

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19058009

研究課題名（和文） 異常タンパク質応答UPRによる小胞体の秩序制御

研究課題名（英文） Maintenance of the endoplasmic reticulum function by the unfolded protein response (UPR)

研究代表者

森 和俊 (MORI KAZUTOSHI)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70182194

研究成果の概要（和文）：

メダカの初期発生中、脊索において小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積すること、このときメダカはATF6 $\alpha$ ・ATF6 $\beta$ という名前のセンサー分子を活性化して小胞体局在性の分子シャペロンを転写誘導し、構造異常タンパク質を修復すること、ATF6 $\alpha$ ・ATF6 $\beta$ を欠くメダカはそのような異常を改善できないために脊索が発達せず、死に至ることを明らかにした。このように、異常タンパク質応答は細胞や個体の恒常性維持に極めて重要な役割を果たしている。

研究成果の概要（英文）：

We discovered that unfolded proteins accumulate in the endoplasmic reticulum (ER) of the notochord during medaka early embryonic development, that medaka refolds the accumulated unfolded proteins by activating sensor proteins designated ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  and thereby inducing ER-localized molecular chaperones, and that medaka deficient in both ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  dies due to notochord abnormality. Thus, the unfolded protein response plays a critical role in the homeostasis of the cell and body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	13,600,000	0	13,600,000
2008年度	26,400,000	0	26,400,000
2009年度	26,400,000	0	26,400,000
2010年度	26,400,000	0	26,400,000
2011年度	26,400,000	0	26,400,000
総計	119,200,000	0	119,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：小胞体、高次構造形成、分子シャペロン、タンパク質分解、品質管理、転写誘導、翻訳抑制、遺伝子ノックアウト

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質

が高次構造を形成する場所であると同時に、これら分泌系タンパク質のフォールディング

グ過程に綻びが生じるとダイナミックな細胞応答を示すオルガネラである。つまり、小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積すると、小胞体から核への細胞内情報伝達を伴う転写誘導機構 Unfolded Protein Response (UPR、異常タンパク質応答)が活性化され、蓄積した異常タンパク質の巻き戻し、あるいは分解により恒常性が維持される。

これまでに、特定領域研究「分子シャペロンによる細胞機能制御」および「タンパク質の一生」の計画班員の代表者として、また学術創成研究費「小胞体の機能と制御のダイナミクス」の代表者として科学研究費補助金を受け、哺乳動物 UPR では ATF6 経路と IRE1-XBP1 経路の2つが機能していること、ATF6 経路が主として productive folding に関わる因子を転写誘導するのに対し、IRE1-XBP1 経路は productive folding のみならず小胞体関連タンパク質分解 ERAD 因子 (EDEM、Derlin 等) も転写誘導することを世界に先駆けて明らかにした。

## 2. 研究の目的

タンパク質の社会-機能発現と秩序維持の研究において、異常タンパク質応答の解析は秩序維持機構を解明する上で欠かすことのできない最重要課題の一つである。異常タンパク質の存在を感知するセンサー分子の数が、酵母では1個、線虫やハエでは3個、哺乳類では5個と進化と共に増している。

「タンパク質の社会システム全体像の理解につながる研究成果」を得るためには、網羅的包括的解析を行う必要があるが、5種類のセンサー分子のノックアウトマウスを作出して解析することは、京都大学大学院理学研究科の施設と特定領域からの研究費では不可能である。そこで、硬骨魚類には哺乳類と同じセットのセンサー分子が存在すること

に着目し、ゲノムプロジェクトが終了しているメダカを用いて、異常タンパク質応答の生理的意義を包括的に明らかにすることを目的とした研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) メダカ培養細胞 OLCABe-3 を用いて、メダカでも哺乳動物の場合と同様に、IRE1 経路、PERK 経路、ATF6 経路の3つが機能しているか、明らかにする。

(2) 主要な小胞体ストレス応答発動因子 (IRE1 $\alpha$ 、IRE1 $\beta$ 、PERK、ATF6 $\alpha$ 、ATF6 $\beta$ ) について、既存の変異原処理ライブラリーをスクリーニングすることによって、これらのメダカノックアウト個体を同定し、表現型を解析する。

(3) UPRの主要な標的遺伝子である小胞体シャペロン BiP の第一エクソンを GFP 遺伝子と置き換え、GFP が BiP プロモーターの制御下で発現するトランスジェニックメダカを作出し、小胞体ストレスによる BiP の転写誘導を個体レベルで可視化する。このトランスジェニックメダカと IRE1 $\alpha$ 、PERK、ATF6 $\alpha$  ノックアウトメダカを掛け合わせるにより、何が BiP の主要な制御因子であるか明らかにする。

(4) シングルノックアウトメダカが表現型を示さない場合、種々の組み合わせでダブルノックアウトメダカを作出し、表現型を解析する。

## 4. 研究成果

メダカ培養細胞を用いて、メダカでも哺乳動物の場合と同様に、小胞体ストレスに応答した XBP1 mRNA のスプライシング、翻訳抑制、ATF6 のプロテオリシスが行われることを示し、安価に大量飼育を行うことができるメダカが、小胞体秩序制御機構を解析する

上で、非常に有用なモデル生物となりうると結論した。

主要な小胞体ストレス応答発動因子 (IRE1 $\alpha$ 、IRE1 $\beta$ 、PERK、ATF6 $\alpha$ 、ATF6 $\beta$ ) のシングルノックアウトはメダカの発生、成長に影響を及ぼさないことを見いだした。IRE1 $\alpha$  のノックアウトマウスは胎生致死となるが、ノックアウトメダカはそうならない理由として2つ考えられる。1つ目は、マウスでは IRE1 $\beta$  が消化管のみで発現するのに対し、メダカでは IRE1 $\beta$  がユビキタスに発現しているようであり、IRE1 $\beta$  によって IRE1 $\alpha$  欠損が補償されている可能性である。2つ目は、マウスでは胎生期に肝臓が造血機能を担っているが、魚類ではそうではないため貧血に深刻にならないことである。実際最近、代表者は IRE1 $\alpha$ ・IRE1 $\beta$  ダブルノックアウトメダカが生まれてくるもののやがて死に、その肝臓が野生型に比べて顕著に小さいことから、IRE1 経路はメダカでもマウスと同様に肝臓の発達に重要であることを見いだした。肝臓が発達不全になる原因は究明中であるが、このように、哺乳類と魚類では多少の相違点があるものの、小胞体ストレス応答の基本的仕組みは保存されていると考えている。

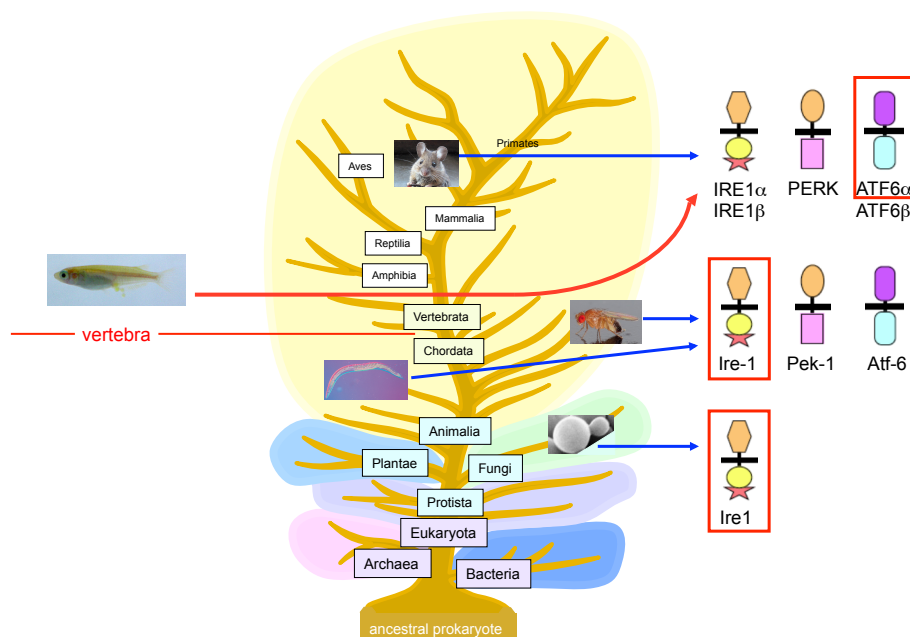
GFP が BiP プロモーターの制御下で発現するトランスジェニックメダカと IRE1 $\alpha$  ノックアウトメダカ、PERK ノックアウトメダカ、ATF6 $\alpha$  ノックアウトメダカとを掛け合わせることで、BiP の主要な制御因子がマウスの場合と同様に ATF6 $\alpha$  であることを明らかにし、背骨の発達と共に小胞体シャペロン転写誘導機構が IRE1 から ATF6 にスイッチしたのではないかという我々の仮説を一步前進させることに成功した。

ATF6 $\alpha$  と ATF6 $\beta$  のダブルノックアウトは、マウスの場合と同様に、メダカでも胚生

致死となることを明らかにした。GFP が BiP プロモーターの制御下で発現するトランスジェニックメダカを用いて、メダカの初期発生過程を観察し、脳、耳胞、脊索で生理的な小胞体ストレスが生じていて、ATF6 $\alpha$  と ATF6 $\beta$  が活性化され小胞体シャペロンが転写誘導されていることを見いだした。ATF6 $\alpha$  と ATF6 $\beta$  のダブルノックアウトのメダカ胚では、BiP、GRP94、Calreticulins という代表的な小胞体シャペロンの発現量が上昇しておらず、小胞体ストレスが亢進していた (XBP1 mRNA のスプライシング反応が亢進していた)。その結果、脊索の発達が阻害されており、脊索が尾の先まで到達していなかった。BiP を不活性化させると考えられる S38P 変異を持つメダカも胚性致死となり、同様に脊索の発達が阻害されていた。これら、ダブルノックアウトメダカと S38P 変異メダカの1細胞期の胚に、試験管内で転写した BiP の mRNA をマイクロインジェクションして一過性に過剰発現させたところ、脊索の発達が部分的に回復した。以上の結果から小胞体シャペロン BiP の機能だけでなく、生理的に生ずる小胞体ストレスに対して小胞体シャペロンを転写誘導することによって適切に対応することがメダカの発生に必須であると結論した。

また、遺伝子組み換え効率が例外的に高いニワトリ DT40 細胞を用いて、酵母でも脊椎動物でも1つしか存在しない HRD3/SEL1L を破壊したところ、可溶性の構造異常タンパク質の分解は阻害されるが、構造異常膜タンパク質の分解には影響を与えないことを見いだした。これらは、哺乳動物細胞におけるノックダウン時の表現系と同じであり、DT40 細胞が小胞体の秩序制御機構解明において極めて有効であることを示すことができた。

## Evolution of the UPR



### 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 14 件)

- (1) A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. J. M. Lynch, M. Maillet, D. Vanhoutte, A. Schloemer, M. A. Sargent, N. S. Blair, K. A. Lynch, T. Okada, B. J. Aronow, H. Osinska, R. Prywes, J. N. Lorenz, K. Mori, J. Lawler, J. Robbins and J. D. Molkenkin, *Cell*, in press, 2012. 査読有.
- (2) A novel IFN- $\gamma$ -stimulated ATF6/C/EBP- $\beta$  signaling pathway critical for the expression of DAPK 1 and induction of autophagy. P. Gade, G. Ramachandran, U.B. Maachani, M.A. Rizzo, T. Okada, R. Prywes, A.S. Cross, K. Mori and D. J. Kalvakolanu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press, 2012. 査読有.
- (3) The Specialized Unfolded Protein Response

of B Lymphocytes: ATF6 $\alpha$ -Independent Development of Antibody-Secreting B cells. I. V. Aragon, R. A. Barrington, S. Jackowski, K. Mori and J. W. Brewer, *Mol. Immunol.*, in press, 2012. 査読有.

- (4) Atf6 $\alpha$ -null mice are glucose intolerant due to pancreatic  $\beta$ -cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. M. Usui, S. Yamaguchi, Y. Tanji, R. Tominaga, Y. Ishigaki, M. Fukumoto, H. Katagiri, K. Mori, Y. Oka and H. Ishihara, *Metabol.*, in press, 2012. 査読有.
- (5) ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway. P. Menu, A. Mayor, R. Zhou, A. Tardivel, H. Ichijo, K. Mori and J. Tschopp, *Cell Death Dis.*, 3, e261, 2012. 査読有.  
doi: 10.1038/cddis.2011.132.
- (6) Vertebrate unfolded protein response: mammalian signaling pathways are

- conserved in medaka fish. T. Ishikawa, Y. Taniguchi, T. Okada, S. Takeda and K. Mori. *Cell Struc. Func.*, 36, 247-259, 2011. 査読有. doi: org/10.1247/csf.11036.
- (7) SEL1L is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal proteins but not transmembrane proteins in chicken DT40 cell line. S. Ninagawa, T. Okada, S. Takeda and K. Mori, *Cell Struc. Func.*, 36, 187-195, 2011. 査読有. doi: org/10.1247/csf.11018.
- (8) Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during mammalian unfolded protein response. A. Uemura, M. Oku, K. Mori, and H. Yoshida, *J. Cell Sci.*, 122, 2877-2886, 2009. 査読有. doi: 10.1242/jcs.040584.
- (9) Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow. L. Zeng, A. Zampetaki, A. Margariti, A. E. Pepe, S. Alam, D. Martin, Q. Xiao, W. Wang, Z. Jin, G. Cockerill, K. Mori, Y. J. Li, Y. Hu, S. Chien and Q. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 8326-8331, 2009. 査読有. doi: 10.1073/pnas.0903197106.
- (10) pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. H. Yoshida, A. Uemura and K. Mori, *Cell Struc. Func.*, 34, 1-10, 2009. 査読有. doi: org/10.1247/csf.06028.
- (11) Human HRD1 promoter carries a functional unfolded protein response element to which XBP1 but not ATF6 directly binds. K. Yamamoto, N. Suzuki, T. Wada, T. Okada, H. Yoshida, R. J. Kaufman and K. Mori, *J. Biochem.*, 144, 477-486, 2008. 査読有. doi: 10.1093/jb/mvn091.
- (12) ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. Y. Adachi, K. Yamamoto, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada and K. Mori, *Cell Struc. Func.*, 33, 75-89, 2008. 査読有. doi: org/10.1247/csf.07044.
- (13) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 $\alpha$  and XBP1. K. Yamamoto, T. Sato, T. Matsui, M. Sato, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada and K. Mori, *Dev. Cell*, 13, 365-376, 2007. 査読有. doi: org/10.1016/j.devcel.2007.07.018.
- (14) Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. S. Nakanaka, T. Okada, H. Yoshida, and K. Mori, *Mol. Cell. Biol.*, 27, 1027-1043, 2007. 査読有. doi: 10.1128/MCB.00408-06.
- [学会発表] (計 6 件)
- (1) 森 和俊、第 8 5 回日本薬理学会年会シンポジウム『創薬のターゲットとしての小胞体ストレス』講演「The forefront of endoplasmic reticulum stress research」(2012 年 3 月 16 日) 国立京都国際会館
- (2) 森 和俊、第 8 4 回日本生化学会大会特別講演「小胞体ストレス応答によるタンパク質品質管理」(2011 年 9 月 23 日) 国立京都国際会館
- (3) 森 和俊、第 5 4 回日本糖尿病学会年次学術集会特別講演「小胞体ストレス応答によるタンパク質品質管理」(2011 年 5 月 21 日) さっぽろ芸術文化の館

- (4) 森 和俊、第 27 回日本毒性病理学会学術集会特別講演「小胞体ストレスと病気」(2011 年 1 月 27 日) 大阪国際交流センター
- (5) 森 和俊、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会・合同大会ワークショップ『種々のモデル生物を用いた小胞体ストレス研究の最前線』演題「The Unfolded Protein Response in *Oryzias latipes*」(2010 年 12 月 8 日) 神戸国際会議場
- (6) 森 和俊、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会) シンポジウム『メンブレントラフィックとオルガネラの機能』演題「ATF6 は小胞体におけるタンパク質の品質管理に必須な普遍的膜結合性転写因子である」(2007 年 12 月 13 日) パシフィコ横浜

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.upr.biophys.kyoto-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森 和俊 (MORI KAZUTOSHI)  
京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：70182194

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし