

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20380062

研究課題名（和文） 小胞体ストレスセンサーIRE1によるシグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the signal transduction mechanism by ER stress sensor IRE1.

## 研究代表者

河野 憲二 (KOHNO KENJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：50142005

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレス応答に重要な哺乳動物の IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路、また IRE1 $\beta$  の標的分子の解析を行った。その結果、転写因子前駆体をコードする *XBP1u* mRNA が小胞体ストレスセンサーIRE1 $\alpha$ により効率良くスプライシングを受ける分子機構、また大腸杯細胞に特異的に発現する IRE1 $\beta$  が小胞体膜上にリクルートされる mRNA 量の安定性に重要な役割をになっていることを解明した。

研究成果の概要（英文）：Mammalian ER stress response pathway, IRE1 $\alpha$ -XBP1, and the target molecule of IRE1 $\beta$  have been studied. As the result, the efficient splicing mechanism of precursor *XBP1u* mRNA, which encodes the precursor of a transcription factor XBP1s, has been precisely studied. Further IRE1 $\beta$ , specifically expressed in goblet cells of colon, plays an important role in the regulation of mRNA stability of secretory and membrane proteins.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：応用生物化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：シグナル伝達、ストレス、動物、細胞・組織、蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

動物細胞では小胞体ストレス応答は小胞体のストレスセンサーの種類により大きく3つの経路に分類される。酵母から進化的に保存されている IRE1 経路、小胞体膜結合型の転写因子 ATF6 経路、タンパク質合成を抑制する PERK 経路で

ある。哺乳動物では IRE1 $\alpha$  と IRE1 $\beta$  の2種のパラログがあり、IRE1 $\alpha$  は標的分子 *XBP1s* mRNA を細胞質でスプライシングし転写因子 XBP1s を合成することがわかっていた。しかし、本来小胞体膜上に行かないはずの *XBP1u* mRNA が、どのような機構で小胞体膜に集められるのかについては全くわか

っていなかった。さらに、*XBPlu* mRNA が *IRE1α* により切断を受けたあと、どのような分子によりどのような反応で連結されるのかに関してもわかっていなかった。一方、*IRE1β* は消化器系でのみ発現されており、その標的分子の1つは *XBPlu* mRNA であると報告されていた。しかしその活性は *IRE1α* に比べると低く、また *IRE1β* には rRNA 切断活性も認められていた。しかし生理作用については明らかとなっていない。申請者は、*XBPlu* mRNA が小胞体膜に効率良く集まる仕組み、*XBPlu* mRNA が切断を受けた後2つをつなぐための分子機構、さらに *IRE1β* の標的分子を明らかにすることが、*IRE1-XBP1* 経路を理解するうえで重要な点と考え、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

*IRE1β* は、ノザン解析により大腸・胃・小腸など消化器系に特異的に発現しており、作製した *IRE1β* 抗体により、*IRE1β* は大腸や胃の杯細胞 (goblet cell) で大量に発現していることがわかった。本研究の目的の1つは、消化器系で特異的に発現される *IRE1β* の新規の標的分子を同定し、*IRE1β* KO マウスで生ずる小胞体異常が何に起因するのか、何故杯細胞では *IRE1β* が発現しても細胞死に至らないのか、ある種のストレスをかけた時に異常が起きないのかどうか、などという点に着目し特に炎症性腸疾患との関連も考慮して解析する。これらの解析結果をふまえ最終的には *IRE1β* の生理的役割を明らかにする。もう1つの目的は、*IRE1α-XBP1* 経路における *XBPlu* mRNA のスプライシングがどのような仕組みによって小胞体膜上で効率よく行われているのか、未解明のリガーゼの単離を含め明らかにする。これらを明らかにすることにより、小胞体ストレス応答の生理的意義を明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

### (1) *IRE1β* の生理機能解析

ホタルルシフェラーゼのN末にシグナルペプチド、C末に小胞体保持シグナルをつけた分泌型タンパク質のモデルになるレポーター用タンパク質を作製 (FLuc-ER) し、小胞体でのタンパク質合成をルシフェリンの発光強度を吸光度と

して測定することで簡便に測れる方法を樹立した。またサイトゾル側のレポーターとして、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼを用い (Rluc-Cyt) 両者の吸光度を同時に測定することにより、小胞体内でのタンパク質合成量を簡便にかつ定量的に測定できる系を構築した。この2つのレポーターと *IRE1α* あるいは *IRE1β* いずれか計3種類の遺伝子を HeLa 細胞にトランスフェクションし、*IRE1* の活性化がサイトゾルあるいは小胞体タンパク質両者の合成にどのような影響を与えるかを調べた。

### (2) *XBPls* mRNA の小胞体膜上に集めるための分子機構の解析

*XBPlu* mRNA と *XBPls* mRNA を用い、これらをウサギ網状赤血球由来の無細胞タンパク質合成系に加え、両者のタンパク質合成の違いをゲル電気泳動法により検出した。

### (3) 細胞質スプライシングの無細胞再構成系の確立とリガーゼの精製

バキュロウイルスと Sf9 細胞を用いて、*IRE1α* のサイトゾリック領域 (キナーゼと RNase 領域をもつ) を組換えタンパク質として精製し、*XBPlu* RNA を標的として試験管内で切断する系を構築した。この系に赤血球抽出液画分を加えると細胞質スプライシングを試験管内で再構成する系を樹立することができた。この系を用いて抽出液の分画とリガーゼの精製を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) *IRE1β* の生理機能解析

PERK は報告通り Rluc-Cyt, Fluc-ER 両者の合成を抑えたが、*IRE1α* の過剰発現は両者の合成に大きな影響を与えなかった。しかし *IRE1β* の過剰発現は Rluc-Cyt には影響を与えなかったが、Fluc-ER の発現を顕著に抑えた。*IRE1α* と *IRE1β* の活性の差がどこにあるかを調べたところ、RNase 領域に依存していることがわかった。さらに、8種類の分泌タンパク質について調べた所、すべてのタンパク質の合成が抑制されていることが明らかとなった。この結果は、*IRE1β* が活性化すると小胞体膜上の mRNA を切断することによりその量を減らし、結果として小胞体特異的にタンパク質合成を抑制するという申請者らの仮説

を支持した。

## (2) XBPlu mRNA の小胞体膜へのリクルート機構

XBPlu mRNA を用いてそのタンパク質合成過程を詳細に検討した結果、XBPlu 特異的な C 末側領域に膜へのリクルートに必要な疎水領域 HR2 があること、さらに C 末側の 26 アミノ酸領域が、タンパク質の合成を一時的に停止する活性があるという興味深い現象を見出した。このタンパク質合成の一時的停止に必要な XBPlu の領域は C 末端側 26 アミノ酸であることは述べたが、このうち一時停止に必須なアミノ酸 15 個を同定した。さらにこの 15 個のアミノ酸は脊椎動物の XBPlu に非常に高く保存されていることを見出した。この結果から、合成途中のタンパク質が一時的に合成を留めることにより XBPlu の HR2 領域を利用して XBPlu mRNA が小胞体膜上にリクルートされること、XBPlu mRNA が小胞体膜上に常に集まることで小胞体ストレス時により効率的にストレス応答 (XBPlu mRNA のスプライシング) が起こることが明らかとなった。このことは、合成途中のタンパク質が mRNA の局在化の機能をもつこと、またタンパク質合成を一時的に停止する配列が明らかとなった、という 2 点の結果から、今までの生物学に新しいパラダイムシフトをもたらした。この結果は *Mol Cell* 誌 (表紙カバーにも採用される) と *サイエンス誌* の両者に報告掲載することができ (発表論文の 2 と 7)、大きな反響を呼んでいる。

## (3) 細胞質スプライシングに必要なリガーゼの単離

細胞質スプライシングの無細胞再構成系を樹立したので、その方法を用いてリガーゼ活性画分の同定をおこなったところ、リガーゼ活性を再構築するために 2 つの画分を必要とすることが明らかとなった。このことから哺乳動物のリガーゼは少なくとも 2 つの因子を必要とする可能性があることが示唆された。さらに哺乳動物 XBPlu mRNA の細胞質スプライシングの連結反応は、酵母 *HAC1* mRNA のスプライシング反応とは異なることも明らかとした。この結果は *Nucleic Acids Research* 誌に掲載されただけでなく、上位論文 5 % に与えられる Featured Article に指定された (論文の 1)。

(4) 今後は、IRE1  $\beta$  が実際に mRNA を切断すること、IRE1  $\beta$  のムチン合成における *in vivo* での役割、XBPlu タンパクの一時的合成停止機構の詳細な分子レベルでの解析、一時停止配列

を利用した新しいタンパク質機能解析手法の開発、XBPlu mRNA のスプライシング反応に関与するリガーゼ分子の同定に向けて研究を進める予定である。

## 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 15 件)

- ① Shinya, S., Kadokura, H., Imagawa, Y., Inoue, M., Yanagitani, K., and Kohno, K. Reconstitution and characterization of the unconventional slicing of XBPlu mRNA in vitro. *Nuc. Acids Res.* [Epub ahead of print] published online March 11, 2011, 査読有
- ② Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H. and Kohno, K. Translational pausing ensures membrane-targeting and cytoplasmic splicing of XBPlu mRNA. *Science* 331, (6017) 586-589, 2011, 査読有
- ③ 柳谷耕太, 河野憲二, XBPlu mRNA が小胞体膜において効率よくスプライシングされるには翻訳停止反応が必要である, *ライフサイエンス新着論文レビュー*, 2011, 査読無
- ④ 柳谷耕太, 河野憲二, 小胞体膜貫通型センサー IRE1 が核に効率よく情報を伝える仕組み, *化学と生物* Vol. 48, 226-228, 2010, 査読無
- ⑤ Hosoda, A., Tokuda, M., Akai, R., Kohno, K., Iwawaki, T. Positive contribution of ERdj5/JPDI to endoplasmic reticulum protein quality control in the salivary gland. *Biochem. J.*, 425, 117-125, 2010, 査読有
- ⑥ Kohno, K., Stress sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. *J. Biochem.* 147, 27-33, 2010, 査読有
- ⑦ Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., and Kohno, K. Cotranslational targeting of XBPl protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Mol. Cell* 34, 191-200, 2009, 査読有
- ⑧ Oikawa, D., Kimata Y, Kohno, K., and Iwawaki, T. Activation of mammalian IRE1  $\alpha$  upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded

proteins. *Exp. Cell Res.* 315, 2496-2504, 2009, 査読有

- ⑨ Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., and Kohno, K. Function of IRE1 $\alpha$  in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 16657-16662, 2009, 査読有
- ⑩ Yoshiuchi, K., Kaneto, H., Matsuoka, TA, Kasami, R., Kohno, K., Iwawaki, T., Nakatani, Y., Yamasaki, Y., Shimomura, I., and Matsuhisa, M., Pioglitazone reduces ER stress in the liver: Direct monitoring of in vivo ER stress using ER stress-activated indicator transgenic mice. *Endocr. J.* 56, 1103-1111, 2009, 査読有
- ⑪ 斎藤美知子, 河野憲二, ジフテリア毒素受容体を利用した疾患モデルマウスの作製, 蛋白質核酸酵素 54 (5), 614-620, 2009, 査読有
- ⑫ 柳谷耕太, 河野憲二, 小胞体膜上でのスプライシングに必須な mRNA 局在化のメカニズム, 細胞工学 28 (8), 826-827, 2009, 査読無
- ⑬ 柳谷耕太, 河野憲二, 細胞質スプライシングに必須な mRNA 局在化のメカニズム, 蛋白質核酸酵素 54 (16), 2177-2183, 2009, 査読有
- ⑭ Takeuchi, M., Kimata Y., and Kohno, K. *Sacchomyces cerevisiae* Rot1 functions as a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 19, 3514-3525, 2008, 査読有
- ⑮ Suzuki, H., Kanekura, K., Levine, T., Kohno, K., Olkkonen, V.M., Aiso, S., and Matsuoka M. ALS-linked P56S-VAPB, an aggregated loss-of-function mutant of VAPB, predisposes motor neurons to ER stress-induced death by inducing aggregation of co-expressed wild-type VAPB. *J. Neurochem.* 108, 973-985, 2009, 査読有

[学会発表] (計 40 件)

- ① 江崎悠太, XBPlu タンパク質の小胞体膜局在化メカニズムの解析, BMB2010, 2010. 12. 10, 兵庫県
- ② 杉村瞳, Functional Difference Between IRE1 $\alpha$  and IRE1 $\beta$ , BMB2010, 2010. 12. 10, 兵庫県
- ③ 都留秋雄, The ER stress sensor IRE1 $\beta$  down-regulates MUC2 mRNA to optimize mucin production, BMB2010, 2010. 12. 7, 兵庫県
- ④ 柳谷耕太, Unfolded-protein interaction with stress sensor Ire1, The 3rd International Symposium on Protein Community, 2010. 9. 13, 奈良県
- ⑤ 中村大祐, The role of IRE1 $\beta$  in LS174T human colon carcinoma cells, The 3rd International Symposium on Protein Community, 2010. 9. 13, 奈良県
- ⑥ 新谷紗代子, Exploring factors involved in

the splicing of XBPlu mRNA, The 3rd International Symposium on Protein Community, 2010. 9. 13, 奈良県

- ⑦ 新谷紗代子, Analysis of XBPlu mRNA splicing reaction in unfolded protein response, 15th Annual meeting of the RNA society, 2010. 6. 23, Washington (USA)
- ⑧ 柳谷耕太, 新生鎖を介した XBPlu mRNA の膜局在化に必須な分子機構, 第 62 回日本細胞生物学会大会, 2010. 5. 21, 大阪府
- ⑨ 河野憲二, The ER stress-sensory mechanism by transmembrane protein Ire1-Dimerization of Ire1 is not sufficient for its activation, CSHL Meeting "Molecular Chaperones & Stress Responses", 2010. 5. 5, New York (USA)
- ⑩ 柳谷耕太, Molecular mechanism for nascent chain-mediated XBPlu mRNA targeting onto membrane, CSHL Meeting "Molecular Chaperones & Stress Responses", 2010. 5. 5, New York (USA)
- ⑪ 今井安隆, ATF4 induces IRE1 $\alpha$  under stressed conditions, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 12, 神奈川県
- ⑫ 新谷紗代子, Analysis of XBPlu mRNA splicing reaction in ER stress response, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 12, 神奈川県
- ⑬ 山本洋平, A novel ER-localized DnaJ protein, DNAJB12, participates in ER quality control, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 12, 神奈川県
- ⑭ 神園栄夫, Molecular phylogenetic and evolutionary trace analysis for stress response sensor protein IRE1, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 12, 神奈川県
- ⑮ 松崎永英, HSP70 plays an important role in the recovery of IRE1 $\beta$  knockout goblet cells from ER distension, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 12, 神奈川県
- ⑯ 横田有希子, The life of XBPlu protein: From birth to death, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 12, 神奈川県
- ⑰ 河野憲二, IRE1 $\beta$  is a key molecule for ER quality control in goblet cells, The 4th Cell Stress Society International (CSSI) Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2009. 10. 7, 北海道
- ⑱ 河野憲二, 小胞体ストレスセンサー IRE1 のクラスタリングと細胞質スプライシング, 第 69 回酵母研究会, 2009. 9. 9, 京都
- ⑲ 河野憲二, The role of IRE1 in unfolded protein response, IV International

- Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis, 2009. 8. 31, Warsaw (Poland)
- ②① 河野憲二, Dynamic regulation of XBP1 mRNA distribution in ER stress response, Gordon Research Conferences “Stress Protein In Growth, Development & Disease”, 2009. 7. 1, Andover (U. S. A)
- ②② 山本洋平, A novel ER-localized DnaJ protein, DNAJB12, participates in ER quality control, FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES “From Unfolded Protein in the Endoplasmic Reticulum to Disease”, 2009. 6. 9, Vermont (U. S. A)
- ②③ 柳谷耕太, Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA, 第61回日本細胞生物学会大会, 2009. 6. 4, 愛知県
- ②④ 河野憲二, 小胞体ストレス応答における XBP1 mRNA 細胞内局在のダイナミックな制御, 第61回日本細胞生物学会大会, 2009. 6. 3, 愛知県
- ②⑤ 中村大祐, 小胞体ストレスセンサーIRE1βの翻訳抑制機構, 第61回日本細胞生物学会大会, 2009. 6. 3, 愛知県
- ②⑥ 河野憲二, IRE1beta is a key molecule for ER quality control in goblet cells, BMB2008, 2008. 12. 10, 兵庫県
- ②⑦ 斎藤美知子, 膵β細胞のインスリン分泌における IRE1αの役割, BMB2008, 2008. 12. 10, 兵庫県
- ②⑧ 竹内雅人, 酵母小胞体分子シャペロンRot1による蛋白質折り畳み機構の解析, BMB2008, 2008. 12. 10, 兵庫県
- ②⑨ 今井安隆, 小胞体ストレス下におけるIRE1α誘導機構の解析, BMB2008, 2008. 12. 10, 兵庫県
- ②⑩ 紫藤昌宏, Ire1は構造異常蛋白質の蓄積以外の小胞体ストレスも感知する, BMB2008, 2008. 12. 10, 兵庫県
- ③① 竹内あすみ, 小胞体ストレスセンサーIre1ファミリーのN末配列の役割, BMB2008, 2008. 12. 10, 兵庫県
- ③② 中村優作, 膵島における小胞体ストレス応答経路活性化機構の解析, BMB2008, 2008. 12. 10, 兵庫県
- ③③ 山本洋平, 新規Hsp40 familyタンパク質DNAJB12及びDNAJB14の機能解析, BMB2008, 2008. 12. 10, 兵庫県
- ③④ 門倉広, タンパク質ジスルフィド結合形成反応中間体の検出とその解析, BMB2008, 2008. 12. 9, 兵庫県
- ③⑤ 河野憲二, XBP1 mRNAの小胞体ストレス時における局在変化, 第3回小胞体ストレス研究会, 2008. 10. 4, 岐阜県
- ③⑥ 柳谷耕太, XBP1 mRNAはER膜上に局在することでIRE1αによって効率的にスプライシングされる, 第60回日本細胞生物学会大会

- , 2008. 6. 30, 神奈川県
- ③⑦ 中村大祐, IRE1βによる分泌タンパク質選択的な翻訳抑制, 第60回日本細胞生物学会大会, 2008. 6. 30, 神奈川県
- ③⑧ 紫藤昌宏, Ire1は構造異常蛋白質の蓄積とは別種の小胞体ストレスとして膜の異常を感知しているのかもしれない, 第60回日本細胞生物学会大会, 2008. 6. 30, 神奈川県
- ③⑨ 藤本直子, IRE1βは杯細胞の小胞体品質管理における重要な分子である, 第60回日本細胞生物学会大会, 2008. 6. 30, 神奈川県
- ③⑩ 柳谷耕太, Membrane localization of XBP1 mRNA contributes the efficiency of IRE1α-dependent cytoplasmic splicing, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Molecular Chaperones and Stress Response”, 2008. 5. 3, Cold Spring Harbor (U. S. A)
- ④① 中村大祐, IRE1beta specifically attenuates the translation of ER proteins, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Molecular Chaperones and Stress Response”, 2008. 5. 2, Cold Spring Harbor

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 形質転換動物及び形質転換幹細胞並びにそれらの利用  
発明者: 河野憲二、斎藤美知子、中島欽一、古川智久  
権利者: 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-181449  
出願年月日: 2010年8月13日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページアドレス  
<http://bsw3.naist.jp/kouno/kouno.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 憲二 (KOHNO KENJI)  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科・教授  
研究者番号: 50142005

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

斉藤 美知子 (SAITO MICHIKO)  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科・助教  
研究者番号：40379558