

【研究区分：先端的研究】

研究テーマ：ゲノム編集技術による小胞体ジスルフィド還元酵素の可視化と細胞ストレス応答性の解析	
研究代表者：生物資源科学部 生命環境学科 生命科学コース 教授 伊原伸治	連絡先：ihara@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：なし	
<p>【研究概要】</p> <p>本研究では、小胞体に局在する ERdj5 の作用機序を明らかにする事を試みた。ゲノム編集技術により ERdj5 を可視化した。可視化した線虫を種々の細胞ストレスに暴露すると、小胞体ストレスと熱ストレスにおいて ERdj5 の発現上昇が観察された。さらに ERdj5 は凝集タンパク質と共局在を示した。これらの結果から、ERdj5 は特定の細胞ストレスに応答し、凝集タンパク質に巻き込まれる事が明らかになった。この観察結果は、ERdj5 が小胞体ストレスと熱ストレスにより誘導される凝集タンパク質の抑制に働いていることを示唆している。</p>	

【研究内容・成果】

小胞体は変性タンパク質を分解して除去するタンパク質品質管理機構が存在する。ERdj5 は小胞体に局在するジスルフィド結合還元酵素であり、変性タンパク質で過形成したジスルフィド結合を還元して、その分解機構を促進することが知られている。しかし、生体内において ERdj5 が種々の細胞ストレスにどのように応答するのかはよくわかっていない。本研究では、ゲノム編集技術を用いてモデル生物である線虫 *C. elegans* の内在性 ERdj5 の可視化を行った。そして可視化した ERdj5 のストレス応答性を明らかにすることを試みた。

① ERdj5 の可視化

ゲノム編集で作成した ERdj5 可視化線虫を用いて、L1 幼虫期、L2 幼虫期、L3 幼虫期、L4 幼虫期、成虫期の各成長段階と各組織の撮影を行った。ERdj5 は L1 幼虫期から咽頭組織で発現しており、L4 幼虫期にかけて発現が強まるが、成虫期ではその発現が減少することが明らかとなった。咽頭組織以外に、体壁筋細胞、腸、産卵口でも弱い発現が見られた(図 1)。

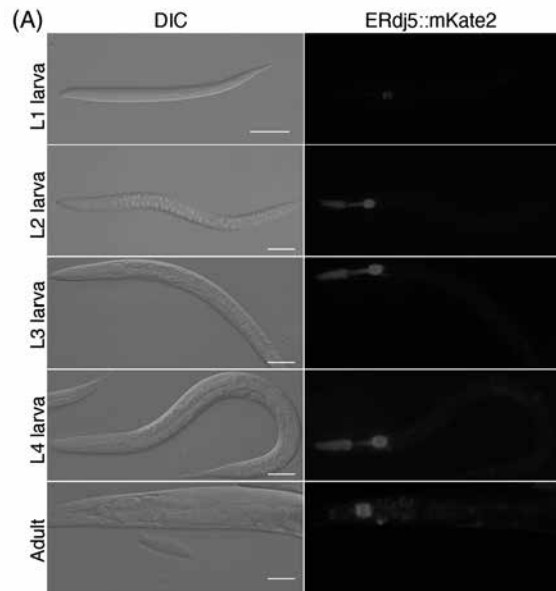


図 1 可視化 ERdj5 の発現組織

② 可視化 ERdj5 の小胞体での局在様式

ゲノム編集で可視化した ERdj5 が細胞内のどこに局在しているのか明らかにするために、ERdj5::mKate2 可視化線虫に小胞体マーカーである TRAM::YFP、ゴルジ体マーカーである MIG-23::GFP をそれぞれ導入

した線虫を用いて、ERdj5::mKate2 と各細胞小器官のマーカーの局在を観察した。その結果、ERdj5 は小胞体に局在することが明らかになった。

③ ERdj5 のストレス応答性

ERdj5 を可視化した線虫を用いて小胞体ストレスへの応答性を調べた。小胞体ストレスに暴露した ERdj5 可視化線虫は、体壁筋細胞や腸など様々な組織で ERdj5 の発現上昇が観察された。さらに、小胞体ストレス以外の細胞ストレスに対する応答性を明らかにするために、熱ストレス、紫外線暴露、活性酸素暴露による影響を検討した。熱ストレスに暴露すると、

小胞体ストレスと同様に様々な組織で ERdj5 の発現が上昇した。しかし、紫外線暴露と活性酸素の発生による ERdj5 の発現や局在は、コントロールと比較して特に変化は見られなかった。

④ 凝集タンパク質に対する応答性可視化  
ERdj5 は熱ストレスにより人為的に誘導された凝集タンパク質と、アミノ酸変異により形成された凝集タンパク質の両方と共局在を示した。この結果は ERdj5 が凝集タンパク質に巻き込まれることを示唆している。種々のストレスに対する ERdj5 の応答を表 1 に示す。

### 細胞ストレスの種類

ストレス	条件
小胞体ストレス	ツニカマイシンによる翻訳後修飾の阻害
熱ストレス	31°Cで12時間飼育 (通常の飼育温度は20°C)
紫外線	UVB 3000 × 100 μJ/cm <sup>2</sup> UVC 600 × 100 μJ/cm <sup>2</sup>
活性酸素	小胞体内腔で一重項酸素を発現
凝集タンパク質	小胞体内腔における凝集タンパク質の形成

表 1 種々の細胞ストレスに対する ERdj5 の応答  
グレーで示したストレスに応答する

本研究では、ゲノム編集技術を用いて内在性 ERdj5 の可視化を行い、生体内における種々の細胞ストレスに対する ERdj5 の応答性について明らかにした。可視化 ERdj5 は咽頭組織で強く発現しており、体壁筋細胞、腸、産卵口などの様々な組織でも弱い発現が観察された。ヒト ERdj5 も脳、心臓、膵臓、肝臓、卵巣、精巣などで発現が確認されており、ERdj5 はユビキタスな発現を示すタンパク質であることが示された。ERdj5 は L1 幼虫期から咽頭組織の発現が見られ L4 幼虫期にかけてその発現が増加したが、成虫期になると発現が減少した。この ERdj5 の発現低下は老化に伴う小胞体ストレス応答の低下が起因していると考えられる。一方で細胞ストレスの要因の一つである紫外線暴露では、ERdj5 の発現や局在に変化が観察されなかった。以前にも紫外線暴露による ERdj5 の転写誘導は引き起こされないことが報告されており、今回の結果と一致している。また、紫外線と同様に活性酸素に対しても ERdj5 は変化を示さなかった。活性酸素による細胞の酸化ストレスは DNA、脂質、タンパク質の酸化的損傷を引き起こし細胞の恒常性を低下させる。小胞体は細胞質と比較して酸化的な環境であることが知られており、小胞体において活性酸素を発現させても小胞体内腔の酸化的環境を大きく変化させるほどの活性酸素が発現していない可能性が考えられる。

ERdj5 の局在を細胞レベルで観察した結果、熱ストレス暴露後に誘導される凝集タンパク質と変異型 Bip により形成される凝集タンパク質の両方に ERdj5 が巻き込まれることが明らかになった。この観察結果は、ERdj5 の機能について 3 つの疑問点が生じた。一つ目は ERdj5 がどのようにして凝集タンパク質を認識するのかである。ERdj5 は凝集タンパク質を解消するための還元酵素であると考えられているが、今回の観察結果は凝集体タンパク質が形成されると、その凝集タンパク質に巻き込まれてしまうことを示唆している。現時点では、凝集体形成時に ERdj5 が受動的に巻き込まれるのか、あるいは凝集体に能動的に巻き込まれることで凝集体を抑制するためなのかは不明である。二つ目は凝集タンパク質に巻き込まれた ERdj5 は機能的かという点である。凝集タンパク質は本来の立体構造をとれず機能的でないと考えられている。その考えに従うと、凝集タンパク質と共局在する ERdj5 も凝集に近い状態であり、ERdj5 は本来の機能を失っている可能性がある。その一方でもし ERdj5 凝集体に能動的に巻き込まれると仮定すると、ERdj5 は凝集体の中でその抑制を実行している可能性がある。三つ目は凝集タンパク質に巻き込まれた ERdj5 は小胞体に局在しているのかという点である。凝集体は小胞体内腔だけでなく細胞質でも形成される。今回観察された分泌型 GFP と ERdj5 の共局在は、ERdj5 が小胞体に局在することから小胞体内腔で生じていると考えられるが、小胞体と細胞質の区別ができていないため断定はできない。

今後は ERdj5 の欠損変異体の凝集タンパク質と比較することで、凝集体に巻き込まれた ERdj5 の生理的意義を明らかにしたい。