

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 25 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790840

研究課題名(和文)細胞内タンパク質分解機構の破綻と腎障害：分子機序の解明と治療戦略の確立

研究課題名(英文)Role of UPR-related protein degradation pathway in kidney

研究代表者

加藤 裕紀(Kato, Hironori)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：40610283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレス応答(UPR)とオートファジーはタンパク質恒常性を調整し、腎疾患の発症・進展に関与するとされる。本研究はUPRのIRE1経路(タンパク質分解系の調整)の活性化におけるオートファジーの調整因子(Atg)の役割を明らかにするものである。研究期間内に得られた成果は：1) AtgはIRE1のC末端に相互作用した、2) ストレス条件下でこれらの結合が大きく変動した、3) 腎培養細胞でも同様に結合が変動した、4) AtgのIRE1への結合はIRE1経路の活性化に関与した。以上の結果から、Atgの結合によるIRE1経路の制御機序が、腎病態の進展に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The unfolded protein response (UPR) and autophagy (Atg) serves protein homeostasis and implicates in renal diseases. Previous our studies demonstrated that the IRE1 signaling, which is known as UPR-mediated protein degradation pathway, related to renal tubular injury. Here, we investigated the role of Atg-related component in the IRE1 signaling. Our results demonstrated that; (1) Atg-related component could be interacted with cytosolic C-terminal region of IRE1; 2) level of this interaction changed during ER stress condition; 3) similar results were also observed in renal culture cells; 4) binding of Atg-related component activated the IRE1 signaling. Taken together, our results suggest a possibility that the Atg-related component regulated the renal function through modulation of UPR.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：小胞体ストレス タンパク質恒常性 腎臓病学

1. 研究開始当初の背景

近年、小胞体内腔に不良タンパク質が蓄積することで惹起される小胞体ストレスとそれが引き金となり生ずる unfolded protein response (UPR) が虚血性腎障害、ネフローゼ、糸球体腎炎、嚢胞腎、等の発症に関与するとされ、その病理学的意義・重要性が注目されている。ところが UPR は主要 3 経路 (PERK、ATF6、IRE1 経路) により構成されており、特定の分子経路が個々の腎疾患において腎機能の維持もしくは破綻のどちらに寄与しているのかは未だはっきりしていない。

一方で細胞内タンパク質分解系であるオートファジーが各種臓器において様々な生理機能や病態形成に関与するとの報告がなされ、腎臓においてもその役割が明らかにされ始めている。ところが腎臓における UPR とオートファジー間のクロストークに関する解析はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに UPR の主要 3 経路のうちタンパク質分解系を調整する IRE1 経路を選択的に活性化する分子機序を見出し、この経路の選択的な活性化が小胞体ストレスおよび重金属による腎尿細管障害に係ること明らかにした。さらに、IRE1 の活性化にオートファジーの調整因子 Atg12-Atg5 が関与することを見出した。この知見を踏まえ、本研究は Atg12-Atg5 による IRE1 の制御機序を解明し、腎細胞における役割を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) Atg12-Atg5 による IRE1 の制御機序の解析: FLAG-tag を付加させた IRE1 を MEF 細胞に発現させ、IRE1 と Atg12-Atg5 の結合の有無を免疫沈降法によって解析した。また FLAG-tag を付加させた Atg12 または Atg5 も MEF 細胞へ発現させ同様の解析を行った。

(2) 結合領域の特定: N 末端 (小胞体内腔側) または C 末端 (細胞質側) を欠損させた IRE1 を MEF 細胞に発現させ、免疫沈降法により解析した。

(3) ストレス条件下における IRE1 と Atg12-Atg5 の結合の変化: 培養細胞を小胞体ストレス誘導剤で刺激し、抽出したタンパク質を抗 Atg12 または Atg5 抗体を用いて免疫沈降し解析した。

(4) 腎培養細胞における IRE1 と Atg12-Atg5 の結合: 腎近位尿細管上皮細胞 NRK 細胞へ FLAG-tag を付加させた IRE1、Atg12 または Atg5 を発現させた後に小胞体ストレスを惹起させ、免疫沈降法を用いて IRE1 と Atg12-Atg5 間の結合を解析した。

(5) IRE1 における Atg12-Atg5 の結合の役割: Atg5 欠損細胞を用いて IRE1 のリン酸化、クラスター化、IRE1 経路の活性化をウェスタンブロットティング法、シヨ糖密度勾配超遠心分離法、RT-PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降法を行った結果、IRE1 は Atg12-Atg5 と相互作用することが明らかになった。

(2) IRE1 は小胞体膜貫通型タンパク質であり、N 末端を小胞体内腔側に、C 末端を細胞質側に局在させている。そこで N 末端または C 末端を欠損させた IRE1 を用いて、Atg12-Atg5 が結合する領域を免疫沈降法で解析した結果、Atg12-Atg5 が結合するのに IRE1 の C 末端が必須であることが明らかになった。

(3) 小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンまたはタブシガルギンの刺激下で経時的に

細胞内因性の IRE1 と Atg12-Atg5 の結合を解析した結果、これらの結合は一過的に誘導されていることが明らかになった。

(4) NRK 細胞においても IRE1 と Atg12-Atg5 が相互作用することが確認され、その結合は小胞体ストレスまたは重金属の惹起により一過的に誘導されることが観察された。

(5) Atg5 欠損細胞を用いて Atg12-Atg5 の結合が IRE1 の活性化に関与しているかどうか解析を行った結果、Atg12-Atg5 の非存在下でも IRE1 の自己リン酸化およびクラスター化は正常に誘導されていた。しかしながら、IRE1 の RNase 活性を XBP1mRNA のスプライシングを指標に RT-PCR により解析した結果、Atg5 欠損細胞では IRE1 の RNase 活性が抑制されていた。

以上の結果から、オートファジー調整因子として知られる Atg12-Atg5 が IRE1 に相互作用し、IRE1 経路の活性化に寄与していることが明らかになった。この成果とこれまでの報告を踏まえて、小胞体ストレスあるいは重金属による腎尿細管障害の発症に Atg12-Atg5 による IRE1 経路の調整が関与していることが推察された。

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 8 件)

Zhang H, Nakajima S, Kato H, Gu L, Yoshitomi T, Nagai K, Shinmori H, Kokubo S, Kitamura M: Selective, potent blockade of the IRE1 and ATF6 pathways by 4-phenylbutyric acid analogues. *Br J Pharmacol*, 170: 822-34, 2013. 査読あり

Kato H, Katoh R, and Kitamura M: Dual regulation of cadmium-induced apoptosis by mTORC1 through selective induction of IRE1 branches in unfolded protein response. *PLoS One*, 8: e64344, 2013. 査読あり

Nakajima S, Kato H, Gu L, Takahashi S, Johno H, Umezawa K, and Kitamura M: Pleiotropic potential of DHMEQ for NF- κ B suppression via reactive oxygen species and unfolded protein response. *J Immunol* 190: 6559-6569, 2013. 査読あり

Gu L, Johno H, Nakajima S, Kato H, Takahashi H, Katoh K, and Kitamura M: Blockade of Smad signaling by 3'-deoxyadenosine: a mechanism for its anti-fibrotic potential; *Lab Invest*; 93; 450-461; 2013. 査読あり

Johno H, Nakajima S, Kato H, Yao J, Paton AW, Paton JC, Katoh R, Shimizu F, and Kitamura M: Unfolded protein response causes a phenotypic shift of inflamed glomerular cells towards redifferentiation through dual blockade of Akt and Smad signaling pathways *Am J Pathol*, 181:1977-1990, 2012. 査読あり

Takahashi S, Tamai T, Nakajima S, Kato H, Johno H, Nakamura T, Kitamura M: Blockade of adipocyte differentiation by cordycepin. *British J Pharmacol* 167: 561-575, 2012. 査読あり

Kadomatsu M, Nakajima S, Kato H, Gu L, Chi Y, Yao J and Kitamura M: Cordycepin as a sensitizer to TNF- α -induced apoptosis through eIF2 γ and mTORC1-mediated inhibition of NF- κ B. *Clin Exp*

Immunol 168: 325-332, 2012. 査読あり
Kato H, Nakajima S, Saito Y, Takahashi S, Katoh R, and Kitamura M: mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective activation of the IRE1-JNK pathway. *Cell Death Differ*, 19: 310-320, 2012. 査読あり

[学会発表](計3件)

Kato H, Nishitoh H and Kitamura M: Tuning of IRE1 α -Mediated Protein Degradation by the Atg5-Atg12 Conjugate. 第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月11-13日

Kato H, Nishitoh H and Kitamura M: Tuning of IRE1 α -Mediated Protein Degradation by the Atg5-Atg12 Conjugate. FASEB, From Unfolded Protein Response in the ER to Disease Conference Dates. Vermont, June 16-21, 2013

Kato H, Nakajima S and Kitamura M: Dual regulation of cadmium-induced apoptosis by mTORC1 through induction of selective unfolded protein response. 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology. San Diego, November 3, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 裕紀 (KATO HIRONORI)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：40610283

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし