

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01468

研究課題名(和文)細胞や生体の恒常性維持に必要な生理的小胞体ストレス応答機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of physiological ER stress response required for the homeostasis of cell and whole body

研究代表者

河野 憲二 (Kohno, Kenji)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任教授

研究者番号：50142005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 45,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いた研究から、正常なインスリン分泌と膵島(膵臓ランゲルハンス島)細胞の生存維持に小胞体ストレス応答経路の一つであるIRE1-XBP1経路の恒常的活性化が必要なことを明らかにした。また、IRE1-XBP1経路のシグナル伝達には、XBP1蛋白質の翻訳休止が必要であるが、それはXBP1の特異的なアミノ酸残基が翻訳途上で蛋白質製造機械リボソーム構成成分との接触により起こることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病の原因となる血糖値調節ホルモンのインスリン分泌が、膵島細胞での小胞体ストレス応答経路IRE1-XBP1経路の恒常的活性化に依存していることを明らかにした。この結果は、正常なインスリン分泌の理解の一助になるとともに糖尿病治療にとっても役に立つ。また、XBP1蛋白質の翻訳過程での一時的休止は、上記の効率的な情報伝達に必要であるが、何故一時休止ということが起こるのか、その原因についても明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Firstly, the constitutive activation of IRE1-XBP1 pathway in the ER of mouse islet beta-cells is required for the normal insulin secretion and both the survival and the maintenance of mouse islet beta-cells using IRE1 knockout mice. Secondly, cryo-electron micrographic studies clarified the 3D structure of translational pausing peptide of XBP1u protein, indicating that the specific amino acid residues in XBP1u directly interacts with the ribosomal components in ribosome tunnel.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：小胞体 ストレス応答 インスリン 糖尿病 リボソーム 翻訳休止

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は細胞から構成されており、外界とは細胞膜を通してやり取りをしている。また細胞内にも膜で区切られたオルガネラがあり、それぞれが独立した機能を有して生命維持に働いている。これらの膜はタンパク質や脂質から構成されており、それらの合成は小胞体を起点として行われている。細胞内外の環境変化により小胞体内に変性タンパク質が蓄積することを小胞体ストレスと呼んでおり、細胞はそのストレスを解消するために小胞体ストレス応答 (UPR: Unfolded Protein Response とも言う) を起こすことが知られている。小胞体ストレス応答は、細胞がその恒常性を維持するために進化的に発達させてきた小胞体とサイトゾル/核間の情報伝達機構であり、その機構は驚くほど巧みに制御されていることが明らかとなってきた。しかし、今までの研究の多くは、ツニカマイシン (糖蛋白質糖鎖合成阻害)、タブシガルギン (小胞体カルシウムチャネル阻害)、DTT (S-S 結合阻害) などの薬剤処理により小胞体内に変性タンパク質の蓄積を強制的に誘導する、いわゆる小胞体ストレスを用いてなされたものである。これらのストレスは、小胞体ストレスにかかわる役者や舞台装置を明らかにするうえで非常に有用であった。しかし、生物がそのような薬剤に実際にさらされる強度な小胞体ストレスが起こることはほとんど考えられず、生理的な状況下でどのような場合に小胞体ストレス応答が重要なのかについて研究することは現在極めて重要であると考えている。

2. 研究の目的

膵島細胞では、生理的条件下で常時小胞体ストレス応答経路が高いレベルで活性化している。これはストレスがかかったことに対応して活性化しているというよりも、この経路の活性化が細胞機能維持の為に必須だからであると考えられる。実際この応答経路を遮断するとインスリンの分泌障害が起こり糖尿病を発症する。そこで、(1) 生理的条件下での小胞体ストレス応答が、細胞や生物個体の恒常性維持にとって実際に重要な役割を果たしていることを、分子・細胞・個体のレベルで明らかにする。また、哺乳動物細胞内では、小胞体ストレスに対応して常に応答できるように、ストレス非存在下においてもその準備がなされていることがわかってきた。その1つの例として、IRE1-XBP1 ストレス応答経路では、XBP1u 蛋白質が翻訳休止という手法を使って常に自身の mRNA を小胞体膜に運ぶ役割をしていることがわかっている。本研究では、(2) XBP1 蛋白質が合成途上で、どのような分子メカニズムを使って翻訳休止という現象を起こしているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレスセンサー IRE1 を膵島細胞のみ KO したマウスは、生後 4 週目から糖尿病症状を示す。その原因をマウスと KO マウスから調製樹立した膵島培養細胞 MIN6 (*Ire1^{F1/F1}*) と MIN6 (*Ire1^{R/R}*) を用いて、分子・細胞のレベルで明らかにする。一方、小胞体ストレス応答のもう一つの経路 ATF6 の KO マウスは全く異常を示さないため、両遺伝子を破壊したマウスを作製し、膵島細胞における両遺伝子の役割を解析する。さらに、そのマウスから MIN6 (*Ire1^{F1/F1}/Atf6^{-/-}*) や MIN6 (*Ire1^{R/R}/Atf6^{-/-}*) を作製し、培養細胞を用いて ATF6 の細胞における生理的役割を明らかにする。

(2) FH-XBP1u を HEK293T 細胞に発現し、翻訳休止配列 (PS) とリボソームトンネル内で相互作用する因子を光架橋し、抗 Flag 抗体により免疫沈降したものを質量分析する。得られた候補分子が実際に XBP1u と相互作用することを、部位特異的変異導入により確認する。

4. 研究成果

(1) 膵島 細胞における IRE1 及び ATF6 経路活性化の生理的役割

正常なインスリン産生に IRE1 の恒常的活性化による 5 種類の PDI の高発現が必要

膵島 細胞では spliced form である *Xbp1s* mRNA が恒常的に高発現していることから、IRE1 は通常の生理的な条件下で常時活性化していることが明らかとなった。この現象は膵 細胞特異的な現象で他の組織では観察されなかった。この応答を起こさない *Ire1* 遺伝子を膵島細胞でのみノックアウト(遺伝子破壊; K0)したマウスを作製すると、4 週齢以降に徐々に高血糖を示すと同時に、多尿、糖尿となり、典型的な糖尿病症状を示すことがわかった。この結果は、膵島 細胞によるインスリン産生が IRE1 の恒常的活性化に依存していることを強く示唆している。そこで、IRE1 -XBP1 経

路がどのようにインスリン産生に寄与しているのかを、*Ire1*^{fl/fl} マウスから培養 細胞を樹立 [MIN6(*Ire1*^{fl/fl})細胞]、その細胞に Cre を強制発現させることにより MIN6(*Ire1*^{R/R})細胞 (IRE1 の RNase 欠損型) を作出し、インスリン産生に及ぼす IRE1 の役割を細胞レベルで調べた。その結果、IRE1 を欠損するとプロインスリン、インスリン両者の発現量が

が激減することを見出した。小胞体シャペロンのトランスクリプトーム解析を行うと、全部で約 20 種類ある PDI family 遺伝子のうち 5 種の遺伝子 (PDI, PIDR, P5, ERp44, ERp46) の発現が有意に低下していた。24 週齢のマウス膵島でも同様の現象が起きていることを確認した (図 1)。この MIN6(*Ire1*^{R/R})細胞に野生型の *Ire1* を導入発現すると、*Xbp1u* mRNA の特殊スプライシングが回復し、プロインスリン、インスリン産生量の回復が認められ、同時に PDI 関連遺伝子の蛋白量レベルでの回復も認められた。このことから膵 細胞でインスリンを正常に合成するためには、常に IRE1 が活性化しその下流の遺伝子群、特に 5 種の PDI family 蛋白質が高発現し、プロインスリンの折り畳みを効率よく行うことが、インスリン産生にとり大変重要であることが明らかとなった。

膵島 細胞での ATF6 のインスリン産生における生理的役割

Ire1 K0 マウスは糖尿病を起こすことは で明らかにしたが、もう 1 つの小胞体ストレス応答経路である *Atf6* の K0 マウスでは、膵臓に全く異常は認められなかった (森和俊研究室、京都大)。そこで両者を掛け合わせて膵島 細胞特異的に両方の遺伝子を破壊したマウス (*Ire1*^{R/R} *Atf6*^{-/-}) を作製したところ、*Ire1* 単独 K0 マウスの糖尿病症状より重篤な表現系を示すことが明らかとなった。*Atf6* 単独の K0 マウス由来の膵島は図 2 左に示すように野生型と同様な膵島を示すが、両遺伝子 K0 マウスでは、8 週齢以降には膵島を検出するのが難しくなった。これは図 2 右に示すように、細胞数が極端

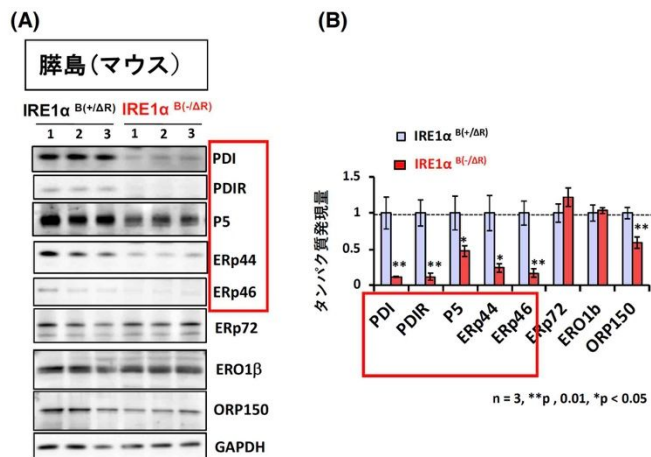


図1 IRE1α K0マウス由来の膵島では5種のPDIの発現が顕著に低下 (A) 対照マウス (黒字) とK0マウス (赤字) の膵島抽出液を電気泳動後、各種抗体でウェスタンブロットングしたもの (B) Aの定量結果

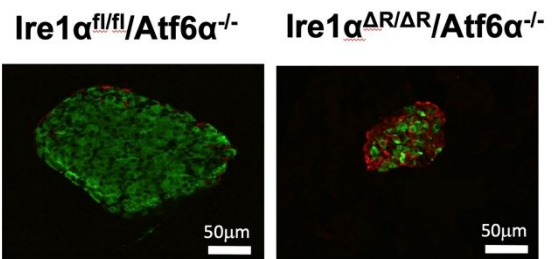


図2 18週齢マウス膵島切片の蛍光抗体像 左はAtf6α遺伝子K0マウス由来、右はIre1α/Atf6α 2重遺伝子破壊マウス由来の膵島。緑: β細胞、赤: α細胞。

8 週齢以降には膵島を検出するのが難しくなった。これは図 2 右に示すように、細胞数が極端

に減り、膵島自体が縮小し見つけるのが難しくなる。明らかに Ire1 単独 KO の場合と異なっている。この理由を明らかにしたいのであるが、マウスから膵島を単離することが難しいので生体を用いた解析は不可能であった。そこで Atf6 KO マウス膵島からと同様に MIN6 (*Ire1*^{+/+}/*Atf6*^{-/-}) 細胞と MIN6 (*Ire1*^{+/+}/*Atf6*^{-/-}) 細胞を樹立した。最初に、MIN6 (*Ire1*^{+/+}/*Atf6*^{-/-}) 細胞にウイルスを用いて Cre を発現させてその影響を見る実験も試してみたが、Cre の発現効果が悪く、おそらく両方の遺伝子が破壊されると、細胞の生存にも大きな影響が出るものと思われ、このような方法はこの研究には向いていないと考えられた。そこで、阻害剤を使うことを試みた。これらの細胞に IRE1 の RNase 部位の阻害剤 4 μ 8c を作用させ、両者のルートを阻害してその効果を調べることにした。4 μ 8c の効果は素晴らしく、添加と同時にインスリン分泌がほぼ抑えられることがわかったが、詳細に調べると IRE1 とは無関係にインスリン分泌を選択的に抑えることが明らかとなりこの阻害剤は使えないことがわかった (Sato et al., Cell Struc. Func.2017)。逆に、MIN6 (*Ire1*^{R/R}/*Atf6*^{+/+}) 細胞に ATF6 阻害剤 Ceapin-A7 を作用させて効果を見る実験も試みたが、今のところはっきりとした影響は見られていない。今後はもっと別の方法を考えなければならない。

(2) XBP1u の翻訳休止機構の解析と小胞体ストレス応答における生理的意義

XBP1u タンパク質は、C 末側に小胞体へ輸送されるためのシグナル配列 HR2 と翻訳休止のためのシグナル PS をその順でもつ (図 3 参照)。翻訳休止をしないと HR2 は SRP に認識されることが、従来の SRP 経路と大きく異なる点である (図 4、PNAS, 2016)。翻訳休止は PS とリボソームトンネルを形成する蛋白質や rRNA との相互作用が大きいことが予想されたので、相互作用分子を光架橋により検出した。質量分析の結果、XBP1u の PS はリボソーム蛋白 uL4 と強く相互作用していることが示唆された。クライオ電顕の結果から uL4(R71) と相互作用している可能性が示唆されていたので、uL4 と XBP1u の PS に

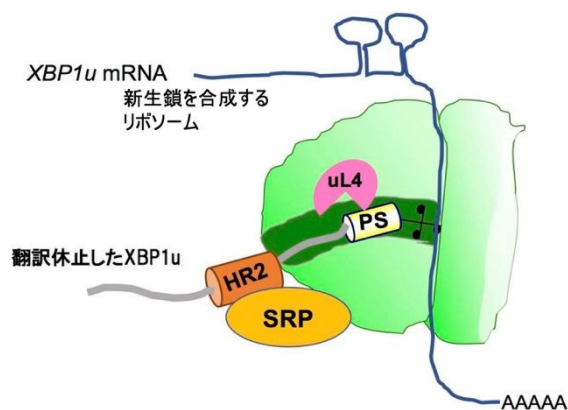
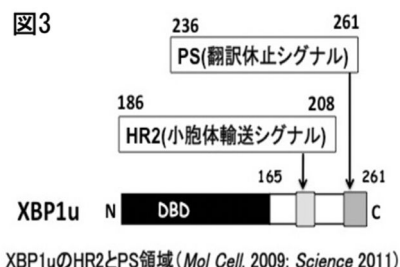


図4 XBP1uのPSとuL4とが相互作用して翻訳休止が起きる模式図

変異を導入し実際に相互作用しているかどうかを検証した。宿主細胞の uL4 を変異型 uL4 と入れ換えた細胞で翻訳休止が起こるかどうかを調べたところ、uL4(WT), uL4(R71K) の時には休止したが、R71G, A, E, W に変異すると休止しなくなったので、R71 位の側鎖の長さや陽イオンが関係していることが示された。哺乳動物細胞を用いてリボソーム蛋白質に変異を入れ翻訳途中で停止した蛋白質の翻訳停止を解除したのは、おそらく初めての報告になるので重要な成果である。uL4(Arg71) と XBP1u(Pro243) とが相互作用していることがクライオ電顕結果から示唆されているので、今後は XBP1u の 243 位の Pro の前後のアミノ酸に変異を導入し、両者の相互作用を詳細に調べることが重要と思われる。

報告になるので重要な成果である。uL4(Arg71) と XBP1u(Pro243) とが相互作用していることがクライオ電顕結果から示唆されているので、今後は XBP1u の 243 位の Pro の前後のアミノ酸に変異を導入し、両者の相互作用を詳細に調べることが重要と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shanmuganathan Vivekanandan, Schiller Nina, Magoulopoulou Anastasia, Cheng Jingdong, Braunger Katharina, Cymer Florian, Berninghausen Otto, Beatrix Birgitta, Kohno Kenji, von Heijne Gunnar, Beckmann Roland	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural and mutational analysis of the ribosome-arresting human XBP1u	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.46267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsuchiya Yuichi, Saito Michiko, Kadokura Hiroshi, Miyazaki Jun-ichi, Tashiro Fumi, Imagawa Yusuke, Iwawaki Takao, Kohno Kenji	4. 巻 217
2. 論文標題 IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1287 ~ 1301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201707143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujimoto Takushi, Nakamura Oriie, Saito Michiko, Tsuru Akio, Matsumoto Masaki, Kohno Kenji, Inaba Kenji, Kadokura Hiroshi	4. 巻 293
2. 論文標題 Identification of the physiological substrates of PD1p, a pancreas-specific protein-disulfide isomerase family member	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 18421 ~ 18433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.003694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大古殿美加、河野憲二	4. 巻 267
2. 論文標題 小胞体膜への蛋白質の標的化 蛋白質の個性に応じた輸送経路	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 971-975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 土屋雄一、河野憲二	4. 巻 57
2. 論文標題 小胞体ストレスセンサーIRE1 によるプロインスリンの酸化的折り畳みの制御機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 161-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hitomi, Shiba Yoko, Tsuchiya Yuichi, Saito Michiko, Kohno Kenji	4. 巻 42
2. 論文標題 4 μ 8C inhibits insulin secretion independent of IRE1 RNase activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 61-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.17002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計26件(うち招待講演 8件/うち国際学会 9件)

1. 発表者名 大古殿美加、曾川愛守榮、柳谷耕太、木俣行雄、河野憲二
2. 発表標題 XBP1u翻訳休止におけるリボソームタンパク質uL4の関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池雅昭、河野憲二
2. 発表標題 重複機能ドメインの解析から得られたXBP1遺伝子の起源と進化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八巻聡、河野憲二、稲葉謙次、門倉広
2. 発表標題 ヒト細胞小胞体機能の低下を鋭敏に検出するレポーターの開発と応用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大古殿美加、曾川愛守榮、柳谷耕太、木俣行雄、河野憲二
2. 発表標題 XBP1u翻訳休止におけるリボソームタンパク質uL4の関与
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会 第19回日本蛋白質科学会年会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋雄一、斉藤美知子、門倉広、宮崎純一、田代文、今川佑介、岩脇隆夫、河野憲二
2. 発表標題 IRE1 -XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic cells.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaaki Koike, Kenji Kohno
2. 発表標題 Conserved overlapping coding frame regulates two types of XBP1 functions.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 The role and the mechanism of XBP1u-translational pausing in the ER stress signaling.
3. 学会等名 International Symposium; Proteins: From the cradle to the grave (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Komatsu, Akio Tsuru, Koubun Yasuda, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi, Kenji Kohno
2. 発表標題 Requirement of ER stress response for nematode expulsion through mature mucin production by IRE1 specific pathway.
3. 学会等名 International Symposium; Proteins: From the cradle to the grave (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaaki Koike, Kenji Kohno
2. 発表標題 XBP1 encodes SRP recognition motif and transactivation domain in a conserved dual-coding frame.
3. 学会等名 International Symposium; Proteins: From the cradle to the grave (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuichi Tsuchiya, Michiko Saito, Hiroshi Kadokura, Jun-ichi Miyazaki, Takao Iwawaki, Kenji Kohno
2. 発表標題 IRE1 -XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic cells.
3. 学会等名 International Symposium; Proteins: From the cradle to the grave (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miku Ohfurudono, Ashway Sogawa, Kota Yanagitani, Yukio Kimata, Kenji Kohno
2. 発表標題 XBP1u translational pausing requires the interaction between own nascent chain and ribosomal proteins.
3. 学会等名 International Symposium; Proteins: From the cradle to the grave (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 The role and mechanism of XBP1u-translational pausing in the ER stress signaling.
3. 学会等名 EMBO workshop: Endoplasmic Reticulum function and disease (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 XBP1u翻訳休止機構と小胞体ストレス下での役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ashway Sogawa, Miku Ohfurudono, Kota Yanagitani, Kenji Kohno
2. 発表標題 Roles of listerin in protein translocation into the endoplasmic reticulum.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kota Yanagitani, Ramanujan Hegde
2. 発表標題 みなしご蛋白質に対する品質管理因子UBE20の発見
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miku Ohfurudono, Ashway Sogawa, Yukio Kimata, Kenji Kohno
2. 発表標題 Molecular mechanism of XBP1u translational pausing
3. 学会等名 EMBO Conference: Protein quality control (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 Translational pausing in the ER stress signaling
3. 学会等名 International Symposium on Protein Quality Control (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 Translational pausing in the ER stress signaling
3. 学会等名 FASEB Science Research Conferences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaaki Koike, Kenji Kohno
2. 発表標題 The role of translational pausing in the delivery of XBP1u mRNA to the ER via the SRP pathway
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kimata, Y., Nguyen, T.M.P., Kohno, K.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 259 (161-188)
3. 書名 Stress response mechanisms in fungi-theoretical and practical aspects	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>読売新聞(2018.5/20)朝刊奈良版28面 「インスリン合成仕組み解明、奈良先端大 必要なたんぱく質同定、糖尿病治療法開発に光」</p> <p>河野特任研究プロジェクト http://www.naist.jp/iri/kouno/ 河野特任研究プロジェクト https://www.facebook.com/naist.kohnolab/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	都留 秋雄 (Tsuru Akio) (80273861)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

