

平成21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19770170  
 研究課題名（和文）小胞体ストレスに応答した膜結合性転写因子 ATF6 の選択的出芽機構  
 研究課題名（英文）Mechanism for the specific activation of a membrane-bound transcription factor ATF6 by 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：

ATF6は小胞体への構造異常タンパク質の蓄積(小胞体ストレス)に応答して活性化する小胞体膜結合性転写因子である。本研究では、ATF6の活性化に小胞体膜貫通型リン酸化酵素PERKが関与していることを明らかにした。また、新規ATF6結合タンパク質としてp45を同定することにも成功した。p45は小胞体ストレス依存的にATF6と結合する性質を持つことから、p45の同定により、ATF6の活性化機構の研究が大きく進展すると期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 0       | 1,800,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,400,000 | 480,000 | 3,880,000 |

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 小胞体ストレス 小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、新規に合成された膜タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体内のシャペロンおよびフォールディング酵素の働きにより正しい高次構造を獲得した後、ゴルジ体、リソソーム、細胞表面などの最終目的地へ輸

送される。ところが、小胞体ストレスと総称される様々な生理条件下ではこのフォールディングシステムが破綻し、高次構造が異常なタンパク質が小胞体に蓄積することが知られている。この時細胞は、小胞体ストレス応答と呼ばれる生体防御機構を活性化して

異常タンパク質に対処する。小胞体ストレス応答においては、転写誘導機構が極めて重要な役割を果たすことが知られている。

当研究室で単離した ATF6 は、小胞体膜に 1 回貫通した II 型膜タンパク質として発現している膜結合性転写因子である。小胞体への異常タンパク質の蓄積を感知すると、ATF6 は小胞体から出芽して小胞輸送によりゴルジ体へ移行し、ゴルジ体に局在する 2 種類のプロテアーゼによるプロセッシングを受ける。その結果、転写因子としての機能を有する ATF6 の細胞質側ドメインが膜から遊離して核へ移行し、標的遺伝子の転写を促進する。ATF6 の細胞質側ドメインを細胞に過剰発現させると、BiP をはじめとする小胞体シャペロンやフォールディング酵素の転写が強く促進されることから、ATF6 は小胞体のフォールディング能力を増強する機能を持つと考えられていた。

このように、小胞体からゴルジ体へ移行してプロセッシングを受けるといふ ATF6 の活性化プロセスの全体像や、フォールディング能力の増強という ATF6 活性化の意義については理解が進みつつあった。一方、ATF6 がどのように小胞体ストレスを感知して小胞体から選択的に出芽するのかについては解決すべき点が多く残されており、その分子機構の解明が重要な課題となっていた。

## 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 の選択的な出芽機構の分子基盤解明を目的として、以下の二つの点を明らかにすることを試みた。

### (1) ATF6 の活性化における PERK の役割

PERK は小胞体を 1 回貫通した小胞体膜貫通

型リン酸化酵素であり、ATF6 とは別の転写誘導経路を制御することが知られている。PERK は小胞体ストレスを感知すると自己リン酸化により活性化し、転写因子 ATF4 を誘導する。米国の David Ron らは PERK の欠損細胞では、小胞体ストレスに応答した小胞体シャペロンの誘導が野生型細胞と比較して有意に低下することを報告している。しかしながら、PERK により誘導される転写因子 ATF4 は小胞体シャペロンのプロモーター上にある ERSE (小胞体ストレス応答性シス配列) には結合しないことが分かっている。したがって、PERK の欠損により小胞体シャペロンの発現誘導が低下するのは、ATF4 以外の転写因子が影響を受けたことによる可能性が考えられた。そこで本研究では、PERK の欠損が ATF6 の活性化に影響を及ぼすのではないかと仮説を立て、その検証を行った。

### (2) 新規 ATF6 結合タンパク質の同定

ATF6 の選択的な出芽機構の理解が進まない理由の一つとして、ATF6 に結合するタンパク質の同定が進んでいないことがあった。そこで、新規 ATF6 結合タンパク質の探索を行い、ATF6 の出芽に関与する因子の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ATF6 の活性化における PERK の役割の評価

PERK 欠損細胞に小胞体ストレスを与え、野生型細胞と比較しながら ATF6 の活性化状態を詳しく検討した。また ATF6 の標的遺伝子産物である BiP の発現誘導についても検討した。

### (2) 新規 ATF6 結合タンパク質の同定

結合タンパク質を同定するための一般的

な方法としては、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等で同定する方法や、yeast two-hybrid法が挙げられる。しかしながら、膜タンパク質である ATF6 は複合体精製が難しいこと、yeast two-hybrid法は膜タンパク質や小胞体内腔でのタンパク質相互作用を再現するには不向きであることなどから、これらの手法によるスクリーニングは現時点では困難と判断した。そこで本研究では、当研究室で行われた ATF6 欠損細胞を用いた DNA マイクロアレイ解析のデータを利用し、ATF6 の標的遺伝子とそのファミリー遺伝子がコードするタンパク質の中から、ATF6 と相互作用するタンパク質を同定することを試みた。

#### 4. 研究成果

(1) PERK 欠損細胞では、ATF6 の活性化が持続しない

野生型のマウス繊維芽細胞を小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンで処理すると、処理後 1 時間から ATF6 のプロセッシングすなわち活性化が起こり、その活性化はツニカマイシン処理後 1 2 時間以降まで持続した。一方、PERK が欠損したマウス繊維芽細胞においては、ツニカマイシン処理後 1 時間から 2 時間では野生型細胞と同じく ATF6 の活性化が確認されたが、それ以降では活性化が見られなかった。すなわち、PERK が欠損すると、ATF6 の活性化が持続できないことが明らかとなった。また、PERK 欠損細胞では、ツニカマイシン処理による BiP の発現誘導も野生型細胞と比較して有意に低下していた。これらの結果は、PERK が ATF6 の出芽過程のいずれかの段階に関与していることを示唆しており、すでに報告されていた PERK 欠損細胞における BiP の発現誘導能の低下は、ATF6 の活性化が低下したことによるものである

と考えられた。

ATF6 と PERK は共に小胞体ストレスのセンサー分子として小胞体ストレス応答を発動する機能を持つが、これらセンサー分子間での機能的なクロストークを初めて示した成果である。PERK が ATF6 の出芽過程のいずれの段階に作用するかについては、現在検証中である。

#### (2) 新規 ATF6 結合タンパク質の同定

当研究室による DNA マイクロアレイ解析で同定された ATF6 の標的遺伝子およびそのファミリー遺伝子がコードするタンパク質に焦点を絞り、ATF6 と結合するタンパク質を免疫沈降法により探索した。その結果、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 N 末端にシグナル配列を持ち、C 末端近傍に膜貫通領域を持つ膜貫通型タンパク質であり、細胞内に過剰発現させると小胞体に局在した。また、p45 は膜貫通領域よりも N 末端側に 2 つの N 型糖鎖付加部位を持ち、N 型糖鎖付加を阻害するツニカマイシンで細胞を処理すると p45 の分子量が低下した。このことから、p45 は糖タンパク質であること、N 末端領域の大部分が小胞体内腔に配向していると考えられた。

興味深いことに、通常の細胞内では p45 と ATF6 の結合は見られないが、小胞体に構造異常タンパク質を蓄積させると、両者は速やかに結合することが分かった。すなわち、p45 は小胞体ストレスに応答して ATF6 と結合する因子であると言えることができる。この結果は、p45 が ATF6 の出芽過程に関与していることを強く示唆している。遺伝子データベースを用いた解析から、p45 は進化的に広く保存されており、これまでのところ、ATF6 が存在する全ての生物種に p45 も存在することが確

認されている。

また、p45 の ATF6 結合ドメインを同定する目的で p45 の N 末端領域半分あるいは C 末端領域半분을それぞれ除いた変異体を作成したところ、N 末端領域半분을除いた変異体は ATF6 と結合できないことが明らかとなった。したがって、p45 は自身の N 末端領域で ATF6 と結合すると考えられた。

小胞体ストレスに応答して ATF6 と結合する性質を持つタンパク質はこれまで報告されておらず、本研究による p45 の同定は、小胞体ストレスに応答した ATF6 の活性化機構を解明する上で極めて重要な成果である。今後 p45 の機能を詳細に解析することにより、ATF6 による小胞体ストレスの感知と選択的出芽の分子機構が明らかにできると期待される。

## 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)

- ① Yusuke adachi, Keisuke Yamamoto, Tetsuya Okada, Hiderou Yoshida, Akihiko Harada, and Kazutoshi Mori  
ATF6 is a Transcription Factor Specializing in the Regulation of Quality Control Proteins in the Endoplasmic Reticulum.  
**Cell Structure and Function** (2008) 33, 75-89. 査読有り

## 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