

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650070

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答のピコバイオロジー的解析

研究課題名(英文)Picobiological analysis of the ER and Golgi stress responses

研究代表者

吉田 秀郎 (Yoshida, Hiderou)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：60378528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：分泌タンパク質は、小胞体で合成されて小胞体シャペロンによって立体構造形成をした後、ゴルジ体で糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けて、最終目的地へと輸送されていく。小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答は、細胞の需要に応じて小胞体とゴルジ体の機能を強化する機構である。本研究課題では、小胞体ストレス応答やゴルジ体ストレス応答の主要な制御因子であるpATF6(P)とpXBP1(U)、TFE3の立体構造を解析することによって、ヒトの小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答の分子機構を明らかにするものである。解析の結果、pXBP1(U)については、結晶構造解析に十分な量のタンパク質を調製することができた。

研究成果の概要(英文)：Secretory proteins are synthesized and folded with endoplasmic reticulum (ER) chaperones in the ER, and received various post-translational modifications such as glycosylation. The ER and Golgi stress responses are the mechanisms that augment function of each organelle in accordance with cellular demands. In this project, we planned to reveal the mammalian molecular mechanisms of the ER and Golgi stress responses through the structural analyses of pATF6(P), pXBP1(U) and TFE3, key regulators of the ER and Golgi stress response. Finally, we obtained pXBP1(U) protein for the analysis of X-ray crystallography.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 ゴルジ体 ストレス応答 構造生物学 結晶構造解析 転写 スプライシング シャペロン

1. 研究開始当初の背景

分泌タンパク質や膜タンパク質は小胞体で合成され、小胞体シャペロンによって正しい立体構造を形成した後、ゴルジ体で糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けて、最終目的地へと輸送されていく。小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答は小胞体とゴルジ体の機能を制御する機構である。研究代表者は小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答の分子機構を解析しており、小胞体ストレス応答の中心的制御因子 ATF6 と XBP1、及びゴルジ体ストレス応答の中心的制御因子 TFE3 を同定した。ATF6 はセンサー型転写因子であり、平常時には小胞体膜貫通型のセンサー分子 pATF6(P)として機能しているが、小胞体の機能が不足すると(小胞体ストレス)、膜の直下で切断されて転写因子 pATF6(N)に変換され、核へ移行して小胞体の機能を担う遺伝子の転写を誘導する。しかしながら、pATF6(P)がどのようにして小胞体ストレスを感知するのかについては、まだほとんどわかっていない。

一方、XBP1 の mRNA は平常時には前駆体 mRNA であるが、小胞体ストレス時には前駆体 mRNA がスプライシングを受けて成熟型に変換され、そこから翻訳された転写因子 pXBP1(S)が小胞体の機能を担う遺伝子の転写を誘導する。興味深いことに、前駆体 mRNA からは制御因子 pXBP1(U)が翻訳され、不要な pXBP1(S)の分解を促進したり、XBP1 の前駆体 mRNA を小胞体に繫留しているが、その分子機構については不明な点が多い。

更に、TFE3 はゴルジ体ストレス応答を制御する転写因子であるが、平常時はリン酸化されることによって細胞質に繫留されており、ゴルジ体の機能が不足すると(ゴルジ体ストレス)脱リン酸化されて核へ移行し、ゴルジ体の機能を担う遺伝子の転写を誘導する。しかしながら、脱リン酸化によって核へ移行する分子機構については、まだよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

そこで、本研究課題では pATF6(P) や pXBP1(U)、及びリン酸化型と脱リン酸化型の TFE3 の立体構造を明らかにすることで、pATF6(P)のストレス感知機構や pXBP1(U)の XBP1 前駆体 mRNA 繫留機構、TFE3 の細胞質繫留機構を解明することを目指した。

小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答は、細胞小器官の機能が細胞の需要に応じて強化されるという「細胞小器官の量的調節機構」の研究につながる学術的にきわめて重要な研究である。研究代表者のこれまでの成果も細胞生物学の教科書に記載されており、研究代表者の元上司である森和俊教授(京都大学大学院理学研究科)は、小胞体ストレス応答の研究で 2014 年のラスカー賞を受賞している。本研究課題によって小胞体ス

トレス応答とゴルジ体ストレス応答の分子機構を明らかにすることによって、細胞生物学の教科書を更書き換えることを期待している。

また、小胞体ストレス応答やゴルジ体ストレス応答は神経変性疾患など様々な疾患との関連が深いことから、これらの関連疾患の予防・診断・治療に役立つ研究基盤を構築することも期待している。

3. 研究の方法

しかしながら、ATF6 や XBP1 に関してはこれまで多くの研究者が立体構造解析を試みてきたが、いずれも失敗に終わっている。そこで本研究課題では、下記のように綿密にタンパク質調製方法を検討することにした。また、タンパク質を調製できたとしても、X線構造解析のために結晶を調製する必要がある。pATF6(P)は膜タンパク質であり、結晶化が特に難しい。そこで、研究代表者が所属する兵庫県立大学大学院理学研究科と協力関係にある理研播磨研究所が有する強力 X線自由電子レーザーである SACLA を用い、小さい結晶あるいは結晶を用いずに立体構造解析を行うことにした。

4. 研究成果

(1) pATF6(P)の立体構造解析

pATF6(P)に関しては、小胞体内腔側の領域に存在するシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合が活性化を制御しており、平常時には pATF6(P)がジスルフィド結合によって多量体を形成することで pATF6(P)の活性化を防いでいるという説がある。そこで、pATF6(P)を酸化的な環境と還元的な環境で調製することで、単量体と多量体の両方の立体構造を解析することを試みた。大腸菌の細胞質は還元的な環境であり、ジスルフィド結合は形成されにくいことから、単量体の産生は大腸菌で行った。一方、昆虫細胞の小胞体で産生することで、ジスルフィド結合が形成された多量体の産生を試みた。更に、pATF6(P)は N 型糖鎖付加を受けること、この N 型糖鎖が小胞体ストレスの感知に関与している可能性があること、昆虫細胞で付加される N 型糖鎖は哺乳類のものとは異なることから、哺乳類細胞で pATF6(P)を調製することも計画した。

研究の結果、昆虫細胞で pATF6(P)を発現させることができたが、結晶構造解析に十分な量を得ることは今のところまだできていない。大腸菌では発現がきわめて難しかったが、レアコドンを改善した大腸菌株を用いることで、ある程度の改善が見られた。哺乳類細胞でも発現させることができたので、現在大量培養系を立ち上げているところである。

(2) pXBP1(U)の立体構造解析

pXBP1(U)には糖鎖もジスルフィド結合もないため、大腸菌内で組換えタンパク質を調

製することにした。通常の大腸菌株 (BL21 株) ではほとんど発現が見られなかったため、レアコドン改善した Rosetta2 株を用い、組換えタンパク質による毒性を提言するために低温で発現誘導するプロモーターを用い、更に組換えタンパク質のフォールディングを促進するために分子シャペロンである trigger factor との融合タンパク質として発現させた。混入している金属イオンを EDTA で除去してから Ni-NTA カラムで生成したり、発現誘導のタイミングをいろいろと試行錯誤して決定したりなど様々なパラメーターを最適化した結果、900ml の培養液から 4.7mg の pXBP1(U)タンパク質を得ることができた。

Ni-NTA カラムでの精製後、陰イオン交換カラムやゲル濾過カラムで精製したところ、二量体だけでなく多量体が混入していることがわかった。ゲル濾過カラムの条件や、塩濃度を増やすことでこの問題を解決し、現在結晶化を進めているところである。

(3) TFE3 の立体構造解析

TFE3 はリン酸化されると細胞質に、脱リン酸化されると核へ移行することから、リン酸化の有無によって立体構造が変化すると考えられる。立体構造の変化に伴って、細胞質繫留タンパク質と結合したり、核輸送タンパク質と結合するのであると想像される。TFE3 の細胞内局在性を制御するリン酸化部位を決定したところ、108 番目のセリン残基であることがわかった。そこで、このセリン残基をアスパラギン酸に置換し、リン酸化されたのと同じ状態を再現することにした。野性型と置換型の TFE3 を哺乳類細胞で発現させたところ、確かに発現することを確認できた。現在、哺乳類細胞と大腸菌細胞でタンパク質の調製を行っているところである。

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 6 件)

Taniguchi, M., Nadanaka, S., Tanakura, S., Sawaguchi, S., Midori, S., Kawai, Y., Yamaguchi, S., Shimada, Y., Nakamura, Y., Matsumura, Y., Fujita, N., Araki, N., Yamamoto, M., Oku, M., Wakabayashi, S., Kitagawa, H., Yoshida, H. TFE3 is a bHLH-ZIP-type transcription factor that regulates the mammalian Golgi stress response. **Cell Struct. Funct.** 査読

有,40, 2015, 13-30. DOI:

10.1247/csf.14015

Sasaki, K. and Yoshida, H. Organelle autoregulation-stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome. **J Biochem.** 査読有, 157, 2015, 185-195. DOI: 10.1093/jb/mvv010

Taniguchi, M. and Yoshida, H. Endoplasmic reticulum stress in kidney function and disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, 査読有, in press.

Uemura, A., Taniguchi, M., Matsuo, Y., Oku, M., Wakabayashi, S. and Yoshida, H. UBC9 regulates the stability of XBP1, a key transcription factor controlling the ER stress response. **Cell Struct. Funct.** 査読有, 38, 2013, 67-79. https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/38/1/38_12026/_article

Ariyasu, D., Yoshida, H., Yamada, M. and Hasegawa, Y. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis contribute to the pathogenesis of dominantly inherited isolated GH deficiency due to GH1 gene splice-site mutations. **Endocrinology**, 査読有, 154, 2013, 3228-3239. DOI: 10.1210/en.2013-1249

Wakabayashi, S. and Yoshida, H. The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists. **Comput. Struct. Biotechnol. J.** 査読有, 2013, e201303010. DOI: 10.5936/csbj.201303010

[学会発表] (計 2 5 件)

吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答による糖鎖修飾の制御 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月26日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Hiderou Yoshida The novel response pathway of the mammalian Golgi stress response that regulates glycosylation of proteoglycans in the Golgi apparatus. EMBO Conference 2014年10月28日 バルセロナ(スペイン)

Hiderou Yoshida A novel Golgi stress response pathway that regulates proteoglycan glycosylation. 第87回日本生化学会大会 2014年10月17日 京都国際会館(京都府京都市)

Hiderou Yoshida Mammalian Golgi stress response regulating Golgi glycosylation. JSCB presymposium 2014年6月10日 東大寺文化センター(奈良県奈良市)

Hiderou Yoshida ER stress response and Golgi stress response. Protein and Peptide Conference 2014年4月26日 大連(中国)

Hiderou Yoshida ER stress response and Golgi stress response. ISN Forefront Symposium 2014年3月9日 チャールストン(アメリカ合衆国)

吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答における膜タンパク質の品質管理 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月5日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

吉田秀郎 細胞分化とゴルジ体ストレス応答 第86回日本生化学会大会 2013年9月11日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答の分子の実体: 不完全な糖鎖修飾の関与 第65回日本細胞生物学会大会 2013年6月20日 ウィンク愛知(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biochem2/index-j.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
吉田 秀郎 (YOSHIDA, Hiderou)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号: 60378528

(2)研究分担者
該当無し

(3)連携研究者
該当無し