

神経変性疾患におけるストレス応答機構の解明

金田典雄、村田富保

名城大学大学院薬学研究科生体機能分析学研究室

これまでに神経栄養因子によって発現誘導される初期応答遺伝子として転写因子やサイトカイン類などをコードする遺伝子が報告されているが、われわれはホルボールエステル (TPA) で誘導されることが知られている TIS (TPA-Induced Sequences) 遺伝子群の一つである TIS11 も神経栄養因子刺激時の初期応答遺伝子の一つであることを報告している¹⁾。TIS11 遺伝子の翻訳産物である TIS11 蛋白質は特異な Zn²⁺フィンガー構造を有しており、われわれは TIS11 蛋白質の生理機能について解析を進め、TIS11 の一次構造上に核内移行シグナル領域ならびに核外移行シグナル領域を同定し、TIS11 が核-細胞質間をシャトルしていること²⁾、また、TIS11 が基本転写活性を増大させる転写活性化因子として機能すること³⁾を報告している。また、海外の研究グループは、TIS11 が TNF- α 、IL-3、GM-CSF などの mRNA の 3' 非翻訳領域に存在する AU-rich エlement に結合し、mRNA を不安定化させる因子であることを報告している^{4, 5)}。したがって、TIS11 は多機能性の Zn²⁺フィンガー蛋白質であることが想定される。

細胞に対して熱・酸化・高浸透圧・UV 照射などのストレスを与えると、ストレス顆粒(stress granule)と呼ばれる凝集体が細胞質に形成されることが報告されており、このストレス顆粒には RNA 結合蛋白質 (TIA-1, TIAR, HuR)、リボソーム、未翻訳 mRNA などが存在することが明らかにされている^{6, 7)}。ごく最近では、ストレス顆粒が、ストレス条件下における翻訳抑制を司る細胞内のコンパートメントであるとの考えが提唱され、ストレス顆粒内に存在する mRNA の安定性を制御する蛋白質の役割が重要視されている^{6, 7)}。これまでにわれわれは、熱ストレスを与えた細胞において TIS11 が細胞質にて顆粒状に分布し、ストレス顆粒に存在することを見出している⁸⁾。さらに、TIS11 のストレス顆粒の移行には、分子内に存在する Zn²⁺フィンガー領域が必要であることを見出している⁸⁾。最近、神経成長因子によって神経細胞様に分化した PC12 細胞において、TIS11 が熱ストレスやミトコンドリア機能阻害剤 FCCP によるエネルギー枯渇ストレス条件下ではストレス顆粒に局在するが、一方、亜ヒ酸による酸化ストレス条件下ではストレス顆粒には局在しないことを見出したので、まず初めに、ストレスの種類に応じた TIS11 のストレス顆粒移行機能について検討した。

TIS11 の全長あるいは Zn²⁺フィンガー領域の GFP 融合タンパク質を発現させた細胞に対して、熱ストレス、エネルギー枯渇ストレス、酸化ストレスを与え、GFP の蛍光を指標に GFP 融合蛋白質の細胞内局在を調べた。その結果、熱ストレスやエネルギー枯渇ストレスにおいては、Zn²⁺フィンガー領域-GFP 融合蛋白質および TIS11 全長-GFP 融合蛋白質はともにストレス顆粒に移行した。しか

し、亜ヒ酸による酸化ストレス条件下では、Zn²⁺フィンガー領域-GFP 融合蛋白質はストレス顆粒へ移行するのに対し、TIS11 全長-GFP 融合蛋白質はストレス顆粒に移行しなかった。以上のことから、酸化ストレス条件下では、TIS11 分子内において Zn²⁺フィンガー領域のストレス顆粒移行活性を抑制する機能ドメインが存在することが示唆された。

TIS11 の Zn²⁺フィンガー構造は Cys-Cys-Cys-His 型であり、この Zn²⁺フィンガー構造を有する TIS11 ファミリー分子として TIS11b および TIS11d が存在し、いずれのファミリー分子も Zn²⁺フィンガー構造を介して mRNA に結合することが報告されている^{4,5)}。そこで、TIS11b 全長あるいは TIS11d 全長の GFP 融合タンパク質のストレス時における細胞内局在を調べたところ、いずれの GFP 融合蛋白質も熱ストレスやエネルギー枯渇ストレスではストレス顆粒に局在し、酸化ストレスではストレス顆粒に局在しなかった。したがって、この知見は、TIS11b および TIS11d も TIS11 と同様にストレス特異的にストレス顆粒へ局在することを示している。また、TIS11b および TIS11d の Zn²⁺フィンガー領域-GFP 融合蛋白質のストレス時における細胞内局在を調べることにより、TIS11b および TIS11d の Zn²⁺フィンガー領域は、熱ストレスやエネルギー枯渇ストレスのみならず酸化ストレスでもストレス顆粒移行活性を示した。したがって、酸化ストレス条件下では、TIS11b および TIS11d いずれの分子においても、TIS11 と同様、それぞれの分子内に Zn²⁺フィンガー領域のストレス顆粒移行活性を抑制する機能ドメインが存在することが示唆された。

以上の結果から、TIS11 ファミリー分子はストレスの種類に応じてストレス顆粒へ移行し、ストレス顆粒内に存在する未翻訳の標的 mRNA に結合し、ストレス条件下における標的 mRNA の安定性に関与していることが示唆された。今後、ストレスの種類に応じた TIS11 ファミリー分子のストレス顆粒への移行を制御する機構について検討していく予定である。

【参考文献】

- (1) N. Kaneda et al. (1992) Sequence of a rat TIS11 cDNA, an immediate early gene induced by growth factors and phorbol esters. *Gene* 118: 289-291.
- (2) T. Murata et al. (2002) Identification of nuclear import and export signals within the structure of the zinc finger protein TIS11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 1242-1247.
- (3) T. Murata et al. (2000) Transcriptional activation function of zinc finger protein TIS11 and its negative regulation by phorbol ester. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274: 526-532.
- (4) WS. Lai et al. (2000) Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA. *J Biol Chem.* 275: 17827-17837.
- (5) PJ Blackshear (2002) Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem. Soc. Trans.* 30:945-952.
- (6) N. Kedersha et al. (2002) Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA_i^{Met})-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell* 13: 195-210.
- (7) N. Kedersha et al. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169: 871-884.
- (8) T. Murata et al. (2005) Recruitment of mRNA-destabilizing protein TIS11 to stress granules is mediated by its zinc finger domain. *Exp. Cell Res.* 303: 287-299.