

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 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770188

研究課題名（和文） 酸化ストレスによるストレス顆粒形成の制御

研究課題名（英文） Regulation of stress granule formation by oxidative stress

研究代表者

松崎 京子（MATSUZAKI KYOKO）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90568932

研究成果の概要（和文）：細胞内ストレス顆粒は、ヒ素や低酸素などの特定のストレス刺激に応答して一過性に細胞質内に形成される構造体で、細胞の生存に重要な役割を果たす。本研究では、ストレス顆粒の多機能性の解明を目指し、新規ストレス顆粒局在因子の探索、及び複合ストレス条件下でのストレス顆粒形成制御機構の解析を行った。その結果、1) 新規ストレス顆粒局在因子として同定した USP10 がストレス顆粒の安定性に寄与することを見出した。また、2) 酸化条件下ではストレス顆粒形成が阻害されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Stress granules (SGs) are phase-dense particles that appear in the cytoplasm of eukaryotic cells that have been exposed to environmental stress (e.g. arsenite, hypoxia). SGs play important role in cell survival. In this study, considering SGs as multifunctional structures, we searched for novel SG-associated proteins and identified USP10. Moreover, USP10 turned out to be important for maintaining the stability of SGs. Next, by observing SGs formation under multiple stress conditions, we found that formation of SGs was strongly inhibited under oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ストレスシグナル伝達、ストレス顆粒、ストレス応答 MAPK 経路

1. 研究開始当初の背景

細胞質内ストレス顆粒の形成は、細胞の生存に必須なストレス応答機構の一つである。細胞は、ヒ素や低酸素などの特定の種類のストレス刺激に曝されると、短時間でストレス顆粒と呼ばれる一過性の構造体を細胞質内に形成する。細胞は、多くの mRNA 及び RNA 結合タンパク質をストレス顆粒内へ取り込

むことで、タンパク質の翻訳を一時的に停止し、異常タンパク質の蓄積や、それに伴う細胞損傷を防いでいる。ストレス顆粒の形成は、植物や酵母からヒトに至るまで広く保存され、マウス個体レベルでもその形成が観察されることから、生物の生存に必要な基本的なストレス応答機構であると考えられる。しかしながら、ストレス顆粒を構成する因子は未

だその全てが明らかになっておらず、またその形成機構の詳細も不明であることから、ストレス顆粒研究は近年ホットトピックとして注目されている。

一方、細胞のアポトーシス誘導に中心的な役割を果たすストレス応答機構がストレス応答 MAPK 経路である。私達はこれまでに、ストレス応答 MAPK 経路の主要な MAPKKK である MTK1 の活性制御機構の解析を行い、MTK1 の新規結合因子として RACK1 を同定した。さらに、RACK1 が MTK1 の活性化促進因子であり、両者の結合が MTK1 の活性化に必須であることを見出した。また興味深いことに、特定のストレス刺激に反応して細胞内にストレス顆粒が形成された場合には、RACK1 は MTK1 から解離し、ストレス顆粒内へと取り込まれることがわかった。この時、活性化促進因子 RACK1 との結合を失った MTK1 は、抗癌剤などのストレス刺激を加えても活性化されず、MTK1 依存的アポトーシスも強く阻害された。さらに私達は、実際に抗癌剤に抵抗性を示すことが知られる固形癌内部の低酸素細胞では、ストレス顆粒が形成され、RACK1 がストレス顆粒に取り込まれるために、抗癌剤によるアポトーシス誘導が阻害されることを示してきた。

以上の結果から、ストレス顆粒は当初報告されていたように特定のストレス条件下でタンパク質の翻訳を一時的に停止し、ストレスによる細胞損傷を防ぐだけでなく、シグナル因子を取り込むことで、他のストレス応答機構をも制御する多機能な構造体であると考えられる。しかしながら、ストレス顆粒の多機能性は未だ詳細がほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究においては、細胞内での多機能構造体としてのストレス顆粒の機能を解明することを最終目標とし、始めに新たなストレス顆粒構成因子の探索を行った。さらに、複合ストレス条件下でのストレス顆粒形成を観察し、ストレス顆粒形成機構を分子レベルで明らかにすべく解析を行った。

3. 研究の方法

ストレス顆粒に局在する新規因子を同定するため、ストレス顆粒形成の核となる因子の一つである G3BP に着目し、バイオインフォマティクスの解析により、G3BP との結合が示唆される分子を探索した。得られた分子に関して、実際に G3BP と結合することを、生化学的解析を行い確認した。次に、免疫染色を行い、ストレス顆粒への局在を検証した。

また、複合ストレス条件下でのストレス顆粒形成制御を明らかにするため、複数のストレスを同時に細胞に添加し、ストレス顆粒マ

ーカーを指標とした免疫染色を行い、ストレス顆粒形成の有無を判別した。

4. 研究成果

(1) 新規ストレス顆粒局在因子の探索

G3BP はストレス顆粒の核となることが知られる分子であり、G3BP 分子を単独で細胞に過剰発現させると、それだけで細胞内にストレス顆粒を形成させることができる。

私達は、バイオインフォマティクスの解析を行い、G3BP と結合することが示唆される分子を探索し、ストレス顆粒局在候補因子を複数得ることに成功した。さらに、それらの候補因子のいくつかが実際に G3BP と結合することを共沈実験により確認した。次に、これらの G3BP 結合分子の中から、シグナル伝達に関与すると考えられる分子である USP10 に着目し、さらなる解析を行った。

USP10 は脱ユビキチン化活性を有するタンパク質である。始めに、USP10 が特定のストレス刺激に反応してストレス顆粒へ取り込まれることを免疫染色で確認した。次に、G3BP 及び USP10 に系統的な truncation mutant を作製し、生化学的解析を行い、USP10 がその非酵素領域である N 末端領域で G3BP の NTF2 様ドメインに結合することを明らかにした。また、USP10 は G3BP との結合を介してストレス顆粒へ取り込まれることがわかった。

次に、脱ユビキチン化活性を持たない USP10 (C/A) 変異体を作製し、刺激依存的なストレス顆粒への局在を観察した。その結果、細胞をヒ素で刺激後 30 分ではストレス顆粒への局在が見られるものの、ヒ素刺激 60 分後以降では、その局在が見られなくなった。この時、細胞をストレス顆粒マーカーである eIF4E と共染色すると、USP10 (C/A) を発現する細胞では、ヒ素刺激 60 分後以降のストレス顆粒形成が見られなくなった (図 1)。

以上のことから、USP10 はストレス顆粒へ取り込まれ、その脱ユビキチン化活性がストレス顆粒の安定性に寄与していると考えられた。今後、USP10 によるストレス顆粒安定

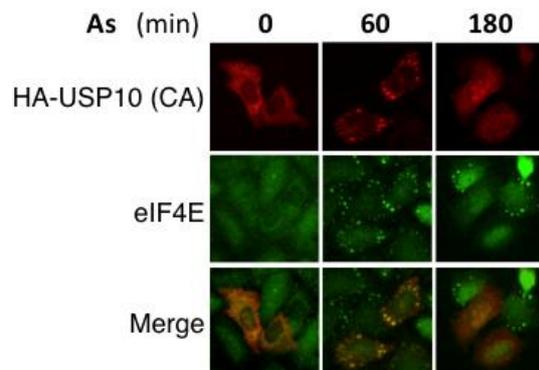


図 1

化の分子メカニズムの解明を目指し、ストレス顆粒内での USP10 の基質となる分子の探索を行う。

(2) 複合ストレス条件下でのストレス顆粒の形成制御

私達はこれまでに、ヒ素や低酸素などの刺激に応答してストレス顆粒が形成されると、ストレス応答 MAPKKK MTK1 の活性化促進因子 RACK1 がストレス顆粒に取り込まれ、この時細胞を抗癌剤などのストレスで刺激しても MTK1 が活性化されず MTK1 依存のアポトーシスが阻害されることを明らかにした。このことから、ストレス顆粒は複合ストレス条件下で、他のストレス応答機構をも制御し得ると考えられた。

これまでに、複数のストレス条件下でのストレス顆粒形成に関する報告はない。そこでまず、ストレス顆粒形成自体が、複合ストレス条件下でどのような制御を受けるかを明らかにするため、細胞に複数のストレスを同時に添加した時のストレス顆粒形成を観察した。

U2OS 細胞にタプシガルギンを添加し小胞体ストレスを与えると、ストレス顆粒形成が強く誘導される。この時、細胞に酸化ストレスとして過酸化水素を同時に添加すると、ストレス顆粒の形成が強く抑制されることがわかった。タプシガルギンを添加、あるいは細胞に G3BP を過剰発現させてストレス顆粒形成を誘導した後、過酸化水素を添加してもストレス顆粒の形成は抑制されなかったことから、過酸化水素はストレス顆粒の形成過程を阻害すると考えられた。そこで、過酸化水素がストレス顆粒形成過程を阻害する分子メカニズムを明らかにすべく研究を進めた。

細胞に小胞体ストレスを与えると、翻訳開始因子 eIF2 α がリン酸化され、その結果ストレス顆粒形成が誘導される。そこで、過酸化水素が eIF2 α のリン酸化を阻害することによってストレス顆粒形成を抑制する可能性を考え、生化学的に検証を行った結果、過酸化水素は eIF2 α のリン酸化を阻害しないことがわかった。そこで次に、過酸化水素によってストレス顆粒形成に必須なタンパク質が酸化的修飾を受けることで、立体構造が変化し、ストレス顆粒形成が阻害されることを予想した。U2OS 細胞を過酸化水素で刺激した後、細胞ライセートを非還元条件で調整し、SDS-PAGE を行った。続いて、これまでにストレス顆粒形成に重要であることが示唆されている種々のタンパク質に対する特異抗体を用いて Western Blot を行い、非刺激のサンプルと比較して、バンドシフトが見られるタンパク質を探索した。その結果、非還元条件で過酸化水素刺激によって高分子側に大

きくバンドシフトするタンパク質を見出した。このタンパク質に存在する Cys 残基をそれぞれ Ser 残基に置換した変異体を作製し、過酸化水素依存的バンドシフトを検証することで、酸化修飾の標的となる Cys 残基を同定した。さらに、バンドシフトが見られない、すなわち酸化修飾を受けない Cys/Ser 変異体を細胞に発現させると、細胞に過酸化水素とタプシガルギンを同時に加えても、ストレス顆粒の形成が回復することを見出した。以上の結果から、過酸化水素はストレス顆粒形成に重要なタンパク質を酸化的に修飾することで、ストレス顆粒の形成を阻害することが示唆された。今後は、実際に生体内で小胞体ストレスと酸化ストレスが生じることが知られる神経変性疾患や糖尿病に着目し、酸化ストレスによるストレス顆粒形成抑制の病態への関与を分子レベルで解明することを目指す。

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 3 件)

- ① 松崎京子、武川睦寛、斎藤春雄「Formation of stress granules under multiple stress conditions」第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 16 日 (横浜)
- ② 西澤龍彦、松崎(有本)京子、武川睦寛、斎藤春雄「Identification of novel binding partners of SUMO-specific protease 1 (SEN1)」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、平成 22 年 12 月 10 日 (神戸)
- ③ 松崎(有本)京子、武川睦寛、斎藤春雄「Regulation mechanism of a novel stress granule-associated protein USP10」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、平成 22 年 12 月 8 日 (神戸)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/MolCellSignal/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 京子 (MATSUZAKI KYOKO)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：90568932

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし