

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15969

研究課題名（和文）小胞体ストレスセンサーIRE1の活性型ジスルフィドオリゴマー形成機構解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of disulfide-bonded active oligomerization by an endoplasmic stress sensor IRE1

研究代表者

松崎 元紀 (MATSUSAKI, Motonori)

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号：90817040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレス応答は、有害なミスフォールドタンパク質の蓄積を感知して、その除去を促す細胞の防御システムである。哺乳動物の主要なストレスセンサーであるIRE1は精力的に研究されてきたが、活性化の際の分子機構に未解明な点が多かった。本研究では、IRE1が形成する活性型オリゴマーの構造動態解明に取り組み、IRE1、分子間ジスルフィド結合、ミスフォールドタンパク質などの因子の量が構造動態に与える影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレス応答制御の破綻や過剰な活性化が、神経変性疾患、2型糖尿病、癌などの様々な疾患と結びついているため、制御の分子機構解明は急務だが、IRE1によるUPR経路の初期に起きるイベントの分子機構が未解明なことが創薬等の障害になっていた。本研究の成果からこれまで不明だったIRE1活性化機構の一端が解明され、その制御に分子間ジスルフィド結合が重要なことが示された。今後IRE1の分子間ジスルフィド結合をターゲットとし、UPR制御に働く、新たな創薬基盤の確立が期待される。

研究成果の概要（英文）：The endoplasmic reticulum (ER) stress response is a cellular defense system that senses the accumulation of cytotoxic misfolded proteins and promotes their removal. IRE1, a major mammalian stress sensor, has been studied intensively, but the molecular mechanisms underlying its activation remain largely unresolved. In this study, I worked to elucidate the structural dynamics of active oligomers formed by IRE1 and clarified the effects of the amount of regulatory factors such as IRE1 concentration, intermolecular disulfide bonds, and misfolded proteins on its dynamics.

研究分野：生化学

キーワード：ジスルフィド結合 小胞体 IRE1 PDIファミリー 小胞体ストレス応答 ミスフォールドタンパク質 インスリン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物細胞の小胞体では、インスリンや IgG のような重要な分泌タンパク質が、組織の役割や生体内の需要の変化に応じて生産されている。小胞体で生産される分泌タンパク質の多くには、重要な翻訳後修飾として、ジスルフィド結合が導入され、これに伴って三次元立体構造形成が行われるため、酸化的フォールディングと呼ばれている(Arolas et al., *Trends Biochem. Sci.*, 2006)。酸化的フォールディングは、ジスルフィド結合を触媒する PDI ファミリータンパク質同士あるいは他の小胞体分子シャペロンと共役した巧妙なシャペロンネットワークによって触媒されている (Kanemura et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2020)。しかし、酸化還元環境の摂動、糖鎖修飾の阻害、許容量を超えたタンパク質の生産、老化などは、このシャペロンネットワークの働きを阻害し、フォールディングの失敗 (ミスフォールディング) と、それに伴う小胞体内におけるミスフォールドタンパク質の蓄積、すなわち小胞体ストレス (ER ストレス) を惹起してしまう (Hetz et al., *Nat. Cell Biol.*, 2015; Rao and Bredesen, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004; Taylor et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2014)。Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ) はミスフォールドタンパク質の蓄積を直接的あるいは間接的に感知し、unfolded protein response (UPR) を惹起する重要な小胞体ストレスセンサーであり、酵母から高等動物まで広く保存されている (Iwata and Koizumi, *Trends Plant Sci.*, 2012; Walter and Ron, *Science*, 2011)。ヒトでは、UPR 制御の破綻や過剰な活性化が、神経変性疾患、2 型糖尿病、癌などの様々な疾患と結びついているため (Hetz and Saxena, *Nat. Rev. Neurol.*, 2017; Hetz et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020; Wang and Kaufman, *Nature*, 2016)、IRE1 による細胞内シグナリングは精力的に研究されてきたが、IRE1 による UPR 経路の初期に起きるイベントの分子機構は完全には理解されていない。

培養細胞レベルでは、酵母 Ire1 とヒト IRE1 $\alpha$  の両方が、ER ストレスを感知して、共焦点顕微鏡観察下で斑点状に集合して活性化することが報告されている (Kimata et al., *J. Cell Biol.*, 2007; Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010)。この斑点状に観察されるクラスターには、数百分子の IRE1 $\alpha$  が含まれると予測されるが詳細は不明である。また、なぜ IRE1 $\alpha$  分子がクラスターを形成できるのかという分子機構も分かっていない。近年では、このようなクラスターの数や大きさ、および細胞の応答が、ER ストレスの質によって変化することも明らかにされた (Belyy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2020; Bergmann et al., *J. Biol. Chem.*, 2018; Ricci et al., *FASEB J.*, 2019)。したがって、IRE1 $\alpha$  による活性型クラスター形成の分子機構解明は、UPR 制御の理解に重要であり、UPR 制御の破綻などに起因する疾患の予防や治療に寄与すると考えられる。

IRE1 $\alpha$  は一回膜貫通タンパク質で、N 末端側の内腔ドメインが ER ストレスを感知してクラスタリングを起こし、C 末端側の二つの細胞質ドメインが自己リン酸化による活性化および特異的スプライシングによる UPR シグナリングを担う (Walter and Ron, *Science*, 2011)。IRE1 $\alpha$  内腔ドメインの会合は細胞質ドメインによる自己リン酸化、すなわち IRE1 $\alpha$  活性化のトリガーとなるが、活性型オリゴマーの構造や動態はほとんど分かっていない。加えて、分子間ジスルフィド結合 (Eletto et al., *Mol. Cell*, 2014; Liu et al., *J. Biol. Chem.*, 2002)、ミスフォールドタンパク質との直接的な結合 (Credle et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005; Karagöz et al., *Elife*, 2017) による会合状態の制御が提唱されているが、これらの因子がどのように活性型オリゴマー形成を駆動するのかが検討されていないため、IRE1 $\alpha$  内腔ドメインをターゲットとした創薬基盤などの確立に障害となっていた。

## 2. 研究の目的

不活性型 IRE1 $\alpha$  が、どんな分子機構で数百～数千分子の IRE1 が含まれると考えられるクラスターを形成するのかの理解を難しくしていたのは、IRE1 $\alpha$  の会合状態を可視化する際の技術的制約である。これまで、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 法 (Amin-Wetzel et al., *Cell*, 2017; *Elife*, 2019)、超遠心分析法 (Karagöz et al., *Elife*, 2017)、BlueNative-PAGE (BN-PAGE) immunoblotting 法 (Sundaram et al., *Mol. Biol. Cell*, 2018) によって、IRE1 $\alpha$  の会合状態が見積もられてきたが、分画が不完全であったため、何量体が存在するのかは謎に包まれている。そこで、本研究では、下記の達成を通じて、活性型オリゴマーの構造動態解明を目的とした。

- (1) 試験管内における IRE1 $\alpha$  内腔ドメイン多量体の高分解能分画法の確立
- (2) 会合状態制御因子 (分子間ジスルフィド結合など) の同定と相互作用解析
- (3) 制御因子が活性型オリゴマーの構造動態に及ぼす影響の定量化

## 3. 研究の方法

IRE1 $\alpha$  内腔ドメインを大腸菌発現系により調製し、リコンビナント IRE1 $\alpha$  内腔ドメインを得た。BN-PAGE 法 (Wittig et al., *Nat. Protoc.*, 2006) を改良した ClearNative-PAGE (CN-PAGE) 法 (Pandhare et al., *Protein Expr. Purif.*, 2019; Tanikawa et al., *Molecules*, 2021) を用いて、IRE1 $\alpha$  内腔ドメイン多量体を、分子量にしたがって分離した。この方法では変性剤 SDS を使用せず、CBB G-250 を泳動サンプルに添加することでタンパク質の表面電荷を天然構造を保ったままキャンセルしている。また、Native 質量分析を用いた会合状態分析により、CN-PAGE の移動度と内腔ドメイン多量体の分子量の関係を確認した。

制御因子の同定では、上記の系により IRE1 $\alpha$  濃度、分子間ジスルフィド結合、ミスフォール

ドタンパク質について構造動態への影響を検討した。ミスフォールドタンパク質のモデルとしてインスリンを用いた。本検討から、分子間ジスルフィド結合が IRE1 $\alpha$  多量体の構造動態を制御することが明らかになったため、小胞体内におけるジスルフィド結合の形成、架け替え、開裂を担う酵素群 PDI ファミリーと IRE1 $\alpha$  内腔ドメインとの相互作用を Far-Western blot により検討した。さらに、PDI ファミリーによる分子間ジスルフィド結合の切断について、SDS-PAGE とシステイン残基修飾剤を組み合わせた時系列解析で検討した。PDI ファミリーのうち、P5 と ERp72 が特に強く IRE1 $\alpha$  と相互作用し、かつ P5 と ERp72 間にも強い相互作用があることが分かったため、蛍光分光光度計を用いた光散乱の測定により、これらの PDI ファミリーのシャペロン活性についても検討した。

制御因子が活性型オリゴマーの構造動態に及ぼす影響の定量化では、CN-PAGE により、内腔ドメインの濃度 (IRE1 $\alpha$  の発現量)、分子間ジスルフィド結合量 (小胞体のレドックス環境)、および、ミスフォールドタンパク質との直接的結合 (小胞体ストレス量) について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 試験管内における IRE1 $\alpha$ 内腔ドメイン多量体の高分解能分画法の確立

IRE1 $\alpha$  内腔ドメインは、全長配列から、シグナルペプチドを取り除き、内腔側の C 末端に GST、6x His タグを融合させて作製した。大腸菌発現系での大量培養、アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、分子間ジスルフィド結合を含まない内腔ドメインを還元型内腔ドメインとしてシングルバンドまで純化した。

先行研究と同様に、SEC 法で内腔ドメインの会合状態を分析すると、内腔ドメイン濃度に応じてピークが低分子側にシフトすること、すなわち二つ以上の会合状態存在することが分かった。しかし、これらの会合状態を分離することはできなかった。

内腔ドメインを CN-PAGE で分離したところ、濃度に応じて複数のバンドが検出され、内腔ドメインが様々な会合状態をとることがわかった。特に 4  $\mu$ M 以上に濃度を上げると三つ以上のバンドが出現し、ダイマーよりも大きな会合状態の存在が示唆された。Native 質量分析により、低濃度内腔ドメインの解析を行ったところ、単量体はほとんど存在せず、ダイマーが主要な成分であることがわかった。CN-PAGE の移動度との比較から、還元型内腔ドメインはダイマーを構成単位(プロトマー)として、4、6、8、.....、とより大きな会合状態を取り得ることが分かった。

##### (2) 会合状態制御因子(分子間ジスルフィド結合など)の同定と相互作用解析

分子間ジスルフィド結合を一つだけ含む内腔ドメイン多量体を、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離し、これを酸化型内腔ドメインとした。

酸化型内腔ドメインは、SEC 分析で還元型内腔ドメインよりも大きな会合状態をとることが示唆され、分子間ジスルフィド結合が会合状態の制御因子であることが分かった。

細胞内で PDI ファミリーの一つ P5 が、内腔ドメインの分子間ジスルフィド結合を制御することが示唆されていた(Eletto et al., *Mol. Cell*, 2014)。そこで、内腔ドメインの分子間ジスルフィド結合制御を試験管内で確認するため、様々な PDI ファミリーと内腔ドメインの親和性を Far-Western blot により検討したところ、P5 と ERp72 の相互作用が強いことがわかった。

P5 による内腔ドメインの分子間ジスルフィド結合切断を時系列解析で検討すると、P5 ホモダイマーが効率よく、分子間ジスルフィド結合の切断に働くことが分かった (*Structure*, 2021)。

当初の計画には含まれていないが、シャペロンネットワークの全容解明に向けて P5 と他の PDI ファミリーの親和性を検討したところ、PDI および ERp72 が高い親和性を持つことが明らかとなった。さらに、P5 との複合体について酵素学的特性の解析を進めたところ、P5-PDI 複合体は酸化的フォールディング触媒活性が、P5-ERp72 複合体はシャペロン活性が、それぞれ効率的になっていることが示唆された (*Biology*, 2021)。これらの結果から、P5 を中心として、酸化的フォールディングの触媒、ミスフォールディングの抑制、ストレス応答の制御が起きるといふ小胞体タンパク質品質管理機構の全く新しいモデルへの発展が期待できる。

ミスフォールドインスリンを、還元型内腔ドメインと共存させたところ、会合状態がより大きくなることを CN-PAGE により明らかにした。

##### (3) 制御因子が活性型オリゴマーの構造動態に及ぼす影響の定量化

還元型内腔ドメインの濃度と会合状態分布について、CN-PAGE により検討したところ、会合状態分布は濃度に応じて定量的に変化した。内腔ドメインが繰り返し構造を作って多量体を大きくするモデルを立てて、会合状態分布をシミュレーションしたところ、実測値とよく一致しており、内腔ドメインの濃度依存のかつ自発的な会合が決まった結合面で行われていることが示唆された。

酸化型内腔ドメインと還元型内腔ドメインを CN-PAGE で比較したところ、酸化型内腔ドメインは 4-mer 以上の多量体を常に形成しており、4-mer をプロトマーとして、4、8、12、.....、という分布を示した。また、各濃度における内腔ドメイン多量体の

平均分子量は酸化型内腔ドメインが有意に還元型内腔ドメインよりも大きくなった。したがって、分子間ジスルフィド結合は多量体形成を促進し、構造導体を大きく変えることが示唆された。今後、分子間ジスルフィド結合の影響を定量的に解析し、結合親和性も算出する。

ミスフォールドインスリンに関しても定量的評価を進めている。

これらの結果から、IRE1 $\alpha$  内腔ドメインの活性型オリゴマーの構造動態について、内腔ドメインの濃度 (IRE1 $\alpha$  の発現量)、分子間ジスルフィド結合力 (小胞体のレドックス環境)、および、ミスフォールドタンパク質との直接的結合 (小胞体ストレス量) がそれぞれ IRE1 $\alpha$  の自発的多量体形成を促進し、協働的に細胞内のクラスター形成に資することを明らかにした。今後さらに細胞生物学的アプローチでデータを取得し、IRE1 $\alpha$  内腔ドメインが、会合状態分布を通して小胞体内環境の摂動を直接的かつ定量的に感知するという新規のモデル提唱を目指す。本研究の達成は、IRE1 $\alpha$  活性化の初期イベントについて詳細な分子機構解明に繋がり、IRE1 $\alpha$  内腔ドメインの分子間ジスルフィド結合をターゲットとし、UPR 制御に働く、新たな創薬基盤の確立が期待される。

以上の研究成果は、一部を論文化しており (*Structure*, 2021; *Biology*, 2021)、他の部分は、第44回先端酵素学研究所セミナー(招待講演)、農芸化学会 2021 年度年会、2022 年度年会、蛋白質科学会 2022 年度年会等で成果発表した。現在、論文を投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okada Shunsuke, Matsusaki Motonori, Okumura Masaki, Muraoka Takahiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Conjugate of Thiol and Guanidyl Units with Oligoethylene Glycol Linkage for Manipulation of Oxidative Protein Folding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 879 ~ 879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26040879	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 Kanemura Shingo, Matsusaki Motonori, Inaba Kenji, Okumura Masaki	4. 巻 21
2. 論文標題 PDI Family Members as Guides for Client Folding and Assembly	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9351 ~ 9351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21249351	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 Okumura Masaki, Kanemura Shingo, Matsusaki Motonori, Kinoshita Misaki, Saio Tomohide, Ito Dai, Hirayama Chihiro, Kumeta Hiroyuki, Watabe Mai, Amagai Yuta, Lee Young-Ho, Akiyama Shuji, Inaba Kenji	4. 巻 -
2. 論文標題 A unique leucine-valine adhesive motif supports structure and function of protein disulfide isomerase P5 via dimerization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	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) 10.1016/j.str.2021.03.016	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 該当する

1. 著者名 金村 進吾, 松崎 元紀, 前仲 勝実, 稲葉 謙次, 奥村 正樹	4. 巻 74
2. 論文標題 小胞体におけるMHCの品質管理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 419-426
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 Matsusaki Motonori, Okada Rina, Tanikawa Yuya, Kanemura Shingo, Ito Dai, Lin Yuxi, Watabe Mai, Yamaguchi Hiroshi, Saio Tomohide, Lee Young-Ho, Inaba Kenji, Okumura Masaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional Interplay between P5 and PDI/ERp72 to Drive Protein Folding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1112 ~ 1112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10111112	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 Zhu Haojie, Matsusaki Motonori, Sugawara Taiga, Ishimori Koichiro, Saio Tomohide	4. 巻 10
2. 論文標題 Zinc-Dependent Oligomerization of Thermus thermophilus Trigger Factor Chaperone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1106 ~ 1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10111106	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 Tanikawa Yuya, Kanemura Shingo, Ito Dai, Lin Yuxi, Matsusaki Motonori, Kuroki Kimiko, Yamaguchi Hiroshi, Maenaka Katsumi, Lee Young-Ho, Inaba Kenji, Okumura Masaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Ca <sup>2+</sup> Regulates ERp57-CaInexin Complex Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2853 ~ 2853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26102853	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

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Motonori Matsusaki, Shingo Kanemura, Kenji Inaba, Masaki Okumura
2. 発表標題 Novel Insight into PDI Family-regulated IRE1 Activation/Inactivation
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎元紀, 横山武司, 次田篤史, 金村進吾, 田尻道子, 明石知子, 稲葉謙次, 奥村正樹
2. 発表標題 分子間ジスルフィド結合による小胞体ストレスセンサー IRE1の会合状態制御
3. 学会等名 第6回東北大学若手研究者アンサンブルワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎元紀, 金村進吾, 田尻道子, 明石知子, 稲葉謙次, 奥村正樹
2. 発表標題 ミスフォールドタンパク質およびジスルフィド結合依存的なIRE1の会合状態制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎元紀, 横山武司, 次田篤史, 金村進吾, 田尻道子, 明石知子, 齋尾智英, 稲葉謙次, 奥村正樹
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーの会合状態分布を介した応答制御機構の研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松崎元紀
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーによる多面的ストレス感知の分子機構
3. 学会等名 第44回 先端酵素学研究所セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
韓国	Korea Basic Science Institute		