

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440043

研究課題名(和文) MAPキナーゼ活性化動態の可視化と操作によるストレス応答特異性決定機構の解明

研究課題名(英文) Visualization and manipulation of stress-activated MAPK signaling for understanding of stress-dependent cell fate determination system.

研究代表者

富田 太郎 (TOMIDA, Taichiro)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：70396886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はストレス応答シグナルの細胞内活性化動態およびその生理的役割を明らかにする目的で行った。その結果、細胞内p38キナーゼ活性の炎症性サイトカイン刺激が細胞質のp38活性化の振動現象(オシレーション)を誘導すること、p38オシレーションの周期によって下流の炎症遺伝子の発現効率が制御されることを見出した。さらにp38活性化をシグナル経路を介さずに可視化と同時に活性誘導できる実験系を構築した。本研究により明らかになったp38分子の新しい活性化動態およびその制御機構の解明は炎症シグナルの解明および関連するがんや神経疾患を制御する新しい方法の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Quantitative analysis of stress-activated MAPK signaling in cultured cells were done using FRET based sensors. I found that inflammatory cytokines induces oscillatory p38 activation in cytoplasm, and demonstrated that such p38 activation occurs heterogeneously in cells. Gene expression analysis further revealed that oscillatory p38 activities efficiently induces expression of pro-inflammatory cytokine gene expression than continuously elevated p38 activity does. When p38 activity was introduced in cells by inducible rapamycin-dependent dimerization of FRB domain and FKBP-p38 fusion protein, we found that there is some relationship between p38 activity and bleb-like plasma-membrane structure even in the absence of upstream signal activation. Such membrane structure was also seen when cells were stimulated by UV stresses or by applying pro-inflammatory cytokines. Thus, this study revealed unexpected p38 signal dynamics as well as its role in inflammatory signaling.

研究分野：分子生物学、生理学、薬理学

キーワード：イメージング MAPK ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

ストレス応答経路のキナーゼは限られた数の分子により細胞の生死や増殖・分化などの様々な細胞機能制御を担うことが知られる。しかし、外界の刺激に対してどのように適切な細胞応答を誘導するのかは明らかになっていない。近年、生きた細胞内に存在する分子の活性化状態をイメージングによって解析する技術が進められており、研究代表者も先行研究(H21-22,H23-24 若手研究 B および新学術-分子行動学)において、生きた細胞内で MAPK 経路の各キナーゼの活性を光学的に可視化する手法を考案し、これを用いてストレスの種類ごとの MAPK 動態の共通点および相違点を解析していた。その結果、(1) ストレス刺激ごとに経路上流の MAP3K 活性化を生じる場所やタイミングが大きく異なることを見いだした(富田 MCB 2009)。また、刺激の種類と強さの違いは、(2) MAPK の強さだけでなくその時間的な変動パターン(一過的あるいは、持続的、周期的に活性が増減する)としても現れることが分かってきた(富田 Science Signal. 2012)。

したがって「ストレスの種類」などの情報は、MAPK 経路活性化の時間経過や細胞内局在という形の情報として伝達されて特異的な細胞応答を誘導する可能性が示唆された。この仮説を検証するためには、ストレスによる細胞応答を実時間で定量しながら、同時に MAPK の活性化および不活性化を任意に操作することが出来れば非常に有効であると考えられた。

生きた細胞内で生じるストレスシグナルの詳細な細胞内動態はほとんど理解できておらず、従来の研究では多数の細胞をすりつぶした生化学的なデータを基に推測している場合が多い。通常は見えず、触れることのできない細胞内シグナルを、生きた細胞で直接的に観察・制御可能にして理解できる点と可視化によって飛躍的に時間空間分解能の高いシグナル動態が理解できる点で非常に有意義であると考えられた。

さらに、ストレス応答経路の異常は様々な個体レベルの病気(がん、慢性関節リウマチ、アルツハイマー病、糖尿病、心肥大、腎不全など)につながるものが近年明らかにされており、ストレス応答経路のシグナル伝達の特異性決定のメカニズムや生理的役割を解明することは医学的にも重要で、かつ、急務として取り組むべき課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、ストレス刺激を受けた細胞内で各種の細胞応答が誘導される過程において、JNK と p38MAPK の細胞内動態を単一細胞レベルでリアルタイムに可視化しながら、さらに、任意にキナーゼ活性を制御する実験系を構築することにより、ストレス依存的に活性化される MAPK リン酸化シグナルの時間

空間的な情報にどのような生理的な役割があるのかを解明する。多様な細胞外シグナルを細胞がどのように情報処理して生体の恒常性を維持するのかを理解することは、ストレス応答だけでなく、他のあらゆる細胞応答にも共通する重要な難問題である。本研究では生きた細胞の分子のレベルで「リアルタイムな可視化と操作」を実現させることにより、この普遍的な問いを解くための研究基盤を確立することを目的とした。

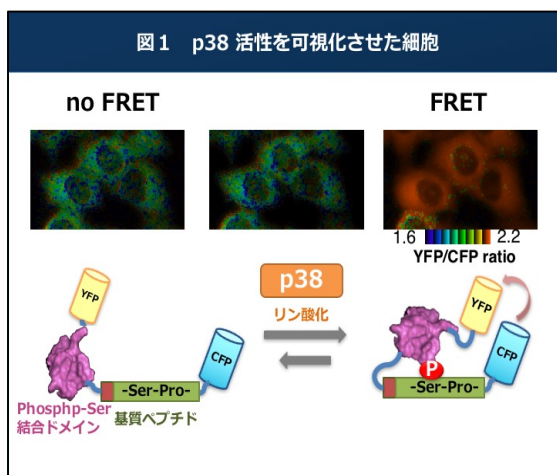
3. 研究の方法

(1) 哺乳類培養細胞系へのストレス応答 MAPK 活性可視化 FRET プロブの発現実験系の構築、(2) MAPK 下流の細胞応答の定量実験系の構築、(3) MAPK の定量的活性操作実験系の構築、(4) ストレス刺激を模した「MAPK 活性化の時間空間パターン」を人為的に細胞内に惹起し、誘導される「細胞応答」を定量評価する。

4. 研究成果

(1) 哺乳類培養細胞系へのストレス応答 MAPK 活性可視化 FRET プロブの発現実験系の構築

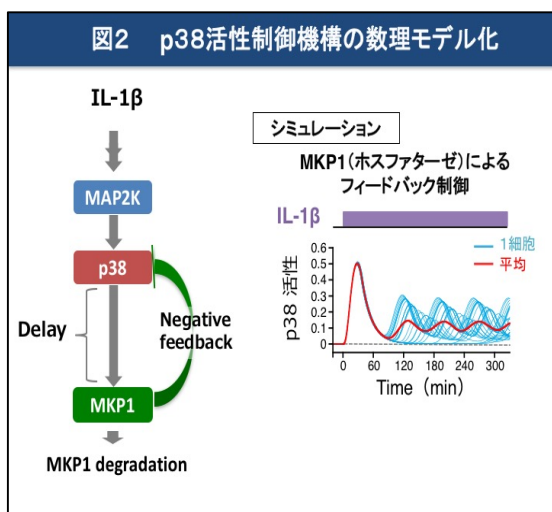
先行研究で作成したプロブを培養細胞株に安定的に発現させ、特に細胞質の p38 活性化依存的に FRET のシグナルが変化する細胞を得た。また、核、細胞膜への局在シグナルを付加したプロブについても、細胞に一過性にプロブを発現させ、また、それぞれ p38 特異的阻害剤存在下ではシグナルを生じないことを確認した。細胞内ストレス応答キナーゼである p38 活性を可視化する細胞実験系(図1)は世界初の成果であり後述の成果と合わせて論文公表を行った((2)に記載)。



(2) 炎症性サイトカイン刺激に対するストレス応答 MAPK 活性化動態の解明

上記(1)の細胞に各種ストレス刺激を行い、細胞内各所のストレス応答 p38 キナーゼ活性を可視化した。特に、炎症性サイトカインの IL-1 β 刺激によって、特に細胞質部位の p38

活性が少なくとも10時間以上にわたり周期的に活性変動することを見出した(p38 オシレーション)。そのメカニズムを解析したところ、MAPK 下流のホスファターゼの発現によるネガティブフィードバック機構の存在が明らかになった。この内因性ネガティブフィードバック機構をもとに、数理モデルを構築することによって、刺激に対する p38 応答を細胞間のばらつきまでも含めて予測できるようになった(図2)。さらに、周期的に繰り返し p38 活性化を生じる刺激パターンを予測し、実際に実験的に細胞で p38 活性を可視化して定量的に検証することに成功した。また、サイトカイン刺激により誘導される炎症性遺伝子の mRNA 発現量を測定したところ、p38 のオシレーションによって IL-6 などの炎症性サイトカイン遺伝子が効率的に発現誘導され、さらに、周期的な p38 活性化を生じさせた場合には、その頻度依存性に高効率に遺伝子発現を生じることがわかった。本研究により炎症に関わる細胞内シグナルについての新たな制御機構が明らかになったことから、その成果を論文として発表した(Tomida et al. Nature Communications 2015)。



(3) p38 の活性操作実験系の構築

p38 活性を可視化しながら、同時に、薬剤あるいは光制御により MAPK 活性化誘導を行う実験系の構築

p38 の蛍光プローブを発現する細胞に、さらに rapamycin 依存的に多量体形成を生じる分子ドメインを p38 に融合させた分子を細胞に発現させ、rapamycin 誘導体添加により細胞内で p38 活性を生じる様子を蛍光イメージングによってリアルタイムに定量することに成功した。MAP3K 分子 (ASK1, TAK1) および MAP2K (MKK6) の多量体化も試みたが、2 量体化誘導に依存した p38 の活性化はほとんど惹起されなかった。特に、p38 活性化誘導に伴って細胞膜に膜 bleb 様の形態が出現したが、これは紫外線ストレスや IL-1 β を与えた際の細胞膜形態の変化と類似していた。p38 活性化に伴う膜形態の変化は細胞の運動状態の変化をも

たらす可能性があるため、今後の研究によって検証する必要がある。

得られた成果の国内外の位置付けとインパクト

本研究により世界で初めて p38 キナーゼ活性のリアルタイムイメージングに成功したことを報告した。また、可視化と同時に p38 活性の薬剤での活性操作が可能であることがわかった。今後、光照射等の新しい光遺伝学ツールを用いた分子多量体化形成の誘導を試みることによってリアルタイムに、かつ、効率よく p38 活性制御を行うことが可能になれば、今回発見した p38 オシレーション現象などの動的シグナルに含まれる生物情報の理解が進むと考えられる。

ストレス応答経路のキナーゼは炎症、アルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経疾患、がんの進展にも密接に関わる鍵となる分子であり、その制御機構の解明はこれら疾患の病態解明や治療法開発に必須であるため、本研究成果で得られた知見を遅滞なく今後の応用研究にも生かしていく必要がある。本研究成果は医学的にも生物学的にも重要な分子について、従来にはない新しい光学的キナーゼ解析方法を実証できた点、およびストレス応答経路キナーゼ分子の複雑な時間動態に生理的意義があることを示す点で新しい概念を提示する。

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4件)

1. Tomida T, Takekawa M, Saito H: Oscillation of p38 activity controls efficient pro-inflammatory gene expression.

Nat Commun. 6: an. 8350, 2015 査読有
doi: 10.1038/ncomms9350.

2. Ichikawa K, Kubota Y, Nakamura T, Weng JS, Tomida T, Saito H and Takekawa M. MCRIP1, an ERK substrate, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-mesenchymal transition by regulating the co-repressor CtBP. Molecular Cell : 58, 35-46, 2015 査読有
doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.023.

3. Ohshima D, Arimoto-Matsuzaki K, Tomida T, Takekawa M and Ichikawa K. Spatio-temporal dynamics and mechanisms of stress-granule assembly. Plos Comput Biol. : 11, e1004326, 2015 査読有
doi: 10.1371/journal.pcbi.1004326.

4. Tomida T.

Visualization of the spatial and temporal dynamics of MAPK signaling using fluorescence imaging techniques.

J Physiological Sci. : 65(1):37-49. 2015
査読有

doi: 10.1007/s12576-014-0332-9

[学会発表] (計8件)

①富田太一郎、伊藤雅功、山口君空、関由成、赤羽悟美 JNK と p38 の定量的イメージングによる末梢神経系の炎症適応メカニズムの理解 第93回日本生理学会大会 北海道札幌市 札幌コンベンションセンター2016年3月22日

②富田太一郎、伊藤雅功、山口君空、関由成、赤羽悟美 p38MAPK 活性のオシレーションによる炎症性遺伝子発現の制御 第89回日本薬理学会年会, 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 2016年3月11日

③ 富田太一郎、斎藤春雄: Analysis of temporal information coding mechanism of MAPK signaling. 第92回日本生理学会大会, 兵庫県神戸市 神戸国際会議場 2015年3月21日

④ 富田太一郎、武川睦寛、斎藤春雄: Quantitative imaging analysis of p38 MAPK activity revealed dynamic regulation of stress signaling. 第88回日本薬理学会年会, 愛知県名古屋市中区 名古屋国際会議場, 2015年3月20日

⑤ Tomida T, Takekawa M, Saito H: Feedback regulation of stress-activated MAPK signaling revealed by single cell FRET imaging. 59th Biophysical Society Annual Meetings, Baltimore convention center, 米国 メリーランド州ボルチモア, 2015年2月11日

⑥富田太一郎、武川睦寛、斎藤春雄: ストレス応答 MAPK 活性化の単一細胞計測により明らかになった動的フィードバック制御 第37回日本分子生物学会, 神奈川県横浜市パシフィコ横浜, 2014年11月27日

⑦富田太一郎、武川睦寛、斎藤春雄: 新規 FRET 型蛍光プローブによるストレス応答 p38MAPキナーゼの動的フィードバック制御の解明. 第130回日本薬理学会関東部会, 東京都品川区、星薬科大学, 2014年7月5日

⑧富田太一郎 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. 第65回日本細胞生物学会シンポジウム、愛知県名古屋市、ウイックあいち 2013年06月20日

[図書] (計1件)

1. Ohshima D, Arimoto-Matsuzaki K, Tomida T, Takekawa M and Ichikawa K.

Stochastic simulation of stress granules. Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling.: 77-93 Springer Japan. 2015

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 太一郎 (TOMIDA, Taichiro)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号: 70396886

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし