

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07020

研究課題名(和文)核小体におけるストレス感知：PICT1を起点としたその仕組みの解明

研究課題名(英文)Nucleolar stress sensing in the nucleolus

研究代表者

前濱 朝彦(Maehama, Tomohiko)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40322755

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)：リボソーム合成不全などによって惹起される核小体ストレスシグナルの中核を担う PICT1 に結合して PICT1 を安定化する分子の同定を試みた。アフィニティープルダウンによって見出した PICT1 結合分子群の中から、遺伝子ノックダウンによる PICT1 不安定化、リコンビナントタンパク質の直接結合、プロテアソームによる PICT1 の *in vitro* 分解に対する阻害作用、核小体ストレスによる結合の解離、などを指標としたスクリーニングを行い、最終的に一つの分子 RPX が生理的環境下における PICT1 安定化因子であることを新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：The nucleolus is a signaling center for nucleolar stress, which is induced by impaired ribosome biogenesis. PICT1 is known to play critical roles in the nucleolar stress response. In this study, I performed siRNA-mediated gene silencing, affinity pulldown, and *in vitro* PICT1 degradation assay to identify a stabilizing factor(s) which binds to and stabilizes PICT1 protein. I also conducted immunoprecipitation assay to analyze nucleolar stress-induced dissociation of PICT1 and candidate stabilizing factor(s). As the result, I successfully found that RPX directly bound to PICT1 and repressed PICT1 degradation by 20S proteasome *in vitro*. In addition, immunoprecipitation assay showed that the nucleolar stress significantly decreased PICT1-RPX interaction, suggesting RPX is an upstream factor which regulates PICT1 stability and the nucleolar stress response.

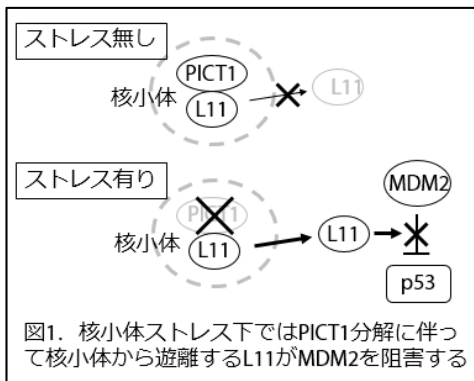
研究分野：生化学・分子細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 核小体ストレス

1. 研究開始当初の背景

リボソームはタンパク質を合成する唯一の分子マシンであり、核小体で行われるその生合成の異常は細胞にとって致命的となる。そのため、細胞にはこの異常(核小体ストレス)に対して、がん抑制因子 p53 の活性化を介して細胞周期の停止や細胞死を誘導する機構が備わっている。

核小体タンパク質 PICT1 はリボソームタンパク質 L11 と結合して L11 を核小体に繋ぎ止めている。核小体ストレス下では PICT1 が分解され、その結果 L11 が核質へ移動し、そこで MDM2 を阻害して、p53 活性化が起こる(図1)。すなわち、ストレスにตอบสนองした PICT1 の分解は p53 活性化を引き起こす一連の反応のトリガーとなる。この PICT1-L11-p53 という応答経路は、DNA 損傷や栄養飢餓といった核小体が感知する多様なストレス応答でも利用されている。



PICT1 タンパク質の約 8 割は天然変性領域から成っており、PICT1 は構造的に非常に不安定な特性を示す。核小体内の PICT1 はリボソームタンパク質群と会合し比較的安定な複合体として存在しているが、界面活性剤によって複合体を壊した場合や単離した場合には PICT1 は極めて不安定となり、ユビキチン化に依存せずにプロテアソームによって容易に分解される。つまり PICT1 は、非ストレス下では PICT1 を安定化する分子と結合することで分解から免れているが、ストレスに曝された時には、これらの分子から解離し、不安定化することで、プロテアソームによってユビキチン化非依存性に分解されると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、核小体におけるストレス感知・応答の仕組みを明らかにするため、ストレス応答シグナルの中核を担う核小体タンパク質 PICT1 に着目し、PICT1 の安定化を司る上流因子の同定を第一の目標とする。また、核小体ストレスにตอบสนองした PICT1 およびその安定化因子の動態を解析することで、核小体ストレス応答の分子機構を解明し、ストレスセンサー分子の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1)遺伝子ノックダウンによる PICT1 安定化

因子スクリーニング

Lipofectamine RNAi Max を用いて HeLa 細胞に siRNA を導入した。siRNA は Bioneer 社で合成したものをを用いた。siRNA 導入の 3 日後に細胞ライセートを調製し、このライセートをニトロセルロースフィルター上にプロットした後、抗 PICT1 抗体による検出を行い、コントロール細胞に対するシグナルが 1/2 以下に減弱したものを陽性(PICT1 安定化因子の候補分子)と評価した。

(2)PICT1-安定化因子結合の評価

リコンビナント PICT1 は GST 融合タンパク質として大腸菌に発現させ、グルタチオンセファロースを用いて精製した後、GST 部分を除去したものを PICT1 タンパク質標品として用いた。PICT1 安定化(候補)因子は MBP タグを N 末端に付加して大腸菌で発現させ、アミロースレジンを用いて精製した。PICT1 と安定化因子およびアミロースレジンを混和しインキュベートした後に、遠心によってレジン回収し、結合している PICT1 および MBP 融合タンパク質(安定化因子)をウェスタンブロットによって検出して PICT1-安定化因子結合を評価した。また PICT1 と安定化因子を予めインキュベートして結合させた後に 20S プロテアソームを添加し、37、90 分反応させ、ウェスタンブロットによって PICT1 を検出することで、20S プロテアソームによる PICT1 分解活性および安定化因子の効果を評価した。

(3)免疫沈降法による細胞内での PICT1-RPX 結合の評価

EGFP-PICT1 を安定発現する HeLa 細胞に mCherry-RPX を発現させ、アクチノマイシン D (5 nM) で 8 時間処理して核小体ストレスを惹起した。この細胞からライセートを調製し、抗 GFP 抗体による免疫沈降を行い、結合している mCherry-RPX をウェスタンブロットによって検出し、PICT1-RPX 結合を評価した。

4. 研究成果

(1)PICT1 安定化因子の同定

これまでにアフィニティープルダウン法を用いて同定した 49 種の PICT1 結合分子の遺伝子ノックダウンを行い、細胞内 PICT1 タンパク質の減少を引き起こす分子の同定を試みたところ、9 分子を PICT1 安定化因子の候補分子として同定した。次にこれら 9 分子のリコンビナントタンパク質を調製し、PICT1 との結合を検討したところ、5 分子が PICT1 と直接結合することを明らかにした。さらに、20S プロテアソームによる PICT1 分解アッセイにおいて、これら 5 分子のうち 3 分子が PICT1 分解を抑制することを見出した(図 2)。最後に、細胞内におけるこれらの 3 分子と PICT1 との結合および核小体ストレスによる結合の変化を検討したところ、3 分子ともに細胞内において PICT1 と結合している

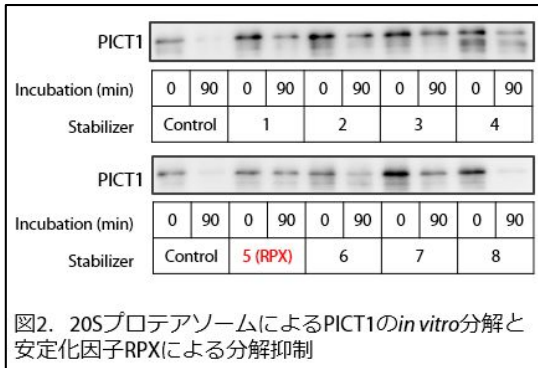


図2. 20SプロテアソームによるPICT1の*in vitro*分解と安定化因子RPXによる分解抑制

ことが観察されたが、このうち 1 分子(RPX)と PICT1 との結合が核小体ストレスによって減弱すること、すなわちストレスに反応して結合の解離が見られることが明らかになった(図3)。また PICT1-RPX 結合に RNA 分子が必要であることも新たに見出しており、この結合がある種の RNA 分子のモニター機能を有していること、すなわち核小体ストレスセンサーとして機能している可能性が示された。

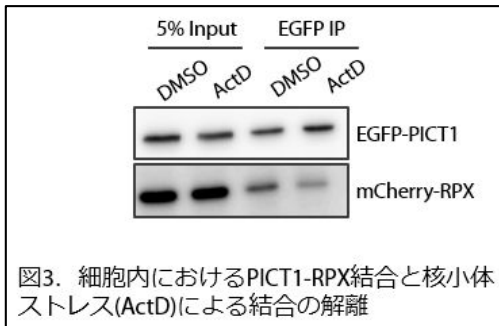


図3. 細胞内におけるPICT1-RPX結合と核小体ストレス(ActD)による結合の解離

(2)分解抵抗性 PICT1 変異体の同定

核小体ストレスによる PICT1 の不安定化機構を考える上で、ストレスによる PICT1 分子の質的变化も重要な要素である。タンパク質の質的变化の多くは翻訳後修飾によってもたらされることが多いため、まず PICT1 分子上で推測される翻訳後修飾部位について、その変異体を網羅的に作成し、細胞内での安定性やストレスによる変化を解析した。その結果、C 末端側の一つのリジン残基をアルギニン残基に置換した変異体(PICT1-KR)がストレスに反応した分解に対して強い抵抗性を示すことを見出した。このリジン残基は核小体局在シグナルの一部となっているため、まず PICT1 の局在に対する KR 変異の影響を検討したところ、PICT1-KR は野生型と同様に核小体に局在していることが明らかとなり、この変異の影響は細胞内局在ではなく、当初の予想通り PICT1 上の翻訳後修飾の変化あるいは PICT1 と他分子との相互作用の変化にあると考えられた。このリジン残基は SUMO 化推測部位であるため、PICT1 の SUMO 化を検討したが、ストレスの有無に関わらず PICT1 の SUMO 化は検出されなかった。またユビキチン化も同様に検出することができなかったことから、このリジン残基のアセチル化あるいはこのリジン残基を介した分子間結合の変

化が PICT1 の分解耐性を生んでいることが考えられた。

以上の結果から、本研究では核小体ストレス応答における PICT1 の役割として、安定化因子 RPX あるいはリジン残基を介したストレスセンサー分子としての機能を新たに提唱することができた。今後、RPX あるいはリジン残基の作用機序をさらに解析することで核小体ストレス応答の分子メカニズムの全貌の解明につながることを期待される。

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7件)

Goto H, Nishio M, To Y, Oishi T, Miyachi Y, Maehama T, Nishina H, Akiyama H, Mak TW, Makii Y, Saito T, Yasoda A, Tsumaki N, Suzuki A.

Loss of *Mob1a/b* in mice results in chondrodysplasia due to YAP1/TAZ-TEADs-dependent repression of SOX9.

DEVELOPMENT in press, 2018、査読有

Nakatani K, Maehama T, Nishio M, Goto H, Kato W, Omori H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A.

Targeting the Hippo Signaling Pathway for Cancer Treatment.

JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 161:237-244, 2017、査読有

Nishio M, Maehama T, Goto H, Nakatani K, Kato W, Omori H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A.

Hippo vs. Crab: Tissue-specific functions of the mammalian Hippo pathway.

GENES TO CELLS 22(1):6-31, 2017、査読有

Otsubo K, Goto H, Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, Nishie W, Sasaki T, Maehama T, Nishina H, Mimori K, Nakano T, Shimizu H, Mak TW, Nakao K, Nakanishi Y, Suzuki A.

MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion, and tumor formation.

ONCOGENE 36:4201-4211, 2017、査読有

後藤裕樹、西尾美希、加藤雅子、前濱朝彦、鈴木聡.

機械的刺激による Hippo-YAP/TAZ 経路の活性化、生理作用、腫瘍進展メカニズムと意義.

生体の科学、67:127-131、2016、査読無

前濱朝彦、鈴木聡.

PTEN:脂質ホスファターゼとしての機能と発

がんへの関与。
実験医学、33(増刊号 15):157-163、2015、
査読無

前濱朝彦、鈴木聡。
PTEN。
日本臨牀、73(増刊号 6):285-290、2015

[学会発表](計 1 1 件)

Maehama T, Nishio M, Miyachi Y, Suzuki A.
Regulation of nucleolar stress response and tumorigenesis by PICT1.
第 2 回 神大・ワシントン大・オスロ大 国際
合同シンポジウム。
Honolulu, HI, USA.
2018.3.7-3.8

西尾美希,前濱朝彦,上田史仁,鈴木 聡。
Hippo シグナル経路による細胞増殖変化と細胞間コミュニケーション。
新学術領域「幹細胞老化と疾患」「細胞競合」
総括班主催「若手の会」。
2018年2月2-3日,熱海

宮地洋佑,西尾美希,前濱朝彦,鈴木 聡。
唾液腺における Mob1a/1b の機能解析。
新学術領域「幹細胞老化と疾患」「細胞競合」
総括班主催「若手の会」。
2018年2月2-3日,熱海

前濱朝彦,宮地洋佑,西尾美希,鈴木 聡。
がん制御因子 PICT1 の安定化機構。
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
ConBio。
2017年12月6-9日,神戸

宮地洋佑,西尾美希,後藤裕樹,前濱朝彦,
鈴木 聡。
唾液腺における MOB1A/1B の機能解析。
文部科学省 新学術領域研究 学術研究支援
基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会。
2017年9月7-9日,蓼科

Nishio M, Maehama T, Suzuki A.
Hippo signaling pathway affects cell competition in mammalian cells via cell-ECM binding and anchorage-dependent cell proliferation.
3rd International Symposium on Cell Competition.
2017年8月29日,札幌

前濱朝彦,宮地洋佑,鈴木 聡。
がん制御因子 PICT1 の安定化機構。
第 16 回 生命科学研究会。
2017年6月30日-7月1日,金沢

Miki Nishio, Tomohiko Maehama, Hideru Togashi, Yohei Shimono, Akira Suzuki.
Role of Hippo pathway *in vivo*.
神戸大学・ワシントン大学・オスロ大学国際
合同シンポジウム。
2017年3月13-14日 神戸

Miki Nishio, Hiroki Goto, Kohei Otsubo, Hideru Togashi, Yohei Shimono, Tomohiko Maehama, Akira Suzuki.
Role of Hippo pathway in vivo.
第 75 回日本癌学会学術総会 Advances in cancer animal model: from mechanisms to clinical output がん動物モデルの新展開:メカニズムから臨床応用まで。
2016年10月6-8日 横浜

田中雅人,後藤裕樹,西尾美希,中谷圭佑,前濱朝彦,富樫 英,下野洋平,鈴木聡。
遺伝子改変動物を利用した,形態形成における Hippo 経路の機能解析。
第 48 回日本臨床分子形態学会ワークショップ □ ゲノム編集の形態学研究への応用。
2016年9月23-24日 熊本

渡邊菜月,野崎智義,前濱朝彦,津久井久美子。
赤痢アメーバにおけるホスファチジルイノシトールシグナルの解析。
第 57 回日本脂質生化学会。
2015.5.28-29、東京

[図書](計 0 件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/mcb/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
前濱 朝彦 (MAEHAMA, Tomohiko)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 4 0 3 2 2 7 5 5