

課題番号 11

細胞周期チェックポイントタンパク ATR を介した オートファジーの制御に関する研究

[1] 組織

代表者：東谷 篤志

(東北大学大学院生命科学研究所)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

安井 明 (東北大学加齢医学研究所)

菅野 新一郎 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費10万円，旅費0円

[2] 研究経過

私たちは、これまでに細胞周期の調節、DNA 損傷の修復に重要な働きをチェックポイントキナーゼ ATR に着目した研究を展開している。本タンパク質は、酵母から植物、線虫、ヒトに至る真核生物に広く保存されており、その核におけるチェックポイント制御に関わる働きについてはかなり解明がなされてきている。一方で、昨年度の本共同研究において、本タンパク質が核以外にもミトコンドリアをはじめ細胞質に広く局在することを明らかにした。また、線虫 *C. elegans* を用いた研究により、その欠損によりミトコンドリア DNA のコピー数が低下することも報告してきた。近年、ヒト ATR の発現が低下に伴う遺伝疾患 Sekel 症の存在が明らかになり、本疾患では、早老症を含む多面的な ataxia 症となることが報告されている。これら多面的な症状は、核のチェックポイント制御の破綻による染色体不安定化だけで説明するには難しい状況がある。さらに、タンパク質リン酸化酵素でありながら、分子量が 200 万を超える比較的大きな分子であり、リン酸化に関わるドメイン以外の未解明な領域の機能の解明が待たれている。そこで、本研究では昨年度の共同研究プロジェクトによる細胞内局在性の解析に引き続き、ヒト ATR を培養細胞において過剰発現することによる影響を調べることにした。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

ヒト ATR の過剰発現を確認する目的で、その N 末端側または C 末端側に Halo Tag を付加した組換えタンパク質をかずさ DNA 研究所の長瀬博士から、また EGFP の融合体を本共同研究分担者である安井博士から、それぞれ提供を受けた。これら組換え遺伝子を U2OS 細胞、HCT116 細胞ならびに HeLa 細胞に transfection した結果、いずれにおいても、その過剰発現体においては、12 時間以降に細胞の空胞化が観察され、24 時間後に空胞化がピークとなりその後は細胞死が観察された (図 1)。また、この空胞化は、Halo Tag のみでは観察されず、また、チェックポイントにおいて必須で ATR の制御にある p53 の欠損変異細胞においても生じること、その他の ATM, mTOR, SMG1 など類縁のタンパク質リン酸化酵素の過剰発現、p53 の過剰発現においては生じないことが明らかになった (図 1)。以上の結果から、ヒト ATR の過剰発現特異的な現象であることが示唆された。

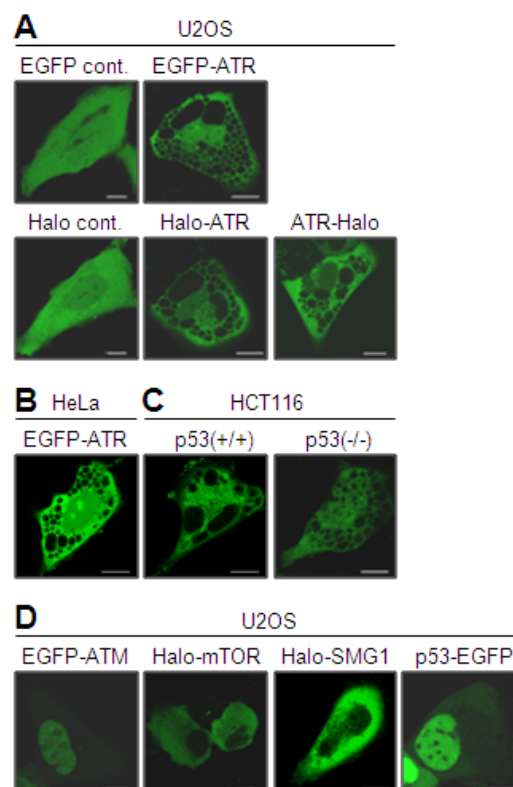


図1 ATR タンパク質の過剰発現による細胞の空胞化 (A) U2OS 細胞に EGFP ならびに Halo Tag 融合 ATR を transfection した 24 時間後の細胞にみられる空胞化。 (B) HeLa 細胞。 (C) HT116 細胞 ならびにその p53 欠損変異細胞のいずれにおける空胞化。 (D) 他の ATR 類縁タンパク質ならびに p53 の過剰発現による影響。

次に、この空胞化がオートファジーによるものか調べる目的で、オートファジーの誘導時に修飾される LC3 タンパク質の変化を SDS 電気泳動と GFP 抗体による検出で調べた。その結果、pEGFP-ATR の細胞への transfection 後、12 時間から LC3 タンパク質の II 型への修飾が生じ、オートファジーが誘導されている可能性が強く示唆された (図 2)。

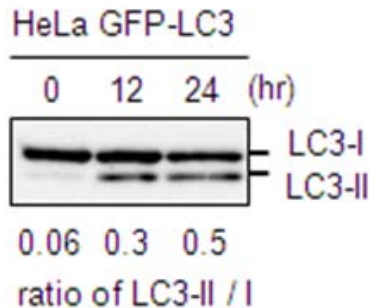


図 2 ATR タンパク質の過剰発現による LC3 タンパク質 II 型への修飾誘導。

さらに、透過電子顕微鏡観察により、空胞化部位の詳細な観察を行った。その結果、膜につつまれる形で、細胞の小器官が取り込まれている様子が鮮明になり、ATR の過剰発現がオートファジーを誘導することを明らかにした (図 3)。

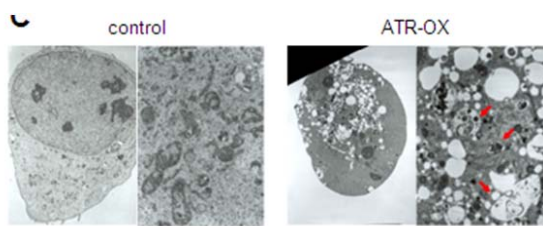


図 3 透過電子顕微鏡を用いた ATR 過剰発現による細胞空胞化の観察像。

最後に、ATR の部分欠損変異体を作成して、こちら各領域の過剰発現とオートファジーの誘導性との関連を調べた。その結果、図 4 に示したように、C 末端側に位置する FAT ドメインを含む PI-3K 様タンパク質リン酸化酵素領域の過剰発現では、細胞の空胞化が起らず、N 末端側の HEAT repeat のみで

空胞化が生じることが明らかになった。

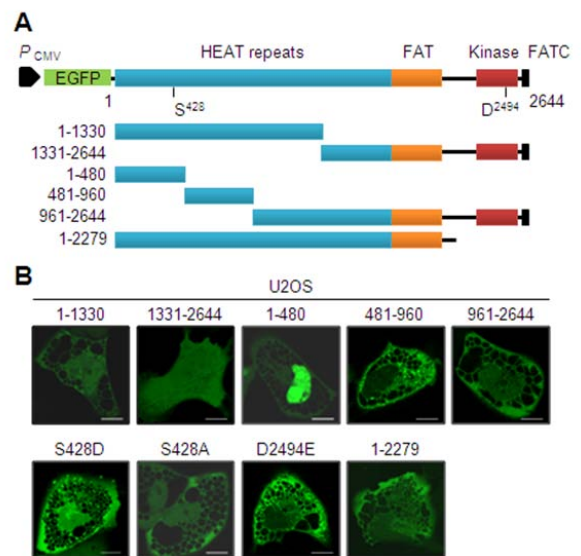


図 4 ATR の各欠損変異タンパク質の過剰発現と細胞空胞化の誘導。

HEAT repeat は、アミノ酸配列上では相同性はみられないが、他の類似 ATM や mTOR タンパク質の N 末端側にも存在し、それぞれが特定のタンパク質と相互作用する上で、何らかの重要な働きがある可能性が近年報告されている。ATM や mTOR の過剰発現では空胞化がみられなかったことから、ATR の HEAT repeat 特異的に相互作用する因子が、過剰発現により吸収され、その結果、オートファジーが誘導された可能性が考察された。また、今回の過剰発現は、本来の ATR タンパク質量と比較して 12 時間後で 3 倍強、24 時間後で 5 倍程度の過剰発現であり、細胞内での ATR タンパク質の発現量は厳密に制御されている可能性が示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究において明にすることができた「ヒト ATR が核以外の細胞質において、オートファジーの制御にも関与する可能性」は、新たな局面を提唱するものと思われる。また、ATR の HEAT repeat ドメインと相互作用する新規因子の探索は、細胞周期の調節、DNA 損傷の修復、酸化障害、加齢などに深く関わる AT ファミリーの研究のさらなる進展が期待される。

[4] 成果資料

(1) C. Mori, T. Takanami, T. Nagase, S. Kanno, A. Yasui, and A. Higashitani. ATR over expression causes cellular vacuolation. 論文投稿中