

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670136

研究課題名(和文)新規in vitroアッセイ系を用いた核小体ストレスの分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of nucleolar stress with a novel in vitro assay

研究代表者

堀内 久徳(Horiuchi, Hisanori)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90291426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：低栄養やDNA傷害、低酸素・活性酸素暴露等に際し、細胞は速やかにリボソーム合成を停止し、そして核小体構造は崩壊する。この現象は「核小体ストレス」と呼ばれ注目されている。本研究は核小体を単離し、rRNA転写を無細胞系で解析するアッセイ系および核小体崩壊を解析するアッセイ系の構築を行い、その安定化に向け改良を行ってきた。さらに、核小体に局在する低分子量G蛋白質RabL10およびRabL11は核小体ストレスに関与している可能性があり、その結合候補蛋白質を同定し、核小体ストレスへの影響を解析中である。

研究成果の概要(英文)：When cells meet stress such as nutrient deficiency, DNA damage, low oxygen condition or reactive oxygen species, they rapidly quit ribosomal biogenesis and break the structure of nucleolus. This phenomenon is noted as the 'nucleolar stress'. The aim of this study is to elucidate the molecular mechanism of the nucleolar stress. We have tried to establish a stable assay system to evaluate it; a cell-free rRNA transcription assay with isolated nucleoli and a cell-free nucleolus break-down assay. We investigated the function of nucleolus-associated small GTPases RabL10 and RabL11, possible regulators for the nucleolar stress. We have identified their possible effector proteins and analyzed about the involvement.

研究分野：biochemistry, cell biology

キーワード：核小体 リボソーム RabL10 RabL11

1. 研究開始当初の背景: 真核細胞のリボソームは、28S、5.8S、5S リボソーム RNA (rRNA)と 46 種類の蛋白質からなる大サブユニットと、18S rRNA と 32 種の蛋白質よりなる小サブユニットから構成される。28S、5.8S、18S rRNA は一つの転写単位に由来し、核小体で RNA ポリメラーゼ I によって一本鎖として転写されたあと snoRNP によって切断される。遺伝子重複によって増幅された rDNA はヒトでは約 400 あり、5 本の染色体に分かれて存在する。リボソーム蛋白質は細胞質で合成されて核小体に運ばれ、核小体で rRNA サブユニットとともにリボソームとして組み立てられる。このように核小体はリボソーム合成工場である。さて、増殖細胞では転写の 50% は rRNA 合成に費やされ、さらに完成したリボソームはエネルギーを使って蛋白質を合成する。このようにリボソームの合成は細胞のエネルギー消費に直結する。そのため低栄養や DNA 傷害、転写阻害、活性酸素暴露、低酸素等のストレスにさらされると細胞は速やかにリボソーム合成を停止し、核小体構造は崩壊する。この現象は「核小体ストレス」と呼ばれ注目されている。最近、核小体ストレスの下流で、何らかの機序で放出されたりリボソーム蛋白質が、p53 と複合体を形成して抑制的に作用している Mdm2 と複合体を形成して、p53 を活性化することで細胞周期の停止をきたすことが報告されている (X Zhang et al, Oncogene, 2012、Mahata et al, Oncogene, 2012)。しかしながら、本分野の研究は端緒にすぎたばかりであり、細胞ストレスがどのようにして核小体ストレスを誘導するのかという上流のメカニズムはほと

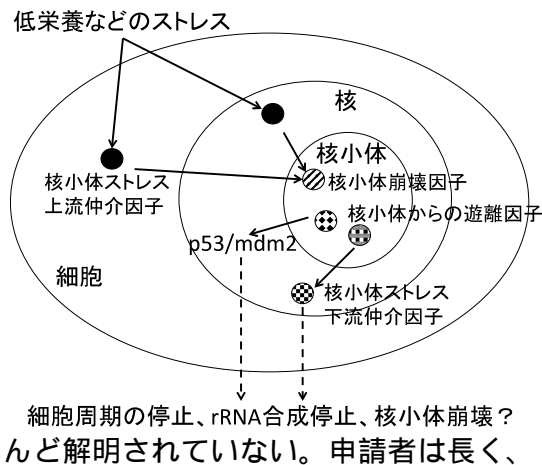
細胞内シグナリングのスイッチとして機能する低分子量 GTP 結合蛋白質の研究を進めてきた。核小体に局在して癌抑制的に働く RasL10A (Elam et al, Cancer Res. 2005, 65:3117-25) に着目して解析したところ、核小体ストレスに關与することを示唆する結果を得た。RasL10A の核小体ストレスへの關与が想定された。そこで、できるだけ完全な形で、そして機能を残して核小体を単離できれば、in vitro の解析系として核小体ストレスに關して多くを解明できると考えて本研究を着想した。

2. 研究の目的: 本研究ではまず核小体を単離し、rRNA 転写を無細胞系で解析するアッセイ系および核小体崩壊を解析するアッセイ系を構築し、それらを用いて核小体ストレスの分子メカニズムを解明することを目的とする。さらに、低分子量 GTP 結合蛋白質 RasL10 等からのアプローチも用いて、研究目的を達成する。細胞の生存に不利な条件かにおいて、核小体ストレスは、オートファジーと車の両輪をなし、細胞の生存のためのエネルギーを確保するシステムで有る。そのため、がん細胞等の生存・成長に重要な働きをしていることが想定される。小胞体ストレスの分子メカニズムを解明することにより、がん細胞の制御に關する有用な情報を得ることも目的とする。このようなアプローチは世界的にも報告がなく、チャレンジングであるが、成功により本分野を画期的に前進させるものとなる。

3. 研究の方法: 本研究では以下のように計画し、研究を進めた。

単離核小体を用いた rRNA 転写アッセイおよび核小体崩壊アッセイを確立し、そのアッセイを用いて、低栄養や低酸素、DNA 傷害、酸化ストレス、転写阻害の導く核小体ストレス (rRNA 転写停止および核小体崩壊) の分子メカニズムを解明する。さらに、核小体に局在し、核小体ストレスを担う可能性のある RasL10 および RasL11 の結合蛋白質を同定し、前述のアッセイを用いて核小体ストレスにおけるそれらの役割を明らかにする。そして、in vitro の解析で明らかになった分子に關しては、培養細胞で siRNA 等を用いて遺伝子発現を抑制し、核小体ストレス刺激を加えて解析する。もし、ロックダウンによって核小体ストレスが誘導されなくな

図. 核小体ストレスの作業仮説



れば、細胞レベルでの証明となる。さらにその遺伝子KOマウスを作成し、個体レベルで解析する。このようにして、核小体ストレスの分子メカニズムを明らかにする。具体的には以下の実験を進める。

1.核小体の無細胞機能アッセイ系の確立と核小体ストレス誘導因子の同定:

- (1) 核小体の単離、
- (2) 核小体崩壊アッセイと核小体崩壊を誘導する因子の同定、
- (3) 単離核小体を用いたrRNA転写アッセイの確立とrRNA転写を抑制する因子の同定
- (4) 核小体の構造・機能維持に必須な核小体蛋白質の同定、
- (5) 核小体ストレス誘導因子の細胞レベル・個体レベルでの解析。

2. 核小体に局在するGTP結合蛋白質RasL10A、RasL11の機能解明

4. 研究成果:

1. 核小体の無細胞機能アッセイ系の確立と核小体ストレス誘導因子の同定: S-HeLa細胞を浮遊培養し、大量の細胞を調整し、核を単離し、超音波破碎によって、各抽出液を調整し、密度勾配遠心法によって核小体を単離した。その核小体を用いてrRNA転写を無細胞系で解析するアッセイ系を構築し、現在、改良中である。また、単離核小体崩壊アッセイ系を構築し、種々の条件により、形態学的に核膜の崩壊を評価したが、有意に変化をもたらす因子は見いだせなかった。現在、本核小体崩壊アッセイ系の構築をさらに精度を上げるべく改良中である。

2. 核小体に局在するGTP結合蛋白質RasL10A、RasL11の機能解明: 低分子量GTP結合蛋白質は、哺乳類では約150種の分子が同定されており、細胞内ではシグナルのスイッチとして働いている。即ち、GTPが結合した活性型とGDPが結合した不活性型であり、両者で蛋白質のコンフォメーションが異なる。活性型のみがエフェクター蛋白質と相互作用でき、シグナルを下流に伝える。さて、核小体には、RasL10およびRasL11の2つの低分子量G蛋白質が局在し、核小体ストレスに関与している可能性が示唆されている。本研究では、そのエフェクター蛋白質の同定を目指し、研究を進めた。まず、大腸菌

を用いて遺伝子組み換えRasL10およびRasL11を作成した。また、GTPあるいはGDPに固定化される可能性のある変異体を作成した。そして、それらのGTP結合型およびGDP結合型を作成し、ビーズに固相化し、HeLa細胞の細胞抽出液や核抽出液を用いてアフィニティカラム法によってその結合蛋白質の同定を行った。この方法によってRasL10およびRasL11それぞれ、2-3の結合蛋白質を同定した。しかし、それらのGTP結合型依存性ははっきりしなかった。このような蛋白質の場合でも生物学的に重要な働きをしていることもあり、その機能の解析中である。また、現在、明らかにGTP結合型RasL10およびRasL11に結合するエフェクター蛋白質を同定すべく、条件の改良を行っている。

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 0 件)

[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:
出願年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等:

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/mc>
b/

6 . 研究組織

(1)研究代表者 堀内 久徳
(HORIUCHI, Hisanori)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90291426

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：