

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659043

研究課題名（和文） 小胞体ストレスによる病態発症とその防御策の探索

研究課題名（英文） Development and prevention of disease states caused by endoplasmic reticulum stress

研究代表者

小林 麻己人 (KOBAYASHI MAKOTO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50254941

研究成果の概要（和文）：

突然変異ゼブラフィッシュ系統の解析により、小胞体ストレスが肝細胞のリソソーム残渣を蓄積させることを見出した。リソソーム残渣の蓄積は、老化や神経変性症との関連が指摘されており、酸化ストレスとの関わりも注目される。そこで、小胞体ストレスと酸化ストレスとの関連性を探るために、酸化ストレス応答に重要な因子 Nrf2 の突然変異系統を作出し、小胞体ストレスを自然発症する突然変異ゼブラフィッシュ系統との二重変異系統を作製・解析した。

研究成果の概要（英文）：

Residual bodies of lysosomes were found to be accumulated in the liver cells in the zebrafish mutant *it768* in which endoplasmic reticulum (ER) stress were spontaneously upregulated. The results were interesting since accumulation of residual bodies had been implied to be associated with oxidative stress. To elucidate relationship between ER stress and oxidative stress, we generated and analyzed a mutant zebrafish of Nrf2, a master regulator of antioxidant genes, and the double mutant of Nrf2 and *it768*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	0	1,100,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	300,000	3,400,000

研究分野：分子発生生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：小胞体ストレス、酸化ストレス、Nrf2、ゼブラフィッシュ、突然変異系統

1. 研究開始当初の背景

異常タンパク質が小胞体内に蓄積すると、細胞の生存が脅かされる。細胞はこれを回避するために小胞体ストレス応答を起こす。近年、糖尿病や神経変性疾患に対する小胞体ストレスの関与が明らかとなってきたが、優れた動物モデルが少なく、その病態発症機序については不明な点が多い。研究代表者は、小

胞体ストレスを自然発症する病態モデル動物（ゼブラフィッシュ突然変異系統 *it768*）の開発に成功した。この系統は、酸化ストレス防御の中心を担う Nrf2 システムが活性化されており、小胞体ストレス応答と酸化ストレス防御のクロストークが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、小胞体ストレスを自然発症するゼブラフィッシュ系統を用いて、小胞体ストレスによる病態発症機構の全体像を解明し、病態改善に向けた戦略を探ることを目的とした。特に、小胞体ストレス応答における Nrf2 システムの活性化に着目し、Nrf2 システムを活用した小胞体ストレス防御の可能性を追求した。

3. 研究の方法

小胞体ストレスを自然発症する突然変異ゼブラフィッシュ系統 *it768* の致死性や病態解析を行った。次に、Nrf2 変異系統を作製し、*it768* 系統の二重変異系統の解析により、小胞体ストレス応答における Nrf2 の生理的役割の解明を試みた。さらに、*it768* 系統の病態を緩和する低分子化合物の探索も行った。

4. 研究成果

本研究の遂行により、次の5点を明らかにした。

(1) *it768* 系統の病態解析

it768 変異幼魚は、生後2週間で致死となった。死因は、摂食障害と推測され、小胞体ストレスとの関連性は特定できなかった。小胞体ストレスによる障害は、肝細胞におけるリソソーム残渣の蓄積であった。小胞体ストレスとオートファジーの関連性を示唆するが、詳細はまだ不明である。

(2) 小胞体ストレス応答型 GFP レポーター系統の作製と解析

小胞体ストレスに応答して GFP 発光するトランスジェニックゼブラフィッシュ *gstp1*-GFP 系統を開発した。この GFP 発光は PERK ノックダウンで激減することから、小胞体ストレスを感知して、Nrf2 にそのシグナルを伝達するのは PERK であることがわかった。一方、常時活性化型 PERK を過剰発現しても Nrf2 は活性化されないことから、PERK と Nrf2 の間に介在する分子の存在が示唆された。

(3) Nrf2 変異系統の作製と解析

TILLING 法により Nrf2 変異ゼブラフィッシュを開発した。生育・生殖とも正常であることから、Nrf2 が生育に必須でない因子であることが示された。一方、Nrf2 変異系統、過酸化化物に対する致死性が極めて高いことが示され、Nrf2 が酸化ストレス耐性を担う因子であることが示された。

(4) 二重変異系統の作製と解析

Nrf2 変異系統と小胞体ストレスを自然発症する *it768* 系統の二重変異系統を作製した。致死性は、*it768* 単独変異系統と同様であることから、摂食障害と Nrf2 には関連性がないことを示唆された。小胞体ストレス応答における Nrf2 の生理的意義解明は今後の課題である。

(5) 病態緩和化合物の探索

it768 の病態（致死性・摂食障害）を緩和する低分子化合物として、各種ケミカルシャペロン・Nrf2 活性化剤・プロテアソーム阻害剤処理を試みたが、いずれも効果がなかった。別角度からのアプローチが必要と判断した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Tsujita, T., Akiyama, S., Wakasa, T., Mukaigasa, M., Kaneko, H., Tamaru, Y., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. (2011) Tissue-restricted induction of Nrf2 and its target genes in zebrafish with gene-specific variations in the induction profiles. *PLoS ONE* 6: e26884. 査読有 (doi:10.1371/journal.pone.0026884)
2. Ishitobi, H., Wakamatsu, A., Liu, F., Azami, T., Hamada, M., Matsumoto, K., Kataoka, H., Kobayashi, M., Choi, K., Nishikawa, S., Takahashi, S. and Ema, M. (2011) Molecular basis for *Flk1* expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse. *Development* 138: 5357-5368. 査読有 (doi:10.1242/dev.065565)
3. Tsujita, T., Li, L., Nakajima, H., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Ohashi, K., Kawakami, K., Kumagai, Y., Freeman, B. A., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. (2011) Nitro-fatty acids and cyclopentenone prostaglandins share strategies to activate the Keap1-Nrf2 system: a study using green fluorescent protein transgenic zebrafish. *Genes Cells* 16: 46-57. 査読有 (doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01466.x)
4. Takeuchi, M., Kaneko, H., Nishikawa, K., Kawakami, K., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. (2010) Efficient transient rescue of hematopoietic mutant phenotypes in zebrafish using

- Tol2*-mediated transgenesis. *Dev. Growth Differ.* 52: 245-250. 査読有 (doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01168.x)
5. Kobayashi, M. (2010) Harnessing the antioxidant power with ARE-inducing compounds. *Chem. Biol.* 17: 419-420. 査読無 (doi: 10.1016/j.chembiol.2010.05.003)
 6. Iida, A., Sakaguchi, K., Sato, K., Iwaki, A., Takeuchi, M., Kobayashi, M., Misaki, K., Yonemura, S., Kawahara, A. and Sehara-Fujisawa, A. (2010) Metalloprotease-dependent onset of blood circulation in zebrafish. *Curr. Biol.* 20: 1110-1116. 査読有 (doi:10.1242/dev.065565)
 7. Mukaigasa, K., Hanasaki, A., Maeno, M., Fujii, H., Hayashida, S., Itoh, M., Kobayashi, M., Tochinai, S., Hatta, M., Iwabuchi, K., Taira, M., Onoe, K. and Izutsu, Y. (2009) The keratin-related Ouroboros proteins function as immune antigens mediating tail regression in *Xenopus* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 18309-18414. 査読有 (doi: 10.1073/pnas.0708837106)
- [学会発表] (計 24 件)
1. 向笠勝貴、Nguyen Linh Thi Phuong、李麗、中島瞳、小林麻己人: 酸化ストレスに対して高い感受性を示す Nrf2 変異ゼブラフィッシュ, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 13 日-16 日.
 2. 中島瞳、中島やえ子、小林麻己人. Nrf2 によるゼブラフィッシュヘムオキシゲナーゼ 1 の肝臓特異的な発現誘導, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 13 日-16 日.
 3. 中島瞳、向笠勝貴、小林麻己人. Nrf2 標的遺伝子の組織特異的発現誘導. 転写研究会若手シンポジウム, 東京, 2011 年 2 月 18 日.
 4. Takeuchi, M., Watanabe, M., Ohashi, K., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. Gene regulation of Gata1 by a histone demethylase LSD1 in zebrafish, The 5th International Symposium on GATA Factors: Function and Regulation of GATA factors in Development and Diseases, Sendai, November 17-19, 2010.
 5. 中島瞳、李麗、向笠勝貴、小林麻己人. 誘導プロファイルの違いにより分類される Nrf2 標的遺伝子群. 第 16 回小型魚類研究会, 埼玉, 2010 年 9 月 18 日-19 日.
 6. 大橋健、竹内未紀、渡辺真奈、小林麻己人. 赤血球分化を進行させる転写因子 Gata1 の分化に伴う発現制御の変遷. 第 16 回小型魚類研究会, 埼玉, 2010 年 9 月 18 日-19 日.
 7. Li, L., Mukaigasa, K., Tsujita, T., Nakajima, H., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. A spontaneous ER stress caused by a genetic mutation in zebrafish induces a constitutive activation of the Nrf2 defense system. The 3rd International Symposium on Protein Communication, Nara, September 13-16, 2010.
 8. Li, L., Nakajima, H. and Kobayashi, M. Nrf2 transcription activation system comprises a multiple sensing mechanism. The 11th Asian and Oceanian Conference on Transcription, Okinawa, July 1-5, 2010.
 9. Li, L., Nakajima, H., Freeman B.A. and Kobayashi, M. Nitro-fatty acids-induced Nrf2 activation in GFP transgenic zebrafish. 9th International Conference on Zebrafish Development & Genetics, Madison, June 16-20, 2010.
 10. Takeuchi, M., Kaneko, H., Nishikawa, K., Kawakami, K., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. Efficient phenotypic rescue of the zebrafish hematopoietic mutant using Tol2-mediated transgenesis. 第 43 回日本発生生物学会年会, 京都,

- 2010年6月20日-23日.
11. Takeuchi, M., Kaneko, H., Nishikawa, K., Kawakami, K., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. An easy and effective approach to rescue zebrafish mutant phenotypes via transient transgenesis using *To12* constructs. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月9日-12日.
 12. Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Akiyama, S., Wakasa, T., Li, L., Tsujita, T., Kaneko, H., Tamaru, Y., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. Identification of Nrf2-regulated genes in zebrafish. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月9日-12日.
 13. Mukaigasa, K., Li, L., Yagi, H., Tsujita, T., Kato, K., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. A zebrafish model for human congenital disorder of glycosylation. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月9日-12日.
 14. Li, L., Nakajima, H., Tsujita, T., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. GFP transgenic zebrafish is a good tool to classify Nrf2 activators. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月9日-12日.
 15. 岩本典子, 伊藤創平, 小林麻己人, 熊谷嘉人: 親電子性物質による非触媒性 Cys121 の翻訳後修飾を介した PTP1B/EGFR シグナルの活性化. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009年10月21日-24日.
 16. 李麗, 辻田忠志, 向笠勝貴, 矢木宏和, 加藤晃一, 山本雅之, 小林麻己人: ヒト先天性糖鎖形成不全症 CDG-Ia の病態モデルフィッシュ, 第15回小型魚類研究会, 名古屋, 2009年9月12日-13日.
 17. 竹内未紀, 金子寛, 西川恵三, 川上浩一, 山本雅之, 小林麻己人: *To12* システムを利用した一過性レスキュー解析, 第15回小型魚類研究会, 名古屋, 2009年9月12日-13日.
 18. 向笠勝貴, 辻田忠志, 李麗, 山本雅之, 小林麻己人: ゼブラフィッシュを用いたヒト先天性糖鎖形成不全症CDG-Iaの治療戦略の探索, 第15回小型魚類研究会, 名古屋, 2009年9月12日-13日.
 19. 中島瞳, 中島-高木やえ子, 井手玲子, 辻田忠志, 金子寛, 秋山真一, 若狭武司, 田丸浩, 山本雅之, 小林麻己人: ストレス応答型転写因子Nrf2の標的遺伝子群の多様性, 第15回小型魚類研究会, 名古屋, 2009年9月12日-13日.
 20. 李麗, 中島瞳, 中島やえ子, 岩本典子, 熊谷嘉人, 山本雅之, 小林麻己人: Keap1-Nrf2 システムの多様な感知応答機構, 平成21年度日本生化学会関東支部例会「若手が担う次世代型生化学研究」, つくば, 2009年6月20日.
 21. 竹内未紀, 山本雅之, 小林麻己人: 赤血球系列への分化が滞る突然変異ゼブラフィッシュ, 平成21年度日本生化学会関東支部例会「若手が担う次世代型生化学研究」, つくば, 2009年6月20日.
 22. 向笠勝貴, 辻田忠志, 李麗, 山本雅之, 小林麻己人: ヒト先天性グリコシル化異常症の病態モデルゼブラフィッシュの解析, 平成21年度日本生化学会関東支部例会「若手が担う次世代型生化学研究」, つくば, 2009年6月20日.
 23. Mukaigasa, K., Li, L., Tsujita, T., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. : Genetically induced ER stress in a zebrafish model for human congenital disorders of glycosylation, 日本発生物学会第42回大会, 新潟, 2009年5月28日-31日.
 24. Takeuchi, M., Kaneko, H., Kobayashi, M. and Yamamoto, M. : Mutation of the lysine-specific demethylase 1 gene causes lineage-specific defects in zebrafish hematopoiesis, 日本発生物学会第42回大会, 新潟, 2009年5月28日-31日.

[その他]
ホームページ等
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/MDBiology/mdbiol.index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 麻己人 (KOBAYASHI MAKOTO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50254941