

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870118

研究課題名(和文) 新規ミトコンドリアレポーターによる活性酸素代謝の高感度生体解析

研究課題名(英文) Development of high-sensitive mitochondrial stress reporter for in vivo ROS-damage imaging

研究代表者

及川 大輔(Oikawa, Daisuke)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20455330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素は、多くの生物が酸素呼吸によって生命エネルギーを得る際にミトコンドリアから生じる副産物であり、様々な生体分子の機能を阻害する悪玉物質として知られる。本研究では、活性酸素の発生源であるミトコンドリアのストレス状態をモニターするレポーターシステム、あるいは、炎症ダメージを検出する新規Indicatorを構築し、細胞、及び動物個体レベルでの活性酸素ダメージ動態の検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：ROS (reactive oxygen species) is a mitochondrial by-product, interfering with various kinds of biomolecule function. In this study, we developed novel reporter systems detecting mitochondrial stress status or inflammatory damage, and evaluated ROS-mediated damage at cellular level or in animal model.

研究分野：細胞生物学

キーワード：活性酸素 炎症シグナル IL-1

1. 研究開始当初の背景

活性酸素は、多くの生物が酸素呼吸によって生命エネルギーを得る際にミトコンドリアから生じる副産物であり、様々な生体分子の機能を阻害する「悪玉」物質として知られる。従来、この活性酸素による生体ダメージを簡便に検出する手法は存在せず、社会的な注目度の高さに相反して、その動物個体レベルの研究は実質的に停滞していた。

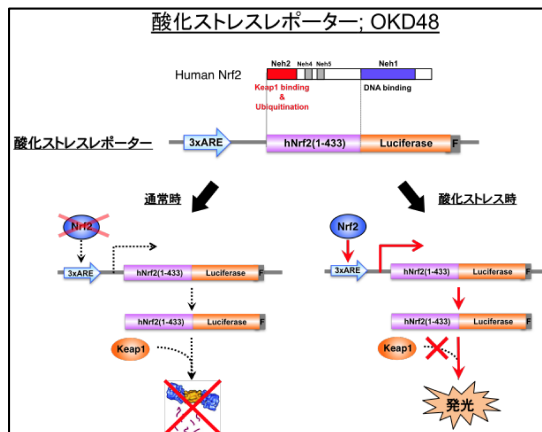
2. 研究の目的

本研究では、このような現状を打開すべく、申請者が独自に開発したレポーターシステム(OKD48 システム)を利用し、さらに、そこから派生する新たな検出技術(ミトコンドリアレポーターを含む)を組み合わせ、それらを多面的に活用することで、これまで実現不可能だった動物個体レベル(in vivo)の活性酸素代謝とそのダメージについて、多次元的な視点から解析・研究を行うことを目的として、研究を展開した。

3. 研究の方法

(i) OKD48 システムの高度化

酸化ストレス応答における基幹因子である Nrf2 は、それ自身が転写因子として下流遺伝子を誘導する他に、タンパク質レベルでの分解制御も受ける。この転写と翻訳後の二段階の制御機構を利用して、酸化ストレス応答の動態をモニターするシステムが OKD48 である。具体的なデザインは下図に示す通りで、



Nrf2 の分解配列を付加したレポーター遺伝子(ルシフェラーゼや GFP など)を、ARE プロモーター制御下で発現させている。通常、このレポーター遺伝子の発現は、転写レベルで誘導されず、また、漏れ出てくるタンパク質も分解されてしまうので、シグナルは検出されない。しかし、酸化ストレス時には、内在性 Nrf2 によりレポーター遺伝子の転写が誘導され、さらに、産生されたレポータータンパク質も Keap1 を介したユビキチン化/分解を免れるので、非常に強いシグナルを発する。このように、転写レベルと翻訳後レベルの2つの制御機構を組み合わせることで、これまでに無い高い S/N 比を実現させることが可能となった。

この OKD48 レポーターの更なる検出感度の向上や、他レポーターとの同時測定などの高機能化を実現するために、各種改良を加え、その機能性を評価した。

(ii) ミトコンドリアレポーターの開発

酸化ストレスの主要原因とされる活性酸素は、一般に、細胞中のミトコンドリアの劣化に伴い発生することが知られている。よって、ミトコンドリアの劣化(ミトコンドリアストレス)に応答する遺伝子機構を利用し、効果的に組み合わせることで、ミトコンドリアの障害、すなわち活性酸素の発生に伴い発光タンパク質(ルシフェラーゼ)を発現するレポーターシステムの構築を目指した。

(iii) 炎症レポーターの開発

さらに、酸化ストレス応答や活性酸素ダメージとも関連する炎症応答について、OKD48 システムや前項目のミトコンドリアレポーターを参考に、IL-1 が受ける転写誘導と翻訳後分解の2段階制御機構を利用して、その動態をモニターするレポーターシステムの構築を目指した。

4. 研究成果

(i) OKD48 システムの高度化

オリジナルの OKD48 システムでは、検出用の発光・蛍光タンパク質として、GFP(Venus) やルシフェラーゼ(GL4)を利用していた。これを他の様々な発光・蛍光タンパク質に改良し、その機能性を確認したところ、GL4 とは異なる種類の発光タンパク質である rLuc や、高光度発光タンパク質のナノ・ランタンや Nano-Luc においても、酸化ストレスへの応答性を評価することができ、さらに、複数の側面でオリジナルのものよりも優れた性質を示すことが分かった。例えば、rLuc を利用することで、小胞体ストレス検出システムである ERA1 システムとの同時多色検出が、細胞レベルで可能になった。また、ナノ・ランタンや Nano-Luc の利用により、OKD48 レポーターの検出感度も格段に向上した。

このように、検出様の発光・蛍光タンパク質を様々な改良することで、レポーターとしての利用性をさらに拡大させることが出来た。

(ii) ミトコンドリアレポーターの開発

ミトコンドリアレポーターの構築を目指して、まずは CCCP などのミトコンドリア脱分極剤の処理によって転写が誘導される promoter 配列のスクリーニングを実施した。その結果、わずかではあるが確実に誘導が認められる promoter 配列を複数同定した。さらに、ミトコンドリア脱分極に伴い安定化するタンパク質として PINK1 に着目し、安定化に必要なドメインの探索などを行い、レポーターの構築に必要な領域を同定した。このように同定した、転写誘導性の promoter と

PINK1 の部分配列との組み合わせを複数パターン試作し、実際に、ミトコンドリアストレスに伴い発光や蛍光が検出されるかどうかを検討した。その結果、どの試作品もわずかに誘導が見られるものの、レポーターとして十分な感度・S/N 比を備えるものは得られなかった。

(iii)炎症レポーターの開発

炎症性サイトカインの一つである IL-1 は、それ自身が炎症シグナルに応じて転写レベルで誘導される他、タンパク質の成熟過程において切断されることが知られている。このような IL-1 が受ける転写・翻訳後の二段階の制御機構を利用して、OKD48 システムと同様に、IL-1 の産生動態、すなわち、炎症動態をモニターする新規レポーターシステムを構築した。

実際のシステムでは、IL-1 タンパク質の切断配列と Degron(タンパク質分解シグナル)を付加したレポーター遺伝子(ルシフェラーゼや GFP など)を、IL-1 プロモーター制御下で発現させている。通常、このレポーター遺伝子の発現は、転写レベルで誘導されず、また、漏れ出てくるタンパク質も Degron を介して分解されてしまうので、シグナルは検出されない。しかし、炎症応答時には、炎症シグナル依存的にレポーター遺伝子の転写が誘導され、さらに、産生された前駆体レポータータンパク質から Degron が切断除去されることにより安定化し、強いシグナルを発するようになる。

このようなレポーターシステムについて、まずは複数の試作品を用いて細胞レベルでの解析を進めた。次に、最も良い機能性を示したものを選択し、動物個体レベルでの作動性を確認した。その結果、本レポーターの動物個体レベルでの機能性を確認することが出来た。

これら一連の研究を通じて、OKD48 システムの高機能化、さらには、炎症レポーターの開発に成功した。これらの成果を基に特許出願なども進めており、今後、大きな研究へと発展させていきたい。

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)

Kitai Y, Ariyama H, Kono N, Oikawa D, Iwawaki T, Arai H. Membrane lipid saturation activates IRE1 without clustering. *Genes to cells*. 18:798-809, 2013. 査読有
doi: 10.1111/gtc.12074.

及川大輔, 岩脇隆夫. 生きているマウスで酸化ストレスを見えるように～ホタルの発光機構と酸化ストレス応答反応を巧みに

組み合わせたマウスの誕生～ 化学と生物. 51, 2013.
<http://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.51.361>

Oikawa D, Iwawaki T. The role of the unfolded protein response in diabetes mellitus. *Seminors in Immunopathology*, 35, 333-350, 2013.
doi: 10.1007/s00281-013-0369-5.

Oikawa D, Iwawaki T. Positive contribution of IRE1 - XBP1 pathway to the expression of placental cathepsins. *Biochem Biophys Res Commun*. 433:426-431, 2013. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.119.

[学会発表](計7件)

Nakazawa S, Ishii R, Oikawa D, Ishitani R, Nureki O, Tokunaga F. "Linear Ubiquitin binding of optineurin regulates NF- B signaling" 2nd International symposium on "Protein modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. P-04. The University of Tokyo, Japan. 2015/1/23

及川大輔, 石井亮平、中澤世識、石谷隆一郎、瀧木理、徳永文稔「Optineurin の直鎖状ユビキチン結合を介した NF- B 抑制と疾患との関連」第 37 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 2014/11/26

Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, Hatada I, Nureki O, Tokunaga F. "Optineurin regulates NF- B via linear ubiquitin binding" International symposium on "Homeostasis through development, life, and diseases. No.16. Gunma University, Japan. 2014/11/7

及川大輔, 石井亮平、中澤世識、石谷隆一郎、瀧木理、徳永文稔「Optineurin による NF- B シグナル制御の細胞機構と疾患」第 9 回臨床ストレス応答学会 岡山大学鹿田キャンパス内マスカットキューブ 2014/11/1

及川大輔, 中澤世識、徳永文稔「新規 LUBAC シグナル複合体構成因子の探索と細胞機能解析」第 66 回日本細胞生物学会 奈良県新公会堂 2014/6/13

岩脇隆夫、及川大輔「胎盤での Cathepsin 遺伝子発現制御における IRE1alpha および XBP1 の役割」第 60 回北関東医学会総会 群馬大学 2013/9/26

Oikawa D, Akai R, Tokuda M, Iwawaki T. "High-sensitive in-vivo detection of

oxidative stress with OKD48 mice” 日本
組織培養学会第 86 回大会 つくば産業技術
総合研究所 2013/5/30-31

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：炎症レポーターシステム

発明者：岩脇隆夫、及川大輔、石川智夫

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2014/070798

出願年月日：2014 年 7 月 31 日

国内外の別：国際出願

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 大輔 (OIKAWA Daisuke)

群馬大学生体調節研究所・助教

研究者番号：2 0 4 5 5 3 3 0

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：