

平成22年4月30日現在

研究種目： 特定領域研究

研究期間： 2007~2011

課題番号： 19058009

研究課題名 (和文) 異常タンパク質応答UPRによる小胞体の秩序制御

研究課題名 (英文) Regulation of the homeostasis of the endoplasmic reticulum by the unfolded protein response

研究代表者

森 和俊 (MORI KAZUTOSHI)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70182194

研究分野： 分子生物学

科研費の分科・細目：5801

キーワード：小胞体、転写誘導、分子シャペロン、タンパク質分解、翻訳抑制、メダカ

1. 研究計画の概要

細胞内のタンパク質は時間的にも空間的にも秩序を持った「タンパク質の社会」の一員として存在する。タンパク質社会がどうやって機能を実現し、その秩序を維持するのかを解明することが本特定領域研究の目的であるが、秩序維持機構として最もよく研究されているのが、小胞体におけるタンパク質の品質管理機構であり、その中心をなすのが小胞体ストレス応答と小胞体関連分解である。これまで、特に小胞体関連分解について、哺乳動物細胞でのノックダウン実験を行ってきたが、期待されるほど明瞭な結果が得られなかった。やはりノックアウト解析をする必要があるが、マウスで網羅的な解析を行うことは実際上困難である。そこで、同じ脊椎動物であるメダカでは、比較的安価にノックアウト個体を同定することが可能であり、容易に大量飼育することができることに着目し、メダカ培養細胞の解析を行った。その結果、哺乳動物培養細胞での結果と非常によく合致した細胞応答を示すことが明らかになった。そこで、全面的にメダカを用いた解析に変更することとし、小胞体ストレス応答発動因子のノックアウト個体の同定に着手し、既に6種のノックアウト個体を得た。今後解析するノックアウト個体の数を増やし、小胞体ストレス応答と小胞体関連分解に関与する遺伝子のノックアウト個体を包括的に解析することによって、タンパク質社会における秩序維持システムの成立と成熟について新たなパラダイムを提案したい。

2. 研究の進捗状況

- 1) メダカ培養細胞を用いて、メダカでも哺乳動物細胞の場合と同様に、IRE1経路、PERK経路、ATF6経路の活性化が起こることを明らかにした。
- 2) 主要な小胞体ストレス応答発動因子 (IRE1 α 、IRE1 β 、PERK、ATF6 α 、ATF6 β) について遺伝子が破壊されたメダカを同定した。戻し交配中である。
- 3) 予備的な段階であるが、ATF6 α とATF6 β のダブルノックアウトが、哺乳動物の場合と同様に、胎生致死になることを見いだした。8回以上戻し交配したメダカを用いて確認する必要がある。
- 4) 組織特異的ATF6様小胞体ストレス応答発動因子 (Luman, CREB-H, OASIS, BBF2H7, TSP40) のうち、Lumanについて遺伝子が破壊されたメダカを同定した。戻し交配中である。
- 5) 小胞体シャペロン BiP のプロモーターによって発現が制御されている GFP 遺伝子をメダカの卵に打ってトランスジェニックメダカを作出し、GFPの発現が小胞体ストレスによってメダカ体内で亢進することを示した。有用なレポーターとなる。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。
解析システムをメダカに変更してからは、極めて順調に研究が進展している。

4. 今後の研究の推進方策

- 1) 主要な小胞体ストレス応答発動因子 (IRE1 α 、IRE1 β 、PERK、ATF6 α 、ATF6 β) について8回以上戻し交配をしたメ

ダカノックアウト個体を作成し、その表現型を調べると共に、胚性線維芽細胞を調製し、マイクロアレイ解析により各々の標的遺伝子を明らかにする。

- 2) ATF6 α と ATF6 β のダブルノックアウトが、哺乳動物の場合と同様に、本当に胎生致死になるなら、オルガネラダイナミクスを絡めてその原因を明らかにする。
- 3) 3 つの特に重要な小胞体ストレス応答発動因子 (IRE1 α 、PERK、ATF6 α) について二重変異体を作成してどのような表現型を示すか明らかにし、個々の分子の役割を明確にする。
- 4) 組織特異的 ATF6 様小胞体ストレス応答発動因子について 8 回以上戻し交配をしたメダカノックアウト個体を作成し、その表現型を調べると共に、ATF6 α ノックアウト個体と交配してダブルノックアウト個体を作成し、表現型を解析することにより、脊椎動物において組織特異的 ATF6 様小胞体ストレス応答発動因子が必要とされた理由を明らかにする。
- 5) 小胞体関連分解に関与する因子 (Derlin-1、Derlin-2、Derlin-3、EDEM1、EDEM2、EDEM3、OS9、XTP3B) について 8 回以上戻し交配をしたメダカノックアウト個体を作成し、その表現型を調べると共に、多重変異体の作出と表現型解析を行う。さらにこれらのノックアウト個体から胚性線維芽細胞を調製し、様々な小胞体関連分解の基質を導入して分解過程を解析し、個々の分子の役割を明らかにすると共に、小胞体関連分解の全体像を解明する。

5. 代表的な研究成果

(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 5 件)

- (1) Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during mammalian unfolded protein response. A. Uemura, M. Oku, K. Mori, and H. Yoshida, *J. Cell Sci.*, 122, 2877-2886, 2009. 査読有
- (2) Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow. L. Zeng, A. Zampetaki, A. Margariti, A. E. Pepe, S. Alam, D. Martin, Q. Xiao, W. Wang, Z. Jin, G. Cockerill, K. Mori, Y. J. Li, Y. Hu, S. Chien and Q. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 106, 8326-8331, 2009. 査読有

- (3) p31 deficiency influences endoplasmic reticulum tubular morphology and cell survival. T. Uemura, T. Sato, T. Aoki, A. Yamamoto, T. Okada, R. Hirai, R. Harada, K. Mori, M. Tagaya, and A. Harada, *Mol. Cell Biol.*, 29, 1869-1881, 2009. 査読有
- (4) pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. H. Yoshida, A. Uemura and K. Mori, *Cell Struct. Func.*, 34, 1-10, 2009. 査読有
- (5) Human HRD1 promoter carries a functional unfolded protein response element to which XBP1 but not ATF6 directly binds. K. Yamamoto, N. Suzuki, T. Wada, T. Okada, H. Yoshida, R. J. Kaufman and K. Mori, *J. Biochem.*, 144, 477-486, 2008. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 石川時郎, 岡田徹也, 谷口善仁, 武田俊一, 森和俊, メダカ小胞体ストレス応答の解析、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸国際会議場
- (2) 蛭川暁, 岡田徹也, 小田裕香子, 大川克也, 森和俊, 小胞体関連分解タンパク質 Derlins 結合タンパク質の同定と解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸国際会議場