

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24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700892

研究課題名（和文） グローバルな翻訳抑制時に起こるストレス応答タンパクの選択的な翻訳促進機構の解析

研究課題名（英文） Studies on selective translation mechanism of stress response Protein under global translational repression

研究代表者

築茂 由則（TSUKUMO YOSINORI）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センターゲノム研究部・研究員

研究者番号：40469630

研究成果の概要（和文）：腫瘍内で見られる栄養飢餓ストレスに曝されたがん細胞は mRNA の翻訳を抑制しながらも、生存に重要なストレス応答タンパクの翻訳を促進し、さらに血管新生などを起こすことで環境改善を計り適応していく。しかし、ストレス応答タンパクが選択的に翻訳されるメカニズムはまだ良く分かっていなかった。本研究ではストレス下での翻訳調節を担う重要なキナーゼの一つ PERK とその新規結合タンパク TBL2 の機能解析を通じてこの分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Upon endoplasmic reticulum (ER) stress, PKR-like ER-resident kinase (PERK) phosphorylates eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2 α), resulting in reducing global translation while promoting translation reinitiation of upstream open reading frame (uORF)-containing mRNAs, such as ATF4. We showed transducin (beta)-like 2 (TBL2) as a novel ER-anchored adaptor protein that promotes the PERK-mediated translation reinitiation for cell survival.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学 腫瘍生物学

キーワード：翻訳、ストレス応答タンパク、小胞体、mRNA、リボソーム、翻訳開始因子、腫瘍、飢餓

1. 研究開始当初の背景

腫瘍内部でのがん細胞のストレス応答の一つとして小胞体ストレス応答が知られている。腫瘍内に見られる低酸素や低グルコース条件下ではタンパク成熟の場である小胞体に異常タンパクが蓄積することで小胞体ストレスが発生する。

小胞体ストレス下では、小胞体膜上に存在するキナーゼ PERK が活性化し、基質である翻訳開始因子 eIF2- α (eukaryotic initiation factor 2-alpha) をリン酸化することで翻訳抑制が起こる。一方で、ストレス応答タンパク ATF4 (activation transcription factor 4) の翻訳は促進される。こうした eIF2- α のリン酸化時、すなわ

ちグローバルな翻訳抑制時に起こる選択的な翻訳促進は ATF4 に限らず多くのストレス応答遺伝子に当てはまる現象である。しかし、その分子機構の詳細は未だに明らかになっていない。

このような背景のもと、申請者は PERK の新規結合タンパクとして同定した機能未知遺伝子 TBL2 (trasducin beta like 2) が、ストレス下での ATF4 の発現に重要な因子であることを見出し、その分子機構を解析した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、代表的なストレス応答転写因子 ATF4 を主な解析対象として、ストレス応答タンパクの選択的な翻訳促進機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ストレス下で起こるグローバルな翻訳抑制への TBL2 の関与を調べるため TBL2 ノックダウン細胞を 35S-Met ラベルし新規タンパク合成を解析した。

(2) ATF4 mRNA のストレス下における翻訳状態を解析するためポリソームアッセイを行った。TBL2 ノックダウン細胞の抽出液を 10 ~ 50 % ショ糖密度勾配遠心し、各フラクション中の ATF4 mRNA 量を比較解析した。

(3) ATF4 の翻訳調節に重要な uORF を含む 5' 非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ後、TBL2 発現による ATF4 翻訳への影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

(4) 293T 細胞より調整した PERK, TBL2 タンパクと、市販のウサギ網状赤血球ライセートを用い *in vitro* における ATF4 mRNA 翻訳活性を検討した。

(5) レンチウイルスを用いて TBL2 発現抑制細胞株を構築し、低グルコースや低酸素などの生理的な腫瘍内飢餓ストレスへの感受性を検討した。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレス下での翻訳調節に必須なキナーゼ PERK に結合する機能未知タンパク TBL2 の機能解析を行った。TBL2 は PERK 同様に小胞体に局在しストレス依存的に PERK に結合した (図 1 A, B)。また TBL2 の発現を抑制すると、ストレス下で誘導される ATF4 の

発現がタンパクレベルで減弱した (図 1 C)。

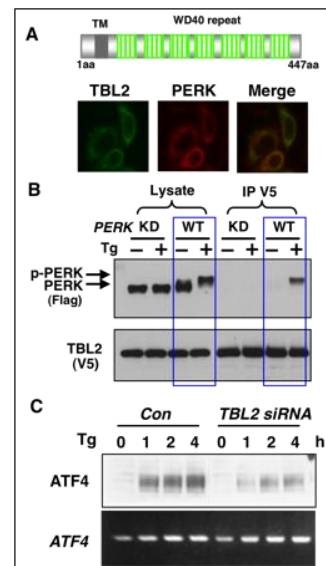


図1 新規PERK結合タンパクTBL2

(2) 上記の発見に基づき、TBL2 の標的的特異性を 35S-Met ラベル、ポリソーム解析により検討した。その結果、TBL2 は ATF4 mRNA の翻訳レベルでの制御に重要であることが判明した。

(3) TBL2 が ATF4 翻訳の開始段階を制御しているかどうかを ATF4 mRNA 上の翻訳開始調節領域を組み込んだルシフェラーゼベクターを用い、細胞内または *in vitro* 翻訳系により検討した。いずれの実験においても、TBL2 は ATF4 の翻訳開始をポジティブに制御していることが示された。

(4) TBL2 がどのような翻訳開始因子と結合するのか免疫沈降法により検討した。その結果 TBL2 は eIF2- α , β , γ 、さらに 60S リボソーム、ATF4 mRNA と特異的に結合することがわかった。さらに様々な TBL2 欠損変異体を作成し、これら翻訳制御因子ならびに PERK との結合部位を同定した。その結果、TBL2 は自身のもつ WD40 ドメインや特異的なアミノ酸配列を介して翻訳開始に重要な複合体を形成することが明らかになった。

(5) TBL2 を介したストレス応答タンパク ATF4 の翻訳調節が、実際にかん細胞の飢餓ストレス環境下での生存に重要かどうか検討するため TBL2 ノックダウンがん細胞株を構築した。その結果、TBL2 発現抑制細胞は栄養飢餓ストレス (グルコース飢餓、低酸素) に対して脆弱になることが判明した (図 2)。

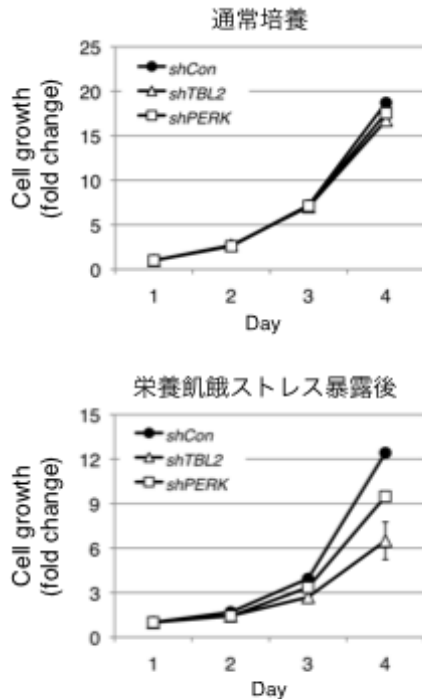


図2 TBL2ノックダウン細胞はストレスに脆弱になる

(6) 現在までに報告されている ATF4 翻訳モデルは、PERK による eIF2 リン酸化は、mRNA 上の 5' 末端からやってきた 40S リボソームが上流の読み枠 uORF での翻訳開始を回避させ、その結果、下流に存在する真の読み枠に到達し翻訳再開が起これるというものである。しかし、再開をうまく説明できる分子モデルはまだ存在しなかった。

本研究結果から、申請者はストレス応答タンパク ATF4 の翻訳調節モデルとして新たなモデルを打ち立てた (図2)。

すなわち、①TBL2 は ATF4 mRNA、60S リボソーム、翻訳開始因子 eIF2 と複合体を形成し、②この TBL2 複合体はストレス依存的に活性化した PERK に結合する。③PERK はストレス下で eIF2 をリン酸化し 40S リボソームの uORF 読み飛ばしを促進する④一方で、TBL2 がすぐ下流に必要な翻訳開始因子を供給する。

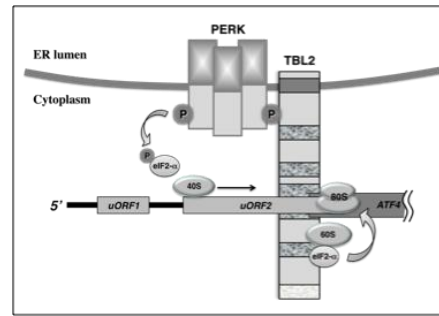


図3 ATF4翻訳調節の新規モデル

このように、PERK と TBL2 の連携がストレス応答タンパクの迅速な翻訳促進に貢献していることが考えられた。

こうした発見は、様々なストレス応答タンパクの発現調節機構の解明や、がんをはじめとした多くのストレス応答関連疾患の病態解明にも繋がると考えられる。

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 1 件)

Matsuo J, * Tsukumo Y, * Saito S, Tsukahara S, Sakurai J, Sato S, Kondo H, Ushijima M, Matsuura M, Watanabe T, Tomida A., Hyperactivation of 4E-binding protein 1 as a mediator of biguanide-induced cytotoxicity during glucose deprivation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 査読あり, 2012, 11: 1082-91, * These authors equally contributed to this work. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-11-0871,

[学会発表] (計 2 件)

(1) 築茂由則、近藤裕道、富田章弘 ビグアナイド系化合物による 4E-BP1 の活性化と抗腫瘍効果、分指標的治療学会、2011 年 6 月 23 日 東京

(2) Yoshinori Tsukumo, Junichi Matsuo, Satomi Tsukahara, Junko Sakurai, Toshiki Watanabe, Sigeo Sato, Hiromichi Kondo, and Akihiro Tomida, Hyper-activation of 4E-binding protein 1 by anti-diabetic biguanide as its anti-tumor mechanisms of action, American Association for Cancer Research, Special conference, 2011 年 2 月 26 日、サンフランシスコ

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築茂 由則 (TSUKUMO YOSHINORI)
公益財団法人がん研究会 がん化学療法
センター・ゲノム研究部 研究員
研究者番号：40469630

2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし