

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670790

研究課題名(和文) 口腔領域硬組織疾患克服に向けた小胞体品質モニタリングプローブの新規開発

研究課題名(英文) Development of ER quality monitoring probe to characterize the oral tissue disease

研究代表者

西頭 英起 (Nishitoh, Hideki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00332627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体の健康状態が低下した際には、小胞体内に不良タンパク質が蓄積する。このことを利用して、小胞体内腔に蛍光タンパク質GFPを発現させ、その蓄積量を経時的にモニターすることで、小胞体の品質管理を定量化することを目指した。そのための技術的ハードルとして、通常小胞体内は酸性のためシステイン間のジスルフィド結合を有するGFPは立体構造が緩み蛍光強度が下がる。この問題点を解決するため、システインを持たないGFP変異型[GFPcys(-)]の作成を行った。これによって得られるプローブを、各種細胞に遺伝子導入し小胞体の状態をモニターし、生細胞における小胞体ストレス状態の可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：When the functional quality of the endoplasmic reticulum (ER) is reduced, unfolded proteins accumulate in the ER. We tried to express the fluorescent protein GFP in the ER lumen and monitor the amount of unfolded proteins. As technical hurdle to do that, GFP in the ER is lower fluorescence intensity because of the loose of three-dimensional structure with the disulfide bond. To solve this problem, GFP variants having no cysteine [GFPcys (-)] was carried out. By using this probe, this gene was introduced into various cells and we succeeded in visualizing the ER stress conditions in living cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ストレス 可視化

1. 研究開始当初の背景

歯と骨の形成とその破綻による疾患のメカニズムを考える上で、骨基質など全ての分泌タンパク質が通過する小胞体(ER)の機能を理解することは不可避である。しかし、小胞体のみならず細胞内オルガネラが発信するシグナルに着目した硬組織研究は数少なかった。本研究では、品質管理が保たれた「元気なERか?」機能不全に陥った「弱ったERか?」を可視化する新規の小胞体品質検出プローブ(ER quality control monitoring probe)を開発し、これまでにない視点での硬組織研究を目指した。

2. 研究の目的

口腔領域において、歯と骨の発生とその異常による疾患の分子メカニズムを明らかにすることは重要である。これまで多くの研究者による実績から、硬組織形成に関わる様々なシグナル伝達経路が明らかにされてきたが、細胞内オルガネラが発信するシグナルに着目した研究は数少ない。骨形成過程では、I型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシン、骨形成因子などの骨基質タンパク質やシグナルリガンドが大量に産生されており、その産生異常は硬組織形成異常を引き起こす。このような分泌タンパク質の全ては、小胞体内腔へ翻訳・輸送され、糖鎖付加・ジスルフィド結合などの修飾を受け高次構造を獲得し、ゴルジ装置を経由して細胞外に分泌される。このように、多くの分泌タンパク質を産生する細胞では、小胞体の品質管理機構が十分に機能していなければならない。例えば膵臓の細胞では大量のインスリンを、形質細胞では大量の抗体を産生しており、それらの細胞内の小胞体機能異常はそれぞれ糖尿病、抗体産生異常を引き起こす。硬組織においても同様で、骨芽細胞・軟骨細胞での小胞体機能異常は、それぞれ骨・軟骨組織の形成異常を引き起こすことが知られている。一方、口腔がんは顎骨浸潤を伴うことが多く、重大な口腔機能障害をもたらす。その骨浸潤・骨吸収の過程では破骨細胞の機能が過剰亢進しており、その際にもやはり様々な分泌タンパク質が産生され、そのため小胞体機能が更新していることが予想される。従って、硬組織形成を担当する細胞群における小胞体品質管理機構を理解し、その制御方法を探索することは、様々な疾患の克服に繋がると考えられる。

3. 研究の方法

小胞体ストレス状況すなわち小胞体の健康状態が低下した際には、小胞体内に不良タンパク質が蓄積する。このことを利用して、小胞体内腔に蛍光タンパク質 GFP を発現させ、その蓄積量を経時的にモニターすること

で、小胞体の品質管理を定量化することを目指した。そのための技術的ハードルとして、通常小胞体内は酸性のためシステイン間のジスルフィド結合を有する GFP は立体構造が緩み蛍光強度が下がる。この問題点を解決するため、システインを持たない GFP 変異型[GFPcys(-)]をスクリーニングした。これによって得られたプローブを、各種細胞に遺伝子導入し、それぞれのステージにおける小胞体の状態をモニターし、細胞・個体レベルに導入しその有用性を検証した。

4. 研究成果

酸化条件下で蛍光を発する GFPcys(-)の作製

GFP タンパク質は、細胞質内で バレル(樽型)構造をしており、このような高次構造を獲得することで 450nm 付近の吸収波長で励起され蛍光を発する。しかし、その一次アミノ酸配列内には一つの分子内ジスルフィド(S-S)結合が形成されるシステイン残基が存在する。しかし、小胞体内腔は比較的酸性状態にあるため、S-S 結合が形成されず、そのため立体構造が崩れ蛍光が極めて減弱する。この問題点を解決するため、システインを他のアミノ酸に置換し、さらに S-S 結合がない状態でも バレル構造を維持できるよう、様々な部位にランダム変異を挿入し、酸性で蛍光を発する変異型 GFP [GFPcys(-)]を作製した。具体的には下記の手順で進めた。

- ・ PCR によりランダム突然変異を GFP 内に誘発させる(Diversify法)。
- ・ 上記ランダム変異が挿入された PCR 産物をリコンビナント作成ベクターに挿入した。
- ・ 上記ライブラリーを大腸菌に遺伝子導入し、in vitro で GFP タンパク質を合成させた。
- ・ 小胞体内腔の pH(6.2~7.2)に合わせ、pH6.2 で蛍光を発する変異株を単離した。

小胞体内腔滞在型 ER-GFPcys(-)の作製スクリーニングによって得られた GFPcys(-)を小胞体内腔に発現させ、かつ ERAD を介して素早く分解されるタンパク質を下記の配列を付加することで作成した。

- ・ N 末端に ER 挿入のためのシグナル配列。
- ・ E3 ユビキチンリガーゼによって認識される degron(分解)配列。
- ・ C 末端に ER 滞在のための KDEL 配列(4 アミノ酸)。

これにより、ER 内腔にのみ発現し、かつ素早く分解され、小胞体ストレス時には ER 内腔に蓄積し蛍光を発する ER-GFPcys(-)タンパク質を ER quality control monitoring プローブとして獲得した。

ER-GFPcys(-)の薬剤誘導性発現未分化骨芽細胞株の作製

テトラサイクリン(Tet)投与によって目的タンパク質の発現 on/off を制御できるシステムにより、骨芽細胞への分化誘導が可能なC2C12細胞、軟骨芽細胞への分化が可能な前駆軟骨細胞株 ATDC5、間葉系幹細胞などを用いて、恒常的遺伝子導入細胞株を作成した。

レンチウイルスによる ER-GFPcys(-)の破骨細胞分化への導入

レンチウイルス発現システムを用いて、Lentivirus-Tet-ER-GFPcys(-)を作成し、骨髄マクロファージに遺伝子導入するシステムを構築した。

骨芽細胞・破骨細胞分化における in cell 発現系の解析

これまで、細胞分化過程における小胞体ストレス誘導の解析については、小胞体ストレス受容体の活性化を指標としたウエスタンブロッティングなどの生化学的手法に頼るしか無かった。開発した ER-GFPcys(-)によって、小胞体内不良タンパク質蓄積(小胞体ストレス)を定量的・経時的に計測する事が可能になった。ER-GFPcys(-)を導入することで、細胞の分化段階での変化を観察した結果、新規 ER quality control monitoring プローブとして in cell レベルでの有効であることを確認した。

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)

Kikuchi H., Nakayama M., Kuribayashi F., Imajoh-Ohmi S., Nishitoh H., Takami Y., Nakayama T. GCN5 is involved in regulation of immunoglobulin heavy chain gene expression in immature B cells. *Gene* 544:19-24 (2014), 査読有

Kikuchi H., Nakayama M., Kuribayashi F., Imajoh-Ohmi S., Nishitoh H., Takami Y., Nakayama T. Protein kinase C gene expression is oppositely regulated by GCN5 and EBF1 in immature B cells. *FEBS Lett.* 588:1739-1742 (2014), 査読有

Matsui M., Fukuno N., Kanda Y., Kantoh Y., Chida T., Nagaura Y., Suzuki O., Nishitoh H., Takeda K., Ichijo H., Sawada Y., Sasaki K., Kobayashi T., Tamura S. The expression of Fn14 via mechanical stress-activated JNK contributes to apoptosis induction in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 289:6438-6450 (2014), 査読有

Kikuchi H., Nakayama M., Kuribayashi F., Imajoh-Ohmi S., Nishitoh H., Takami Y., Nakayama T. GCN5 is

essential for IRF-4 gene expression followed by transcriptional activation of Blimp-1 in immature B cells. *J. Leukoc. Biol.* 95:399-404 (2014), 査読有

Homma K., Fujisawa T., Tsuburaya N., Yamaguchi N., Kadowaki H., Takeda K., Nishitoh H., Matsuzawa A., Naguro I., Ichijo, H. SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. *Mol. Cell* 52:75-86 (2013), 査読有 Kadowaki H., Nishitoh H. Signaling Pathways from the Endoplasmic Reticulum and their Role in Diseases. *Genes* 4:306-333 (review article) (2013), 査読有

Yamaguchi K., Takeda K., Kadowaki H., Ueda I., Namba Y., Ouchi Y., Nishitoh H., Ichijo H. Involvement of ASK1-p38 pathway in the pathogenesis of diabetes triggered by pancreatic β cell exhaustion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830:3656-3663 (2013), 査読有

[学会発表](計4件)

西頭英起, 第 86 回日本生化学会大会, Derlin ファミリーを介した小胞体品質管理システム, 2013.9.11, 横浜

西頭英起, 第 65 回日本細胞生物学会大会, 新規小胞体品質管理システムの分子機構解明, 2013.6.21, 名古屋

Nishitoh H., EMBO Conference, Derlin family proteins control protein loading into the endoplasmic reticulum via substrate-specific cotranslational rerouting from translocation to degradation, 2014.10.26, バルセロナ

西頭英起, 第 9 回小胞体ストレス研究会, 小胞体品質管理における Derlin の生理的意義の解析, 2014.7.4, 徳島

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/2bio/#>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西頭 英起 (NISHITOH, Hideki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 00332627

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

門脇 寿枝 (KADOWAKI, Hisae)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40568200