

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16358

研究課題名（和文）リポキシトーシスの実行を制御するユビキチンリガーゼの同定とその機能解析

研究課題名（英文）Identification of ubiquitin ligase that controls the execution of lipoxytosis

研究代表者

松岡 正城（Matsuoka, Masaki）

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80749151

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Rbx1と細胞死のリポキシトーシス誘導時に特異的に相互作用しているタンパク質は見出されなかったために、安定同位体標識したアミノ酸を用いた質量分析器による比較定量解析を行い、細胞死の進行時にRbx1と相互作用が増強または減弱したタンパク質を同定しました。その結果、リポキシトーシス誘導時に相互作用が増強したタンパク質を約30種類程度見出した。その中で、検出確度が高く細胞死経路において相互作用の増強が大きいタンパク質を13個選び、コードしている遺伝子の発現抑制細胞を作成し、リポキシトーシスが抑制されるのかを評価した。13遺伝子のうち、2遺伝子のノックダウンで細胞死が抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、抗がん剤誘導による細胞死が、鉄依存的な過酸化脂質の生成によって引き起こされるフェロトーシスと名付けられた細胞死経路に注目が集まっている。申請者が、解析しているリポキシトーシスは、フェロトーシスの重要な制御因子であるGPx4を遺伝子的欠損させた時に起きるが、鉄非依存的に過酸化脂質の生成が起き、フェロトーシスとは異なる細胞死であることが示唆されている。本研究課題において解析した結果は、現在、大部分が明らかになっていない過酸化脂質の生成が起因となる細胞死経路であるリポキシトーシスの制御メカニズムの解明につながる重要な研究結果であり、臨床応用の上でも非常に重要な一歩になると思われる。

研究成果の概要（英文）：Because we did not find any proteins that specifically interacted with Rbx1 during lipoxytosis induction of cell death, we performed a comparative quantitative analysis using mass spectrometry with stable isotope-labeled amino acids to identify proteins whose interaction with Rbx1 was enhanced or attenuated during cell death progression. As a result, we found about 30 proteins whose interaction was enhanced during lipoxytosis induction. Among them, we selected 13 proteins with high detection accuracy and large interaction enhancement in the cell death pathway, created cells suppressing expression of the encoding genes, and evaluated whether lipoxytosis is suppressed.

研究分野：細胞生物学

キーワード：過酸化脂質 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

GPx4 は、生体膜に生じたリン脂質ヒドロペルオキシドを還元する生体内の主要な抗酸化酵素である。GPx4 は、様々な組織・細胞において生存や機能維持に必須であり、GPx4 が欠損すると細胞死が起こり、個体としても致死に至ることを明らかにしている。

これまで当研究室では、GPx4 を欠損した時に起こる細胞死が、どのような細胞死なのかを明らかにするために、詳細な解析が行えるタモキシフェン(Tam)誘導型 GPx4 欠損 MEF 細胞を樹立し、GPx4 欠損によって起こる細胞死の解析を行い、以下の項目を報告している。

Tam を添加して GPx4 を欠損すると、Tam 添加後 24 時間をピークに PC-00H が生成した後、Tam 添加後 48 時間までに Mek-Erk 経路が活性化するが、細胞死は Tam 添加後 72 時間までに誘導されること この細胞死は Vitamin E を添加すると完全に抑制されること アポトーシスやネクローシスなど、典型的な既知の細胞死経路とは異なる細胞死経路を辿ることなどを報告している。以上のことから、GPx4 欠損による脂質酸化依存的細胞死経路が、新たな細胞死経路で致死に至っていると考え、この細胞死経路をリポキトーシスと名付け、現在リポキトーシスの実行メカニズムを詳細に解析している。最初に、細胞死の実行因子を同定するため、網羅的な shRNA ライブラリーによるスクリーニングを行い細胞死実行因子として 6 遺伝子見出し、その 6 遺伝子を Lipo-1~6 として名付けた。

Lipo-1~6 の 6 遺伝子のうち Lipo-4(Rbx1)、Lipo-5(Ube2d1)はユビキチンリガーゼであった。このことから、リポキトーシスの制御にユビキチン化が重要な役割を担っていることが考えられた。これまでの解析により、Rbx1、Ube2d1 はリポキトーシス経路においてリン脂質ヒドロペルオキシド生成の下流かつ Erk のリン酸化の上流において機能することから、リポキトーシスにおいてシグナル伝達の制御していることが明らかとなっている。Rbx1 は、1000 種類以上のタンパク質と相互作用しており、ユビキチンリガーゼ複合体を構成するタンパク質の組み合わせによって、タンパク質の分解、細胞周期や酸化ストレス、DNA 修復の制御など、多様な機能を示すことが報告されている。しかし、リポキトーシスにおいて Rbx1 が、どのような複合体を形成し、何を基質としているかは、全く明らかになっていません。

2. 研究の目的

リポキトーシス誘導時に形成する Rbx1 を含む複合体とその基質タンパク質を明らかにする目的で、リポキトーシス誘導時の Rbx1 と相互作用するたんぱく質をショットガンプロテオミクスによる網羅的な解析を行い、同定した。

3. 研究の方法

N 末端に Flag タグを融合した Rbx1 を安定発現した Flag-Rbx1 発現 MEF 細胞を樹立し、Anti - Flag 抗体による免疫沈降を行い、Rbx1 と相互作用するたんぱく質を微量なタンパク質も高感度に検出できる四重極-フォーリエ変換ハイブリット型質量分析計を用いてショットガンプロテオミクスを行った。この時、まず初めに、Non-label 状況下におけるリポキトーシス誘導時と非誘導時(通常時)を比較し顕著に相互作用が変化したタンパク質を解析した。その後、相対定量解析を得意とする SILAC による ¹³C, ¹⁵N 標識を行い、リポキトーシス誘導時と通常時で Rbx1 との相互作用が変化するたんぱく質を詳細に解析した。

SILAC 法では、¹²C6, ¹⁴N2 Lysine, ¹²C6, ¹⁴N4 Arginine を含む Light 培地、¹³C6, ¹⁵N2 Lysine(+8), ¹³C6, ¹⁵N4 Arginine(+10) を含む Heavy 培地を用いて実験を行った。まず、リポキトーシス誘導時と通常時における FLAG-RBX1 相互作用タンパク質の相対定量解析を行った。安定同位体標識による影響を除外するため、通常状態の細胞とリポキトーシス誘導時の細胞はそれぞれ Heavy、Light 培地で培養した。本研究では、Light(Tam-)と Heavy(Tam+)の組み合わせを Aset、逆の組み合わせを Bset と表記した。A,B の両方の解析結果をもとに相対定量解析結果の評価を行った。

4. 研究成果

Silac-total では、Light サンプル、Heavy サンプルの両方で検出、比較でき、相対定量解析できたタンパク質は A セット 943 個、B セット 888 個となった。

SILAC 法を用いてのショットガンプロテオミクス解析の結果、リポキトーシス誘導時において RBX1 との相互作用が増強したタンパク質として 102 個同定した。そのうち、たんぱく質としての検出確度が高いタンパク質を 13 個選定し、それぞれのタンパク質をコードしている遺伝子の KD 細胞を作成した。この 13 遺伝子の発現抑制細胞の中で、2 遺伝子の発現抑制細胞において、リポキトーシス抑制効果を確認できた。以上のことから、これらの 2 遺伝子はリポキトーシス実行因子であることが示唆された。

本研究において、Rbx1 がリポキトーシス経路の誘導時に相互作用が増強し、Rbx1 と共に細胞死の実行を制御している遺伝子を見出してくることが出来た。本課題において、当初の予定とはずれたが、細胞死の実行因子を新たに2 遺伝子見出してくることに成功した。リポキトーシス誘導時に Rbx1 と相互作用するユビキチンリガーゼの全体像の解明は、基質タンパク質及び以降のシグナル伝達の経路を明らかにすることに繋がるため、今後のリポキトーシス研究の大きな進歩が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松岡 正城
2. 発表標題 リボキシトースス実行因子Lipo遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松岡 正城
2. 発表標題 リボキシトーススを制御するユビキチン複合体の同定へ向けた プロテオミクス解析系の確立
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 須藤 由季映、松岡 正城、小寺 義男、今井 浩孝
2. 発表標題 リボキシトースス実行因子Lipo-4の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松岡 正城
2. 発表標題 脂質酸化が起因となって起きる 新たな細胞死経路~リボキシトースス~
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第62回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡 正城
2. 発表標題 脂質酸化依存的b新規細胞死リポキシトース実行因子Lipo-1の機能解析
3. 学会等名 第63回 日本薬学会 関東支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡 正城
2. 発表標題 リコンビナントタンパク質を用いたリポキシトース実行因子Lipo-1の機能解析
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関