

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770137

研究課題名 (和文)

MAPKKK 活性化の時空間動態を指標とするストレス受容機構の研究

研究課題名 (英文)

Imaging analysis of stress signaling and spatio-temporal dynamics 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 (和文)：高効率に最大で数千個の生細胞からの FRET シグナルを一度に可視化する実験系を作成し、詳細な MAPK および MAP3K 活性の時系列データを大量に取得可能になった。この系で細胞内局所のキナーゼ活性を解析した結果、翻訳阻害剤 (アノマイシン) や紫外線、インターロイキン 1 で刺激した細胞では、細胞質で p38 が強く応答することが確認された。さらに、個々の細胞の応答性については従来測定が困難であったが、本実験系を用いて、翻訳阻害ストレス下では、細胞質の p38 はどの用量でも細胞毎に均一に揃って同程度に活性化されている (graded-response) ことが初めて明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：(1) Automated FRET analysis system was established by which intracellular MAPK activity from more than 1,000 cells can be imaged simultaneously in real-time. (2) By administrating MAPK activity FRET reporter to subcellular components, spatial distribution of stress-activated MAPK activity was determined. I found that ribotoxic stress, UV, hyperosmotic stress, and interleukin-1 induces p38 MAPK activation in cytoplasm. (3) Before this study, individual cellular response in mammalian cells has been not well understood because of the lack of the tools to determine individual cellular response with a good quantitativity. Using automated FRET system and MAPK activity indicator, I identified that ribotoxic stress response in individual cell was similar to average response of cell population at any doses applied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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) ストレス応答の情報伝達経路において、紫外線や高浸透圧などの物理化学的なストレスを細胞が感知して、細胞内情報伝達を活性化させる分子メカニズムが不明であった。

(2) ストレス応答 MAPK 経路は各種ストレスやサイトカインによって活性化されるが、細胞内のどこから、どのようにシグナル伝達が広がるのかはほとんど不明であった。

(3) ストレス応答 MAP3K 活性を可視化できるようになったが、通常の蛍光イメージングによる解析では効率が悪かった。

## 2. 研究の目的

(1) 各種ストレスによって細胞内のどこで MAPK 経路の分子が活性化されるのかを特定する。

(2) さらにそれぞれの場所で MAPK 経路活性を引き起こすストレスセンサー分子や MAPK 上流因子の探索を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 高効率に多数の細胞からの FRET 計測が可能な実験系を確立させ、これにより、MAPK 経路分子活性化の時空間的動態を明らかにする。

(2) FRET 測定によって、RNAi などの手法により、MAPK 経路の上流分子の同定を行う。

## 4. 研究成果

(1) 高効率に生細胞内局所の MAPK 活性を測定するハイスループット FRET 測定系の構築を行った。

当初はセルソーターやマイクロプレートリーダーを用いる方法でこれを達成する予定であったが、細胞の状態の安定性や計測のシグナル感度から、顕微鏡下でマイクロプレート上の細胞を自動計測する方法によってこれを達成した。この系によって、同時に数千個以上の細胞からの FRET シグナルをほぼ自動で計測できるようになり、細胞毎の時間経過も詳細に追跡可能になった。

(2) MAPK 活性の時空間動態およびその制御因子の解明。

細胞内局所のキナーゼ活性を解析した結果、翻訳阻害剤 (アニソマイシン) や紫外線で刺激した細胞では、ストレス応答経路の MAP3K が細胞質で強く活性化した。このことから、この下流の p38 も細胞質で応答すると予想されたが、実際にこれが確認された。また、高浸透圧および IL-1b によっても、細胞質において p38MAPK 活性化が強く生じることが分かった。

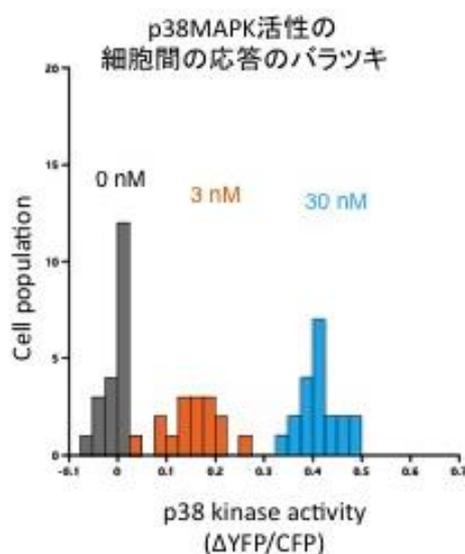
(3) TNF- $\alpha$  経路の MAP3K の同定。

ストレス応答経路の MAP3K の TAK1 を shRNA によって発現抑制させると、TNF- $\alpha$  依存的な MAP3K 活性化のシグナルが大きく抑制されることが FRET イメージングにより同定された。

(4) 細胞集団のストレス応答経路活性化の均一性と不均一性の解析。

ストレス応答経路の構成因子の異常はがんや免疫疾患などの原因としても知られ、この経路は治療薬、治療法の鍵となる標的である。しかしながら、これまでの生化学的な解析では細胞集団の知見に基づいたものがほとんどであり、応答の細胞間での均一性・不均一性はほとんど理解が進んでいない。

本研究で構築した高効率な FRET 測定実験系を用いることによって、翻訳阻害ストレスに



## 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1件)

Taichiro Tomida, Pauline O'Grady, Mutsuhiro Takekawa, Haruo Saito. Stimulus-specific distinctions in spatial and temporal dynamics of stress-activated protein kinase kinases revealed by a fluorescence resonance energy transfer biosensor. *Molecular and Cellular Biology*, 査読有、Vol.29, No.22, 2009, pp.6117-6127.

〔学会発表〕（計3件）

1. 富田太郎、斎藤春雄

第84回日本薬理学会年会、誌上発表

演題：線虫感覚神経のMAPキナーゼリン酸化シグナルのin vivoイメージング解析発表

発表年月日：H23年3月22～24日

場所：パシフィコ横浜（東日本大震災により誌上開催に変更）

2. 富田太郎、斎藤春雄

第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会ポスター発表

演題：ストレス応答MAPキナーゼ活性の可視化解析

発表年月日：H22年12月10日

場所：神戸国際会議場

3. 富田太郎、斎藤春雄

第54回米国生物物理学会年会、ポスター発表

演題：SPATIO-TEMPORAL DYNAMICS OF STRESS-ACTIVATED MAP3K ACTIVITY REVEALED BY A NOVEL FRET BIOSENSOR.

発表年月日：H22年2月24日

場所：モスコーンセンター、米国サンフランシスコ

〔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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし。

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