

運動神経変性疾患の原因となる無糖鎖型 Seipin に起因する

小胞体ストレスと細胞死の誘導機構の解析

齊藤 峻介

目次

要旨	3
序論	4
実験結果	14
考察	58
実験方法	63
結論	71
論文目録	72
引用文献	73
謝辞	89

要旨

小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積する小胞体ストレス状態が持続すると、細胞機能が障害され、細胞死に至る場合もある。このような小胞体ストレスが神経変性疾患を発症させるのかどうかを究明することを目指し、本研究では遺伝性の神経変性疾患である **Seipinopathy** の原因となる変異遺伝子がコードする、無糖鎖型 **Seipin (ngSeipin : non-glycosylated Seipin)** に着目した。**ngSeipin** は他の著名な神経変性疾患の原因タンパク質とは異なり、小胞体膜に局在する。また **ngSeipin** のトランスジェニックマウスの脳において小胞体ストレスが生じることもすでに明らかにされている。そこで、この **ngSeipin** が導入された細胞の小胞体で何が起こって小胞体ストレスが生じるのか明らかにできれば、小胞体ストレスに起因して神経変性疾患が起こるメカニズムを理解するための手がかりが得られるのではないかと考え、解析を行った。

本研究では、ショウジョウバエ **Seipin** が小胞体膜カルシウムイオンポンプである **SERCA** と結合し小胞体内へのカルシウムイオンの取り込みを促進するという知見から着想を得て、**ngSeipin** が小胞体膜カルシウムイオンポンプの機能に影響するかどうかを検討した。まずヒト大腸ガン由来細胞である **HCT116** に **ngSeipin** を導入したところ、導入量に相関して小胞体内カルシウムイオン濃度が低下すると共に、小胞体ストレスと細胞死が誘導されることがわかった。**Seipin** をノックアウトしたヒト神経芽細胞腫 **SH-SY5Y** に内在性 **Seipin** と同程度の量の **ngSeipin** を導入した場合にも、同様の効果が見られた。このような小胞体内カルシウムイオン濃度低下が生じるメカニズムをさらに詳細に検討したところ、**ngSeipin** はヒトの小胞体膜カルシウムイオンポンプである **SERCA2b** を巻き込みながら小胞体膜上で凝集する性質があり、これにより **SERCA2b** が不活性化されてしまうことが明らかになった。さらに、**ngSeipin** と共に **SERCA2b** を発現させ、細胞内に存在する **SERCA2b** の総量を増やすことで小胞体内カルシウムイオン濃度低下を補填すると、小胞体ストレスが減弱され、細胞死も抑制されることを見出した。

以上の結果から、神経変性疾患の原因となる **ngSeipin** が小胞体内のカルシウムイオン恒常性の維持を担う主要な分子の 1 つである **SERCA2b** の機能を直接阻害し、小胞体ストレスと細胞死を引き起こすことを示すことができた。

序論

細胞内小器官の1つである小胞体(ER: Endoplasmic Reticulum)は、細胞内で合成された膜タンパク質および分泌タンパク質の新生ポリペプチドが挿入され、正しい構造を形成する場である。小胞体内部にはタンパク質の折りたたみを促進する多種多様なシャペロンや酵素(これらを小胞体シャペロンと総称する)が存在し、これらの介助を受けて正しい立体構造を獲得したタンパク質は小胞体から放出され、輸送経路を介してゴルジ体以降へ運ばれてゆく[1]。

それと同時に、小胞体は細胞内におけるカルシウムイオンの貯蔵庫としての役割も担う。小胞体内部のカルシウムイオン濃度は通常、細胞質と比べて5000倍以上高く保持されており[2]、このような極端な小胞体-細胞質間のカルシウムイオンの濃度勾配は小胞体膜に局在するカルシウムイオンポンプであるSERCA (Sarco / Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase)によって形成・維持されている[3]。小胞体内に蓄えられたカルシウムイオンは小胞体膜カルシウムイオンチャネルであるRyR (Ryanodine Receptor)およびIP3R (Inositol 1,4,5-trisPhosphate Receptor)を介して一過的に細胞質に放出され、細胞質におけるセカンドメッセンジャーとして機能する[4]。また、小胞体内の高濃度のカルシウムイオンは小胞体シャペロンの正常な機能に必要であると考えられている。例えば、代表的な小胞体シャペロンであるBiP (Immunoglobulin heavy chain binding protein)は、カルシウムイオンが不足することで基質となるタンパク質との結合能が低下することが示されている[5]。

§1 小胞体ストレス応答

小胞体に一度に許容量を上回る多量の新生ポリペプチドが挿入された場合や、小胞体内の環境の変化によりタンパク質の折りたたみが行いにくくなった場合、あるいは遺伝子変異によるアミノ酸変異が原因で正常な折りたたみが困難なタンパク質が合成された場合には、小胞体内部に構造異常タンパク質が蓄積していくようになる。このような小胞体ストレス状態(ER Stress)に対処するため、細胞には小胞体ストレス応答(UPR: Unfolded Protein Response)と呼ばれる、酵母からヒトを含む脊椎動物まで保存された恒常性維持機構が備わっている[6]。脊椎動物以降の高等動物の小胞体ストレス応答は主として

- ① mRNA の翻訳抑制によるタンパク質合成の一時停止
 - ② 小胞体シャペロンの転写誘導
 - ③ 小胞体関連分解(ERAD: ER-Associated Degradation)関連因子の転写誘導
- の3つからなり、それぞれ① PERK (PKR-like ER Kinase)、②ATF6 (Activating Transcription Factor 6)、③ IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1) という小胞体膜タンパク質がストレスを感知することによって発動される(図0-1)。

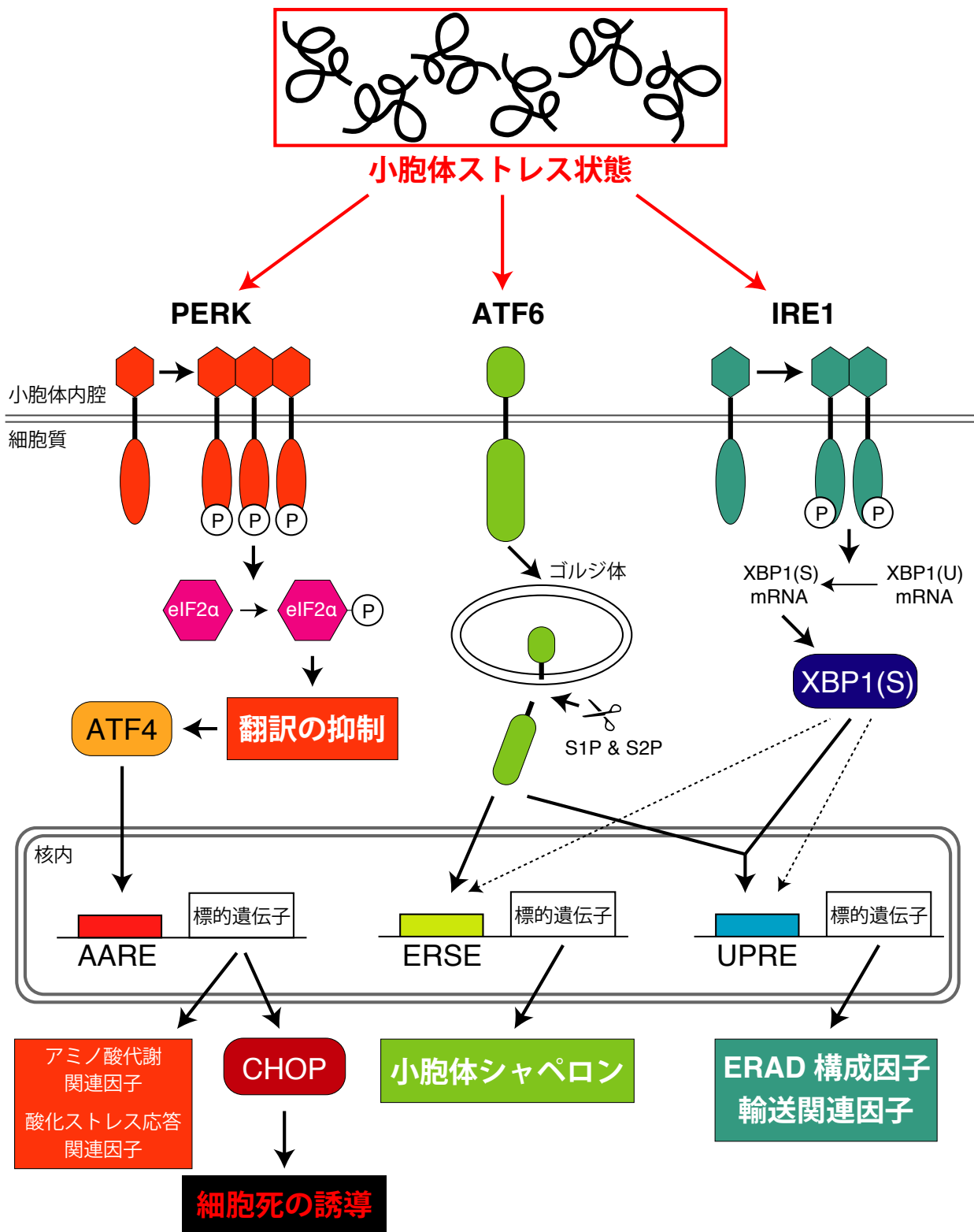


図 0-1 高等動物の小胞体ストレス応答の模式図

高等動物の小胞体ストレス応答は主として ①PERK 経路、②ATF6 経路、③IRE1 経路 の3つからなる。説明は本文を参照

①:PERKはI型の小胞体膜タンパク質であり、細胞質側にキナーゼドメインを持つ。小胞体ストレス条件下においてPERKは多量体化して自己リン酸化することで活性化し[7]、翻訳開始因子であるeIF2 (eukaryotic Initiation Factor)の α サブユニットのSer51をリン酸化する[8][9]。通常時eIF2 α は別の翻訳開始因子であるeIF2Bと結合し、eIF2BのGEF (Guanine nucleotide Exchange Factor)活性により不活性型(GDP結合型)から活性型(GTP結合型)へ変換されるが、eIF2 α がリン酸化されている際にはeIF2とeIF2Bの結合の様式が変化し、活性型への変換が抑えられる[10]。その結果、細胞内に存在する活性型eIF2の総量が減少し、翻訳の効率が低下する。このとき、ATF4 (Activating Transcription Factor 4)に関しては翻訳が逆説的に促進される(図0-2)。もっともよく解析されているmouseのATF4 mRNA上にはATF4のORF (Open Reading Frame)の5'側にuORF1 (upstream ORF 1)とuORF2が存在する。まず、ATF4 mRNAの5'端のキャップ構造付近に結合したリボソーム43S複合体(リボソーム40Sサブユニット、活性型eIF2、メチオニル tRNAを含む)が3'側に移動してゆき、uORF1のAUGを認識したのち、リボソーム60Sサブユニットと結合して80Sリボソームを形成することで翻訳を開始する。翻訳開始時に活性型eIF2は不活性型に変換され、リボソームから解離する。uORF1の翻訳が完了すると大部分のリボソームがmRNAから解離するが、一部のリボソームではmRNAとの結合が維持され、3'側への移動を再開する。通常条件下においては活性型eIF2が十分に存在するため、移動を再開したりリボソームがuORF2に到達するまでに活性型eIF2とメチオニル tRNAが再供給され、uORF2が翻訳される。uORF2とATF4のORFは重なっているため、uORF2のAUGが認識したりリボソームはATF4のORFのAUGを認識することができない。小胞体ストレス条件下において活性型eIF2が減少すると、リボソームがuORF2に到達するまでに活性型eIF2とメチオニル tRNAの再供給が完了せず、その結果としてuORF2のAUGよりさらに3'側に存在するATF4のORF中のAUGにリボソームが到達し、ATF4が翻訳されるようになる[8][11]。転写因子であるATF4はシス配列であるAARE (Amino Acid Response Element)を認識し[12]、CHOP (CCAAT / enhancer-binding protein homologous protein)や種々のアミノ酸代謝・酸化ストレス応答関連因子の発現を促進する[13]。マウスを用いた解析の結果、PERKは膵臓、肺、肝臓、脾臓で高発現していることが示されている。またPERKノックアウトマウスは出生

率が 50%程度まで低下し、出生した個体では膵臓β細胞の細胞死が誘導され、重度の糖尿病を発症することが見出されている[14]。

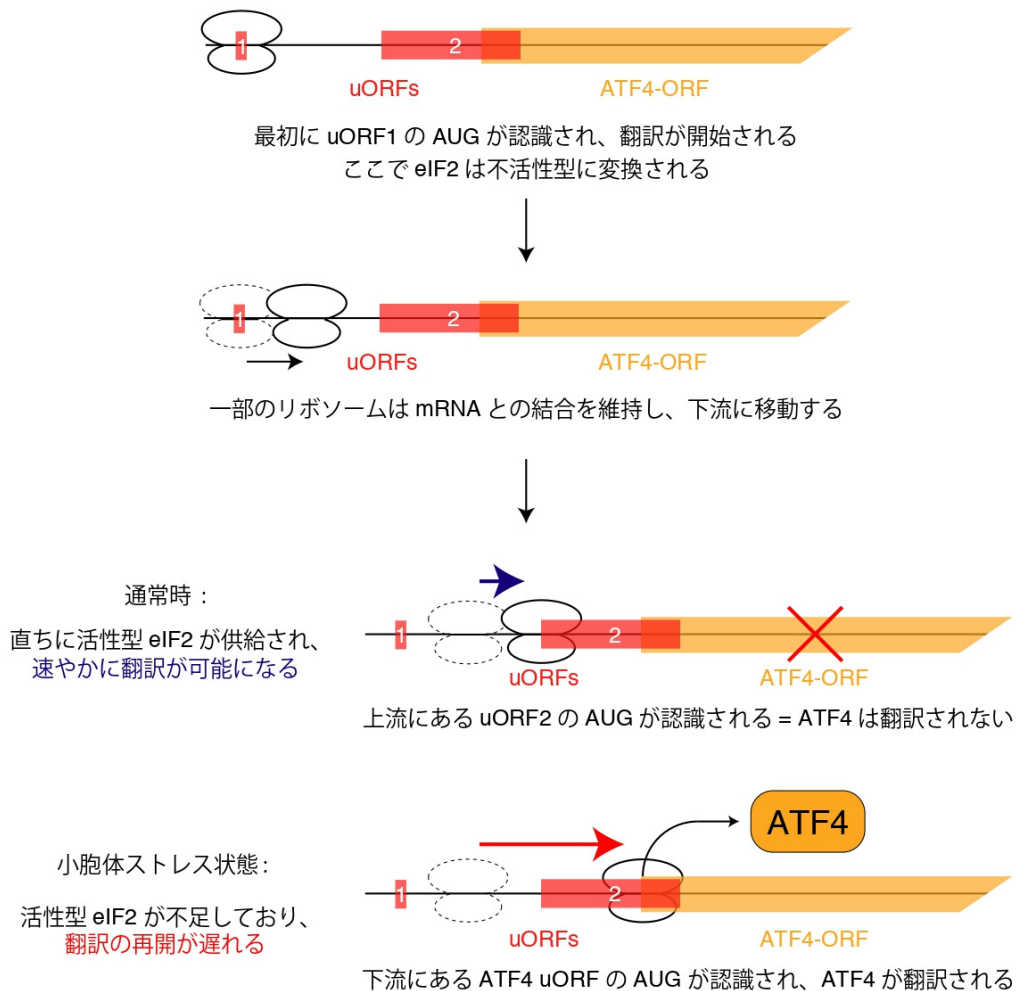


図 0-2 : ATF4 の逆説的な翻訳機構

②:ATF6 は II 型の小胞体膜貫通タンパク質であり、細胞質側に bZIP (basic leucine zipper)領域と転写活性化領域を持つ膜結合型転写因子である[15][16]。ATF6 には α 、 β のパラログが存在し、いずれも小胞体ストレス条件下で小胞体からゴルジ体に輸送され、ゴルジ体においてプロテアーゼである S1P (Site-1 Protease)および S2P (Site-2 Protease)による 2 段階の切断を受ける[17][18]。これにより生じた ATF6 の細胞質側断片は核に移行し、基本転写因子 NF-Y (Nuclear Transcription Factor Y)と結合して標的遺伝子のプロモーター上に存在するシス配列 ERSE (ER stress response element)に結合し、転写因子として機能する[19]。Tet-OFF システムを用いたヒト ATF6 α 発現細胞の

マイクロアレイ解析[20]、ATF6 α ノックアウトマウスから樹立したMEF細胞を用いたマイクロアレイ解析[21]、ATF6 α/β ダブルノックアウトメダカ胚を用いたマイクロアレイ解析[22]の結果から、ATF6はBiPなどの小胞体シャペロンやいくつかのERAD関連因子の誘導を担う転写因子であることが示されている。ATF6 α および β はマウス、メダカ共にユビキタスに発現しており[23][24]、ATF6 α および β シングルノックアウトマウス及びメダカは正常に出生・発育するものの、ダブルノックアウトマウス・メダカは発生の極めて初期の段階で胚生致死となる[25]。またATF6 α/β ダブルノックアウトメダカの解析から、ATF6が小胞体シャペロンを転写誘導することが胚発生段階における脊索の形態形成に必要であることが示されている[22]。

③:IRE1はPERKと同様にI型の膜貫通タンパク質であり、細胞質側にキナーゼドメインとヌクレアーゼドメインを有する[26][27]。ヒトIRE1には α と β のパラログが存在する。IRE1は小胞体ストレス条件下において2量体から多量体となり、自己リン酸化することで活性化され、ヌクレアーゼ活性を発揮する。活性化されたIRE1は細胞質に存在するXBP1(X-box Binding Protein 1)のmRNAの2カ所を切断し、切断されたXBP1 mRNAはRtcBによって繋ぎ直される[28]。これにより26塩基がSplice outされたXBP1(S) mRNAが産生される[29]。スプライシングされていないXBP1(U) mRNAから翻訳されるXBP1(U)は転写活性化ドメインを持たないが、XBP1(S) mRNAでは翻訳時にフレームシフトが起こるようになり、転写活性化ドメインをもつXBP1(S)が翻訳される。XBP1(S)は(1)NF-Yと共にERSEに結合すること(2)単独でシス配列UPRE(Unfolded protein response element)に結合すること(3)切断型ATF6とヘテロダイマーを形成してUPREに結合することがそれぞれ報告されている[29][30][25]。これらによりERAD関連因子を転写誘導することで小胞体内部に蓄積した構造異常タンパク質の分解を促進することや[31][32]、小胞体内外へのタンパク質の輸送に関与する因子の転写誘導を担うこと[21][33]がわかっている。マウスIRE1 α はユビキタスに発現しているのに対し、マウスIRE1 β は胃や腸に特異的に発現している[34]。IRE1 α ノックアウトマウスは胎盤・肝臓に異常が生じ、胎生致死となる[35][36]。IRE1 β ノックアウトマウスは致死ではないものの、胃や腸で恒常的に小胞体ストレスが生じるようになる[34]。メダカIRE1 α と β はともにユビキタスに発現しており[24]、IRE1 α/β

ダブルノックアウトメダカは尾部や肝臓、孵化腺に異常が生じるため、発生初期においてこれらの組織の形成に IRE1 経路が必要であると考えられる[37]。

これら3つの経路を担う小胞体ストレスセンサータンパク質はいずれも平常時は小胞体内腔で BiP と結合し、不活性化されている。その一方で小胞体ストレス条件下においては BiP がこれらのセンサータンパク質から解離して構造異常タンパク質と結合するようになるため、各経路が活性化できるようになると考えられている[38][39]。また IRE1 と PERK に関しては、構造異常タンパク質と直接結合することで活性化するモデルも提唱されている[40][41][42][43]。

これら①②③の経路の活性化を以ってしても小胞体ストレス状態を解消できない場合、アポトーシス経路が活性化され細胞死が誘導される。PERK-ATF4 制御下で誘導される CHOP はアポトーシス抑制因子である BCL2 (B-cell/CLL Lymphoma 2)の発現を抑制する[44]。また CHOP はアポトーシス促進因子である BIM (Bcl2-interacting Mediator of Cell Death / Bcl-2-like Protein 11)の発現を促進する[45]。BIM はアポトーシス促進因子 BAX (BCL2 associated X)、BAK (BCL2 homologous antagonist killer)を活性化させ[46]、ミトコンドリア外膜の透過性を増大させることでミトコンドリアから細胞質へシトクロム C を放出させ、イニシエーターカスパーゼである Caspase 9 を活性化させる。Caspase 9 によってエフェクターカスパーゼである Caspase 3 や Caspase 7 が切断・活性化され、アポトーシスが実行される[47]。CHOP はこれ以外にも DR5 [48]、Trb3 [49]、PUMA [50]などの様々なアポトーシス関連因子を転写調節することが示されている。

IRE1 もアポトーシス経路を活性化させることが報告されている。小胞体ストレス条件下で活性化された IRE1 にアダプタータンパク質である TRAF2 (TNF -Receptor-Associated Factor 2)が結合し、これにより ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1)を介した JNK (c-Jun N terminal Kinase)経路の活性化が促進され、アポトーシスが誘導されることが報告されている[51][52]。また、小胞体ストレス条件下において多量体化した IRE1 はヌクレアーゼ活性により様々な mRNA を比較的非特異的に切断(RIDD: Regulated IRE1-Dependent Decay)するようになる[53]。RIDD のターゲットの中にはイニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ 2 の活性を制御する

miR-17、miR-34a、miR-96、miR-125b が含まれており、これらの micro RNA が分解されることでカスパーゼ経路が活性化されて、アポトーシスが誘導される[54]。

§ 2 小胞体ストレスと神経変性疾患

上記 5 種類の小胞体ストレスセンサー破壊系統の表現型から、生体内で生理的に生じる小胞体ストレスに対して組織ごとに適切な小胞体ストレス応答経路を活性化させ対処することが重要であり、それができずに小胞体ストレス状態が持続してしまうと様々な組織で悪影響が生じるのだと理解できる。

このような小胞体ストレスが生理的な局面だけでなく病理的な局面においても発生し、病態形成に関与している可能性がある。特に神経変性疾患に関しては、家族性パーキンソン病の発症に関与するリン酸化 α -シヌクレイン[55]や、ポリグルタミン病の原因であるポリグルタミン[51]、家族性の筋萎縮性側索硬化症の原因となる SOD1 (Super Oxide Dismutase 1)の変異体[56]など、病原タンパク質が神経細胞に蓄積して小胞体ストレス応答が活性化される例が複数報告されている。しかしながら、上記を含めて神経変性疾患の原因タンパク質は多くの場合神経細胞の小胞体以外の部位(細胞質または細胞外)に蓄積し、小胞体ストレスを含めて多岐にわたるメカニズムで細胞毒性を惹起すると考えられる。したがって、例え病原タンパク質に起因する小胞体ストレス応答の活性化を検出することができたとしても、小胞体ストレス自体が神経変性疾患の発症・進行にどの程度関与しているのかを厳密に評価することが困難であった。

§ 3 末梢神経変性疾患 Seipinopathy の原因となる、小胞体膜タンパク質 Seipin の N 型糖鎖欠損変異体(ngSeipin)について

小胞体ストレスに起因して神経変性疾患を発症・進行させるメカニズムを真に理解するためには、病原タンパク質が小胞体に蓄積する神経変性疾患においてどのような分子メカニズムで小胞体ストレスが生じるのかを見極め、それが神経変性疾患発症の引き金となるのかを明らかにすることが必要である。そこで本研究では、小胞体膜タンパク質 Seipin の変異に起因して発症する優性の末梢神経変性疾患である Seipinopathy に着目した[57][58]。

Seipin は BSCL2 (Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy type 2)遺伝子にコードされる小胞体 2 回膜貫通タンパク質であり、小胞体内腔部分の相互

作用によって小胞体膜上でオリゴマー(ヒトでは 11 量体、ショウジョウバエでは 12 量体、酵母では 10 量体)を形成することが明らかにされている [59][60][61][62]。BSCL2 は元々、先天性全身性脂肪萎縮症 2 型(CGL2 : Congenital generalized lipodystrophy type 2)という、出生時から全身の脂肪組織が消失し肝腫大や糖尿病をきたす常染色体劣性の遺伝性疾患の原因遺伝子として同定された [63]。Seipin をノックアウトした酵母・ショウジョウバエ・ヒト細胞を用いた解析から、Seipin オリゴマーは小胞体膜において脂肪滴が形成されて細胞質に放出される際に小胞体膜と脂肪滴に局在し、正常な脂肪滴の形成に必要であることが示されているものの [64][65][66]、Seipin が脂肪滴の形成に具体的にどのように関与しているのかについては未だ不明な点が多い。

Seipinopathy は CGL2 とは全く臨床像が異なる、四肢の振戦や麻痺、四肢の筋萎縮が引き起こされる優性の末梢神経変性疾患である [57]。Seipinopathy は遺伝子変異に起因して Seipin の小胞体内腔部分の N 型糖鎖付加配列(152N-153V-154S)にアミノ酸変異(N152S または S154L)が起こり、N 型糖鎖の付加が阻害された ngSeipin (non-glycosylated Seipin)が発現することで発症する [67]。N 型糖鎖は非常に親水性の高い翻訳後修飾であり、タンパク質の立体構造形成に影響を及ぼすため、ngSeipin の場合は正常な折りたたみが阻害されて小胞体で凝集を引き起こすと考えられる [57]。また、ヒト細胞及びトランスジェニックマウスを用いた解析の結果、ngSeipin が発現することで小胞体ストレスと細胞死が誘導されることも示されている [67][68]。しかしながら ngSeipin が具体的にどのような分子メカニズムで小胞体ストレスを誘導するのかについては、これまで明らかになっていなかった。

§ 4 研究の目的、方法

ngSeipin に起因する小胞体ストレスが神経変性疾患を引き起こすのかどうかを明らかにするための第一歩として、本研究では ngSeipin 発現細胞において小胞体ストレスが発生するメカニズムを解明することを目指した。具体的なアプローチとしては、ショウジョウバエ脂肪細胞において Seipin が小胞体膜カルシウムイオンポンプである SERCA と結合し、小胞体内部へのカルシウムイオンの取り込みを促進することを示した先行研究から着想を得て [69]、ngSeipin が小胞体内カルシウムイオン濃度に影響を及ぼすのではないかという仮説を立てた。これについてヒト培養細胞を用いた解析により検証した。

実験結果

本研究ではヒト大腸ガン由来の二倍体細胞 HCT116[70]と、ヒト神経芽細胞腫由来細胞 SH-SY5Y[71]を用いて解析を行うこととした。これらの細胞を用いて ngSeipin の解析を行うための下準備として、まずこれらの細胞における内在性 Seipin と SERCA の発現について調べた。

ヒト Seipin mRNA には(i) 1.6 kb、(ii) 1.8 kb、(iii) 2.2 kb の3つの isoform が存在する。(i)からは ①:398 アミノ酸からなる short form Seipin のみが翻訳される。その一方で(ii)と(iii)からは①よりも高い割合で ②:462 アミノ酸からなる long form Seipin が翻訳される(図 1-1A) [63][72]。ヒトの脳ではこれらの mRNA isoform のうち (ii)が高発現していることから[63]、ヒト神経細胞では他の組織由来の細胞と比べて long form Seipin の発現が多いと考えられる。実際に HCT116 と SH-SY5Y からそれぞれタンパク質ライゼートを調製しウエスタンブロットを行ったところ、short form Seipin (Seipin^S)は両者ともに検出されたのに対し、long form Seipin (Seipin^L)は SH-SY5Y でのみ検出された(図 1-1B(a))。このとき、タンパク質ライゼートを高マンノース型糖鎖切断酵素である Endoglycosidase H (EndoH)で処理すると、Seipin^Sと Seipin^Lのいずれもバンドが低分子量側にシフトしたことから、Seipin が両 isoform 共に糖タンパク質であることが確かめられた(図 1-1B(a))。

ヒトでは SERCA 1、SERCA2、SERCA3 の3種類の SERCA が存在するが、qRT-PCR の結果、HCT116 と SH-SY5Y のどちらでも SERCA2 の発現が 1、3 と比べて圧倒的に多いことがわかった(図 1-1C)。また SERCA2 には 2a、2b、2c の3つの isoform が存在し[73]、2b はユビキタスに、2a と 2c は主に筋肉や心臓に発現していると考えられている[74]。実際に qRT-PCR を行うと、HCT116 と SH-SY5Y のいずれにおいても SERCA2b がほぼ独占的に発現していることがわかった(図 1-1D、1-1E)。

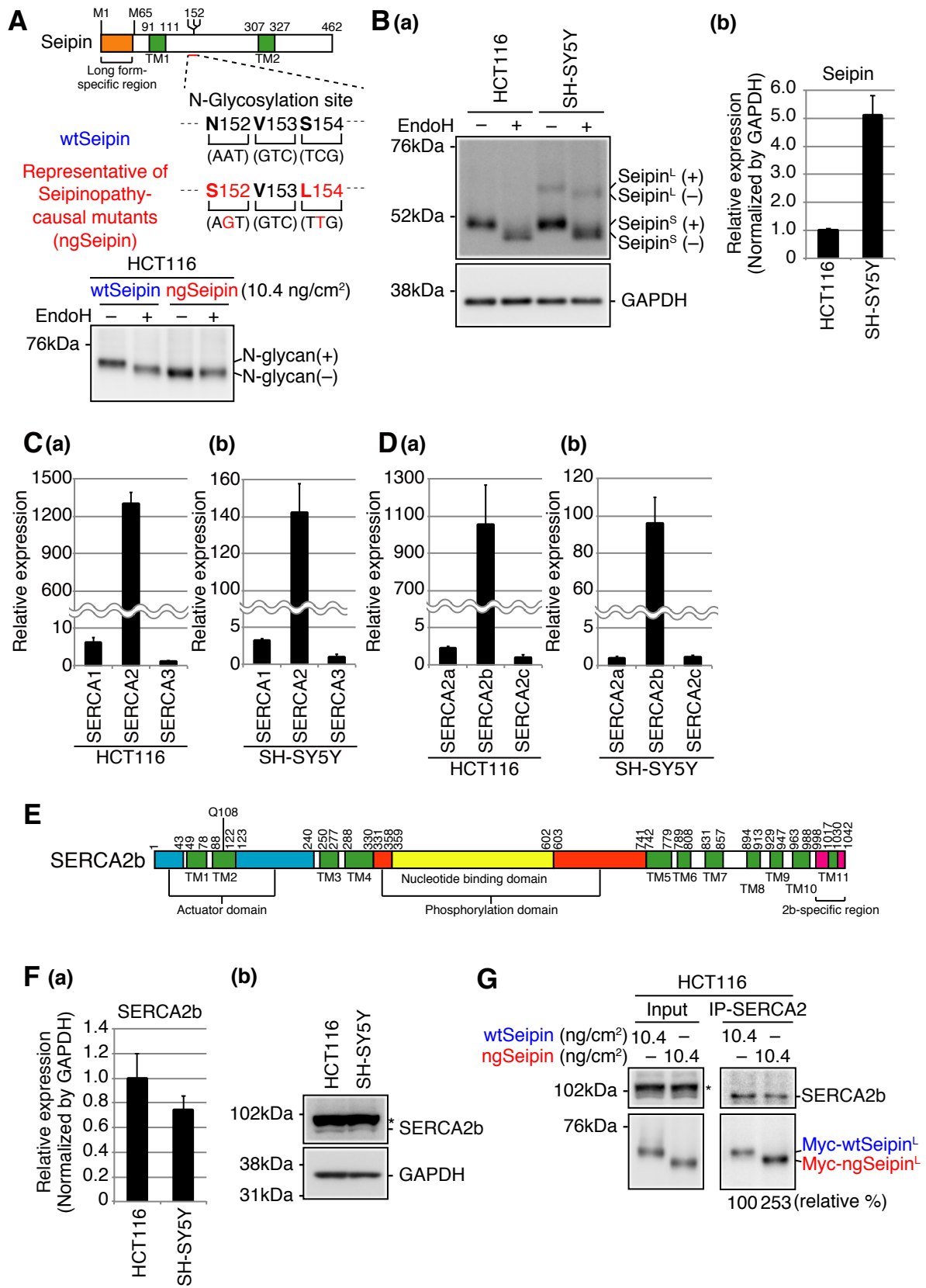


図 1-1 HCT116 および SH-SY5Y における Seipin、SERCA の発現
(説明は次ページに記した)

図 1-1(前ページ)の説明

(A) (上) Seipin のドメイン図。long form Seipin は 1 番目のメチオニン(M1)、short form Seipin は 65 番目のメチオニン(M65)から翻訳が開始される。TM1、TM2 はいずれも膜貫通領域を示す。N152-V153-S154 が N 型糖鎖付加配列のコンセンサス配列(N-X-S/T)に相当し、N152 に N 型糖鎖が付加される。併記された遺伝子変異に起因して N152S または S154L のアミノ酸変異が生じることで、N 型糖鎖付加が阻害される。本解析では N152S と S154L を共に導入した無糖鎖型 Seipin (ngSeipin)を細胞に発現させ、解析することにした。(下) HCT116 に Myc タグ付きの wtSeipin または ngSeipin を 10.4 ng/cm² トランスフェクションした細胞のライゼートを EndoH で無処理または処理し、ウエスタンブロットを行った。検出は抗 Myc 抗体を用いて行った。(B) (a) HCT116 または SH-SY5Y のライゼートを EndoH で無処理または処理し、10 μg ずつ泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 Seipin および抗 GAPDH 抗体を使用した。(b) HCT116 および SH-SY5Y から RNA を調製し、qRT-PCR を行うことで Seipin mRNA の発現量を比較した(Seipin^Lと Seipin^Sがいずれも検出可能なプライマーを使用した)。検定の際には GAPDH の検出量で補正を行った。(n=3) (C)(D) (B)と同様にして、SERCA1、SERCA2、SERCA3、SERCA2a、SERCA2b、SERCA2c の発現量を比較した。(n=3) (E) SERCA2b の模式図。TM1 から TM11 はいずれも膜貫通領域を示す。(F) (a) HCT116 および SH-SY5Y から RNA を調製し、qRT-PCR を行うことで SERCA2b mRNA の発現量を比較した。検定の際には GAPDH の検出量で補正を行った。(n=3) (b) HCT116 または SH-SY5Y のライゼートを 10 μg ずつ泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 SERCA2 および抗 GAPDH 抗体を使用した。(G) Myc-wtSeipin または Myc-ngSeipin を 10.4 ng/cm² ずつトランスフェクションした HCT116 からライゼートを調製し、SERCA2 抗体を用いた IP 実験を行った。検出には抗 Myc および抗 SERCA2 抗体を用いた。

WEB上に公開されている RNA-Seq DataSet を参照すると、SERCA2 はユビキタスに発現しているのに対して、Seipin は比較的神経細胞において多く発現していることがわかる[75][76] (URL : <https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) (図 1-2)。実際、SERCA2b に関しては qRT-PCR・ウエスタンブロットのいずれの結果でも HCT116 と SH-SY5Y との間でほとんど発現量に差が見られなかったのに対し(図 1-1F)、Seipin に関しては SH-SY5Y における発現が HCT116 と比べて約 5 倍多いことがわかった(図 1-1B(b))。

(ウエスタンブロットの際、HCT116 と SH-SY5Y ライゼートを 10 μg ずつ泳動した場合でも、細胞数を揃えて泳動した場合でも、GAPDH の検出量に関して HCT116 と SH-SY5Y の間で差が見られなかった。このことから HCT116 と SH-SY5Y では同程度の量の GAPDH が発現していると判断し、qRT-PCR の検定の際には目的遺伝子の検出量を GAPDH の検出量で補正することとした。)

次に、pCMV promoter 制御下で N 末端に Myc タグを付加した wtSeipin^L を発現させるためのベクターを作製し、さらにこれに点変異(N152S・S154L)を導入することで Myc-ngSeipin 発現ベクターを作製した。これらのベクターを 10.4 ng/cm² ずつ導入した HCT116 のライゼートを調製し、EndoH 処理ののちにウエスタンブロットを行った。その結果、Myc-wtSeipin では EndoH 処理によってバンドシフトが見られたのに対し、Myc-ngSeipin ではバンドシフトが見られなかった(図 1-1A)。このことから、想定通り ngSeipin には N 型糖鎖が付加されていないことがわかった。

(本研究では実験ごとに様々なサイズのディッシュ(2.0cm² の 24well plate、9.6 cm² の 6well plate、11.8 cm² の 3.5cm ディッシュ 等)を使い分けたため、トランスフェクション量は ng/cm² で統一して表記した。例えば、100 ng のプラスミドを 6 well plate にトランスフェクションした場合と、123 ng のプラスミドを 3.5cm ディッシュにトランスフェクションした場合は、いずれも 10.4 ng/cm² と表記した)

これらの発現ベクターを Transfection した HCT116 からライゼートを調製し、SERCA2 抗体を用いた IP 実験を行った。その結果、ngSeipin は wtSeipin と比べて比較的多く SERCA2b と Co-IP されたことから(約 2.5 倍)、ngSeipin は wtSeipin と比べて相対的に多く内在性 SERCA2b と結合することが示唆された(図 1-1G)。

Nervous system
 Colon

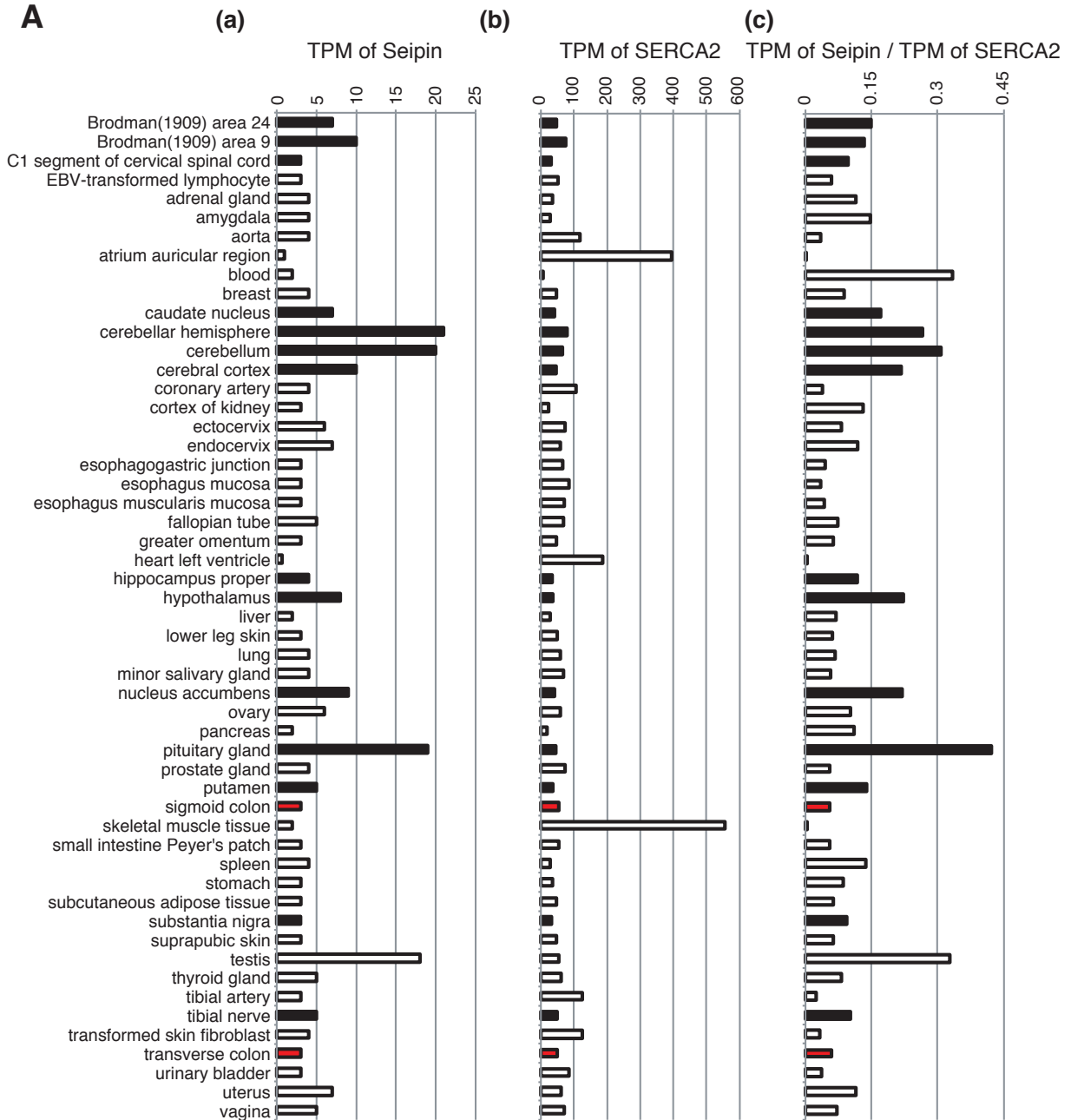


図 1-2：様々なヒト組織における Seipin および SERCA2 の発現量の比較

Expression Atlas: Gene expression across species and biological conditions (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>)の RNA-Seq データを参照し、ヒトの各組織における Seipin および SERCA2 の発現量(TPM : Transcripts Per Million)を比較した。黒色・赤色のグラフは各々 Nervous System ・ Colon における発現を示す。

図 1-1G の結果は、ngSeipin が SERCA2b に多量に結合し、その機能に影響を与える可能性を想起させるものであった。そこで次に、小胞体内腔に局在し、カルシウムイオンと結合することで蛍光を発するレポータータンパク質である G-CEPIA1er[77]を wtSeipin または ngSeipin とともに細胞に導入し、ngSeipin が小胞体内カルシウムイオン濃度に及ぼす影響を調べた。その結果、HCT116、SH-SY5Y いずれの場合でも、wtSeipin を導入しても G-CEPIA1er の蛍光強度に影響を及ぼさないのに対し、ngSeipin を導入した場合には G-CEPIA1er の輝度が 60%程度まで有意に低下した(図 1-3A、1-3B)。このことから ngSeipin に起因して小胞体内カルシウムイオン濃度が減少していることが示唆された。

次に細胞質に局在するレポータータンパク質である GCaMP6f [78]を wtSeipin または ngSeipin とともに細胞に導入し、その後に Thapsigargin [79] 処理を行い、処理前後の蛍光輝度の変化を経時的に観察する実験を行った。SERCA を選択的に阻害する薬剤である Thapsigargin で処理された細胞では、小胞体膜カルシウムイオンチャネルを介したカルシウムイオンの細胞質への放出のみが起こるようになる。従って Thapsigargin 処理後の細胞質におけるカルシウムイオン濃度の上昇を定量することで、Thapsigargin 処理前の小胞体内のカルシウムイオン濃度を間接的に定量することができる。その結果、ngSeipin 発現細胞では wtSeipin 発現細胞と比べて Thapsigargin 処理後の GCaMP6f の輝度の上昇量が有意に少ないことがわかった(図 1-3C)。この結果から(図 1-3A、1-3B の結果と同様に)ngSeipin 発現細胞において小胞体内カルシウムイオン濃度が低下することが示唆された。

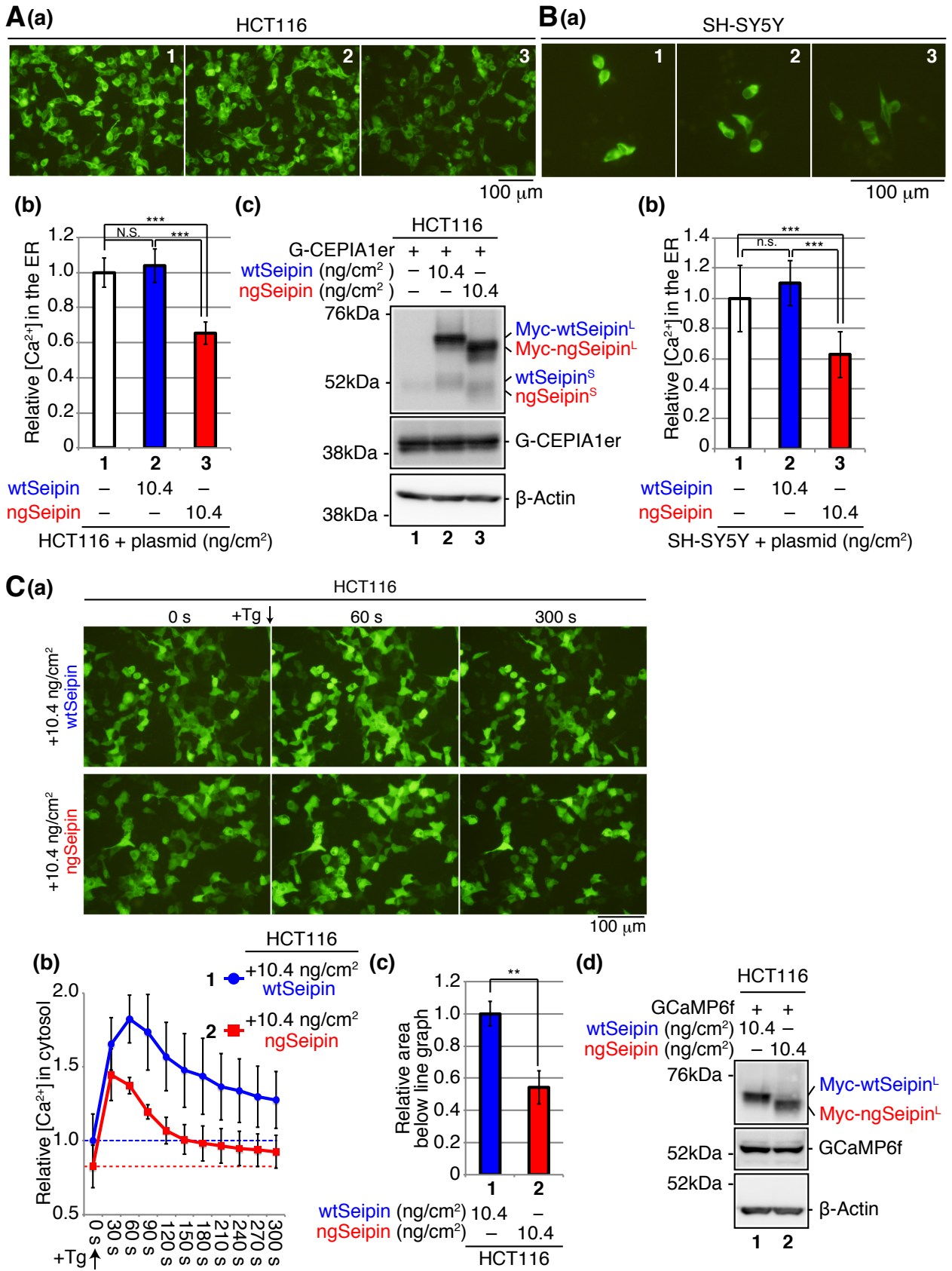


図 1-3 : ngSeipin の小胞体内カルシウムイオン濃度への影響
(説明は次ページに記した)

図 1-3(前ページ)の説明

(A) (a) HCT116 に 104 ng/cm^2 の G-CEPIA1er と共に 10.4 ng/cm^2 の wtSeipin または ngSeipin をトランスフェクションし、28 時間後に蛍光観察を行った。各条件 1 サンプルあたり 5-7 枚ずつ画像を撮影した。(b) 合計 3 サンプル分の実験結果(合計 16-17 枚ずつ)の輝度を測定し、それらすべての平均と標準偏差を求め、有意差検定を行った。検定結果は G-CEPIA1er のみを導入したサンプルの測定結果の平均を相対値 1 として表記した。(c) (a)で解析したサンプルからライゼートを調製し、ウエスタンブロットを行った。検出には抗 Seipin、抗 GFP および抗 β -Actin 抗体を使用した。(B) (a)SH-SY5Y を用いて(A(a))と同様の解析を行った。(b)合計 15-17 枚(各サンプル 5-7 枚ずつ)の画像を(A(b))と同様に検定した。

(C) (a) HCT116 に 104 ng/cm^2 の GCaMP6f と共に 10.4 ng/cm^2 の wtSeipin または ngSeipin をトランスフェクションし、28 時間後、 $1 \mu\text{M}$ の Thapsigargin (Tg)を培地に加えた。添加後 30 秒ごとに撮影を行った。それらのうちの 0、60、300 秒時点の画像を示した。(b) (a)の解析結果の各時間での平均と標準偏差を求め、wtSeipin 発現細胞の 0 秒時点での輝度を相対値 1 とする折れ線グラフで表記した。(n=3) (c) (a)のサンプルの測定時間内における小胞体内から細胞質へのカルシウムイオンの移動の総量を見積もるため、(b)のグラフ下面積(=(b)の点線と折れ線グラフの間の面積)を計算した。3 回の実験の結果の平均、標準偏差、有意差の有無を求め、wtSeipin 発現細胞の結果の平均を相対値 1 として表記した。(d) (a)の解析を行ったサンプルからライゼートを調製し、ウエスタンブロットを行った。検出には抗 Myc、抗 GFP および抗 β -Actin 抗体を使用した。

これらの結果は ngSeipin が SERCA2b と結合することで、SERCA2b による小胞体内へのカルシウムイオンの取り込みを選択的に阻害する可能性を想起させるものであった。これを検証するため、次に小胞体膜カルシウムイオンチャネルあるいは SERCA を選択的に活性化する薬剤を用いた解析を行った。

まず qRT-PCR で HCT116 における主要な小胞体膜カルシウムイオンチャネルの発現を調べたところ、1 型リアノジン受容体(RyR1)、1 型・2 型・3 型イノシトール 1,4,5-トリスリン酸受容体(IP3R1・IP3R2・IP3R3)が発現していることがわかった(RyR2、RyR3 の発現は検出されなかった)(図 1-4A)。そこで次に、G-CEPIA1er とともに wtSeipin または ngSeipin を導入した細胞を RyR の開口試薬である 4-Chloro-m-Cresol (4CmC) [80]、または IP3R の開口を促進する Bradykinin (Bra) [81]で処理し、小胞体内カルシウムイオン濃度の変化を調べた。その結果、wtSeipin・ngSeipin 発現細胞のいずれにおいても、4CmC または Bra 処理に起因する小胞体内カルシウムイオン濃度の低下が見られた(図 1-4B)。

図 1-4(次ページ)の説明

(A) HCT116 から RNA を調製し、qRT-PCR を行うことで RyR1、IP3R1、IP3R2、IP3R3 mRNA の発現量を比較した。検定の際には GAPDH の検出量で補正を行った。(n=3) (B) HCT116 に 104 ng/cm²の G-CEPIA1er と共に 10.4 ng/cm²の wtSeipin または ngSeipin をトランスフェクションし、28 時間後、1 mM 4-Chloro-M-Cresol (4CmC) (a) または 10 μM Bradykinin (Bra) (b) または両方 (c) を培地に加え、10 分後に蛍光観察を行った。(d) (a)-(c)の結果を検定し、各実験の G-CEPIA1er のみトランスフェクション・薬剤処理なしの結果の平均を相対値 1 として表記した(各サンプル 5-7 枚・各条件 3 サンプル由来の合計 15-17 枚の画像を取得・検定した)。(a)、(b)、(c)の実験はそれぞれ独立に行った。

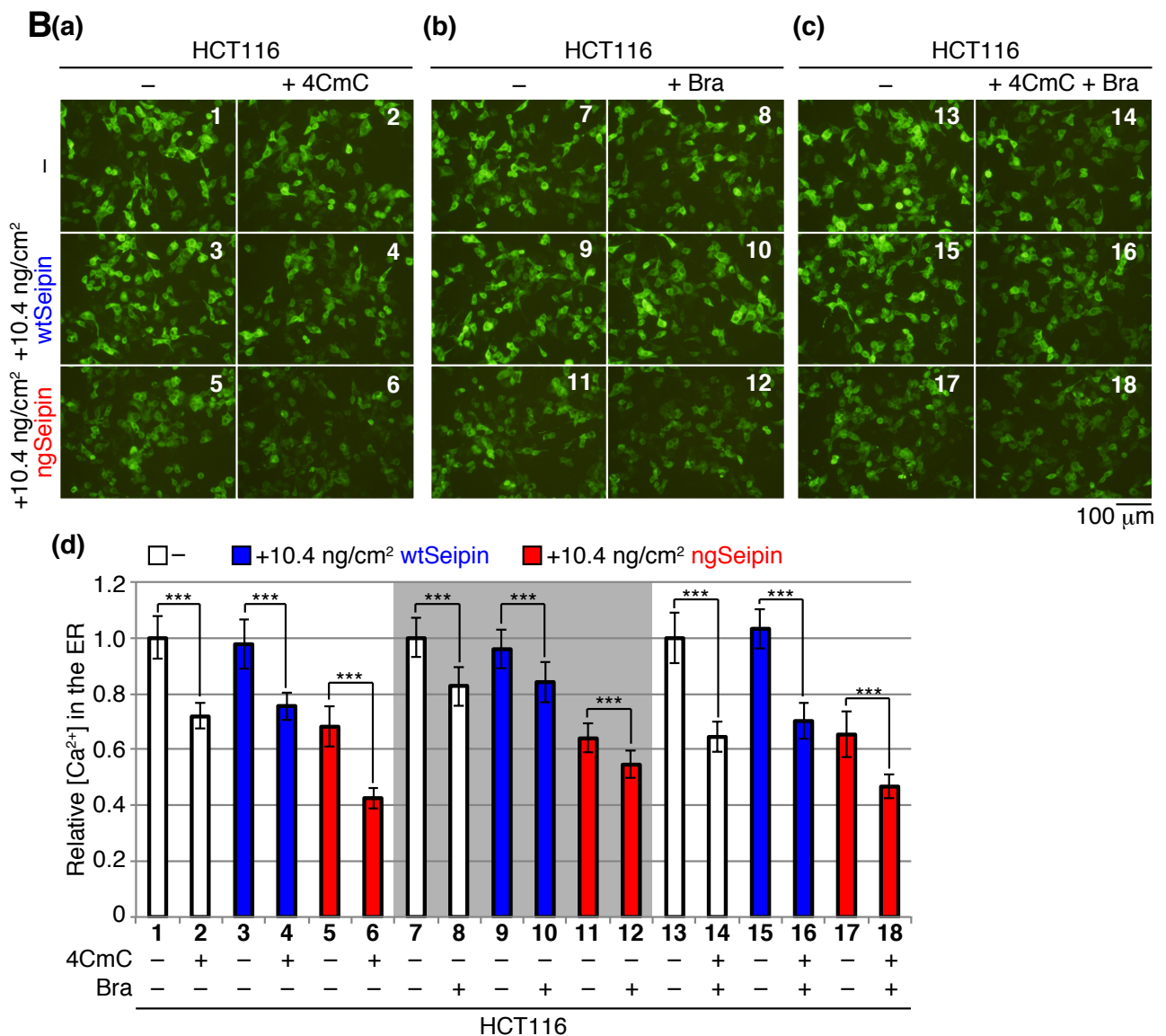
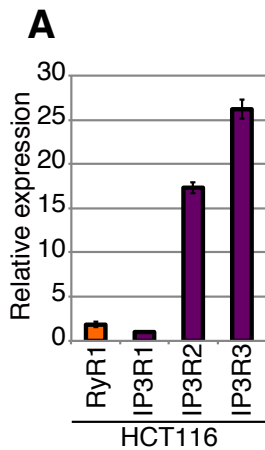


図 1-4 : ngSeipin の RyR や IP3R の機能への影響の有無の検討
(説明は前ページに記した。)

次に G-CEPIA1er とともに wtSeipin または ngSeipin を導入した細胞を SERCA の選択的な活性化試薬である CDN1163 [82][83]で処理したところ、wtSeipin 発現細胞では CDN1163 処理時間に応じて小胞体内カルシウムイオン濃度が上昇したものの、ngSeipin 発現細胞では効果が見られなかった(図 1-5A)。

これらの結果から、ngSeipin 発現細胞においても RyR1 や IP3R1,2,3 は正常に機能している(薬剤に起因して開口が起こる)一方で、SERCA2b に関しては選択的に不活性化されている(薬剤による活性化が起こらない)ことが示唆された。

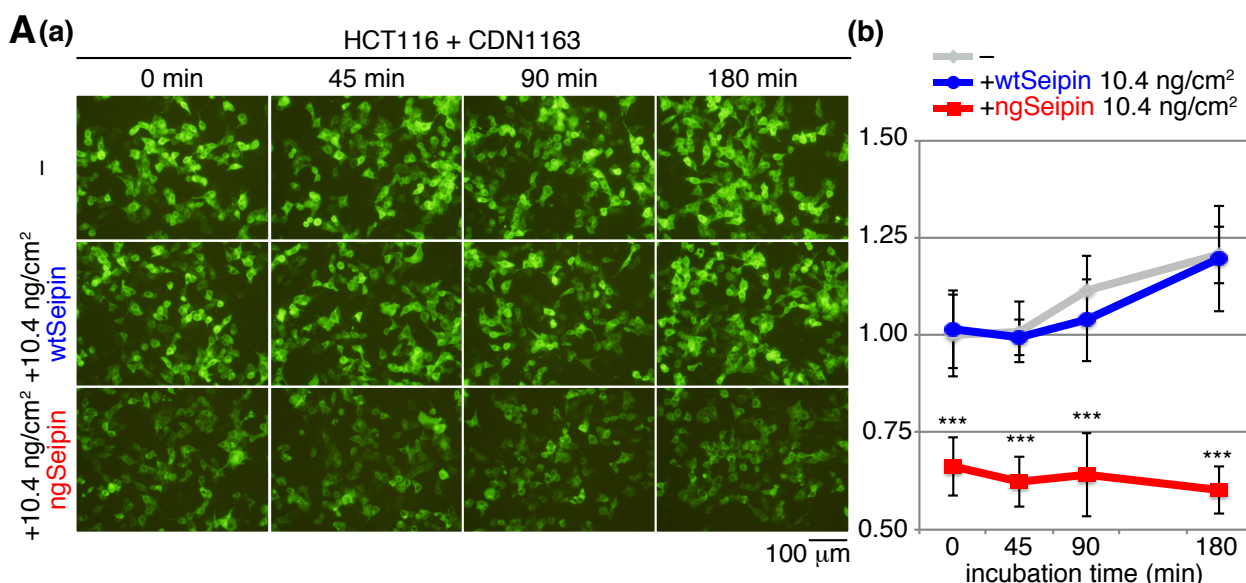


図 1-5 : ngSeipin 発現細胞への CDN1163 の効果の有無の検討

(A) (a) HCT116 に 104 ng/cm² の G-CEPIA1er と共に 10.4 ng/cm² の wtSeipin または ngSeipin をトランスフェクションし、28 時間後、10 μM の CDN1163 を培地に加え、表記の時間後に蛍光観察を行った。各条件それぞれ 3 サンプルずつ調製し、各サンプルの各処理時間でそれぞれ 5-6 枚ずつ画像を撮影した。(b) 各条件の各時間における 3 サンプル分の画像全て(15-16 枚ずつ)の平均・標準偏差を求め、G-CEPIA1er のみをトランスフェクションした細胞の 0 分時点での測定結果の平均値を相対値 1 とする折れ線グラフで表記した。いずれの処理時点においても、G-CEPIA1er のみを Transfection した場合(灰色)と G-CEPIA1er と ngSeipin を Co-Transfection した場合(赤色)との間で有意な差が認められた。

Seipinopathy は優性の疾患であることから、ngSeipin に起因する小胞体内カルシウムイオン濃度の低下は ngSeipin が wtSeipin と細胞内で共存する場合でも検出されるのではないかと予想された。この可能性を検証するため、細胞内に様々な量比の wtSeipin + ngSeipin を G-CEPIA1er と共に導入し、蛍光観察を行った。その結果、wtSeipin と共存する場合でも、しない場合でも、ngSeipin の導入量に相関して小胞体内カルシウムイオン濃度の有意な低下が起こることがわかった(図 1-6A)。さらに、wtSeipin と ngSeipin を 1:1 の量比で導入した細胞に CDN1163 処理を行ったところ、ngSeipin を単独で導入した場合と同様に、小胞体内カルシウムイオン濃度の増加は起こらなかった(図 1-6B)。これらの結果から、ngSeipin に起因する小胞体内カルシウムイオン濃度の低下は wtSeipin によって抑制されないことが示された。

図 1-6(次ページ)の説明

(A) (a) HCT116 に 104 ng/cm^2 の G-CEPIA1er と共に表記の量の wtSeipin および ngSeipin をトランスフェクションし、28 時間後に蛍光観察を行った。(b) (a)の結果を検定し、G-CEPIA1er のみをトランスフェクションした細胞の測定結果の平均値を 1 として表記した(各サンプル 5-6 枚・各条件 3 サンプル由来の合計 15-16 枚の画像を取得・検定した)。(B) (a) HCT116 に 104 ng/cm^2 の G-CEPIA1er と共に 5.2 ng/cm^2 ずつ wtSeipin および ngSeipin をトランスフェクションし、28 時間後、 $10 \mu\text{M}$ の CDN1163 を培地に加え、表記の時間後に蛍光観察を行った。両条件それぞれ 3 サンプルずつ調製し、各サンプルの各処理時間でそれぞれ 5-8 枚ずつ画像を撮影した。(b) 両条件の各時間における 3 サンプル分の画像全て(15-18 枚ずつ)の平均・標準偏差を求め、G-CEPIA1er のみをトランスフェクションした細胞の 0 分時点での測定結果の平均値を相対値 1 とする折れ線グラフで表記した。いずれの処理時点においても、G-CRPIA1er のみを Transfection した場合(灰色)と G-CRPIA1er と wtSeipin と ngSeipin を Co-Transfection した場合(紫色)との間で有意な差が認められた。

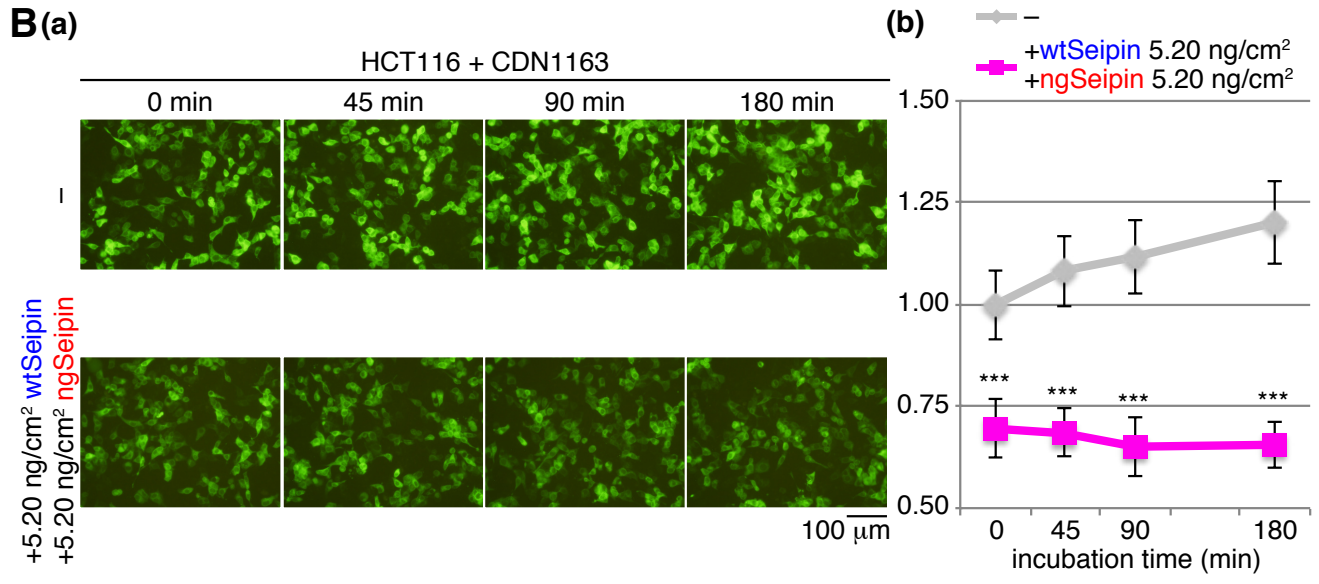
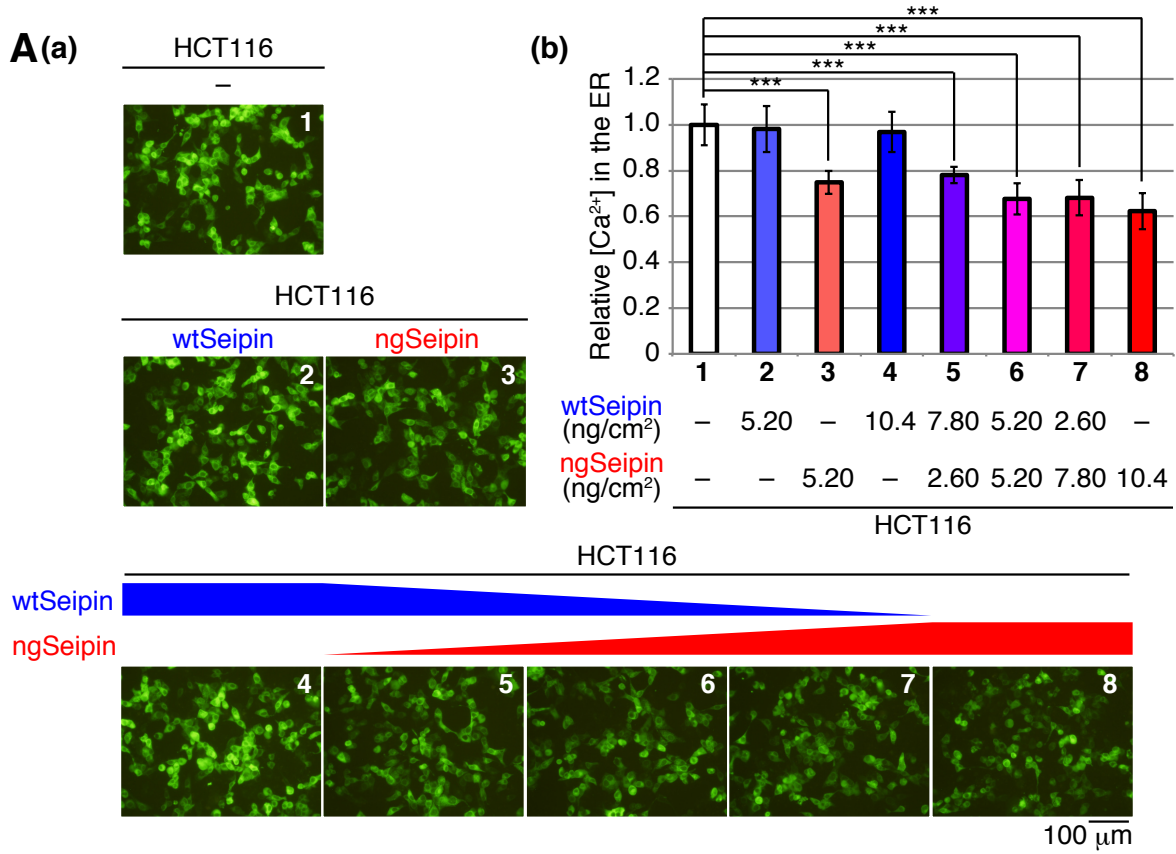


図 1-6 : wtSeipin と ngSeipin を同時に導入した場合の小胞体内カルシウムイオン濃度への影響
(説明は前ページに記した)

次に、ヒト細胞において内在性 Seipin が SERCA2b の機能に影響するのかどうかを検証するため、CRISPR/Cas9 を用いて HCT116 ゲノム上の Seipin 遺伝子をコードする領域の 2 箇所を切断し、その後に両アレル共に 2 つの切断部位が非相同末端連結により連結されたクローンを単離することで、Seipin 遺伝子のほぼ全領域が欠失されたノックアウト(Seipin-KO)細胞を作製した(図 1-7A, 1-7B)。単離したクローンで想定通りに Seipin の発現が見られないことを、RT-PCR およびウエスタンブロットにより確認した(図 1-7C、1-8A(c))。

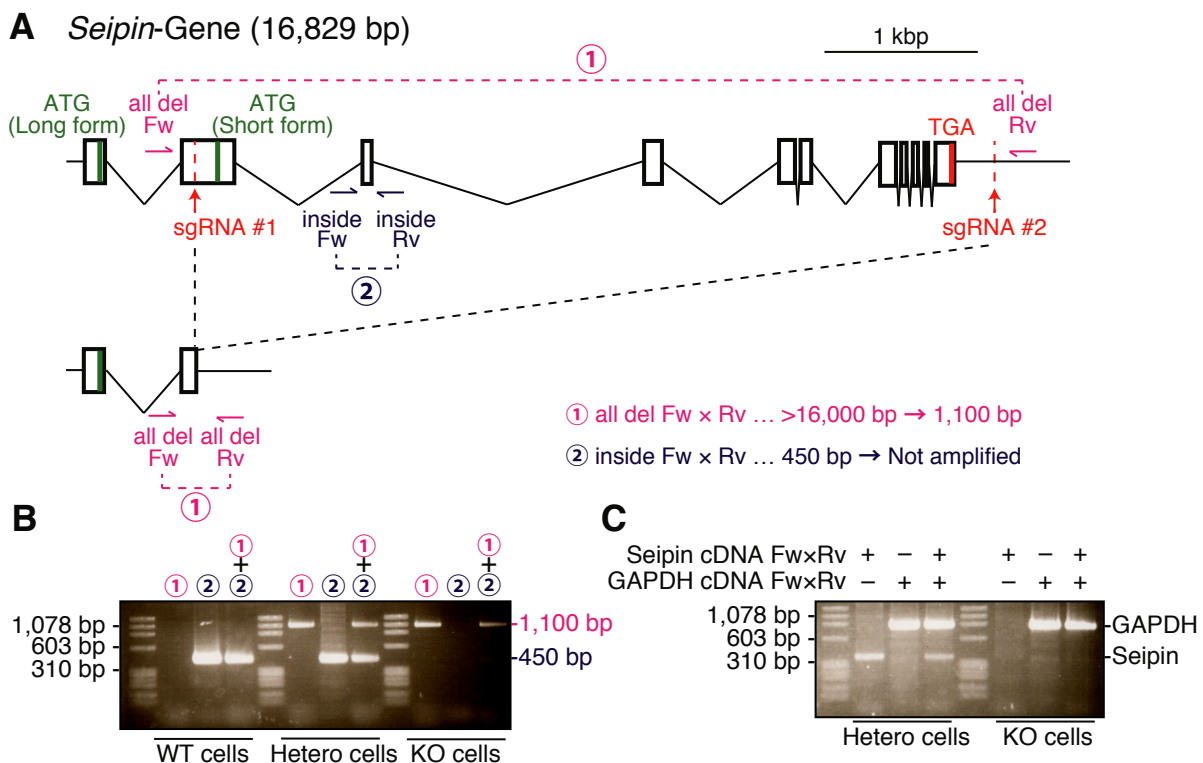


図 1-7 : Seipin-KO HCT116 の作製

(A)Seipin 遺伝子の exon2 と 3'UTR を標的とする sgRNA を使用し、両アレル共にこれら 2 箇所が切断され、非相同末端連結されることで Seipin 遺伝子の大部分が欠失した Seipin-KO 細胞を作製した。非相同末端連結が起こったことを確認するため、all del Fw × Rv と inside Fw × Rv の 2 つのプライマーペアで Genomic PCR を行った。(B) (A)で表記されたプライマーペアを用いた Genomic PCR の結果。(C) Seipin-Hetero 細胞と KO 細胞の cDNA を用いて RT-PCR を行った結果。

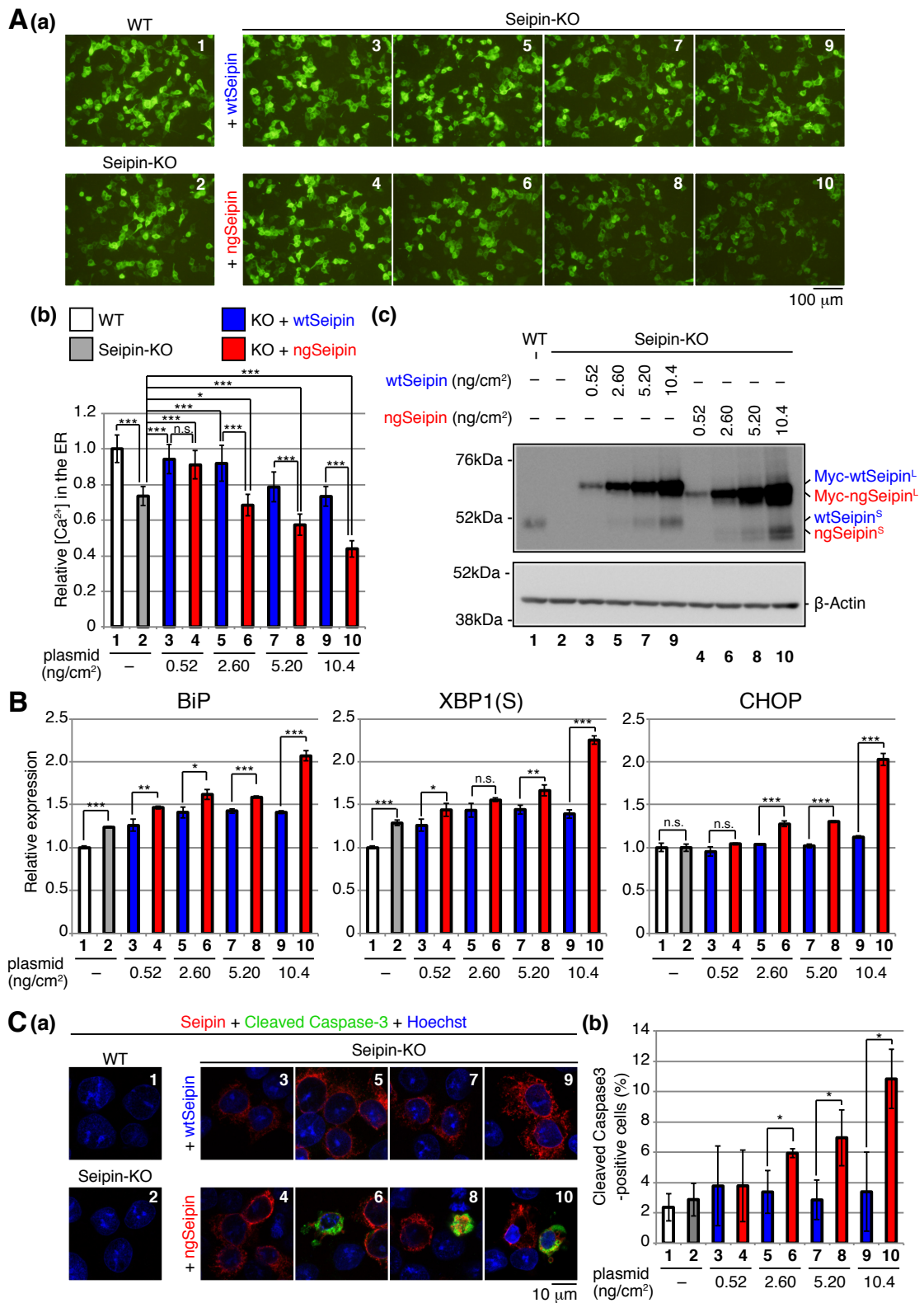


図 1-8 : Seipin-KO HCT116 における小胞体内カルシウムイオン濃度の低下、および KO 細胞への wtSeipin および ngSeipin の入れ戻し解析 (説明は次ページに記した)

図 1-8(前ページ) の説明

(A)野生型あるいは Seipin-KO HCT116 に 104 ng/cm² の G-CEPIA1er と共に表記の量の wtSeipin または ngSeipin をトランスフェクションし、28 時間後に蛍光観察を行った。各条件 1 サンプルあたり 5 枚ずつ画像を撮影した。(b) 合計 3 サンプル分の実験結果(合計 15 枚ずつ)の輝度を測定し、それらすべての平均と標準偏差を求め、有意差検定を行った。検定結果は G-CEPIA1er のみを導入した野生型 HCT116 の測定結果の平均を相対値 1 として表記した。(c) (a)で解析したサンプルからライゼートを調製し、ウエスタンブロットを行った。検出には抗 Seipin および抗 β -Actin 抗体を使用した。(B) 野生型あるいは Seipin-KO HCT116 に表記の量の wtSeipin または ngSeipin をトランスフェクションした細胞から RNA を調製し、qRT-PCR を行うことで BiP、XBP1(S)、CHOP mRNA の発現量を比較した。検定の際には GAPDH の検出量で補正を行った。(n=3) (C) (a) 野生型あるいは Seipin-KO HCT116 に表記の量の wtSeipin または ngSeipin をトランスフェクションした細胞を用いて、抗 Myc 抗体および抗 Cleaved-Caspase3 抗体で免疫染色を行った。(b) (a)の実験を 3 回行い(各条件合計 118-250 細胞ずつ解析した)、各回での Seipin と Cleaved-Caspase3 が共に検出された細胞の割合を求め、それらの平均と標準偏差、有意差の有無を求め、表記した。

次に、この Seipin-KO 細胞の小胞体内カルシウムイオン濃度を G-CEPIA1er を用いて調べたところ、ショウジョウバエ Seipin-KO 脂肪細胞を用いた解析結果[69]と同様に、小胞体内カルシウムイオン濃度が低下することがわかった(図 1-8A)。この結果から内在性のヒト wtSeipin に関しても、SERCA2b の正常な機能に必要であることが示唆された。

この Seipin-KO 細胞にさまざまな量の wtSeipin または ngSeipin を Transfection で入れ戻すことで、小胞体内カルシウムイオン濃度にどのような影響が見られるか検討した。まず内在性 Seipin とほぼ同程度~少し多い程度(0.52 ng/cm²)の Seipin を導入した場合には、wtSeipin だけでなく ngSeipin を導入した場合でも、Seipin-KO に起因する小胞体内カルシウムイオン濃度の低下を相補することができることがわかった(図 1-8A)。その一方で、ngSeipin の導入量を増加(2.60 ng/cm² 以上)させた場合には、(0.52 ng/cm² の場合とは全く逆に)Seipin-KO 細胞の小胞体内カルシウムイオン濃度をさらに低下させること

が明らかになった(図 1-8A)。

図 1-8A で ngSeipin の発現量に相関して検出された小胞体内カルシウムイオン濃度の低下に伴って小胞体ストレスが発生するかどうかを検討するため、小胞体ストレス応答マーカー遺伝子の発現量を qRT-PCR で調べた。その結果、ngSeipin を 2.60 ng/cm² 以上導入した細胞では(同じ量の wtSeipin を導入した細胞と比べて) BiP (主として ATF6 経路)、XBP1(S) (IRE1 経路)、CHOP (主として PERK 経路)の発現量がいずれも増加することがわかった(図 1-8B)。さらに、さまざまな量の wtSeipin または ngSeipin をトランスフェクションした細胞を用いて免疫染色を行ったところ、ngSeipin を 2.60 ng/cm² 以上導入した場合には Myc 抗体(Red)と、エフェクターカスパーゼである Caspase3 の切断型(=活性化型)を特異的に検出できる Cleaved Caspase-3 抗体(Green)とで共免疫染色される細胞の割合が、導入量に相関して有意に増加することがわかった(図 1-8C)。

これらの結果から、ngSeipin に起因する小胞体ストレスと細胞死には、小胞体内カルシウムイオン濃度の低下が関与している可能性が示唆された。

図 1-8 までの結果を受け、次に ngSeipin がどのようなメカニズムで SERCA2b を不活性化させるのか検討しようと考えた。そこでまず、Seipin が小胞体内腔部分の分子間相互作用によりオリゴマー化する性質を持つことに着目し、このオリゴマー化が ngSeipin の凝集に関与するかどうかを検討した。

Cryo 電子顕微鏡を用いたヒト Seipin オリゴマーの立体構造解析により、ヒト Seipin は小胞体内腔部分の分子間相互作用を介して小胞体膜上でリング状の 11 量体を形成することが明らかにされている[59]。Seipin モノマーの小胞体内腔部分には 8 本の β -strand からなる β -sandwich ドメインと、3 連結の α -helix が存在する。各モノマーの 3 連結の α -helix 同士は疎水相互作用(L226 \leftrightarrow L220、L233 \leftrightarrow V227)を介して結合して core ring を形成しており、この部分が小胞体膜の脂質二重層に陥入していることが示唆されている。core ring 構造は各モノマーの β -sandwich ドメインに取り囲まれた状態になっており、隣り合う β -sandwich ドメイン同士にも複数の水素結合(S181 \leftrightarrow Y215、Q239 \leftrightarrow S217、H131 \leftrightarrow R209)および疎水性相互作用(Y134 \leftrightarrow M189)が存在する。N 型糖鎖はこれらの隣り合う β -sandwich ドメインの間に割り込むような形で存在することから [Protein Data Bank: 6DS5]、Seipin の N 型糖鎖の欠失は Seipin モノマー同士

の相互作用に影響を及ぼす可能性が考えられた(図 1-9A)。そこで、先行研究[59]を参考にして上記の分子間相互作用に関与する 6 種類のアミノ酸に変異(H131R・Y134A・Y215A・L220D・L233D・Q239A)を導入した Seipin(M6)および ngSeipin(M6)の発現ベクターを作製し、解析に用いることにした(図 1-9B)。EndoH 処理の結果、Seipin(M6)には問題なく N 型糖鎖が付加されており、ngSeipin(M6)には N 型糖鎖が付加されていないことがわかった(図 1-9C)。

ngSeipin の小胞体膜上における凝集を定量的に検出する方法としては PLA (Proximity Ligation Assay)を用いた。手順としては、短い核酸が付加された抗体を用いてタンパク質 A および B をラベルしたのち、Ligation 反応～シグナル増幅反応を行う。これにより、タンパク質 A-B 間の距離が 40 nm 以下である場合にのみ Ligation～シグナル増幅が起こり、緑色の光点状のシグナルが検出される(図 1-9D)。

Myc-または Flag-タグを付加したさまざまな Seipin を同時にトランスフェクションした細胞を調製し、これらで Myc 抗体と Flag 抗体を用いた PLA を行った。その結果、 $1.30 + 1.30 \text{ ng/cm}^2$ 以上の Myc-ngSeipin + Flag-ngSeipin を導入した細胞では、同じ量の Myc-wtSeipin + Flag-wtSeipin を導入した細胞と比べて PLA のシグナル量が有意に増加した(図 1-9E)。この結果は ngSeipin が小胞体膜上で凝集していることを示唆するものである。さらに、Myc-wtSeipin + Flag-ngSeipin を導入した細胞でも Myc-wtSeipin + Flag-wtSeipin を導入した細胞と比べて PLA シグナルが増強されたことから、ngSeipin は ngSeipin 同士だけでなく wtSeipin も巻き込んで凝集を引き起こすことが示唆された(図 1-9E)。

その一方で、 $5.20 + 5.20 \text{ ng/cm}^2$ の Myc-ngSeipin(M6) + Flag-ngSeipin(M6)または Myc-wtSeipin + Flag-ngSeipin(M6)を導入した細胞では、PLA シグナルの増加が見られなかった(図 1-9E)。従って ngSeipin の小胞体膜上における凝集には、Seipin の小胞体内腔におけるオリゴマー化が必要であることが明らかになった。さらに、ngSeipin(M6)は ngSeipin と同様に内在性 SERCA2b と結合するものの(図 1-10A)、ngSeipin(M6)発現細胞では ngSeipin 発現細胞とは異なり、小胞体内カルシウムイオン濃度の低下は起こらず(図 1-10B)、小胞体ストレス応答の活性化やアポトーシスの誘導も見られなかった(図 1-10C、1-10D)。これらの結果から、ngSeipin に起因する SERCA2b の不活性化には ngSeipin の凝集が必要であることが示唆された。

図 1-9(次ページ)の説明

(A)Seipin オリゴマーの模式図。Cryo 電子顕微鏡を用いた解析により、Seipin モノマー同士が小胞体内腔部分の複数の疎水性相互作用および水素結合により結合していることが明らかにされている。N 型糖鎖は Seipin モノマー同士の相互作用面に割り込む形で配置されている。(B) Seipin のオリゴマー化に必要な 6 種類のアミノ酸に変異を導入した Seipin(M6)の模式図。(C) 野生型 HCT116 に各種 Seipin を 10.4 ng/cm^2 ずつトランスフェクションし、EndoH で無処理または処理したのちにウエスタンブロットを行った。検出には抗 Myc 抗体を用いた。(D) Proximity Ligation Assay の模式図。(E) (a) Seipin-KO HCT116 に各プラスミドを表記の量トランスフェクションし、抗 Myc および抗 Flag 抗体を用いて PLA を行った。Myc-ngSeipin + Flag-ngSeipin 発現細胞では、時々inset で示すように PLA のシグナルが全く検出されない領域が認められた。(b) (a)の実験を合計 2 回行い(各条件合計で 35-57 細胞ずつ撮影した)、個々の細胞あたりの PLA シグナルが占める面積を測定し、それらの平均と標準偏差、有意差の有無を求めた。結果は Myc-wtSeipin と Flag-wtSeipin を 0.26 ng/cm^2 ずつトランスフェクションした細胞の測定結果を相対値 1 として表記した。

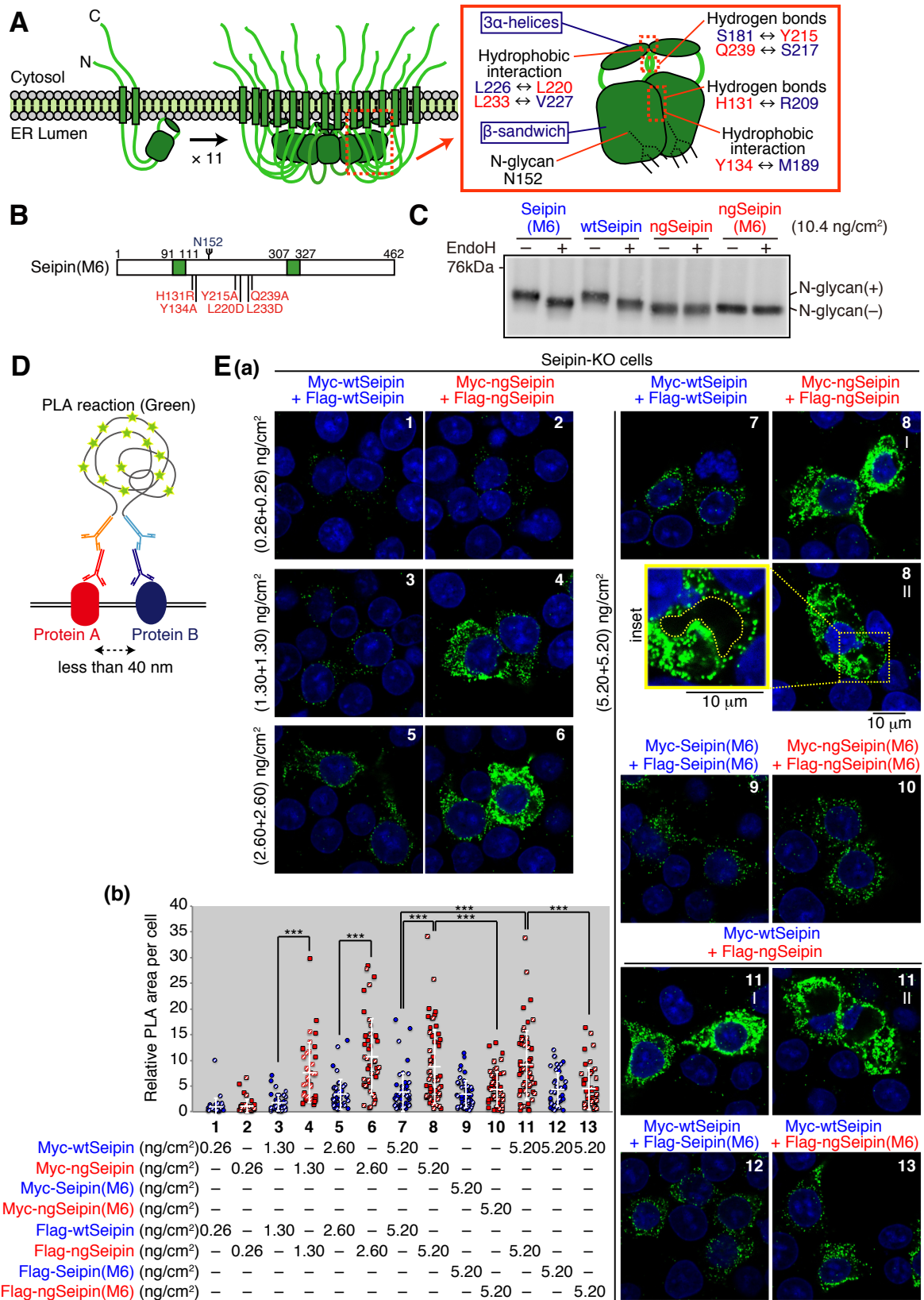


図 1-9 各種 Seipin 発現細胞を用いた Proximity Ligation Assay (PLA)
(説明は前ページに記した)

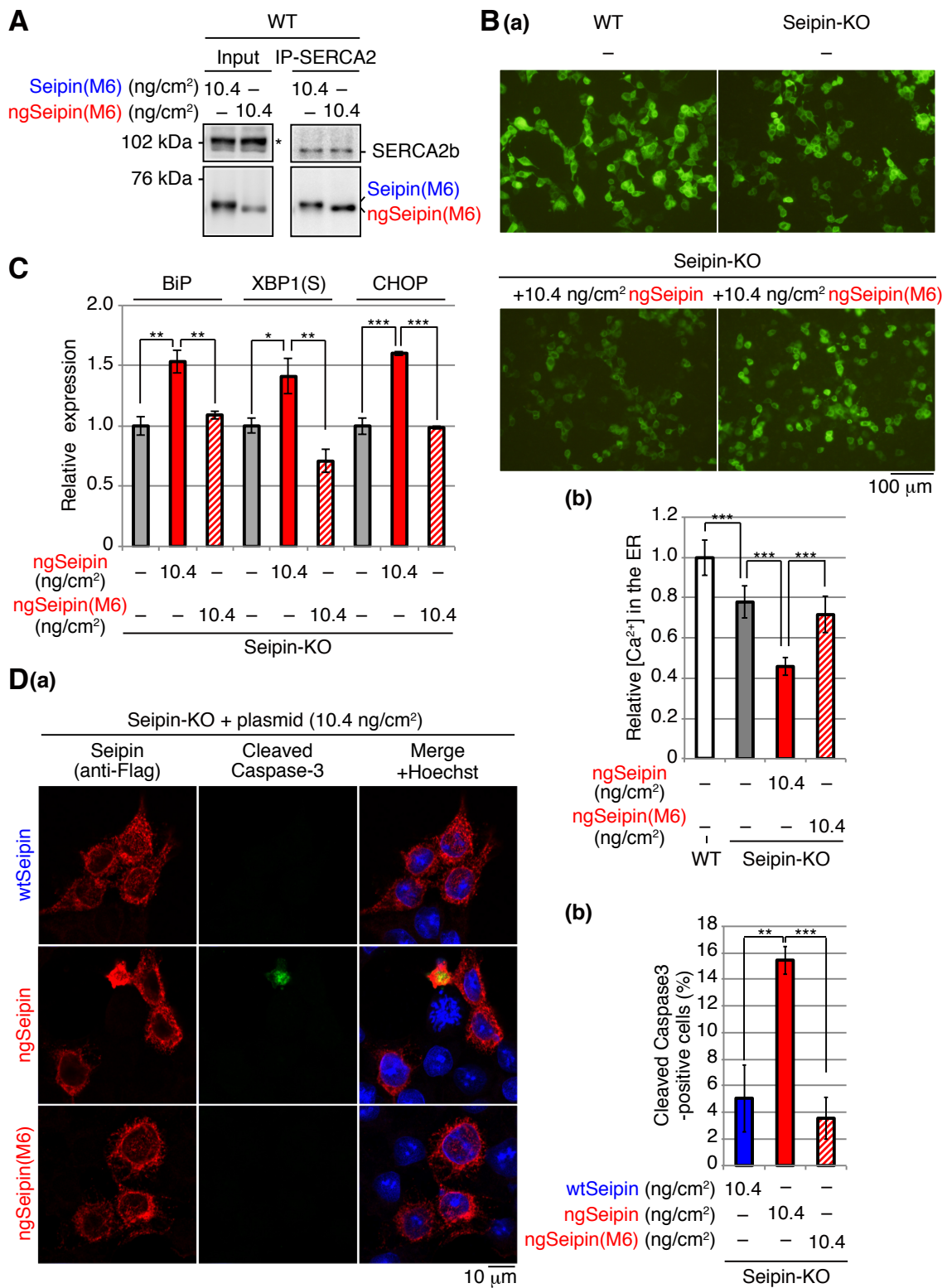


図 1-10 : ngSeipin(M6)発現細胞における小胞体内カルシウムイオン濃度、小胞体ストレス応答、およびアポトーシスの誘導 (説明は次ページに記した)

図 1-10(前ページ)の説明

(A)野生型 HCT116 に表記の Myc-Seipin(M6)あるいは Myc-ngSeipin(M6)を 10.4 ng/cm^2 トランスフェクションした細胞のライゼートを調製し、SERCA2 抗体を用いた IP 実験を行った。検出には抗 Myc 抗体および抗 SERCA2 抗体を用いた。(B) 野生型あるいは Seipin-KO HCT116 に 104 ng/cm^2 の G-CEPIA1er と共に 10.4 ng/cm^2 の ngSeipin または ngSeipin(M6)をトランスフェクションし、28 時間後に蛍光観察を行った。各条件 1 サンプルあたり 5-6 枚ずつ画像を撮影した。(b) 合計 3 サンプル分の実験結果(合計 15-16 枚ずつ)の輝度を測定し、それらすべての平均と標準偏差を求め、有意差検定を行った。検定結果は G-CEPIA1er のみを導入した野生型 HCT116 の測定結果の平均を相対値 1 として表記した。(C) Seipin-KO HCT116 に 10.4 ng/cm^2 の ngSeipin または ngSeipin(M6)をトランスフェクションした細胞から RNA を調製し、qRT-PCR を行うことで BiP、XBP1(S)、CHOP mRNA の発現量を比較した。検定の際には GAPDH の検出量で補正を行った。(n=3) (D) Seipin-KO HCT116 に 10.4 ng/cm^2 の ngSeipin または ngSeipin(M6)をトランスフェクションした細胞を用いて、抗 Myc 抗体および抗 Cleaved-Caspase3 抗体で免疫染色を行った。(b) (a) の実験を 3 回行い(各条件合計 108-118 細胞ずつ解析した)、各回での Seipin と Cleaved-Caspase3 が共に検出された細胞の割合を求め、それらの平均と標準偏差、有意差の有無を求め、表記した。

ngSeipin に起因する SERCA2b の不活性化のメカニズムをさらに検証するため、次に SERCA2b との結合を担う Seipin の領域を決定しようと考えた。

まず、Seipin のさまざまな部位を欠失させた変異体や、膜貫通部分を別の小胞体膜貫通タンパク質である G6Pase の膜貫通領域にすげ替えた変異体を複数作製した(図 1-11A、1-11B)。これらの変異体をトランスフェクションした細胞のライゼートを用いてウエスタンブロットを行った結果、いずれの変異体に関しても想定通りの高さにバンドが検出されることがわかった(図 1-11C)。

次に、これらの変異体の発現細胞ライゼートと SERCA2 抗体を用いて IP 実験を行った結果、ほとんどの変異体 Seipin が内在性 SERCA2b と Co-IP される一方で、Seipin(Δ C)および ngSeipin(Δ C)はほとんど Co-IP されないことがわかった(図 1-11C)。

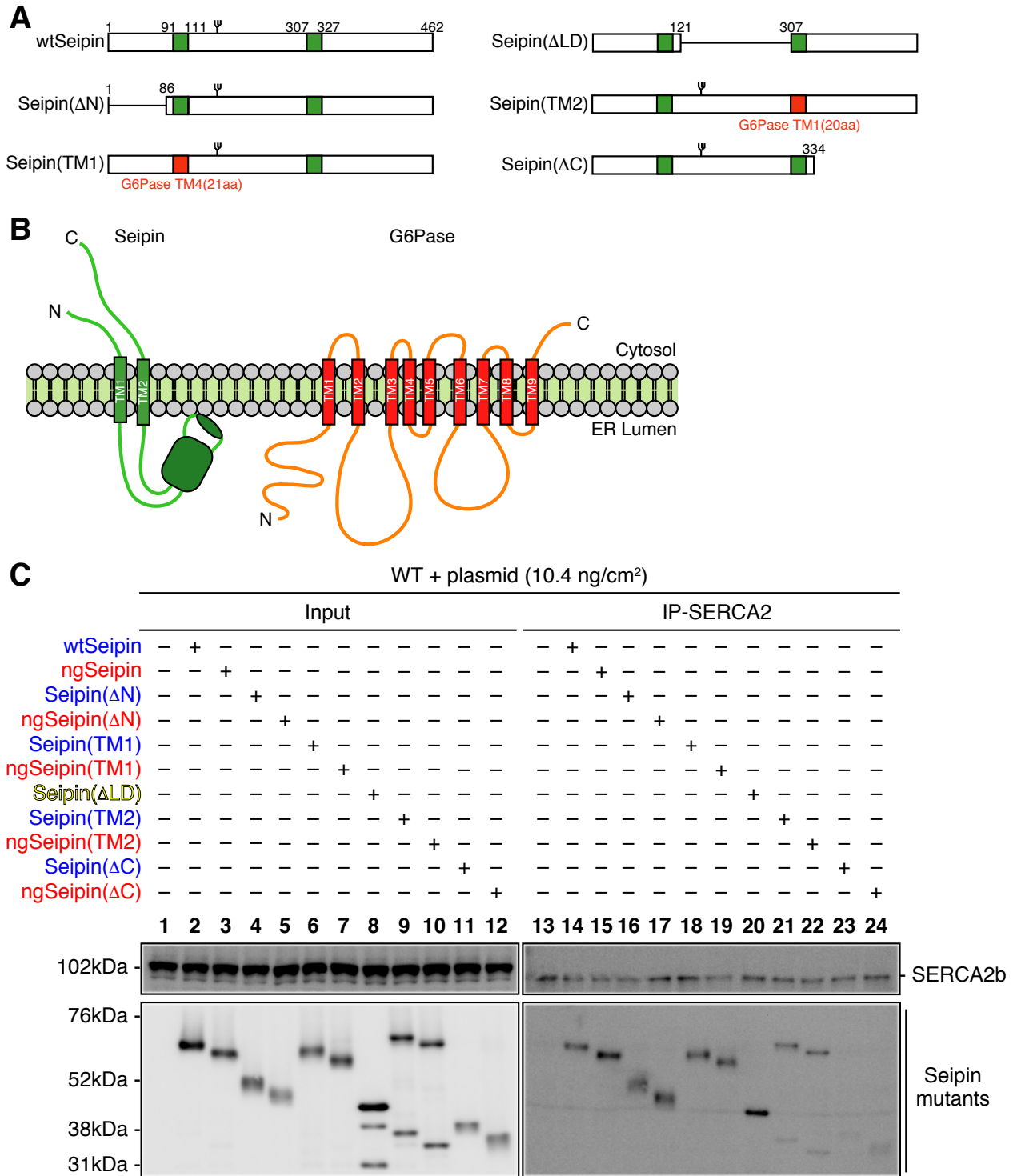


図 1-11：種々の部分欠損・すげ替え変異体 Seipin を用いた IP 実験
 (A) 各種部分欠損・配列すげ替え Seipin の模式図。(B) Seipin および G6Pase の模式図。(C) 野生型 HCT116 に種々の変異体 Seipin を 10.4 ng/cm² ずつトランスフェクションした細胞のライゼートを調製し、SERCA2 抗体を用いた IP 実験を行った。検出には抗 Myc および抗 SERCA2 抗体を用いた。

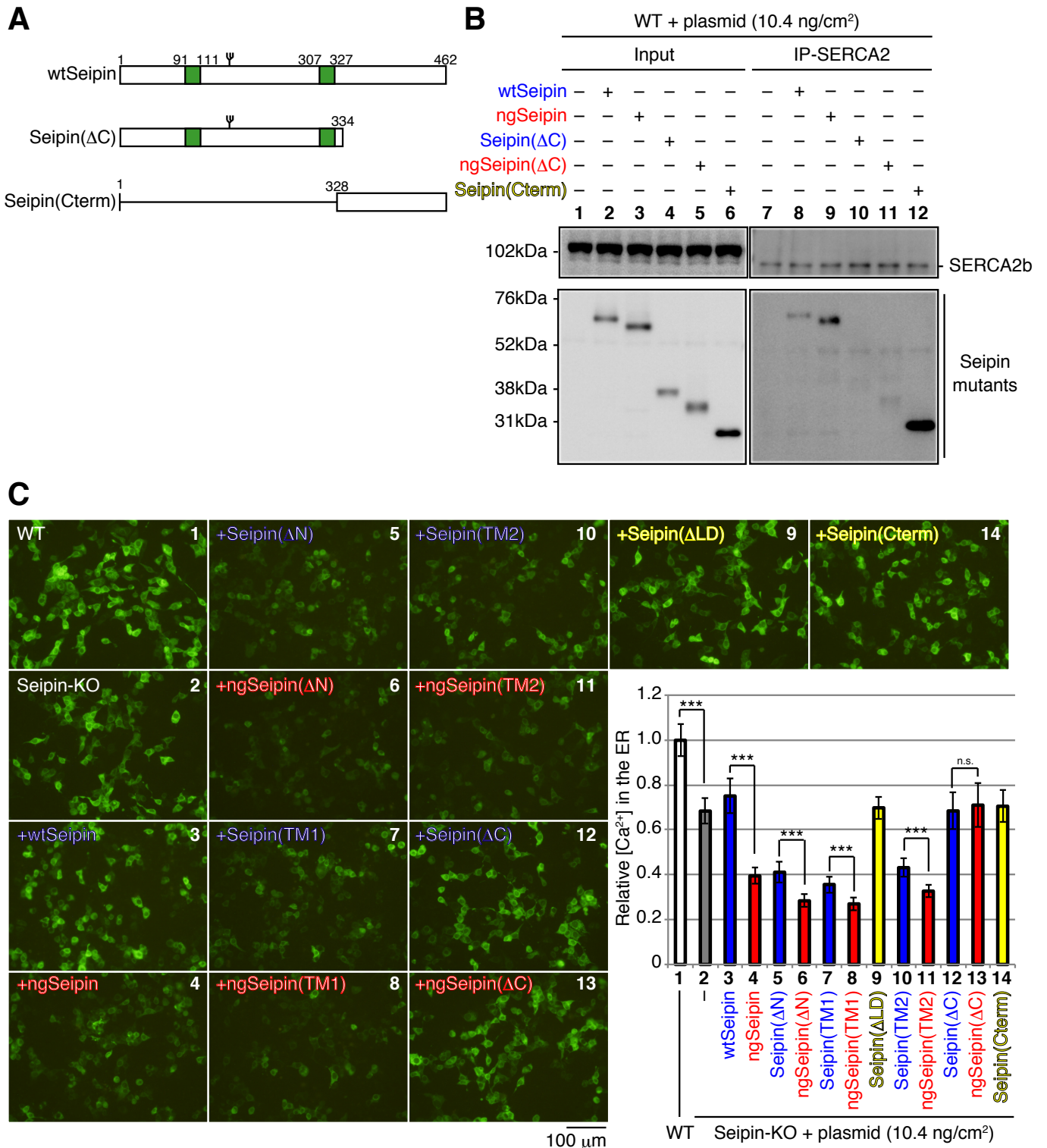


図 1-12: Seipin(ΔC)、Seipin(Cterm)を用いた IP 実験
 および各種変異体 Seipin 発現細胞の小胞体内カルシウムイオン濃度
 (説明は次ページに記した)

図 1-12(前ページ)の説明

(A) Seipin(Δ C)および Seipin(Cterm)の模式図。(B) 野生型 HCT116 に種々の変異体 Seipin を 10.4 ng/cm^2 ずつトランスフェクションした細胞のライゼートを調製し、SERCA2 抗体を用いた IP 実験を行った。検出には抗 Myc および抗 SERCA2 抗体を用いた。(C) 野生型あるいは Seipin-KO HCT116 に 104 ng/cm^2 の G-CEPIA1er と共に 10.4 ng/cm^2 の各種 Seipin をトランスフェクションし、28 時間後に蛍光観察を行った。各条件 1 サンプルあたり 5-8 枚ずつ画像を撮影した。(b) 合計 3 サンプル分の実験結果(合計 15-18 枚ずつ)の輝度を測定し、それらすべての平均と標準偏差を求め、有意差検定を行った。検定結果は G-CEPIA1er のみを導入した野生型 HCT116 の測定結果の平均を相対値 1 として表記した。

そこで次に Seipin の C 末端部分のみ(Seipin(Cterm))を発現させるコンストラクトを作製し(図 1-12A)、これを導入した細胞のライゼートを用いて IP 実験を行った。その結果、Seipin(Cterm)は効率よく内在性 SERCA2b に Co-IP された。これらの結果から、Seipin は細胞質側に存在する C 末端部分で SERCA2b と結合していることが強く示唆された(図 1-12B)。

次に図 1-11A と 1-12A のさまざまな変異体 Seipin 発現細胞の小胞体内カルシウムイオン濃度を調べたところ、ほとんどの部分欠損またはすげ替え変異体は小胞体内カルシウムイオン濃度を低下させ、そこから糖鎖をも欠失させた多重変異体はさらに顕著に小胞体内カルシウムイオン濃度を低下させることがわかった。その一方で、Seipin(Δ C)、ngSeipin(Δ C) 発現細胞では小胞体内カルシウムイオン濃度の低下が見られなかった。また、Seipin(Δ LD)および Seipin(Cterm)は IP 実験で SERCA2b との結合が検出されたものの、これらを導入した細胞では小胞体内カルシウムイオン濃度の低下が見られなかった(図 1-12C)。従って、Seipin の変異体に起因する小胞体内カルシウムイオン濃度の低下には、C 末端における SERCA2b との結合と、小胞体内腔部分におけるオリゴマー化を介した凝集の 2 つが必要であることを示唆された。

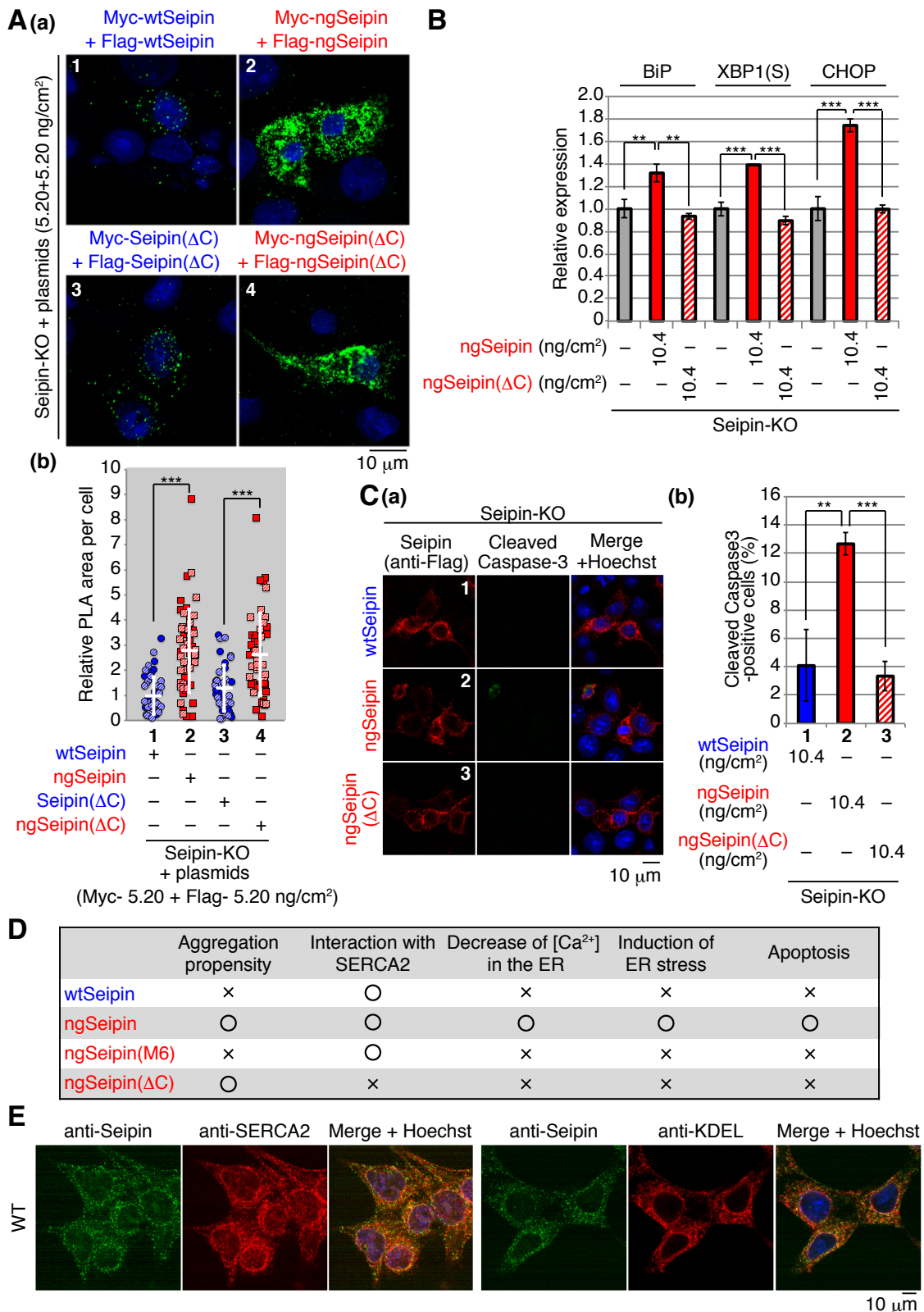


図 1-13 ngSeipin(ΔC)発現細胞における PLA、小胞体ストレス応答、細胞死の解析、および野生型 HCT116 における Seipin、SERCA2、KDEL の免疫染色 (説明は次ページに記した)

図 1-13(前ページ)の説明

(A) (a)表記の種類・量の発現ベクターをトランスフェクションした Seipin-KO HCT116 で抗 Myc および抗 Flag 抗体を用いて PLA を行った。(b) (a)の実験を合計 2 回行い(各条件合計で 40-48 細胞ずつ撮影した)、個々の細胞ごとの PLA シグナルが占める面積を測定し、それらの平均と標準偏差、有意差の有無を求めた。結果は Myc-wtSeipin と Flag-wtSeipin を 5.20 ng/cm^2 ずつトランスフェクションした細胞の測定結果を相対値 1 として表記した。(B) Seipin-KO HCT116 に ngSeipin または ngSeipin(Δ C)を 10.4 ng/cm^2 トランスフェクションした細胞から RNA を調製し、qRT-PCR を行うことで BiP、XBP1(S)、CHOP mRNA の発現量を比較した。検定の際には GAPDH の検出量で補正を行った。(n=3) (C) Seipin-KO HCT116 に 10.4 ng/cm^2 の ngSeipin または ngSeipin(Δ C)をトランスフェクションした細胞を用いて、抗 Myc 抗体および抗 Cleaved-Caspase3 抗体で免疫染色を行った。(b) (a)の実験を 3 回行い(各条件合計 117-127 細胞ずつ解析した)、各回での Seipin と Cleaved-Caspase3 が共に検出された細胞の割合を求め、それらの平均と標準偏差、有意差の有無を求め、表記した。(D) ここまでの解析結果をまとめ、表で示した。(E) 野生型 HCT116 で、Seipin 抗体と SERCA2 抗体、あるいは Seipin 抗体と KDEL 抗体を用いて免疫染色を行った。

Myc-ngSeipin(Δ C) + Flag-ngSeipin(Δ C)発現細胞では多量の PLA シグナルが検出されたことから、ngSeipin(Δ C)は小胞体膜上で凝集を引き起こすことが示唆された(図 1-13A)。その一方で、ngSeipin(Δ C)発現細胞では小胞体ストレス応答は活性化されず(図 1-13B)、細胞死も誘導されなかった(図 1-13C)。従って、Seipin が小胞体膜上で凝集を引き起こすだけでは、小胞体ストレス応答や細胞死が誘導されないことが示唆された。

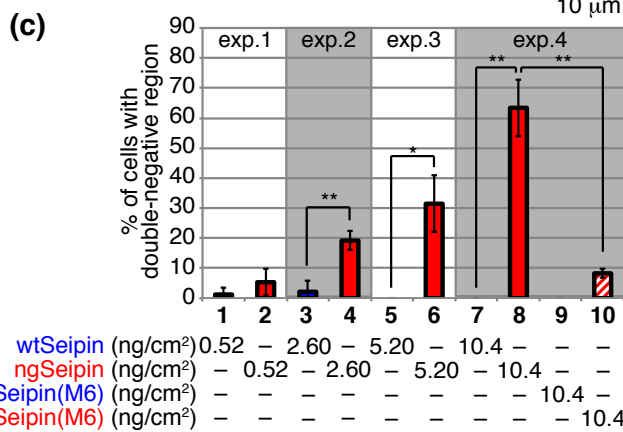
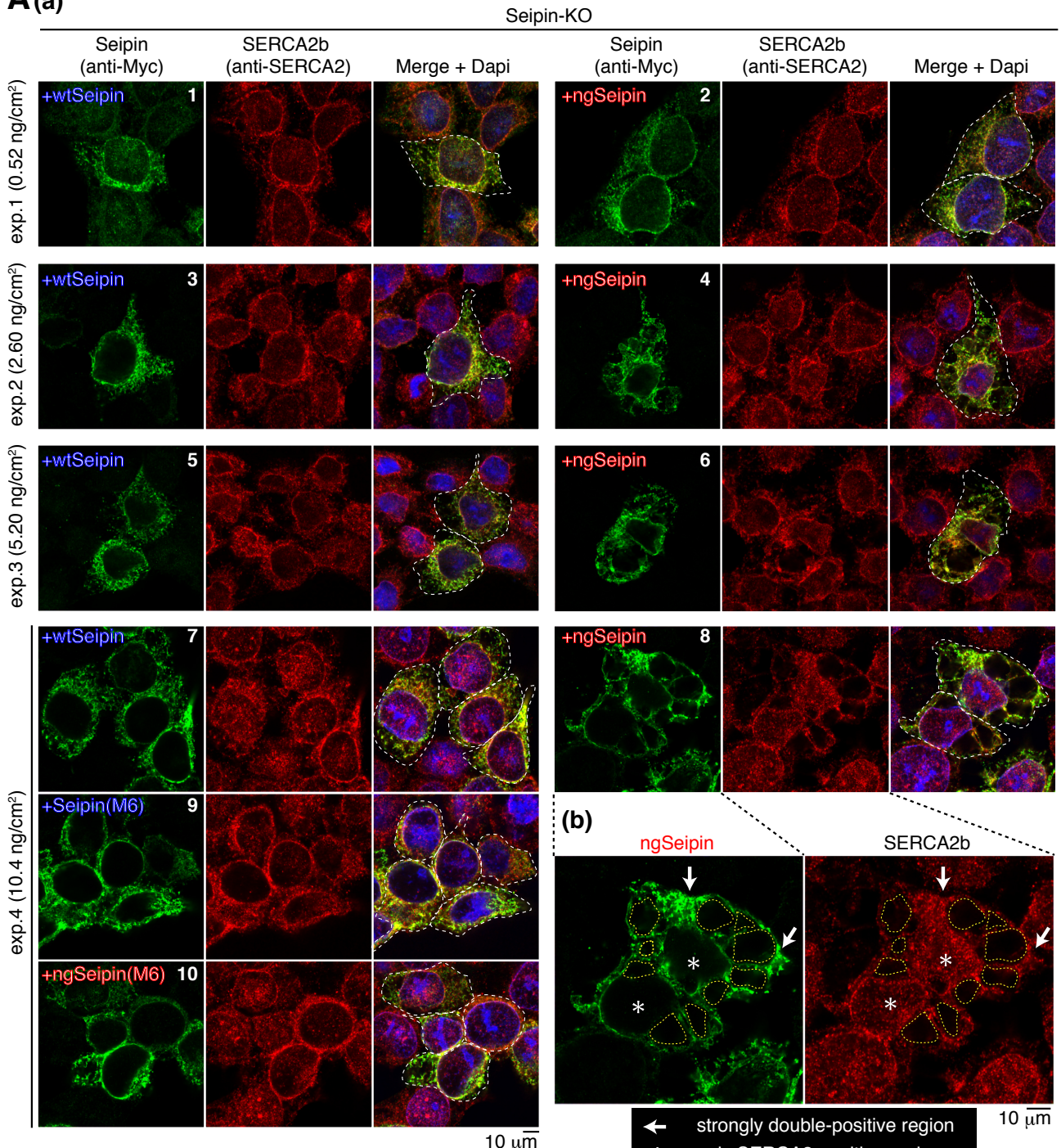
ここまでの結果をまとめ、図 1-13D に示した。ngSeipin は SERCA2b を不活性化させることで小胞体内カルシウムイオン濃度を低下させるが、これには小胞体内腔におけるオリゴマー化を介した凝集と、C 末端部分を介した SERCA2b との結合が必要であることが明らかになった。実際、SERCA2b と結合するものの凝集傾向を示さない ngSeipin(M6)や、凝集を引き起こすものの SERCA2b とは結合しない ngSeipin(Δ C)は、小胞体内カルシウムイオン濃度を低下させず、小胞体ストレス応答と細胞死も誘導しなかった。

次に、ngSeipin の小胞体膜上における凝集が小胞体の形態に影響を及ぼすのではないかと考え、これについて免疫染色で調べた。まずは wtSeipin と SERCA2 の共免疫染色を行ったところ、HCT116 の内在性 Seipin や Seipin-KO 細胞に Transfectin した Myc-wtSeipin はいずれも典型的な ER パターンを示し、SERCA2 のシグナルとよく共局在した(図 1-13E、1-14A)。また内在性 SERCA2b に関しては(KDEL 抗体の検出結果との比較から分かるように)小胞体だけでなく、一部は核でもシグナルが見られた。先行研究を参照したところ、この結果は SERCA2 の一部が核膜に存在することに起因すると考えられた[84](図 1-13E、1-14A)。その一方で、Seipin-KO 細胞に 2.60 ng/cm² 以上の Myc-ngSeipin を Transfectin した Seipin-KO 細胞を用いて共免疫染色を行うと、正常な細胞とは全く異なる、小胞体が膨らんで歪に変形した細胞が複数検出された(図 1-14A(a))。詳細な観察の結果、このような ngSeipin 発現細胞の小胞体には(野生型 HCT116 にも見られる)SERCA2 のみが検出される領域(only SERCA2-positive region)と、Seipin と SERCA2 がどちらも強く検出される領域(strongly double-positive region)、Seipin と SERCA2 のいずれも検出されない領域(double-negative region)が含まれていることがわかった(図 1-14A(b))。このような double-negative region を含む ngSeipin 発現細胞の割合は、ngSeipin の導入量に相関して増加することがわかった(図 1-14A(c))。(Myc-ngSeipin + Flag-ngSeipin を導入した細胞を用いて PLA を行った場合にも、一部の細胞では全く PLA のシグナルが検出されない領域が観察されていた(図 1-9E(a)の inset)。この部分は、図 1-14A の免疫染色の際に検出された double-negative region と同じものであると考えられる。)

次に Seipin(M6)や ngSeipin(M6)を導入した細胞で免疫染色を行ったところ、double-negative region が観察される細胞の割合が ngSeipin 発現細胞と比べて顕著に減少することがわかった(図 1-14A(c))。その一方で ngSeipin(Δ C)発現細胞では ngSeipin 発現細胞とほぼ同じ頻度で double-negative region が観察された(図 1-15A(a))。これらのことから、ngSeipin に起因する double-negative region の形成には、ngSeipin の小胞体内腔部分のオリゴマー化を介した小胞体膜上での凝集が必要であることが示唆された。

ngSeipin 発現細胞を用いた免疫染色の結果、double-negative region は GAPDH 抗体由来のシグナルの局在と一致せず、double-negative region は細胞質ではないことが示唆された(図 1-14B)。

A(a)



B

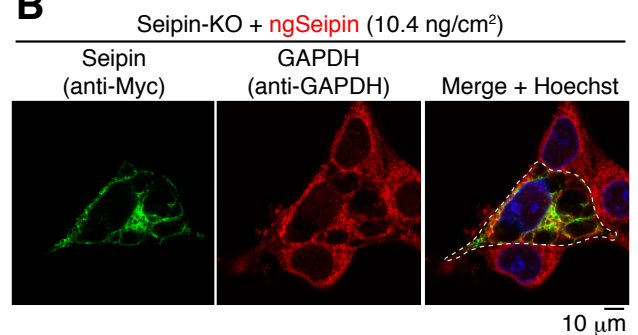


図 1-14 : ngSeipin 発現細胞の免疫染色 (説明は次ページに記した)

図 1-14(前ページ)の説明

(A) (a) Seipin-KO HCT116 に表記の種類・量の発現ベクターを導入し、抗 Myc および抗 SERCA2 抗体を用いた免疫染色を行った。(b) ngSeipin 発現細胞の拡大像。Seipin と SERCA2 が共に強く検出される領域(strongly double-positive region)と、SERCA2 のみが検出される領域(only SERCA2-positive region)、どちらも検出されない領域(double-negative region)が認められた。(c) (a)の実験を各条件 3 回ずつ行い(各条件合計 70-132 細胞ずつ撮影した)、各回で double-negative region が検出された細胞の割合の平均と標準偏差を求め、これらを有意差の有無と共に表記した。(B) Seipin-KO HCT116 に ngSeipin を 10.4 ng/cm² トランスフェクションした細胞で、抗 Myc および抗 GAPDH 抗体を用いて免疫染色を行った。

興味深いことに、図 1-12C で小胞体内カルシウムイオン濃度の低下が見られた Seipin(Δ N)、Seipin(TM1)、Seipin(TM2)を Transfectin した細胞を用いて免疫染色を行ったところ、いずれの場合も double-negative region が検出された(図 1-15A)。それらからさらに糖鎖をも欠失させた ngSeipin(Δ N)、ngSeipin(TM1)、ngSeipin(TM2)発現細胞では、糖鎖有りの場合よりさらに高頻度で double-negative region が検出された(図 1-15A)。従って N 末端の欠失や TM1、TM2 のすげ替えも、N 型糖鎖の欠失と同じように Seipin の凝集の原因となり、そのような変異体 Seipin が SERCA2b と結合すると SERCA2b を不活性化してしまうのだと考えられる。それに加えて糖鎖の欠失も起こる場合には、さらに凝集が促進され、より顕著に SERCA2b が不活性化されるのであろう。

A(a)

Seipin-KO

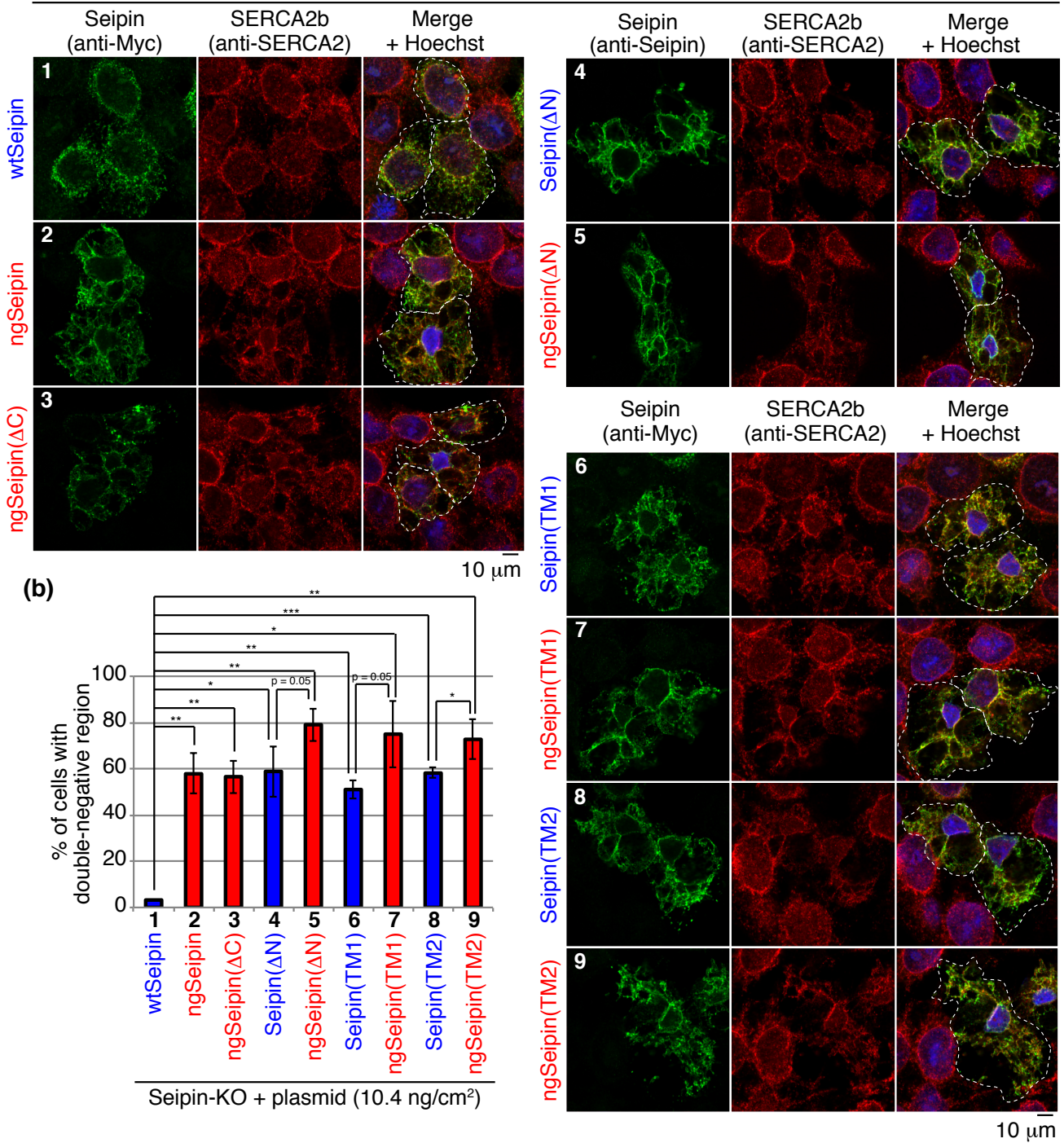


図 1-15：各種部分欠損・すげ替え変異体 Seipin 発現細胞の免疫染色

(A) (a) Seipin-KO HCT116 に表記の種類の発現ベクターを 10.4 ng/cm² で導入し、免疫染色を行った。抗体は Seipin(ΔN)発現細胞と ngSeipin(ΔN)発現細胞のみ抗 Seipin 抗体と抗 SERCA2 抗体を使用し、それ以外は抗 Myc および抗 SERCA2 抗体を使用した。(b) (a)の実験を各条件 3 回ずつ行い(各条件合計 87-98 細胞ずつ撮影した)、各回で double-negative region が検出された細胞の割合の平均と標準偏差を求め、これらを有意差の有無と共に表記した。

double-negative region をより詳細に解析する目的で、live imaging も行った。mEGFP-ngSeipin を mCherry-SERCA2b、ER-TagBFP(小胞体内腔に局在)と共に細胞に導入して解析したところ、 2.60 ng/cm^2 以上の mEGFP-ngSeipin を導入した際に、mEGFP-ngSeipin と mCherry-SERCA2b のシグナルが検出されない double-negative region が観察された(図 1-16A(a))。さらに、この double negative region が ER-TagBFP の局在と一致することが明らかになった(図 1-16A(b))。このことから、double-negative region は小胞体内腔であることが強く示唆された。mEGFP-ngSeipin(M6)発現細胞では、double-negative region の形成は認められなかった(図 1-16A(c))。

mEGFP-ngSeipin + Lamp1-mCherry + ER-TagBFP 発現細胞における mEGFP-ngSeipin や ER-TagBFP の局在と Lamp1-mCherry の局在は一致しなかったため(図 1-16B)、double-negative region がリソソーム内部である可能性は低いと考えられた。

以上の結果から、ngSeipin は小胞体膜上で SERCA2b を巻き込みながら凝集することで小胞体を変形させ、double-negative region を形成させることが示唆された。

図 1-16(次ページ)の説明

(A) (a) Seipin-KO HCT116 に表記の量の mEGFP-wtSeipin または mEGFP-ngSeipin を mCherry-SERCA2b (20.8 ng/cm^2)と ER-TagBFP (20.8 ng/cm^2)と Co-Transfection し、live-imaging を行った。(b) mEGFP-ngSeipin 発現細胞の拡大像。mEGFP-ngSeipin も mCherry-SERCA2b も検出されない穴のような領域(double-negative region)と ER-TagBFP の局在が一致する結果が得られた。(c) mEGFP-Seipin(M6)、mEGFP-ngSeipin(M6)を用いて(a)と同様の解析を行った。(d) (a)および(c)の実験を合計 3 回行い(各条件合計 91-105 細胞ずつ撮影した)、double-negative region が検出された細胞の割合の平均・標準偏差を求め、有意差の有無と共に表記した。(B) Seipin-KO HCT116 に表記の量の mEGFP-ngSeipin・Lamp1-mCherry・ER-TagBFP を Co-Transfection し、live-imaging を行った。

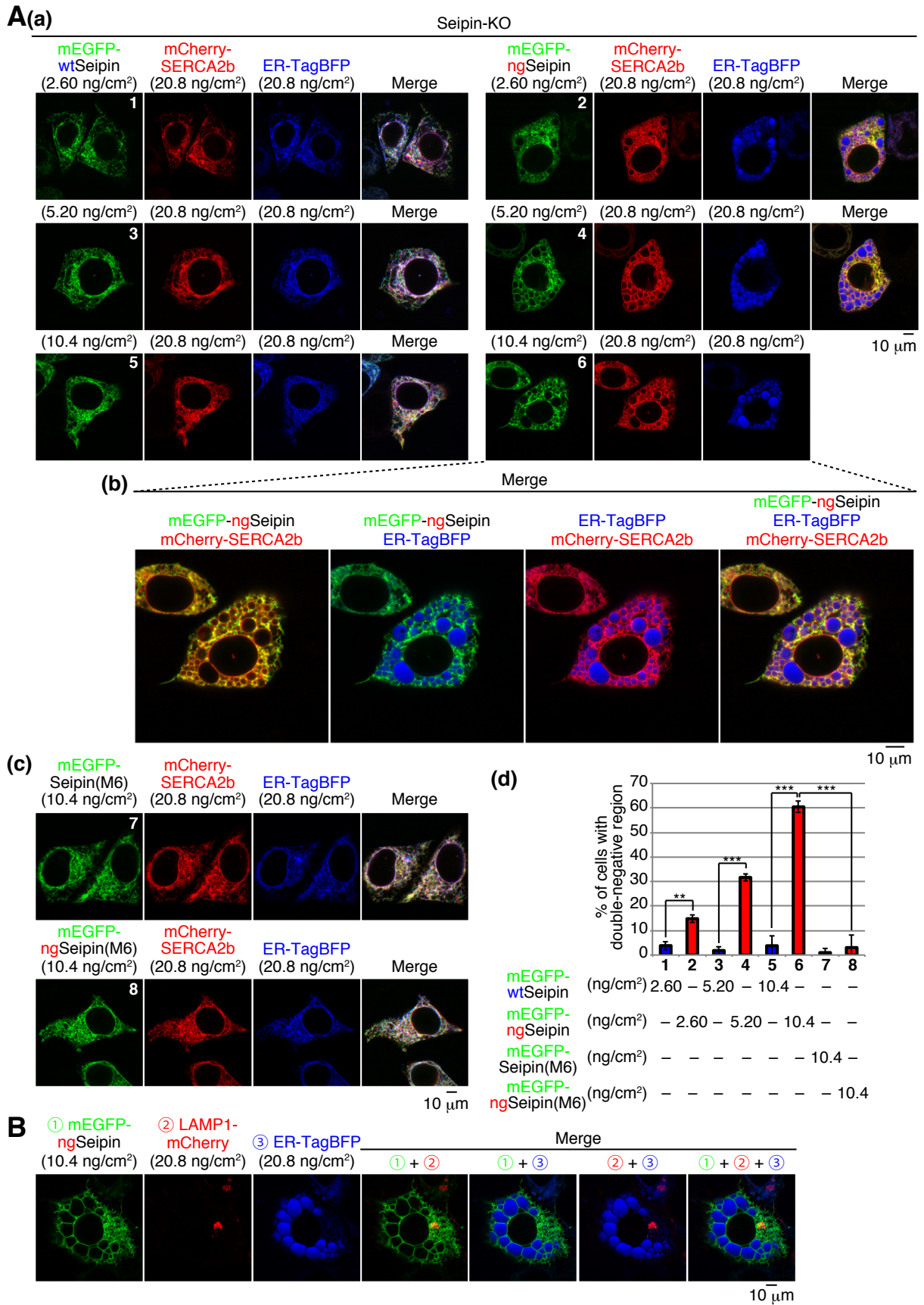


図 1-16 mEGFP-ngSeipin 発現細胞を用いたライブイメージング解析 (説明は前ページに記した)

これまでの結果から、ngSeipin に起因する小胞体ストレスの発生や細胞死の誘導には SERCA2b の不活性化に起因する小胞体内カルシウムイオン濃度の低下が関与するのではないかと考えられた。この可能性をさらに検証するため、次に細胞内に ngSeipin とともに SERCA2b を導入し、ngSeipin に起因する SERCA2b の不活性化を補填することで、小胞体ストレス応答の活性化や細胞死を抑制することができるか検討した。

野生型 HCT116 に ngSeipin と共に SERCA2b を 20.8 ng/cm² 導入すると、ngSeipin を単独で導入した場合と比べて G-CEPIA1er の輝度が有意に増加した(図 1-17A)。この効果は不活性化型の変異体 SERCA2b(Q108H)[85] を 20.8 ng/cm² 導入した場合には見られないことから、上記のデータが期待通り SERCA2b の導入に起因して小胞体内へのカルシウムイオンの取り込み能力が補填できたことを意味することが確かめられた(図 1-17A)。

次に、Seipin-KO 細胞に SERCA2b を 5.20、10.4 または 20.8 ng/cm² 導入したところ、導入量に相関して小胞体内カルシウムイオン濃度が有意に増加した(図 1-17B)。SERCA2b を 10.4 ng/cm² の wtSeipin と共に導入した場合にも同様の効果が見られた。その一方で、SERCA2b を 10.4 ng/cm² の ngSeipin と共に導入した場合、5.20 または 10.4 ng/cm² の SERCA2b では小胞体内カルシウムイオン濃度の増加は見られず、20.8 ng/cm² の SERCA2b を導入して初めて ngSeipin に起因する小胞体内カルシウムイオン濃度の低下を有意に補填することができた(図 1-17B)。この結果は ngSeipin が SERCA2b を不活性化する性質を持つことに起因すると考えられる。

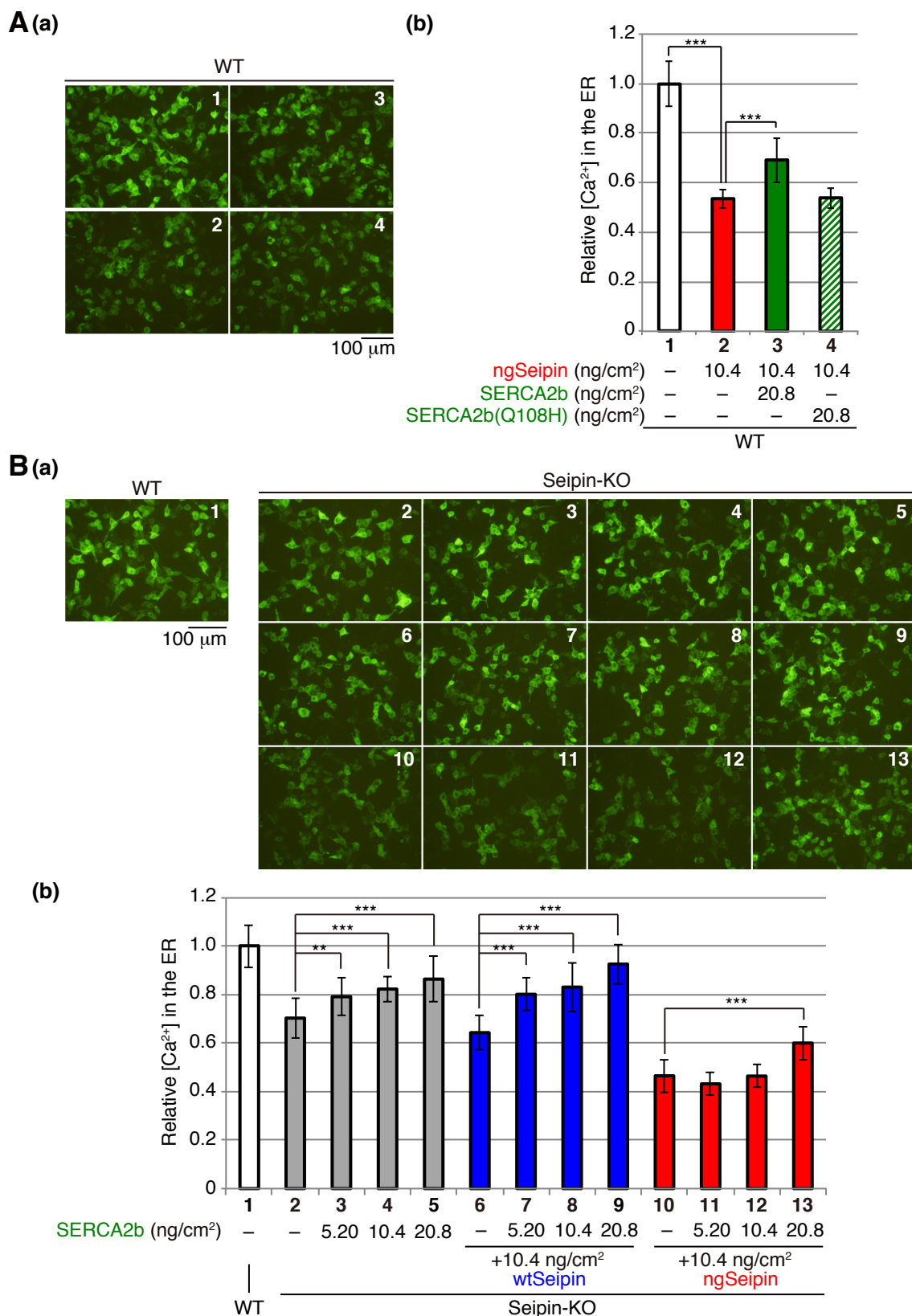


図 1-17 : ngSeipin と共に SERCA2b を導入した際の
小胞体内カルシウムイオン濃度の変化
(説明は次ページに記した)

図 1-17(前ページ)の説明

(A) (a) 野生型あるいは Seipin-KO HCT116 に 104 ng/cm^2 の G-CEPIA1er、 10.4 ng/cm^2 の ngSeipin と共に 20.8 ng/cm^2 の SERCA2b または SERCA2b(Q108H)をトランスフェクションし、28 時間後に蛍光観察を行った。各条件 1 サンプルあたり 5-7 枚ずつ画像を撮影した。(b) 合計 3 サンプル分の実験結果(合計 15-17 枚ずつ)の輝度を測定し、それらすべての平均と標準偏差を求め、有意差検定を行った。検定結果は G-CEPIA1er のみを導入した野生型 HCT116 の測定結果の平均を相対値 1 として表記した。(B) (a) 野生型あるいは Seipin-KO HCT116 に 104 ng/cm^2 の G-CEPIA1er、 10.4 ng/cm^2 の wtSeipin または ngSeipin と共に種々の量の SERCA2b をトランスフェクションし、28 時間後に蛍光観察を行った。各条件 1 サンプルあたり 5 枚ずつ画像を撮影した。(b) 合計 3 サンプル分の実験結果(合計 15 枚ずつ)の輝度を測定し、それらすべての平均と標準偏差を求め、有意差検定を行った。検定結果は G-CEPIA1er のみを導入した野生型 HCT116 の測定結果の平均を相対値 1 として表記した。

10.4 ng/cm^2 の ngSeipin と共に 20.8 ng/cm^2 の SERCA2b をトランスフェクションしても、ngSeipin 発現細胞で検出される PLA シグナル量(図 1-18A)や double-negative region の形成頻度(図 1-18B)には影響が見られず、ngSeipin の凝集には影響を及ぼさないことがわかった。その一方で、 10.4 ng/cm^2 の ngSeipin に起因する BiP、XBP1(S)、CHOP の発現量の増加は、 20.8 ng/cm^2 の SERCA2b を共に導入することで部分的に抑制できることがわかった(図 1-18C)。 10.4 ng/cm^2 の ngSeipin が導入された細胞における細胞増殖率の低下(図 1-18D)や細胞死の誘導(図 1-18E)も、 20.8 ng/cm^2 の SERCA2b を共に導入することで有意に抑制されることがわかった。

以上の結果から、ngSeipin は小胞体内カルシウムイオン濃度の低下を介して小胞体ストレスと細胞死を誘導することが明らかになった。

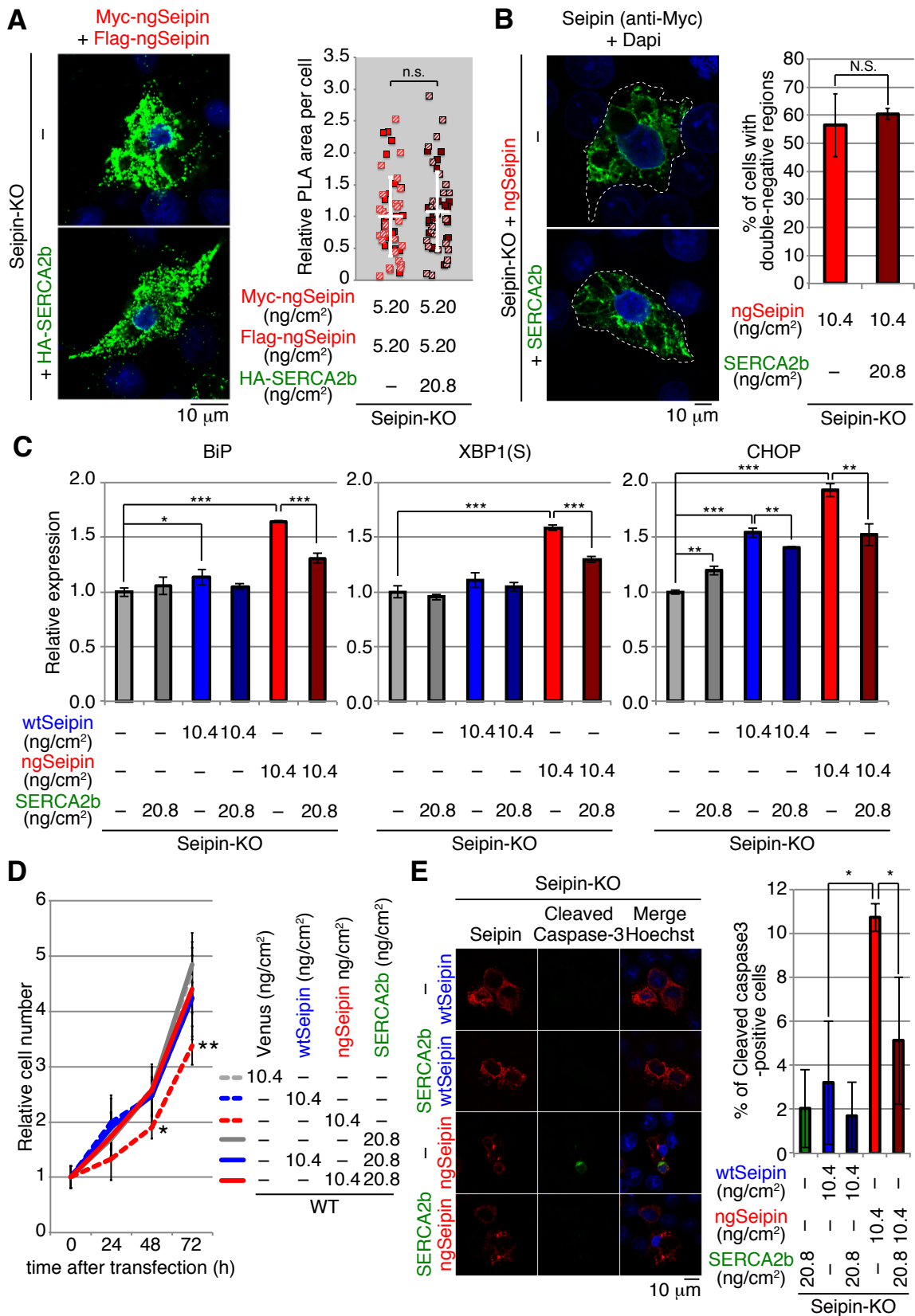


図 1-18 : ngSeipin と共に SERCA2b を導入した際の PLA、免疫染色、小胞体ストレス応答、細胞増殖率、および細胞死の解析 (説明は次ページに記した)

図 1-18(前ページ)の説明

(A) 表記の種類・量の発現ベクターをトランスフェクションした Seipin-KO HCT116 で抗 Myc および抗 Flag 抗体を用いて PLA を行った。実験は合計 2 回行い(各条件合計で 49-50 細胞ずつ撮影した)、個々の細胞で PLA シグナルが占める面積を測定し、それらの平均と標準偏差、有意差の有無を求めた。結果は Myc-ngSeipin と Flag-ngSeipin のみを 5.20 ng/cm^2 ずつトランスフェクションした細胞の測定結果の平均値を相対値 1 として表記した。(B) Seipin-KO HCT116 に表記の種類・量の発現ベクターを導入し、抗 Myc 抗体を用いた免疫染色を行った。実験を各条件 3 回ずつ行い(各条件合計 110-112 細胞ずつ撮影した)、各回で double-negative region が検出された細胞の割合の平均と標準偏差を求め、これらを有意差の有無と共に表記した。(C) Seipin-KO HCT116 に表記の種類・量の発現ベクターをトランスフェクションした細胞から RNA を調製し、qRT-PCR を行うことで BiP、XBP1(S)、CHOP mRNA の発現量を比較した。検定の際には GAPDH の検出量で補正を行った。(n=3) (D) Seipin-KO HCT116 に表記の種類・量の発現ベクターをトランスフェクションした細胞の増殖率を 24 時間ごとに調べた。各条件の 0 時間の細胞量の平均を相対値 1 として検定し、標準偏差と有意差の有無と共に折れ線グラフで表記した。(n=4) (E) Seipin-KO HCT116 に表記の種類・量の発現ベクターをトランスフェクションした細胞を用いて、抗 Myc 抗体および抗 Cleaved-Caspase3 抗体で免疫染色を行った。この実験を 3 回行い(各条件合計 97-125 細胞ずつ解析した)、各回での Seipin と Cleaved-Caspase3 が共に検出された細胞の割合を求め、それらの平均と標準偏差、有意差の有無を求め、表記した。

2.60 ng/cm^2 以上の ngSeipin を Transfection した HCT116 において検出された種々の表現型が、内在性の Seipin 遺伝子に糖鎖欠損変異が導入された神経細胞においても検出できるのかどうかを検討するため、複数の手法(ABE [86]、BE4-Gam [87]、CRISPR/Cas9 + ssODN [88]、MhAX Method [89])を用いて糖鎖欠損変異がノックインされた SH-SY5Y の作製を試みたが、期待通りの変異が導入された細胞を作製することができなかった。そこで代替として、CRISPR/Cas9 + ssODN によってノックイン細胞作製を試みた中で副産物として樹立することができた Seipin-KO SH-SY5Y 細胞を用いて、内在性と同程度

の量の ngSeipin を Transfection することで表現型が得られるかどうか調べることにした。

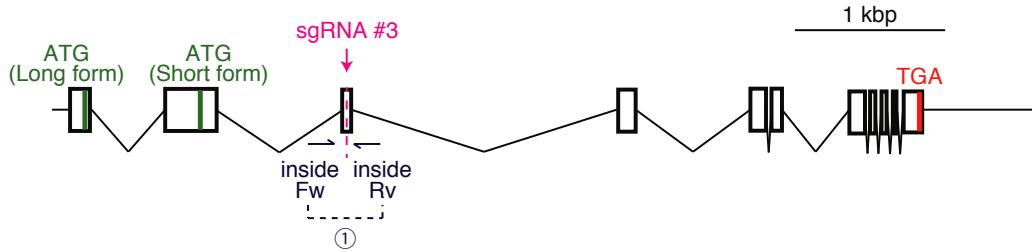
野生型 SH-SY5Y に Seipin 遺伝子の exon3 を標的とする sgRNA #3 (図 1-19A)と CRISPR/Cas9 を導入した結果、両アレル共に exon3 上の同じ部位に全く同一の 1 塩基欠失が導入された Seipin-KO 細胞を樹立することができた(図 1-19B、1-19C)。RT-PCR を行い、増副産物の配列を調べることで、KO 細胞由来の cDNA においても想定通りの変異が検出できることを確かめた(図 1-19D、1-19E、1-19F)。この変異を持つ Seipin では T156 以降でフレームシフトが起こり、164 番目のコドンが終止コドンとなるため、C 末端側の SERCA2b との結合に関与する領域は全て欠失している状態となる(図 1-19G)。

野生型 SH-SY5Y においては Seipin^L と Seipin^S が 4:9 の量比で発現しているので、Seipin-KO SH-SY5Y に Seipin をトランスフェクションする際には Myc-Seipin^L : Myc-Seipin^S = 4:9 の量比で導入することにした。この導入比率で固定した上で、Seipin-KO SH-SY5Y に導入する Myc-Seipin のプラスミドの総量を減らしてゆき、どの程度が WB で Myc-Seipin を検出可能な導入量の下限であるのかを検討した。その結果から、Myc-Seipin^L + Myc-Seipin^S = 0.42 + 0.94 ~ 0.62 + 1.40 ng/cm² が概ね下限に相当すると判断した(図 1-19H)。

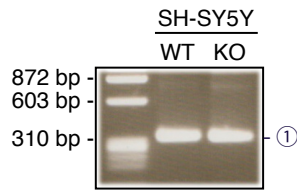
図 1-19(次ページ)の説明

(A)Seipin 遺伝子の exon3 を標的とする sgRNA を設計し、両アレル共にこの部分が切断され非相同末端連結が起こり、フレームシフトが生じた KO 細胞を作製した。非相同末端連結が起こったことを確認するため、inside Fw × Rv のプライマーペアで Genomic PCR を行った。(B) (A)で表記されたプライマーペアを用いた Genomic PCR の結果。(C) (B)の PCR 産物の配列を調べた結果。(D) RT-PCR で用いたプライマーペアの設計部位。(E) (D)で表記されたプライマーペアを用いた RT-PCR の結果。(F) (E)の PCR 産物の配列を調べた結果。(G) (C)および(F)の結果から、Seipin-KO SH-SY5Y では両アレル共に 1 塩基が欠失し、フレームシフトが起こることがわかった。(H) 野生型 SH-SY5Y と、様々な量の Seipin^L と Seipin^Sをトランスフェクションした Seipin-KO SH-SY5Y のライゼートを調製し、ウエスタンブロットを行った。検出には抗 Seipin および抗 GAPDH 抗体を使用した。

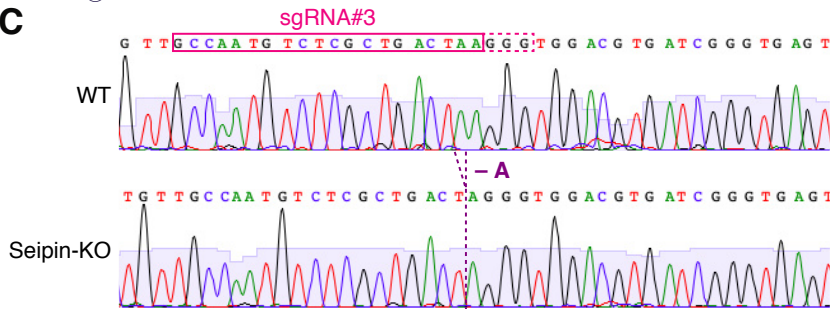
A *Seipin*-Gene (16,829 bp)



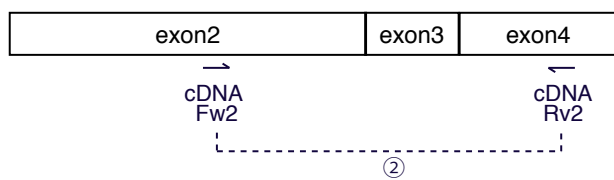
B



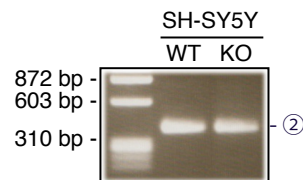
C



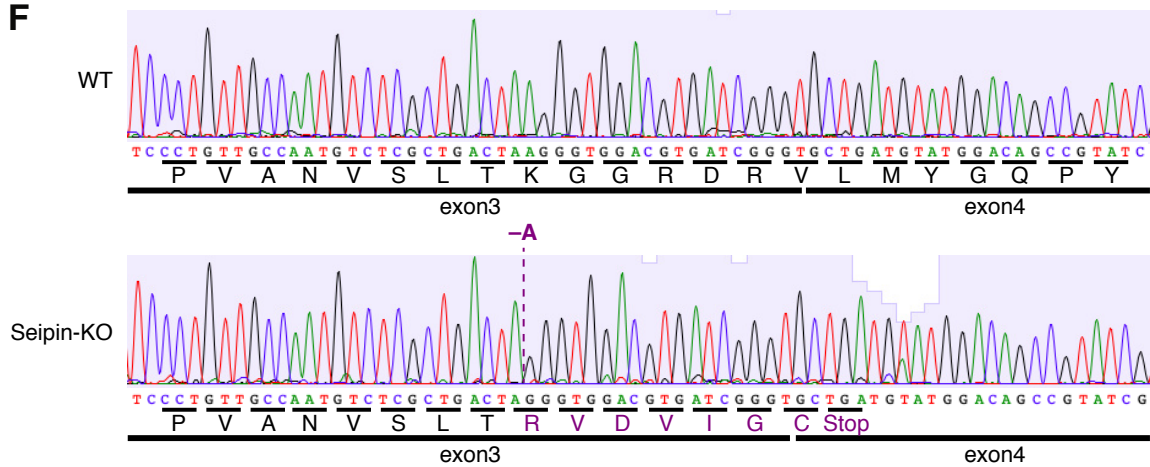
D



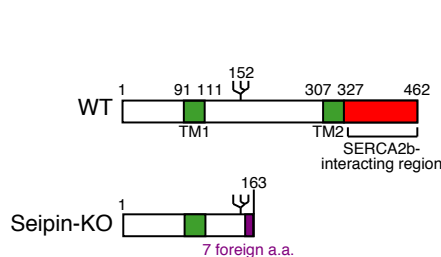
E



F



G



H

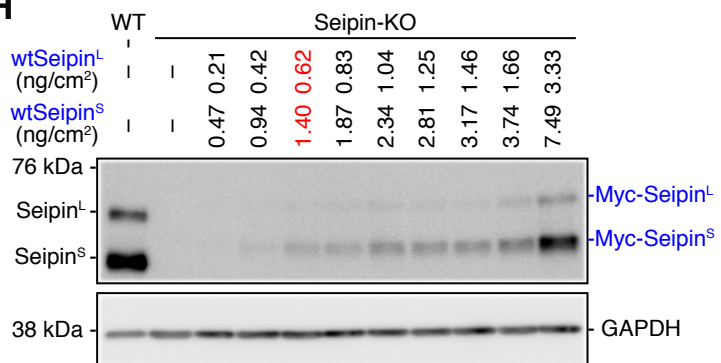


図 1-19 Seipin-KO SH-SY5Y の作出
(説明は前ページに記した)

SH-SY5Y に 104 ng/cm^2 の G-CEPIA1er を Transfection した後、同一視野にて蛍光画像と明視野画像を撮影し、両者を比較した結果、①SH-SY5Y への Transfection の効率は概ね 15%程度であることがわかった(図 1-20)。

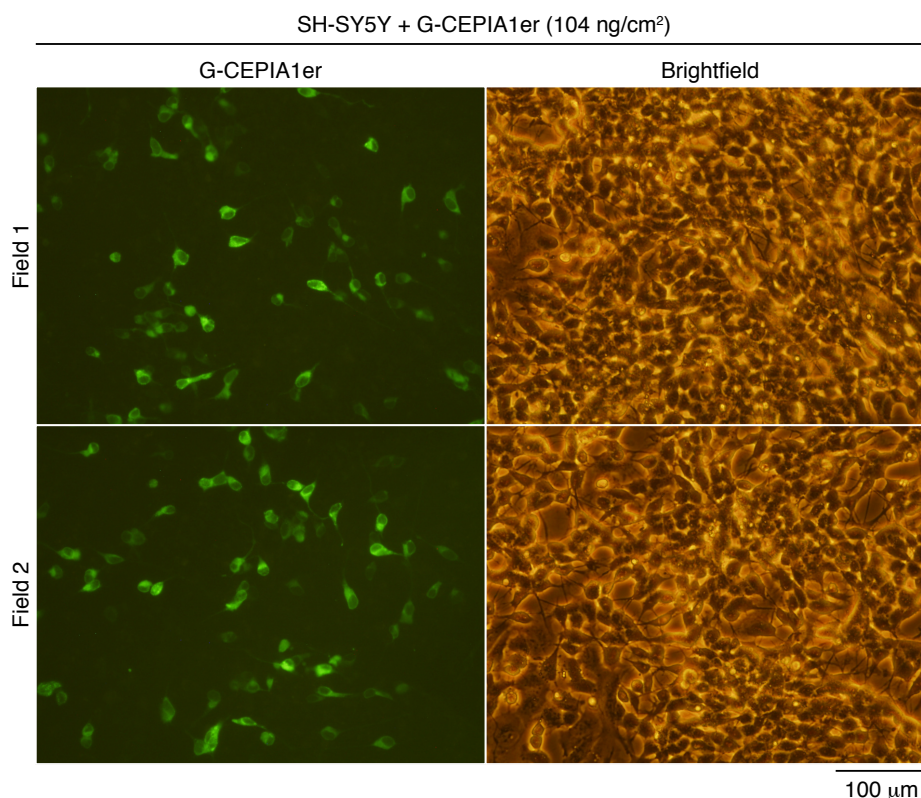


図 1-20：野生型 SH-SY5Y に 104 ng/cm^2 の G-CEPIA1er を Transfection し、蛍光画像と明視野画像を撮影し、両者を比較した。この結果から、トランスフェクション効率は 15%程度であると判断した。

次に 104 ng/cm^2 の G-CEPIA1er と共に wtSeipin または ngSeipin を図 1-21A(c)に表記の条件(= 図 1-19H の実験においてウエスタンブロットで Myc-Seipin が検出できる下限程度だった条件)で導入し、蛍光観察を行った後、ウエスタンブロットを行った。ウエスタンブロットで検出された各レーンの Seipin のバンドを定量し、これを GAPDH のバンドの定量結果で補正した結果、② Transfection された Seipin の量は野生型 Seipin の 16-18%であった。これらの結果①②を総合し、図 1-21A(c)の条件で Transfection することで概ね SH-SY5Y の内在性 Seipin と同程度の量の wtSeipin あるいは ngSeipin を導入することが

できたと判断した。

Seipin-KO SH-SY5Y では野生型の SH-SY5Y と比べて小胞体内カルシウムイオン濃度が有意に低下していた(図 1-21A)。この KO 細胞に図 1-21A(c)の条件で wtSeipin、ngSeipin、あるいは wtSeipin と ngSeipin を半量ずつ導入した結果、wtSeipin を導入することで Seipin-KO に起因する小胞体内カルシウムイオン濃度の低下が相補される一方で、ngSeipin を導入した場合や、wtSeipin と ngSeipin を半量ずつ導入した場合には Seipin-KO SH-SY5Y 以下にまで小胞体内カルシウムイオン濃度が低下することがわかった(図 1-21A)。次に、同じ Seipin の導入条件で調製した細胞を用いて免疫染色を行ったところ、wtSeipin を導入した細胞では Seipin・SERCA2 共に典型的な ER パターンを示す一方で、ngSeipin を導入した場合や、wtSeipin と ngSeipin を半量ずつ導入した場合には strongly double-positive region および double-weak region が検出された。double-weak region は ngSeipin を導入した細胞・wtSeipin と ngSeipin を半量ずつ導入した細胞 のいずれに関しても 25-30%の細胞で検出された(図 1-21B)。

レポーターアッセイを行った結果、ngSeipin を導入した細胞や、wtSeipin と ngSeipin を半量ずつ導入した細胞においては、ERSE レポーター(主として ATF6 経路)、UPRE レポーター(IRE1 および ATF6 経路)、ATF4 レポーター(PERK 経路)のいずれに関しても有意な活性化が見られ、小胞体ストレス応答が活性化されていることがわかった(図 1-21C)。さらに wtSeipin、ngSeipin、または wtSeipin と ngSeipin を半量ずつ導入した細胞を用いて Myc 抗体と Cleaved Caspase-3 抗体を用いて免疫染色を行った結果、ngSeipin を導入した細胞・wtSeipin と ngSeipin を半量ずつ導入した細胞 のいずれに関しても Cleaved Caspase-3 positive な細胞の数が有意に増加し、細胞死が誘導されていることがわかった(図 1-21D)。

以上から、内在性と同程度の量の ngSeipin が導入された SH-SY5Y では ngSeipin が SERCA2b を巻き込みながら凝集し、これにより SERCA2b が不活性化されて小胞体内カルシウムイオン濃度が低下するとともに、小胞体ストレスと細胞死が誘導されることがわかった。

図 1-21(前ページ)の説明

(A) (a) 104 ng/cm² の G-CEPIA1er をトランスフェクションした野生型 SH-SY5Y、104 ng/cm² の G-CEPIA1er と共に表記の量・種類の発現ベクターをトランスフェクションした Seipin-KO SH-SY5Y の蛍光観察を行った。各条件 1 サンプルあたり 5-6 枚ずつ画像を撮影した。(b) 合計 3 サンプル分の実験結果(合計 15-16 枚ずつ)の輝度を測定し、それらすべての平均と標準偏差を求め、有意差検定を行った。検定結果は G-CEPIA1er のみを導入した野生型 SH-SY5Y の測定結果の平均を相対値 1 として表記した。(c) (a)で解析したサンプルからライゼートを調製し、ウエスタンブロットを行った。検出には抗 Seipin および抗 GAPDH 抗体を使用した。Seipin のバンドの強度を GAPDH のバンドの輝度で補正した相対発現量を併せて表記した。(B) (a) A(c)に表記された量・種類の発現ベクターをトランスフェクションした Seipin-KO SH-SY5Y で、抗 Seipin および抗 SERCA2 抗体を用いて免疫染色を行った。実験を各条件 3 回ずつ行い(各条件合計 90-98 細胞ずつ撮影した)、各回で double-weak region が検出された細胞の割合の平均と標準偏差を求め、これらを有意差の有無と共に表記した。(C) Seipin-KO SH-SY5Y に各種 UPR レポータープラスミド(104 ng/cm²)・内部標準である pRL-SV40(10.4 ng/cm²)と共に A(c)に表記された条件の各種 Seipin をトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。相対活性値の平均と標準偏差を求め、有意差の有無と共に表記した。(n=3) (D) Seipin-KO SH-SY5Y に A(c)に表記された条件で各種 Seipin をトランスフェクションした細胞を用いて、抗 Myc 抗体および抗 Cleaved-Caspase3 抗体で免疫染色を行った。この実験を 3 回行い(各条件合計 100-110 細胞ずつ解析した)、各回での Seipin と Cleaved-Caspase3 が共に検出された細胞の割合を求め、それらの平均と標準偏差、有意差の有無を求め、表記した。

考察

Seipin は元々、先天性全身性脂肪萎縮症 2 型(CGL2: Congenital Generalized Lipodystrophy type2)という、全身の脂肪組織が消失しインスリン抵抗性や脂肪肝が生じる重篤な劣性遺伝性疾患の原因遺伝子である BSCL2 (Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2)がコードするタンパク質として同定された [63]。その後の Seipin をノックアウトした酵母、ショウジョウバエおよびヒト細胞を用いた解析から [64][65][66]、Seipin は小胞体膜上で行われる脂肪滴の形成・成熟を制御する因子であることが明らかになり、この機能が損なわれることが CGL2 患者の臨床像や Seipin をノックアウトしたモデル動物で見られる様々な表現型に関与すると考えられている。その一方で、遺伝子変異に起因して無糖鎖型となった変異体 Seipin (ngSeipin)は優性遺伝性の末梢神経変性疾患 Seipinopathy を発症させることも明らかにされた [57]。興味深いことに、Seipinopathy の患者の臨床像やヒト ngSeipin トランスジェニックマウスの表現型は CGL2 の患者及び Seipin ノックアウトマウスの表現型とは異なっていた。すなわち、Seipinopathy の患者や ngSeipin トランスジェニックマウスでは脂肪肝やインスリン抵抗性などの種々の代謝異常の表現型は報告されておらず、その一方で週齢依存的に運動ニューロンが変性し、四肢の筋萎縮や麻痺が認められた [58][68]。このことから細胞内で ngSeipin は脂肪滴の形成とは独立なメカニズムで獲得毒性を惹起し、神経変性を誘導すると考えられた。また先行研究において ngSeipin が導入されたヒト細胞や ngSeipin トランスジェニックマウスの神経細胞では ngSeipin が凝集を引き起こすと共に、小胞体ストレスや細胞死が誘導されることが報告された [67][68]。従って Seipinopathy の発症機序には ngSeipin が誘導する小胞体ストレスや細胞死が関与している可能性が高く、これらが誘導される分子メカニズムを解明することができれば、Seipinopathy の発症機構の解明や効果的な治療法の確立に近づくことができると考えられた。

本研究において我々は、ショウジョウバエ Seipin が小胞体膜カルシウムイオンポンプ SERCA と結合して SERCA を介した小胞体内部へのカルシウムイオンの取り込みを促進することを示した先行研究などから着想を得て [69]、まず ngSeipin 発現細胞の小胞体内カルシウムイオン濃度をカルシウムイオンレポータータンパク質である G-CEPIA1er [77]を用いて測定した。その結果、ngSeipin を単独発現、あるいは wtSeipin と ngSeipin を共発現させた細胞では小胞体内

カルシウムイオン濃度が顕著に低下するとともに、小胞体ストレスや細胞死が誘導されることが明らかになった。これらの表現型には ngSeipin の凝集や、SERCA2b の不活性化が関与する可能性が考えられたので、次に様々な変異体 Seipin を用いてこれらの仮説を検証した。まず ngSeipin の小胞体内腔領域に変異(M6)を導入した ngSeipin(M6)を作製し解析したところ、オリゴマー形成が抑制された ngSeipin(M6)は凝集を引き起こさないことが明らかになった。この ngSeipin(M6)発現細胞では小胞体内カルシウムイオン濃度は低下せず、小胞体ストレスおよび細胞死も誘導されないことが明らかになった。次に様々な ngSeipin の部分欠損変異体を作製し解析したところ、ngSeipin(Δ C)は糖鎖の付加阻害に起因する凝集を引き起こすものの、SERCA2b との結合が失われており、小胞体内カルシウムイオン濃度低下・小胞体ストレス・細胞死のいずれも誘導しないことがわかった。オリゴマー化に必要となる小胞体内腔領域を欠失させた Seipin(Δ LD)も、小胞体内カルシウムイオン濃度を低下させなかった。これらの結果から、ngSeipin は SERCA2b を不活性化させることで小胞体内カルシウムイオン濃度を低下させる性質があり、これには「SERCA2b との結合」と「Seipin の凝集」の両方が必要であることがわかった。

小胞体内カルシウムイオン濃度が低下すると、小胞体シャペロンである BiP の機能が低下することで小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積し、小胞体ストレスが誘導される[5]。そこで ngSeipin 発現細胞に SERCA2b を共発現させ小胞体内カルシウムイオン濃度低下を解消させたところ、小胞体ストレス応答や細胞死の誘導が有意に抑制された。この結果から ngSeipin は小胞体内カルシウムイオン濃度を低下させることで小胞体ストレス及び細胞死を誘導することがわかった。また、ngSeipin は単独発現させた場合も SERCA2b と共発現させた場合も同程度に細胞内凝集を引き起こしたことから、ngSeipin が細胞内で凝集してもそれ単独では小胞体ストレスや細胞死の直接的な要因とはならないことが示唆された。

本研究で Seipin-KO HCT116 への入れ戻し実験を行った結果、ngSeipin 発現ベクターの導入量が少なく、ngSeipin の発現量が内在性 Seipin と同じ～やや多い程度の場合には ngSeipin は凝集せず、Seipin-KO 細胞で見られる小胞体内カルシウムイオン濃度の低下を相補することができることが明らかになった。先行研究において、酵母 Sei1/Ldb16(酵母の Seipin ホモログとそのパートナー因

子)やショウジョウバエ *Seipin* には小胞体内腔領域に N 型糖鎖付加配列が存在しない一方で、酵母 *Sei1* やショウジョウバエ *Seipin* もヒト *Seipin* とほぼ同様にリング状のオリゴマーを形成でき[59][60][61][62]、*Sei1*・*Ldb16* は脂肪滴形成の促進[64]、ショウジョウバエ *Seipin* は脂肪滴形成と *SERCA* を介した小胞体内へのカルシウムイオンの取り込みの両方を促進できる[65][69]ことが示されている。また酵母 *Sei1* 欠損株にヒト *ngSeipin* を導入することで脂肪滴形成能を回復できたとする先行研究も存在する[90][91]。これらの知見と今回の結果を総合すると、ヒト *Seipin* も酵母やショウジョウバエの *Seipin* と同様に、糖鎖がなくてもオリゴマー形成して正常に機能できうるのではないかと考えられる。

その一方で *Seipin*-KO HCT116 への *ngSeipin* 発現ベクターの導入量を増加させた場合には、*ngSeipin* は *wtSeipin* と違って小胞体膜上で凝集を引き起こすことが分かった。この凝集の中に *SERCA2b* が巻き込まれることで *SERCA2b* が不活性化され、小胞体内カルシウムイオン濃度が低下し、その結果として小胞体ストレスや細胞死が誘導されることも明らかになった。これらの結果と、ヒト生体内において *Seipin* が神経細胞での発現量が多いことを併せて考えると、*Seipinopathy* が発症した際には特に神経細胞で *ngSeipin* の凝集が起こり、*SERCA2b* が不活性化されることで小胞体内カルシウムイオン濃度低下や小胞体ストレスが生じて、その結果として運動神経が変性するのではないかと考えられる。実際に本解析では、神経芽腫由来の培養細胞である SH-SY5Y で *Seipin*-KO 株を樹立し、これに内在性と同程度の量の *ngSeipin* を入れ戻したとき、*Seipin*-KO 以下にまで小胞体内カルシウムイオン濃度が低下して、小胞体ストレスと細胞死が誘導されることを見出している。

ngSeipin が 2.60 ng/cm² 以上導入された細胞の小胞体膜の形態を免疫染色により解析した結果、小胞体の形が歪に変形し、*Seipin*・*SERCA2b* いずれのシグナルも検出されない *double negative region* が形成されることがわかった。より詳細な解析のために *live-imaging* も行った結果、小胞体内腔に局在する *ER-TagBFP* の局在と *double negative region* が一致したため、*double negative region* が膨張した小胞体内腔であることを示すことができた。

この *double negative region* と類似した小胞体の構造変化が先行研究においても報告されていないかどうかを調べた。その結果、cytochrome p450 の 1-29 アミノ酸に相当する膜貫通領域(*CytERM*)を付加した(*EGFP* などの)蛍光タンパ

ク質を細胞に発現させると、小胞体膜上に穴のような構造(OSER : organized smooth ER)が形成された例が見つかった[92]。この CytERM-EGFP に蛍光タンパク質の 2 量体形成を阻害するアミノ酸置換を導入した変異体(CytERM-mEGFP(A206K)など)の発現細胞においては、OSER の形成は見られなかった。これらの結果と ngSeipin 発現細胞の解析結果との照らし合わせから、小胞体膜上でタンパク質の(凝集を含めた)過剰な多量体化が起こった場合には、double negative region といった小胞体の形態変化が起こるのだと考えられる。実際 ngSeipin に変異を導入して凝集を抑制した ngSeipin(M6)発現細胞においては、double-negative region はほとんど形成されなかった。

本研究で作製された Seipin-KO HCT116 細胞及び Seipin-KO SH-SY5Y 細胞を用いた解析により、Seipin を欠失することでヒト細胞でも(ショウジョウバエ Seipin ノックアウト脂肪細胞と同様に)恒常的に小胞体内カルシウムイオン濃度が低下することが示された。また Seipin の部分欠損変異体を用いた IP 実験により、ヒト Seipin は C 末端部分で SERCA2b と結合することが見出された。

興味深いことに、CGL2 の原因となる複数の Seipin の機能欠損変異体の中に、Seipin の C 末端部分のほぼ全域が欠損する変異体(R275X ; Long Form の表記では R339X)が存在する[93]。また、脂肪細胞前駆細胞(3T3-L1)では Seipin をノックダウンすると脂肪細胞への分化が阻害されるが、この表現型は C 末端を欠失させた変異体では相補できないことも明らかにされている[94]。これらの知見から、Seipin の機能にとって C 末端部分での SERCA2b との相互作用は小胞体内腔部分を介したオリゴマー化と並んで重要であり、これが失われることが CGL2 で見られる脂肪組織の障害、糖尿病の発症など様々な臨床像に関与する可能性がある。その一方で、SERCA2b のどの部分が Seipin と相互作用するのか、また Seipin がどのようなメカニズムで SERCA2b の機能を促進するのかは全く明らかにされておらず、更なる解析が必要である。

本研究の結果、ngSeipin が導入されたヒト培養細胞では小胞体内カルシウムイオン濃度が低下することが示された。このような小胞体内カルシウムイオン濃度の低下が個体レベルで生じた場合、小胞体ストレスを誘導するだけでなく細胞内シグナル伝達やシナプス伝達などのカルシウムイオンが仲介する神経細胞の諸機能にも広範に・直接的に影響する可能性を考慮する必要があるだろう。

近年の臨床試験の結果、ALS 患者にフェニル酪酸ナトリウムやタウルウルソジオールなどの小胞体ストレスを緩和するケミカルシャペロンを経口摂取させることで症状の進行を抑えることができることが示唆されており、小胞体ストレスと神経変性疾患の関係への注目はますます高まっている[95][96]。従って、今後は本解析結果を基礎として研究を発展させ、Seipinopathy モデルマウスや ALS モデルマウスを含む、小胞体ストレスとの関連が指摘されている病態モデルの運動神経細胞において、小胞体内カルシウムイオン濃度低下が生じるのかを検証することが次の重要な課題である。その上で、遺伝学的あるいは薬学的手法を用いて神経変性疾患モデル動物の小胞体内カルシウムイオン恒常性の維持機能を増強させることで小胞体ストレスを抑制でき、その結果神経変性疾患の症状を緩和・回復させることができるのかを調べることが求められる。

実験方法

・プラスミドの作製

プラスミドの作製は標準的な手順で行った[97]。DNA 配列の確認はサンガーシーケンス解析により行った。pCMV-Myc (CLONTECH)に Seipin あるいは SERCA2b の cDNA 配列をクローニングし、N 末端 Myc タグ付きの発現ベクターとして使用した。各種点変異・部分欠損・配列すげ替え変異体の作製の際には Dpn1 を使用した。N 末端 Flag タグ付き、あるいは N 末端 HA タグ付きの発現ベクターは、Inverse PCR により pCMV-Myc 発現ベクター中の Myc をコードする DNA 配列を Flag あるいは HA をコードする配列に変更した後、PCR 産物を NE Builder HiFi Assembly (New England BioLabs)でつなぎ合わせることで作製した。N 末端に mEGFP が付加された mEGFP-Seipin の発現ベクターを作製するため、まず mEGFP-KDEL 発現ベクター[98] をテンプレートとする PCR により mEGFP フラグメントを調製し、これを pCMV-Myc-Seipin 発現ベクターの Myc 配列と Seipin 配列の間に読み枠が合うように NE Builder で挿入した。N 末端に mCherry が付加された mCherry-SERCA2b 発現ベクターを作製するため、pmCherry-N1 発現ベクター(TAKARA) をテンプレートとする PCR により mCherry フラグメントを調製し、これを pCMV-Myc-SERCA2b 発現ベクターの Myc 配列と SERCA2b 配列の間に読み枠が合うように NE Builder で挿入した。ER-TagBFP 発現ベクターは当研究室の石川時郎 博士が以前に作製されたものを使用した。pCMV G-CEPIA1er は東京大学の飯野 正光博士らのグループが以前に作製されたものであり[77]、Addgene を介して入手した。pGP-CMV-GCaMP6f はハワード・ヒューズ医学研究所の Douglas S Kim 博士らのグループが以前に作製されたものであり[78]、Addgene を介して入手した。pLAMP1-mCherry はコロラド大学の Amy Palmer 博士らのグループが以前に作製されたものであり[99]、Addgene を介して入手した。

・細胞の培養方法とトランスフェクション

HCT116 (ATCC CCL-247) と SH-SY5Y (ATCC CRL-2266)は Dulbecco's modified Eagle's medium (glucose 4.5 g/liter) に 10%相当量の FBS と 抗生物質(100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin)を加えたものを用いて、37°C・5%CO₂ 条件のインキュベーターにて培養した。HCT116 にトランスフェクションするには polyethylenimine Max (Polyscience)を使用した。SH-SY5Y にトランスフェクションするには Lipofectamine-LTX (ThermoFisher Scientific) を使用した。

・ウエスタンブロット

6 ウェルプレートまたは 3.5cm ディッシュに培養した細胞を PBS で洗浄し、スクレーパーを用いてエッペンチューブに回収したのち、5,000 rpm で 2 分間遠心した。遠心後のペレットを 200 µl の SDS sample buffer (50 mM Tris/HCl, pH 6.8, containing 100 mM dithiothreitol, 2% SDS and 10% glycerol)に protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque)と 10 µM MG132 を加えた混合溶液に懸濁し、37°Cで 30 分間以上処理することでウエスタンブロットのサンプルとした。ウエスタンブロットは標準的な手順で行った[97]。検出試薬として Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology) を使用し、LAS-3000mini LuminoImage analyzer (Fuji Film)で検出を行った。

・免疫沈降実験

6 ウェルプレートに培養した HCT116 を PBS で 1 回洗浄したのち、300 µl の high salt buffer (50 mM Tris/Cl, pH 8.0, containing 1% NP-40 and 150 mM NaCl) を加えて 10 分間静置して細胞を溶解させた。この細胞溶解液をエッペンチューブに移し、17800 g / 4 °C で 10 分間遠心した。これにより得られた上清のうち 200 µl に 5 µl の SERCA2 抗体を加え、1 晩 4 °Cにて反応させたのち、protein A-coupled Sepharose beads (GE Healthcare)を用いて 90 分間 4 °Cにて反応させた。ビーズを high salt buffer で 2 回、PBS で 1 回洗浄したのち、SDS sample buffer を 15 µl 加えて 5 分間 100 °Cで煮沸することでサンプルとした。

・免疫蛍光染色

MycタグあるいはFlagタグ付きのタンパク質をコードした発現ベクターを細胞にトランスフェクションした28時間後に、氷冷したメタノールで6分半処理することで固定と膜透過処理を行った。これをブロッキング溶液(3% BSA in 0.05% PBS-T)を用いて37°C 1時間ブロッキングした後、一次抗体を加えたブロッキング溶液で37°C 2時間処理し、その後にAlexa488-conjugated anti-rabbit secondary antibodyとAlexa568-conjugated anti-mouse secondary antibodyを含むブロッキング溶液で37°C 1時間処理した。抗体反応後のカバースリップは5 µg/ml のHoechst 33342 または 50 µg/ml のDapiを含む Prolong Goldまたは Prolong Grass Antifade Mountants (ThermoFisher Scientific) で封入した。解析にはLSM 880 with Airyscan と Zen/Zen2.6 acquisition software (Carl Zeiss)を用いた。

・ライブイメージング

ガラスボトムディッシュに培養した HCT116 に mEGFP-Seipin^L または mEGFP-ngSeipin^L を、mCherry-SERCA2b または LAMP1-mCherry、および ER-TagBFP と共にトランスフェクションした。28 時間後、フェノールレッド不含の DMEM に medium change し、LSM 880 with Airyscan および Zen/Zen2.6 acquisition software を用いてライブイメージングを行った。

・小胞体内あるいは細胞質におけるカルシウムイオンの検出

小胞体内および細胞質のカルシウムイオンは各々G-CEPIA1er [77]および GCaMP6f [78]を用いて検出した。トランスフェクションから28時間後、Olympus IX-71-22TFL/PH と DP Controller 1.2.1.108 を用いて蛍光観察を行った。蛍光画像の検定は ImageJ (<https://imagej.net/ij/index.html>)を用いて以下の手順で行った。

- ① Color > Split channels で Green Channel を抽出
- ② Process > Subtract Background (rolling ball radius: 50.0 pixels) によりバックグラウンドを減算
- ③ Image > Adjust > Threshold により閾値を設定
- ④ Analyze > Set Measurement の選択肢から Mean gray value を選択
- ⑤ Analyze > Measure により、画像全体の細胞の平均輝度を算出

・ CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト細胞の作製

まず DT-A-pA-loxP-PGK-Puro-pA-loxP [100]とテンプレートとする PCR を行うことで PuroR フラグメントを調製し、これを px330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene)の PciI サイトに挿入することで px330-PuroR を作製した。

Seipin-KO HCT116 を作製するため、Seipin 遺伝子の exon2 および 3'UTR 領域を標的とする guide RNA 配列に対応した以下の 2 種類のオリゴのペア
[5'-CACCGCTCTCACTTTCCGCCATTAG-3' + 5'-AAACCTAATGGCGGAAAGTGAGAGC-3']
[5'-CACCGGGGAGTGGGAAAGCTTGCTA-3' + 5'-AAACTAGCAAGCTTTCCCACTCCCC-3']
をアニーリングさせ、各々 px330-PuroR の BbsI サイトに挿入した。これら 2 種類のプラスミドを HCT116 に同時にトランスフェクションしたのち、二週間程度 0.5 µg/ml の Puromycin で選抜を行うことで Seipin-KO HCT116 のクローンを単離した。

Seipin-KO SH-SY5Y を作製するため、Seipin 遺伝子の exon3 を標的とする guide RNA 配列に対応したオリゴのペア

[5'-CACCCAATGTCTCGCTGACTAA-3' + 5'-AAACTTAGTCAGCGAGACATTG-3']

をアニーリングさせ、px330-PuroR の BbsI サイトに挿入した。このプラスミドを Microporator (Digital Bio) を用いてエレクトロポレーション(n=3 / 1,100 V/20 msec)で SH-SY5Y に導入し、1ヶ月程度 0.5 µg/ml の Puromycin で選抜を行うことで Seipin-KO HCT116 のクローンを単離した。

・ Genomic PCR

培養した細胞を PBS で洗浄したのち、Alkaline Lysis Buffer (25mM NaOH、0.2mM EDTA)を加えて溶かし、これを 100℃で 10 分間煮沸したのち、40mM Tris-HCl (pH = 8.0)を等量加えることで Genomic PCR のテンプレートとした。

Seipin-KO HCT116 の Seipin 遺伝子に導入された変異(非相同末端連結)は all del Fw × all del Rv

[5'-TTTCCATGGTTGCACGATTA-3' + 5'-AAGCCACATGCAATGGTTTC-3']

および

inside Fw × inside Rv

[5'-GGCCTGTGAGCAGAATGTTT-3' + 5'-GCTGAGGAAGGTGAAGTTGC-3']

の 2 種類のプライマーのペアを用いた PCR により検出した。

Seipin-KO SH-SY5Y の Seipin 遺伝子に導入された変異(非相同末端連結)は inside Fw(同上)と inside Rv(同上)を用いた PCR により検出した。

いずれの genomic PCR の際も KOD-Fx Neo (TOYOBO)を用いた。

・ RT-PCR

6well plate に培養した HCT116 または SH-SY5Y から ISOGEN (Nippon Gene) を用いて Total RNA を抽出し、これを元に Moloney murine leukemia virus reverse transcription キット(Invitrogen)と oligo-dT プライマーを用いて cDNA を調製した。これをテンプレートとして、Seipin あるいは GAPDH の cDNA 配列の一部を増幅する RT-PCR を PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara Bio)を用いて行った。使用したプライマーは以下の通り。

Seipin cDNA Fw + Seipin cDNA Rv (HCT116)

[5'- CCTCCTCCTTTCCCTCCCTCT -3' + 5'- CTTGCGTTCCTAGCTGCTCT -3']

GAPDH cDNA Fw + GAPDH cDNA Rv (HCT116)

[5'- AGGGCTGCTTTTAACTCTGG -3' + 5'- CGTCAAAGGTGGAGGAGTGG -3']

Seipin cDNA Fw2 + Seipin cDNA Rv2 (SH-SY5Y)

[5'- ATGGTCAACGACCCTCCAGT -3' + 5'- GACCAAGAACATGCCCAAAT -3']

・ Quantitative RT-PCR(qRT-PCR)

上記の方法で調製した cDNA をテンプレートとして SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いて Quantitative RT-PCR を行った。

使用したプライマーのペアは以下の通り。

qBiP Fw + qBiP Rv (*BiP* mRNA)

[5'- TCTCAGATCTTTTCTACAGCTTCTGA -3' + 5'- TGCTTTTTGTTCAGGGGTCTTTCA -3']

qXBP1 Fw a + qXBP1 Rv (*XBPI(S)* mRNA)

[5'- CTGCTGAGTCCGCATCAGGT -3' + 5'- GAGTCAATACCGCCAGAATCCA -3']

qCHOP Fw + qCHOP Rv (*CHOP* mRNA)

[5'- ACCTATGTTTCACCTCCTGGA -3' + 5'- CAGTCAGCCAAGCCAGAGAA -3']

qGAPDH Fw + qGAPDH Rv (*GAPDH* mRNA)

[5'- GACCCCTTCATTGACCTCAA -3' + 5'- TTGACGGTGCCATGGAATT -3']

qRyR1 Fw + qRyR1 Rv (*RyR1* mRNA)

[5'- GACGAGGTCCAGTTCCTG -3' + 5'- TGCTCCTTGAGCACGGT -3']

qIP3R1 Fw + qIP3R1 Rv (*IP3R1* mRNA)

[5'- GCCAGCTGTCGGAATTAAG -3' + 5'- GGGTTGACATTCATGTGAGG -3']

qIP3R2 Fw + qIP3R2 Rv (*IP3R2* mRNA)

[5'- GTGGCTCAAATGATTGTGGA -3' + 5'- CACTGTCGCCTTCATTGCTA -3']

qIP3R3 Fw + qIP3R3 Rv (*IP3R3* mRNA)

[5'- GTGGATGACCGCTGTGTG -3' + 5'- GCACACCTTGAAGAGGCAGT -3']

qSERCA1 Fw + qSERCA1 Rv (*SERCA1* mRNA)

[5'- CCTCACCACCAACCAGATGT -3' + 5'- CCGGTGATGGAGAACTCATT -3']

qSERCA2 Fw + qSERCA2 Rv (*SERCA2* mRNA)

[5'- GTGCAAATGCCTGCAACTC -3' + 5'- CGACATTGACTTTCTGTCACG -3']

qSERCA3 Fw + qSERCA3 Rv (*SERCA3* mRNA)

[5'- TCTCGGTGACAGCCGAG -3' + 5'- TCACTCGGGAGCTCGTT -3']

qSERCA2abc Fw + qSERCA2a Rv (*SERCA2a* mRNA)

[5'- TGTCGAACCCTTGCCACTCAT -3' + 5'- GCGGTTACTCCAGTATTGCAGGT -3']

qSERCA2abc Fw + qSERCA2b Rv (*SERCA2b* mRNA)

[5'- TGTCGAACCCTTGCCACTCAT -3' + 5'- GCTGCACACACTCTTTACCAGGT -3']

qSERCA2abc Fw + qSERCA2c Rv (*SERCA2c* mRNA)

[5'- TGTCGAACCCTTGCCACTCAT -3' + 5'- ACAACTAAAGTTCTGAGCTAAGAACAGGT -3']

解析した遺伝子のうち Seipin、GAPDH、SERCA1、SERCA2、SERCA3、SERCA2a、SERCA2b、SERCA2c、RyR1、IP3R1、IP3R2、IP3R3 に関しては、上記のプライマーセットと cDNA テンプレートをを用いた PCR の産物を TA クローニングし、これらのベクターを各々200、2000、20000 個ずつ含むサンプルで qRT-PCR を行い、得られた Ct 値に基づいて検量線を作製した。この検量線に基づき、Seipin、GAPDH、SERCA1、SERCA2、SERCA3、SERCA2a、SERCA2b、SERCA2c、RyR1、IP3R1、IP3R2 or IP3R3 の発現量の絶対定量を行い、GAPDH の発現量で補正することで検定を行った。BiP、XBP1(S)、CHOP に関しては、各遺伝子の Ct 値を GAPDH の Ct 値で補正する相対定量法($\Delta\Delta Ct$ 法)で検定を行った。

• Proximity Ligation Assay (PLA)

HCT116にMyc-Seipinの発現ベクターとFlag-Seipinの発現ベクターを同時にトランスフェクションし、24時間 に氷冷したメタノールで6分半処理することで細胞を固定・膜透過した。その後、Duolink in situ Starter Set GREEN (Sigma-Aldrich)、抗Myc抗体、抗Flag抗体を用いてPLAをマニュアルに従って行った。

・細胞増殖率の検定

種々のプラスミドをトランスフェクションして 24 時間が経過した 6well plate 中の HCT116 をトリプシン処理し、新しい 6well plate の各ウェルに等量ずつ播種した。播種してから 0、24、48、72 時間後に細胞数の測定を行った。

・レポーターアッセイ

24well plate に播種した SH-SY5Y に種々のプラスミドをトランスフェクションし、28 時間後に PBS で洗浄を行い、Luciferase Assay Lysis Buffer (Toyo Bnet)を用いて細胞溶解液を調製した。これらのサンプルで PicaGene Dual-luciferase reporter assay reagent (Toyo Bnet)を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。検定の際には Firefly(下記①②③の UPR レポーター)のシグナル量を Renilla(下記④の内部標準)のシグナル量で補正した。

使用したレポータープラスミドは以下の通り。

①ERSE Reporter : pGL3-GRP78(-132)-luc [15]

②UPRE Reporter : p5xUPRE-GL3 [29]

③ATF4 Reporter : pdCMV-murineATF4-luc2 (当研究室の石川時郎 博士が以前に作製された)

④内部標準 : pRL-SV40 (Promega)

これらを①+④、②+④または③+④の組み合わせで細胞に導入し、解析を行った。

・抗体

使用した抗体の名称(動物種)、メーカーカタログ番号、各実験における使用濃度はそれぞれ以下の通り。

抗体の名称 (動物種)	メーカー	カタログ 番号	使用濃度
Anti-BSCL2 (Seipin) (rabbit monoclonal)	Cell Signaling	Cat#: 23846	ウエスタンブロット(1:1000) 免疫蛍光染色(1:1000)
anti-SERCA2 (mouse monoclonal)	Santa Cruz	Cat#: sc-376235	ウエスタンブロット(1:500) 免疫沈降実験(5 μl) 免疫蛍光染色(1:250)
anti-Myc-tag mAb-	MBL	Code:	ウエスタンブロット(1:1000)

HRP-DirecT (mouse monoclonal)		M047-7	
anti-GFP (rabbit polyclonal)	MBL	Code: 598	ウエスタンブロット(1:1000)
anti-β-actin (mouse monoclonal)	Wako	Cat#: 017-24573	ウエスタンブロット(1:2000)
anti-GAPDH Peroxidase Conjugated (mouse monoclonal)	Wako	Cat#: 015-25473	ウエスタンブロット(1:5000)
anti-GAPDH (mouse monoclonal)	Wako	Cat#: 014-25524	免疫蛍光染色(1:1000)
anti-KDEL (mouse monoclonal)	MBL	Code: M181-3	免疫蛍光染色(1:2000)
anti-Myc-tag (rabbit polyclonal)	MBL	Code: 562	PLA (1:250) 免疫蛍光染色(1:100)
Anti-Flag M2 (mouse monoclonal)	Sigma	Cat#: F3165	PLA (1:250) 免疫蛍光染色(1:500)
Anti-Myc tag (mouse monoclonal)	Wako	Cat#: 017-21871	免疫蛍光染色(1:100)
Anti-Cleaved Caspase-3 (rabbit polyclonal)	Cell Signaling	Cat#: 9661	免疫蛍光染色(1:800)
Alexa488-conjugated anti-rabbit secondary antibody	Invitrogen	Cat#: A-11008	免疫蛍光染色(1:1000)
Alexa568-conjugated anti-mouse secondary antibody	Invitrogen	Cat#: A-11004	免疫蛍光染色(1:1000)

・ 統計処理

統計解析の際には Student's t-test を行った。解析結果を * : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 、n.s. : not significant (有意差なし) として表記した。

結論

ngSeipin が導入されたヒト培養細胞では、小胞体内カルシウムイオン濃度の有意な低下が認められた。その分子メカニズムを調べた結果、ngSeipin は小胞体内腔部分での Seipin 同士の相互作用を介して小胞体膜上で凝集する性質があり、さらにこの凝集に SERCA2b が (Seipin の C 末端部分との結合を介して) 巻き込まれることを明らかにした。このようなメカニズムで SERCA2b が不活性化されて小胞体内部へのカルシウムイオンの取り込みが抑制されることが、ngSeipin に起因する小胞体ストレスと細胞死の原因であることを突き止めた。

論文目録

本研究内容は以下の論文で公表した。

Saito S, Ishikawa T, Ninagawa S, Okada T, Mori K. A motor neuron disease-associated mutation produces non-glycosylated Seipin that induces ER stress and apoptosis by inactivating SERCA2b. *Elife*. 2022 Nov 29;11:e74805. doi: 10.7554/eLife.74805. PMID: 36444643; PMCID: PMC9708084.

引用文献

1. Ellgaard L, Helenius A, Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, (2003), 181-191, 4(3)
2. Laude A, Simpson A, Compartmentalized signalling: Ca²⁺ compartments, microdomains and the many facets of Ca²⁺ signalling. *FEBS Journal*, (2009), 1800-1816, 276(7)
3. Brini M, Carafoli E, Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiol Rev* (2009), 89: 1341–1378,
4. Berridge M, Bootman M, Roderick H, Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, (2003), 517-529, 4(7)
5. Preissler S, Rato C, Yan Y, Perera L, Czako A, Ron D, Calcium depletion challenges endoplasmic reticulum proteostasis by destabilising bip-substrate complexes. *eLife*, (2020), 1-36, 9
6. Mori K, Signalling pathways in the unfolded protein response: Development from yeast to mammals. *Journal of Biochemistry*, (2009), 743-750, 146(6)
7. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000. (2000), 2(6), 326-32,
8. Harding H, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D, Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, (2000), Vol. 6, 1099–1108

9. Harding H, Zhang Y, Ron D, Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, (1999), 397, 271-274,
10. Kashiwagi K, Yokoyama T, Nishimoto M, Takahashi M, Sakamoto A, Yonemochi M, Shirouzu M, Ito T, Structural basis for eIF2B inhibition in integrated stress response. *Science*, (2019), 364, 495–499
11. Vattem K, Wek R, Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *PNAS*, (2004), vol. 101, no. 31, 11269 –11274
12. Oyadomari S, Mori M, Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and Differentiation*, (2004), 11(4), 381-389,
13. Harding H, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu P, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl D, Bell J, Hettmann T, Leiden J, Ron D, An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular Cell*, (2003), Vol. 11, 619-633
14. Harding H, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini D, Ron D, Diabetes Mellitus and Exocrine Pancreatic Dysfunction in Perk/ Mice Reveals a Role for Translational Control in Secretory Cell Survival. *Molecular Cell*, (2001), Vol. 7, 1153–1163,
15. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K, Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins: Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, (1998), 33741-33749, 273(50)

16. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K, Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology of the Cell*, (1999), Vol. 10, 3787–3799,
17. Ye J, Rawson R, Komuro R, Chen X, Davé U, Prywes R, Brown M, Goldstein J, ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Molecular Cell*, (2000), Vol. 6, 1355–1364,
18. Okada T, Haze K, Nadanaka S, Yoshida H, Seidah N, Hirano Y, Sato R, Negishi M, Mori K, A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *Journal of Biological Chemistry*, (2003), 31024-31032, 278(33)
19. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K, Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Formation of Transcription Factor Complex ERSF Including NF-Y (CBF) and Activating Transcription Factors 6 α and 6 β That Activates the Mammalian Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology*, (2001), 1239-1248, 21(4)
20. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K, Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.*, (2002), 366, 585–594,
21. Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K, (2008), ATF6 Is a Transcription Factor Specializing in the Regulation of Quality Control Proteins in the Endoplasmic Reticulum. *CELL STRUCTURE AND FUNCTION*, (2008), 33: 75–89

22. Ishikawa T, Okada T, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Kamei Y, Shigenobu S, Tanaka M, Saito T, Yoshimura J, Morishita S, Toyoda A, Sakaki Y, Taniguchi Y, Takeda S, Mori K, ATF6 α/β -mediated adjustment of ER chaperone levels is essential for development of the notochord in medaka fish. *Molecular Biology of the Cell*, (2013), 1387-1395, 24(9)
23. Haze K, Okada T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K, Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J.*, (2001), 355, 19–28,
24. Ishikawa T, Taniguchi Y, Okada T, Takeda S, Mori K, Vertebrate Unfolded Protein Response: Mammalian Signaling Pathways Are Conserved in Medaka Fish. *CELL STRUCTURE AND FUNCTION*, (2011), 36: 247–259,
25. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K, Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 α and XBP1. *Developmental Cell*, (2007), 365-376, 13(3)
26. Tirasophon W, Welihinda A, Kaufman R, A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *GENES & DEVELOPMENT*, (1998), 12:1812–1824
27. Wang X, Harding H, Zhang Y, Jolicoeur E, Kuroda M, Ron D, Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO Journal*, (1998), 5708-5717, 17(19)

28. Lu Y, Liang F, Wang X, A Synthetic Biology Approach Identifies the Mammalian UPR RNA Ligase RtcB. *Molecular Cell*, (2014), 758-770, 55(5)
29. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K, XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell*, (2001), Vol. 107, 881–891,
30. Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman R, Mori K, Differential Contributions of ATF6 and XBP1 to the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress-Responsive cis-Acting Elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem*, (2004), 343-350, 136
31. Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman R, Nagata K, Mori K, A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response to decrease the load in the ER; these processes are collectively termed the unfolded protein response. *Developmental Cell*, (2003), Vol. 4, 265–271,
32. Yamamoto K, Suzuki N, Wada T, Okada T, Yoshida H, Kaufman R, Mori K, Human HRD1 promoter carries a functional unfolded protein response element to which XBP1 but not ATF6 directly binds. *Journal of Biochemistry*, (2008), 477-486, 144(4)
33. Liu L, Cai J, Wang H, Liang X, Zhou Q, Ding C, Zhu Y, Fu T, Guo Q, Xu Z, Xiao L, Liu J, Yin Y, Fang L, Xue B, Wang Y, Meng Z, He A, Li J, Liu Y, Chen X, Gan Z, Coupling of COPII vesicle trafficking to nutrient availability by the IRE1 α -XBP1s axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (2019), 11776-11785, 116(24)

34. Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho J, West A, Ron D, Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, (2001), 585-593, 107(5)
35. Iwawaki T, Akai R, Yamanaka S, Kohno K, Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *PNAS*, (2009), vol. 106, no. 39, 16657–16662,
36. Zhang K, Wong H, Song B, Miller C, Scheuner D, Kaufman R, The unfolded protein response sensor IRE1 α is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *Journal of Clinical Investigation*, (2005), 268-281, 115(2)
37. Ishikawa T, Kashima M, Nagano A, Ishikawa-Fujiwara T, Kamei Y, Todo T, Mori K, Unfolded protein response transducer IRE1-mediated signaling independent of XBP1 mRNA splicing is not required for growth and development of medaka fish. *eLife*, (2017), 6
38. Carrara M, Prischi F, Ali M, UPR signal activation by luminal sensor domains. *International Journal of Molecular Sciences*, (2013), 6454-6466, 14(3)
39. Carrara M, Prischi F, Nowak P, Kopp M, Ali M, Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein C H 1 to initiate ER stress signaling. *eLife*, (2015), 4
40. Kay L, Elif K, aragö G, Acosta-Alvear D, Nguyen H, Lee C, Chu F, Walter P, An unfolded protein-induced conformational switch activates mammalian IRE1. *eLife*, (2017), 6

41. Oikawa D, Kitamura A, Kinjo M, Iwawaki T, Direct Association of Unfolded Proteins with Mammalian ER Stress Sensor, IRE1 β . *PLoS ONE*, (2012), 7(12)
42. Wang P, Li J, Sha B, The ER stress sensor PERK luminal domain functions as a molecular chaperone to interact with misfolded proteins. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, (2016), 1290-1297, 72(12)
43. Wang P, Li J, Tao J, Sha B, The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, (2018), 4110-4121, 293(11)
44. McCullough K, Martindale J, Klotz L, Aw T, Holbrook N, Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Molecular and Cellular Biology*, (2001), 1249-1259, 21(4)
45. Puthalakath H, O'Reilly L, Gunn P, Lee L, Kelly P, Huntington N, Hughes P, Michalak E, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A, ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell*, (2007), 1337-1349, 129(7)
46. Kim H, Tu H, Ren D, Takeuchi O, Jeffers J, Zambetti G, Hsieh J, Cheng E, Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis. *Molecular Cell*, (2009), 487-499, 36(3)
47. Masud A, Mohapatra A, Lakhani S, Ferrandino A, Hakem R, Flavell R, Endoplasmic reticulum stress-induced death of mouse embryonic fibroblasts requires the intrinsic pathway of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, (2007), 14132-14139, 282(19)

48. Yamaguchi H, Wang H, CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, (2004), 45495-45502, 279(44)
49. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H, TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO Journal*, (2005), 1243-1255, 24(6)
50. Cazanave S, Elmi N, Akazawa Y, Bronk S, Mott J, Gores G, CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, (2010), 299(1)
51. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H, ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes and Development*, (2002), 1345-1355, 16(11)
52. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding H, Ron D, Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane. protein kinase IRE1. *Science*, (2000), 664-666, 287(5453)
53. Julie H, Jonathan S. W, Decay of EndoplasmicReticulum-Localized mRNAs Duringthe Unfolded Protein Response. *Science*, (2006), 104-107, 313 (5783)
54. Upton J, Wang L, Han D, Wang E, Huskey N, Lim L, Truitt M, McManus M, Ruggero D, Goga A, Papa F, Oakes S, IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic caspase-2. *Science*, (2012), 818-822, 338(6108)

55. Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet JC, Bonini NM, Lindquist S. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*. 2006 Jul 21;313(5785):324-8.
56. Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H, ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes and Development*, (2008), 1451-1464, 22(11)
57. Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, Patel H, Petek E, Hörl G, Malli R, Reed J, Dierick I, Verpoorten N, Warner T, Proukakis C, Van Den Bergh P, Verellen C, Van Maldergem L, Merlini L, De Jonghe P, Timmerman V, Crosby A, Wagner K, Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nature Genetics*, (2004), 271-276, 36(3)
58. Ito D, Suzuki N, Seipinopathy: A novel endoplasmic reticulum stress-associated disease. *Brain*, (2009), 8-15, 132(1)
59. Yan R, Qian H, Lukmantara I, Gao M, Du X, Yan N, Yang H, Human SEIPIN Binds Anionic Phospholipids. *Developmental Cell*, (2018), 248-256.e4, 47(2)
60. Sui X, Arlt H, Brock K, Lai Z, DiMaio F, Marks D, Liao M, Farese R, Walther T, Cryo-electron microscopy structure of the lipid droplet-formation protein seipin. *Journal of Cell Biology*, (2018), 4080-4091, 217(12)
61. Klug Y, Deme J, Corey R, Renne M, Stansfeld P, Lea S, Carvalho P, Mechanism of lipid droplet formation by the yeast Sei1/Ldb16 Seipin complex. *Nature Communications*, (2021), 12(1)

62. Arlt H, Sui X, Folger B, Adams C, Chen X, Remme R, Hamprecht FA, DiMaio F, Liao M, Goodman JM, Farese RV Jr, Walther TC. Seipin forms a flexible cage at lipid droplet formation sites. *Nature Structural and Molecular Biology*, (2022), 194-202, 29(3)
63. Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T Jr, Van Maldergem L, Sobel E, Papp J, Meier M, Mégarbané A, Bachy A, Verloes A, d'Abronzio FH, Seemanova E, Assan R, Baudic N, Bourut C, Czernichow P, Huet F, Grigorescu F, de Kerdanet M, Lacombe D, Labrune P, Lanza M, Loret H, Matsuda F, Navarro J, Nivelon-Chevalier A, Polak M, Robert JJ, Tric P, Tubiana-Rufi N, Vigouroux C, Weissenbach J, Savasta S, Maassen JA, Trygstad O, Bogalho P, Freitas P, Medina JL, Bonnicci F, Joffe BI, Loyson G, Panz VR, Raal FJ, O'Rahilly S, Stephenson T, Kahn CR, Lathrop M, Capeau J; BSCL Working Group. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nature Genetics*, (2001), 365-370, 28(4)
64. Szymanski K, Binns D, Bartz R, Grishin N, Li W, Agarwal A, Garg A W, Anderson R, Goodman J, The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *PNAS*, (2007), 04(52):20890-5.
65. Tian Y, Bi J, Shui G, Liu Z, Xiang Y, Liu Y, Wenk M, Yang H, Huang X, Tissue-autonomous function of drosophila seipin in preventing ectopic lipid droplet formation. *PLoS Genetics*, (2011), 7(4)
66. Salo V, Belevich I, Li S, Karhinen L, Vihinen H, Vigouroux C, Magré J, Thiele C, Hölttä - Vuori M, Jokitalo E, Ikonen E, Seipin regulates ER – lipid droplet contacts and cargo delivery, *The EMBO Journal*, (2016), 2699-2716, 35(24)
67. Ito D, Suzuki N, Molecular pathogenesis of Seipin/BSCL2-related motor neuron diseases. *Annals of Neurology*, (2007), 237-250, 61(3)

68. Yagi T, Ito D, Nihei Y, Ishihara T, Suzuki N, N88S seipin mutant transgenic mice develop features of seipinopathy/BSCL2-related motor neuron disease via endoplasmic reticulum stress. *Human Molecular Genetics*, (2011), 3831-3840, 20(19)
69. Bi J, Wang W, Liu Z, Hueng X, Jiang Q, Liu G, Wang Y, Huang X, Seipin promotes adipose tissue fat storage through the ER Ca²⁺-ATPase SERCA. *Cell Metabolism*, (2014), 861-871, 19(5)
70. Roschke A, Stover K, Tonon G, Schäffer A, Kirsch I, Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. *Neoplasia*, (2002), 19-31, 4(1)
71. Yusuf M, Leung K, Morris K, Volpi E, Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y. *Neurogenetics*, (2013), 63-70, 14(1)
72. Lundin C, Nordström R, Wagner K, Windpassinger C, Andersson H, von Heijne G, Nilsson I, Membrane topology of the human seipin protein. *FEBS Letters*, (2006), 2281-2284, 580(9)
73. Gélébart P, Martin V, Enouf J, Papp B, Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2003), 676-684, 303(2)
74. Dally S, Bredoux R, Corvazier E, Andersen J, Clausen J, Dode L, Fanchaouy M, Gelebart P, Monceau V, Del Monte F, Gwathmey J, Hajjar R, Chaabane C, Bobe R, Raies A, Enouf J, Ca²⁺-ATPases in non-failing and failing heart: Evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochemical Journal*, (2006), 249-258, 395(2)

75. GTEx Consortium. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science*, (2015), May 8;348(6235):648-60.
76. Papatheodorou I, Moreno P, Manning J, Fuentes AM, George N, Fexova S, Fonseca NA, Füllgrabe A, Green M, Huang N, Huerta L, Iqbal H, Jianu M, Mohammed S, Zhao L, Jarnuczak AF, Jupp S, Marioni J, Meyer K, Petryszak R, Prada Medina CA, Talavera-López C, Teichmann S, Vizcaino JA, Brazma A. Expression Atlas update: from tissues to single cells. *Nucleic Acids Research*, (2020), D77-D83, 48(D1)
77. Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, Ohkura M, Okubo Y, Iino M, Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. *Nature Communications*, (2014), 5
78. Chen T, Wardill T, Sun Y, Pulver S, Renninger S, Baohan A, Schreiter E, Kerr R, Orger M, Jayaraman V, Looger L, Svoboda K, Kim D, Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, (2013), 295-300, 499(7458)
79. Lyttonsg J, Westlins M, Hanleyll M, Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, (1991), 17067-17071,
80. Zorzato F, Scutari E, Tegazzin V, Clementi E, Treves S. Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release. *Mol Pharmacol*, (1993), 44(6), 1192-201,
81. Cruzblanca H, Koh D, Hille B, Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca² release from IP₃-sensitive Ca² stores in rat sympathetic neurons. *PNAS*, (1998), 7151-7156

82. Cornea R, Gruber S, Lockamy E, Muretta J, Jin D, Chen J, Dahl R, Bartfai T, Zsebo K, Gillispie G, Thomas D, High-throughput FRET assay yields allosteric SERCA activators. *Journal of Biomolecular Screening*, (2013), 97-107, 18(1)
83. Gruber S, Cornea R, Li J, Peterson K, Schaaf T, Gillispie G, Dahl R, Zsebo K, Robia S, Thomas D, Discovery of enzyme modulators via high-throughput time-resolved FRET in living cells. *Journal of Biomolecular Screening*, (2014), 215-222, 19(2)
84. Abrenica B, Gilchrist J, Nucleoplasmic Ca²⁺ loading is regulated by mobilization of perinuclear Ca²⁺. *Cell Calcium*, (2000), 127-136, 28(2)
85. Miyauchi Y, Daiho T, Yamasaki K, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Danko S, Suzuki H, Iizuka H, Comprehensive analysis of expression and function of 51 sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase mutants associated with darier disease. *Journal of Biological Chemistry*, (2006), 22882-22895, 281(32)
86. Gaudelli N, Komor A, Rees H, Packer M, Badran A, Bryson D, Liu D, Programmable base editing of T to G C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, (2017), 464-471, 551(7681)
87. Komor A, Zhao K, Packer M, Gaudelli N, Waterbury A, Koblan L, Kim Y, Badran A, Liu D, Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci Adv*, (2017), 3(8), eaao4774,
88. Richardson C, Ray G, DeWitt M, Curie G, Corn J, Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nature Biotechnology*, (2016), 339-344, 34(3)

89. Kim S, Matsumoto T, Kagawa H, Nakamura M, Hirohata R, Ueno A, Ohishi M, Sakuma T, Soga T, Yamamoto T, Woltjen K, Microhomology-assisted scarless genome editing in human iPSCs. *Nature Communications*, (2018), 9(1)
90. Fei W, Shui G, Gaeta B, Du X, Kuerschner L, Li P, Brown A, Wenk M, Parton R, Yang H, Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *Journal of Cell Biology*, (2008), 473-482, 180(3)
91. Wang C, Miao Y, Chang Y, Control of lipid droplet size in budding yeast requires the collaboration between Fld1 and Ldb16. *Journal of Cell Science*, (2014), 1214-1228, 127(6)
92. Cranfill P, Sell B, Baird M, Allen J, Lavagnino Z, De Gruiter H, Kremers G, Davidson M, Ustione A, Piston D, Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nature Methods*, (2016), 557-562, 13(7)
93. Ebihara K, Kusakabe T, Masuzaki H, Kobayashi N, Tanaka T, Chusho H, Miyanaga F, Miyazawa T, Hayashi T, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K, Gene and Phenotype Analysis of Congenital Generalized Lipodystrophy in Japanese: A Novel Homozygous Nonsense Mutation in Seipin Gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, (2004), 2360-2364, 89(5)
94. Yang W, Thein S, Guo X, Xu F, Venkatesh B, Sugii S, Radda G, Han W, Seipin differentially regulates lipogenesis and adipogenesis through a conserved core sequence and an evolutionarily acquired C-terminus. *Biochemical Journal*, (2013), 37-44, 452(1)

95. Paganoni S, Macklin EA, Hendrix S, Berry JD, Elliott MA, Maiser S, Karam C, Caress JB, Owegi MA, Quick A, Wymer J, Goutman SA, Heitzman D, Heiman-Patterson T, Jackson CE, Quinn C, Rothstein JD, Kasarskis EJ, Katz J, Jenkins L, Ladha S, Miller TM, Scelsa SN, Vu TH, Fournier CN, Glass JD, Johnson KM, Swenson A, Goyal NA, Pattee GL, Andres PL, Babu S, Chase M, Dagostino D, Dickson SP, Ellison N, Hall M, Hendrix K, Kittle G, McGovern M, Ostrow J, Pothier L, Randall R, Shefner JM, Sherman AV, Tustison E, Vigneswaran P, Walker J, Yu H, Chan J, Wittes J, Cohen J, Klee J, Leslie K, Tanzi RE, Gilbert W, Yeramian PD, Schoenfeld D, Cudkowicz ME. Trial of Sodium Phenylbutyrate-Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, (2020), 919-930, 383(10)
96. Paganoni S, Hendrix S, Dickson SP, Knowlton N, Macklin EA, Berry JD, Elliott MA, Maiser S, Karam C, Caress JB, Owegi MA, Quick A, Wymer J, Goutman SA, Heitzman D, Heiman-Patterson TD, Jackson CE, Quinn C, Rothstein JD, Kasarskis EJ, Katz J, Jenkins L, Ladha S, Miller TM, Scelsa SN, Vu TH, Fournier CN, Glass JD, Johnson KM, Swenson A, Goyal NA, Pattee GL, Andres PL, Babu S, Chase M, Dagostino D, Hall M, Kittle G, Eydinov M, McGovern M, Ostrow J, Pothier L, Randall R, Shefner JM, Sherman AV, St Pierre ME, Tustison E, Vigneswaran P, Walker J, Yu H, Chan J, Wittes J, Yu ZF, Cohen J, Klee J, Leslie K, Tanzi RE, Gilbert W, Yeramian PD, Schoenfeld D, Cudkowicz ME. Long-term survival of participants in the CENTAUR trial of sodium phenylbutyrate-taurursodiol in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, (2021), 63(1), 31-39,
97. Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

98. George G, Ninagawa S, Yagi H, Furukawa J, Hashii N, Ishii-Watabe A, Deng Y, Matsushita K, Ishikawa T, Mamahit Y, Maki Y, Kajihara Y, Kato K, Okada T, Mori K, Purified EDEM3 or EDEM1 alone produces determinant oligosaccharide structures from M8B in mammalian glycoprotein ERAD. *eLife*, (2021), 70357, 10
99. Van Engelenburg S, Palmer A, Imaging type-III secretion reveals dynamics and spatial segregation of Salmonella effectors. *Nature Methods*, (2010), 325-330, 7(4)
100. Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, Ishikawa T, Takeda S, Sakuma T, Yamamoto T, Mori K, EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *Journal of Cell Biology*, (2014), 347-356, 206(3)

謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、終始ご指導・ご鞭撻を賜りました京都大学大学院理学研究科 生物物理学教室 ゲノム情報発現学分野 教授 森和俊 博士に謹んで深謝の意を表します。森教授には 2014 年 4 月から 9 年間もの間、何不自由なく研究に徹することのできる環境と、数えきれないほど多くの有益な助言を与えていただきました。また、絶えず真摯に熱心に研究と向き合う姿勢から多くの大切なことを学ばせていただき、私に研究者として目指すべき姿を示してくださいました。

同分野 助教 岡田徹也 博士には、研究の多くの局面で様々な角度からご助言をいただきました。また本研究の完成のために欠かすことのできなかつた顕微鏡解析のための詳細な技術と知識を授けていただきました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

同分野 助教でいらっしゃいました、住友化学株式会社 生物環境科学研究所 細胞生化学 G 細胞技術 T 主任研究員 石川時郎 博士には、私が森研究室に所属して以降、最も身近な立場で数多くの実験・解析の方法を教えてくださいました。また、論文のデータの解釈の仕方や研究の進め方など、研究者として生きていくための思考方法の基礎を授けていただきました。それだけでなく、研究に挫折しくじけそうになった私を何度も励まし、支えてくださいました。深く感謝申し上げます。

同分野 特定助教でいらっしゃいました、神戸大学バイオシグナル総合研究センター、農学研究科資源生命科学専攻 応用動物学講座細胞情報学 助教 蜷川 暁 博士には、研究にあたり数多くの局面でご相談させていただき、いつもの確なアドバイスをさせていただきました。また日頃から親身に接していただき、沢山の励ましの言葉もいただきました。深く感謝いたします。

森研究室の皆様には様々なご助言をいただき、色々な場面でお世話になりました。宮川かおるさんには研究試薬の調製や事務の仕事で日々お世話になりました。澤田真紀子さんにはメダカの飼育・維持をしていただきました。皆様の多大な支援をいただき、大変有意義な研究生生活を送ることができました。ありがとうございました。

最後に、研究に取り組む自由を与え、いつも心の支えとなってくれた父 修、母 早苗、弟 航介、妹 あかね、祖母 とき子に感謝いたします。