

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770141
 研究課題名（和文）JNKとp38キナーゼ活性の可視化と操作によるストレス応答の特異性決定機構の研究
 研究課題名（英文）Mechanisms and roles of spatio-temporal dynamics of SAPKs signaling in determining cell fates.
 研究代表者
 富田太一郎（TOMIDA TAICHIRO）
 東京大学・医科学研究所・助教
 研究者番号：70396886

研究成果の概要（和文）：細胞のストレス応答を担うストレス応答キナーゼ(以下 SAPK)活性化の動態を先鋭的な可視化手法で解明し、また、キナーゼ動態を人為的に操作することにより、ストレス依存的な細胞応答の特異性決定に「キナーゼ活性化を生じる場所やタイミング」という時空間的な情報がどのような役割を担うかを解明する目的で研究を行った。本研究では細胞への紫外線、タンパク合成阻剤等による SAPK 活性化の時・空間動態を解析することに成功した。その結果、刺激の種類によって SAPK 活性を生じる場所およびタイミングに相違点があり、それぞれ特徴的な時空間パターンが存在することが明らかになった。また、SAPK 活性をモニターしながら人為的に活性誘導する実験系を構築したところ、刺激の種類ごとに異なる細胞機能を発揮するメカニズムの一つがシグナルの時間動態に起因する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：(1)Subcellular distribution of stress-activated protein kinase activities were determined by imaging analysis using fluorescent protein-based kinase activity sensors. (2) I found SAPKs are activated either in the cytoplasm or near plasma membrane depending on the type of stresses applied. (3)By manipulating subcellular-localized SAPK activity using inducible protein dimerization system, I found that cell death was induced only when sustained SAPK activity was induced in cytoplasm, while induction of transient SAPK activity resulted in no obvious cell death and showed only slight change in plasma membrane dynamics (membrane blebbing and shape of cell edge). Our data suggest that SAPK mediated signal can determine cell fates depending on the spatial or temporal dynamics of SAPK activity inside cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ストレス応答、キナーゼ、イメージング

1. 研究開始当初の背景

ストレス応答の c-jun N末キナーゼと p38 キナーゼ(以下、まとめてストレス応答 MAP キナーゼ: SAPK)分子は多様な上流シ

グナルによる活性化を受け、細胞の生存や死、分化などを決定づける様々な細胞機能を誘導する。しかし、わずか2種類の分子がどのようなメカニズムで多様な細胞応答を制御

できるのかは生物学的にも医学的にも未解明の難問題である。

一般的には、細胞表面にある受容体が外的因子（リガンド）と結合することで情報処理が開始される。しかし、紫外線や放射線、熱、浸透圧などの一般に環境ストレスと呼ばれるものはその実体が物理化学的的刺激であり、このような非リガンド性の環境ストレスの刺激を細胞はどのようなメカニズムで情報伝達して適切な細胞応答を引き起こすのかを明らかにするために、先行研究において、ストレス応答の細胞内情報伝達を担う SAPK 経路に着目して解析を行っていた。

SAPK 経路は酵母からヒトを含む真核細胞に共通に保存されており、SAP3K→SAP2K→SAPK の 3 段階に順次リン酸化シグナルを伝え、最終的に SAPK は転写因子などをリン酸化（活性化）して、アポトーシスや細胞周期停止などに代表される様々な細胞応答を制御することが知られている。先行研究から上流の SAP3K レベルのイメージング解析によって、ストレス毎に活性化される SAPK 経路のシグナルには、質的に異なる複数のタイプが存在することを見いだした。特に、ストレスの種類の違いによって、シグナル発生の場所やタイミングという時間空間的な情報が異なっていることを発見していた(富田 MCB 2009)。

従って、ストレスの種類という情報は細胞内シグナルの活性化される場所やタイミングの情報として下流に伝達されて、その情報を基に細胞の生死などが決定されている可能性が示唆されたが、従来法の生化学や遺伝学的解析ではこれまで十分な時空間解像度のある解析は困難であったため、これを検証することはできていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内の SAPK 活性化の動態を先鋭的なイメージング手法で解明し、さらに SAPK 活性を任意に制御することで、ストレス依存的な細胞応答の特異性決定に「SAPK リン酸化シグナルを生じる場所やタイミング」という時空間的な情報がどのような役割を担うかを解明することが目的である。具体的には、

①細胞内局所の SAPK 活性をプレットの原理で可視化する実験系を構築し、この系で各種ストレス刺激を行ってその細胞内動態を解明する。

②人為的に SAPK のキナーゼ活性化を生じる場所とタイミングを操作する実験系を構築し、「SAPK 活性化を生じる場所と持続時間」と「細胞応答の種類」との対応を明らかにする。

先鋭的な光化学の手法を生物学に駆使する

ことにより、「哺乳類生細胞におけるストレス応答シグナルの特異性決定機構の解明」という難問題に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究計画では、細胞内局所の SAPK 活性測定系を構築し、各種ストレスによって細胞内のどこで SAPK が活性化されるのかをイメージング実験によって特定する。さらに細胞内の SAPK 活性化を生じる場所やタイミングを任意に操作可能にする実験系を構築し、これを用いて、SAPK 活性の生じる場所や時間経過が細胞機能に及ぼす影響を明らかにする。

(1). キナーゼ活性可視化実験系の構築

プローブの開発および最適化
培養細胞レベルで細胞内の局所のシグナルを解析するために十分な感度を有する SAPK 活性可視化のプローブを作製する。新規に作製した分子あるいは先行研究で作製した既存のタンパク質性のプレットプローブ候補分子からシグナルの感度の高いものを選別し、さらにこれらに変異を導入してより高感度のプローブを得る。

(2). 局所 SAPK シグナルの動態解明

細胞内の特定の部位にプローブを局在させて、ストレス依存的な各部位の SAPK 活性化にどのような違いがあるのかを明らかにする。

(3). SAPK 活性制御実験系の構築

細胞内の SAPK 活性を任意に誘導させる実験系を構築し、生細胞の SAPK を実時間に可視化しながらの活性誘導を試みる。

(4)細胞内局所の SAPK 活性誘導を生じさせ、これによる細胞機能への影響を解析する。細胞内 SAPK 活性を生じる場所が細胞機能にどのように影響するかを解明する。

4. 研究成果

上記 3. (1)に関して、細胞内 SAPK 可視化実験系の構築を行った。

(1) 先行研究にて作製した SAPK プローブ 2 種類に変異を導入し、より高効率にシグナルを得られる高感度なプローブを得た。細胞内各所への局在シグナルを付加させたプローブを作製し、実際にその部位のキナーゼ活性化を測定可能であることを確認した。

(2) 上記 3. (2)に関して、培養細胞の細胞膜、核、細胞質にプローブを発現する細胞を作成し、これにストレス刺激を行ったところ、タンパク合成阻害、紫外線、炎症性サイトカイ

ン刺激などは主に細胞質部分に強い SAPK 活性を生じることを見いだした。特に、長時間の SAPK 活性化を生じる刺激によって細胞死が顕著に生じた。一方で、TPA あるいは PDGF などによる刺激では細胞質だけでなく、細胞膜付近にも強いシグナルを生じることが明らかになった。TPA や PDGF 刺激の場合に、細胞膜の動きが激しい領域で特に強い SAPK 活性化が観察され、細胞膜動態との関連が示唆された。

(3) 上記 3. (3) に関して、FKBP-FRB-rapamycin 三者が複合体形成する protein-dimerization システムを用いて、rapamycin 依存的に p38 経路 SAPK 活性化を誘導する実験系を構築した。

実際にこの系を用いてキナーゼ活性をモニターしながら細胞膜あるいは細胞質、核などで複合体形成 (SAPK 活性化) を誘導すると、細胞膜近傍で活性を誘導した場合に若干の細胞膜動態への影響が認められた。一方で細胞質で活性誘導を行うと、特に長時間の SAPK 活性化による細胞死が生じたが、短時間の SAPK 活性化では細胞死に至らず、SAPK 活性の強さではなく、特に持続時間の違いによって細胞の生死が決まることが示唆された。

以上 4. (1)~(3) から、まず刺激の種類によって細胞内の SAPK 活性化を生じる部位やタイミング、持続時間は異なることが明らかになった。実際に局所の SAPK 活性を誘導実験によって細胞内に再現させたところ、細胞死誘導には SAPK 持続時間の影響が顕著であった。したがって、限られた数の分子であっても多様な細胞機能を担うメカニズムの一つはシグナルの時空間動態にあることが示唆された。

国内外での成果の位置づけ

研究成果の (1) については、世界中で新規の蛍光プローブが半ば競争的に開発されているが、実際に細胞内局在情報までを解析できる高感度のプローブの作成は難しく成功例はまだ多くない。本研究で効率よく高感度のプローブを作成する方法を見つけ、またさらに、実際に細胞内の SAPK 動態を可視化に成功した点は、当該分野の新たな研究の流れを作っている。本成果を基に実際に動物体内のシグナル可視化を行いたいという研究者からのプローブ譲渡希望や問い合わせが研究発表後に相次いでおり、国内外の研究者が生体イメージングを用いたシグナル解析に着手するきっかけの一つになっていると思われる。

今後の展望

生物学的には生きた細胞内のシグナル動

態の解明は非常に重要であるが、今後モデル動物など *invivo* において、細胞機能と細胞内シグナル動態との対応を解明することが次の大きな課題である。そのためには特に生きたままの動物から分子レベルの情報を取り出す技術が重要であり、より高感度なプローブの開発や測定系の開発が必要になると考えられる。

また、これまでも SAPK 経路は抗炎症、抗がん剤の最も主要なターゲットであり、現在開発中の薬も含めて多くの薬がこの経路を主要な標的としている。しかしながら、本研究で SAPK 活性の細胞内時空間動態の情報が細胞機能の特異性決定に重要であることが示唆され、特異性の高い作用薬、あるいは副作用の軽減という医学・薬学的な見知からも細胞内シグナルの時空間動態の理解とその細胞機能への影響について、今後早急に解明する必要があると思われる。

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 1 件)

Tomida, T., Oda, S., Takekawa, M., Iino, Y., and Saito, H. (2012). The Temporal Pattern of Stimulation Determines the Extent and Duration of MAPK Activation in a *Caenorhabditis elegans* Sensory Neuron. *Sci. Signal.* 5, ra76. 査読有
doi: 10.1126/scisignal.2002983.

〔学会発表〕 (計 3 件)

富田太一郎 「線虫の環境応答行動における情報伝達の可視化」 第 82 回日本動物学会シンポジウム、旭川、2011 年 9 月

富田太一郎、斎藤春雄 「*in vivo* MAPK リン酸化シグナルの可視化による線虫の感覚応答解析」日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜

富田太一郎、斎藤春雄 「MAP キナーゼ活性化の *in vivo* イメージングとシステムエンジニアリング的アプローチによる線虫感覚神経 MAPK 制御機構の解析」日本分子生物学会年会、2012 年 12 月、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 太一郎 (TOMIDA TAICHIRO)
東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70396886

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし