

# 様式 C-19

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 4月 17日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007-2008

課題番号:19592173

研究課題名(和文) Hypoxia に関わる新しいER stress 経路の同定

研究課題名(英文) Identification of a noble ER stress pathway in hypoxia

研究代表者

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA YUKA)

長崎大学医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号:10244089

研究成果の概要:

低酸素分圧(Hypoxia)は、癌化、癌転移に重大な影響を与え、タンパク質の発現および活性上昇が小胞体ストレス応答として始まる。我々は、Hypoxiaによって発現が減少する、リボゾーム結合タンパク質(35kDa)の存在を見いだした。本研究では、このp35 proteinの同定と小胞体ストレスに関わっている経路を探索してその役割を解析する事を目的とした。p35 proteinは、 $\alpha$ NACであると同定できた。 $\alpha$ NAC蛋白が亡くなる事により小胞体ストレスが引き起こされ、最終的に細胞死に至る事を発見した。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1800000	540000	2340000
平成20年度	1700000	510000	2210000
年度			
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード: hypoxia, ER stress

### 1. 研究開始当初の背景

低酸素分圧領域(Hypoxia)は、多くの癌に存在し、癌化、癌転移に重大な影響を与える。それは、Hypoxiaの癌細胞は、

薬剤や放射線の抗ガン治療に抵抗性のため、癌の活性を上昇させ、癌転移を起こしやすい悪性度の高い癌になるためである。実際、頭頸部癌におけるHypoxiaの存在は、

臨床的に癌治療予後を不良にし、患者の生存率を下げるとの報告がある (Mol. Cancer Res. 4, 423-435, 2006; Cancer Metastasis Rev. 23, 293-310, 2004他)。

Hypoxiaの状態になると細胞内では、小胞体 (Endoplasmic reticulum, ER) ストレスが起こり、幾つかのタンパク質の発現および活性上昇が小胞体ストレス応答として始まる (Nat Rev Cancer. 4, 966-77, 2004; Mol. Cell 6, 1099-1108, 2000他)。小胞体ストレスとは、小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積する状態を指すが、その応答には以下の3つがある。(1) 小胞体にそれ以上新生タンパク質が送られないようにするため、タンパク質の翻訳を抑制したり、あるいは、(2) 小胞体内チャペロンを増やすことによって、小胞体内折りたたみ機構を増強させたりする。しかし、それでも状況が改善しないときには、(3) 細胞死を起こして細胞を死滅させる。この分子機構は、ER膜上の3つの小胞体ストレスセンサー (PERK, IRE1およびATF6) が活性化する事により始まり、それぞれ異なった形で下流へシグナルを伝達するといわれている。

我々は、以前より、リボゾームで働くタンパク質の同定および役割の解析を行い、リボゾーム上のペプチド鎖に結合している50kDaのタンパク質を見出した。我々は、これをeIF1 $\alpha$  (elongation factor 1 $\alpha$ ) と同定し、eIF1 $\alpha$ は変性したタンパク質のrefolding活性を持っていることを証明した (J Biol. Chem. 277, 18545-51, 2002)。

## 2. 研究の目的

研究を継続中に、我々は、Hypoxiaによって発現が減少する、リボゾーム結合タンパク質 (35kDa) が存在することに気づいた。アネロパックにてHela S3細胞を嫌気状態にした時の、リボゾーム結合タンパク質を細胞より精製採取し、SDS pageにて分離した。以下この蛋白質を p35 proteinと呼ぶ。小胞体ストレスセンサーの1つであるPERKが活性化する事により、eIF-2 $\alpha$  がリン酸化され、リボゾーム上での蛋白の翻訳を停止させる経路があることはよく知られていた (Mol. Cell Biol. 22, 7405-7416, 2002 他)。eIF-2 $\alpha$ は、メチオニン-tRNAをリボゾームに運び、リボゾーム上で蛋白の翻訳を開始するために働く蛋白である。こうした事実からすると、我々が発見したリボゾーム結合タンパク質 p35 proteinも、小胞体ストレスによる転写抑制および細胞死に強く関係している可能性がある。したがって、本研究では、この p35 proteinの同定とER stressに関わっている経路を探索してその役割を解析したいと考えた。

## 3. 研究の方法

<平成19年度>

この年度は、p35 proteinを同定する事と、Hypoxiaに対しp35 proteinの a) 蛋白質レベル b) 細胞内局在の変化を解析し、Hypoxiaとp35 proteinとの発現との関係を調べることに目標を置いた。

<平成20年度>

この年度では、前年度で得られた結果を基に、遺伝子導入を用いて、Hypoxiaにより惹起されたER stressにおけるp35 protein

の役割を解明することを目的とした。

#### 4. 研究成果

<平成19年度> p35 protein は  $\alpha$ NAC (nascent polypeptide associated complex) であると同定できた。ヒト子宮頸部癌細胞 HeLa S3 細胞にて、 $\alpha$ NAC の抗体を使用して蛋白発現を見たところ、 $\alpha$ NAC は Hypoxia の時間経過とともにその蛋白発現量が減少している事が解った (Fig. 1a)。また、細胞が 16h から浮遊しており細胞死を起こし始めていると思われた (Fig. 1b)。実際、細胞を DAPI 染色および Annexin assay で見たところ、24h 後には核の分断化が認められ、apoptosis を起こしていることが示唆された (Fig. 1c, d)。また、 $\alpha$ NAC の時間経過による蛋白発現量減少は、inhibitor による実験から caspase による切断ではないと考えられた (Fig. 1e)。同様の実験をヒト神経芽細胞腫細胞 SK-N-SH にて行ったところ、HeLa S3 細胞と同様の結果を得た (Fig. 2)。

<平成20年度> その同定した $\alpha$ NAC を特異的に抑制するために siRNA を作製し、HeLa S3 に導入した。siRNA を導入することにより、 $\alpha$ NAC 蛋白が減少することを Western blot により示した (Fig. 3a)。

$\alpha$ NAC 蛋白が亡くなる事により細胞死が引き起こされる事を位相差顕微鏡図、免疫染色、Annxin assay、TUNEL assay にて示した (Fig. 3b, c, d, e)。 $\alpha$ NAC 蛋白が亡くなる事により ER stress が引き起こされることは、ER stress 関連のタンパク質発現を Western blot により示した (Fig. 4a)。

#### 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 1 件)

$\alpha$ NAC の低下によってはじまるERストレス由来のアポトーシス

佛坂 由可、中村 卓

第48回日本歯科放射線学会総会・学術、大宮、2007年5月

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA YUKA)

長崎大学医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：10244089

##### (2) 研究分担者

片山 郁夫 (KATAYAMA IKUO)

長崎大学医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：80295089

田代 茂樹 (TASHIRO SHIGEKI)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20300882

角 忠輝 (SUMI TADATERU)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80284701

中村 卓 (NAKAMURA TAKASHI)

長崎大学医学部・歯学部附属病院・教授

研究者番号：30172406

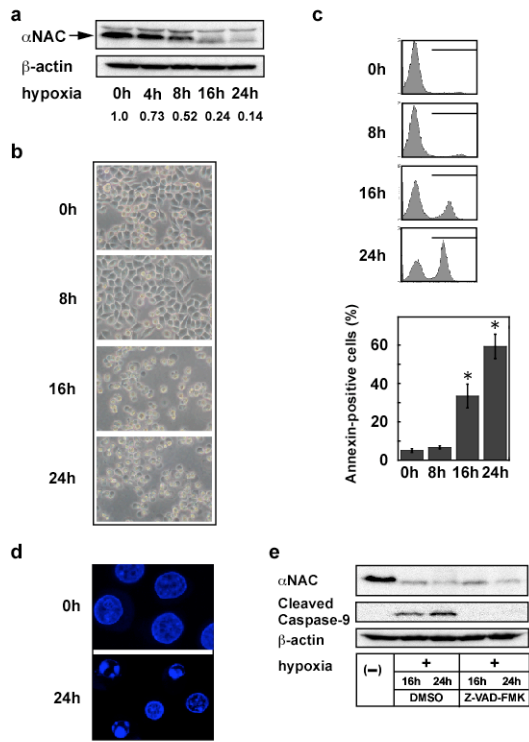


Figure 1a, b, c, d, e

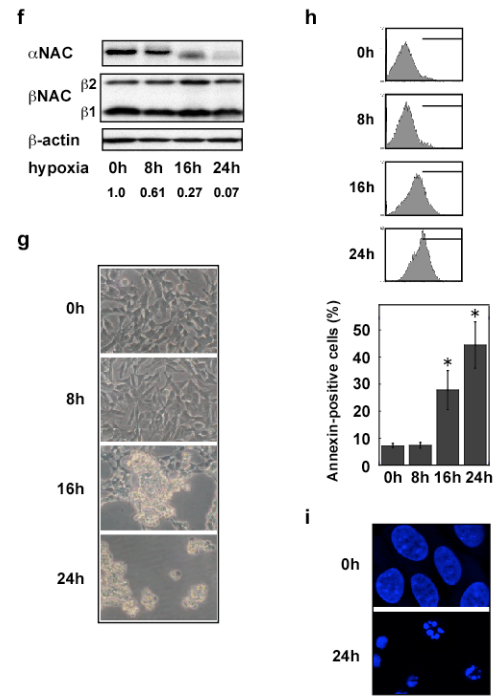


Figure 2f, g, h, i

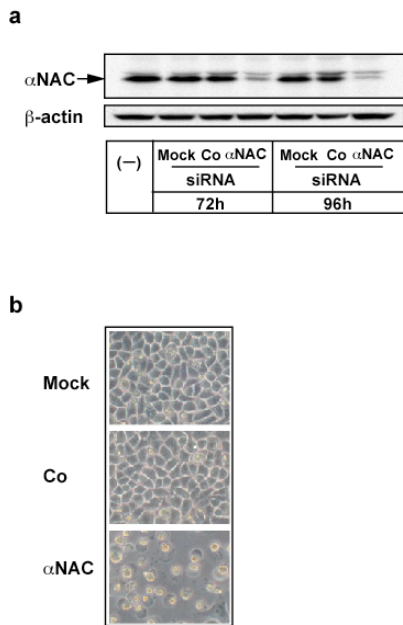


Figure 3a, b

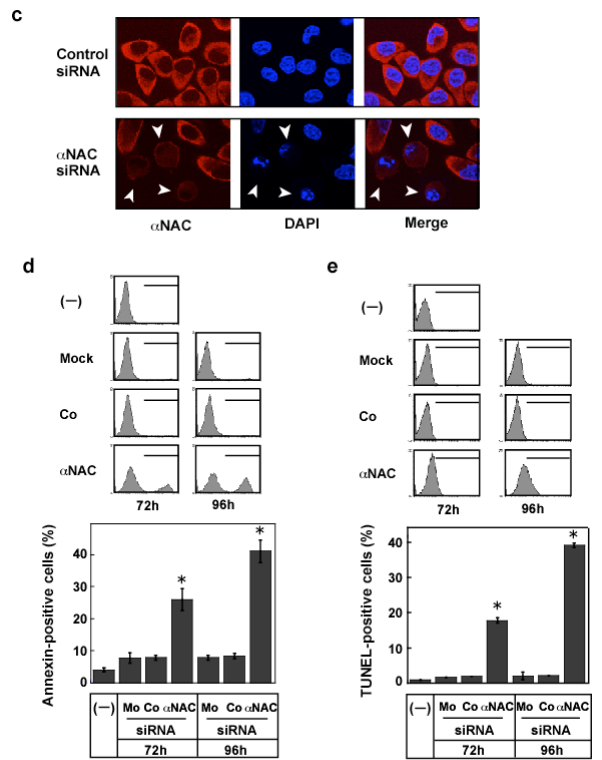


Figure 3c, d, e

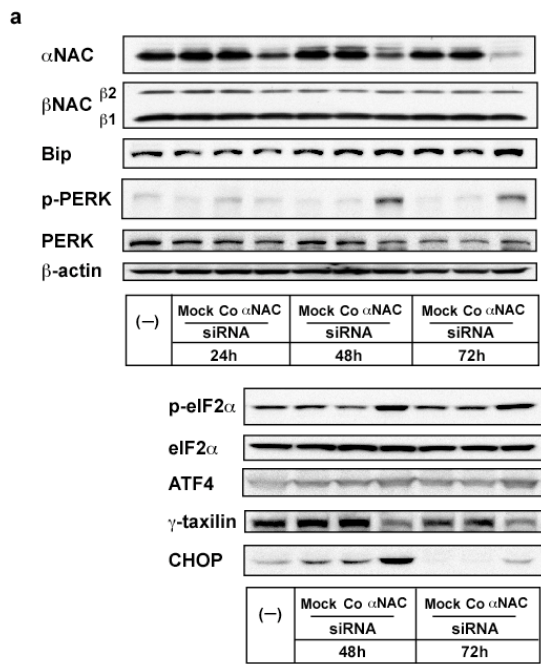


Figure 4a