

核小体ストレスの生体イメージング技術とその治療応用

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科
分子腫瘍学分野
河原 康一

1. はじめに 目的

ゲノムDNA障害(DNAストレス)やがん遺伝子の過剰発現(発がんストレス)時に、p53が活性化され、細胞増殖停止・細胞死・老化を導き、がんの発症を防御する機構は、これまでによく研究されてきた。近年これらに加えて核小体を起点としてp53が活性化される、核小体ストレス機構の存在が報告された。この核小体ストレス応答は、たんぱく質合成と細胞増殖のバランスを制御する機構であると考えられており、薬剤(ActinomycinD, 5-flourouracil(5FU), Mycophenolic acid(MPA))によるリボソームRNAの不足時や、リボソームたんぱく質(RP)の異常時、血清除去、細胞接触抑制(Contact Inhibition)時等に作動する。核小体ストレスが起こると、リボソームたんぱく質L5(RPL5)、L11(RPL11)等のRPが核小体外の核質領域においてMDM2と結合し、MDM2の活性を抑制する。この機構によって、p53が安定化して細胞増殖が抑制される現象が、核小体ストレス応答である。

我々はRPを核小体に留めることで核小体ストレス応答を抑制する新規分子PICT1を見出し、PICT1が個体の初期発生や胸腺T細胞の形成に必須であること、PICT1の発現低下は腫瘍進展を抑制すること等を明らかにした。このように、PICT1が制御する核小体ストレス応答が生体の恒常性維持や発がんの抑制を調節する主要なストレス応答機構と考えられた。

このことから、いつ、どこで、どの程度、核小体ストレス応答が起こっているのかを明らかにすることは、これらの生理現象やその破綻によって生じる癌をはじめとする種々の疾患の発生機序を理解するうえで鍵となる極めて重要な課題である。また核小体ストレス応答はDNA障害なしにp53増加により腫瘍の進展を抑制することから、核小体ストレスを誘導する薬剤は新規作用機序をもつ抗腫瘍薬となると考えられる。

本研究では核小体ストレス応答が作動する機序の解明やこのストレス応答を標的とした抗がん治療薬探索を進めるため、核小体ストレス応答を特異的に検出できる可視化レポーターシステムの構築を行った。

2. 3. 方法、結果 研究成果

1) 核小体ストレス応答を検出する FRET プローブ作製と最適化の検討

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) は、励起状態にあるドナー分子から、近接するアクセプター分子へエネルギーが遷移し、特異な蛍光を発するもので、細胞内の分子間相互作用の検出に広く用いられている。この FRET を利用して、核小体ストレス応答に特徴的である MDM2 と RPL5 等のリボソームたんぱく質との結合を検出できれば、生体内でこのストレス応答を可視化計測できると考えられる。FRET の計測には蛍光タンパク質である CFP と YFP が一定の方向性で近接することが重要であるため、まず遺伝子工学的な手法を用いて、異なる部位で YFP や CFP を融合させた MDM2 及び RPL5 の発現ベクターを構築した(図 1)。

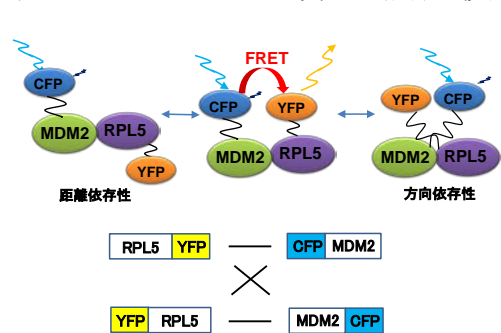


図1 FRETプローブの作動原理

ルが生起することが分かった(図2)。これらのうち、RPL5のN末端RPL5、MDM2のC末端に、YFP

やCFPを融合したプローブが、最も強いFRETシグナルを生じた(図2)。そこで、以降の検討では、上記の蛍光プローブの組み合わせを用いることにした。

2) 核小体ストレス応答への特異性の検討

RNAポリメラーゼIによるrRNA合成を阻害するActnimycinDに加え、リボヌクレオチドアナログとして作用する5-flourouracil(5FU)、リボヌクレオチドプールの枯渇を起こすミコフェノール酸(MPA)はいずれもrRNA合成阻害によって核小体ストレス応答を誘導する。そこで、5FU、MPAによって核小体ストレスを誘導し、プローブの反応性を検討した。その結果、DMSO添加によってはFRETシグナルの変化はみられないが、5FUとMPA添加によってActnimycinDと同程度の強いFRETシグナルを計測した(図3)。この結果から、本研究で作製したFRETプローブは核小体ストレス応答に特異性をもって検出できると考えられた。

3) 汎用性の検討

本プローブが様々な細胞株に適応可能であるかを検討した。今回作製したFRETプローブを、COS細胞に加えて、ヒト子宮頸がん細胞株Hela細胞や、ヒト肺腺癌細胞株であるH1299細胞に導入しシグナルを計測したところ、これらの細胞株すべてにおいて、核小体ストレス時、強いFRETシグナルを認めた(図4)。

4. 考察 まとめ

以上の検討結果から、本研究で設計した蛍光プローブについて基礎検討を行い、本プローブが核小体ストレス応答を可視化計測できること、核小体ストレスに対して特異的であること、種々の培養細胞に適応可能であることを明らかにした。このFRETプローブを活用し、いつ、どこで、どれくらい核小体ストレス応答が起こっているかという作動機構を明らかにすることで、核小体ストレス応答の生体での役割の解明につながることを期待される。また核小体ストレス応答はp53経路を活性化することでがん細胞の増殖や腫瘍化進展を抑制することから、本可視化レポーターシステムを用いて核小体ストレス応答を誘導する抗がん剤を探索することも可能となる。本プローブが近い将来、多くの研究者に活用され、このようなストレス応答を基軸とした生命科学、医学、創薬研究に大いに貢献できることを切に望む。

5. 発表論文、参考文献

本研究の成果は国内特許の申請を完了し、現在論文を投稿準備中である。

<特許>

核小体ストレス応答を誘導する薬剤の探索のためのポリペプチドの組み合わせ及びスクリーニング方法、特願2013-217200、鹿児島大学、河原康一、古川龍彦、有馬一成、上條陽平、堀口史人、2013年10月

<参考文献>

1. Zhang Y, Wolf GW, Bhat K, Jin A, Allio T, Burkhart WA, Xiong Y., Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway., Mol Cell Biol. 2003 (23), 8902-12.
2. Zhang Y, Lu H., Signaling to p53: ribosomal proteins find their way., Cancer Cell. 2009, 16(5), 369-77.

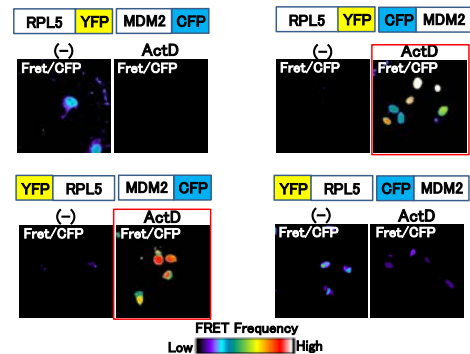


図2 異なるプローブによるFRETシグナルの比較
COS1細胞

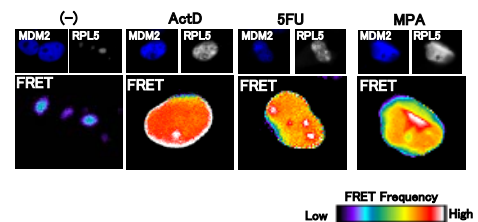


図3 核小体ストレス薬剤への特異性の検証

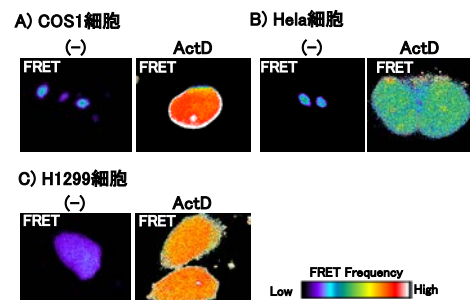


図4 種々のヒトがん細胞株で計測可能

3. Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J, Komatsu Y, Yang YR, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, Kamijo T, Zhang Y, Zhu Y, Prives C, Nakano T, Mak TW, Sasaki T, Maehama T, Mori M, Suzuki A., Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11., *Nat Med.* 2011, 17(8), 944-51.
4. Suzuki A, Kogo R, Kawahara K, Sasaki M, Nishio M, Maehama T, Sasaki T, Mimori K, Mori M., A new PICTure of nucleolar stress., *Cancer Sci.* 2012, 103(4), 632-7.
5. Uchi R, Kogo R, Kawahara K, Sudo T, Yokobori T, Eguchi H, Sugimachi K, Maehama T, Mori M, Suzuki A, Komune S, Mimori K., PICT1 regulates TP53 via RPL11 and is involved in gastric cancer progression., *Br J Cancer.* 2013, 109(8), 2199-206.
6. 河原康一., 核小体ストレス応答によるp53-MDM2経路の制御., *生化学*, 2013, 85(3), 152-159.