

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20247026

研究課題名 (和文) 小胞体ストレス感知の分子機構と応答破綻の影響解析

研究課題名 (英文) Analysis of molecular mechanism of sensing endoplasmic reticulum stress and effect of failing in the endoplasmic reticulum stress 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

研究成果の概要 (和文)：

小胞体膜結合性転写因子 ATF6 は、小胞体ストレスを感知するとゴルジ装置へ移行し、プロテオリシスによる活性化を受ける。この小胞体ストレスの感知に ATF6 内腔領域のみが十分であることを証明した。ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスは正常に発育するが、腹腔に小胞体ストレス誘導剤を投与すると脂肪肝を形成して死亡する。その原因として、肝臓からの脂肪の放出を担う超低密度リポタンパク質形成に関与する Apolipoprotein B-100 の品質管理に ATF6 $\alpha$  非存在下では問題が生じることを突き止めた。

研究成果の概要 (英文)：

The endoplasmic reticulum (ER) membrane-bound transcription factor ATF6 translocates to the Golgi apparatus upon ER stress to be activated by proteolysis. We demonstrate that the luminal domain of ATF6 alone is sufficient for sensing ER stress. ATF6 $\alpha$  knockout mice develop normally, however, ATF6 $\alpha$  knockout mice exhibit liver dysfunction and steatosis upon intraperitoneal injection of the ER stress-inducing reagent tunicamycin. We point out suppression of very-low-density lipoprotein formation, which is responsible for release of neutral lipids from liver, due to the destabilized apolipoprotein B-100 as a cause of liver steatosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2009年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2010年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
年度			
年度			
総計	33,300,000	9,990,000	43,290,000

研究分野：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、分子シャペロン、転写誘導、膜結合性転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

新規に合成された分泌タンパク質や膜タンパク質の高次構造形成が行なわれる小胞体は、これらのタンパク質が正しい立体構造をとっているかどうか峻別する能力を有し、

タンパク質の品質を管理するオルガネラとして知られている。小胞体内にはタンパク質の高次構造形成を介助・促進する分子シャペロンやフォールディング酵素（小胞体シャペロン）が多種多様に存在し、通常、新生タンパク質は効率よく折り畳まれている。一方、

折り畳みに失敗したタンパク質は小胞体関連分解機構により細胞質に引き出され、ユビキチン・プロテアソーム系により分解される。このように、折り畳み (Productive Folding) と分解 (ER-associated degradation:ERAD) という、相反する2つの仕組みによって小胞体におけるタンパク質品質管理は成立している。

しかしながらいわゆる小胞体ストレスと総括されている状況下では、小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積し、小胞体の機能が阻害される。この時、Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれる細胞内情報伝達経路が活性化され小胞体の恒常性が維持される。すなわち、小胞体ストレス下では、それ以上新規合成タンパク質が小胞体内に送り込まれないように翻訳を抑制する小胞体の負荷軽減、小胞体シャペロンの転写誘導による折り畳み容量の増強、ERAD 因子の転写誘導による分解システムの活性化の3つの対応がなされる。UPR は、センサー兼トランスデューサーとして機能する小胞体膜貫通型タンパク質によって媒介され、哺乳動物では、IRE1、PERK、ATF6 という3つのユビキタスなタンパク質が重要な役割を果たしている。

申請者は、IRE1 を酵母で初めて同定して UPR という新領域を開拓し (Cell, 1993)、哺乳動物 UPR の解析では ATF6 (MBC, 1999) ならびに IRE1 の下流で働く転写因子 XBP1 (Cell, 2001) を単離同定するなど、本研究領域を常に先導する役割を果たしてきている。

ATF6 は小胞体膜を貫通する II 型の膜糖タンパク質として構成的に発現している (MBC, 1999)。小胞体ストレス下では ATF6 はゴルジ装置へと選択的に輸送され、ゴルジ局在性のプロテアーゼ S1P と S2P により連続的に切断される。この結果膜から遊離した細胞質側領域は、転写因子として必要なドメインを全て持ち、核へ移行して転写を実行する (MBC, 2000, 2001)。活性型の ATF6 細胞質領域を生理的レベルで発現させた実験結果 (BJ, 2002) 等から、ATF6 は小胞体シャペロンの転写制御を行っていると考えていたが、最近 ATF6 ノックアウトマウスの作製に成功し、MEF を使った解析により、小胞体シャペロンの転写誘導に実際に必要であることを証明した (Dev. Cell, 2007)。さらに、これまで IRE1-XBP1 経路により転写誘導されると考えてきた (Dev. Cell, 2003) ERAD 因子の転写誘導にも ATF6 が必要であることが明らかになったため、解析を行い、ATF6 と XBP1 のヘテロダイマーが ERAD 因子を

転写誘導することを明らかにした (Dev. Cell, 2007)。このように、哺乳動物細胞では、小胞体シャペロンや ERAD 因子といった小胞体におけるタンパク質の品質管理に重要なタンパク質の転写誘導は ATF6 によって担われている。興味深いことに、酵母には ATF6 は存在しない。線虫やショウジョウバエには ATF6 とよく似た遺伝子が存在するが、米国のグループがこれは UPR にはほとんど関与せず、IRE1 経路が UPR を制御していることを報告している。よって ATF6 は高等動物になって始めて中心的役割を果たすようになったと考えられる。

ATF6 の解析において、現在残された最重要課題は、小胞体ストレス下 ATF6 が如何にして活性化されるかという小胞体ストレス感知の分子機構と、ATF6 がいないとどのような不都合が生じるのかという応答破綻の影響解析の2つである。

## 2. 研究の目的

本基盤研究Aは、次の2つの研究課題に取り組み、成果を上げることを目的とするものである。

### 1) 小胞体ストレス感知の分子機構

小胞体膜結合性転写因子である ATF6 は、小胞体ストレス下ゴルジ装置へ移行し活性化される。このとき、高次構造の異常なタンパク質は小胞体内に留められたままであるため、品質管理機構が破綻している訳ではなく、ATF6 が積極的に選別されている (MBC, 2004)。これまでは、通常時 ATF6 に結合しているメジャーな小胞体シャペロン BiP が小胞体ストレス下に解離することで ATF6 の輸送が起こるとされていた (米国 Prywes 氏ら, Dev. Cell, 2004) が、申請者は2つの新規制御機構を発見した。(1)ジスルフィド結合の還元と(2)エスコートタンパク質の結合である。

(1) ATF6 の内腔領域の保存された位置に2つのシステイン残基が存在し、ジスルフィド結合を形成している。小胞体ストレス下ではこれが還元され、還元型モノマーのみがゴルジ装置へ移行することを見いだした (MBC, 2007)。還元型モノマーは酸化型よりも ATF6 活性化プロテアーゼにより切断されやすく、また XBP1 とのヘテロダイマー化が容易である。この ATF6 還元酵素を同定し、その活性化機構を明らかにすることで、小胞体ストレス感知の分子機構に迫る。

(2) ATF6 の内腔領域にアラニン置換変異を導入することにより、小胞体ストレス下でもゴルジ装置へ移行しない変異体を作製す

ることに成功した。10 アミノ酸への変異導入からスタートしたが、最終的に 4 アミノ酸の置換が有効であることがわかった。この変異体では野生型の場合と同様に BiP の結合・解離が見られることから、ATF6 をゴルジ装置へエスコートするタンパク質が結合できなくなったと考えている(未発表)。この ATF6 エスコートタンパク質を同定し、その活性化機構を明らかにすることで、小胞体ストレス感知の分子機構に迫る。

## 2) 応答破綻の影響解析

ATF6 は哺乳動物では ATF6 $\alpha$  と ATF6 $\beta$  の 2 つからなり、小胞体における品質管理に働くタンパク質の転写制御を担っているのは主として ATF6 $\alpha$  である。ATF6 $\alpha$  や ATF6 $\beta$  単独のノックアウトマウスは特に表現型を示さないが、ATF6 $\alpha$  と ATF6 $\beta$  のダブルノックアウトマウスは胎生致死となることを見いだした (Dev. Cell, 2007)。その原因を明らかにする。

ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの腹腔に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを投与すると、肝臓が白色になり、数日でほとんどが死亡することがわかった。電子顕微鏡観察により、ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの肝臓には脂肪滴が多数認められた。小胞体におけるタンパク質の品質管理と脂肪肝発症との関連を示す興味深い知見と考えており、その分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) 小胞体ストレス感知の分子機構

ATF6 を小胞体ストレス依存的に還元する酵素とエスコートするタンパク質の同定を断行するが、これらは ATF6 と小胞体内腔で結合するため、核内での相互作用に基づく通常の Yeast Two-Hybrid 法は使えない。酵母の IRE1 を活用した小胞体膜タンパク質用の Two-Hybrid 法も開発されているが、IRE1 は I 型膜タンパク質であり、II 型の膜タンパク質である ATF6 には適用できない。また、I 型 II 型両方を対象にした Yeast Dual Membrane 法は試みたが、成功しなかった。

現在、質量分析によるタンパク質の同定が簡便、高感度、低価格になっていることから、ATF6 に特異的に結合するタンパク質を生化学的に単離し、質量分析で同定する手法が最も目的に合致していると考えている。申請者は既に、この手法を用いて小胞体関連分解において重要な役割を果たす小胞体膜 4 回貫通タンパク質 Derlin に結合するタンパク質を複数同定している(未発表)。

### (1) ATF6 還元酵素の同定

ATF6 の内腔領域に存在する Cys467 と Cys618 が分子内および分子間でジスルフィド結合を形成しており、ATF6 は通常時モノマー、ダイマー、オリゴマーとして存在する。Cys467 をアラニンに置換すると、free になった Cys618 を持つ ATF6 は予想通りモノマー、ダイマーとして存在した。一方、Cys618 をアラニンに置換すると、free になった Cys467 を持つ ATF6 は予想に反して他のタンパク質とのジスルフィド結合を介してオリゴマーを形成することがわかった (MCB, 2007)。小胞体膜に近い Cys467 と共有結合を形成するこの相手タンパク質は、ATF6 のジスルフィド結合形成に重要な役割を果たすが、PDI などの典型的な oxidoreductase に対する抗体とは反応しないことから、ATF6 を小胞体ストレス依存的に還元する酵素である可能性が高いと考えている。

Cys618 をアラニンに置換した変異型の全長 ATF6[ATF6full(C618A)] に Tandem Affinity Purification (TAP)tag (myc tag と IgG カラムで精製できるように付けられた Protein A が TEV プロテアーゼ切断サイトで繋がれているもの) を結合させても、この相手タンパク質との結合が見られたので、ATF6full(C618A)-TAPtag を HEK293 細胞などヒトの細胞にトランスフェクトし、ATF6full(C618A)に共有結合してくるタンパク質を IgG カラムで精製し、電気泳動で分離後に質量分析にかけてこの相手タンパク質を同定する。

上記の実験と平行して以下の単離方法も実践する。申請者は既に、ATF6 内腔領域に TAP tag を融合させたタンパク質 ATF6(luminal)-TAPtag が、Cys467 と Cys618 を介してジスルフィド結合を形成すること、このジスルフィド結合が小胞体ストレス依存的に還元されること、この融合タンパク質が野生型タンパク質と同様に小胞体ストレス依存的にゴルジ装置へ移行することを見いだしている。そこで、この可溶性の融合タンパク質をツールにして小胞体ストレスを負荷した細胞から ATF6 結合タンパク質を単離し、質量分析にかけることで ATF6 還元酵素を同定する。

### (2) ATF6 エスコートタンパク質の同定

ATF6 の内腔 272 アミノ酸領域に存在する 468-471 の 4 アミノ酸と 476-481 の 6 アミノ酸の合計 10 アミノ酸をアラニンに置換すると、小胞体ストレス下でもゴルジ装置へ移行しないことを見いだした。さらにゴルジ装置への移行に重要なアミノ酸を絞り込み、

Leu470・Ile471・Arg478・Leu479の4アミノ酸をアラニンに置換するだけでATF6は小胞体ストレス下でも小胞体にとどまったままであることを明らかにした。この変異型にも野生型の場合と同様に、通常時BiPが結合し、小胞体ストレス時にはそのBiPが解離するため、アラニン置換によってエスコートタンパク質がATF6に結合できなくなったことがゴルジ装置へ移行しない原因であると考えている(未発表)。

野生型ATF6および4アミノ酸変異型ATF6にGFPを融合させたタンパク質を安定に発現するChinese Hamster Ovary (CHO)細胞を作製しており、変異型ATF6は小胞体ストレス下でもゴルジ装置へ移行しないことを確認している。これらの細胞を可溶化した後、GFPに対する抗体で免疫沈降し、共沈してくるタンパク質を電気泳動して、野生型ATF6には結合するが変異型ATF6には結合しないタンパク質を見つけ、質量分析によって同定する。

ATF6内腔領域の2つのシステインをアラニンに置換し、ジスルフィド結合を形成できなくした変異体、およびさらにこれに4アミノ酸変異を導入したATF6を作製している。これにTAPtagを付け、ATF6還元酵素の場合と同様の手法によりエスコートタンパク質を同定する。

上記いずれの方法でも、通常の細胞からエスコートタンパク質を単離するのは難しいと思われる。そこで、ブレフェルジンA処理をして小胞体からゴルジ装置への輸送をブロックした後小胞体ストレスを負荷し、ミクロソーム画分を単離してこれを精製の出発材料とすることで、非特異的結合を減らすと同時にエスコートタンパク質を濃縮することができるかと考えている。

## 2) 応答破綻の影響解析

### (1) ATF6 $\alpha$ とATF6 $\beta$ のダブルノックアウトマウスの解析

$\alpha$ と $\beta$ がダブルでノックアウトされたマウスを得るために交配し、200匹以上の産仔を解析したが、目的の遺伝子型は得られなかった。そこで、交配後出生前に開腹し、胎生期14.5日から徐々に遡って、いつの時点でダブルノックアウトマウスが死ぬのか明らかにし、その原因を探る。

### (2) 脂肪肝形成への影響

ATF6 $\alpha$ ノックアウトマウスの腹腔に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを投与すると、肝臓が白色となり、3~4日で死亡する。野生型およびATF6 $\beta$ ノックアウト

マウスに同様の処置をしても体重は減少するものの回復し、死には至らないので、小胞体ストレス応答の破綻が個体レベルで重篤な影響を与える好例と考えられる。ATF6 $\alpha$ ノックアウトマウスの肝臓を電子顕微鏡で調べると、脂肪滴が多数観察されたことから、非アルコール性脂肪肝炎のよいモデルとなると考えられる。非アルコール性脂肪肝炎は肥満とインスリン抵抗性に起因すると考えられているが、その発症機構には依然不明な点が多く。本発見は小胞体におけるタンパク質の品質管理と脂肪肝との接点という、興味深い新たな攻め口を与えていると考えている。

まず、ツニカマイシン投与後のマウスの血液の生化学的検査を行い、肝機能をチェックする。アポトーシスが起きているかどうか、TUNEL法などを用いて調べる。次いで、LPSを野生型およびATF6 $\alpha$ ノックアウトマウスの腹腔に投与し、両者に差が出るかどうか明らかにすることによって、肝臓の変化が炎症に起因するかどうか、小胞体ストレスに特異的といえるかどうか調べる。

肝臓に脂肪滴が蓄積する原因が、肝臓での脂肪の合成亢進、分解の抑制あるいは肝臓への取り込みの亢進、肝臓からの排出の抑制のいずれであるか明らかにする必要がある。ツニカマイシン投与前後の野生型およびATF6 $\alpha$ ノックアウトマウスの肝臓からmRNAを調製し、マイクロアレイ解析を行って、遺伝子発現状況を調べ、さらにその結果をノーザンブロットやウェスタンブロットで確認することによって原因の絞り込みを行う。

## 4. 研究成果

### 1) 小胞体ストレス感知の分子機構

小胞体ストレス時にATF6を還元する酵素およびゴルジ体へとエスコートするタンパク質を同定するため、ATF6のC末端側内腔領域ATF6(C)にTAPtag付けた融合タンパク質を発現するプラスミドを作製した。これをHEK293細胞やHeLa細胞に導入すると、合成された融合タンパク質は全長型のATF6と同様に、小胞体内へ移行し、糖鎖修飾を受け、ジスルフィド結合を形成してモノマー及びダイマーとして存在し、短い半減期を示した。小胞体ストレス負荷後、この融合タンパク質は還元され、ゴルジ体へと輸送された。この融合タンパク質に結合するタンパク質をスクリーニングしたところ、既存のBiPに加えてCalnexinとPDIが同定され、これらはシャペロン活性によってこの融合タンパク質に結合していると考えられた。以

上の結果から、この融合タンパク質は ATF6 の活性化に関わるタンパク質を単離同定するのに有用なツールとなると結論した。同時に、我々の結果は ATF6 が小胞体ストレスを感知してゴルジ装置へ移行するには膜貫通型タンパク質である必要はなく、内腔領域のみで十分であることを示している。

## 2) 応答破綻の影響解析

### (1) ATF6 $\alpha$ と ATF6 $\beta$ のダブルノックアウトマウスの解析

ダブルノックアウトマウスは胎生期 8.5 日ですで見つからず、IRE1 $\alpha$  や PERK ノックアウトマウスと比較しても、非常に早い時期に胎生致死となることが明らかになった。余りにも早いいため、マウスを用いて胎生致死の原因を究明することは困難であった。

### (2) 脂肪肝形成への影響

腹腔内に小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンを投与すると、野生型マウスの場合、しばらく体重が減少するが、5 日目以降回復した。一方、ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの場合 3 日後に全滅した。開腹すると、ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの肝臓は白色化しており、H&E 染色でも異常が見られた。LPS 投与の場合、野生型とノックアウトマウスで差は見られなかった。ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの肝臓は oil red O でよく染色されることから、脂肪肝となっていると考えられた。実際、肝臓内にトリアシルグリセロールが顕著に蓄積しており、コレステロール量も 2 倍程度増加していた。

この原因を探るためマイクロアレイ解析を行ったところ、脂肪酸の $\beta$ 酸化に関わる酵素の mRNA が低下しており、このためトリアシルグリセロールが蓄積しやすくなっていると考えられた。

さらに、肝臓から中性脂肪を放出する作用を持つ超低密度リポタンパク質の形成に着目した解析を行った。超低密度リポタンパク質の形成に必須の役割を果たす Apolipoprotein B-100 を定量すると、野生型マウスではツニカマイシン投与後一旦減少するもののやがて回復するのに対し、ノックアウトマウスでは減少したままであった。Apolipoprotein B-100 は巨大なタンパク質で、通常時でも折り畳まれにくい、小胞体ストレス時のノックアウトマウスでは、小胞体シャペロンが転写誘導されないため、さらに折り畳まれにくいために減少し、その結果超低密度リポタンパク質が形成されず肝臓に脂肪滴が溜まっていくと考えられた。

また、ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの肝臓

では、脂肪滴形成を促進する ADRP が顕著に転写誘導されていた。

ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの肝臓を電子顕微鏡により観察すると、脂肪滴で埋め尽くされていることがわかった。以上 3 つの複合的な理由により、ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスでは小胞体ストレスにより脂肪肝の形成が促進されていると結論した。我々の結果は小胞体ストレス、脂質代謝、脂肪肝の関連を如実に示すものである。

## 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 5 件)

1. Y. Sato, S. Nadanaka, T. Okada, K. Okawa and K. Mori, Luminal domain of ATF6 alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi apparatus. *Cell Struc. Func.*, 36, 35-47, 2011. 査読有
2. N. Egawa, K. Yamamoto, H. Inoue, R. Hikawa, K. Nishi, K. Mori and R. Takahashi, The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 $\alpha$ , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J. Biol. Chem.*, 286, 7947-7957, 2011. 査読有
3. K. Yamamoto, K. Takahara, S. Oyadomari, T. Okada, T. Sato, A. Harada and K. Mori, Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6 $\alpha$ -knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell*, 21, 2975-2986, 2010. 査読有
4. A. Tanimura, T. Yujiri, Y. Tanaka, M. Hatanaka, N. Mitani, Y. Nakamura, K. Mori and Y. Tanizawa, The anti-apoptotic role of the unfolded protein response in Bcr-Abl-positive leukemia cells. *Leukemia Res.*, 33, 924-928, 2009. 査読有
5. M. Irisawa, J. Inoue, N. Ozawa, K. Mori, and R. Sato, The sterol-sensing ER membrane protein TRC8 hampers ER-to-Golgi transport of SREBP-2/SCAP and reduces SREBP-2 cleavage. *J. Biol. Chem.*, 284, 28995-29004, 2009. 査読有

[学会発表] (計2件)

1. Y. Sato, S. Nadanaka, T. Okada, K. Okawa, K. Mori, "Analysis of mechanism of ATF6 activation in response to ER stress", FASEB summer research conference "Protein Folding in the Cell", Saxtons River, Vermont, USA, July 27, 2010
2. 佐藤吉美, 灘中里美, 岡田徹也, 森和俊, 小胞体膜結合性転写因子 ATF6 活性化機構の解析, 第82回日本生化学大会, 神戸ポートアイランド, 2009年12月8日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[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

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

### (2) 研究分担者

親泊 政一 (OYADOMARI SEIICHI)  
徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授  
研究者番号: 90502534  
(2008年度、2009年度)

原田 彰宏 (HARADA AKIHIRO)  
群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号: 40251441  
(2008年度)

### (3) 連携研究者

南野 哲男 (MINAMINO TETSUO)  
大阪大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 30379234