

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510283

研究課題名(和文)小胞体ストレスセンサータンパク質の時空間的イメージングによるストレス応答の解析

研究課題名(英文)Imaging the activation behavior of ER stress sensors

研究代表者

田代 悦(TASHIRO, ETSU)

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：00365446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：作用点の異なる様々な小分子化合物によるUPR関連遺伝子群の発現パターンを比較解析した結果、ストレスセンサーの活性とUPR関連遺伝子の発現が化合物の作用点の違いによって少なくとも3パターン存在することが示唆された。

また、小胞体ストレスセンサーの一つとして知られるIRE1の活性化をイメージングするために、IRE1の活性化に必要な十分なステップである二量体化を、分断された蛍光蛋白質の再構成によりタンパク質間相互作用を検出する手法Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)法を用いて検出する系を構築した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we compared the expression patterns of nine UPR target genes induced by seven UPR-inducing compounds with different modes of action. As a result, it was suggested that the existence of at least three types of ER stress sensors' activation profiles and UPR target gene expression profiles, which depend on the mode of actions of the compounds.

Moreover, we developed a new detection system for the activation of IRE1a by evaluating dimerization of it by bimolecular fluorescent complementation (BiFC) assay. By detecting the fluorescence derived from the reconstituted cerulean, this assay system enabled us to distinguish the activation behaviors of IRE1a as to ER stress-inducing compounds.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：小胞体ストレス イメージング センサータンパク質 UPR 比較解析

1. 研究開始当初の背景

小胞体は膜タンパク質及び分泌タンパク質の折りたたみが行われる細胞内小器官であるが、異常に折りたたまれてしまったタンパク質を、折りたたみ直しや細胞質への排出などにより減少させる機構をも備えている。このタンパク質の恒常性を維持するための調節機構は **unfolded protein response (UPR)** と呼ばれ、小胞体膜上に局在する3つのセンサータンパク質(ATF6, IRE1, PERK)の活性化を発端とし、下流のUPR関連遺伝子が発現誘導されることで実行される。これまでに糖鎖修飾阻害剤 **tunicamycin** や小胞体 Ca^{2+} ATPaseの阻害剤 **thapsigargin** など作用点の異なる小分子化合物がUPRを誘導することは報告されているが、これら化合物が誘導するUPR関連遺伝子の発現挙動の違いについて解析した例はなかった。そこで申請者らは、異なる作用点を持つUPR誘導剤7種が誘導する9種のUPR関連遺伝子の発現を経時的に測定した結果、それぞれの化合物による9種のUPR関連遺伝子の発現はそれぞれ特徴的なパターンを示し、階層的クラスタリングにより解析すると5化合物が2つに分類されることを見出してきた。UPR関連遺伝子の発現は小胞体膜上に局在する3つのセンサータンパク質の活性化に起因することから、申請者らは「UPR誘導剤によりセンサータンパク質の活性化パターンが異なるのでは？」という作業仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、3つのセンサータンパク質の活性化を3色の蛍光タンパク質 (**venus, cerulean, mCherry**) を用いて検出する系をそれぞれ構築し、UPR誘導剤による3つのセンサータンパク質の活性パターンを時空間的に解析することである。

3. 研究の方法

各種UPR誘導剤によるUPR関連遺伝子のmRNA量は、**Real-Time RT-PCR**法を用いて定量化した。また3つのストレスセンサーの活性については、**ATF6**は活性化するとプロテアーゼにより切断されるため切断される前の不活性型**ATF6**を**Western blotting**にて、**IRE1α**は活性化すると**XBP1 mRNA**を切断するため切断された**XBP1 mRNA**量を**RT-PCR**にて、**PERK**は活性化すると**eIF2α**をリン酸化するためリン酸化**eIF2α**を**Western blotting**にて検出した。

次に**BiFC**法による**IRE1α**活性化を検出するための各種プラスミドは、定法に従って作成した。また再構成された**cerulean**の青色蛍光は共焦点顕微鏡にて検出した。さらに検出した青色蛍光は**Image J**にて定量化した。

4. 研究成果

[1] 種々のUPR誘導剤によるUPR関連遺伝子発現パターンの比較解析

小胞体の恒常性維持機構 **UPR (Unfolded Protein Response)** は、小胞体膜上に局在する3つのセンサータンパク質 (**ATF6, IRE1, PERK**) が小胞体内に蓄積した不良タンパク質を認識することで活性化し、様々なUPR関連遺伝子群の発現によって制御されている。これまでに、糖鎖修飾阻害剤 **tunicamycin** や小胞体 Ca^{2+} ATPase阻害剤 **thapsigargin** など作用点の異なる様々な小分子化合物がUPRを誘導することが報告されているが、これら作用点異なる化合物によるUPR関連遺伝子の発現挙動の違いについて解析した例はなかった。

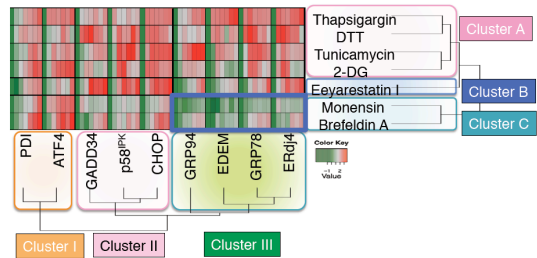


図 1

そこで、作用点異なるUPR誘導剤7種 (**2-deoxyglucose, brefeldin A, DTT, eeyarestatin I, monensin, thapsigargin, tunicamycin**) によるUPR関連遺伝子9種 (**ATF4, CHOP, EDEM, ERdj4, GADD34, GRP78, GRP94, PDI, p58^{IPK}**) のmRNA量を**Real-Time RT-PCR**により化合物添加24時間後まで経時的発現挙動を測定した。その結果、それぞれの化合物による9種のUPR関連遺伝子の発現プロファイルはそれぞれ特徴的なパターンを示し、またその発現プロファイルの類似度をピアソン相関係数を用いて計算すると、それぞれの化合物の濃度を変えた時の発現プロファイル同士が最も類似していることがわかった。このことから、UPR関連遺伝子発現プロファイルの違いは化合物の濃度よりも化合物の作用点の違いに依存していることが示唆された。さらに、化合物毎の遺伝子発現プロファイルを階層的クラスタリングにより比較解析した結果、7種のUPR誘導剤によるUPR関連遺伝子の発現プロファイルは大きく3つに分類された (グループ A ; **2-deoxyglucose, DTT, thapsigargin, tunicamycin** ; グループ B ; **eeyarestatin I** ; グループ C ; **brefeldin A, monensin**) (図 1)。UPR関連遺伝子の発現は3つのストレスセンサーの活性で制御されているため、次にグループ A, B, C それぞれに属する化合物群による3つのストレスセンサーの活性を検討したところ、グループ A に属する化合物は3つのストレスセンサーいずれも活性化させていたのに対し、グループ B に属する化合物は**PERK**と**ATF6**を、さらにグループ C に属する化合物は**PERK**のみを活性化させていた。以上の結果

より、ストレスセンサーの活性と UPR 関連遺伝子の発現が化合物の作用点の違いによって少なくとも 3 パターン存在することが示唆された。

[2] BiFC 法による IRE1 α 活性化検出法の構築

UPR(Unfolded Protein Response)は小胞体内に不良タンパク質が蓄積した時に活性化される小胞体内の恒常性維持機構である。UPRは小胞体膜上に局在する3つの小胞体ストレスセンサー(ATF6, IRE1 α , PERK)が不良タンパク質の蓄積を感知することでの活性化し、これが引き金となり実行される。近年、これら小胞体ストレスセンサーの活性化の強度や速度が、さまざまな生理的・薬理的条件において異なることが示唆されている¹⁻³⁾。したがって、これらの差異を解析することはUPR制御機構のさらなる理解に繋がると期待される。そこで本研究では、IRE1 α の活性化に必要な十分なステップである二量体化を、分断された蛍光蛋白質の再構成によりタンパク質間相互作用を検出する手法 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)法を用いて検出する系の構築を目的とした。

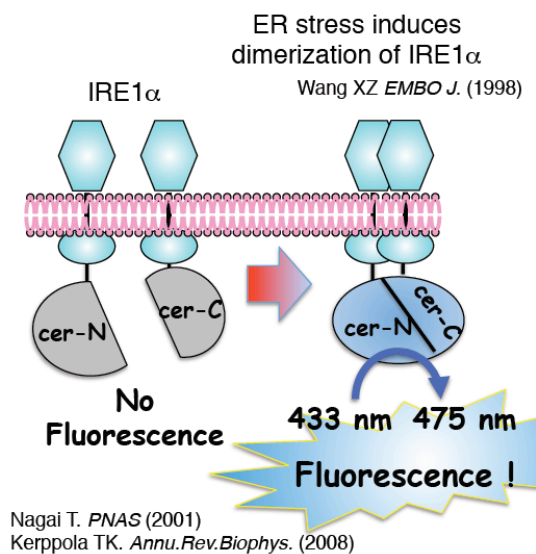


図 2

IRE1 α の二量体化は N 末端の小胞体内腔ドメインで起こるため、IRE1 α の C 末端欠損体に青色蛍光タンパク質 cerulean の N 末端もしくは C 末端断片を結合させた融合タンパク質を設計し(図 2)、その両方を安定発現する細胞を作製した。通常培養条件下では cerulean 由来の青色蛍光はほとんど観察されなかったが、小胞体ストレス誘導剤 DTT を処理したところ青色蛍光が観察された。通常培養条件下では小胞体に局在している IRE1 α は二量体化するとドット状の局在に変化すると報告⁴⁾と同様に、DTT 添加によって誘導された青色蛍光の局在もドット状

であった。さらに他の小胞体ストレス誘導剤(糖鎖修飾阻害剤 tunicamycin, Ca²⁺ATPase 阻害剤 thapsigargin)の添加によっても、青色蛍光を示す細胞の割合が顕著に増加し、さらにその蛍光はドット状の局在であった(図 3)。これらの結果から、青色蛍光は融合タンパク質の二量体化を反映していることが示唆された。また、これらの化合物が誘導する青色蛍光を経時的に観察したところ、DTT や thapsigargin は添加 1 時間後から、tunicamycin は添加 4 時間後から顕著に観察された。これらの時系列変化は内在性 IRE1 α 活性化の指標である XBP1 mRNA のスプライシングの時系列変化と概ね一致した。以上より、本検出系は内在性 IRE1 α の活性を反映しており、また様々な化合物が誘導する IRE1 α 活性化速度の差異解析にも有用であることが示唆された。

【引用文献】

- 1) J. B. DuRose *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, **2006**, *17*, 3095.
- 2) D. T. Rutkowski *et al.*, *J. Cell Biol.*, **2010**, *189*, 783.
- 3) S. Shinjo *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2013**, *77*, 729.
- 4) H. Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 16113.

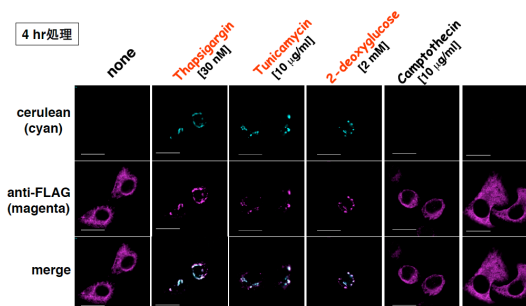


図 3

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 18 件)

1. Magi S, Takemoto Y, Kobayashi H, Kasamatsu M, Akita T, Tanaka A, Takano K, Tashiro E, Igarashi Y, Imoto M. 5-Lipoxygenase and CysLT1 regulate EGF-induced cell migration through Tiam1 upregulation and Rac1 activation. *Cancer Science* 105, 290-296 (2014) 査読あり
2. Shinjo S, Tashiro E, Imoto M. Establishment of a new detection system for the dimerization of IRE1 α with BiFC method. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1333-1336 (2013) 査読あり
3. Shinjo S, Mizotani Y, Tashiro E, Imoto M. A Comparative Analysis of the Expression Patterns of UPR-Target Genes caused by

- UPR-inducing Compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 729-735 (2013) 査読あり
4. Zimmermann TJ, Burger M, Tashiro E, Kondoh Y, Martinez NE, Gormer K, Rosin-Steiner S, Shimizu T, Ozaki S, Mikoshiba K, Watanabe N, Hall D, Vetter IR, Osada H, Hedberg C, Waldmann H. Boronic Acid Inhibitors of Acyl Protein Thioesterase 1 and 2. *ChemBioChem* 14, 115-22 (2013) 査読あり
 5. Magi S, Shitara T, Takemoto Y, Sawada M, Kitagawa M, Tashiro E, Takahashi Y, Imoto M. Novel derivatives of aclacinomycin A block cancer cell migration through inhibition of farnesyl transferase. *J. Antibiot.* 66, 165-170 (2013) 査読あり
 6. Magi S, Tashiro E and Imoto M. A chemical genomic study identifying diversity in cell migration signaling in cancer cells. *Scientific Reports* 2, 823 (2012) 査読あり
 7. Ri M, Tashiro E, Oikawa D, Shinjo S, Tokuda M, Yokouchi Y, Narita T, Masaki A, Ito A, Ding J, Kusumoto S, Ishida T, Komatsu H, Shiotsu Y, Ueda R, Iwawaki T, Imoto M, Iida S. Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *Blood Cancer J.* e79 (2012) 査読あり
 8. Sasazawa Y, Kanagaki S, Tashiro E, Nogawa T, Muroi M, Kondoh Y, Osada H, Imoto M. Xanthohumol Impairs Autophagosome Maturation through Direct Inhibition of Valosin-Containing Protein. *ACS Chemical Biology* 7, 892-900 (2012) 査読あり
 9. Yamamoto K, Makino M, Watanapokasin R, Tashiro E and Imoto M. Inostamycin enhanced TRAIL-induced apoptosis through DR5 up-regulation on the cell surface. *J. Antibiot.* 65, 295-300 (2012) 査読あり
 10. Tashiro E and Imoto M. Target identification of bioactive compounds. *Bioorg. & Med. Chem.* 20, 1910-1921 (2012) 査読あり
 11. Yamamoto K, Tashiro E, Motohashi K, Seto H and Imoto M. Napyradiomycin A1, an inhibitor of mitochondrial complexes I and II. *J. Antibiot.* 65, 211-214 (2012) 査読あり
 12. Kiga M, Tanzawa F, Iwasaki S, Inaba F, Fujiwara K, Iwadare H, Echigo T, Nakamura Y, Shibata T, Suzuki K, Yasumatsu, I Nakayama A, Sasazawa Y, Tashiro E, Imoto M, S. Kurakata S. Antitumor effects of novel highly hydrophilic and non-ATP-competitive MEK1/2 inhibitor, SMK-17. *Anticancer Drugs.* 23, 119-130 (2012) 査読あり
 13. Kobayashi I H, Ogura, Y, Sawada M, Nakayama T, Takano K, Minato Y, Takemoto Y, Tashiro E, Watanabe H & Imoto M. Involvement of 14-3-3 proteins in the second EGF-induced wave of Rac1 activation in the process of cell migration. *J. Biol. Chem.* 286, 39259-39268 (2011) 査読あり
 14. Yamada Y, Tashiro E, Taketani S, Imoto M and Kataoka T. Mycotrienin II, a translation inhibitor that prevents ICAM-1 expression induced by pro-inflammatory cytokines. *J. Antibiot.* 64, 361-366 (2011) 査読あり
 15. Kawamura T, Matsubara K, Otaka H, Tashiro E, Shindo, K, Yanagita R. C., Irie K and Imoto M. Generation of “Unnatural Natural Product” library and identification of a small molecule inhibitor of XIAP. *Bioorg. & Med. Chem.* 19, 4377-4385 (2011) 査読あり
 16. Sawada M, Kubo, S Matsumura, K Takemoto Y, Kobayashi H, Tashiro E, Kitahara T, Watanabe H and Imoto M. Synthesis and anti-migrative evaluation of moverastin derivatives. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 21, 1385-1389 (2011) 査読あり
 17. Yamamoto K, Tashiro E and Imoto M. Quinotrierixin Inhibits ER Stress-induced XBP1 mRNA Splicing through Inhibition of Protein Synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 284-288 (2011) 査読あり
 18. Kitagawa M, Misawa M, Ogawa S, Tashiro E and Imoto M. A New Convenient Cell-based Screening Method for Small Molecule Glycolytic Inhibitors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 367-369 (2011) 査読あり
- [学会発表] (計 17 件)
1. Etsu Tashiro, Satoko Shinjo, Yuji Mizotani, and Masaya Imoto
Comparative Analysis of the Expression Patterns of UPR-Target Genes Caused by UPR-Inducing Compounds
RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology 3rd Annual Symposium
2014 年 5 月 22 日 Schloss Ringberg ドイツ
 2. 田代悦、新莊聡子、溝谷優治、井本正哉
種々の化合物による UPR 関連遺伝子群発現挙動の解析
日本農芸化学会
2014 年 3 月 28 日 明治大学生田キャンパス
 3. Etsu Tashiro, Satoko Shinjo, Masaya Imoto
Establishment of a New Detection System for the Dimerization of IRE1a Using a BiFC Assay
The 7th Japan-Korea Chemical Biology Symposium
2014 年 2 月 10 日 韓国チェジュ島
 4. 田代悦、新莊聡子、井本正哉
BiFC 法による IRE1a 二量体検出法の構築
日本農芸化学会関東支部 2013 年度支部大

- 会
2013年11月22日 慶應義塾大学
5. 田代悦、井本正哉
UPR誘導剤によるUPR関連遺伝子発現パターンと比較解析
Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds
日本癌学会
2013年10月5日 パシフィコ横浜
 6. 新莊聡子、田代悦、井本正哉
BiFC法によるIRE1a二量体化検出法の構築
Establishment of a new detection system for the dimerization of IRE1a by BiFC assay
日本ケミカルバイオロジー学会
2013年6月20日 東京医科歯科大学
 7. 田代悦、井本正哉
BiFC法を利用した新規IRE1a活性化阻害剤探索系の構築
Establishment of a new screening system for the inhibitor of IRE1a activation using a BiFC assay
日本がん分子標的治療学会
2013年6月13日 京都国際会議場
 8. Satoko Shinjo, Etsu Tashiro, Masaya Imoto
Establishment of a New Detection System for the Dimerization of IRE1a Using a BiFC Assay
RIKEN-Max Planck-Join Research Center for Systems Chemical Biology The 2nd Symposium
2013年4月16日 理研(和光)
 9. 新莊聡子、田代悦、井本正哉
BiFC法によるIRE1二量体化検出法の構築
日本分子生物学会
2012年12月11日(火) 福岡国際会議場
 10. 田代悦、新莊聡子、溝谷優治、井本正哉
種々の小分子化合物によるUPR関連遺伝子群発現挙動の解析
第7回小胞体ストレス研究会
2012年11月9日 広島
 11. 田代悦、李政樹、岩脇隆夫、飯田真介、井本正哉
XBPI活性化阻害剤の探索と多発性骨髄腫治療薬への応用
新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御」第2回若手研究者ワークショップ
2012年10月30日 大阪大学中之島センター
 12. Etsu Tashiro, Satoko Shinjo, Yuji Mizotani, and Masaya Imoto
A Comparative Analysis of the Expression Patterns of UPR-Target Genes caused by UPR-inducing Compounds
EMBO Conference - The Physiology of the ER
2012年10月16日 Girona (Spain)
 13. 新莊聡子、溝谷優治、田代悦、井本正哉

- 小分子化合物が誘導するUPR関連遺伝子発現挙動の解析
日本ケミカルバイオロジー学会
2012年6月8日 京都大学
14. 田代悦、山本浩太、井本正哉
イノスタマイシンによる細胞膜表面DR5の発現上昇を介したTRAIL誘導性アポトーシス増強
日本ケミカルバイオロジー学会
2012年6月8日 京都大学
 15. Kohta Yamamoto, Etsu Tashiro, and Masaya Imoto
Quinotriexin Inhibited Endoplasmic Reticulum Stress-Induced X-box Binding Protein 1 mRNA Splicing through Inhibition of Protein Synthesis
5th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine 2011年8月22日 カナダ・ケベック
 16. Satoko Shinjo, Etsu Tashiro, and Masaya Imoto
Analysis of Machinery for Endoplasmic Reticulum Stress Response Induced by Small Molecular Compounds
5th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine 2011年8月22日 カナダ・ケベック
 17. 田代悦、張嘉峯、井本正哉
イノスタマイシンによるFGF受容体-1ゴルジ体蓄積機構の解析
Studies on the mechanism of FGF receptor-1 accumulation in golgi apparatus by inostamycin
日本ケミカルバイオロジー学会 2011年5月24日 東京

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 悦 (TASHIRO ETSU)

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：00365446

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

井本 正哉 (IMOTO MASAYA)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：60213253