

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790196

研究課題名(和文)ハンチントン病関連蛋白質封入体は細胞分裂や細胞ストレス制御に関わる新規構造か？

研究課題名(英文)Analyses of HAP1/STB functions in regulation of cell-cycle progression and cellular stress responses

研究代表者

藤永 竜太郎 (FUJINAGA, Ryutaro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30335723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：HAP1は細胞質封入体stigmoid body (STB)のコア分子である。HAP1導入細胞を用いて細胞周期進行におけるHAP1の局在変化を観察した。間期ではHAP1は大型STBを形成していたが、分裂期に入るとSTBは消失し、一部のHAP1は紡錘体極に集積していた。細胞質分裂期から再びSTB様構造が観察された。次に、HAP1導入細胞を用いてストレス負荷がHAP1発現形態に及ぼす影響を観察した。熱ショック、小胞体ストレス、血清飢餓などでは顕著な影響は見られなかったが、プロテアソーム阻害剤処理によりHAP1はSTB形成から顆粒網状構造へと発現形態を変化させた。現在、さらに詳細を解析中である。

研究成果の概要(英文)：Huntingtin-associated protein 1 is a core molecule of the cytoplasmic inclusion, stigmoid body (STB). First, we examined cell-cycle dependent change in HAP1 distribution in HAP1-transfected HeLa cells. In interphase, HAP1 formed large-sized STBs. During mitosis, most of the HAP1/STB disappeared but a subset of HAP1 was concentrated at the spindle poles. When cells entered cytokinesis, HAP1 started to form small-sized STB-like inclusion. Next, we examined effect of stress exposures on HAP1/STB morphology in HAP1-transfected immortalized mouse hypothalamic cell line. HAP1 formed typical STBs in most of the stress conditions (e.g., heat shock, ER stress and serum-starvation). However, in proteasome inhibited condition, HAP1 induced cytoplasmic granulo-reticular clusters instead of STB formation. Now we are analyzing the mechanism of change in HAP1/STB morphology and its biological significance in proteasome-inhibitor-induced apoptosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：HAP1 stigmoid body ストレス 細胞分裂 ハンチントン病 アポトーシス プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

Stigmoid body (STB)は、直径1~3 μ mの周囲を膜に囲まれていない細胞質内封入体であり、生理条件下のラット脳神経細胞質において命名された構造である (Shinoda et al., 1992)。私達は、ハンチントン病関連蛋白質である huntingtin-associated protein 1 (HAP1)がSTBのコア分子であることを証明した (Fujinaga et al., 2007, 2009)。加えて、HAP1/STB がハンチントン病の病態保護因子として働くことや (HAP1 保護仮説)、同じポリグルタミン病に属する球脊髄性筋萎縮症や脊髄小脳変性症3型に対しても保護仮説が適用できる可能性を示してきた (Fujinaga et al., 2004; Takeshita et al., 2006, 2011)。HAP1 保護仮説は他のグループにも支持されている。このような状況で、HAP1/STB が神経変性疾患等の結果として観察される異常蛋白質の非生理的凝集体 (アグリソームのような)として誤って記載されることがあるが、HAP1/STB は正常動物組織に認められるアグリソームマーカー陰性の生理的構造である (Fujinaga et al., 2009)。HAP1/STB は神経細胞以外のいくつかの末梢臓器の細胞にも存在することが明らかになりつつあり、私達も一部確認している。つまり、この封入体は神経細胞だけでなく、より普遍的に存在する可能性を示唆している。細胞内の機能構造としての HAP1/STB を確立するためには、神経変性疾患との関連に注目してきた従来の研究だけではなく、新しいアプローチが必要であると考えられる。申請者は、本研究の着想に至るヒントとして次のような現象を見出している。(1) 大型の HAP1/STB は小型のユニット封入体融合で形成され、この過程には微小管が必須である (Fujinaga et al., 2009)。微小管は細胞分裂にも重要である。(2) HAP1/STB は細胞分裂期には基本的に消失するが、紡錘体極周囲に、一部 HAP1/STB に類似した集積が認められる。(3) HAP1/STB は、グルココルチコイド受容体の核内移行制御に関与している (Fujinaga et al., 2011)。グルココルチコイド受容体はストレス応答に重要である。プロテアソーム活性低下 (ある種のストレス状態、細胞内蛋白質分解系を介した恒常性維持の破綻) は HAP1/STB 形成に影響を与える可能性がある。現在までに、海外のグループが HAP1 がカルシウム調節や細胞内物質輸送に関与することを報告しているが、HAP1 が STB を形成する形態学的事実とは結びつけられていない。国内外の研究で STB が偶然記載されることはあるものの、この構造に注目している研究はない。

2. 研究の目的

未だ機能が明らかにされていないハンチントン病関連蛋白質封入体 “stigmoid body (STB)” とそのコア蛋白質である huntingtin-associated protein 1(HAP1)の

細胞分裂や細胞ストレスに伴う細胞内動態変化を解析し、この構造が細胞分裂制御や細胞死を含む細胞ストレス応答に関係する新規構造であることを明らかにする。STB の存在はまだあまり注目されていないが、通常条件下の動物組織において形態学的にはっきりと、しかも頻繁に認められる構造であり、重要な細胞質内構造であることは間違いないと考えられる。

3. 研究の方法

(1) GFP-HAP1 安定発現 HeLa 細胞株を用いて、細胞分裂各ステージ (前期~細胞質分裂期)における HAP1 の細胞内局在を免疫蛍光染色により解析した。ステージの同定には微小管染色、ヘキストによる核染色を組み合わせ、分裂前期から細胞質分裂期を同定した。(2) GFP-HAP1 が STB を形成する様子や細胞分裂に伴う変化をリアルタイムに解析した。細胞を 35 mm ディッシュに培養後、顕微鏡ステージ上で培養システム (ニコンセルセイバー) にセットし、冷却 CCD カメラ搭載の蛍光顕微鏡下でタイムラプス画像取得し、メタモルフソフトウェアにより解析した。(3) 動画解析により形態学的に GFP-HAP1 安定発現株、GFP 安定発現株、コントロール細胞の分裂期の長さには差があるかどうかを観察した。BioStation IM (Nikon)を用いて撮影、解析を行った。(4) HAP1 を発現させた細胞を用いて以下の処理による HAP1 発現形態の変化を観察した (プロテアソーム阻害、小胞体ストレス、熱ショックストレス、低酸素ストレス、血清飢餓、酸化ストレス)。ストレス負荷実験では、マウス由来視床下部不死亡細胞株を用いた (Cellusions 社)。(5) ストレス誘導性のアポトーシスに対する HAP1/STB の影響 (特に抑制効果) を調べた。評価はウエスタンブロットで行った。

4. 研究成果

(1) GFP-HAP1 安定発現 HeLa 細胞株の GFP-HAP1 の細胞内局在変化: 間期では GFP-HAP1 は細胞質内において小型もしくは大型の STB を形成していた。分裂中期では、間期に観察された球形の STB 構造が消失し、HAP1 が細胞質内に分散する様子が観察される一方で紡錘体極に集積を形成する2つの特徴を有していた。この特徴は後期、終期まで維持されていた。細胞質分裂期には、紡錘体極周囲で STB 様の構造が観察され、間期に向けて STB の再形成が始まっていることが伺えた。つまり、HAP1 は間期において典型的な STB を形成するが、分裂期に入ると STB 構造を失い、細胞質への散在傾向と紡錘体極への集積傾向を見せることが明らかになった。

(2) GFP-HAP1 安定発現 HeLa 細胞株を用いた動画解析: 上記の染色像を連続的に詳細観

察するためにタイムラプス解析を行った。間期では、GFP-HAP1 は多数の小型 STB ユニートを形成し、時間経過と共にそれらが互いに融合して大型の STB を形成した。分裂直前には HAP1 がスポット状に観察され、やがて中期、終期、後期にわたってこのスポットは2つに別れ紡錘体極に局在しさらに HAP1 の集積が強くなる様子が観察された。一方で、分裂期では間期と比べて細胞質内での diffuse な HAP1 の発現も強くなる傾向にあった。細胞質分裂期では、紡錘体極付近と mid body 側の細胞質で新たな STB 様構造の再形成が観察された。分裂後に典型的な STB 形成像が娘細胞に観察された。私達は過去に、Cos7 細胞に一過性に GFP-HAP1 を発現させ、間期における STB 形成の動画解析を報告している。今回は、GFP-HAP1 安定発現 HeLa 細胞株を用いて細胞周期全体における HAP1/STB の発現形態変化を初めて明らかにすることが出来た。

(3) GFP-HAP1 の過剰発現が細胞分裂に与える影響。まず、GFP-HAP1 安定発現 HeLa 細胞とコントロール細胞をダブルチミジンブロックまたは CDK-1 阻害剤により同調培養を行い、15分ごとに細胞をパラフォルムアルデヒドで固定し観察した。この実験では、明らかな違いを見ることは困難であった。次に分裂期特異的に細胞を染色するリン酸化ヒストン H3 抗体の染色を行いセルカウントを行った。HAP1 の発現が分裂期の長さに影響を与えていれば全体における分裂期の細胞の割合が変化することを期待したが、はっきりとした結果を得ることは出来なかった。そこで、GFP-HAP1 安定発現 HeLa 細胞、GFP 安定発現 HeLa 細胞、コントロール細胞の動画撮影データを元に解析を行った。少なくともそれぞれのサンプルにつき 30 細胞以上の観察を行った。視覚的に細胞が丸くなってから2つの娘細胞の間に亀裂が入るまでを分裂期の長さとした。分裂期の平均時間は、GFP-HAP1 安定発現 HeLa 細胞 (78 分)、GFP 安定発現 HeLa 細胞 (79 分)、コントロール細胞 (56 分) であった。外来遺伝子を導入すると時間が延長される傾向にあったが、GFP-HAP1 安定発現 HeLa 細胞と GFP 安定発現 HeLa 細胞の間に差は認められなかった。長時間のタイムラプス解析を行い、少なくともそれぞれのサンプルで 100 細胞以上の間期の長さについても計測した。しかしながら、分裂期同様に外来遺伝子導入によりやや時間が延長される傾向にあったが GFP-HAP1 安定発現 HeLa 細胞と GFP 安定発現 HeLa 細胞の間に顕著な差は認められなかった。以上より、今回の実験条件では、HAP1 の発現が細胞周期進行に影響を与えているかどうか明確なデータを得る事が出来なかったが、以下のような問題も残った。安定発現株を使用しているが、細胞ごとに HAP1 の発現強度のばらつきがありデータ解釈に影響を与えている可能性がある。また、安定発現株スクリーニングの際に細胞周期が安定している細胞を選択している可能性も否

定できない。最終的な結論を導くには実験方法も含めて更に検討が必要である。

(4) 細胞ストレスが HAP1 の発現形態に及ぼす影響：まず、今回使用したマウス由来視床下部不死化細胞株における内因性 HAP1 の発現を確認した。ウエスタンブロットで内因性 HAP1 の発現は非常に弱く、また免疫染色においても HAP1 による STB 形成があまり顕著ではなかったため今回は GFP-HAP1 をトランスフェクションすることにより STB 形成を誘導してストレス負荷実験を行った。

熱ショック:42 で1時間熱処理を行い、その後、37 でインキュベーションを行った。熱ショック直後及びその後のインキュベーションにおいて、大型の HAP1/STB が形成されていた。また、ウエスタンブロットで Hsp70 の発現を確認したところ、GFP 発現細胞(コントロール)と GFP-HAP1 発現細胞のどちらにおいても同程度の誘導が観察された。つまり、熱ショックストレスは HAP1/STB の形態にほとんど影響を与えず、また HAP1 の過剰発現は Hsp70 を指標とした熱ショック応答にも影響を与えないことが分かった。

小胞体ストレス：ツニカマイシン及びタプシナルジン処理を行った。どちらの処理においても GFP-HAP1 は大型の STB 形成を維持していた。また、ウエスタンブロットで CHOP の発現を確認したところ、GFP 発現細胞(コントロール)と GFP-HAP1 発現細胞のどちらにおいても同程度の誘導が観察された。つまり、小胞体ストレスは HAP1/STB の形態にほとんど影響を与えず、また HAP1 の過剰発現は CHOP を指標とした小胞体ストレス応答にも顕著な影響を与えないことが分かった。

血清飢餓、低酸素ストレス：血清を除いた培養においても HAP1/STB の形成に変化は見られなかった。デフェロキサミンを用いた疑似低酸素状態においても HAP1/STB の形成に変化は見られなかった。ただし、今回用いた視床下部不死化細胞では、低酸素で蓄積することが知られる HIF1 の変動が確認されなかったため低酸素実験においては検討が必要であると考えられた。

酸化ストレス：亜ヒ酸ナトリウム処理による酸化ストレス実験を行った。薬剤処理後にヘムオキシゲナーゼ1の誘導を確認した。低濃度の亜ヒ酸ナトリウム処理を行うと、GFP-HAP1 は大型の STB 形成から多数の顆粒状集積を形成する傾向にあった。現在、更に解析中である。

プロテアソーム阻害：MG132 及びラクタシスチンを用いた。今回のストレス負荷実験の中では最も顕著な変化が観察された。つまり、阻害剤存在下では、HAP1 は顆粒網状構造の発現パターンとして観察された。タイムラプス解析を行うと、既に形成された HAP1/STB が顆粒網状構造に変化するというよりは、新たに合成された HAP1 が顆粒網状構造として細胞質内に広がる様子が観察された。HAP1 と微小管の二重染色を行うと、通常は HAP1/STB

の小型ユニットが微小管上に観察されたが、MG132 処理を行うと、細胞質内の広い領域で HAP1 が一部微小管と関連しながらアセンブルしている様子が観察された。この結果から HAP1 分子と微小管の関係が MG132 処理により変化している可能性を示唆された。現在、HAP1 と微小管モーター分子(キネシン、ダイニン)との関係を免疫染色と免疫沈降により解析中である。MG132 が微小管そのものに影響を与えている可能性も考え、チュープリンの代表的な翻訳後修飾であるアセチル化について検討した。ウエスタンブロットの結果、MG132 処理により -チュープリンのアセチル化が亢進していることが明らかになった。

-チュープリンのアセチル化と HAP1 の発現形態変化が関連しているかどうか調べるために、HDAC 阻害剤処理を行った。阻害剤処理に伴いアセチル化 -チュープリンの蓄積が誘導され、HAP1 の発現形態も STB 形成から顆粒網状構造に似た構造に変化した。つまり、MG132 処理が HAP1 の発現形態を変化させるメカニズムの一部はアセチル化 -チュープリンの蓄積が関与していることが示唆された。

(5) MG132 誘導性のアポトーシスに対する HAP1/STB の影響:まず、MG132 が視床下部不活化細胞のアポトーシスを誘導するかウエスタンブロットにより検討した。cleaved caspase3 と cleaved PARP の増加を指標とした。MG132 の処理濃度、処理時間依存的にこれらのマーカー蛋白質の増加が観察されアポトーシスを誘導することが明らかになった。現在、HAP1 の過剰発現が MG132 誘導性アポトーシスに与える影響について検討中である。

本研究において、細胞周期進行過程で HAP1 の発現パターンがダイナミックに制御されていることが明らかになった。一方で、HAP1 の細胞周期制御に関する役割については明らかにすることができなかった。今後、結論を得るためには実験アプローチを工夫する必要があると考えられた。ストレス制御に関しては、少なくともプロテアソーム阻害剤処理により HAP1 発現形態は STB から顆粒網状構造に変化することが明らかになった。プロテアソーム活性の低下は老化過程や神経疾患などで指摘されている。今後、プロテアソーム活性低下が引き起こす HAP1 発現形態変化メカニズムの解明や細胞死(アポトーシス)に対するその意義を解明することにより、HAP1 分子及び HAP1 が形成する特徴的な細胞内構造の生理的意義や疾患生物学的意義が理解されることが期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 9 件)

1) 藤永 竜太郎, 山下 由美子, 菊池 悠次郎, 柳井 章江, 國分 啓司, 篠田 晃
細胞ストレス負荷による神経細胞質封入体 stigmoid body の形態変化~プロテアソーム活性の重要性~
第 119 回 日本解剖学会総会・全国学術集会
2014, 3/27-29 下野市(自治医科大学)

2) Md Nabiul Islam, Yukio Takeshita, Ryutarō Fujinaga, Akie Yanai, Keiji Kokubu, Ren Yonetani, Mir Rubayet Jahan, Greggoly John Wroblewski, Koh Shinoda
Neuroanatomical distribution of the STB/HAP1-immunoreactive cells in the spinal cord of the adult rat
第 119 回 日本解剖学会総会・全国学術集会
2014, 3/27-29 下野市(自治医科大学)

3) M. N. Islam, R. Fujinaga, A. Yanai, K. Kokubu, R. Yonetani, C. Yamada, H. Yoshidome, Y. Kikuchi, M. R. Jahan, K. Shinoda
Distribution of the huntingtin-associated protein 1 (HAP1) in the spinal cord of the adult rat.
Neuroscience 2013 2013, 11/9-13 San Diego, USA

4) MD Islam, Ryutarō Fujinaga, Mir R. Jahan, Akie Yanai, Keiji Kokubu, Naoto Hayasaka, Ren Yonetani, Koh Shinoda
Immunohistochemical distribution of the Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) in the spinal cord of adult rat
Neuro2013 2013, 6/20-23 京都市(国立京都国際会館)

5) 藤永 竜太郎, 山下 由美子, 菊池 悠次郎, 今井 智子, 柳井 章江, 國分 啓司, 篠田 晃
神経細胞質封入体 stigmoid body の形態制御に対するプロテアソーム阻害剤の影響
第 118 回 日本解剖学会総会・全国学術集会
2013, 3/28-30 高松市(サンポート高松)

6) 藤永 竜太郎
神経細胞特異的封入体の神経変性疾患における役割
山口大学研究推進体「ストレス」成果報告シンポジウム 2013, 2/8 宇部市(山口大学)

7) Md. Nabiul Islam, Ryutarō Fujinaga, Akie Yanai, Mir Rubayet Jahan, Keiji Kokubu, Yumiko Yamashita, Tatsuya Watanabe and Koh Shinoda
Sporadically lurking Huntingtin-associated protein 1 immunoreactive (SLH) cells in the hippocampus and its morphological

relationships with the progenitor cell markers, GABA, and steroid receptors. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Homones & Cancer 2012, 11/15-17 Kanazawa (Ishikawa Ongakudo)

8) M. N. Islam, R. Fujinaga, A. Yanai, M. R. Jahan, Y. Takeshita, K. Kokubu, Y. Yamashita, C. Ishikawa, K. Shinoda
Immunohistochemical characterization of the “sporadically lurking HAP1-immunoreactive (SLH) cells” in the hippocampus, with special reference to the expression of steroid receptors, g-aminobutyric acid, basket cell and progenitor cell markers.
Neuroscience 2012 2012, 10/13-17 New Orleans, USA

9) 藤永竜太郎
ハンチントン病関連蛋白質 (HAP1) が形成する神経細胞質封入体 “stigmoid body” の細胞内ダイナミクス
第5回 研究推進体「ストレス」フォーラム
2012, 5/1 宇部市 (山口大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
藤永 竜太郎 (FUJINAGA, Ryutaro)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30335723

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし