

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657030

研究課題名（和文）Pichia 酵母等を用いたオルガネラ形態形成機構の解明

研究課題名（英文）Yeast genetic approach for endoplasmic-reticulum morphogenesis

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：小胞体の恒常性が破綻する（小胞体ストレス）と、小胞体小胞体局在膜タンパク質 Ire1 が活性化し、小胞体ストレス応答が引き起こされる。私たちは、小胞体膜局在亜鉛トランスポーター Zrg17 が Ire1 と会合していることを見いだした。Ire1 は Zrg17 をリン酸化する。また、Zrg17 の存在量も Ire1 により制御を受けているようだ。すなわち、Ire1 は Zrg17 に直接的に作用し、サイトゾルから小胞体への亜鉛イオン輸送をコントロールしているのであろう。

研究成果の概要（英文）：Dysfunction of the endoplasmic reticulum (ER), namely ER stress, activates an ER-located transmembrane protein Ire1. In the present study, we have noticed interaction between Ire1 and an ER-located zinc-ion transporter Zrg17 in yeast cells. Zrg17 was highly phosphorylated in IRE1 cells but not in ire1  $\Delta$  cells cultured in ER-stress conditions. We propose that Ire1 activated through zinc deficiency directly phosphorylates and stabilizes Zrg17 for efficient incorporation of zinc ion into the ER.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：酵母、細胞小器官、オルガネラ、小胞体、ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物細胞は、生体膜で被われたさまざまな細胞内区画、すなわちオルガネラを有している。オルガネラはそれぞれ独特の形態を有しており、その形態形成に関わる因子の同定と機能解析は、細胞生物学における重要なトピックとして、近年、急速に研究が進んでいる。一方、オルガネラの形態は静的なものではなく、形態変化やその制御も興味深い

事象だと考えられるが、そのような観点からの研究例はあまり報告されていない。

(2) 小胞体はタンパク質の分泌を司る細胞内小器官である。また、膜脂質構成成分（リン脂質など）の生合成や代謝も、小胞体にて行われる。例えば動物細胞では、分化に伴って小胞体の形態が著しく変化することが知られている。そもそもは生体膜で被われた袋である小胞体は、伸展して細長い円柱状であ

り、それが分岐した網目状の形態であることが多いが、一方、臍細胞や抗体産生細胞などタンパク質分泌が盛んな細胞では扁平な形態であり、さらには、それが多層状に連なり、表面積も体積も著しく増大している。なお、小胞体への過剰な負荷（分泌の亢進）に応じた小胞体の形態変化と伸展は、出芽酵母でも認められる。また、*Saccharomyces cerevisiae* に比べ、近縁種である *Pichia pastoris* はタンパク質分泌が盛んであり、かつ、発達した小胞体を有している。

(3) この小胞体の形態変化が、少なくとも一部は小胞体ストレス応答によるものであることは明白である。小胞体の機能不全は、小胞体ストレスと総称され、それに対する細胞の防衛応答が小胞体ストレス応答である。真核生物全般に保存されている I 型膜貫通タンパク質 Ire1 は、小胞体に局在し、かつ、サイトゾル側ドメインにキナーゼ活性と RNase 活性を併せ持つ。小胞体ストレス応答のトリガーとなる Ire1 の機能に関しては、酵母を用いた研究が中心となって解明が進んできた。すなわち、Ire1 の小胞体内腔ドメインは、変性タンパク質と直接的に相互作用し、これは Ire1 のホモ多量体化へと結びつく。ホモ多量体化した Ire1 は、サイトゾル側のキナーゼ活性依存的に自己リン酸化し、RNase 活性を発揮するようになる。酵母では、この RNase 活性の標的は HAC1 mRNA である。HAC1 mRNA は、通常時にはイントロンが存在しており、タンパク質に翻訳されない。しかし、(小胞体ストレスに応じて) 活性化した Ire1 は HAC1 mRNA をスプライシングにより成熟させ、転写因子タンパク質の生成（成熟型 mRNA の翻訳）へとつながる。そして、小胞体で機能するタンパク質全般の発現が転写レベルで誘導され、小胞体ストレスは解消へと向かう。分泌の亢進も小胞体ストレスとなり、Ire1 を活性化する。また、興味深いことに、タンパク質分泌が盛んであり小胞体が発達しているほ乳動物細胞、そして *Pichia pastoris* では、常に Ire1 が活性化しており、標的 mRNA (*Pichia pastoris* では HAC1 mRNA) がスプライシングされているのである。また、Ire1 遺伝子の破壊により、小胞体形態変化が不全になることも分かっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) を用いて、分泌亢進、そして小胞体ストレスに応じて、小胞体が伸展や形態変化するメカニズムを解明することを目指した。予備的先行研究の結果では、この事象には、Ire1 は寄与するが、HAC1 は無関係なようである。すなわち、Ire1 遺伝子破壊と異なり HAC1 遺伝子破壊では、小胞体形態変化が阻害されないのである。そ

こで、HAC1 非依存的な Ire1 の機能の存在を想定し、それを明白にすることが、研究目的を達成する道筋だと考え、そのことにアプローチするという戦略を採ることとした。

## 3. 研究の方法

HAC1 非依存的な Ire1 の機能を見いだすべく、Ire1 に会合するタンパク質の同定を行った。すなわち、HA エピトープ標識した Ire1 を発現する酵母細胞の粗抽出液を抗 HA エピトープ抗体による免疫沈降に供し、共沈降するタンパク質を LC-MS 解析により同定した。そして、Ire1 とそのタンパク質との関連を、Western blotting や変異体解析を含む多様な手法により検討した。

## 4. 研究成果

本研究ではまず、*Saccharomyces cerevisiae* 細胞における Ire1 会合タンパク質として、Zrg17 を同定した。Ire1 と Zrg17 の会合は、小胞体ストレスの有無により変化しない。なお、Zrg17 は小胞体膜局在亜鉛イオントランスポーターであり、サイトゾルから小胞体へ亜鉛イオンを運搬する役割を担うことが報告されている。

そこで本研究では次に、Zrg17 と Ire1 との関連を検討した。まず、Zrg17 の細胞内存在量に対する Ire1 の寄与を明らかにすべく、細胞粗抽出液をウエスタンブロッティング解析に供した (Zrg17 は Myc エピトープにより標識されている)。その結果、通常条件で培養したときには (Synthetic dextrose 培地)、野生型細胞と Ire1 遺伝子欠損細胞の間で Zrg17 の発現量に違いは見られなかったが、一方、亜鉛欠乏培地での培養時には、野生型細胞でのみ顕著に Zrg17 の誘導が認められた。両者の細胞で Zrg17 mRNA 量には差が認められなかったことから、Ire1 は Zrg17 の安定化に寄与していると考えられる。

恒常的活性化型 Ire1 変異体は、高い Zrg17 安定化効果を示した。また、Phostag 含有ゲルでの電気泳動解析から、Zrg17 は Ire1 依存的にリン酸化されることも明らかとなった。亜鉛欠乏は小胞体ストレスを誘起することが知られており、その結果として活性化した Ire1 が Zrg17 を安定化し、小胞体への亜鉛イオンの取り込みが促されるというモデルが考えられる。この現象により小胞体内腔の亜鉛イオン濃度が保たれ、小胞体の恒常性は維持されるのであろう。Ire1 による Zrg17 の安定化は他の小胞体ストレスでも認められ、すなわち、小胞体の亜鉛イオン取り込みは、亜鉛欠乏時に限らない小胞体ストレス応答の一環であると言えよう。

## 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7件)

1. Nguyen TSL, Kohno K, Kimata Y “Zinc depletion activates the endoplasmic reticulum-stress sensor Ire1 via pleiotropic mechanisms.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 印刷中(掲載確定), 2013年, 査読有

2. Ishiwata-Kimata Y, Promlek T, Kohno K, Kimata Y “BiP-bound and nonclustered mode of Ire1 evokes a weak but sustained unfolded protein response.” *Genes Cells*, Vol. 18, 288-301, 2013年, 査読有

3. Promlek T, Ishiwata-Kimata Y, Shido M, Sakuramoto M, Kohno K, Kimata Y “Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum-stress sensor Ire1 by different manners.” *Mol. Biol. Cell*, Vol. 22, 3520-3532, 2011年, 査読有

4. Yanagitani K, Kimata Y, Kadokura H, Kohno K “Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1 mRNA.” *Science* Vol. 331, 586-589, 2011年, 査読有

5. Oikawa D, Kimata Y “Experimental approaches for elucidation of stress-sensing mechanisms of the Ire1 family proteins.” *Methods Enzymol.* Vol. 490, 195-216, 2011年, 査読無

6. Kimata Y, Kohno K “Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells” *Curr. Opin. Cell. Biol.* Vol. 23, 135-142, 2011年, 査読有

7. Yamamoto YH, Kimura T, Momohara S, Takeuchi M, Tani T, Kimata Y, Kadokura H, Kohno K “A novel ER J-protein DNAJB12 accelerates ER-associated degradation of membrane proteins including CFTR.” *Cell Struct. Funct.* Vol. 35, 107-116, 2010年, 査読有

[学会発表] (計14件)

1. 宮川賢一、河野 憲二、木俣 行雄 「エタノールによる出芽酵母の小胞体ストレス応答」 日本農芸化学会 2013年度大会、2013年3月27日、仙台

2. 堂道京子、Nguyen Sy Le Thanh、堤智明、河野憲二、木俣行雄 「小胞体ストレスセン

サーIre1による亜鉛トランスポーターZrg17の直接的制御」 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡

3. Nuyen SLT, Dodo K, Tsutsumi T, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K, Kimata Y “Direct regulation of a zinc-ion transporter Zrg17 by the ER-stress sensor Ire1.” *EMBO Conference Series “The physiology of the endoplasmic reticulum (ER): Function and dysfunction”* 2012年10月16日、スペイン(ジローナ)

4. 堂道京子、堤智明、Nguyen Sy Le Thanh、河野憲二、木俣行雄 「小胞体ストレスセンサーIre1による亜鉛トランスポーターZrg17の直接的制御」 酵母遺伝学フォーラム第45回研究報告会、2012年9月4日、宇治

5. Kimata Y “Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum-stress sensor Ire1 by different manners.” *Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology: Symposium “Frontiers in intracellular transport and organelle biology”*, 2012年5月29日、神戸

6. Kimata Y “Unfolded-protein recognition by Ire1 upon endoplasmic-reticulum stress.” *The 2nd International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences* 2011年7月19日、インドネシア(ジョグジャカルタ)

7. 滝沢健、木俣有紀、河野憲二、木俣行雄 「小胞体ストレスセンサーIre1の集合メカニズム」 *BMB2010*、2010年12月9日、神戸

8. 平岡雄一郎、宗像丈夫、中村大祐、河野憲二、木俣行雄 「哺乳動物IRE1 $\alpha$ の高次ホモ多量体化」 *BMB2010*、2010年12月9日、神戸

9. 木俣行雄 「Unfolded Protein Responseとは何か？」 第179回酵母細胞研究会、2010年12月3日、東京

10. Kimata-Ishiwata Y, Shido M, Kohno K, Kimata Y “New activation modes of the endoplasmic reticulum-stress sensor Ire1.” *The 3rd International Symposium on Protein Community*、2010年9月14日、奈良

11. Promlek T, Kimata Y, Kohno

K “Unfolded-protein interaction with stress sensor Ire1.” The 3rd International Symposium on Protein Community、2010年9月14日、奈良

12. 木俣有紀、Thanyarat Promlek、河野憲二、木俣行雄 「いかなるストレスが Unfolded Protein Response を引き起こすのか？」 酵母遺伝学フォーラム第43回研究報告会、2010年9月9日、奈良

13. 滝沢健、木俣有紀、河野憲二、木俣行雄 「小胞体ストレスセンサーIre1 分子同士の出会いは偶然では無い？」 酵母遺伝学フォーラム第43回研究報告会、2010年9月10日、奈良

14. Kimata Y “The unfolded protein response not by unfolded proteins.” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Molecular Chaperones and Stress response” 2010年5月5日、アメリカ合衆国（ニューヨーク）

[その他]

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/kouno/kouno.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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