

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462921

研究課題名(和文) ストレス応答タンパクの多様性についてー NACとMUC1の核内での働きー

研究課題名(英文) dual-function stress response protein

研究代表者

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA, Yuka)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：10244089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素における細胞死に小胞体ストレスが関係しているのではないかとされているが、その伝達経路は現在の所ほとんど分かっていない。今回、私たちは、GSK-3 依存性に α -taxilinと NACが減少する事によって、小胞体ストレスを介した細胞死が誘導される事を発見した。そして、その小胞体ストレスの経路はそれぞれ違った経路を選択していた。さらに、 α -taxilinが発現減少すると、アルツハイマー病の発症時に誘導されるtauのリン酸化が起こる事を発見した。この事は、アルツハイマー病の発症に、 α -taxilinや NACが関与している事を示唆しているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The signaling pathway leading to the endoplasmic reticulum (ER) stress responses has not been fully elucidated. Here we showed that glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)-dependent downregulation of α -taxilin and nascent polypeptide-associated complex β -subunit (NAC) mediates hypoxia-induced unfolded protein responses (UPRs) and the subsequent apoptotic pathways. However, the ER stress signaling pathways initiated by α -taxilin or NAC were distinct, triggering different ER stress sensors and activating different downstream pathways. α -taxilin ablation induced tau hyperphosphorylation alone. Notably, downregulation of α -taxilin and NAC occurs in the brain of patients with Alzheimer's disease. These results suggest that α -taxilin and NAC merge to regulate hypoxia-induced ER stress responses and provide a new insight into the pathogenesis of Alzheimer's diseases.

研究分野：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード： α -taxilin NAC ER stress Alzheimer's diseases hypoxia

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)小胞体内シ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 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)。

今回、 γ -taxilin は NAC 蛋白と結合している蛋白であることが分かった。そして、 γ -taxilin はER stressに關与している遺伝子の転写coactivator である。したがって、 γ -taxilin は NAC と相互に關係しながら、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 NAC 蛋白と關連して解析したいと考えた。

3. 研究の方法

<平成 25 年度>

この年度は、Hypoxia による γ -taxilin、NAC の蛋白質レベルおよび細胞内局在の変化を Western blot および顕微鏡にて解析し、Hypoxia における γ -taxilin と NAC との発現との關係を調べることに目標を置いた。また、 γ -taxilin の発現が減少する事は、ER stress やミトコンドリアに關与しているかどうかを、また、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 および顕微鏡にて検討した。

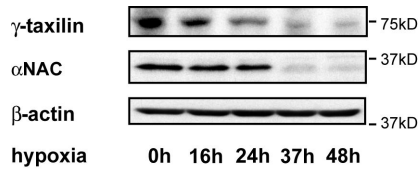
<平成 26 年度、27 年度>

この年度では、前年度で得られた結果を基に、 γ -taxilin と NAC の発現減少による細胞死の経路の違いを探求した。さらに、 γ -taxilin と NAC の発現減少がアルツハイマー病等の神経変性疾患に關与しているかどうかを解析した。

4. 研究成果

<平成 25 年度>

ヒト神経芽細胞腫細胞 SK-N-SH にて、
-taxilin と NAC の抗体を使用して蛋白発現
を見たところ、 -taxilin は NAC と同様に
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、 γ -taxilin は NAC 蛋白と結合して
いる蛋白であることが分かった (Fig.2)。

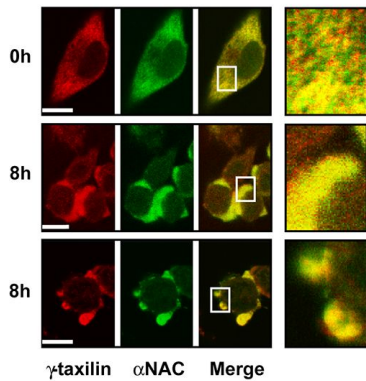


Figure 2

-taxilin の siRNA を用いて、 -taxilin
の発現が減少する事は、ER stress やミトコ
ンドリアに参与している事、また、細胞死が
引き起こされる事が分かった (Fig.3)。

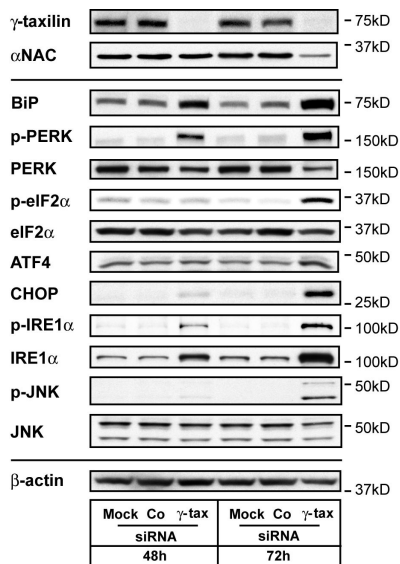


Figure 3

<平成 26 年度、27 年度>

-taxilin と NAC の発現減少による細胞
死の経路の違いを探索した結果、 NAC は
PERK の経路のみを惹起していたが、
-taxilin においては、それに加えて、
IRE1-JNK の経路を活性化している事が分か
った (Fig.4)。

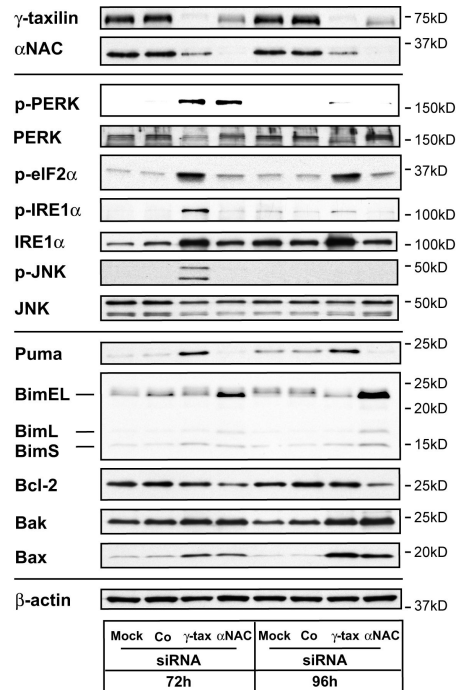


Figure 4

さらに -taxilin の発現減少においてのみ、
アルツハイマー病の発症に参与していると
言われている tau のリン酸化が誘導される事
を発見した (Fig.5)。また、 NAC、 -taxilin
共に、アルツハイマー病の組織染色にて蛋白
発現が減少していた (Fig.6)。これらのこ
とは、アルツハイマー病の発症に、両蛋白が
参与している事を示唆しているかもしれな
い。

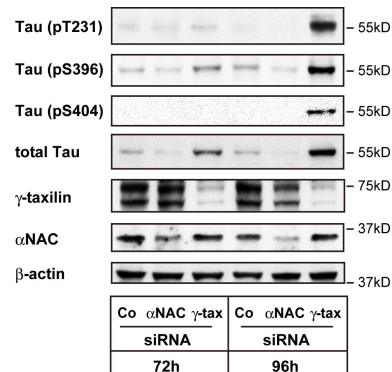


Figure 5

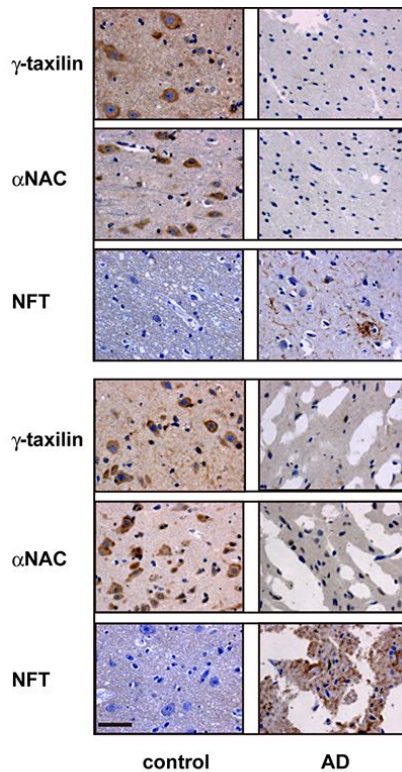


Figure 6

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2件)

1, *Eida S, *Van Cauteren M, *Hotokezaka Y, Katayama I, Sasaki M, Obara M, Okuaki T, Sumi M, Nakamura T.

Length of intact plasma membrane determines the diffusion properties of cellular water.

Scientific reports. 6:19051.

doi:10.1038/srep19051.2016. 査読有り

(*equally contributing author)

2, Hotokezaka Y, Katayama I, van Leyen K, Nakamura T.

GSK-3 -dependent downregulation of -taxilin and NAC merge to regulate ER stress responses.

Cell Death Dis.6:e1719,doi: 10.1038/cddis, 2015. 査読有り

[学会発表](計2件)

1, Hotokezaka Y, Eida S, Katayama I, Sasaki M, Sumi M, Nakamura T.

In vitro measurement of apoptotic and non-apoptotic cells using diffusion-weighted MR.

The 19th International Congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology IADMFR (Bergen Norway) June 22 to 27, 2013 program, P22. **IADMFR-BIR best poster prize**

2, Eida S, Van Cauteren M, Hotokezaka Y, Obara M, Okuaki T, Katayama I, Sasaki M, Sumi M, Nakamura T.

Differentiation between apoptotic and non-apoptotic cell death using diffusion-weighted MR.

ISMRM 21st Annual meeting and exhibition (Salt Lake City, USA) April 20 to 26, 2013.

[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・病院(歯学系)・講師

研究者番号: 10244089

(2)研究分担者

片山 郁夫 (KATAYAMA, Ikuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 80295089

田代 茂樹 (TASHIRO, Shigeki)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号: 20300882

榮田 智 (EIDA, Sato)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 80325662

中村 卓 (NAKAMURA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号: 30172406