

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15278

研究課題名（和文）IRE1による多次元小胞体ストレス感知メカニズムの解明

研究課題名（英文）Multidimensional endoplasmic reticulum stress sensing by IRE1

研究代表者

松崎 元紀（MATSUSAKI, Motonori）

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号：90817040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体では、インスリン、免疫グロブリンなどの分泌タンパク質が、生体のニーズに合わせて酸化的フォールディングと呼ばれる複雑な過程を経て作られている。フォールディングは様々な環境の摂動に影響されて失敗することがあり、小胞体ストレスの原因となる。細胞が小胞体ストレスの多寡や性質によって応答を臨機応変に調節する仕組みは、がんや糖尿病と言った様々な疾患の発症および進展で重要だが、不明な点が多かった。本研究により、小胞体ストレス応答機構の中心的な制御因子であるIRE1が、小胞体ストレスの量と質を感知して内腔ドメインの多量体形成の度合いを変えするという分子機構で、細胞応答を調節していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレス応答（UPR）の制御破綻は、がん、糖尿病、アルツハイマー病、パーキンソン病など様々な疾患の発症および進展と関連するため、IRE1によるUPR制御の分子機構は盛んに議論されてきたが、IRE1内腔ドメインの会合状態が様々なストレス因子の存在下でどのように変化するかは不明だった。本研究では、内腔ドメインの会合状態を定量的に分析し、ストレス依存的な内腔ドメインの多量体化動態を示し、UPR制御機構の分子レベルの理解が進んだ。今後、IRE1内腔ドメインの多量体形成について薬剂的制御が可能になれば、UPR制御の破綻が関連する様々な疾患の新たな治療戦略確立の端緒となり得る。

研究成果の概要（英文）：In the endoplasmic reticulum (ER), insulin, immunoglobulins, and other secreted proteins are made to meet the needs of the organism through a complex process called oxidative folding. Folding can fail under the influence of various environmental perturbations, leading to ER stress. The underlying processes by which cells flexibly modulate their responses depending on the degree and type of ER stress play a key role in the onset and progression of several diseases, including cancer and diabetes, but remain unknown. This work proposes that IRE1, a key regulator of the ER stress response, regulates cell responses by detecting and evaluating the quantity and quality of ER stress through the dynamic oligomer formation with its luminal domain.

研究分野：生化学

キーワード：小胞体ストレス応答 ジスルフィド結合 ミスフォールドタンパク質 小胞体ストレスセンサー

1. 研究開始当初の背景

小胞体では、インスリン、免疫グロブリンなどの分泌タンパク質が、生体のニーズに合わせて大量にあるいは急激に作られるが (Kanemura et al., *Int J Mol Sci*, 2020)、これらの分泌タンパク質はジスルフィド結合形成と共役した複雑なタンパク質フォールディングをうける (Matsusaki et al., *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2020)。このような小胞体におけるタンパク質フォールディングは、レドックスバランス、金属イオン濃度、タンパク質輸送、熱などの様々な摂動に影響されることで、ときに失敗、すなわちミスフォールディングを起こし、小胞体ストレスを生じる (Bergmann et al., *J Biol Chem*, 2018; Park et al., *Cells*, 2018)。哺乳動物細胞ではこのような小胞体ストレスの除去、抑制などを行う小胞体ストレス応答 (UPR) 機構が存在し、UPR の主要な制御因子として、小胞体ストレスセンサー Inositol Requiring Enzyme 1 alpha (IRE1 α) が知られている。IRE1 α による UPR 制御の破綻は、糖尿病、神経変性疾患、癌などとの関連が指摘されているため、重要な創薬標的として期待されているが、その詳細な分子機構は未解明の部分が多い。

I 型膜タンパク質である IRE1 α の役割について、その内腔ドメインで摂動の結果として生じるミスフォールドタンパク質の蓄積 (凝集体形成) を間接的かつ一次元的に感知し、二量体化することで活性化 UPR シグナリングを行うという仮説が提唱されてきた (Hetz et al., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020)。しかし、近年では主に細胞生物学的アプローチにより、二量体よりさらに大きな多量体形成や、ジスルフィド結合がその活性化制御に関わることなどが相次いで報告され (Karagöz et al., *eLife*, 2017; Eletto et al., *Mol Cell*, 2014)、ストレス感知における会合や、ジスルフィド結合の役割が従来の二量体化仮説と一見して矛盾を生じていた。すなわち、IRE1 α は本当に「二量体化」を契機としてシグナリングを行っているのか、ストレスとして感知している実体は何かといった分子機構の詳細が、既存の仮説で説明しきれないことが明らかとなってきた。このような背景から、IRE1 α が、何をどのように感知しているか、また複数の因子を感知する場合、それらの間にどのような相互作用が生じるかが、IRE1 α による UPR 制御の分子機構解明において、喫緊の課題となっていた。

2. 研究の目的

研究代表者は、ClearNative-PAGE (CN-PAGE)、Dot far-Western blot 等を組み合わせたタンパク質多量体の新たな統合的分析法を開発し (Tanikawa et al., *Molecules*, 2021)、IRE1 α が四量体を越える大きな多量体を形成しうることを明らかにしつつある (Matsusaki et al., 投稿準備中)。本研究では、IRE1 α のストレス感知に重要な「多量体形成」というイベントが、IRE1 α の発現量、タンパク質のミスフォールディング量、小胞体のレドックスバランス摂動といった多元的な因子の「量」や「質」の違いとどのように関わるかを観測し、IRE1 α による UPR 制御機構解明を目指した。

3. 研究の方法

IRE1 α 内腔ドメインは、リコンビナントタンパク質として大腸菌発現系を用いて調製した。動的光散乱 (DLS)、サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱 (SEC-MALS)、CN-PAGE 等を用いて平均粒子径、平均分子量などを観測し、IRE1 α 濃度、分子間ジスルフィド結合の有無、ミスフォールドタンパク質の有無などがどのように会合状態を変化させるかを解析した。試験管内で観測された会合状態変化に基づき、培養細胞における IRE1 α 一過性発現系を用いて、細胞内の多量体形成に介入し、IRE1 α リン酸化レベルを指標として、IRE1 α 内腔ドメインの多量体形成に起因する細胞質ドメインの活性化制御についても検討した。

4. 研究成果

(1) 試験管内における様々な会合状態制御因子に対する IRE1 α 内腔ドメイン多量体の会合状態変化の解析

- ① IRE1 α 内腔ドメインのリコンビナントタンパク質を、大腸菌発現系で大量培養し、アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにより純化した。その際、分子間ジスルフィド結合を内腔ドメイン二つに対して一つ含む酸化型 IRE1 α 内腔ドメイン (IRE1_{LD} Ox)、および、内腔ドメインの三つのシステイン残基を全てセリン残基に置換することで、全くジスルフィド結合を含まない還元型 IRE1 α 内腔ドメイン mimic (IRE1_{LD} noCys) をそれぞれ調製した。
- ② IRE1 α 濃度および分子間ジスルフィド結合の有無と平均分子量の増減を検討するため、DLS 法で内腔ドメインの会合状態を分析した (図 A)。対照実験である BSA では濃度を変えても粒子径は変化しなかった。一方で、IRE1_{LD} noCys は濃度を増大させると平均粒子径も増大した。さらに、IRE1_{LD} Ox は、同じ濃度でも常に IRE1_{LD} noCys より大きな粒子が観測された。これらの結果は多量体形成の度合いが、IRE1 α 濃度および分子間ジスルフィド結合の有無で変化することを示唆している。
- ③ 同様に、SEC-MALS 法で内腔ドメインの溶出ピーク位置分析および分子量推定を行っ

た。SEC-MALS においても、濃度依存的な IRE1_{LD}noCys の溶出ピーク位置および分子量の変化が見られた (図 B)。加えて、IRE1_{LD}Ox では、より大きな推定分子量が観測されるだけでなく、高濃度の試料では高分子量側にもう一つのピークが出現した (図 C)。これらの結果は、内腔ドメインの濃度と分子間ジスルフィド結合が相乗的により大きな多量体形成を促すことを示唆している。

- ④ インスリンをモデル凝集タンパク質として用い、凝集体存在下の会合状態変化を CN-PAGE で分離したところ、凝集体濃度に応じて、凝集体と内腔ドメインの会合、および内腔ドメイン同士の更なる会合が検出され、内腔ドメインの多量体形成の度合いが、ミスフォールドタンパク質の有無で変化することが示唆された。

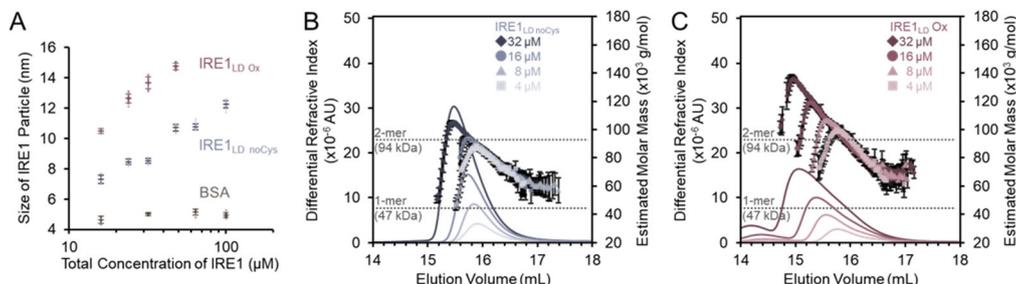


図 DLS および SEC-MALS を用いた会合状態の分析

(2) 培養細胞における IRE1 α 内腔ドメインの多量体形成に起因する活性化制御の検討

- ① (1)から、IRE1 α の濃度、分子間ジスルフィド結合、ミスフォールドタンパク質の濃度が IRE1 α 内腔ドメインの多量体形成を促進することが分かった。そこで、細胞内で多量体形成が IRE1 α による UPR シグナル制御を起こすかを確認するため、トランスフェクションにより培養細胞で IRE1 α を一過性発現させ、ストレス非依存的に IRE1 α の濃度を上昇させた際のリン酸化 IRE1 α 量を WB で定量した。その結果、細胞内の IRE1 α の濃度が高いほどリン酸化 IRE1 α 量が増加することがわかった。

以上の結果から、IRE1 α 内腔ドメインは、IRE1 α の発現量、タンパク質のミスフォールディング量、小胞体のレッドスバランス摂動を多角的に感知して、多量体形成を起こすことで、小胞体ストレスの「量」や「質」を、UPR シグナル制御に反映していることが示唆された (Matsusaki et al., 投稿準備中)。

これまで、細胞が小胞体ストレスの多寡によって応答を臨機応変に調節する仕組みは不明な点が多かった。本研究の成果により、UPR の中心的な制御因子である IRE1 α が、内腔ドメインの多量体形成の度合いを変えるという分子機構で、細胞応答の臨機応変を生み出していることが示唆された。今後、IRE1 α 内腔ドメインの多量体形成について薬剤的制御が可能になれば、UPR 制御の破綻が関連する様々な疾患の新たな治療戦略基盤となり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松崎元紀、金村進吾、齋尾智英、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーIRE1による活性酸素種の直接的感知と分子シャペロンによるその制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2024度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松崎元紀、奥村正樹
2. 発表標題 多量体分析で解き明かす小胞体ストレスセンサーが細胞応答を量的に調節する仕組み
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松崎元紀、横山武司、次田篤史、金村進吾、田尻道子、明石知子、野井健太郎、齋尾智英、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーIRE1 によるストレス感知と越膜シグナル変換の分子機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松崎元紀、横山武司、次田篤史、金村進吾、田尻道子、明石知子、野井健太郎、齋尾智英、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーIRE1の多量体形成ポテンシャルとストレス感知
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motonori Matsusaki
2. 発表標題 Orchestrated oligomeric interaction in the endoplasmic reticulum stress response
3. 学会等名 Molecular Ensemble Seminar #01 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松崎元紀、齋尾智英
2. 発表標題 PAGEを基盤とした抗原抗体反応における会合状態分布の解析
3. 学会等名 第24回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松崎元紀, 横山武司, 次田篤史, 金村進吾, 田尻道子, 明石知子, 野井健太郎, 齋尾智英, 稲葉謙次, 奥村正樹
2. 発表標題 IRE1による定量的小胞体ストレスセンシングの分子機構
3. 学会等名 第15回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松崎元紀, 横山武司, 次田篤史, 金村進吾, 田尻道子, 明石知子, 齋尾智英, 稲葉謙次, 奥村正樹
2. 発表標題 IRE1の会合状態変化によるストレスレベル感知機構の研究
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------