

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893040

研究課題名(和文) 神経変性疾患におけるストレス顆粒形成の細胞死への関与

研究課題名(英文) Formation of stress granules participates in the regulation of cell death in neurodegenerative diseases

研究代表者

松崎 京子(有本京子)(Arimoto-Matsuzaki, Kyoko)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90568932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は特定のストレス刺激にตอบสนองして、細胞質内にストレス顆粒と呼ばれる一過性の構造体を形成する。細胞はストレス顆粒を形成することで蛋白質の翻訳を一時的に停止させ、またストレス顆粒内に細胞死促進因子を取り込みその機能を阻害することで、ストレス環境下での細胞の生存を促進する。申請者は神経変性疾患の病態において、細胞内で観察される複合的なストレス環境(小胞体ストレスと酸化ストレス)では、ストレス顆粒の形成が抑制されていることを見出し、その分子メカニズムの解析を行った。さらに、病態モデル細胞株を用いた実験から、このようなストレス顆粒形成の抑制が、神経変性疾患の神経細胞死を促進させ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 certain types of stress such as arsenite, hypoxia, and ER stress. By assembling SGs, cells shut down protein synthesis temporarily to prevent accumulation of mis-folded proteins. SGs also contribute to cell survival under stressful conditions by sequestering some apoptosis regulating factors and suppressing their functions. In this study, I focused on the regulation of SG formation under multiple stress conditions which are often seen in various severe diseases. In neurodegenerative diseases, cells undergo cell death because of multi-stress, ER stress and oxidative stress. Here I found that in oxidative conditions, ER stress cannot induce SG formation, rendering cells vulnerable to cell death. By establishing model cell line for one of typical neurodegenerative disorders, I confirmed that neuronal cell death is promoted by SG suppression.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ストレス応答 ストレス顆粒 酸化ストレス 小胞体ストレス 細胞死

1. 研究開始当初の背景

細胞は特定の種類のストレス刺激(ウイルス感染、低酸素、小胞体ストレスなど)にさらされると、細胞質内にストレス顆粒と呼ばれる一過性の構造体を形成する。House keeping 遺伝子をコードするような多くの mRNA が RNA 結合蛋白質とともにストレス顆粒に取り込まれ、蛋白質の翻訳が一時的に停止する。細胞はストレス顆粒を形成し、蛋白質の翻訳を一時的に停止することで、ストレス環境下での異常蛋白質の蓄積を防ぎ、さらなる細胞損傷を防御している。一方、熱ショック蛋白質などのストレス環境下での細胞生存に必須な蛋白質をコードするような mRNA は、ストレス顆粒へはとりこまれず、むしろ積極的に蛋白質へと翻訳されることが知られている。すなわち、ストレス顆粒の形成はストレス環境下での蛋白質翻訳を選択・最適化し、細胞の生存に寄与する基本的な細胞のストレス応答機構であることがわかる。さらに最近、ストレス顆粒には種々のアポトーシス関連因子が取り込まれることが次々と明らかになってきた。ストレス顆粒はアポトーシス関連因子を取り込みその機能を阻害することによっても、ストレス環境下での細胞の生存に寄与する。

生体内で細胞は様々な種類や強度の複数の刺激に同時にさらされている。しかしながら、このような複合的なストレス環境下におけるストレス顆粒形成の制御や、細胞生存との関連はこれまで全く知られていなかった。そこで、申請者は複合ストレス環境として、神経変性疾患における神経細胞に着目した。

神経変性疾患では、神経細胞内に異常蛋白質の蓄積による小胞体ストレスと、活性酸素種 ROS の産生による酸化ストレスとの両方が生じ、結果的に神経細胞死が起こる。小胞体ストレスはストレス顆粒形成を強く誘導することが知られているが、酸化ストレスによるストレス顆粒形成に関してはほとんど報告がなかった。そこで予備実験として、細胞に小胞体ストレスと酸化ストレスの両方を与えた時のストレス顆粒形成を観察した結果、酸化ストレスが小胞体ストレスによるストレス顆粒形成を強く抑制することを見出した。さらにこの時、ストレス顆粒形成の核となる RNA 結合因子の一つ TIA1 が酸化修飾を受けることがわかった。酸化修飾の標的残基として同定した Cys 残基を Ser 残基に置換した点変異体を細胞に発現させると、酸化条件下でも小胞体ストレスによるストレス顆粒形成が回復することを確認した。

2. 研究の目的

酸化ストレスによるストレス顆粒形成抑制の分子機構の詳細を明らかにする。さらに、実際に酸化ストレスと小胞体ストレスの両方が誘導される神経変性疾患において、酸化ストレスが小胞体ストレスによるストレス顆粒形成を阻害し、その結果神経細胞死を促

進することを、疾患モデル細胞を用いて検証する。

3. 研究の方法

これまでに行った予備実験の結果から、酸化ストレスによるストレス顆粒形成抑制は、TIA1 の酸化修飾に起因すると考えた。そこで、TIA1 が酸化されるとストレス顆粒形成が抑制される分子機構として二つのモデルを提唱し、それぞれ検証を行う。具体的には、TIA1 が酸化されることにより TIA1 自身の多量体化が阻害されるか、あるいは TIA1 が酸化されると TIA1 と標的 mRNA との結合が阻害されるか、をそれぞれ検証する。

次に、神経変性疾患におけるストレス顆粒形成の細胞死への関与を解析する。はじめに、実際に神経細胞を用いて、酸化ストレスが小胞体ストレスによるストレス顆粒形成を抑制し、細胞死を促進することを検証する。次に、申請者がこれまでに樹立したポリグルタミン病のモデル細胞株を用いて、TIA1 が酸化されることを確認する。次に、酸化されない TIA1/CS 点変異体を細胞に発現させた場合には、ストレス顆粒形成の回復がみられ、細胞死の抑制がみられることを確認する。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレスによるストレス顆粒形成抑制機構の解明

RNA 結合分子である TIA1 はその N 末端領域に存在する RNA 結合領域を介して標的 mRNA と結合し、C 末端領域の prion like domain を介して自身が多量体化することで、ストレス顆粒形成の核となると考えられている。そこで、酸化修飾を受けた TIA1 がストレス顆粒形成を抑制する分子機構として二つの可能性を考えた。はじめに、酸化ストレスによって修飾を受けた TIA1 は、自身の多量体化が抑制されると予想し、Myc タグを付加した TIA1 と Flag タグを付加した TIA1 を細胞内に共発現させ、共沈実験を行うことにより両者の結合を検証した。その結果、酸化ストレスの有無による両者の結合の変化は見られなかった。したがって、酸化ストレスは TIA1 の多量体化へは影響しないと考えられた。次に、酸化修飾を受けた TIA1 が標的 mRNA との結合能を失う可能性を考え、TIA1 と標的 mRNA との結合を RIP assay の手法を用いて検証した。その結果、酸化ストレス条件下で TIA1 とその結合標的 mRNA である TNF α や COX2 mRNA との結合が著しく低下することがわかった。さらに、酸化されない変異体である TIA1/CS 変異体では、酸化ストレス条件下でも標的 mRNA との結合が低下しないことを確認した。以上のことから、酸化ストレス条件下では、TIA1 が酸化修飾を受けることにより、標的 mRNA との結合能を失い、結果としてストレス顆粒形成が抑制されると考えられた。

(2) 神経細胞におけるストレス顆粒形成

神経変性疾患における神経細胞内でのストレス顆粒形成と細胞生存への関与を検証するため、予備実験として神経細胞であるマウス海馬由来 HT22 細胞を用いて、実際に神経細胞において酸化ストレスが小胞体ストレスによるストレス顆粒の形成を抑制しているかを検証した。HT22 細胞はグルタミン酸受容体を持たないため、細胞に高濃度のグルタミン酸を添加することにより、細胞内に ROS が蓄積し、酸化ストレスによる細胞死が誘導される。HT22 細胞にグルタミン酸を添加し、細胞内に ROS の蓄積を促した場合には、小胞体ストレスによるストレス顆粒の形成が抑制され、この時細胞死が促進することが確認された。細胞に酸化されない TIA1 変異体を発現させた場合には、ROS の存在下でもストレス顆粒形成が見られ、細胞死が抑制されることも確認した。

次に、申請者が樹立した神経変性疾患モデル細胞を用いてストレス顆粒形成と細胞死への影響を検証した。ハンチントン病を代表とするポリグルタミン病は、グルタミンをコードする CAG 塩基配列の繰り返しが原因遺伝子で異常に伸長する（通常は 20 回程度であるのに対し、40 回以上）ことで引き起こされる神経変性疾患である。これまでの報告から、ポリグルタミン病では、神経細胞内に異常タンパク質蓄積による小胞体ストレスと ROS の産生による酸化ストレスとの両方が誘導され、細胞死が引き起こされることが知られている。

申請者が樹立したポリグルタミン病モデル細胞株は、細胞に試薬 (Shield1) 依存的にポリグルタミン (polyQ) を発現誘導・蓄積させることができ、Shield1 依存的に polyQ を細胞内に蓄積させると、異常タンパク質蓄積による小胞体ストレスと、ROS の蓄積による酸化ストレスの両方が生じる。はじめにモデル細胞株を用いてストレス顆粒形成の有無を検証した。その結果、Shield1 を細胞に添加した場合には、ストレス顆粒形成はほとんど観察されなかった。一方、Shield1 と同時に細胞を抗酸化剤 NAC で処理した場合には、ストレス顆粒形成が観察された。このことから、神経変性疾患モデル細胞においても、ROS による酸化ストレスが小胞体ストレス誘導性ストレス顆粒形成を抑制していることが示唆された。また、このモデル細胞に TIA1 の酸化されない変異体 TIA1(C/S) を発現させた場合には、Shield1 を添加しただけでストレス顆粒の形成が見られることも確認した。さらに細胞を長時間培養し、細胞死の検証を行った結果、NAC の添加、あるいは TIA1(C/S) の発現によりストレス顆粒形成を回復させた場合には、細胞死が顕著に抑制された。

以上のように、本研究から、酸化ストレス条件下ではストレス顆粒形成の核となる分子の一つ TIA1 が酸化的に修飾されることでその mRNA 結合能を失い、結果的にストレス

顆粒形成が抑制されることがわかった(図1)。さらに、神経変性疾患モデル細胞株を使用し、実際に病態において酸化ストレスによるストレス顆粒形成抑制が、細胞死を促進することを示唆する結果を得た。

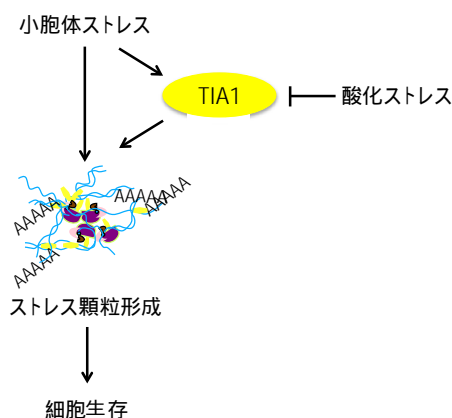


図1 酸化ストレスによるストレス顆粒形成抑制

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)

松崎(有本)京子、武川睦寛、斎藤春雄
「細胞質内ストレス顆粒の形成と細胞生存への寄与」放射線生物研究 Radiation Biology Research Communications, 第49巻、2014年、248-262

〔学会発表〕(計4件)

松崎(有本)京子、武川睦寛、斎藤春雄
「Stress granule formation under multiple stresses and its involvement in diseases」第14回東京大学生命科学シンポジウム BIO UT、平成26年4月26日(東京)

Arimoto-Matsuzaki K., Takekawa M., Saito H. 「Functional analysis of a stress granule-associated protein USP10」RNA Granule Conference 2014、平成26年6月8日～平成26年6月10日(Halifax, Canada)

松崎(有本)京子、武川睦寛、斎藤春雄「酸化ストレスによるストレス顆粒形成の制御と疾患への関連」第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月27日(横浜) Ohshima D., Arimoto-Matsuzaki K., Tomida T., Takekawa M., Ichikawa K. 「Spatio-temporal dynamics and mechanisms of stress granule assembly」新学術領域研究 修飾シグナル病 第2回国際シンポジウム、平成27年1月23日～平成27年1月24日(東京)

〔その他〕

ホームページ等

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

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