

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14707

研究課題名(和文)「ナノピペット」による蛍光標識したストレス顆粒の単離

研究課題名(英文)The selective collection of stress granules using nanopipette

研究代表者

金 俊達(KIM, Jundal)

筑波大学・生命領域学際研究センター・助教

研究者番号：90570036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス顆粒は、ストレス刺激に応答して一過性に形成される細胞質内の構造体であり、RNA結合タンパク質や mRNA を顆粒内に取り込み、翻訳を一時的に停止させることで mRNA の安定性や翻訳を調節している。近年、この顆粒の形成が細胞のストレス適応機構として重要な役割を担っていることが明らかとなったが、この顆粒が形質膜を持たないことから生化学的な単離や精製が困難であるため、形成や制御に働く全構成因子は未だ分かっていない。本研究では、生細胞から蛍光融合タンパク質をプローブとして、先端口径が約 50 nm のナノピペットを用いて、ストレス顆粒をナノ環境から単離・精製することを目的とする。

研究成果の概要(英文)：When cells are under environmental stress, DNA and RNA can be easily damaged, which cause biological disorder. To prevent from several biological disorders, there exist a lot of self-protective systems in cells. In recent years, a stress-responsive self-protective system called stress granule (SG) has been discovered. SG is cytoplasmic aggregation that forms when translation initiation is impaired by stress, and it is considered to play a critical role in regulation of mRNA metabolism and protect RNAs from harmful conditions. However, the identity of SG is poorly understood, because the isolation of SG is extremely difficult. For further analysis, a method that can effectively isolate SG is demanded. Nanopipette is a robotic nanometer-size glass pipette. It can take samples selectively and rapidly in an individual cell, which may meet the requirements for SG isolation. In the present study, we attempted to collect SG using nanopipette, by marking SG with fluorescent protein markers.

研究分野：分子生物学

キーワード：ストレス顆粒 ナノピペット

1. 研究開始当初の背景

生体の基本単位である細胞は、環境変化を要因とするストレスの種類、持続時間、強弱に対して、細胞死誘導する「シグナル伝達機構」や、損傷の修復による生存を維持する「ストレス適応機構」のいずれかを選択し、運命を決定する。近年、細胞のストレス適応機構の一つとして、「ストレス顆粒」の形成による翻訳制御が注目を集めている。この顆粒の役割は、mRNA、40S リボソームや RNA 結合タンパク質を取り込み、翻訳を一時的に停止することで、ストレス環境下で異常タンパク質の蓄積防止や細胞損傷を修復するタンパク質の発現制御を行う(図1)。

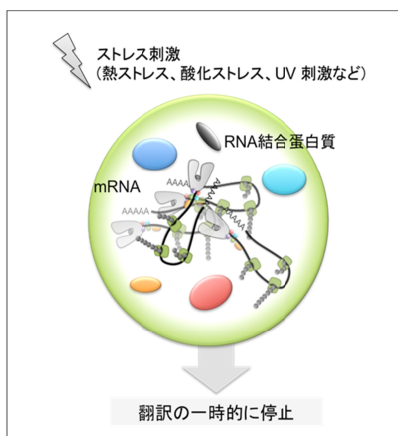


図1. ストレス顆粒の形成によるmRNAの翻訳制御

しかし、ストレス顆粒は膜構造を持たず、その形成は動的かつ可逆的であることから、単離や精製による生化学的解析が極めて困難であった。そのため、顆粒の形成や機能を制御しているタンパク質を含む多くの構成物質は、未だ不明点が多い。従って、ストレス顆粒の本質を理解するためには、構造体の大きさからナノ環境での選択的なサンプリング手法の開発が必須であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ストレス応答機構の動態情報を解析するため、単一の生細胞に形成されたストレス顆粒を、最新の「ナノピペット」を用いて、蛍光融合タンパク質をプローブ（バイオイメーjing）として、先端口径が約 50 nm のナノピペット技術(ナノテクノロジー)を組み合わせることで、ストレス顆粒をナノ環境(生細胞)からマイクロ環境(チューブ)へ単離・精製することを目的とした(図2)。

3. 研究の方法

申請者らは、細胞内で「ストレス顆粒」を構成している本質(mRNA・タンパク質・生体低分子)の単離・精製を目指し、バイオイメーjing・ナノ技術・生化学の3つのアプローチから包括的に解明に取り込んだ。具体的には、以下の項目に従って研究を遂行した。

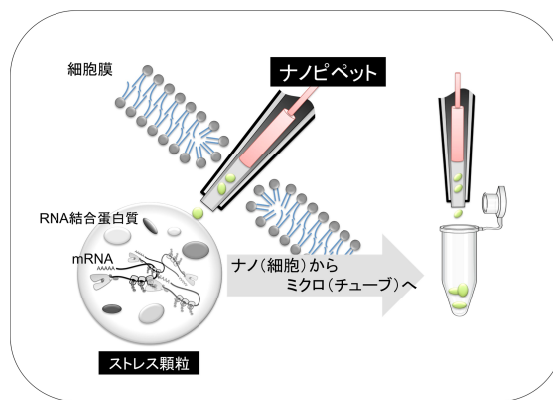


図2. ナノピペットを用いたストレス顆粒の単離

(1) ストレス顆粒の単離・精製

・G3BP や TIA-1 など、既知のストレス顆粒内で RNA 結合タンパク質をマーカーとして、生細胞内で蛍光が観察可能な発現ベクターを作製した。酸化ストレスの刺激後、ストレス顆粒のマーカータンパク質の局在を解析し、「ストレス顆粒」の場所を特定した。また、細胞種によってはストレスの種類や持続時間に対する応答性が異なることから、多種の細胞における本ストレス顆粒の蛍光マーカーの有効性も試みた。

(2) ストレス顆粒の構成物質同定の検証

・ストレス刺激後の単一細胞からナノピペットを用いてストレス顆粒を単離し、それらを構成している本質(mRNA・タンパク質・生体低分子)の解明を試みた。

特に、【生細胞内におけるストレス顆粒の蛍光マーカーの検証】と【ナノピペットを用いて単一細胞からストレス顆粒の単離】に着目した。

4. 研究成果

生細胞内におけるストレス顆粒の蛍光マーカーの検証

ストレス顆粒のマーカータンパク質として知られている G3BP1 および TIA-1 に mCherry および Venus を融合させた発現ベクターを構築し、ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞に導入し、酸化ストレス刺激に回答するストレス顆粒を可視化した。さらに、高精度のナノピペットのポジショニング(導入角度や深さ)解析を行い、ターゲットの「場」を特定するため、X-Y 軸の情報に Z 軸を加え、細胞内顆粒の立体像の局在を明らかにした(図3)。

ナノピペットを用いて単一細胞からストレス顆粒の単離

先端口径 50 nm のガラスキャピラリーを装着したナノピペット装置を用いて、細胞内の蛍光部の単離を行った。その結果、細胞内のターゲット部の蛍光が低下することに対し

て、ガラスキャピラリー内では蛍光が認められた(図4)。本研究の結果から、従来困難だった生細胞からストレス顆粒の単離方法として、ナノピペット技術が有用である可能性が示唆された。

ストレス顆粒の構成物質の同定
単一細胞からストレス顆粒を単離し、それらを構成している本質(mRNA・タンパク質・生体低分子)の解明のため、解析を進めてきたが、現在まで完了はしていない。

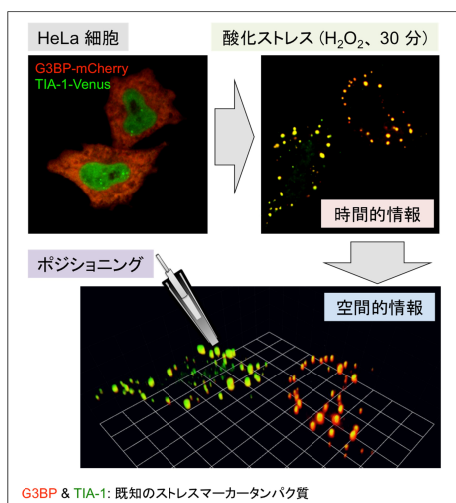


図3. ストレス顆粒の時間・空間的信息

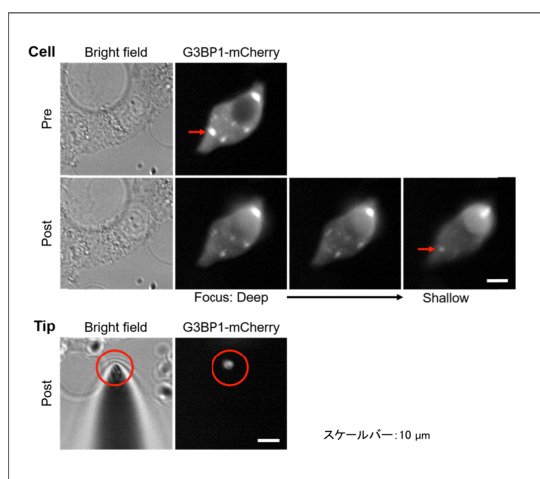


図4. ナノピペットを用いたストレス顆粒の単離

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 3 件)

1) Kim JD, Park KE, Ishida J, Kako K, Hamada J, Kani S, Takeuchi M, Namiki K, Fukui H, Fukuhara S, Hibi M, Kobayashi M, Kanaho Y, Kasuya Y, Mochizuki N, and Fukamizu A. PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor

coordination. *Science Adv.* 1, e1500615 (2015).

2) Toma-Fukai S, Kim JD, Park KE, Kuwabara N, Shimizu N, Krayukhina E, Uchiyama S, Fukamizu A, and Shimizu T. Novel helical assembly in arginine methyltransferase 8. *J. Mol. Biol.* 428, 1197-1208 (2016).

3) Ishimaru T, Ishida J, Kim JD, Mizukami H, Hara K, Hashimoto M, Yagami KI, Sugiyama F, and Fukamizu A. Angiodysplasia in embryo lacking protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in vascular endothelial cells. *J. Biochem.* 161, 255-258 (2017).

〔学会発表〕(計 8 件)

1) Kim JD, Ishida J, Kako K, Hamada J and Fukamizu A: Maintenance of phosphate metabolism in Purkinje cell dendritic arbors and motor coordination requires PRMT8 as phospholipase. 第38回日本分子生物学会年会、平成27年12月2日、神戸ポートアイランド、(兵庫県・神戸)

2) 石丸友博、石田純治、金 俊達、橋本美涼、水上早瀬、杉山文博、八神健一、深水昭吉: 血管内皮タンパク質アルギニンメチル基転移酵素・PRMT1の機能解析、第19回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、平成27年12月10日、神戸国際会議場、(兵庫県・神戸)

3) 野口和之、石田純治、石丸友博、川崎祥平、金 俊達、権 哲源、加香孝一郎、山縣邦弘、深水昭吉: ヒスタミンのH3受容体を介した心腎病態に対する作用の検討、Advans研究会2015、平成27年12月12日、ホテルグランドパレス、(東京都・千代田区)

4) 金 俊達、石田純治、加香孝一郎、濱田樹理、深水昭吉: ホスホリパーゼ活性を持つアルギニンメチル化酵素の小脳機能に対する役割、第10回炎症・脂質代謝・メタボリズムフォーラム、平成28年2月13日、東京大学山上会館、(東京都・文京区)

5) 金 俊達、深水昭吉、ジン ウイクン、トート エステル: ナノピペットを用いた単一細胞内の顆粒の単離、第89回日本生化学会大会、平成28年9月26日、仙台国際センター、(宮城県・仙台市)

6) 水上早瀬、石田純治、金 俊達、水野聖哉、杉山文博、深水昭吉: 生体内におけるPRMT1スプライシングバリエーションの機能、第89回日本生化学会大会、平成28年9月27日、仙台国際センター、(宮城県・仙台市)

7) Kim JD, Ishida J and Fukamizu A: PRMT8 as a phospholipase is required for Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. International meeting of the federation of Korean microbiological societies、平成28年11月3日~4日、KINTEX、(Korea・Gyeonggi-do)

8) 水上早瀬、石田純治、金 俊達、水野聖哉、杉山文博、深水昭吉: PRMT1 v2 ノックアウトマウス由来MEFを用いたスプライシングバリエーションの細胞機能解析、第39回日本分子生物学会

年会、2016 年 12 月 2 日、パシフィコ 横浜、(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

1) 深水昭吉、金 俊達

アルギニンメチル化とシグナル伝達、実験医学 33, 1543-1547 (2015)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金 俊達 (KIM, Jundal)

筑波大学・生命領域学際研究センター・助教

研究者番号：90570036

(2) 連携研究者

深水 昭吉 (FUKAMIZU, Akiyoshi)

筑波大学・生命領域学際研究センター・教授

研究者番号：60199172