

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770205

研究課題名 (和文) 膜結合性転写因子 ATF6 の小胞体ストレス応答性出芽機構

研究課題名 (英文) The activation mechanism of a membrane-bound transcription factor ATF6 in response to Endoplasmic Reticulum Stress

研究代表者

岡田 徹也 (OKADA TETSUYA)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：70378529

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、小胞体膜結合性転写因子ATF6の活性化機構に関与する因子として我々が同定した新規ATF6結合タンパク質p45に関する解析を行い、以下の成果を得た。

(1)p45と相同性の高いp50を新たに同定し、p45と同様に、p50も構造異常タンパク質の蓄積に応答してATF6と結合することを見い出した。さらにATF6との結合に必要なp45とp50のアミノ酸領域を同定した。(2)相同組み換え効率の高いニワトリ DT40細胞を用いて、p50が欠損した細胞を樹立した。(3)質量分析法を活用してATF6複合体の構成成分を明らかにするための実験系を確立した。

研究成果の概要 (英文)：

A membrane-bound transcription factor ATF6 is activated by accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER). We previously found that p45, a membrane protein localized in the ER, binds to ATF6 in response to the accumulation of unfolded proteins. In this study, we obtained following results.

(1) We found that the p45-homologous protein, p50, also binds to ATF6 in the ER stress dependent manner, and that p45 and p50 bind to ATF6 through their N-terminal regions. (2) We established p50-deficient cells using the chicken DT40 cell line. (3) We established a system to identify components of ATF6 complex by mass spectrometry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1800,000	540,000	2340,000
2010年度	1700,000	510,000	2210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3500,000	1050,000	4550,000

研究分野：細胞生物学、分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス ATF6 DT40

1. 研究開始当初の背景

小胞体膜結合性転写因子 ATF6 は、小胞体ストレスと総称される「小胞体への構造異常タンパク質の蓄積」を感知すると、小胞体から出芽してゴルジ体に移行し、ゴルジ体で2段階のプロセッシングを受けて活性化する。異常タンパク質の蓄積に応答した ATF6 の出芽機構については、小胞体シャペロン BiP との結合・解離モデルと ATF6 内腔ドメインの酸化還元モデルが提唱されていたが、同定されていた ATF6 結合タンパク質が BiP のみと少なかったこともあり、その詳しい機構は分かっていなかった。我々は、ATF6 の標的遺伝子産物を対象に ATF6 結合タンパク質を探索した結果、小胞体タンパク質 p45 を新規 ATF6 結合タンパク質として同定することに成功した。p45 は C 末端側に膜貫通領域を持ち、N 末端領域の大部分が小胞体内腔に配向した膜タンパク質である。小胞体に局在する以外は、その細胞内機能は不明であった。興味深いことに、p45 は小胞体ストレス依存的に ATF6 と相互作用する。これらの結果は、p45 が ATF6 の出芽制御因子として機能する可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、小胞体ストレスに応答した ATF6 の出芽機構を明らかにすることを目的として、p45 の詳細な機能解析を行うとともに、さらなる新規 ATF6 結合タンパク質の同定にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) p45 と相同性の高いタンパク質の検索と p45 のドメイン解析

p45 と有意な相同性を持つタンパク質をヒト遺伝子データベース上で検索し、p50 を見出した。p45 および p50 がどのように ATF6 と相互作用するか明らかにするために、p45 と p50 の様々の変異体を作製し、ATF6 との結合に必要なアミノ酸領域の検討を行った。

(2) ATF6 の活性化機構を逆遺伝学的に解析することが可能な実験系の確立

ATF6 の活性化機構および p45、p50 の機能を明確に明らかにするために、相同組み替え効率が哺乳動物細胞に比べて2桁以上高く、逆遺伝学的解析が容易なニワトリ DT40 細胞に着目した。相同組み替え効率が高いだけでな

く、DT40 細胞は倍加時間が8時間と短いため、哺乳動物細胞やノックアウトマウスを用いた逆遺伝学的解析に比べて、圧倒的に効率よく解析を行うことができる。DT40 細胞を用いて、p45 および p50 の欠損細胞の作製に取り組んだ。

(3) 新規 ATF6 結合タンパク質を同定するための実験系の確立

ATF6 の出芽機構の全容を理解するためには、p45 および p50 以外にも、ATF6 と相互作用するタンパク質を網羅的に同定することが有効である。結合タンパク質を同定するための手段として、目的タンパク質の複合体を精製してその構成因子を質量分析により網羅的に同定する手法が近年広く普及している。しかしながら、ATF6 は膜タンパク質ということもあり、複合体構造を維持したままの可溶化や精製が難しい。この事が、ATF6 結合タンパク質の同定が進まない大きな要因の一つとなっている。

一方、小胞体ストレスに応答して ATF6 がゴルジ体に移行するには ATF6 の小胞体内腔ドメインが必須であることが示されている。この知見は、ATF6 の出芽機構を明らかにするためには、小胞体内腔ドメインに結合するタンパク質を同定することが重要であることを示唆している。

そこで我々は、ATF6 の小胞体内腔ドメインに小胞体局在化シグナルと TAP タグを付加したタンパク質(ATF6(C)-TAP)を培養細胞に発現させ、ATF6(C)-TAP の可溶性と精製効率の検討を行った。ATF6(C)-TAP は疎水性領域を持たないため、全長 ATF6 で見られる可溶化と精製過程での課題が解決できると予想される。また、TAP タグは、プロテイン A と TEV プロテアーゼ認識配列で構成されており、プロテイン A 領域で IgG セファロースと結合させた後、TEV プロテアーゼによって TEV プロテアーゼ認識部位で切断するという2段階の精製を行うことが可能である。したがって、ATF6 の小胞体内腔ドメインとその結合タンパク質複合体を高純度に精製できると考えられる。

4. 研究成果

(1) p45 と相同性の高いタンパク質の検索と p45 のドメイン解析

ヒト遺伝子データベースを検索した結果、

p45 と相同性の高いタンパク質として、p50 を新たに同定した(ウエスタンブロット法による解析で、50kDa のタンパク質として検出されたため、便宜上 p50 と呼ぶ)。p50 は N 末端にシグナル配列を有するが、p45 とは異なり膜貫通領域を持たない可溶性タンパク質である。

細胞内へのトランスフェクションと免疫染色解析から、p50 は小胞体局在性のタンパク質であると考えられた。さらに、免疫沈降法による結合実験を行ったところ、p45 と同じく、p50 も小胞体ストレス依存的に ATF6 と相互作用することが明らかとなった。興味深いことに、p45 と p50 同士も小胞体ストレス依存的に相互作用すること、p45 と p50 を共発現させると ATF6 との相互作用が増強されることから、p45 と p50 は複合体を形成して機能すると考えられた。

さらに、p45 と p50 の様々な変異体を作製し、ATF6 との結合に必要なアミノ酸領域の特定を行った。その結果、両者とも N 末端領域を除くと、小胞体ストレスに応答した ATF6 との相互作用能が消失することが明らかとなった。該当する N 末端領域は進化的に高度に保存されており、p45 および p50 と ATF6 との結合が生物種間で広く保存されていることが示唆される。

(2) ATF6 の出芽機構を逆遺伝学的に解析することが可能な実験系の確立

ATF6 遺伝子は少なくとも線虫以降の後生生物において獲得されたことが判明している。DT40 細胞は逆遺伝学的解析に有効な実験系であるが、哺乳動物以外の生物種で、ゴルジ体への移行とプロテオリシスという ATF6 の活性化機構が保存されているかは未確認であった。そこで、まずニワトリ ATF6 の抗体を作成し、DT40 細胞の内在性 ATF6 が小胞体ストレスに応答してプロテオリシスを受けるかどうか調べた。その結果、哺乳動物と全く同様に、DT40 細胞においても ATF6 は小胞体ストレスに応答してプロテオリシスを受けて活性化することを実証した。また、DT40 細胞において ATF6 遺伝子を破壊すると、マウス細胞の場合と同様に小胞体ストレスに応答した BiP の転写誘導がほぼ消失した。これらの結果は、DT40 細胞が哺乳動物と同等の ATF6 活性化機構を有しており、モデル細胞としての DT40 細胞の有用性を示している。

そこで、DT40 細胞を用いて実際に p50 遺伝子の破壊を開始し、p50 遺伝子のホモ欠損細胞の作製を完了した。p50 欠損細胞における ATF6 の活性化能を詳細に解析することにより、p50 の機能と ATF6 の活性化機構の理解が進むと期待される。p45 遺伝子については、ニワトリの遺伝子データベースに登録されていなかったため、現在独自にニワトリ遺伝子のクローニングを実施中である。

(3) 新規ATF6結合タンパク質の同定するための実験系の確立

作製した ATF6 (C)-TAP の細胞内挙動を詳しく解析した結果、ATF6 (C)-TAP は野生型 ATF6 と同様に、通常は小胞体に局在するが、小胞体ストレスに曝された細胞では速やかにゴルジ体に移行することが分かった。この結果は、ATF6 のゴルジ体移行は ATF6 の小胞体内腔ドメインのみで制御されていることを示しており、ATF6 (C)-TAP と相互作用するタンパク質を網羅的に同定することで、ATF6 の出芽機構を明らかにできることを意味している。また、期待通り、ATF6 (C)-TAP は全長の ATF6 と比べて可溶化と精製効率の向上が見られた。

ATF6 (C)-TAP の共沈降物を質量分析法により解析したところ、小胞体局在性のシャペロンである PDI とカルネキシンを ATF6 結合タンパク質として新規に同定することができた。両者は ATF6 の出芽に直接関連するものではないと考えられたが、今後、さらに精製条件を最適化することで、ATF6 の出芽機構に直接関与する因子を新たに同定することが可能と期待される。

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 1 件)

①Yoshimi Sato, Satomi Nadanaka, Tetsuya Okada, Katsuya Okawa, and Kazutoshi Mori
Luminal domain of ATF6 alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi apparatus
Cell Structure and Function (2011) 36, 35-47.

査読あり

[学会発表] (計 3 件)

① Tetsuya Okada, Shunichi Takeda, and Kazutoshi Mori

Analysis of the unfolded protein response using chicken DT40 cell line

BMB2010, 2010 年 12 月 10 日, 神戸ポートアイランド

② Tetsuya Okada, Shunichi Takeda, and Kazutoshi Mori

The unfolded protein response in chicken DT40 cells: A novel tool for comprehensive genetic analysis mammalian-type unfolded protein response

FASEB Summer Research Conference, July 28, 2010

Saxtns River, Vermont Academy

③ Yoshimi Sato, Satomi Nadanaka, Tetsuya Okada, and Kazutoshi Mori

Analysis of mechanism of ATF6 activation in response to ER stress

FASEB Summer Research Conference, July 28, 2010

Saxtns River, Vermont Academy

[その他]

ホームページ等

<http://www.upr.biophys.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 徹也 (Okada Tetsuya)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号 : 70378529

