

酸化ストレスに対する細胞の新たな防御機構

福田 智美 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

背景

酸化ストレスは、生活習慣病や神経変性疾患をはじめとする様々な疾患を引き起こすとされ、発生や細胞増殖、細胞死、老化などの生命現象にも関与している。この酸化ストレスに応答する代表的な経路が Nrf2-Keap1 システムである。

Nrf2 は抗酸化作用のある遺伝子群の転写発現を制御する転写因子であり Keap1 による制御を受けている。Keap1 は、プロテアソームによる分解シグナルとなるユビキチンを標的タンパク質に付加するユビキチンリガーゼであり、また酸化ストレスセンサーとしての役割も持つ。非ストレス下では、Keap1 は Nrf2 をユビキチン化し、プロテアソームによって分解させている。一方、細胞がストレスにさらされると Keap1 は不活性型となり、Nrf2 は安定化し、抗酸化物質の遺伝子発現を誘導する。細胞はこのようなメカニズムによって酸化ストレスから身を守っている。しかしながら、この Nrf2-Keap1 システムを制御する分子機構には完全には解明されていない。

当研究室では、新規に発見したタンパク質 Cul10 が酸化ストレスに関与することを見出した。そこで本研究では、Cul10 の Nrf2-Keap1 システムへの関与を解明することを目的とした。

方法

・ Transfection

目的遺伝子の発現プラスミドを OptiMEM と混合し、Polyethyleneimine によって Transfection した。

・ 免疫沈降

Transfection を行った HEK293T 細胞を、lysis buffer 300 μ l (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, 1 mM DTT) に溶解し、溶解液を遠心しその上清を可溶性画分とした。その後、可溶性画分に抗体の結合したビーズを加え、低温で 4 時間回転混合した。遠心して上清を除去し、沈殿物を Wash Buffer (20 mM Tris-HCl(pH7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40) で 3 回 wash し、免疫沈降物を得た。

・ Western blotting 法

細胞の可溶性画分または免疫沈降物に 4 \times sample buffer を加え 100 $^{\circ}$ C で 5 分間処理した。熱処理した sample を SDS-PAGE した後、membrane にゲル上のタンパク質を 2 時間転写した。タンパク質が転写された membrane を、3% スキムミルク/TBS-T で 1 時間ブロッキングした後、1 次抗体の入った 3% BSA/TBS-T で一晩処理した。その後、membrane を TBS-T で 3 回 wash し、2 次抗体の入った 3% スキムミルク/TBS-T で 30 分間処理した。TBS-T で 3 回 wash した後、membrane に検出試薬を処理し、フィルム感光させ現像した。

・ 免疫染色

遺伝子発現プラスミドを Transfection した HeLa 細胞を 4% PFA/PBS で 10 分間固定した。固定後、5% BSA-0.4% Triton X/PBS で 30 分間処理し、ブロッキングと透過処理を行った。その後 PBS で wash し、1 次抗体の入った 5% BSA/PBS を 1 時間処理した。PBS で 3 回 wash した後、蛍光標識 2 次抗体の入った 5% BSA/PBS で 30 分間処理した。PBS で 3 回 wash した後、褪色防止液に浸け細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

結果、考察、展望

Cul10 によって Nrf2 の細胞内局在が変化するか解析するため、HeLa 細胞にプラスミドを Transfection した後、免疫染色を行った。その結果、Nrf2 の単独発現では核に局在していたが、Cul10 との共発現では Nrf2 は核と細胞質の両方に局在するようになった。このことから、Cul10 は Nrf2 の局在制御に関わっていると考えられる。また、Nrf2 と Cul10 が相互作用していると考えられるので、免疫沈降を行い相互作用について現在解析を進めている。

細胞内の局在変化がユビキチン活性に関わっているか解析するため、Cul10 が Nrf2 のユビキチン修飾に及ぼす影響を調べている。この結果の詳細は発表会で報告する。

Cul10 はストレス下で遺伝子発現の上昇がみられたことから、Nrf2 の標的因子である可能性が考えられた。現在、Cul10 が Nrf2 の標的因子であるかについて解析を進めている。

これまでに得られた結果から、Cul10 は酸化ストレス応答の新たな制御因子であることが示唆された。