

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月2日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592088

研究課題名（和文） DNA障害に起因する細胞死におけるERストレス経路の関与

研究課題名（英文） ER stress pathway in apoptosis of DNA damage

研究代表者

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA YUKA)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：10244089

研究成果の概要（和文）：

本研究では、DNA 障害による細胞死にER stress が関与していることを示し、そのメカニズムを解明する事を目的としていた。しかし、研究を遂行中に、hypoxiaにおいて γ -taxilinの発現が減少し蛋白分解が起こることを見出した。よって、hypoxiaによる細胞死における、 γ -taxilinの関与とそのメカニズムを解明する事に目的を変更し、研究を進めた。そして、 γ -taxilinの発現が減少する事によって細胞死が引き起こされる事を発見した。さらに、その細胞死がER stressを介しており、さらにミトコンドリアにも関与している事を示した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to show that ER stress is related to the cell death of DNA damage and to elucidate the mechanism. However, We have found that γ -taxilin is downregulated and protein degradation of γ -taxilin occurs in hypoxia during the research. Therefore, the purpose was changed to clarify that γ -taxilin is involved in the cell death caused by hypoxia. And it was found that cell death is caused by the degradation of γ -taxilin. In addition, the cell death was participated in the ER stress and mitochondria pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

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, γ -taxilin

|

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り込ま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。

2. 研究の目的

平成19-20 年度科学研究費基盤C「Hypoxia に関わる新しいER stress 経路の同定」(課題番号19592173)にて、われわれは、hypoxia における α NACを介した新しい小胞体ストレス (ER stress) 経路を同定し、論文として発表した (Cell Death Differ 16: 1505-14; 2009)。

γ -taxilin は α NAC 蛋白と結合している蛋白であり、ER stressに関与している遺伝子の転写coactivator である。したがって、 γ -taxilin は α NAC と相互に関係しながら、ER stress を誘導する役割を果たしているかもしれない。以上のことから、 γ -taxilin 蛋白が分解する事によりER stress が引き起こされ、最終的に細胞死に至る経路が、hypoxia で惹起される細胞死においても存在している可能性があると考えている。本研究では、hypoxiaによる細胞死における、 γ -taxilin 蛋白の役割を解析したいと考えた。

3. 研究の方法

<平成 22 年度>

この年度は、Hypoxia による γ -taxilin の a)蛋白質レベル b)細胞内局在の変化を Western blot および顕微鏡にて解析し、Hypoxia と γ -taxilin との発現との関係を調べることに目標を置いた。

<平成 23 年度、24 年度>

この年度では、前年度で得られた結果を基に、 γ -taxilin の発現が減少する事によって細胞死が引き起こされるかどうかを、 γ -taxilin の siRNA を用いて、Annexin assay、Western blot および顕微鏡にて解析した。

さらに、 γ -taxilin の発現減少による細胞死が、ER stress を誘導し、さらにミトコンドリアにも関与しているかどうかを Western blot にて解析した。

4. 研究成果

<平成 22 年度>

ヒト神経芽細胞腫細胞 SK-N-SH にて、 γ -taxilin の抗体を使用して蛋白発現を見たところ、 γ -taxilin 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. 1)。

また、細胞は 37h から浮遊しており細胞死を

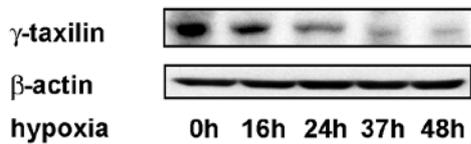


Figure 1

起こし始めていると思われた (Fig. 2)。

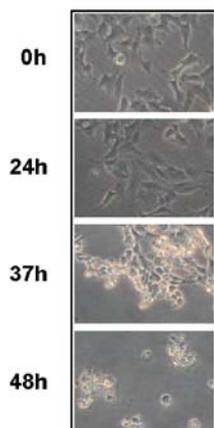


Figure 2

実際、細胞を DAPI 染色および Annexin assay で見たところ、37h 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. 3, 4)。

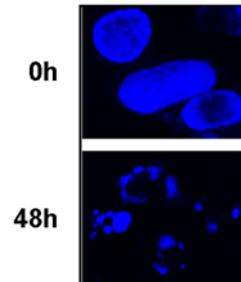


Figure 3

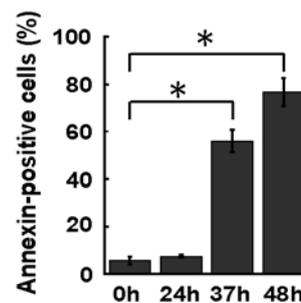


Figure 4

また、 γ -taxilin 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。同様の実験をヒト子宮頸部癌細胞 HeLa S3 細胞にて行ったところ、ヒト神経芽細胞腫細胞 SK-N-SH と同様の結果を得た。

<平成 23, 24 年度>

γ -taxilin 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、 γ -taxilin 蛋白が減少することを Western blot により示した (Fig. 5)。

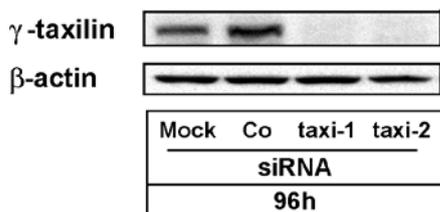


Figure 5

γ-taxilin 蛋白がなくなる事により細胞死が引き起こされる事を Annexin assay にて示した (Fig. 6)。

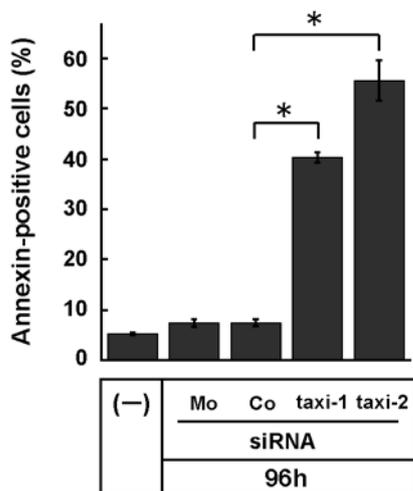


Figure 6

γ-taxilin 蛋白がなくなる事により 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が増加する事を Western blot により示した (Fig. 7)。

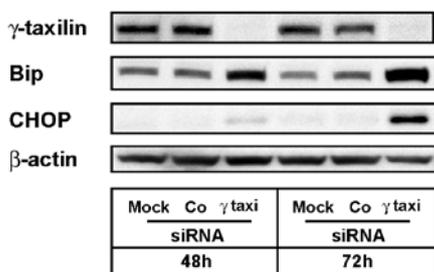


Figure 7

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

佛坂由可, 片山郁夫, 中村卓: 細胞ストレス応答におけるγ-taxilin の関与. 日本歯科放射線学会 第 31 回関西・九州合同地方会 (名古屋) プログラム P2, 2011 12/10

佛坂由可, 片山郁夫, 中村卓: 低酸素状態応答におけるγ-taxilin の役割. 第 53 回日本歯科放射線学会総会・学術大会 (盛岡) プログラム・講演抄録集, P14, 2012 6/2-3

[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

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA YUKA)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号: 10244089

(2) 研究分担者

片山 郁夫 (KATAYAMA IKUO)

長崎大学・大学病院・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

中村 卓 (NAKAMURA TAKASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 30172406