

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06957

研究課題名(和文) 亜鉛欠乏症への亜鉛要求性タンパク質恒常性維持シグナル伝達機構破綻の関与

研究課題名(英文) Role of dysregulation of zinc-dependent proteostasis signaling in zinc deficiency

研究代表者

枝松 裕紀 (Edamatsu, Hironori)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70335438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛欠乏下での活性型変異体Hras (HrasG12V)の発現は、ストレスMAPキナーゼ(JNKとp38MAPK)に依存したカスパーゼ3活性化を伴う細胞死を誘導した。これらの応答は、Rasの下流のERKの活性化に依存していた。HrasG12V発現は小胞体(ER)ストレスを誘導し、亜鉛欠乏下ではIRE1経路を介してJNKとp38MAPKの活性化に関与した。また、HrasG12V発現は、亜鉛結合タンパク質をERK依存的に大量に発現誘導した。これらの機構により、HrasG12V発現は亜鉛とタンパク質の恒常性を攪乱し、亜鉛欠乏に対する脆弱性を細胞に与えると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜鉛欠乏下でのRasシグナルの恒常的活性化が引き起こす細胞死の誘導機構の解析を目指した本研究は、細胞の生存における亜鉛恒常性の重要性を見出した。さらに、Rasシグナル伝達の異常な亢進が亜鉛結合タンパク質の生合成を亢進させ、その結果、亜鉛恒常性を破綻させる可能性を指摘することができた。今後、本研究で得られた成果をさらに発展させることで、がん細胞の新たな脆弱性の発見に繋がると思われる。

研究成果の概要(英文)：Expression of constitutively active Hras (HrasG12V) under zinc-deficient conditions led to the activation of caspase-3 and stress-activated MAPKs (JNK and p38MAPK). The induction of these stress responses depended on the activation of ERK, which is downstream of Ras. HrasG12V expression induced endoplasmic reticulum (ER) stress, which was further exacerbated by zinc deficiency to activate JNK and p38MAPK through IRE1. In addition, HrasG12V expression upregulated the expression of a subset of zinc-binding proteins, which appears to dysregulate zinc homeostasis and proteostasis and to confer vulnerability to zinc deficiency.

研究分野：細胞内シグナル伝達

キーワード：RAS がん 脆弱性 小胞体ストレス 亜鉛恒常性 トランスクリプトーム 細胞死 タンパク質恒常性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は、ヒト血清中では約 **0.9 mg/L** (約 **15 μM**) 存在し、**300** 種以上の金属酵素の触媒中心の形成と約 **700** 種以上のタンパク質の構造安定化に参与する。亜鉛の欠乏は、皮膚炎、発育や創傷治癒の遅延、生殖機能低下、骨格の発育不全など亜鉛欠乏症とよばれる障害を引き起こす。これらは、亜鉛結合タンパク質の障害の結果であると考えられている。

従来の亜鉛欠乏症に関する細胞生物学的研究は、亜鉛輸送体の遺伝子破壊等による解析が中心であった。これらの研究は、亜鉛の吸収不足の要因と効果を明らかにした。しかし、亜鉛欠乏症発症に普遍的に関与し得る亜鉛結合タンパク質や細胞過程が存在するかは、明らかではない。

ras 原がん遺伝子産物 (**Ras**) は、細胞増殖・生存に関わる細胞内シグナル伝達に参与する。研究代表者は **Ras** シグナル伝達系の解析の過程で、発がん性の常時活性型の変異体 **Hras** (**HrasG12V**) を誘導発現する **Rat-1** 細胞由来細胞 (以下 **Rat-1RasVal** 細胞) では、血清非存在下での **HrasG12V** の発現が通説に反して細胞死を誘導することを見出した。血清中の細胞死抑制因子として亜鉛を同定したが、亜鉛による細胞死抑制の機構は不明であった。この亜鉛による細胞死抑制の機構を知ることは、亜鉛欠乏症発症の機構を知る糸口の一つになると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、常時活性型変異体 **Hras** (**HrasG12V**) の発現による細胞死誘導がタンパク質合成の亢進と良い相関を示すことに着目した。**HrasG12V** によるタンパク質合成亢進下での亜鉛欠乏が、小胞体 (**ER**) での変性タンパク質の蓄積による **ER** ストレスを引き起こし細胞死誘導に繋がるなどの作業仮説をたてた。この仮説に基づいて、**Ras** シグナルによる **ER** ストレス誘導とそれに対する亜鉛欠乏の効果について、分子レベルで明らかにすることを目的とした。さらに、亜鉛欠乏症発症に共通に関与し得る普遍的な分子基盤を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 亜鉛欠乏下での活性型変異体 **Hras** 発現による細胞死誘導のシグナル伝達の解析: 解析には、発がん性の常時活性型の変異体 **Hras** (**HrasG12V**) を誘導発現する **Rat-1** 細胞由来細胞 (**Rat-1RasVal** 細胞) を用いた。亜鉛添加あり条件 (**3 μM**; 通常の **10%** ウシ胎児血清含有 **DME** 培地に含まれる濃度に相当) および亜鉛添加なし条件で **HrasG12V** の発現を誘導し、細胞死 (アポトーシス) 誘導に関わる細胞内シグナル伝達分子の活性化状態をウェスタンブロット法で解析した。また、各種阻害剤を用いて、シグナル伝達経路を解析した。

(2) トランスクリプトーム解析による活性型変異体 **Hras** 発現が引き起こす遺伝子発現の変動への亜鉛欠乏の効果の解析: **Rat-1RasVal** 細胞で、亜鉛添加あり条件 (**3 μM**) および亜鉛添加なし条件で **HrasG12V** の発現を誘導し、発現が変動する遺伝子群をマイクロアレイ法 (東レ **3D-Gene**) により同定した。さらに、**DAVID** を用いて発現変動のあった遺伝子群の特徴の可視化 (エンリッチメント解析) を行い、**HrasG12V** と亜鉛により影響を受ける生物学的過程を推定した。

(3) 活性型変異体 **Hras** 発現による **ER** ストレス誘導と亜鉛欠乏による細胞死誘導との関係の解析: 上記 (2) の解析で示した **ER** ストレス誘導に関連して、**ER** ストレスセンサー分子活性化の関与について阻害剤を用いて検討した。シグナル伝達分子の活性化の検討は、(1) に示した方法に主に従った。

(4) トランスクリプトーム解析による活性型変異体 **Hras** 発現が引き起こす亜鉛欠乏の誘導機構の解析: 上記 (2) で得たトランスクリプトームデータから **HrasG12V** 発現により発現誘導される亜鉛結合タンパク質をコードする遺伝子群を検索した。同定された一部の亜鉛結合タンパク質遺伝子の発現を **siRNA** で阻害し、その **ER** ストレス応答への影響を検討した。

(5) データベース検索による他の細胞等における亜鉛欠乏と小胞体ストレス応答との関係の解析: 上記 (4) で同定した亜鉛結合タンパク質遺伝子と亜鉛トランスポーターを共発現する細胞等を、既存のデータベースからサーチエンジンである **SEEK** を用いて抽出した。さらに **SEEK** に実装されているエンリッチメント解析機能を用いて亜鉛結合タンパク質の高発現が影響を与え得る生物学的過程を推定し、(1)~(4) での **Rat-1RasVal** 細胞の解析から得られた知見との類似性を検討した。

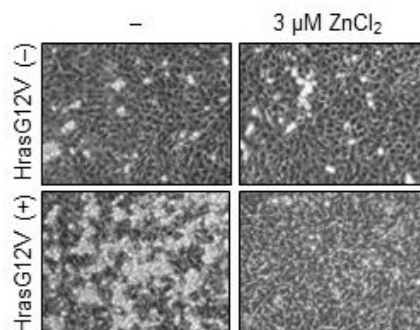


図1 HrasG12V 発現による細胞死と亜鉛の細胞死阻害効果 (初出, **BioMetals**, **35**, 349-362, 2022)

4. 研究成果

(1) 亜鉛欠乏下での活性型変異体 **Hras** 発現による細胞死誘導のシグナル伝達の解析: 亜鉛添加あり条件 (3 μM) および亜鉛添加なし条件で **Rat-1RasVal** 細胞に **HrasG12V** 発現による細胞死を誘導し

(図1) 細胞内シグナル伝達分子の活性化を解析した。その結果、亜鉛欠乏下での **HrasG12V** 発現による細胞死にはカスパーゼ 3 の活性化とストレス **MAP** キナーゼ (**JNK**、**p38MAPK**) の活性化を伴うことを明らかにした。またカスパーゼ 3 の活性化には **JNK** または **p38MAPK** の活性化を必要とすることを明らかにした。さら

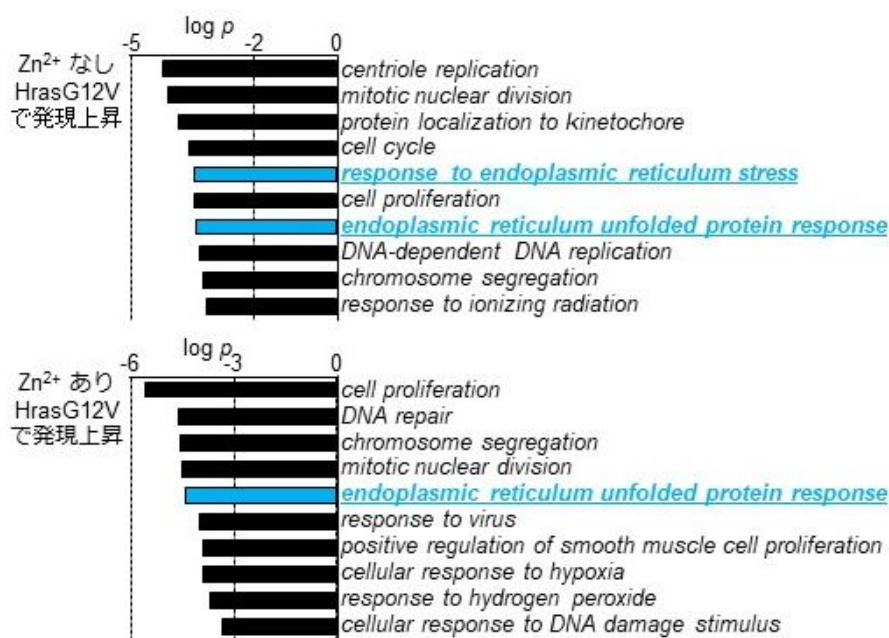


図2 **HrasG12V** 発現で発現上昇する遺伝子群のエンリッチメント解析 (初出, *BioMetals*, **35**, 349-362, 2022)

に **JNK**、**p38MAPK** の活性化は **Ras** の下流の **ERK** の活性化が要求されることを明らかにした。

(2) トランスクリプトーム解析による活性型変異体 **Hras** 発現が引き起こす遺伝子発現の変動への亜鉛欠乏の効果の解析: 亜鉛添加 (3 μM) の有無と **HrasG12V** の発現誘導の有無の4つの条件下で **mRNA** を回収し、マイクロアレイ解析により2万遺伝子の発現を解析した。DAVIDを用いて **HrasG12V** の発現により発現上昇する遺伝子群の特徴の可視化(エンリッチメント解析)を行ったところ、亜鉛の添加の有無にかかわらず **ER** ストレスで上方制御されるものが数多く含まれていることが明らかとなり、**HrasG12V** 発現による **ER** ストレス誘導が示唆された。(図2)

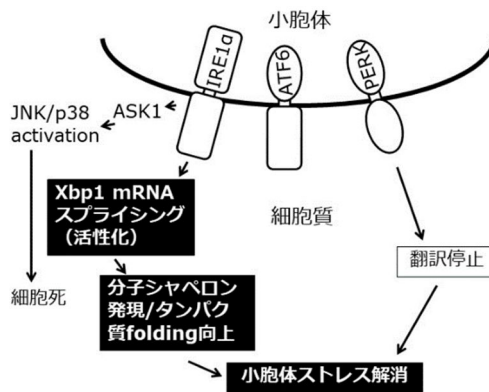


図3 **ER** ストレス応答の主要経路

(3) 活性型変異体 **Hras** 発現による **ER** ストレス誘導と亜鉛欠乏による細胞死誘導との関係の解析: **ER** ストレスで活性化される3つのシグナル経路軸 (**PERK** 軸、**IRE1** 軸、**ATF6** 軸; 図3)のうち、**PERK** 軸と **IRE1** 軸について解析した。その結果、**HrasG12V** の発現では **PERK** 軸はほとんど活性化されなかった。一方、**IRE1** 軸を介した **Xbp1 mRNA** の非典型スプライシングは、**HrasG12V** の発現により誘導された。**IRE1** 軸は、また、**JNK** や **p38MAPK** の活性化に関与することが知られている。そこで **IRE1** のキナーゼ活性を阻害する薬剤を用いて **JNK** と **p38MAPK** の活性化への関与を検討したところ、この薬剤は亜鉛非添加時の **HrasG12V** 発現による **JNK** や **p38MAPK** の活性化を抑制することがわかった。以上の(1)~(3)の結果から、亜鉛非添加時の **HrasG12V** 発現は、**ER** ストレスによる **IRE1** の活性化を介した **JNK** や **p38MAPK** を引き起こし、これが細胞死誘導を引き起こしていると考えられた。モデルを図4に示す。

(4) トランスクリプトーム解析による活性型変異体 **Hras** 発現が引き起こす亜鉛欠乏の誘導機構の解析: 亜鉛非添加時の **HrasG12V** 発現による細胞内亜鉛の欠乏の機構を推定するために、上記(2)のトランスクリプトーム解析の結果を再解析した。その結果、**HrasG12V** 発現で強く発現誘導される遺伝子の上位には、複数の亜鉛結合タンパク質(酵素)がランクインすることが分かった。これらの遺伝子のいくつかを **siRNA** を用いて発現抑制させたところ、亜鉛非添加時の **HrasG12V** 発現による **JNK** や **p38MAPK** 活性化が抑制されることを見出した。今後、さらに解析を進めていくことにした。

(5) データベース検索による他の細胞等における亜鉛欠乏と小胞体ストレス応答との関係の解析: 上記(4)で見出した **HrasG12V** 発現で発現上昇する亜鉛結合タンパク質(酵素)と細胞への亜鉛取り込みに関与する亜鉛トランスポーター遺伝子とを共に強発現する細胞等をデータベース検索した。その結果、そのような細胞などを複数のトランスクリプトームデータセットに確認した。さらに **SEEK** のエンリッチメント解析機能を用いて、亜鉛結合タンパク質とトランスポーターとを共発現する細胞等で発現上昇している遺伝子群のエンリッチメント解析をしたところ、**ER** ストレス関連の遺伝子がエンリッチされていること

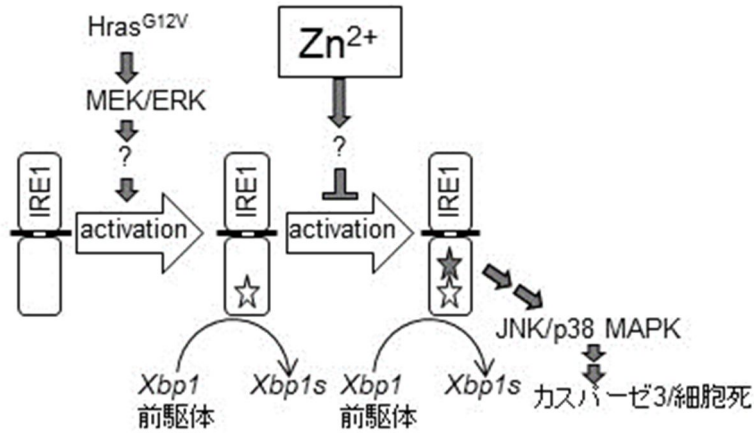


図4 **HrasG12V** 発現による **ER** ストレスと亜鉛欠乏を介した細胞死誘導の機構 (モデル; 初出, *BioMetals*, **35**, 349-362, 2022)

を見出した。以上の(4)と(5)の結果は、**Ras/ERK** 経路の恒常的活性化による亜鉛結合タンパク質(酵素)の大量産生が、亜鉛とタンパク質の恒常性を攪乱させ、亜鉛欠乏に対する脆弱性を細胞に与える可能性を示唆している。今後の詳細な解析が必要となった。

以上の(1)~(5)の結果から考えられるモデルを、図5に示す。このモデルに基づいた今後の解析により、**Ras/ERK** 経路の恒常的活性化を伴う様々ながん細胞が持つ脆弱性の同定に繋がるかもしれない。

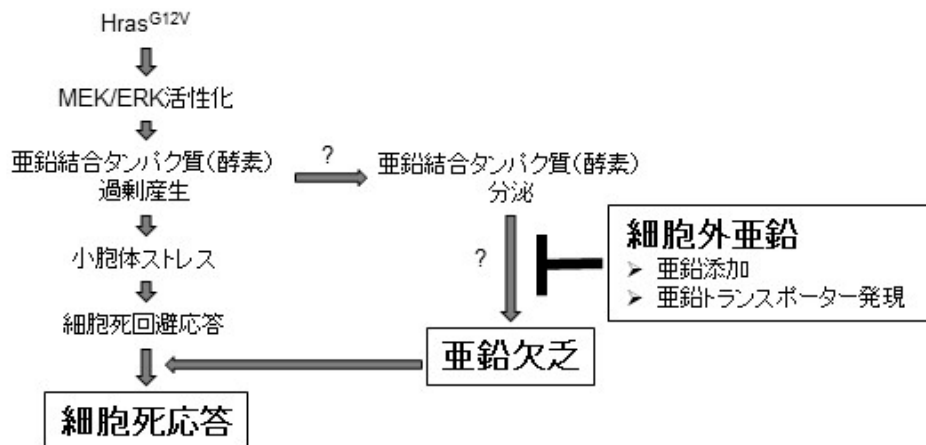


図5 **HrasG12V** 発現が引き起こす亜鉛結合タンパク質産生亢進による **ER** ストレス誘導と亜鉛恒常性の攪乱の機構 (モデル)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hironori Edamatsu	4. 巻 35
2. 論文標題 Zinc ions negatively regulate proapoptotic signaling in cells expressing oncogenic mutant Ras	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioMetals	6. 最初と最後の頁 349 ~ 362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10534-022-00376-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 枝松 裕紀
2. 発表標題 活性型変異体Hras発現細胞における亜鉛依存的遺伝子発現の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 枝松 裕紀
2. 発表標題 rasシグナルによる亜鉛依存的ストレス応答に関連した遺伝子の網羅的発現解析
3. 学会等名 第18回日本亜鉛栄養治療研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------