

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：35303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23817

研究課題名(和文)ケミカルゲノミクスによる小胞体ストレス応答制御機構の解明

研究課題名(英文)A chemical genomics approach to elucidate the regulation of unfolded protein response

研究代表者

北風 圭介 (Kitakaze, Keisuke)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80840545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレス応答(UPR)は小胞体の恒常性を保つための適応応答機構である。UPRを制御する新規タンパク質を見出し、その機序を明らかにすることができれば、疾患の治療標的になることが期待される。本研究では標的既知の低分子化合物ライブラリーとUPRレポーター細胞を用いた網羅的な探索を行い、UPRを制御する新規タンパク質の候補としてTRPV1およびVEGFR2を同定した。TRPV1は小胞体内のイオン濃度を変化させることでUPRを活性化し、VEGFR2はIRE1-XBP1経路に寄与することでUPRを抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケミカルゲノミクスの手法は、発現量の解析だけでは発見できない新規UPR制御タンパク質を探索できる点に優れており、本研究では創薬標的になりやすく、小胞体機能への関与の可能性が高い分子群に着目した。本研究によりUPR制御タンパク質候補を発見したことにより、小胞体ストレスを原因とする疾患の発症機序の解明や治療薬開発につながることを期待される。加えて、本研究は探索研究の方法論確立という側面も持っており、本研究の手法は様々なシグナル伝達経路における探索研究にも応用可能であり、生命科学の広い分野に対して有用性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：The cell has an adaptive system against endoplasmic reticulum stress called unfolded protein response (UPR). The discovery of novel proteins that regulate the UPR and the elucidation of their mechanisms will lead to the development of therapeutic targets for diseases. In this study, we performed a comprehensive screening for proteins that regulate the UPR using a compound library and UPR reporter cells and identified TRPV1 and VEGFR2 as candidate proteins. Our data suggest TRPV1 activates the UPR by altering ion concentrations in the ER, and VEGFR2 suppresses the UPR by contributing to the IRE1-XBP1 pathway.

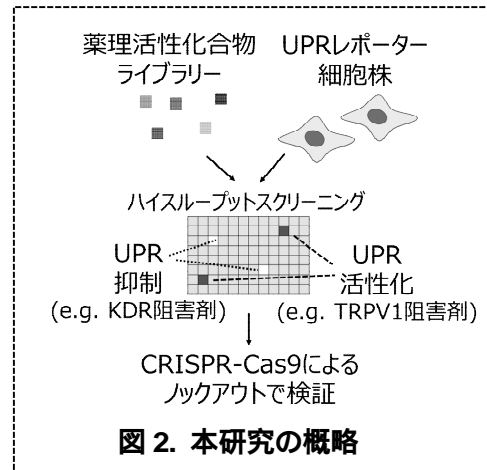
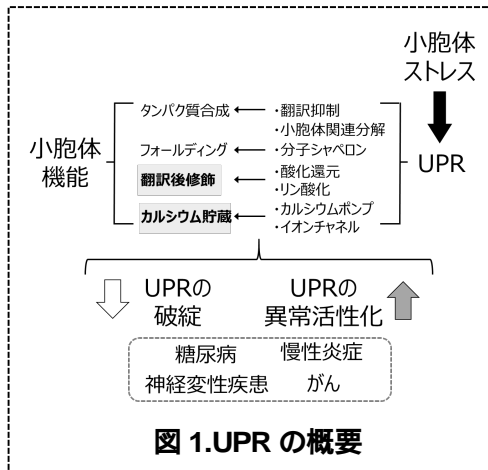
研究分野：生物系薬学

キーワード：ケミカルゲノミクス 小胞体ストレス応答 CRISPR TRPV1 VEGFR2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小胞体の機能としてタンパク質合成、プロセッシングおよびカルシウム貯蔵がよく知られている。小胞体ストレスは小胞体に折り畳み不全タンパク質が蓄積すること等で生じ、細胞は恒常性を保つために小胞体ストレス応答 (UPR) という適応機構を活性化させるが、UPR の破綻や異常活性化は糖尿病、慢性炎症、神経変性疾患、がん等の様々な疾患の発症に寄与することが報告されている。これまでの UPR 関連タンパク質の網羅的探索により、様々な UPR 関連タンパク質が見出されたが、UPR が翻訳後修飾やカルシウム貯蔵をどのように制御しているのかについては未だ不明な点が多い (図 1)。ケミカルゲノミクスは阻害剤等の生命現象を攪乱する化合物を利用して関連因子を網羅的に探索する手法であり (参考文献 1)、遺伝子の機能重複等に影響されず、かつ化合物を加えるタイミングを制御できることから、これらの小胞体機能を調べる有用なツールになることが期待できる。



2. 研究の目的

小胞体ストレスは、細胞のタンパク質合成の場である小胞体に折り畳み不全タンパク質が蓄積することにより生じる。細胞は恒常性を保つために小胞体ストレス応答 (UPR) という適応機構を活性化させストレスを解消する (参考文献 2)。様々な原因による UPR の破綻や異常活性化は糖尿病、神経変性疾患や癌等の様々な疾患の発症に寄与することが報告されている (参考文献 3-5)。UPR を制御する新規タンパク質を見出し、その生理学的・病態生理学的意義を明らかにすることができれば、様々な疾患の新規治療ターゲットになることが期待される。本研究ではキナーゼやホスファターゼ等の酵素活性、あるいはイオンチャネルといった創薬標的になりやすく、かつ発現量の解析だけでは発見できない分子群に特に着目し、製薬企業から提供された標的既知の 1 万以上の低分子化合物で構成されるライブラリーと UPR レポーター細胞を用いた網羅的な探索を行うことで、UPR を制御する新規タンパク質を見出し、その UPR 制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究方法の概略を図 2 に示した。化合物スクリーニングは、96、384 あるいは 1536 穴プレートに薬理活性化化合物を分注し、我々が樹立した 293A-EUA-EGFP レポーター細胞 (以下 UPR レポーター細胞) (参考文献 6) を加えると同時に、小胞体ストレス誘導剤である 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ツニカマイシンおよび 20 nM タブシガルギンの混合溶液を添加し、24 時間後の EGFP の蛍光強度をプレートリーダーもしくは Operetta CLS ハイコンテンツイメージングシステム (パーキンエルマー) で測定した。化合物の解析には TIBCO Spotfire Analyst および ChemFinder ultra を用いた。CRISPR-Cas9 系によるノックアウト (KO) 細胞株の樹立は、UPR レポーター細胞あるいはヒト血管内皮細胞株 EA.hy926 に組み換えレンチウイルスベクターを用いて guide RNA および SpCas9 を発現させ、限界希釈法により KO クローンを単離した。塩基配列の挿入欠失はサンガーシーケンシングにより、タンパク質発現はウエスタンブロットにより確認した。KO 細胞株への TRPV1 のレスキュー実験は、ラット TRPV1 の N 末端に Myc-tag、C 末端に KDEL あるいは KKMP 配列を付加し、レンチウイルスベクターを用いて強制発現させた。UPR 下流因子の発現は定量的 PCR 法およびウエスタンブロット法により解析した。

4. 研究成果

我々は、12,426 種類の薬理活性化合物のスクリーニングを行い、UPR レポーター活性を顕著に増減させる 172 種類のヒット化合物の同定に成功した。これらの化合物に共通する標的タンパク質として UPR 活性化因子を 4 候補、UPR 抑制因子を 8 候補見出し、このうち最も顕著に UPR レポーター活性が変化した 2 つのタンパク質に着目した。1 つ目のタンパク質である Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) はイオンチャネルであり、UPR 活性化因子の候補として見出された。もう一つのタンパク質である血管内皮細胞増殖因子受容体 VEGFR2 は受容体型チロシンキナーゼであり、UPR 抑制因子の候補として見出された。これらの候補について、CRISPR-Cas9 系を用いたゲノム編集を行い、KO 細胞株を樹立した。UPR レポーター細胞のレポーター活性測定により、TRPV1 KO 細胞株では野生型 (WT) よりも小胞体ストレス誘導剤であるツシカマイシンやタブシガルギンに対する UPR が減弱していることが明らかとなった(図 3)。TRPV1 は一部が小胞体膜上に局在することが報告されているが、その機能はよく分かっていない。そこで、TRPV1 KO 細胞株に対し、C 末端に小胞体膜局在シグナル (KKXX) を付加した TRPV1 を強制発現させた。TRPV1-KKXX 発現細胞株のレポーター活性は野生型と同レベルに回復することが明らかとなった。一方で小胞体局在シグナル (KDEL) を付加した TRPV1-KDEL 発現細胞株のレポーター活性は KO 株とほとんど変わらなかった。また、定量的 PCR の解析から、UPR を構成する PERK 経路、IRE1 経路および ATF6 経路の全てで UPR レポーター活性と同様の傾向が認められた。以上から、小胞体膜上に局在する TRPV1 が小胞体ストレス応答全般に関与することが明らかとなった。TRPV1 はナトリウムイオンやカルシウムイオンなどの陽イオンを通すイオンチャネルであることから、小胞体膜上の TRPV1 が小胞体内のカルシウム濃度変化に寄与することが示唆される。一方で、VEGFR2 KO 細胞株では小胞体ストレス誘導剤の非存在下であるにも関わらず、UPR が活性化していた(図 4)。ウエスタンブロット法によるタンパク質発現解析の結果から、UPR のうち、主に IRE1-XBP1 経路の活性化による可能性が考えられた。さらに、内在性 VEGFR2 の発現が高いヒト血管内皮細胞株 EA.hy926 についても CRISPR-Cas9 系を用いたゲノム編集を行い、複数の KO 株の作製に成功した。今後、本細胞株を用いてさらなる解析を進めていく予定である。以上より本研究では、UPR を制御する新規タンパク質の候補を複数見出すことに成功した。加えて、探索研究の方法論としても有用であることを示すことができた。

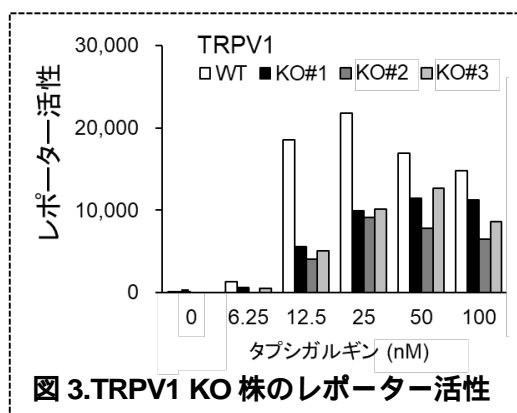


図 3. TRPV1 KO 株のレポーター活性

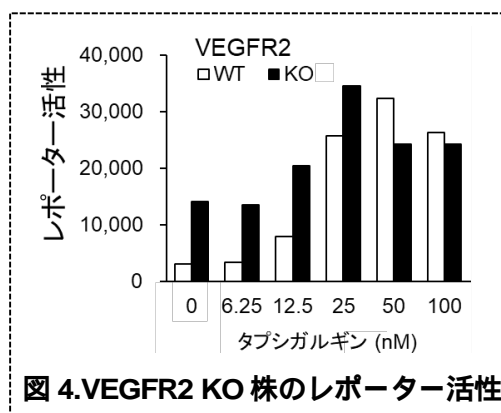


図 4. VEGFR2 KO 株のレポーター活性

<参考文献>

- (1) Zheng XF, Chan TF: Chemical genomics in the global study of protein functions. *Drug Discov Today* 2012;7(3): 197–205
- (2) Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ: Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21:421–438
- (3) Hotamisligil GS: Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140(6):900–917
- (4) Martínez G, Khatiwada S, Costa-Mattioli M, Hetz C: ER proteostasis control of neuronal physiology and synaptic function. *Trends Neurosci* 2018;41(9):610–624
- (5) Clarke HJ, Chambers JE, Liniker E, Marciniak SJ: Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer Cell* 2014;25(5):563–573
- (6) Kitakaze K, Taniuchi S, Kawano E, Hamada Y, Miyake M, Oyadomari M, Kojima H, Kosako H, Kuribara T, Yoshida S, Hosoya T, Oyadomari S: Cell-based HTS identifies a chemical chaperone for preventing ER protein aggregation and proteotoxicity. *eLife* 2019;8:e43302

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitakaze Keisuke, Taniuchi Shusuke, Kawano Eri, Hamada Yoshimasa, Miyake Masato, Oyadomari Miho, Kojima Hirotsu, Kosako Hidetaka, Kuribara Tomoko, Yoshida Suguru, Hosoya Takamitsu, Oyadomari Seiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Cell-based HTS identifies a chemical chaperone for preventing ER protein aggregation and proteotoxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e43302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.43302	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keisuke Kitakaze, Shusuke Taniuchi, Eri Kawano, Yoshimasa Hamada, Masato Miyake, Miho Oyadomari, Hirotsu Kojima, Hidetaka Kosako, Tomoko Kuribara, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Seiichi Oyadomari
2. 発表標題 Identification of a chemical chaperone for mitigating protein aggregation and proteotoxicity during endoplasmic reticulum stress
3. 学会等名 Experimental Biology 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北風圭介, 親泊美帆, 張君, 濱田良真, 竹之内康広, 坪井一人, 藤谷与士夫, 岡本安雄, 親泊政一
2. 発表標題 小胞体ストレス下において転写因子ATF4は臍 細胞同一性を維持する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北風圭介, 親泊美帆, 張君, 津川和江, 河野恵理, 三宅雅人, 竹之内康広, 坪井一人, 岡本安雄, 親泊政一
2. 発表標題 小胞体ストレス応答転写因子ATF4の機能不全は臍 細胞の脱分化を惹起する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北風圭介, 親泊美帆, 張君, 津川和江, 河野恵理, 三宅雅人, 竹之内康広, 坪井一人, 岡本安雄, 親泊政一
2. 発表標題 臍 細胞における小胞体ストレス応答転写因子ATF4の機能解明
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北風圭介, 谷内秀輔, 河野恵理, 濱田良真, 三宅雅人, 親泊美帆, 小島宏建, 小迫英尊, 栗原ともこ, 吉田優, 細谷孝充, 親泊政一
2. 発表標題 小胞体ストレス下のタンパク質凝集を標的とする新規化学シャペロンの同定
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北風圭介, 谷内秀輔, 河野恵理, 濱田良真, 三宅雅人, 親泊美帆, 小島宏建, 小迫英尊, 栗原ともこ, 吉田優, 細谷孝充, 親泊政一
2. 発表標題 小胞体ストレス下のタンパク質凝集と細胞毒性を緩和する化学シャペロンの同定
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------