

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590232
 研究課題名（和文）mRNA サーパーバイランス機構が仲介する新規ストレス応答メカニズムの解明
 研究課題名（英文）NMD mediated new stress response mechanism

研究代表者
 高橋 滋（TAKAHASHI SIGERU）
 東京薬科大学・生命科学部・准教授
 研究者番号：10266900

研究成果の概要：ATF5 mRNA は通常状態では uORF からの翻訳による ATF5 翻訳領域内でのストップコドンの発生により NMD による分解を受けている。一方、ストレス環境下では本来の翻訳開始点からの翻訳が起る事による NMD システムからの回避が起り、mRNA の安定性が増加する。その結果、ATF5 の発現量が上昇し、標的遺伝子の発現が引き起こされ、ATF5 を介したストレス応答が形成されることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：遺伝子 栄養学 環境 ストレス 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

環境汚染物質の多くは生物にストレスを加える。生物にストレスを加えると、外界からのストレスに対して恒常性を維持する働きがあるストレスタンパク質の遺伝子の発現が誘導される。しかし、このような生体の環境ストレスへの応答、または応答の破綻の分子メカニズムには、いまだに多くの未知領域が存在する。申請者は、ラット胎児肺線維芽細胞において高濃度酸素暴露により mRNA の発現が誘導される転写因子として、ATF5 を同定した。

2. 研究の目的

「ATF5 mRNA は通常状態では uORF からの翻訳による ATF5 翻訳領域内でのストップコドンの発生により NMD による分解を受けている。一方、ストレス環境下では本来の翻訳開始点からの翻訳が起る事による NMD システムからの回避が起り、mRNA の安定性が増加する。その結果、ATF5 の発現量が上昇し、標的遺伝子の発現が引き起こされ、ATF5 を介したストレス応答が形成される。」という仮説を証明する。

3. 研究の方法

(1) NMD 経路において中心的な役割を果たす制御因子としては、Upf1, Upf2, Upf3が知られており、これら因子の変異はナンセンス変異を有するmRNA を特異的に安定化する事が知られている。Upf1, Upf2, Upf3 の変異体を持ちて ATF5 mRNA の安定性にNMD が関与している事を調べる。

(2)細胞をストレス刺激した場合にATF5mRNA の分解が抑制されるかどうかを調べる。

(3) SiRNA を用いて、動物培養細胞のATF5 タンパク質のノックダウンを行う。そして、DNA チップを用いて、ストレス下で、野生型の細胞との間で発現量の変動が見られる遺伝子を同定することによってATF5 により転写制御を受ける遺伝子の探索を行う。

(4) クロマチンの構造変化という視点からストレス応答におけるATF5 による発現調節のメカニズムに迫る。

4. 研究成果

NMD 経路において中心的な役割を果たす制御因子であるUpf1, Upf2 のSiRNA を細胞へ導入したところATF5 mRNA の発現量が増加した。また、Luciferase (LUC) レポータープラスミドのLUC cDNA の開始コドンより上流部分をATF5 の5' UTR と交換したプラスミドのLUC 構造遺伝子内の5' UTR 内のuORF からの翻訳由来の終止コドンよりも55塩基以上下流に外来遺伝子のスプライシングのドナー、アクセプター配列を含むイントロン配列を挿入したプラスミドを動物細胞へ導入したところ、イントロンの挿入によりmRNA の分解が促進されるが、この分解促進は、Upf1, 2 のノックダウンやATF5 の翻訳開始を5' UTR 上のuATG からそれより下流の本来のATG ヘシフトさせ

る事がわかっているヒ素暴露により阻害された。この様な阻害は、コントロールであるPTC を持つbeta-globin 遺伝子では見られなかった。これらの結果からATF5 mRNAの発現にNMD 経路が関与している可能性が示唆された。

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5件) 全て査読あり

1. Shimizu, Y, I, Sunaga, E., Aoyagi, S., Kanazawa, K., Äul Takahashi, S. ÄulnoneÄstrike0, Takahashi, Y., and Nemoto, T., NMR metabolic profiling on highly-diluted neonatal mouse urine J. Toxicol. Sci. b0(2009) (In Press) * : corresponding author

2. Shimizu, Y, I., Morita, M., Ohmi, A., Aoyagi, S., Ebihara, H., Tonaki, D., Horino, Y., Iijima, M., Hirose, H., Äul Takahashi, S. ÄulnoneÄstrike0 and Takahashi, Y., Fasting induced up-regulation of activating transcription factor 5 in mouse liver Life Sci b0. (2009) (In Press)

3. Uekusa H., Namimatsu M., Hiwatashi Y., Akimoto T., Nishida T., Äul Takahashi S ÄulnoneÄstrike0 .* b0, Takahashi Y. Cadmium interferes with the degradation of ATF5 via a post-ubiquitination step of the proteasome degradation pathway Biochemical and Biophysical Research Communications. b0380(3), 673-678, (2009)

4. Watatani, Y., Ichikawa, K., Nakanishi, N., Fujimoto, M., Takeda, H., Kimura, N., Hirose, H., Äul Takahashi,

S. AulnoneÄstrike0 *, Takahashi, Y.,
Stress-induced translation of ATF5 mRNA is
regulated by the 5' -untranslated region
J. Biol. Chem. b0, 283, 2543-2553 (2008)

5. Watatani, Y., Kimura, N., Tonaki, D.,
Hirose, H., Äul Takahashi,
S. AulnoneÄstrike0 *, Takahashi, Y., Amino
acid limitation induces expression of ATF5
mRNA at post-transcriptional levels,
Life Sciences b0, 80, 879-885. (2007)

[学会発表] (計7件)

1. Aoyagi, S., Morita, M., Nakamura, A.,
Shimizu, Y.I. Hirose, H., Takahashi, S.,
Takahashi, Y. Expression of activating
transcription factor 5 (ATF5) in cryptic
region of mouse intestinal epithelium.,
FASEB Meeting b0: Gastrointestinal Tract
XII: The Molecular & Integrative Basis for
GI Development, Homeostasis & Disease.
2007/8/11 Colorado, USA

2. Takeda, H., Kimura, N., Watatani, Y.,
Utsugi, K., Ichikawa, K., Uekusa, H.,
Nakanishi, N., Hirose, H., Takahashi, S.,
Takahashi, Y., Upstream open reading frame
modulates the NMD-mediated
destabilization of ATF5 mRNA in response to
cellular stress, Cold Spring Harbor
Laboratory the 2007 meeting on Eukaryotic
mRNA Processing. b0 2007/8/24 New York,
USA

3. 清水悠介、青柳俊、森田桃子、中村明日香、
広瀬秀徳、高橋滋、高橋勇二、絶食ストレス
によるATF5 とその近位逆行遺伝子の誘導的
発現、第30回日本分子生物学会年会、第80回
日本生化学大会合同大会 2007/12/14、横浜

4. 竹田仁、木村なつみ、宇津木克紀、綿谷裕
二郎、市川研史、広瀬秀徳、高橋滋、高橋勇
二、転写因子ATF5mRNA の5' UTR は、ストレス
に応答して、NMD によるmRNA の不安定化機構
を調節する、第30回日本分子生物学会年会、
第80回日本生化学大会合同大会
2007/12/13、横浜

5. 山崎高志、大味麻子、加藤研司、車谷春香、
山本宙享、高橋滋、高橋勇二、ストレス応答
性転写因子ATF5 によるAARE 配列を介した
CHOP 遺伝子の転写活性化、第31回日本分子
生物学会年会、第81回日本生化学大会合同大
会 2008/12/11、神戸

6. Shigeru Takahashi, Hitoshi Takeda,
Mariko Umemura, Natsumi Kimura, Katsunori
Utsuki, Yujiro Watatani, Noriko Nakanishi,
Kenji Ichikawa, Ryuichi Okuyama, Yuji
Takahashi, 5' -untranslated region
modulates the stability of ATF5 mRNA in
response to oxidative stress、第31回日
本分子生物学会年会、第81回日本生化学大会
合同大会 2008/12/12、神戸シンポジウム、「ス
トレス応答と転写因子」

7. 清水悠介、須永絵里、青柳俊、中村明日香、
広瀬秀徳、高橋滋、根本直、高橋勇二、新生
仔マウス尿を対象とした微量試料へのNMR-メ
タボリック・プロファイリング法の応用の試
み、第62回日本栄養・食糧学会大会 2008/5/2、
埼玉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 滋 (TAKAHASHI SHIGERU)
東京薬科大学・生命科学部・准教授
研究者番号：10266900

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：