

課題番号 46

酸化ストレス抑制遺伝子 OXR1 による 細胞防御機構の解明

[1] 組織

代表者：秋山 秋梅

(京都大学大学院理学研究科)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：菅野 新一郎

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 3 万円

[2] 研究経過

背景：

OXR1(Oxidation Resistance 1)は、真核生物において酸化ストレス防御機能を担っている(e.g. M. Yang, et al., 2014, Y. Wu, et al., 2016)。また、OXR1 による酸化ストレス防御が筋萎縮性側索硬化症の発症や老化の抑制に寄与していることが報告されている(e.g. P. L. Oliver, et al., 2011, Y. Sanada, et al., 2014)。このように、OXR1 は細胞・個体の正常な機能を維持するために必要とされる遺伝子であることは示されているが、OXR1 の酸化ストレス防御機能の分子メカニズムは解明されていない。

目的：

OXR1 の酸化ストレス防御機能の詳細を明らかにするために、OXR1 の結合因子の探索、関連経路の同定を試みている。

概要：

平成 28 年度に行った共同研究では、ヒト細胞内で発現させた FLAG-OXR1 を用いた免疫沈降法において、タンパク質分解制御に寄与するキナーゼ GSK3beta およびその関連タンパク質を含む OXR1 結合因子の候補をいくつか同定した。本研究では、上述の結果の信憑性を確認するためにも GST-OXR1 を使用した別の方法で結合因子探索を行った。得られた結果をもとに、精製タンパク質を用いた結合検証実験を行った。

方法：

(1) 京都大学で作成した大腸菌発現プラスミドを用い、東北大学においてヒト細胞発現プラスミドを作成、バキュロ細胞で発現させヒト細胞エキストラクトと

反応させた。特異的に結合するタンパク質を精製し、質量分析をおこなった。

(2) 京都大学または東北大学において作成した発現プラスミドを使用し、GST または His で標識したタンパク質を大腸菌で発現させ、精製した。GST または His アフィニティー精製法によって、精製タンパク質同士、または精製タンパク質と細胞抽出液中のタンパク質との結合を調べた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

(1) GSK3beta は検出されなかったが、前回の実験結果にも含まれていた v-ATPase 複合体を形成しているタンパク質が検出された(下図)。

(2) 精製 OXR1 と精製 GSK3beta タンパク質との結合、および精製 GSK3beta タンパク質と細胞抽出液中の OXR1 との結合はみられていない。v-ATPase 関連タンパク質については現在確認中である。

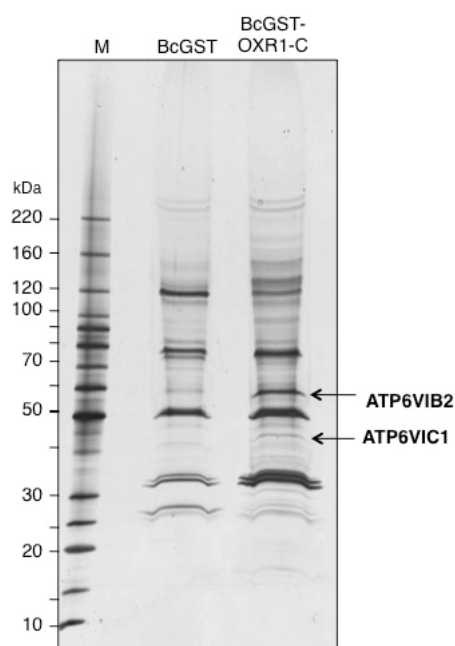


図 GST-OXR1 複合体精製

精製 GST-OXR1 に細胞抽出液を反応させて形成される OXR1 複合体を GST アフィニティー精製法により精製した。それらを SDS-PAGE ゲル上に展開した後、候補タンパク質を質量分析で同定した。

(3-2) 波及効果と発展性など

OXR1がv-ATPase複合体形成タンパク質と結合することはマウス OXR1 を用いた研究では報告されていたが(M. Merkulova, et al., 2014)、本研究でヒト OXR1においても同様の結果を得ることができた。

GSK3beta 依存的な基質のリン酸化またはタンパク質分解機構の異常は、神経変性疾患やガンの発症原因の一つであると考えられている。また、v-ATPaseによるリソソーム内のpH調整機能が中枢神経系の疾患の発症に寄与していることも示唆されている。これらの因子に対する阻害剤の疾患治療への応用が期待されている。本研究の結果より、OXR1が酸化ストレスからどのように細胞や個体の生存を守っているのかを明らかにできる可能性がある。さらに、OXR1研究の成果を神経変性疾患などの治療の向上に役立てられることも期待される。

[4] 成果資料

本共同研究成果が直接掲載された論文はまだない。本研究をもとに、引き続き共同研究を進める準備をしている。