

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770100

研究課題名 (和文)

MAPKKK 活性化のリアルタイムな可視化によるストレス受容機構の研究

研究課題名 (英文)

Analysis of stress signaling by real-time visualization of MAPKKK activity

研究代表者

富田 太一郎 (TOMIDA TAICHIRO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70396886

研究成果の概要：生体を構成する個々の細胞は紫外線や高浸透圧など様々な環境ストレスに曝されているが、ストレス刺激を受けた細胞には、分化したり自ら細胞死をおこすことでうまくストレス環境に適応し、個体の生存を維持するしくみが存在する。本研究では、細胞内に生じるストレス応答の情報伝達を生きた細胞で光学的に観察することに成功し、その結果、ストレス刺激の種類の違いは、MAPKKK 分子の活性化のおこるタイミングや場所の違いという形で細胞内に情報伝達されていることを解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,900,000	0	2,900,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	150,000	3,550,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ストレス応答、キナーゼ、イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) ストレスを受けた細胞は、細胞死や細胞分化のシグナルを制御することにより、個体の生存をはかることが知られていたが、実際に、細胞のどこで紫外線などのストレスを感知し、また、その情報がどのように細胞内の分子へと伝達されているのかは不明であった。本研究代表者は、ストレス応答シグナルの代表例である MAPK シグナルに着目し、モデル生物の出芽酵母の場合、高浸透圧環境下では細胞膜上の浸透圧センサー分子から

MAPK 経路の上流の MAP3K 分子へのシグナル入力が直接的に生じることを解明していたが、哺乳類細胞では同様のストレスセンサー分子が同定されておらず、また、細胞内でどのようにストレス応答の MAPK シグナルが制御されているのかは全く不明であった。

(2) 当時、MAPK 活性化を解析する手法としては、遺伝学あるいは生化学的な手法が中心であり、細胞内情報伝達を生きた細胞で解析する手法はわずかしかなかった。しかしなが

ら、ストレス応答 MAPK 経路の異常は動物個体の発生に異常を起こしたり、また、糖尿病や心不全、がん、慢性関節リウマチなどの免疫異常やアルツハイマー、パーキンソン病など様々な疾患をひきおこすこと、さらに、MAPK 阻害剤あるいは活性化剤が上記疾患の治療薬になり得ることが明らかにされつつあったため、ストレス応答 MAPK が生体内でどのように制御されているかを解明することは生物学的な観点で重要であるだけでなく、医学および薬学的な観点からも疑いなく急務の課題であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、光学的に MAPK シグナル活性化を可視化する新規の手法を開発し、さらに、これを用いて、実際に生きた細胞内でストレス応答のシグナル伝達が生じる様子を解明することを目的とした。これにより、未解明の細胞内ストレスセンサーの存在を確認すること、また、ストレスセンサー下流のシグナル伝達メカニズムの解明を期待した。また、光学的な MAPK 測定の開発を応用することで生きた動物個体の MAPK シグナルを可視化する将来の応用研究への道が拓けることも期待した。

3. 研究の方法

(1) MAP3K 光学測定系の構築

MAPK 光学測定を行うために、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) という物理現象を利用する先鋭的な分析方法を考案した。MAPK 経路の最も上流に位置する MAP3K 分子の標的である MAP2K-MKK6 に由来する基質と、その基質にリン酸化依存的に結合する蛋白質ドメイン (Yeast Rad53 分子由来の FHA1 ドメイン) とを融合させ、その両側にオワンクラゲ由来の改変型蛍光蛋白質と融合させた MAP3K 活性化センサー (プローブ) を作製する。MAP3K 活性化依存的なプローブ内の構造変化を蛍光エネルギー共鳴現象の変化 (蛍光強度レシオ変化) として光学的に検出する。

(2) MAP3K 測定系の最適化

センサーを細胞に発現させて蛍光測定し、さらにアミノ酸配列に改変を加えることによってシグナル/ノイズ比の高いプローブを選別する。

(3) ストレス刺激による細胞内 MAP3K 活性化の動態のリアルタイムイメージングの実現

センサーを細胞に発現させ、生きた細胞でストレス刺激を与えながら顕微鏡下で蛍光測定することにより、細胞内 MAP3K 活性化を画像化する。

刺激の種類などに応じて、細胞内 MAP3K 活

性がどのように制御されるかを解明する。

4. 研究成果

(1) MAP3K 光学測定系の実現

本研究によって、ストレス応答 MAP3K のリン酸化シグナルの細胞内の実時間画像化に成功した。特に、MAP3K は MAPK 経路の上流であり、既知の哺乳類ストレス応答分子としては最も上流に位置する分子の一つであるが、哺乳類では少なくとも 14 種類以上の MAP3K 分子が存在しているため、その活性化動態はほとんど不明であった。本研究により、MAP3K の活性化を光学的に実時間で可視化解析することが可能になった。細胞内ストレス応答のリン酸化シグナルの画像化は世界初の成果である。

さらに、今後の応用研究として、がんや神経疾患などの疾患モデル動物体内で MAPK シグナル異常がどのように生じているかを解明する新たな研究手法の開発が期待されているが、FRET を用いた MAPK シグナル画像化法は原理的に適切な蛍光・発光蛋白質を選択することで、動物体内での検出も可能にするものであるため、本研究成果は将来の応用研究への重要な足がかりとなると思われる。

(2) 細胞内ストレスシグナルフロー (流れ) の可視化解析

ストレス環境に曝された細胞に MAP3K 活性の光学測定を行うことにより、細胞の中で、どこからどのようなタイミングで MAPK 経路の活性化を生じるかが明らかになった。その結果、刺激の種類依存的に、シグナルの開始点および、シグナル発生のタイミングの同期性などに非常に顕著な違いがあることを発見した (図 1)。つまり、細胞内では、「ストレス刺激を受けた」という情報は、単に MAP3K 活性化という情報に変換されているだけでなく、「刺激の種類」という情報までも、MAP3K 活性化を生じる「タイミングや場所の違い」という形で細胞内に情報が蓄積されて

いることになる。

そこで、この現象から、未知のストレス応答経路と既知のサイトカイン・増殖因子の経路との比較を行った。特に、紫外線受容の仕組みは世界中で長らく議論がなされてきたが、これが細胞がん化に関わるシグナルとして有名な EGF 受容体シグナルと関連するの否かという問題に対して、本研究では、EGF 受容体シグナルと紫外線受容のシグナルでは細胞内の MAP3K 活性の発生する場所が全く異なっており、紫外線に対するストレス応答シグナルは EGF 経路のような細胞膜由来ではなく、むしろ細胞内部のシグナルによって活性化されていることが明らかになった。

また、多くの抗がん剤と同様に DNA 損傷を起こすアルキル化剤 MMS (メチルメタンスルホネート) によって生じる MAP3K 活性化は、十分に高濃度で与えた場合にも、細胞ごとに応答を起こすまでの時間は長く、しかも、細胞間のバラツキが非常に大きいことを発見した。一方で、サイトカイン刺激等の場合はこのようなバラツキは観察されなかった。

DNA 損傷から細胞死などを引き起こす過程においては、例えば細胞周期の違いなどの何らかの間接的な制御が働くことによって、個々の細胞ごとに MAPK 経路の活性化のされ易さが違うことが示唆された。本研究で発見されたこの現象は、がん細胞が抗がん剤耐性を獲得するメカニズムの一端を担う可能性がある。今後、さらに多くの抗がん剤によるがん細胞内の MAPK 経路活性化の時空間動態を検討することで、がん治療にも有用な知見が得られるものと期待される。

本研究において、時間・空間解像度の高い先鋭的な光学解析法を新規開発したことにより、従来法では知ることが困難な時空間的な MAP3K 活性化動態の情報を取得し、さらに、その時空間動態という観点から、未解明のストレス応答シグナルが他のシグナルとどのように一致、あるいは分離されているのかを理解するという非常に独創的な研究成果を得ることができた。

以上の成果の一部は既に学会で公表している。また、学術雑誌に論文を投稿中である。

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)

[学会発表](計3件)

富田太郎、武川睦寛、斎藤春雄
第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会一般口頭発表およびポスター発表
演題：ストレス応答 MAP3K 活性の可視化解析

発表年月日:(ポスター): H20 年 12 月 10 日 / (口頭): H20 年 12 月 12 日
場所：神戸国際展示場

富田太郎、武川睦寛、斎藤春雄
第 82 回日本薬理学会年会 一般口頭発表
演題：MAP3K 活性化のリアルタイムイメージングによるストレス応答シグナル動態の解明
発表年月日： H21 年 3 月 16 日 (月)
場所：パシフィコ横浜

富田太郎、武川睦寛、斎藤春雄
第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会一般口頭発表およびポスター発表
演題：ストレス応答 MAP3K 活性可視化プロトコルの創製とその応用
発表年月日:(ポスター): H19 年 12 月 12 日 / (口頭): H19 年 12 月 12 日
場所：パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 太郎 (TOMIDA TAICHIRO)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：70396886

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

