

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370081

研究課題名(和文) 膜脂質の異常による小胞体ストレスとその感知メカニズム

研究課題名(英文) Evocation of the ER stress response by lipid aberrancy

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体は分泌タンパク質の折り畳みや膜脂質の生合成を司るオルガネラである。小胞体の機能不全は小胞体ストレスと呼ばれ、従来は分泌タンパク質が折り畳み不全を来し、構造異常タンパク質として小胞体内腔に蓄積する状態であると考えられてきた。小胞体ストレスに応じて小胞体を構成するタンパク質全般の発現量が上昇し、小胞体ストレスが緩和されるという現象が知られている。これが小胞体ストレス応答である。本研究では、膜脂質の恒常性破綻も小胞体ストレスセンサータンパク質Ire1を活性化することを明らかにし、また、Ire1遺伝子変異細胞やIre1会合タンパク質の解析により、そのメカニズムに迫ることができた。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER) is a cellular compartment in which secretory proteins are folded and membrane lipids are metabolized. ER stress, namely dysfunction of the ER, has been believed to be caused by impaired protein folding in the ER, which leads to formation of toxic aggregates of denatured proteins. ER stress activates the ER-located transmembrane protein Ire1, which evokes the unfolded protein response (UPR) to protect cells against ER stress. In the present study, we addressed how membrane-lipid aberrancy activates Ire1 and evokes the UPR. In budding yeast cells, mutant Ire1 which cannot recognize unfolded proteins was normally activated by disturbance of membrane-lipid homeostasis. Also through analysis of proteins which are associated with Ire1 in yeast cells, we could establish a molecular model which explains activation of Ire1 by membrane-lipid aberrancy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 オルガネラ 酵母 ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物細胞は生体膜で囲われた多彩な細胞内区画すなわちオルガネラを有している。小胞体は扁平あるいは筒状の形態をしており、その実態は一層の生体膜で覆われた袋である。小胞体の第一の機能は、分泌タンパク質の折りたたみである。サイトゾルから小胞体膜に付着したりボゾームから、トランスロコンを通じてタンパク質が小胞体内腔へと運び込まれる。そしてタンパク質は BiP など小胞体内在性タンパク質の補助により折り畳まれ、正しく折り畳まれたタンパク質のみが輸送小胞に詰め込まれてゴルジ体へと運ばれる。

細胞が置かれた状況の悪化により、小胞体におけるタンパク質の折り畳みに不全を来すと、折り畳み不全タンパク質が小胞体内腔に蓄積し、タンパク質凝集体が形成される。重金属やある種の薬剤はタンパク質の折り畳みを阻害し、また、分泌タンパク質の過剰発現によって折り畳み不全タンパク質が蓄積することも知られている。折り畳み不全タンパク質凝集体は、他の正常なタンパク質も巻き込んでその機能を阻害することから、生体にとって極めて有害である。

そこで真核生物はこの危機的状況、すなわち小胞体ストレスを回避するため、小胞体ストレス応答を引き起こす。小胞体ストレス応答では、小胞体への折り畳み不全タンパク質の蓄積に伴って、センサータンパク質が活性化し、小胞体分子シャペロンを含む小胞体タンパク質の発現が転写レベルで誘導される。Ire1 は真核生物全般に保存された小胞体膜貫通 I 型膜タンパク質であり、センサータンパク質として機能する。Ire1 の小胞体内腔ドメインには構造異常タンパク質を直接的に認識できる部位が存在しており、その部位と構造異常タンパク質の相互作用により Ire1 は活性化すると考えられている。

なお、活性化した Ire1 は RNase として機能し、酵母では HAC1、動物では XBP1 と呼ばれる転写タンパク質をコードする mRNA をスプライシングにより成熟させ、前述の遺伝子発現誘導へと結びつくことが知られている。動物には Ire1 の他にも、Ire1 ファミリータンパク質である PERK、そして II 型膜貫通タンパク質である ATF6 が小胞体ストレスセンサーとして機能することが分かっている。

## 2. 研究の目的

小胞体は前項で記したような分泌系タンパク質折り畳みの場であるだけでなく、膜脂質の生合成の場でもある。近年、膜脂質の恒常性破綻に起因する小胞体ストレス応答が注目されている。ヒトでは高脂血症を含む脂質異常が小胞体ストレス応答を引き起こし、過剰な小胞体ストレスが引き起こすアポトーシスがさまざまな疾患の誘因になることが知られている。例えば、糖尿病におけるラ

ンゲルハンス島  $\beta$  細胞の壊死などである。また、出芽酵母においては、どのような遺伝子の破壊により小胞体ストレス応答が惹起するかが網羅的に調べられており、その結果、小胞体分子シャペロンや構造異常タンパク質の処理に関わるタンパク質の遺伝子だけでなく、膜脂質の生合成酵素や運搬因子の遺伝子の欠損も、広範囲に Ire1 を活性化して HAC1 mRNA をスプライシングに導くことが明らかとなった。

しかし一方で、膜脂質の恒常性破綻が Ire1 の活性化や小胞体ストレス応答の惹起に結びつくメカニズムは解明されていない。膜脂質異常は何らかの原因により小胞体内腔に構造異常タンパク質を生み出し、それが Ire1 など小胞体ストレスセンサーに感知されるのであろうか？あるいは、膜脂質異常はダイレクトに小胞体ストレスセンサーに感知されるのだろうか？本研究ではこれらの疑問にアプローチし、膜脂質異常が小胞体ストレス応答を惹起するメカニズムを解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究ではまず、出芽酵母にて Ire1 遺伝子変異体の表現型を精査するために、S288C 系の Ire1 遺伝子欠損株を用いた。そこに ARS/CEN 系プラスミドを用い、Ire1 遺伝子(野生型もしくは変異型)を導入した。そして、さまざまなストレスに応じた Ire1 変異体の活性化を、HAC1 mRNA のスプライシングの程度により評価した。なお、HAC1 mRNA スプライシングは、HAC1 遺伝子コーディング部位をプライマーとする RT-PCR によりアッセイ(定量化)することができる。

また、Ire1 のクラスター化については、HA エピトープ標識付き Ire1 遺伝子発現細胞の抗 HA 抗体免疫染色のほか、Ire1 と GFP の融合タンパク質を酵母細胞内で発現させ、その蛍光観察も進めた。Ire1 以外の遺伝子の破壊株については EUROSCARF から購入し、Ire1 遺伝子破壊株との交配を行った。

また、Ire1 に会合するタンパク質を検出・同定する目的で、HA 標識した Ire1 を発現する酵母細胞から細胞抽出液を調製し、それを抗 HA 抗体によるアフィニティー精製に供し、共精製されるタンパク質を液体クロマトグラフマスマスペクトルにて同定した。なお、同定されたタンパク質もエピトープ標識し、ストレスに応じた増減や Ire1 との会合度を調べるためにはウェスタンブロット解析を行った。

## 4. 研究成果

本研究ではまず、Ire1 の小胞体ドメインを欠き構造異常タンパク質との会合能を失った Ire1 変異体遺伝子を作製し、それを出芽酵母に発現させた。その変異型 Ire1 株は、小胞体でのタンパク質折り畳みを阻害するストレス(変異型分泌タンパク質遺伝子の

量発現)では小胞体ストレス応答を惹起しなかったのに対し、飽和脂肪酸を培地に加えるなどにより脂質のホメオスタシスに変動をもたらした場合は、野生型 Ire1 株と同様の小胞体ストレス応答をもたらした。この知見は、脂質の恒常性破綻は小胞体への変性タンパク質蓄積蓄積とは無関係に Ire1 を活性化させることを示している。

また我々は、小胞体内腔ドメインを完全に欠く Ire1 変異体も作製した (bZIP-Ire1)。bZIP-Ire1 には小胞体へのトランスロケーションシグナルと膜貫通領域が残存しているため、bZIP-Ire1 は野生型 Ire1 と同じくタイプ I 膜貫通タンパク質として小胞体膜に局在する。また、bZIP-Ire1 は核内転写因子タンパク質由来の bZIP 配列が融合されているので、authentic な小胞体内腔ドメインを欠くにも関わらず、野生型 Ire1 と同じくホモ会合してクラスター化することができる。そして我々は、膜脂質の恒常性破綻をもたらすストレス全般によって、bZIP-Ire1 が活性化することを見いだした。そのストレスには、培地への飽和脂肪酸添加に加え、膜脂質の生合成酵素や運搬因子遺伝子の欠損も含まれる。よって我々は、膜脂質の恒常性破綻は Ire1 のサイトゾル側ドメインにより感知されると考えている。

そこで次に我々は、Ire1 サイトゾル側ドメインがストレスを感知する機構を解明することを目指し、新規な Ire1 結合タンパク質の検索を試みた。イノシトール欠乏により膜脂質ストレス状態になり Ire1 が活性化している酵母細胞 (Ire1 には HA エピトープが付加されている) から細胞抽出液を調製し、抗 HA エピトープ抗体による免疫沈降により Ire1 会合タンパク質を取得し、次いで、LC-MS/MS 法により、その Ire1 会合タンパク質の同定を行った。

第一に同定された Ire1 会合タンパク質は、ミオシンタンパク質 Myc2 である。小胞体ストレスに応じて、Ire1 と Myc2 の会合度は増大した。アクチン線維を破壊する薬剤であるラトランクリン A の存在により Ire1 のクラスター化と活性化が抑えられることなどから、Ire1 はアクチン線維に導かれて(乗って)クラスター化して活性化すると考えられる。この考えを裏付ける知見として、Ire1 クラスターとアクチン線維が共局在する画像が得られている。

第二に同定されたのが、小胞体膜局在タンパク質 Rtn1 である。膜脂質ストレスを細胞に与えると、Rtn1 と Ire1 は解離する。Rtn1 の過剰発現は Ire1 の活性化を抑え、逆に Ire1 遺伝子の破壊は非ストレス時にでも Ire1 が恒常的に活性化する傾向が認められた。すなわち、Rtn1 は Ire1 の負の制御因子であり、膜ストレスにより Rtn1 による Ire1 の抑制が解除されると考えられる。

なお、本研究においては、同様の知見が動物細胞でも得られるかどうかについても、検

討を進めた。そして我々は、小胞体ストレスに応じたミオシン関連タンパク質と動物 Ire1 $\beta$ との会合を見いだすことができた。

## 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 Mathuranyanon R, Tsukamoto T, Takeuchi A, Ishiwata-Kimata Y, Tuchiya Y, Kohno K, Kimata Y

“Tight regulation of the unfolded protein sensor Ire1 by its intramolecularly antagonizing subdomain” J. Cell Sci. 印刷中, 2015 年 査読有 doi: 10.1242/jcs.164111

② Miyagawa K, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K, Kimata Y

“Ethanol stress impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and activates Ire1 in *Saccharomyces cerevisiae*.” Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 78, 1389-1391, 2014 年 査読有 doi: 10.1080/09168451.2014.921561

③ Nguyen TSL, Kohno K, Kimata Y

“Zinc depletion activates the endoplasmic reticulum-stress sensor Ire1 via pleiotropic mechanisms.” Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 77, 1337-1339, 2013 年 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748779>

④ 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 doi: 10.1111/gtc.12035

⑤ Ishiwata-Kimata Y, Yamamoto YH, Takizawa K, Kohno K, Kimata Y

“F-actin and a type-II myosin are required for efficient clustering of the ER stress sensor Ire1.” Cell Struct. Funct. Vol. 38, 135-143, 2013 年 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666407>

[学会発表] (計 9 件)

① Yukio Kimata, Kenji Kohno

“Fine regulation of the endoplasmic reticulum-stress sensor Ire1 under various cellular situations” 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15 日～2014 年

10月18日国立京都国際会館(京都府京都市)

② 木俣有紀、小口能里枝、木俣行雄  
「ミトコンドリアの機能不全は Unfolded Protein Response にどのように関わるか？」  
酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会  
2014年9月1日～2014年9月3日東京大学  
(東京都文京区)

③ 木俣有紀、河野憲二、木俣行雄  
「出芽酵母における小胞体ストレスセンサー Ire1 の機能と制御」第66回日本細胞生物学会大会  
2014年6月11日～2014年6月13日奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

④ 塚本知子、Rubwad Mathuranyanon、河野憲二、木俣行雄  
「N末端天然変性領域による小胞体ストレスセンサー Ire1 の厳密な制御」第36回日本分子生物学会大会  
2013年12月3日～2013年12月6日神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

⑤ 宮川賢一、河野憲二、木俣行雄  
「出芽酵母でのエタノール誘発性小胞体ストレスと防衛応答」第36回日本分子生物学会大会  
2013年12月3日～2013年12月6日神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

⑥ 小口能里枝、木俣有紀、河野憲二、木俣行雄  
「小胞体ストレスセンサー Ire1 の活性調節とストレス感知：サイトゾル側ドメインの関与」第36回日本分子生物学会大会  
2013年12月3日～2013年12月6日神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

⑦ Yukio Kimata  
“The ER stress sensor Ire1 phosphorylates and stabilizes the ion transporter Zrg17 to enable proper zinc distribution in yeast cells” Gordon Research Conference  
“Stress Proteins in Growth, Development & Disease” 2013年7月7日～2013年7月21日 Mount Snow Resort (USA)

⑧ Rubwad Mathuranyanon, Kenji Kohno, Yukio Kimata  
“Regulation of the ER stress sensor Ire1 by its N-terminal intrinsically disordered region” 第65回日本細胞生物学会大会  
2013年6月19日～2013年6月21日 ウィンク愛知(愛知県名古屋市)

⑨ Rubwad Mathuranyanon, Kenji Kohno, Yukio Kimata  
“The distinct roles of IRE1 paralogues in mammalian secretory cells” FASEB meeting  
“From Unfolded Proteins in the ER to Disease” 2013年6月16日～2013年6月21日

日 Saxon River (USA)  
〔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://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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者  
河野 憲二 (KOHNO, Kenji)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授  
研究者番号: 50142005