

令和 2 年 9 月 16 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K00838

研究課題名(和文) タンパク質の品質管理機構におけるビタミンCの役割

研究課題名(英文) Effect of vitamin C in protein quality control

研究代表者

曽根 保子 (SONE, Yasuko)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・准教授

研究者番号：80452027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内のタンパク質品質管理システムにおけるビタミンCの影響を明らかにするため、培養細胞のタンパク質品質管理システムにおいて、小胞体ストレスを誘導し、小胞体ストレス応答時におけるビタミンCの影響を解析した。その結果、細胞内のビタミンCは、一部の小胞体ストレス応答因子の誘導を抑制したほか、ミスフォールドしたタンパク質のみを分解系へ輸送するタンパク質分解に関わる因子の発現も抑制した。このことから、ビタミンCは細胞内のタンパク質品質管理システムに深く関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、タンパク質品質管理システムにおいて、小胞体ストレスを引き起こした際、ビタミンCが小胞体ストレス応答因子やタンパク質分解に関わる因子の発現を抑制したことなどを明らかとしており、ビタミンCがタンパク質品質管理システムに関与する可能性を示唆するものである。この分野についての研究はこれまでに少なく、十分に明らかとされていない。したがって、本研究で得られた知見は新規性の点から学術的意義が認められる。さらに、今後、タンパク質品質管理システムにおけるレドックス環境とビタミンCの関係、及びビタミンC摂取量とその反応性についての詳細を明らかにできれば、健康維持・増進の観点からさらに社会的意義が高まる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of vitamin C on the response of endoplasmic reticulum stress by inducing an abnormal state (ER stress) in the protein quality control system of cultured cells. As a result, intracellular vitamin C suppressed the induction of some endoplasmic reticulum stress response factors, as well as the expression of factors involved in proteolysis that transport only misfolded proteins to the degradation system. This suggests that vitamin C may be deeply involved in the intracellular protein quality control system.

研究分野：複合領域

キーワード：ビタミンC タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞には新しく合成されたタンパク質の立体構造を形成するための機構が存在する。新しく合成されたタンパク質は、小胞体でジスルフィド形成、糖鎖付加、リン酸化など種々の修飾を受けて成熟するが、この際に何らかのストレスが負荷され、その機能や恒常性が失われると、正しい立体構造が形成されず、折りたたみ不全なタンパク質(ミスフォールドタンパク質)が蓄積する。

このような状況が起こるとセンサータンパク質がこの状況を察知し、小胞体を起源とする小胞体ストレス応答(unfolded protein response)が活性化し、これらの欠陥タンパク質を速やかに分解除去する機構がはたらく。しかし、何らかの強い、長時間に及ぶ負荷がかかった場合には、これらの機構が破綻し、小胞体自身の機能が失われたり、処理できない多量の未成熟タンパク質が異常蓄積したり、あるいは、小胞体ストレス応答そのものが異常活性化を起こし、最終的に神経変性疾患や糖尿病など多くの疾患のトリガーとなることが報告されている。

本来、小胞体にはタンパク質の機能獲得・維持のための機構が備わっているが、これには小胞体内腔のレドックス環境が密接に関連していると考えられている。小胞体内腔はサイトゾルと比較して酸化しており、この環境がタンパク質のジスルフィド結合形成を有利にするだけでなく、小胞体内に存在する多くの酸化還元酵素によるジスルフィド結合の形成・異性化を助けている。そのため、小胞体内のレドックス制御はタンパク質の品質管理にとって非常に重要な要素である。

他方、ビタミン C はその分子内にエンジオールを有する特異的構造から、生体内でさまざまな酸化還元反応に密接に関与する。これまでも、食品中での検討において、Ero1(Endoplasmic reticulum oxidation 1)、PDI(protein disulfide isomerase)、ビタミン C を併用することにより、グリアジン画分やグルテニン画分のジスルフィド結合の形成量が増加したとの報告もある。そのため、ビタミン C は電子の授受を介して、小胞体内腔でのジスルフィド結合形成やレドックス制御に深く関与し、タンパク質の品質管理機構にも影響を及ぼす可能性が考えられる。

小胞体でのジスルフィド結合の形成機構においては、細胞内でタンパク質ジスルフィド結合を創りだす酵素 Ero1 と PDI を中心とする Ero1-PDI レドックスネットワークが形成され、新たな合成タンパク質にジスルフィド結合が導入される。このレドックスネットワークの過程で、ビタミン C が何らかのはたらきをもつ可能性も考えられる。

しかしながら、上述のようなタンパク質品質管理システムにおいて、小胞体内のジスルフィド結合の形成過程、レドックス制御の過程において、ビタミン C が何らかの影響を及ぼすのか、また、影響を及ぼすのであれば、どこで、どのように関与しているかについての分子メカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

タンパク質品質管理制御におけるレドックスネットワークやこれにかかわるシステムのどの過程で、どのようにビタミン C が関連するかは明らかにされておらず、その具体的な効果の程度についても明らかでない。そこで、本研究では、小胞体内でのタンパク質の品質管理機構におけるビタミン C の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

培養細胞系を用い、下記の項目について検討した。1) 細胞内小器官(小胞体とサイトゾル)の分画精製の検討、2) 細胞内の小器官(小胞体とサイトゾル)におけるビタミン C 貯留量の分析、3) DTNB(Ellman)法による小胞体内およびサイトゾルでのジスルフィド結合の定量などを試みた。続いて、ビタミン C 負荷による 4) 小胞体内のストレス応答因子によるストレスレベルの評価、5) EDEM(ER-degradation enhancing -mannosidase like protein)を指標としたミスフォールドタンパク質レベルの評価を行った。

4. 研究成果

本研究では、安定型ビタミン C を培養細胞系へ添加し、細胞にビタミン C 量を取り込ませた後、細胞内のビタミン C 貯留量を評価した。その結果、培養 48 時間までは細胞内ビタミン C 量の増加を認めた。さらに、予め細胞内にビタミン C を一定量以上取り込ませた培養細胞に対し、3 種類の異なる小胞体ストレス誘導剤を添加することにより小胞体ストレスを人為的に惹起させ、小胞体ストレス応答時におけるビタミン C の影響を解析した。その結果、細胞内にビタミン C を含むグループで分子シャペロン、及びアポトーシス促進遺伝子の発現が抑制された。これらの結果についての一部を図 1 に示す(factor1 のタンパク質発現解析結果)。

いずれの小胞体ストレス誘導によっても、小胞体ストレス応答因子のタンパク質発現が著しく増加した。これに対し、予め細胞内にビタミン C を取り込ませておいたグループでは、その発現が抑制された。上述の結果のなかには、ビタミン C 量に依存的な因子もあったものの、その量と反応性については更なる検討が必要であった。

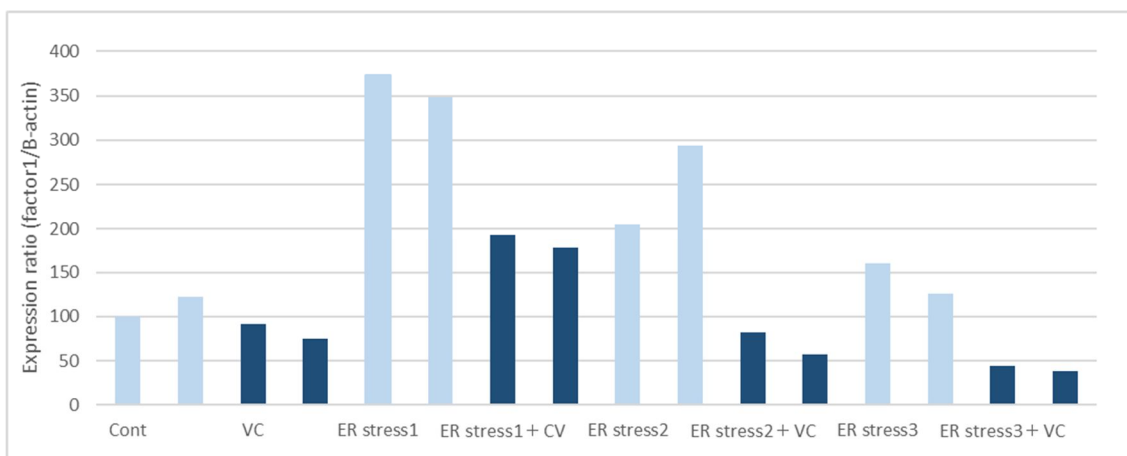


図 1. factor1 のタンパク質発現解析結果

本研究では、細胞内でタンパク質ジスルフィド結合を創り出す酵素 Ero1 と PDI を中心とする Ero1-PDI レドックスネットワークが小胞体ストレスにより活性化され、これらにかかわる因子が大きく変動することを期待していたが、本研究では、これらの大きな変化を捉えることはできなかった。

さらに、EDEM を指標としたミスフォールドタンパク質レベルの評価、及びビタミン C の影響についての評価を行った。EDEM は小胞体中で Mannose 8B form の糖タンパク質を認識して、小胞体からサイトゾルへの逆輸送を促進し、小胞体関連分解 (ERAD) を促進する因子として知られており、正しくフォールディングされたタンパク質とミスフォールドしたタンパク質を見分け、ミスフォールドしたタンパク質のみを分解系へもっていくことから、小胞体ストレス時には非常に重要な因子となる。

小胞体ストレスを惹起させた培養細胞において、ビタミン C の添加により、同定されている EDEM の機能的ホモログのうち、特定の因子の発現が減少した。したがって、ビタミン C が小胞体ストレス時におけるタンパク質分解の過程にも何らかのかたちで関与している可能性が認められた。ただし、小胞体ストレスの誘導時においても、EDEM の発現誘導は微増であったことから、これらの結果の解釈については、更なる検証が必要である。

加えて、細胞内小器官 (小胞体とサイトゾル) の分画精製を行い、細胞試料を小胞体とサイトゾルに分画後、小胞体とサイトゾルのそれぞれにおけるタンパク質発現解析、ビタミン C 量の測定を行った。しかしながら、分画精製の過程で、目的成分の分解が大きく、再現性の高い結果は得られなかった。また、DTNB 法による小胞体内およびサイトゾルでのジスルフィド結合の定量についても細胞内小器官レベルでは結果が安定せず、さらなる検討が必要であると考えられた。

以上より、ビタミン C は一部の小胞体ストレス応答因子やタンパク質分解に関わる因子の発現抑制を介して、細胞内のタンパク質品質管理システムに深く関与する可能性が示唆された。しかし、その詳細なメカニズムについては、今後更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoko Fujiwara, Chisato Tsukahara, Naoe Ikeda, Yasuko Sone, Yasuko Sone, Tomoko Ishikawa, Ikuyo Ichi1, Taisuke Koike, and Yoshinori Aoki.	4. 巻 61
2. 論文標題 Oleuropein improves insulin resistance in skeletal muscle by promoting the translocation of GLUT4.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 196-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Tomoko, Sato Yoko, Kurimoto Kyoko, Sone Yasuko, Akamatsu Rie, Fujiwara Yoko	4. 巻 4
2. 論文標題 Curricular evaluation of "SHOKUIKU program" as a postgraduate minor course of food and nutrition education using a text-mining procedure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Nutrition	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40795-018-0246-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 曽根保子、花岡美憂、村山加奈、井野大輝。
2. 発表標題 小胞体ストレス応答遺伝子に対するビタミンCの影響。
3. 学会等名 日本ビタミン学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sone Y, Morito K, Narita T, Egawa S, Kawahara K, Otsuka Y, Fujiwara Y.
2. 発表標題 Efficacy of Habitual Exercise for Improving Lipid Profiles Depends on the PPAR-gamma Genotype in Japanese Males.
3. 学会等名 12th Asian Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Sato H, Kawamura Y, Tomino S, Sonoda M, Ichi I, Sone Y, Ishikawa T, Fujiwara Y.
2. 発表標題 Tocotorienol improves the glucose tolerance in obese mice induced by high fat feeding.
3. 学会等名 12th Asian Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 曽根 保子、山本 彩矢、小林 詩歩、中川 理紗
2. 発表標題 小胞体ストレスに対するビタミンCの影響
3. 学会等名 日本家政学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究内容 http://www.takasaki-u.ac.jp/p_eiyo_labo/7995/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考