

主論文の要旨

**FAM98A is localized to stress granules and  
associates with multiple  
stress granule-localized proteins**

FAM98A は stress granule に局在し、他の stress granule 局在  
タンパクとも結合している

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
生体管理医学講座 麻酔・蘇生医学分野

(指導：西脇 公俊 教授)

尾関 奏子

## 【要約】

Stress granule (以下 SG) は様々なストレスにより誘導される細胞質内構造体であり、その構成には Low complexity 領域 (LC 領域) を持つ様々なタンパク質が関与していると報告されている。本研究ではタンパク質 FAM98A が様々なストレス刺激後に SG に局在し、p-body にはしないこと、局在には LC 領域の C 末端を介していることを示した。また、2 種類の配列の siRNA を使用した FAM98A のノックダウンにより SG の形成が低下したことから、FAM98A は SG 形成に関与していることが示された。最後に SG に局在すると既に報告されているタンパク質、DDX1 (DEAD box helicase 1)、ATXN2 (ataxin 2)、ATXNL2 (ataxin 2 like)、NUFIP2 (FMR1 interacting protein 2) と FAM98A との結合していることを示した。

## 【背景】

SG はストレスにより誘導される細胞質内構造体で、熱、浸透圧、酸化などのストレスにより形成されることが報告されている。細胞にストレスが加わると、HRI、PERK、PKR、GCN2 などを通じて翻訳開始因子 eIF2 (Eukaryotic translation initiation factor 2) のリン酸が起り翻訳停止する。翻訳停止した messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) などが集まり SG を形成する。その際タンパク質の翻訳停止や翻訳後修飾におけるリン酸化、ユビキチン化、アルギニン化が SG の形成や分解において重要な役割を担っている。近年の研究により、SG 形成はストレス下における細胞の生存シグナルの活性化に重要な役割を担っていることがわかってきた。シグナル伝達物質を取り込むことによってアポトーシスを阻害したり、細胞増殖に必須である mRNA を SG 内に取り込むことにより細胞損傷を回避したりし、その後ストレスが除去され SG が分解されると細胞増殖が再開する。

また、SG を構成する多数のタンパク質の解明が進んでいる。G3BP1 (Ras GTPase activating protein binding 1) は重要な構成タンパク質の一つで、ノックダウンすると SG の形成が阻害される。また、G3BP1 に多数のタンパク質が結合しており、それらの多くはグリシンとアルギニンを多く含む LC 領域を持つことが知られている。当研究室では過去に、FAM98A (family with sequence similarity 98 member A) が卵巣癌や大腸癌の悪性化に関与すること、PRMT1 というメチル化酵素によりアルギニンのメチル化を受けること、を明らかにしてきた。FAM98A は C 末端に LC 領域があり、SG 内に局在する可能性があるかと予想した。

## 【結果】

初めに FAM98A が SG 内に局在することを示した。(Fig.1) HeLa 細胞を使用し 0.05mM から 0.5mM の濃度で 30 分間のヒ素刺激後に免疫染色をおこなった。0.1mM 以上で SG が形成され、FAM98A と G3BP1 の共局在が確認されたので、FAM98A が SG に局在することが示唆された (Fig.1 A)。ヒ素以外のストレス、44°C の熱刺激 30 分、1mM 過酸化水素 90 分、0.3M ソルビトール 30 分の刺激でも同様に SG の形

成が認められ、FAM98A と G3BP1 との共局在を確認した (Fig.1 B)。SG 形成阻害薬であるシクロヘキシミドを添加してヒ素刺激を行うと、SG の形成が阻害されていることが確認できた (Fig.1 C)。また、細胞質内には SG 以外にも RNA 分解機構を担っている p-body と呼ばれる構造物があるが、ヒ素刺激後に P-body のマーカーである DCP1A と FAM98A で免疫染色を行った結果、DCP1A と FAM98A は局在が一致しないことから、FAM98A は P-body には局在せず、SG に特異的に局在することが示された (Fig.1 D)。

次に、FAM98A の N 末端、C 末端どちらが SG への局在に重要であるかを検討した。FAM98A の FL,N 末端側、C 末端側をそれぞれ HeLa 細胞に過剰発現させ、ヒ素刺激、熱刺激を行ったところ、C 末端側では FL 同様に SG への局在が認められたが、N 末端側では SG への局在が認められなかったため、FAM98A の SG への局在は LC 領域を持つ C 末端側が重要であることがわかった (Fig.2A)。

次に、FAM98A が SG 形成に必須であることを示した。2 種類の配列の SiRNA を HeLa 細胞へトランスフェクションし 72 間後に細胞を回収し、WB で FAM98A がノックダウンされていることを確認した。(Fig.3A) これらの HeLa 細胞にヒ素刺激を行い、FAM98A と G3BP1 で免疫染色をして SG 形成を観察したところ、コントロールに比べて FAM98A のノックダウンにより数の減少がみられた。(Fig.3B) 50 個の細胞を抽出し、SG の数をカウントしたところ、FAM98A をノックダウンした細胞の SG 数は優位に少ないことが示された。(Fig.3 CD)

以上の結果から FAM98A は SG の形成に関与していることが示唆された。

最後に SG 内での FAM98A と他のタンパク質との結合について調べた。293T 細胞に Flagtag-FAM98A の FL、N 末端側、C 末端側をそれぞれ強制発現させ、フラッグビーズを用いて免疫沈降を行い、WB で FAM98A とタンパク質 DDX1、ATXN2、ATXNL2、NUFIP2 との結合を確認した。その結果 4 つのタンパク質全てにおいて、FL の FAM98A との結合が確認され、その結合 N 末端側であった。(Fig.4 A) また、Hela 細胞にコントロールと FAM98A の SiRNA をそれぞれトランスフェクションした後にヒ素刺激を行って SG を形成し、それぞれのタンパク質に対する抗体と G3BP1 抗体を用いて局在を確認すると、ATXN2、ATXNL2、NUFIP2 は SG に局在するが、DDX1 は局在しなかった。(Fig.4B)

## 【考察】

本研究によって FAM98A は SG の重要な構成要素の一つであることがわかった。また、質量分析と免疫沈降により結合が予想されたタンパク質、ATXN2,ATX2L, NUFIP2,DDX1 との結合も確認された。これらは神経変性疾患に関連するタンパク質であり、SG に局在することはすでに知られていたが、今回の実験で、FAM98A との結合が初めて認められ、さらに、N 末端側へ結合することが示された。中でも DDX1

との結合には **FAM98A** が必須であった。

**【結語】**

**FAM98A** は様々な外的ストレスによって形成される **SG** に特異的に局在し、また、神経変性疾患に関する蛋白質、**ATXN2,ATX2L,NUFIP2,DDX1** と **SG** 内で結合していることが示された。**FAM98A** は大腸癌や卵巣癌の増殖に関与する蛋白質であり、**FAM98A** の更なる解析が、ストレス応答、癌細胞の増殖、神経変性疾患の解明につながる可能性がある。