

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：87401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460402

研究課題名(和文) 環境ストレスによるmRNA監視機構の変動と病態への影響に関する研究

研究課題名(英文) Research on environmental stresses-induced change in nonsense-mediated mRNA decay (NMD) activity and its effect on pathological conditions

研究代表者

臼杵 扶佐子 (Usuki, Fusako)

国立水俣病総合研究センター・その他部局等・部長

研究者番号：50185013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：環境ストレス、小胞体ストレスプレコンディショニングによりmRNA監視機構NMDは抑制され、早期終止コドンPTCを有する疾患遺伝子がコードする蛋白質が発現した。NMD抑制は、eukaryotic initiation factor 2 のリン酸化による翻訳抑制とNMD構成因子の発現抑制によって生じた。環境ストレスは、PTCを有する疾患細胞の表現型に影響を及ぼす因子となりうる。

研究成果の概要(英文)：Nonsense-mediated mRNA decay (NMD), an mRNA quality surveillance mechanism, was suppressed under environmental stresses and mild endoplasmic reticulum (ER) stress preconditioning. NMD suppression under mild ER stress preconditioning up-regulated the expression of mutant disease-related mRNA carrying premature termination codon (PTC) and restored partially the defect of protein. Mild ER stress preconditioning-induced NMD suppression was caused by phospho-eukaryotic initiation factor 2 - mediated translation suppression and downregulation of some NMD components. Environmental stresses and ER stress preconditioning has potential to affect phenotypes of PTC-related diseases.

研究分野：分子病態医化学

キーワード：環境ストレス mRNA監視機構(NMD) eIF2 リン酸化 NMD抑制 早期終止コドン(PTC) 蛋白質翻訳抑制
Snhg1 mRNA

1. 研究開始当初の背景

バイオインフォマティクス研究の知見から遺伝子疾患の約 3 分の 1 は異常な早期終止コドン(PTC)を含む変異遺伝子に起因する疾患であることが明らかになっているが、このような PTC を有する疾患では PTC を含む変異 mRNA を分解、排除する mRNA 監視機構 NMD がその病態に深く関与している。PTC を含む mRNA は、がんでも認められ、また正常でも alternative splicing によって数多く発生する。生体は、NMD によって異常な構造を持つ蛋白質断片の蓄積を免れているが、NMD は常に生体に有益となるわけではない。PTC を有する mRNA がコードする蛋白質が正常な機能を保持する場合は、NMD の作動によりその病態は増悪する。このような例では、NMD 抑制によりその病態が回復することが考えられる。実際、我々は PTC が生じた遺伝子疾患患者線維芽細胞の NMD を分子薬理的に制御することで疾患遺伝子の発現を調節し、その細胞機能が部分的に回復するものがあることを明らかにした。^{1, 2)}

NMD の実行は一般的に PTC の位置に依存するが、例外も多く報告され、さらに PTC の位置は同じであるにも関わらず表現型の異なる筋ジストロフィー例も報告されている。PTC の位置以外に NMD 実行を左右する因子が存在することが考えられる。これまで、飢餓や低酸素時などの環境ストレス下では NMD が抑制されることが報告されているが、その抑制機序、病態への関与については未解明な部分が多い。NMD は、PTC を含む変異 mRNA を有する遺伝性疾患の病態を左右するのみならず、非ストレス下では合成されない 5' 非翻訳側に open reading frame を有するストレス蛋白質の動態を左右し、環境ストレス応答に関与する可能性も指摘されている。

2. 研究の目的

疾患の発生、病態、進行に關与する環境ストレス(酸化ストレスや小胞体ストレス)が NMD に及ぼす影響及びその機序を明らかにし、環境ストレスによる NMD 変動が、遺伝性疾患の約 3 分の 1 をしめる PTC 変異疾患の表現型に及ぼす影響を明らかにして、PTC 変異疾患やがん、環境ストレス誘発性疾患の病態解明、治療に貢献することを目的とする。具体的には、下記の 4 項目を目的とした。

- (1) 環境ストレス(酸化ストレス、小胞体ストレス)負荷が NMD 活性に及ぼす影響を明らかにする。
- (2) 環境ストレスが NMD 変動を起こすメカニズムを明らかにする。
- (3) 環境ストレスによる NMD 変動がストレス応答に及ぼす影響を明らかにする。
- (4) 環境ストレスによる NMD 抑制が PTC を有する遺伝性疾患の病態に及ぼす影響について明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 環境ストレスとして酸化ストレスをおこすことが明らかになっているメチル水銀、弱い小胞体ストレス(小胞体ストレスプレコンディショニング)をおこすために ER Ca^{2+} -ATPase inhibitor である thapsigargin (TPG)を用いた。NMD 活性は、早期終止コドン PTC をもつために通常は NMD により分解されている蛋白質をコードしない RNA である small nucleolar RNA host gene 1 (Snhg1) mRNA あるいは growth arrest specific 5 (GAS5) mRNA 発現を指標に検討した。
- (2)細胞ストレス下では非ストレス蛋白質の翻訳低下とストレス防御に機能するストレス蛋白質の翻訳亢進がおこるが、この現象に中心的役割を果たすのが eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2 α) のリン酸化である。NMD の実行は蛋白質の翻訳と密接に関係することから、環境スト

皮下での NMD 抑制における eIF2 α リン酸化の意義について検討するために、リン酸化無効のプロミシン選択性 eIF2 α 変異体を作成した。環境ストレスに高感受性の細胞株であることをこれまで明らかにしてきた C2C12-DMPK160 細胞に Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて eIF2 α 変異体を導入後、プロミシン選択を行い、変異 eIF2 α 発現安定細胞株を得た。

(3) NMD が生体ストレス応答に及ぼす影響は、C2C12-DMPK160 を用いて検討した。NMD 構成因子 SMG-1、SMG-7、転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) をノックダウンするために siRNA を作成し、LipofectaminTM RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いて C2C12-DMPK160 に導入した。ストレス関連蛋白質の発現を real-time PCR、Western blot にて検討した。

(4) PTC を有し、NMD がその病態に負に作用する NMD 関連疾患のモデル細胞として、Ullrich 病患者線維芽細胞^{1, 2)}を用いた。本細胞では、collagen VI $\alpha 2$ 鎖 (COL $\alpha 2$ (VI)) の triple helical domain をコードする exon 内の遺伝子異常により PTC が出現すること、collagen VI の三鎖構造を認識する抗 collagen VI 抗体による免疫染色で collagen VI が欠損していることをすでに明らかにしている。siRNA 導入による NMD 抑制後及び環境ストレス負荷後の COL $\alpha 2$ (VI)mRNA の発現を real-time PCR にて、collagen VI 蛋白質の発現は抗 collagen VI 抗体による免疫染色で検討した。

4. 研究成果

(1) 環境ストレス負荷が NMD 活性に及ぼす影響についての検討

環境ストレス(酸化ストレス、小胞体ストレス)下における mRNA 監視機構 NMD の変動について、早期終止コドン PTC をもつために通常は NMD により分解されている、蛋白質をコードしない RNA である Snhg1 あるいは GAS5 mRNA 発現を指標に検討した。環境ストレス感

受性、非感受性筋芽細胞、ラット培養大脳皮質神経細胞、グリア細胞いずれの細胞でも、酸化ストレス、小胞体ストレス負荷により、Snhg1 あるいは GAS5 の mRNA の発現増加が認められたことから、環境ストレス(酸化ストレス、小胞体ストレス)によって NMD は抑制されると考えられた。

(2) 環境ストレスが NMD 変動を起こすメカニズムに関する検討

環境ストレスによって NMD は抑制されることが明らかになったが、NMD の実行は、蛋白質の翻訳と密接に関係している。細胞ストレス下では非ストレス蛋白質の翻訳は低下し、ストレス防御に機能するストレス蛋白質の翻訳は亢進するが、その中心的役割を担うのが eIF2 α のリン酸化である。環境ストレス下での NMD 抑制における eIF2 α リン酸化の意義について検討するために作成したリン酸化無効 eIF2 α 安定発現細胞株の内因性 eIF2 α を siRNA でノックダウン後、小胞体ストレスプレコンディショニングを行った。小胞体ストレスプレコンディショニングによって、野生株では NMD 抑制の指標である Snhg1 mRNA が増加したが、リン酸化無効 eIF2 α 安定発現細胞株では野生株に比し有意に Snhg1 mRNA 発現が低下した。従って、ストレス下での NMD 抑制において eIF2 α のリン酸化は重要であると考えられた。しかしながら、リン酸化無効 eIF2 α 安定発現細胞においても、小胞体ストレスプレコンディショニング下では Snhg1 mRNA は非プレコンディショニング下に比し有意に増加した。変異株では mammalian target of rapamycin (mTOR) mRNA の有意な低下が認められたことから、mTOR 抑制による cap-dependent mRNA translation 阻害の影響が考えられた。そこで、小胞体ストレスプレコンディショニング下において mTOR 活性剤である MHY1485 添加による Snhg1 mRNA の変動を調べたところ、MHY1485 添加によって変異株の Snhg1 mRNA は非添加時に比し有意に減少した。

従って、変異株における小胞体ストレスプレコンディショニング下の NMD 抑制は、mTOR pathway の阻害が部分的に関係していると考えられた。さらに、環境ストレス負荷時は NMD 構成因子の一部は発現が低下することから、リン酸化無効の eIF2 α 変異体導入細胞における小胞体ストレスプレコンディショニング下での NMD 抑制は、NMD 構成因子の発現抑制と mTOR pathway の阻害の両者が関与していると考えられた。

(3) 環境ストレス下における NMD 変動によるストレス応答への影響に関する検討

細胞ストレス下では、非ストレス下で合成されない転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) が下流のストレス蛋白質の転写を活性化することから、ATF4 はストレス応答における key factor と考えられている。ATF4 の発現は、eIF2 α リン酸化が関与すると考えられているが、ATF4 は、非ストレス下では合成されない 5' 非翻訳側に open reading frame を有する転写因子で、その発現動態には NMD の関与も指摘されている。そこで、siRNA を用いて NMD 構成因子 SMG-1、SMG-7 をブロックした NMD 抑制細胞の環境ストレス下における ATF4 発現について検討したところ、ATF4 mRNA は増加したが ATF4 蛋白質の発現増加は認められなかった。したがって、ATF4 の発現は、NMD 抑制ではなく、主に eIF2 α のリン酸化に依存すると推定された。さらに ATF4 ノックダウン細胞では、ストレス下における小胞体シャペロン GRP78 の発現が non-silencing siRNA 導入細胞よりも少なく、その発現には phospho-eIF2 α /ATF4 pathway が関与していると考えられた。

(4) 環境ストレスによる NMD 抑制が PTC を有する遺伝性疾患の病態に及ぼす影響

環境ストレスによる NMD 抑制が PTC を有する

遺伝性疾患の病態に及ぼす影響について、PTC を有する疾患モデル細胞である Ullrich 線維芽細胞を用いて小胞体ストレスプレコンディショニング下で検討した。小胞体ストレスプレコンディショニングにより Ullrich 線維芽細胞の Snhg1 mRNA の発現は増加し、原因遺伝子の mRNA 発現の増加と欠損蛋白質の発現が認められた。

siRNA 導入による NMD 構成因子 SMG-1 ブロックにおける NMD 抑制と小胞体ストレスプレコンディショニングの併用では、小胞体ストレスプレコンディショニングによって欠損蛋白質の発現は増加傾向が認められた。

以上、環境ストレス下では mRNA 監視機構 NMD は抑制され、早期終止コドン PTC を有する疾患細胞の欠損蛋白質が発現したことから、環境ストレスは、PTC を有する疾患細胞の表現型に影響を及ぼす因子となりうる事が推測された。

<引用文献>

1. Usuki F, Yamashita A, Higuchi I, et al: Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease. *Ann Neurol* 55:740-744, 2004
2. Usuki F, Yamashita A, Kashima I, et al.: Specific inhibition of nonsense-mediated mRNA decay components, SMG-1 or Upf1, rescues the phenotype of Ullrich's disease fibroblasts. *Molecular Therapy* 14: 351-60, 2006

4. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Usuki F, Fujimura M: Decreased plasma thiolthiol antioxidant barrier and selenoproteins as potential biomarkers for ongoing methylmercury intoxication and an individual protective capacity. *Arch Toxicol* 90(4):917-26, 2016 doi:10.1007/s00204-015-1528-3 (査読有)

2. Usuki F, Yamashita A, Shiraishi T, Shiga A, Onodera O, Higuchi I, Ohno S: Inhibition of SMG-8, a subunit of SMG-1, ameliorates the mutant phenotype exacerbated by nonsense-mediated mRNA decay without cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci 110: 15037-15042, 2013 doi: 10.1073/pnas.1300654110. (査読有)
3. Usuki E, Fujimura M, Yamashita A: Endoplasmic reticulum stress preconditioning attenuates methylmercury-induced cellular damage by inducing favorable stress responses. Scientific Reports 3:2346, 2013 doi:10.1038/srep02346. (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

1. Usuki F, Fujimura M: Mild endoplasmic reticulum stress preconditioning upregulates gene expression of membrane transporters. 55th Annual Meeting of Society of Toxicology, New Orleans, 2016.3
2. Usuki E, Fujimura M: Methylmercury-induced stress responses in astroglia cells. 54th Annual Meeting of Society of Toxicology, San Diego, 2015.3
3. Usuki F, Fujimura M: Plasma thiol antioxidant barrier as a potential biomarker for methylmercury intoxication. 53rd Annual Meeting of Society of Toxicology, Phenix, 2014.3
4. Usuki F, Fujimura M, Yamashita A: Mild endoplasmic reticulum stress preconditioning attenuates methylmercury (MeHg)-induced cellular damage through induction of favorable stress responses in MeHg-susceptible myogenic cell line. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.

〔図書〕(計3件)

臼杵扶佐子, 坂本峰至: 胎児におけるメチル水銀中毒症. 日本臨床別冊 新領域別症候

群シリーズ 神経症候群 (第2版) IV VIII 先天異常/先天奇形 環境要因・物質による先天異常, 819-822 頁, 日本臨床社, 東京, 2014

臼杵扶佐子: 水銀. 日本臨床別冊 新領域別症候群シリーズ 神経症候群 (第2版) V XII 医薬品副作用、中毒性疾患 金属、薬品・化学物質による中毒性疾患, 615-618 頁, 日本臨床社, 東京, 2014

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nimd.go.jp/kakubu/rinsho/usuki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼杵扶佐子 (USUKI, Fusako)
 国立水俣病総合研究センター・臨床部・部長
 研究者番号: 50185013

(2) 研究分担者

藤村成剛 (FUJIMURA, Masatake)
 国立水俣病総合研究センター・基礎研究部・室長
 研究者番号: 50185013

(3) 連携研究者

山下暁朗 (YAMASHITA, Akio)
 横浜市立大学医学部・分子細胞生物学・准教授
 研究者番号: 20405020