

平成23年 5月26日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790182

研究課題名(和文) 機能未知細胞内構造STBとステロイド受容体の相互作用及び細胞内ダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Analysis of the interaction of STB with steroid hormone receptors and their subcellular dynamics

研究代表者

藤永 竜太郎 (FUJINAGA RYUTARO)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30335723

研究成果の概要(和文)：STBは、アンドロゲン受容体やグルココルチコイド受容体とリガンド結合ドメインを介して細胞質内で相互作用することが明らかになった。さらに、STBと結合した受容体のリガンド依存的な核内移行はプロテアソーム阻害剤により抑制されることが示された。これらの結果は、STBがアンドロゲン受容体やグルココルチコイド受容体の細胞質内での修飾や核内移行制御に関与していることを示唆し、また、この制御にはユビキチン/プロテアソームシステムが深く関わっていることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：STB interacted with androgen receptor (AR) and glucocorticoid receptor (GR) through their ligand-binding domain in the cytoplasm. The ligand-dependent nuclear translocation of the receptors on STB was attenuated by the treatment of a proteasome inhibitor. The results suggested that STB is involved in the regulation of the cytoplasmic modification and nuclear translocation of AR and GR in a ubiquitin-proteasome system.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：HAP1、ハンチントン病、ステロイド受容体、タイムラプス、プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

Stigmoid body(STB)は、元々、ラット脳において神経細胞質に見出された電子顕微鏡で定義される直径1～4μmの機能未知封入体である。その後、神経細胞以外の種々の末梢臓器の細胞にも高頻度に存在することが明らかになってきている。また、STBのコア分子はハンチントン病関連蛋白質である

huntingtin-associated protein 1 (HAP1)であり、HAP1の細胞内導入で形成される構造がSTBであることが証明されている。HAP1/STBの生理機能については未知の部分が多いが、少なくともHAP1/STBがハンチントン病や球脊髄性筋萎縮症の病態保護因子であることが示されてきている。申請者は、1) HAP1/STBの脳内発現分布がステロイドホルモン受容

体の分布と類似していること、2) HAP1/STB がアンドロゲン受容体と培養細胞下で結合することから、HAP1/STB が種々のステロイドホルモン受容体の細胞質内制御に関連する構造である可能性を指摘してきた。本研究は、これをさらに詳細に解析し、発展させるものである。海外の2つのグループが、HAP1分子が蛋白質の細胞内輸送やカルシウム調節に関係している可能性を示唆しているが、HAP1がSTBに局在している形態学的事実とは結びつけられていない。現在までに、国内外の研究でSTBが偶然記載されることはあるもののSTBに注目している研究はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HAP1/STB と種々のステロイドホルモン受容体との結合性のスクリーニングを行い、HAP1/STB の受容体核内移行制御に対する役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 発現プラスミドの作製：HAP1 とアンドロゲン受容体の発現プラスミドは、報告済みなので、他のステロイドホルモン受容体遺伝子をラット由来 total RNA より RT-PCR によりクローニングした。(エストロゲン・グルココルチコイド・ミネラルコルチコイド受容体)。

(2) HAP1 とステロイドホルモン受容体の結合性：HAP1 を導入して STB 形成を誘導した COS-7 細胞にステロイドホルモン受容体遺伝子またはその deletion mutants を共発現させ、蛍光免疫二重染色、免疫沈降、in vitro binding assay により結合性の解析を行った。細胞培養は、チャコール/デキストラン処理した血清を含むメディウムを用い、ステロイドを低減させた状態にした。

(3) タイムラプス解析：細胞を 35 mm 底面ガラスディッシュに培養後、蛍光タンパク質を融合させた HAP1 とステロイドホルモン受容体を共発現させ、長期培養システム (セルセイバー：ニコン) にセットし、冷却 CCD カメラ搭載の蛍光顕微鏡下でタイムラプス画像取得を行った。画像は MetaMorph ソフトウェアで動画変換し解析した。必要に応じて、ステロイドリガンドやプロテアソーム阻害剤 (MG132) を添加した。

4. 研究成果

(1) クローニングしたステロイド受容体を COS-7 細胞に導入後、これらの発現をウエスタンブロッティングと免疫染色により確認した (図 1 A, B)。ステロイドがない条件ではアンドロゲン受容体 (AR), グルココルチ

コイド受容体 (GR), ミネラルコルチコイド受容体 (MR) は基本的に細胞質に散在的に発現し、エストロゲン受容体 α , β (ERs) は核内に局在した。AR においては、約 30% の細胞において凝集体を形成している様子も観察された (矢印)。

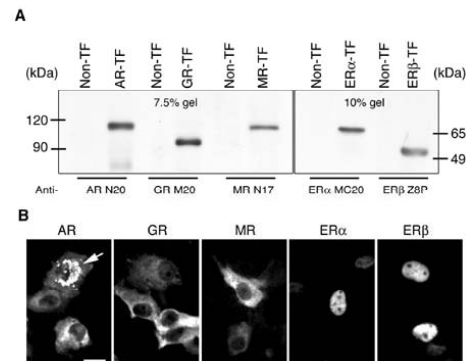


図 1 ステロイド受容体の発現確認

(2) HAP1 とそれぞれのステロイド受容体を COS-7 細胞に共発現させ免疫二重染色を行った (図 2)。その結果、HAP1/STB は GR 及び AR と共局在することが明らかになった。

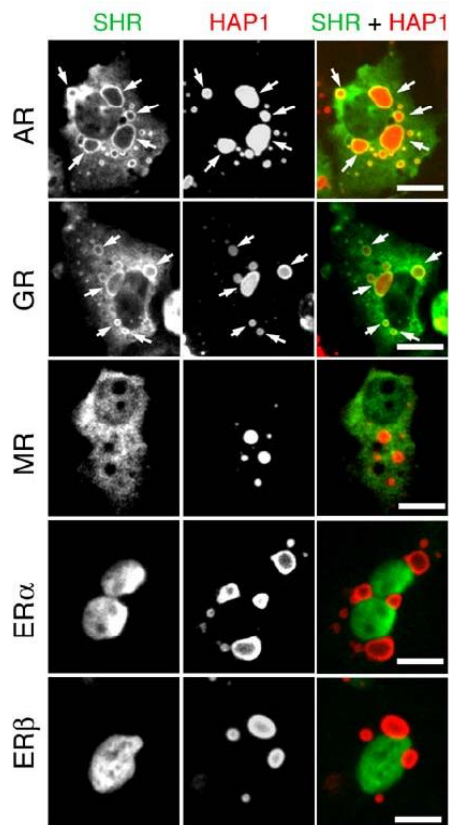


図 2 HAP1 とステロイド受容体の共発現解析 (矢印は GR または AR と共局在している HAP1/STB)

(3) HAP1 との共局在に重要なステロイド受容体のドメインを明らかにするために、種々の GR-deletion mutants を作製した(図 3A, B)。共発現解析の前に、それらの発現形態を調べたところ GRN543 は核に局在し、その他の mutants は細胞質 (GRN325) または細胞質と核 (GRN429, GRLBD) に発現した(図 3C)。

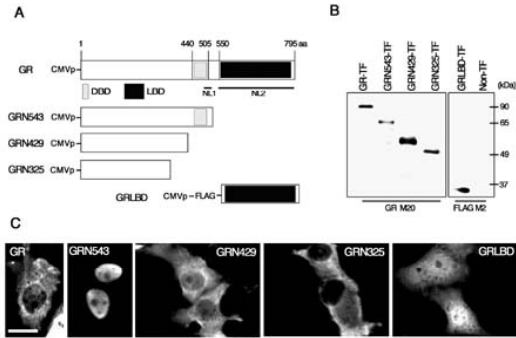


図 3 GR-deletion mutants の作製とその発現解析

(4) 作製した GR-mutants と HAP1 を共発現させたところ、リガンド結合ドメイン (LBD) を欠失したものは、HAP1/STB との共局在が観察されなくなった。一方で、LBD のみで HAP1/STB と共局在したことから、LBD が重要であることが示された(図 4A)。さらに、免疫沈降と *in vitro* binding assay によって、HAP1 は GRLBD のみならず ARLBD と結合することが証明された。HAP1 分子内では、1-473 のアミノ酸領域が直接結合することが示された(図 3B, C)。

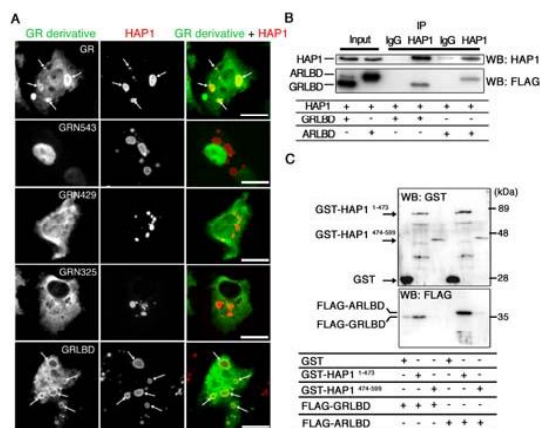


図 4 HAP1 と GR-mutants の共発現解析(A) (矢印は GR または GRLBD と共局在している HAP1/STB) 及び免疫沈降(B) と *in vitro* binding assay(C)

(5) 免疫染色と動画解析を行ったところ、HAP1/STB に局在している GR や AR も細胞質に散在的に分布する GR や AR と同様にステロイドに応答して核内移行した(図 5)。

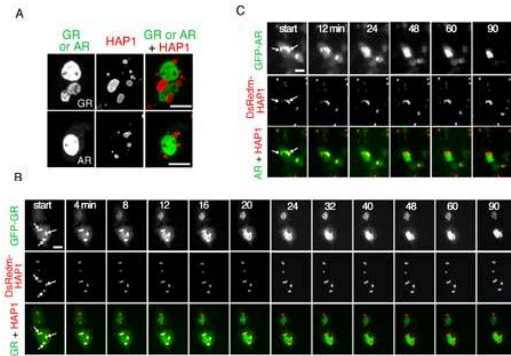


図 5 リガンド添加後の免疫染色(A)及びタイムラプス解析(B, GR; C, AR) (矢印は GR または AR と共局在している HAP1/STB)

(6) COS-7 細胞をプロテアソーム阻害剤である MG132 で 5 時間処理すると HAP1/STB と GR または AR との共局在頻度が約 2 倍に上昇することが分かった(図 6)。

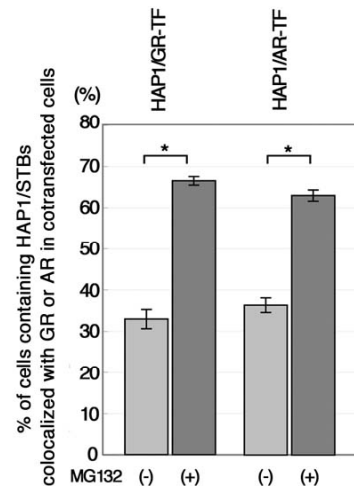


図 6 MG132 存在下または非存在下における HAP1/STB と GR または AR の共局在細胞の割合の比較 (共局在を示す細胞数/全共発現細胞数)

(7) MG132 存在下での GR 及び AR のリガンド依存的な核内移行を調べた。その結果、細胞質に散在的に分布する GR や AR は速やかに核内移行するが、HAP1/STB に局在している GR や AR の核内移行は遅延していることが明らかになった(図 7)。

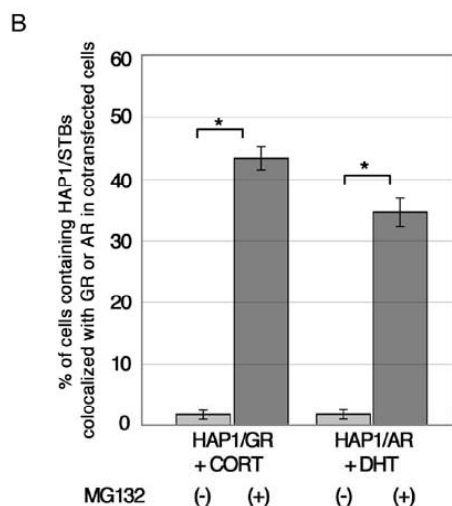
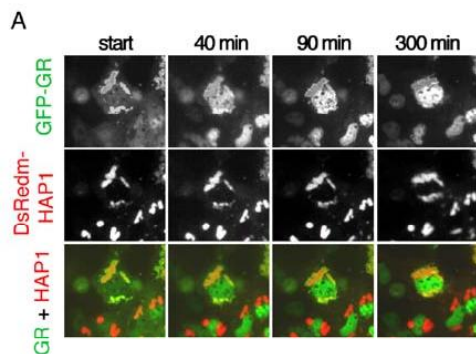


図7 MG132 存在下におけるステロイドリガンド添加後のGR動態のタイムラプス解析(A)とHAP1/STBとGRまたはARの共局在細胞の割合(B)

(8) 本研究の結果、HAP1/STBがアンドロゲン受容体やグルココルチコイド受容体と結合し、これら受容体の細胞質内での修飾や核内移行制御に関与していることが示唆された、またこの制御にはユビキチン/プロテアソームシステムが深く関わっていることが示された。本研究を進展させることにより、ステロイドによる細胞や個体の機能制御の理解のための新たなメカニズムを提供することが期待される。

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4件)

① RYUTARO FUJINAGA, YUKIO TAKESHITA, KAZUHIRO YOSHIOKA, HIROYUKI NAKAMURA, SHUHEI SHINODA, MD. NABIUL ISLAM, MIR RUBAYET JAHAN, AKIE YANAI, KEIJI KOKUBU AND KOH SHINODA.

Intracellular colocalization of HAP1/STBs

with steroid hormone receptors and its enhancement by a proteasome inhibitor. *Exp Cell Res.* 2011 (in press) doi:10.1016/j.yexcr.2011.05.004 査読有り

② YUKIO TAKESHITA, RYUTARO FUJINAGA, KEIJI KOKUBU, MD. NABIUL ISLAM, MIR RUBAYET JAHAN, AKIE YANAI, AKIRA KAKIZUKA, KOH SHINODA.

Interaction of ataxin-3 with huntingtin-associated protein 1 through Josephin domain.

Neuroreport. 2011 22(5):232-238.

査読有り

③ JUNE KAWANO, RYUTARO FUJINAGA, KIWAKO YAMAMOTO-HANADA K, YOSHITOMO OKA, YUKIO TANIZAWA, KOH SHINODA.

Wolfram syndrome 1 (Wfs1) mRNA expression in the normal mouse brain during postnatal development.

Neurosci Res. 2009 64(2):213-230.

査読有り

④ RYUTARO FUJINAGA, YUKIO TAKESHITA, KANAKO UOZUMI, AKIE YANAI, KAZUHIRO YOSHIOKA, KEIJI KOKUBU, KOH SHINODA.

Microtubule-dependent formation of the stigmoid body as a cytoplasmic inclusion distinct from pathological aggresomes.

Histochem Cell Biol. 2009 132(3):305-318.

査読有り

[学会発表] (計4件)

① Ryutaro Fujinaga, Yukio Takeshita, Kazuhiro Yoshioka, Hiroyuki Nakamura, Shuhei Shinoda, Akie Yanai, Keiji Kokubu, Koh Shinoda

Relaying function of the STB/HAP1 on nuclear translocation of androgen and glucocorticoid receptors and its proteasome-dependent regulation

Society for Neuroscience 40th Annual Meeting 2010, 11/15 San Diego USA

② 藤永 竜太郎, 竹下 幸男, 吉岡 和博, 中村 裕幸, 篠田 崇平, 柳井 章江, 国分 啓司, 篠田 晃

STB/HAP1 のアンドロゲン及びグルココルチコイドレセプターの核内移行中継機能とプロテアソーム活性の関与

Neuro2010 (第33回日本神経科学大会、第53回日本神経化学学会大会、第20回日本神経回

路学会大会 合同大会) 2010, 9/4 神戸
神戸コンベンションセンター

③藤永竜太郎、竹下幸男、吉岡和博、中村裕
幸、篠田崇平、柳井章江、國分啓司、篠田晃
細胞質内封入体 STB とステロイド受容体の相
互作用及びその細胞内動態制御
第 115 回 日本解剖学会総会・全国学術集会
2010, 3/28 盛岡 岩手県民会館

④藤永竜太郎、魚住加奈子、竹下幸男、柳井
章江、國分啓司、松尾義久、篠田晃
ラット脳内における HAP1 の時空間的発現パ
ターンと stigmoid body 形成に関する形態学
的解析
第 50 回 日本組織細胞化学会総会・学術集
会 2009, 9/27 大津 滋賀県立県民交流セ
ンター

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤永 竜太郎 (FUJINAGA RYUTARO)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30335723

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし