

平成30年 8月21日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24228002

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答の分子機構とその破綻による疾患機序の解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism of ER stress response and the pathophysiology of ER stress disorders

研究代表者

河野 憲二 (Kohno, Kenji)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任教授

研究者番号：50142005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 165,280,000円

研究成果の概要(和文)：通常活性化されていない小胞体ストレス応答経路(IRE1経路)が、インスリンを分泌する膵臓細胞やムチンを産生する腸上皮の杯細胞では、恒常的に活性化していることを見出した。これらの細胞でIRE1経路を働かなくしたマウスやマウス由来の細胞を作製し解析したところ、膵細胞でIRE1を働かなくするとプロインスリンの折り畳み異常が昂進し糖尿病を発症した。一方、腸でIRE1を働かなくするとムチン産生が阻害され寄生虫感染時の排虫が遅れることがわかった。このことから、インスリン分泌や腸の恒常性維持のためには、生理的条件下での小胞体ストレス応答IRE1経路の活性化が大変重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Under physiological condition, ER stress pathway (IRE1 branch) is constitutively activated in pancreatic islet cells and intestinal goblet cells, which secrete insulin and mucin, respectively. To clarify the physiological role of highly activated IRE1 pathway, we constructed Ire1^{fl} or Ire1^{fl} KO mice, and examined their physiological and molecular biological differences between wild-type and Ire1 KO mice. Islet cell-specific Ire1^{fl}-conditional KO mice showed the typical diabetic phenotype due to the disorder of oxidative proinsulin folding. Ire1^{fl} KO mice showed the retardation of nematoda expulsion due to the impairment of mature mucin production in intestinal goblet cells. These results clearly indicate that highly activation of IRE1 pathway plays an important role in normal insulin-secretion and/or the maintenance of homeostasis of intestine under physiological condition.

研究分野：応用生物科学

キーワード：細胞応答 情報伝達

1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレス応答の研究は、ツニカマイシン、タブシガーギン、ジチオスレイトールなどの薬剤処理による研究が主流であった。それら薬剤を使うことにより、強度の小胞体ストレスを誘導し細胞レベルでの応答を調べることは、小胞体ストレス応答の大筋を理解するのに大きく貢献した。しかし近年、哺乳動物組織での生理的レベルの小胞体ストレス応答の解析にも目が向けられるようになり、発生や細胞の分化にとっても重要な役割をしていることがわかり始めている。

2. 研究の目的

哺乳動物個体は下等真核生物に比べると多様化した小胞体ストレス応答経路を進化的に発達させてきた。本研究ではインスリンやムチンの産生にとり、小胞体ストレス応答経路の活性化が重要であることを個体・細胞・分子レベルで理解することを目的とする。さらにこれらの小胞体ストレス応答経路の活性化が破綻すると、糖尿病、大腸炎、寄生虫感染などが起こりやすくなることを示し、生理的レベルの小胞体ストレス応答が生体の維持や防御に重要であることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Ire1*βKO (ノックアウト)マウスを用い、大腸杯細胞のムチン合成・分泌や寄生線虫を感染させたときの小腸杯細胞の過形成、ムチン産生、排虫との関係を明らかにする。

(2) 小胞体ストレスセンサーIRE1αを膵島β細胞でのみ欠失したマウスを用いて、インスリン産生におけるIRE1αの役割を個体レベル、細胞レベルで詳細に解析し、糖尿病との関連を調べる。

(3) *XBPlu* mRNA の小胞体膜へのリクルート機構を、無細胞翻訳系、培養細胞の両レベルで詳細に解析する。

4. 研究成果

(1) IRE1βは杯(さかずき)細胞のムチン産生に重要な役割を果たす(論文③参照)

小胞体ストレスセンサーIRE1は、哺乳動物では2つのパラログ、IRE1αとIRE1βが存在する。IRE1αは多くの組織で発現しており、発生に必須の遺伝子であることがわかっているが、IRE1βに関しては詳細な解析はなされていなかった。IRE1βは大腸、胃、小腸で発現しており、特に大腸、小腸のムチンを産生する杯細胞で特異的に発現が高いことを明らかにした。*Ire1*βKOマウスと野生型マウス由来の大腸杯細胞を電子顕微鏡で観察すると(図1参照)*Ire1*βKOマウス由来の杯細胞では、粗面小胞体の著しい肥大が観察され、生化学的な解析からムチン(MUC2)前駆体が小胞体内に多量に蓄積していることが明らかとなった(図1右)。*Muc2* mRNAの半減期を調べたところ、*Ire1*βKO杯細胞

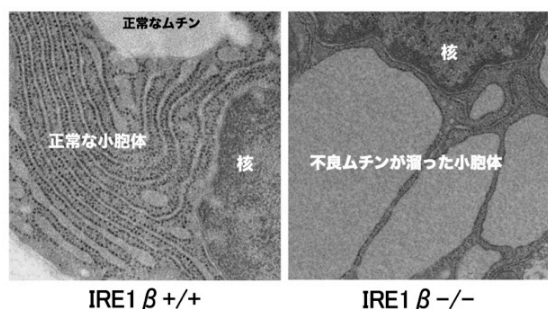


図1 マウス大腸杯細胞の電顕写真

では半減期が野生型マウスに比べ非常に長くなっていることが明らかとなった。これまでに当研究室で得たデータから次のように考えている。杯細胞では多量のムチン合成が行われており、IRE1βが常時活性化することにより*Muc2* mRNAを切断、結果としてムチン合成量を下げ小胞体のfolding capacity(タンパク質の折り畳み能力)を許容レベル内に保っている、一方、βKO杯細胞ではIRE1βが機能しないので、その調整ができないことにより、小胞体のfolding capacityを超えた過剰のムチンが合成され、結果として小胞体内に凝集蓄積している。この研究結果は、生理的条件下でのIRE1βの常時活性化が、杯細胞のムチン合成に重要であることを示した初めての論文であり、Faculty 1000にも注目する論文として取り上げられた。

(2) IRE1βは小腸における寄生線虫排除に貢献している

(1)の研究により、IRE1βが大腸杯細胞のムチン産生に必要であることが示された。ムチンは小腸杯細胞でも分泌され、外界からの菌の侵入や寄生虫感染を防いでいることが知られている。そのことから、*Ire1*βKOマウスでは、寄生線虫の排虫に異常を生じている可能性が考えられた。その可能性を検証するために、野生型マウスと*Ire1*βKOMausに腸管寄生線虫(*N. brasiliensis*)を感染させ、排虫に異常がでるかどうかを調べた。野生型マウスはTh2型応答を起こし、小腸杯細胞が過形成を起こし成熟肥大した杯細胞になりムチンを多量に分泌し、感染7日目にはほぼすべての排虫が完了した。一方、*Ire1*βKOMausでは、過形成及び成熟化が大きく抑制され、感染7日目ではまだ半分程度の線虫が小腸に残っており、排虫の遅れが観察された。寄生線虫感染により起こる上記の現象は、IL33の投与により非常に良く再現されたので、以後の研究はIL33投与により行った。ムチン産生のゲル電気泳動解析、電顕による形態観察、マウス小腸の組織化学的解析など詳細な解析を進めた結果、野生型マウスでは寄生線虫感染により杯細胞の過形成が起き、大量のムチン産生により排虫を行うが、*Ire1*βKOMausではこの応答がうまくいかず、成熟型ムチン形成が大きく抑制され、結果として排虫が遅れることが明らかとなった。こ

この現象は小胞体ストレスセンサーの *Ire1β* 欠損マウス特異的であり、*Ire1α* 欠損マウスでは全く観察されないため、このことは *IRE1β* がムチン産生に特化して進化した小胞体ストレスセンサーであることを示している（論文投稿準備中）。

(3) 膵島β細胞のインスリン産生に *IRE1α* は必須である

膵島β細胞では spliced form である *Xbp1s* mRNA が恒常的に高発現していることから、*IRE1α* は通常の生理的条件下で常時活性化していることが明らかとなった。この現象は膵β細胞特異的な現象で他の組織では観察されなかった（図2参照）。この応答を起

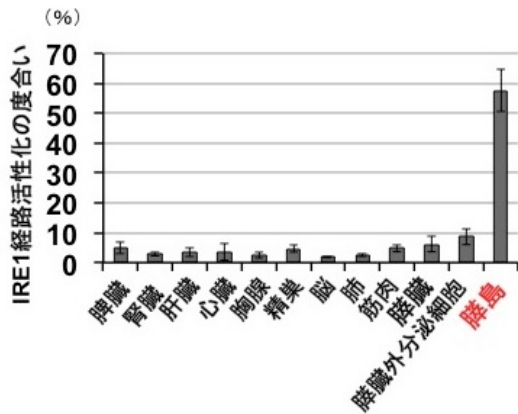


図2 膵島での *IRE1α*-*XBP1* 経路の特異的活性化

こさない *Ire1α* 遺伝子を膵島β細胞でのみノックアウトしたマウスを作製すると、4週齢以降にインスリン産生の低下が認められ、糖尿病症状を示すことがわかった。この結果は、膵島β細胞によるインスリン産生が *IRE1α* の恒常的活性化に依存していることを強く示唆している。そこで、*IRE1α*-*XBP1* 経路がどのようにインスリン産生に寄与しているのかを、*Ire1α^{f1/f1}* マウスから培養β細胞を樹立 [*MIN6(Ire1α^{f1/f1})* 細胞]、*Cre* を発現させることにより *Ire1α^{ΔR/ΔR}* 細胞 (*IRE1α* の RNase 欠損型) を作出し、インスリン産生に及ぼす *IRE1α* の役割を調べた。その結果、*IRE1α* を欠損するとプロインスリン、インスリン両者の発現量が激減することを見出した。小胞体シャペロンのトランスクリプトーム解析を行うと、全部で約 20 種類ある *PDI* family 遺伝子のうち 5 種の遺伝子発現が有意に低下していた。この細胞に野生型の *Ire1α* を導入発現すると、*Xbp1u* mRNA の特殊プライミングが回復し、プロインスリン、インスリン産生量の回復が認められ、同時に *PDI* 関連遺伝子の蛋白質質量レベルでの回復も認められた。このことから膵β細胞でインスリンを多量に合成するためには、常に *IRE1α* が活性化しその下流の遺伝子群、特に 5 種の *PDI* family 蛋白質が高発現し、プロインスリンの折り畳みを効率よく行うことが、

インスリン産生にとり大変重要であることが明らかとなった（図3及び論文①参照）。

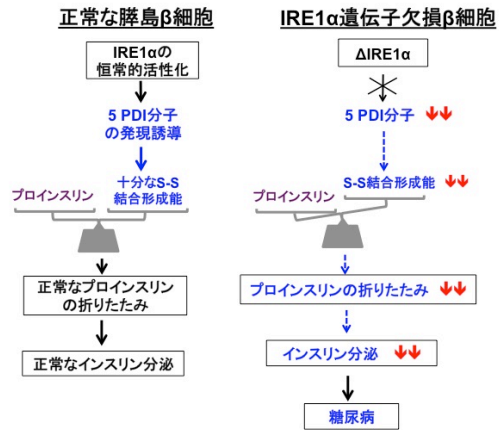


図3 *Ire1α*K0 マウスの膵島β細胞(右)ではプロインスリンの折り畳みに必要な 5 種の *PDI* が高発現せずインスリン分泌の低下が起こる

(4) *XBP1u* の翻訳休止を利用した小胞体膜への輸送解析から新しい SRP 経路を発見

哺乳動物で、非ストレス下でも発現している *XBP1u* 蛋白質は、C 末端側に小胞体移行シグナル(HR2)と翻訳休止シグナル(PS)の 2 つのシグナルをもち、この 2 つを利用し自身の mRNA を小胞体膜上に運ぶことを報告した (Mol Cell 2009; Science 2011)。 *XBP1u* の HR2 配列は通常はシグナル配列としては機能しないが、翻訳休止を起こすと SRP に認識され小胞体膜へと運ばれる。興味深いことに、この順序は今まで報告されている SRP がシグナル配列を認識する仕方とは逆である。さらに面白いことに、SRP に認識されると、その蛋白質は小胞体内に移行するとされているが、このケースでは最終的にはトランスロコンを通過できにくく、*XBP1u* は小胞体膜表面蛋白質として局在化した後、核に移行する。これは従来の SRP 経路とは異なる新しい SRP ルートの発見である（図4及び論文②を参照）。

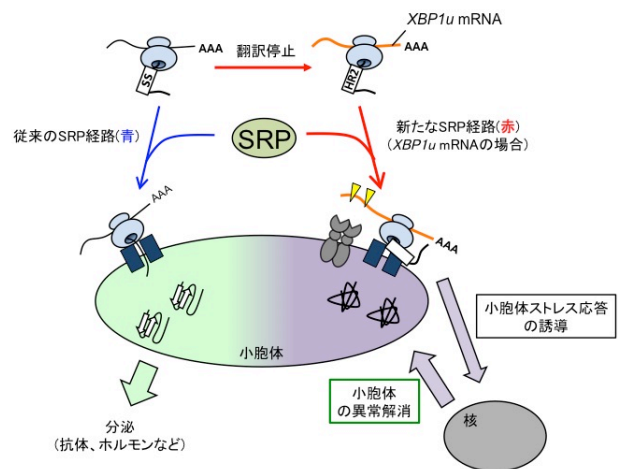


図4 SRP による小胞体膜へのリクルート(左)と *XBP1u* 蛋白質のポージングを利用した小胞体膜への新しいリクルート経路(右)

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3件)

① Tsuchiya Y, Saito M, Kadokura H, Miyazaki J, Tashiro F, Imagawa Y, Iwawaki T, and Kohno K. IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic β cells. *J Cell Biol.* 217(4), 1287-1301 (2018) 査読有

DOI: 10.1083/jcb.201707143

② Kanda S, Yanagitani K, Yokota Y, Esaki Y, and Kohno K. Autonomous translational pausing is required for *XBP1u* mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(40), E5885-E5895 (2016) 査読有

DOI: 10.1073/pnas.1604435113

③ Tsuru A, Fujimoto N, Takahashi S, Saito M, Nakamura D, Iwano M, Iwawaki T, Kadokura H, Ron D, and Kohno K. Negative feedback by IRE1 β optimizes mucin production in goblet cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(8), 2864-2869 (2013) 査読有

DOI: 10.1073/pnas.1212484110

[学会発表] (計5件)

① Kenji Kohno, FASEB Science Research Conferences; "From Unfolded Proteins in the ER to Disease" Saxtons River, USA (2017) 招待講演

② Kenji Kohno, International Symposium on Protein Quality Control, Nara, Japan (2017) 主催者及び講演

③ Kenji Kohno, EMBO conference "Structure and function of the endoplasmic reticulum" Girona, Spain (2016) 招待講演

④ Kenji Kohno, FASEB Science Research Conferences; "From Unfolded Proteins in the ER to Disease" Saxtons River, USA (2013) 招待講演

⑤ Kenji Kohno, EMBO Conference "The Physiology of the endoplasmic reticulum (ER): Function & Dysfunction" Girona, Italy (2012) 招待講演

[図書] (計2件)

① Kimata Y, Nguyen TMP, Kohno K. Response and cytoprotective mechanisms against proteotoxic stress in yeast and fungi. Ed. by Marek Skoneczny, in "Stress response mechanisms in Fungi" Springer, 印刷中

② Yanagitani K, Kohno K. Nascent chain-mediated localization of mRNA on the endoplasmic reticulum as an important step of unfolded protein response. Ed. by Koreaki Ito, in "Regulatory nascent polypeptides",

Springer, p291-310 (2014)

[その他]

ホームページ: <http://www.naist.jp/iri/kouno/>

報道関連情報: (1) 読売新聞(2018.5/20)

(2) 日刊工業(2016.9/21), 朝日新聞(11/3)

(3) NHK テレビ(2013.2/7), 朝日(2/14)・産経(2/10)・奈良(2/9)・毎日・京都などの各新聞

アウトリーチ活動: 大阪府高齢者大学講義

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 憲二 (KOHNO, Kenji)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任教授

研究者番号: 50142005

(2) 研究分担者

都留 秋雄 (TSURU, Akio)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 80273861

(3) 連携研究者

小池 雅昭 (KIOKE, Masaaki)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任助教

研究者番号: 60263448

木俣 行雄 (KIMATA, Yukio)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号: 60263448

斉藤 美知子 (SAITO, Michiko)

京都薬科大学・バイオサイエンス研究センター・准教授

研究者番号: 40379558

(4) 研究協力者

大古殿 美加 (OHFURUDONO Miku)

RON David