

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590081
 研究課題名 (和文) mRNA 不安定化因子 TIS11 のストレス顆粒への局在に関する研究
 研究課題名 (英文) Study on recruitment of mRNA-destabilizing protein TIS11 to stress granules

研究代表者
 村田 富保 (MURATA TOMIYASU)
 名城大学・薬学部・助教
 研究者番号：80285189

研究成果の概要：

近年、多くの疾患が様々なストレスによって引き起こされることから、細胞のストレス応答機構を探ることは、ストレスに対する生体防御機構を知るうえで重要な研究課題である。細胞のストレス応答反応の一つとして、細胞に対して熱ストレス・ミトコンドリア機能障害・酸化ストレス・UV 照射などのストレスを与えると、ストレス顆粒と呼ばれる凝集体が細胞質に形成されることが知られている。我々は、ストレスの種類に応じて TIS11 がストレス顆粒に局在することを初めて発見し、ストレス顆粒内で TIS11 が mRNA 不安定化因子として機能していることを報告した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,200,000	0	2,200,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	420,000	4,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：TIS11、ストレス顆粒、翻訳抑制、mRNA 不安定化因子

1. 研究開始当初の背景

神経成長因子 (NGF) は交感神経や知覚神経の分化・生存維持・再生修復に必須となる神経栄養因子の一つである。そこで、神経細胞特有のプログラムを解明することを目的として、NGF の作用機序に焦点を置いた研究が世界中で繰り広げられ、NGF によって発現誘導される初期応答遺伝子として転写因子やサイトカイン類などの遺伝子が報告されていた。我々は、ホルボールエステル (TPA)

で誘導されることが知られている TIS (TPA-Induced Sequences) 遺伝子群において、TIS11 遺伝子が NGF 刺激時の初期応答遺伝子の一つであることを報告した。この発見を機に、我々は TIS11 遺伝子の発現調節機構を解明するために、TIS11 遺伝子のプロモーター領域の解析を進め、TIS11 遺伝子の発現調節機構の一端を解明することができた。さらに、TIS11 遺伝子の翻訳産物である TIS11 タンパク質は特異な Zn²⁺フィンガー構造を有

しており、我々は TIS11 タンパク質の機能解析についても研究を進めた。その結果、NGF に応答して交感神経細胞様に分化する副腎髄質 PC12 細胞を用いて、TIS11 が転写活性化因子であることを初めて発見し、TIS11 が NGF の生理作用に関与する転写調節因子の一つであることを示した。さらに、細胞質で合成された TIS11 は、核内へ移行して、はじめて転写調節機能を発揮することから、核-細胞質間における物質輸送という視点から研究を進め、TIS11 の一次構造にて核内移行シグナル領域ならびに核外移行シグナル領域を同定し、TIS11 が核-細胞質間をシャトルしていることを見出した。一方、海外の研究グループによって、TIS11 が腫瘍壊死因子 α 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン-3 などの mRNA の 3' 非翻訳領域に存在する AU-rich エlement に結合し、mRNA を不安定化させることが報告された。さらに、TIS11 がアポトーシス誘導因子として機能することも報告された。以上のことから、我々の研究成果と海外の研究グループの研究成果を考慮すると、TIS11 は多機能性の Zn^{2+} フィンガータンパク質であることが想定された。

2. 研究の目的

細胞のストレス応答反応の一つとして、細胞に対して熱ストレス・ミトコンドリア機能障害・酸化ストレス・UV 照射などのストレスを与えると、ストレス顆粒と呼ばれる凝集体が細胞質に形成されることが報告され、その生理的意義が注目されている。通常、翻訳中の mRNA はリボソームが複数連なったポリソーム構造をとる。しかしながら、ストレスが加わると、不完全な翻訳開始装置が構築され、ポリソーム構造が崩壊し、それらが凝集してストレス顆粒が形成され、その結果、翻訳反応が抑制されると考えられている。事実、ストレス顆粒には、未翻訳の mRNA、一部の翻訳制御因子、リボソームタンパク質の分解物などが存在することが報告されている。ストレス顆粒の形成によるストレス特異的な翻訳抑制は、ストレスに適応するための細胞の防御機構の一つとされ、ストレス時における異常なタンパク質合成を最小限に抑え、ストレスから細胞を保護すると考えられている。我々は、ストレス条件下において TIS11 がストレス顆粒に局在することを独自に見出した。そこで、本研究では、ストレス条件下で形成されるストレス顆粒における TIS11 の機能的役割を解明することを目的として、以下に示す研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) ストレス条件下における TIS11 ファミリー

一分子のストレス顆粒への移行様式の解析

① TIS11 ファミリー分子の GFP (green fluorescent protein) 融合タンパク質発現ベクターの作製

TIS11、TIS11b あるいは TIS11d のペプチド断片(野生型および変異型)をコードする DNA 断片を PCR 法により増幅し、種々の DNA 断片を GFP 発現ベクターに組み込んだ。次いで、蛍光自動シーケンサーにより DNA 断片の塩基配列を確認した。

② 遺伝子導入細胞の免疫蛍光染色法

COS7 細胞は、10%牛胎仔血清を含む DMEM を用いて 37°C、5%CO₂ 存在下で継代培養した。COS7 細胞をチャンバースライドに播種し、細胞密度が 80%になるまで培養した。次いで、種々の発現ベクターを COS7 細胞内へ遺伝子導入し、14 時間後に遺伝子導入細胞に対して熱ストレス処理 (44°C、30 分間)、FCCP 処理によるエネルギー枯渇ストレス (2 μ M FCCP、1 時間) あるいは亜ヒ酸処理による酸化ストレス (1 mM 亜ヒ酸、30 分間) を与えた。その後、TIA-1 抗体を用いて遺伝子導入細胞を免疫蛍光染色し、作製した細胞標本を共焦点レーザー顕微鏡で検鏡し、TIS11 ファミリー分子の細胞内局在の解析を行った。

(2) p53 誘導性アポトーシスにおける TIS11 の細胞内局在の解析

tsAM5D 細胞は、10%牛胎仔血清および G5 サプリメント(インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸、ビオチン、ヒドロコルチゾン、塩基性線維芽細胞増殖因子、上皮増殖因子)を含有する DMEM を用いて、IV 型コラーゲンをコートしたディッシュ上にて 33°C、5%CO₂ 存在下で継代培養した。また、培養温度を 33°C から 39°C にシフトすることにより、p53 誘導性のアポトーシスを惹起させた。TIS11 の mRNA 発現量は、TIS11 遺伝子に対する特異的プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法により定量した。TIS11 の細胞内局在の解析は、TIS11 抗体および TIA-1 抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、作製した細胞標本を共焦点レーザー顕微鏡で検鏡した。

4. 研究成果

特定のペプチド断片を GFP に融合させたタンパク質を細胞内に発現させることにより、GFP の局在を指標にして、融合したペプチド断片の細胞内移行活性を評価することができる。そこで、ストレス条件下における TIS11 の細胞内局在を解析するために、まず初めに TIS11 の全長 (1-320) および Zn^{2+} フィンガー領域 (76-161) の GFP 融合タンパク質発現ベクターを作製した。次いで、それぞれの GFP 融合タンパク質を COS7 細胞に一過性に発現させた後、熱ストレス、ミトコンドリア機能阻害剤 FCCP によるエネルギー枯渇ストレス、亜ヒ酸による酸化ストレスを与えた。その後、

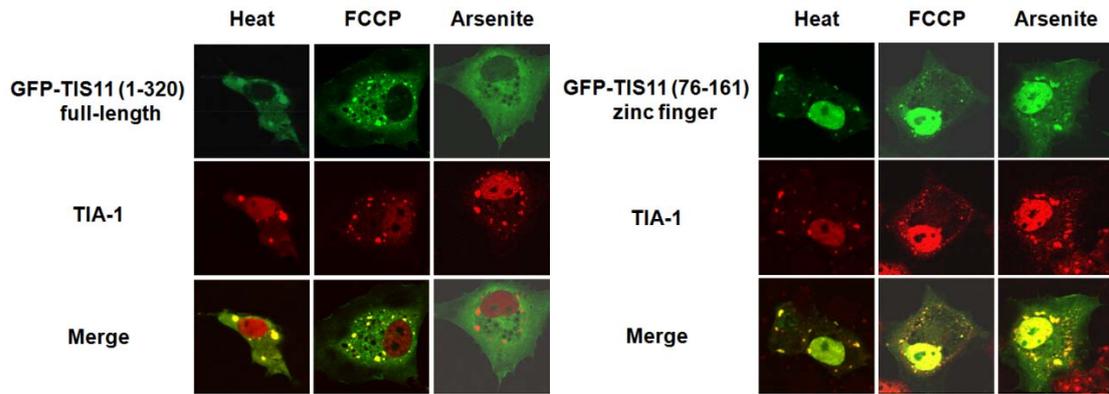


Fig. 1. Subcellular localization of TIS11-GFP fusion proteins under the various stress conditions.

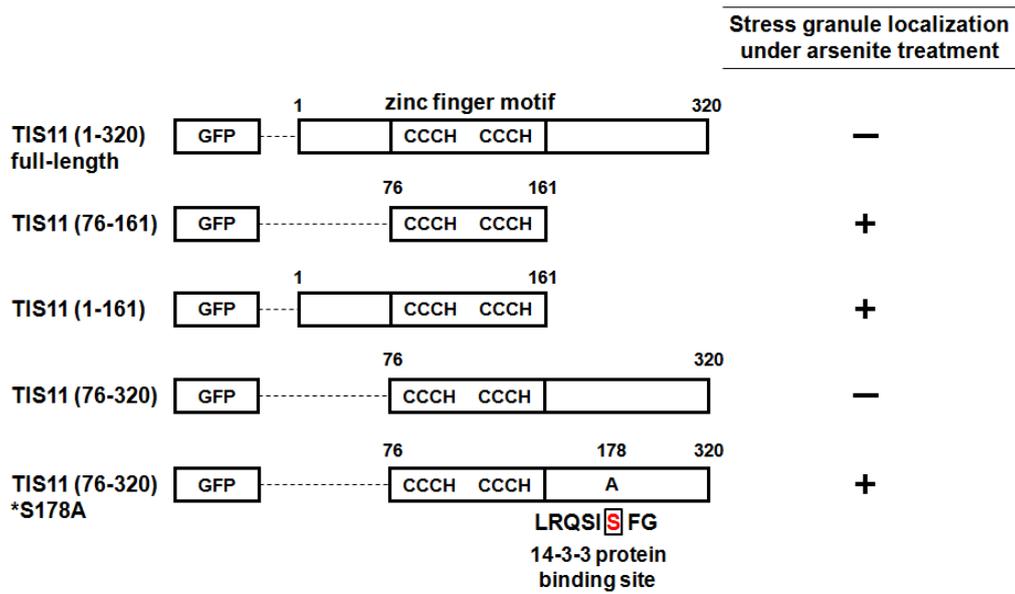


Fig. 2. Recruitment of TIS11 mutants to stress granules under the oxidative stress condition.

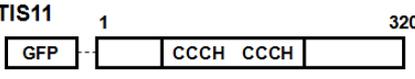
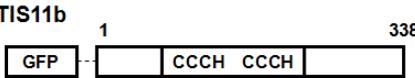
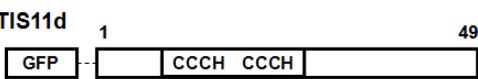
		Stress granule localization		
		Heat	FCCP	Arsenite
GFP-TIS11		+	+	-
GFP-TIS11b		+	+	-
GFP-TIS11d		+	+	-

Fig. 3. Effect of various stresses on recruitment of TIS11 family proteins to stress granules.

ストレス顆粒のマーカー分子である TIA-1 (T-cell intracellular antigen-1) に対する免疫蛍光染色を行い、GFP と TIA-1 の局在を指標に TIS11 の全長および Zn²⁺フィンガー領域のストレス顆粒への移行について解析した (Fig. 1)。

熱ストレスや FCCP によるエネルギー枯渇ストレスを与えた細胞では、TIS11 全長 (GFP-TIS11 (1-320)) は細胞質全体に顆粒状に存在し、その顆粒が TIA-1 陽性のストレス顆粒と一致したため、熱ストレスや FCCP によるエネルギー枯渇ストレスでは TIS11 全長はストレス顆粒に移行することが判明した。一方、亜ヒ酸による酸化ストレスを与えた細胞では、TIS11 全長 (GFP-TIS11 (1-320)) は細胞質全体に存在したが、顆粒状には存在せず、TIA-1 陽性のストレス顆粒へ移行しなかった。これらの知見から、TIS11 全長はストレスの種類に応じてストレス顆粒に局在することが判明した。

熱ストレスや FCCP によるエネルギー枯渇ストレスを与えた細胞では、TIS11 の Zn²⁺フィンガー領域 (GFP-TIS11 (76-161)) は細胞質に顆粒状に存在し、TIA-1 陽性のストレス顆粒へ局在することが判明した。これらの知見から、熱ストレスやエネルギー枯渇ストレスにおける TIS11 全長のストレス顆粒への移行は、Zn²⁺フィンガー領域のストレス顆粒移行活性に依存することが示唆された。一方、亜ヒ酸による酸化ストレスを与えた細胞では、TIS11 全長 (GFP-TIS11 (1-320)) がストレス顆粒に局在しなかったのに対して、TIS11 の Zn²⁺フィンガー領域 (GFP-TIS11 (76-161)) はストレス顆粒に局在したことから、酸化ストレス条件下では Zn²⁺フィンガー領域のストレス移行活性が抑制されることが示唆された。

そこで、TIS11 の変異体を用いて、Zn²⁺フィンガー領域のストレス顆粒移行活性を抑制する機能ドメインの解析を試みた (Fig. 2)。その結果、酸化ストレス条件下では、Zn²⁺フィンガー領域と C 末端領域からなる欠失変異体 (GFP-TIS11 (76-320)) が、全長 (GFP-TIS11 (1-320)) の場合と同様に、酸化ストレス条件下においてストレス顆粒移行活性を示さなかったことから、C 末端領域にストレス顆粒移行活性を抑制する機能ドメインが存在することが考えられた。さらに、C 末端領域に存在する 14-3-3 タンパク質の結合モチーフに変異 (S178A) を加えたところ、C 末端領域によるストレス顆粒移行活性阻害が阻止された。以上のことから、酸化ストレス条件下において 14-3-3 タンパク質が TIS11 分子の C 末端領域に結合することで、TIS11 のストレス顆粒移行活性が阻害されることが示唆された。今後、TIS11 のストレス顆粒移行活性に対する 14-3-3 タンパク質の影響につ

いて詳細な検討を行う予定である。

TIS11 は、分子内に存在する Zn²⁺フィンガー領域を介して、腫瘍壊死因子 α 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン-3 などの mRNA の 3' 非翻訳領域に存在する AU-rich エlement に結合することが知られている。したがって、ストレス顆粒内に未翻訳 mRNA が蓄積されていることを考慮すると、TIS11 は Zn²⁺フィンガー領域を介してストレス顆粒内の未翻訳 mRNA と結合することで、ストレス顆粒に局在することが示唆された。

TIS11 の Zn²⁺フィンガー構造は Cys-Cys-Cys-His 型であり、この Zn²⁺フィンガー構造を有する TIS11 ファミリー分子として TIS11b および TIS11d が知られている。また、いずれのファミリー分子も Zn²⁺フィンガー構造を介して mRNA に結合することが報告されている。そこで、各種ストレス条件下における TIS11b および TIS11d の細胞内局在を調べた (Fig. 3)。その結果、TIS11b 全長 (GFP-TIS11b) および TIS11d 全長 (GFP-TIS11d) も熱ストレスやエネルギー枯渇ストレスではストレス顆粒に局在し、酸化ストレスではストレス顆粒に局在しなかった。したがって、これらの知見は、TIS11b および TIS11d も TIS11 と同様にストレス特異的にストレス顆粒へ移行することを示している。以上の結果から、TIS11b および TIS11d もストレス顆粒内に存在する未翻訳の標的 mRNA に結合し、ストレス条件下における標的 mRNA の安定性に関与していることが示唆された。今後、TIS11b および TIS11d のストレス顆粒移行活性を制御する分子メカニズムについても検討していく予定である。

さらに、我々は、p53 による神経細胞死と TIS11 との関連性についても検討した。本来、p53 はアポトーシス誘導と細胞周期停止に関わる転写因子であり、癌の研究領域では癌化の進展を抑制する分子として知られている。一方、神経疾患の研究領域では、近年、いくつかの神経変性疾患において、p53 が活性化されて、p53 誘導性アポトーシスを介して神経細胞死が起こることが報告されている。我々は、カテコールアミン合成の第一律速酵素であるチロシン水酸化酵素遺伝子のプロモーターを利用してカテコールアミン産生細胞に温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを作製し、副腎髄質細胞の不死化細胞株 tsAM5D 細胞の樹立に成功した。tsAM5D 細胞の細胞生物学的特性として、39°C 条件下ではグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) / 毛様体神経栄養因子 (CNTF) によって神経細胞様に分化するが、GDNF/CNTF が存在しない場合は急速にアポトーシスが起こることが挙げられる。最近、この細胞死のメカニズムを解析したと

ころ、39°CではT抗原が不活性化されること
 によって、T抗原に結合していたp53が遊離
 し、p53の転写活性化能が亢進することでア
 ポトーシスが起ることを見出した。そこで、
 tsAM5D細胞がp53誘導性のアポトーシスを評
 価するためのモデル細胞になることが判明
 したので、tsAM5D細胞を用いて、p53誘導性
 アポトーシスに対するTIS11の機能的役割に
 ついて検討した。その結果、p53誘導性アポ
 トーシスが起る際にTIS11が発現誘導され、
 TIA-1陽性のストレス顆粒に局在すること
 を見出した。TIS11はmRNA不安定化因子と
 して機能することが知られているので、p53に
 よるアポトーシスが起る際に、発現誘導さ
 れたTIS11は、ストレス顆粒内に存在する
 mRNAに結合し、mRNAの分解系を制御し
 ていることが示唆された。

細胞はストレスに対応するために、遺伝子
 発現を調節する必要があり、遺伝情報を担
 うmRNAの量を適切に調節する必要がある。
 つまり、mRNAの合成と分解のバランスがス
 トレス特異的に調節され、mRNAの存在量
 が規定されると考えられている。したがっ
 て、ストレス条件下では、ストレスに対応
 するために、遺伝情報を担うmRNAの安定
 性が厳密に制御されることになる。今後、
 ストレス顆粒内におけるTIS11のmRNA
 不安定化作用を詳細に調べることは、ス
 トレス条件下におけるmRNAの分解制御
 機構を解明するうえで意義のある研究課
 題になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
 は下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Murata T, Tsuboi M, Koide N, Hikita K, Kohno S, Kaneda N (2008) Neuronal differentiation elicited by glial cell line-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor in adrenal chromaffin cell line tsAM5D immortalized with temperature-sensitive SV40 T-antigen. *J. Neurosci. Res.* 86(8): 1694-1710. 査読有
- ② Murata T, Koide N, Tsuboi M, Kohno S, Hikita K, Kaneda N (2008) Autocrine TGF- β signaling is required for the GDNF/CNTF-induced neuronal differentiation of adrenal chromaffin tsAM5D cells expressing temperature-sensitive SV40 T-antigen. *Neurosci. Lett.* 438(1): 42-47. 査読有

- ③ Murata T, Itoigawa M, Ito C, Nakao K, Tsuboi M, Kaneda N, Furukawa H (2008) Induction of apoptosis in human leukaemia HL-60 cells by furanone-coumarins from *Murraya siamensis*. *J. Pharm. Pharmacol.* 60(3): 385-389. 査読有
- ④ 村田富保、金田典雄: mRNA不安定化因子TIS11のストレス顆粒への局在 名城大学総合研究所紀要, 13, 1-4 (2008) 査読無
- ⑤ Ito C, Murata T, Itoigawa M, Nakao K, Kaneda N, Furukawa H (2007) Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia HL-60 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 58(7): 975-980. 査読有
- ⑥ Murata T, Tsuboi M, Hikita K, Kaneda N (2006) Protective effects of neurotrophic factors on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of murine adrenal chromaffin cell line tsAM5D. *J. Biol. Chem.* 281(32):22503-22516. 査読有
- ⑦ Ito C, Itoigawa M, Nakao K, Murata T, Tsuboi M, Kaneda N, Furukawa H (2006) Induction of apoptosis by carbazole alkaloids isolated from *Murraya koenigii*. *Phytomedicine* 13(5): 359-365. 査読有
- ⑧ Ito C, Murata T, Itoigawa M, Nakao K, Kumagai M, Kaneda N, Furukawa H (2006) Induction of apoptosis by isoflavonoids from the leaves of *Millettia taiwaniana* in human leukemia HL-60 cells. *Planta Med.* 72(5): 424-429. 査読有
- ⑨ 金田典雄、村田富保: p53によって発現誘導されるmRNA不安定化因子TIS11の細胞内局在 名城大学総合研究所紀要, 11, 105-110 (2006) 査読無

[学会発表] (計 5 件)

- ① 河野 晋、村田富保、渡久川敦子、田原

千愛、疋田清美、金田典雄：14-3-3タンパク質はTIS11bおよびTIS11dのストレス顆粒への移行を阻害する：日本薬学会第129年会 平成21年3月27日（京都）

- ② 河野 晋、村田富保、渡久川敦子、駒中隆文、佐田優太、田中沙耶、疋田清美、金田典雄：小胞体ストレス条件下におけるストレス顆粒の形成：第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会 平成20年12月11日（神戸）
- ③ 河野 晋、村田富保、疋田清美、金田典雄：小胞体ストレス条件下におけるeIF2 α のリン酸化を介したストレス顆粒の形成：日本薬学会第128年会 平成20年3月28日（横浜）
- ④ 田原千愛、村田富保、疋田清美、金田典雄：ストレス条件下におけるTIS11ファミリー分子の細胞内局在に関する研究 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 平成19年12月14日（横浜）
- ⑤ 田原千愛、村田富保、疋田清美、金田典雄：熱ストレス条件下におけるTIS11ファミリー分子の細胞内局在の解析：日本薬学会第127年会 平成19年3月30日（富山）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 富保 (MURATA TOMIYASU)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：80285189

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし