

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570222

研究課題名(和文)細胞運命制御に関わる小胞体シグナル系の同定

研究課題名(英文)Identification of the ER signaling system that regulates cell fate decision

研究代表者

森島 信裕 (Morishima, Nobuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号：40182232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の小器官である小胞体は蛋白質新生と輸送開始の場所であるとともに、細胞内の情報発信の役割も担う。本研究は小胞体が発するシグナルのうち、細胞の運命制御に関わり、骨格筋前駆細胞が骨格筋細胞に分化する過程で機能しているものに焦点を当てた。前駆細胞が融合して巨大な筋細胞に変化する直前に小胞体からカルシウムが流出することを見出した。その結果小胞体内に生ずるストレス状態(小胞体ストレス)がストレスセンサーであるATF6を活性化させ、さらにはカスパーゼを活性化させていることが示唆された。また、小胞体ストレス特異的カスパーゼとして私たちが同定したカスパーゼ12は特異的な基質を持つ可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER) is the place of protein synthesis and the starting point of vesicular transport. In addition to these roles, the ER sends out intracellular signals that include those for cell fate decision. This study focuses on the ER signaling that we have already found to be involved in skeletal muscle formation from the progenitor cells (myoblasts) by cell fusion. We have found that ER calcium depletion occurs in differentiating myoblasts, just prior to cell fusion. Because critical enzymes that assist protein folding in the ER require calcium for their activity, calcium depletion causes ER stress. This result suggests that ER stress evoked by calcium depletion activates ATF6, a stress sensor, and caspases in a specific manner. We have also identified a substrate candidate of caspase-12 which was previously shown as the ER stress-specific caspase by us.

研究分野：細胞分化制御

キーワード：筋分化 小胞体ストレス カスパーゼ カルシウム 小胞体

1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレスとは小胞体内においてフォールディング不全を起こしたタンパク質が蓄積する状況を指す。小胞体内でのタンパク質合成過多や何らかの原因によってフォールディングが阻害されると小胞体ストレスが生じる。生体内で見られる小胞体ストレス及び小胞体の機能を阻害する種々の薬剤を使用して生じさせた人為的なストレス、いずれの場合も3種の小胞体ストレスセンサーが揃って活性化し、ストレス解消に向けた応答を起こすと考えられていた。一方、骨格筋の形成過程で私たちが見出した小胞体ストレスは特異的なストレスセンサーを選択的に活性化させていることを示唆するデータを得た。また、形成過程にある骨格筋組織においては生細胞中において、本来アポトーシスを実行するカスパーゼ 12 が低レベルで活性化していることを見出した。

2. 研究の目的

骨格筋の分化過程で生じる小胞体ストレスは特定の原因で生じているため、小胞体センサーを選択的に活性化すると考え、ストレスの原因を探ることを第一の目的とした。また、このような特定の原因が引き起こす小胞体ストレスがどのような影響を細胞に与えるかという点を、アポトーシスを制御、実行するタンパク質の挙動変化やカスパーゼ活性化によって生じる効果の観点から探ることを第二の目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレスセンサーの一つ、ATF6 が特異的に筋前駆細胞中で活性化するという私たちのデータは ATF6 の特別な活性化機構が働いている可能性を示唆する。そこで、筋前駆細胞中において ATF6 結合タンパク質を主に免疫共沈降法を利用して探索し、結合タンパク質の中から ATF6 の活性を制御するタンパク質を同定することを試みた。しかし、ATF6 の細胞内存在量は生細胞中では低いレベルに抑制されていて免疫共沈降実験を著しく困難にすることが判明したため方針を変更し、ATF6 が特異的に活性化される筋前駆細胞中で小胞体ストレスが生じる原因の同定を試みた。

(2) 筋分化過程で重要な役割を果たすことが示唆されたアポトーシス制御タンパク質、アポトーシス実行タンパク質の機能に注目し、筋分化過程への関わりを探ることを試みた。小胞体ストレスによって特異的に活性化することが知られているカスパーゼ 12 が筋分化過程で活性化するデータを得ていたことから、カスパーゼ 12 の基質 (研究開始時点で不明) の探索を *in vitro* 切断を利用した cDNA 発現スクリーニングによって行った。また、基質が切断される意義について焦点をおいた研究を行った。

4. 研究成果

(1) ATF6 の特異的な活性化を引き起こす小胞体ストレス

GFP タグを付けた ATF6 タンパク質を筋芽細胞中で発現させ、抗 GFP 抗体を用いた免疫共沈降を行って回収した。増殖条件下にある筋芽細胞から得られた沈降タンパク質を電気泳動で分離し、質量分析による解析を行ったところ、ATF6、GFP、抗体以外のタンパク質として同定されたものは分子シャペロンやリボソームタンパク質など、免疫共沈降実験においてバックグラウンドとなるタンパク質のみであった。一方、ATF6 の特異的な活性化が起こる分化誘導条件下では GFP-ATF6 タンパク質のレベルが著しく低下することが判明した。ATF6 はプロテアソーム阻害剤存在下で増加することから、ユビキチンプロテアソーム系による量的制御を強く受けている可能性が示唆された。

プロテアソーム阻害剤存在下においては ATF6 の安定化が起こるが、一方でプロテアソーム活性を抑制したことによる細胞毒性が発揮され、アポトーシスが誘導された。この時、ATF6 量は増加するとともに、特異的な切断に依ると思われる ATF6 活性化体が検出された。この条件下では ATF6 以外の小胞体ストレスセンサーの活性化は顕著には起こらなかった。また、同時に小胞体分子シャペロンの増大が起こることから、筋分化過程においてプロテアソーム活性の抑制による ATF6 の安定化と活性化が起こり、それによって小胞体ストレス応答を起さる可能性が示唆された。

骨格筋細胞がその前駆細胞である筋芽細胞の融合によって形成される直前に小胞体ストレスが生じることを私たちは以前報告した。筋芽細胞が融合する過程において小胞体膜構造がどのように変化するか、小胞体を蛍光標識して経時的に観察したところ、細胞融合の直前に膜構造が一部変形し、顕微鏡下で球状に見える構造が一過的に出現することを見出した。小胞体ストレスを引き起こす種々の条件、薬剤を用いてこの特殊構造が形成されるかどうかを検討し、ATF6 の特異的な活性化を引き起こす条件は小胞体からカルシウムが流出してカルシウム濃度が低下することであることをつきとめた。これを裏付けるように、小胞体膜に局在する小胞体カルシウム濃度センサーが細胞融合直前にカルシウム濃度低下を検知し、特徴的な複合体形成を行うことを合わせて明らかにした。従って、筋分化過程における小胞体ストレスは小胞体内カルシウム濃度の低下によって引き起こされ、同時に起こる ATF6 の安定化が特異的な小胞体ストレス応答を招いていることが示唆された。

(2) カスパーゼ 12 の基質

放射性同位体アミノ酸を用いて *in vitro* 合

成したタンパク質のプールに対してカスパーゼ12による切断スクリーニングを行い、14種の基質候補を見出した。基質候補をコードするcDNAクローンを単離し、配列解析を行った。候補のうち、クローン18D4のみがN末端側に膜貫通領を持つ機能未知タンパク質をコードすることが判明した。カスパーゼ12が小胞体上で活性化されることを考慮し、小胞体に局在する可能性のある18D4に注目してさらに解析を進めた。18D4タンパク質とGFPとの融合タンパク質を筋芽細胞中で発現させると小胞体に局在し、蛍光顕微鏡下で網状のパターンを示した。18D4タンパク質は分子量約4万であり、カスパーゼ12によって試験管内切断を行うと少なくとも2カ所で切断された。

カスパーゼ12によって切断されて生じると考えられる細胞質ゾル側の断片のGFP融合体は核に局在した。従って、カスパーゼ12の切断はタンパク質Xの局在を変える役割を果たす可能性が示唆された。ただし、カスパーゼ12による基質候補（以下タンパク質Xと呼ぶ）の切断はタンパク質X内の一ないし二カ所で起こるが、小胞体ストレスによってアポトーシスを起こした細胞中ではタンパク質Xはさらに切断を受け低分子化していた。この切断はカスパーゼ3などの他のカスパーゼによる可能性がある。

カスパーゼ12の基質特異性は非常に厳密であり、少数種類のタンパク質を特異的に切断して何らかの重要な機能を発揮していることが考えられた。タンパク質Xが生体内でも切断されているかどうかを探るため、マウス胚におけるタンパク質Xをウエスタンブロット法によって解析した。その結果、発生過程にあるマウス胚において切断が見られるほか、胚と母体の間に介在する組織である胎盤において特異的な切断が起こっていることを示唆するデータを得た。胎盤は強い小胞体ストレスが生じていることが知られていることから、カスパーゼ12の活性化及びタンパク質Xの切断が起こることが十分考えられるため、胎盤の生細胞でこれらの分子が重要な役割を果たす可能性がある。

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 4 件)

1. N. Morishima and K. Nakanishi
"Proplatelet formation in megakaryocytes is associated with endoplasmic reticulum" *Genes Cells* (査読あり) (in press) (2016)

2. N. Morishima and K. Nakanishi
"Significance of ER Ca²⁺ outflow during

myogenesis" *Channels* (査読なし) **9**, 173-174 (2015)

DOI: 10.1080/19336950.2015.1069504

3. K. Nakanishi, K. Kakiguchi, S. Yonemura, A. Nakano, and N. Morishima
"Transient Ca²⁺ depletion from the endoplasmic reticulum is critical for skeletal myoblast differentiation" *FASEB J.* (査読あり) **29**, 2137-2149 (2015)
DOI: 10.1096/fj.14-261529

4. 森島信裕「細胞ストレスによる分化誘導」*Surgery Frontier* (査読なし) **20**, 23-28 (2013)

[学会発表](計 5 件)

1. 森島信裕、中西慶子「巨核球の最終分化過程における小胞体ストレスの発生」第 87 回日本生化学会大会 2014.10.16 国立京都国際会館(京都府京都市)

2. 中西慶子、垣口貴沙、米村重信、小林俊秀、中野明彦、森島信裕 「筋分化過程における生理的な小胞体ストレスが引き起こす特異的な小胞体構造変化」第 66 回日本細胞生物学会大会 2014.6.11 奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

3. 中西慶子、垣口貴沙、米村重信、中野明彦、森島信裕 「小胞体内カルシウム濃度変化による小胞体構造の制御」第 85 回日本生化学会大会 2012.12.16 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

4. 中西慶子、垣口貴沙、米村重信、中野明彦、森島信裕 "Physiological endoplasmic reticulum (ER) stress is caused by ER calcium depletion in differentiating myoblast cells" 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.13 マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

5. 中西慶子、垣口貴沙、米村重信、中野明彦、森島信裕 "Endoplasmic reticulum (ER) calcium depletion is a cause of physiological ER stress in differentiating myoblast cells" 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会 2012.5.28 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

[その他]

理化学研究所プレスリリース
2015年2月17日 筋肉を動かすカルシウムは筋肉を作る指令役も担う-カルシウム枯渇の指標となる多層化した小胞体膜構造を発見-

http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150217_1/

理化学研究所ニュース

2015年2月26日 "SARC bodies: markers of cellular stress needed for muscle cell differentiation"

http://www.riken.jp/en/pr/topics/2015/20150226_1/

科学技術振興機構サイエンスポータル

2015年2月18日 "筋肉動かす Ca は筋肉作る指令役も担う"

http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash_review/newsflash/2015/02/20150218_03.html#

医学生物学の総合ポータルサイト BioMed サーカス.com レビュー記事

2015年7月22日「小胞体内カルシウムの減少に依存した筋分化制御機構」

http://biomedcircus.com/paper_03_39.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森島 信裕 (MORISHIMA, Nobuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号： 40182232