

ストレス可視化技術による加齢老化プロセスの解明

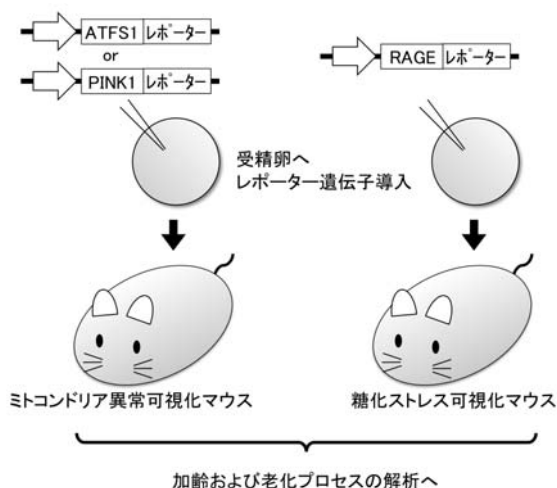
[1] 組織

代表者：平松 伸彦
(金沢医科大学総合医学研究所)
対応者：本橋 ほづみ
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：岩脇 隆夫
(金沢医科大学総合医学研究所)

研究費：物件費20万円

[2] 研究経過

本研究は生物個体における加齢および老化が細胞小器官のひとつであるミトコンドリアの機能やタンパク質の糖化反応と密接に関連すると考えて、まずはミトコンドリアの異常および糖化ストレス応答の可視化から加齢・老化のプロセスの分子細胞生物学的メカニズムに迫ることを目的としている。そこで最初に取り組んだのは生体レベルでミトコンドリア異常や糖化ストレス応答を視覚化できるレポーターシステムの構築である。



近年、ミトコンドリアで生じる異常に伴ってユニークな挙動を示す分子が幾つか知られている。その中で我々は ATFS1 および PINK1 に注目した。ATFS1 は線虫で発見されたタンパク質であるが、興味深いことに1分子内にミトコンドリア移行シグナルと核移行シグナルを有する。ミトコンドリアが正常な場合にはミトコンドリア移行シグナルが優位に働き、ATFS1 はミトコンドリア内まで運ばれて

待ち構えるプロテアーゼにより分解される。しかしミトコンドリアが異常な状況下では核移行シグナルが優位に働き、ATFS1 は核内で転写因子としての機能を発揮する。

一方の PINK1 はヒトやマウスにも存在するタンパク質であり、特徴的な性質を持つ。ミトコンドリアが正常な場合には ATFS1 と同じくミトコンドリア内まで運ばれて待ち構えるプロテアーゼにより分解される。しかしミトコンドリアが異常な状況下では PINK1 はミトコンドリア外膜に留まり、マイトファジーの誘導因子としての機能を発揮する。

また糖化ストレス応答については RAGE とよばれる膜タンパク質に注目した。RAGE は細胞膜表面で糖化タンパク質を感知して多量体化することで NF- κ B などシグナル伝達を活性化する機能を有する。この NF- κ B の経路を介して RAGE は糖化ストレスにより遺伝子レベルで発現上昇することも分かっている。

以上の知見を踏まえて、各分子 (ATFS1、PINK1、および RAGE) のストレス応答機能を蛍光および発光レポーター分子の活性化に変換できる遺伝子コンストラクトの試作と性能試験を繰り返した。後で述べる通り、それら遺伝子コンストラクトを発現させた細胞からストレスに応じたレポーターシグナルの上昇は確認できるものの、その性能に不安が残るためモデルマウス開発に踏み切れていない。

本橋教授 (加齢研) にはモデルマウスが誕生した後に協力してもらう予定であったため現在までに残念ながら実質的な共同研究は行っていないのが現状である。ただ今回提案しているモデルマウスは開発に成功すれば、様々な健康問題を研究する上で価値の高いものになるはずなので今後もレポーター遺伝子コンストラクトの改良および試作を続けるつもりである。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

ミトコンドリア異常を可視化するレポーターシステムを構築するために、まずは線虫由来 ATFS1 遺伝子およびマウス由来 PINK1 遺伝子をクローニングして、それぞれの全長または部分領域にルシフェ

ラーゼ遺伝子および赤色蛍光タンパク質遺伝子が連結された哺乳動物細胞系発現プラスミドを作成した。これらのプラスミドをHEK293T細胞およびHeLa細胞に一過的に導入してミトコンドリアを脱分極させるカルボニルシアニド m-クロロフェニルヒドРАЗОН (CCCP) で処理したところ、幾つかのプラスミドを導入した細胞でレポーター活性が未処理のときよりも上昇した。しかし、その比率は2~3倍程度であり、細胞に導入したプラスミドをそのままトランスジェニックマウス作製に用いるには完成度が低いと判断した。

一方の糖化ストレス応答を可視化するレポーターシステムを構築するために、ヒト由来の RAGE 遺伝子をクローニングして、それぞれの全長または部分領域にルシフェラーゼ (N側域) 遺伝子およびルシフェラーゼ (C側域) 遺伝子が連結された哺乳動物細胞系発現プラスミドを作成した。これらのプラスミドをHEK293T細胞およびHeLa細胞に一過的に導入して RAGE とルシフェラーゼの融合タンパク質を過剰発現させたところ、N側およびC側の両方を発現する細胞のレポーター活性は期待に反してN側およびC側の片方しか発現しない細胞のレポーター活性と同レベルであった。

(3-2) 波及効果と発展性など

現在のところ計画していたモデルマウスはおろかレポーター遺伝子コンストラクトすら完成に至っていない。本研究で注目した3分子(ATFS1、PINK1、およびRAGE)の基本性能について文献情報だけでなく、独自に詳細な確認を行うべきだったと反省している。それゆえ先のネガティブな結果が出た後は各分子の細胞内局在や発現レベル、ドメイン機能などについて過去の報告と比較しながら見直しを行っている。また他の分子を応用した可視化システムへの変更も検討しており、ミトコンドリア異常および糖化ストレス応答で鋭敏かつ特異的に挙動変化を示す分子の探索も同時に進めている。これらの解析から最適なシステムを考案できれば再度レポーター遺伝子コンストラクトを作成して培養細胞系での試験を経てモデルマウス作製にチャレンジしたい。

冒頭にも書いた「生物個体における加齢および老化が細胞小器官のひとつであるミトコンドリアの機能やタンパク質の糖化反応と密接に関連する」という仮説からミトコンドリアの異常および糖化ストレス応答の可視化が重要な仕事であると理解してくれる人は多く、本研究の類似課題は岩脇教授を代表者として幾つかの民間研究助成や平成30年度の学術研究振興資金(私学事業団)に採択されている。

[4] 成果資料
なし