

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892018

研究課題名(和文) 酵母における新規な小胞体ストレス回避メカニズム

研究課題名(英文) The novel mechanism of avoidance of ER stress in yeast

研究代表者

木俣 有紀 (Kimata, Yuki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：10706261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物は小胞体の機能不全に応じて小胞体ストレス応答を引き起こす。従来は小胞体への構造異常タンパク質の蓄積に起因すると考えられてきた小胞体ストレスであるが、近年の研究により、脂質の恒常性破綻や細胞内呼吸の異常など、さまざまな原因があることが分かってきた。よって、小胞体ストレスセンサーの活性制御システムも、これまで考えられてきた以上に多彩なはずである。そこで本研究では、小胞体ストレスセンサーIre1がミトコンドリアの機能不全に対してどのように活性が変化するかについて、出芽酵母を題材としてアプローチした。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic cells cumulatively evoke the endoplasmic reticulum (ER)-stress response or the unfolded protein response (UPR). Cellular stress causing the UPR has been believed to accompany accumulation of unfolded proteins in the ER. In consistent to this idea, ER stress sensors including the ER-located type-I transmembrane protein Ire1 is activated through ER accumulation of unfolded proteins. However, recent studies revealed that membrane-lipid abnormalities and/or disturbance of intracellular respiration also cause ER stress which initiates the UPR. In the present study, I have addressed modulation of Ire1's activity by mitochondrial dysfunction in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. Namely, Ire1 gets insensitive to weak ER stress in cells lacking normal mitochondrial function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス応答 Ire1 出芽酵母

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体はあらゆる真核生物で保存されている細胞小器官である。その役割の一つに分泌タンパク質の折り畳みが挙げられる。新規に合成された分泌タンパク質は、小胞体内でジスルフィド結合形成や糖鎖付加などの修飾を受け、高次構造を形成する。その他にも小胞体は膜脂質の生合成やカルシウムの貯蔵などの役割を担う。小胞体の機能不全は小胞体内腔への構造異常タンパク質蓄積などを伴い、細胞にとって障害となる(小胞体ストレス)。細胞は小胞体ストレスへの防衛機構として小胞体ストレス応答(Unfolded Protein Response; UPR)を引き起こす。

小胞体膜上のタンパク質が小胞体ストレスセンサーとして小胞体内の構造異常タンパク質蓄積を察知することにより、UPRは惹起される。出芽酵母は小胞体ストレスセンサーとしてIre1を有する。Ire1は真核生物全般に保存されている型膜タンパク質であり、サイトゾル側にRNaseドメインとKinaseドメインを併せ持つ。また、小胞体内腔ドメインには密に折りたたまれた領域(Core Stress Sensing Region (CSSR))が存在しているのに加え、膜貫通ドメイン直前は天然変性状態にある(サブ領域V)。

非ストレス状態ではIre1には、サブ領域に分子シャペロンであるBiPが結合しており、ホモ会合と活性を抑制していると考えられる。小胞体ストレス状態になるとIre1からBiPが解離し、Ire1はオリゴマー化(クラスター化)する。Credle等によるX線結晶構造解析により、CSSRはダイマー状態で構造異常タンパク質を捕捉できる溝を形成すると考えられている。小胞体内に蓄積した構造異常タンパク質とCSSRの直接的な相互作用は、Ire1の自己リン酸化へとつながり、次いで、KinaseドメインへのADPの配位を経てIre1はRNaseとして活性化される。出芽酵母では、RNaseとして活性化したIre1はHAC1 mRNAのスプライシングを行う。

成熟型HAC1 mRNAの翻訳により生じたHAC1タンパク質は転写因子として機能し、小胞体内在性分子シャペロンや膜脂質生合成酵素など小胞体の機能に関わるタンパク質全般を転写レベルで発現誘導し、小胞体ストレスを緩和へと向かわせると考えられている。

## 2. 研究の目的

一方で、本段落で例示するように、これ以外のIre1活性制御メカニズムの存在も想定される。出芽酵母Ire1は、CSSRの部分欠失変異(変異)によって、構造異常タンパク質捕捉能が不全を来すことが分かっている。よって、N結合型糖鎖付加阻害剤ツニカマイシンやジスルフィド結合開裂剤DTTなど、タンパク質の折り畳み不全を来す薬剤の培地への添加によって小胞体ストレスを惹起すると、野生型Ire1は強く活性するが、変異型Ire1は弱くしか活性化しない。

しかし、ストレスがかかる時間が長くなると、変異型Ire1も強い活性を示すようになる。また、膜脂質構成成分であるイノシトールの欠損を含む膜脂質の不全により、野生型Ire1と変異型Ire1は同程度に活性化する。すなわち、CSSRによる構造異常タンパク質認識以外にも、Ire1を活性化するメカニズムが存在するはずなのである。Ire1とは無関係の二量体化ペプチド(出芽酵母核転写因子タンパク質Gcn4由来のベーシックロイジンジッパー配列;bZIP)にて小胞体内腔ドメインを置き換えたIre1キメラ体も、小胞体ストレスに応じて活性化される。この知見は、従来考えられてきたものとは異なるメカニズム、すなわちサイトゾル側の関与によってもIre1が活性化することを示唆していると考えられる。

ミトコンドリアは真核生物共有の細胞内小器官であり、酸化的リン酸化によって効率的にATPを合成する。多くの真核生物細胞において、小胞体とミトコンドリアが近接していることが観察されている。そして、ミトコンドリアと小胞体は、Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達や脂質の交換などを行っている。さらに近年、海外の複数の研究グループにより、小胞体とミトコンドリアを連結するタンパク質複合体が報告されている。例えば、これら二つの細胞内小器官を連結するタンパク質の一つであるmitofusin2は、小胞体とミトコンドリアの接触面に豊富に存在し、ミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>取り込み効率を制御しているとも言われている。

よって本研究では、サイトゾル側におけるIre1活性制御機構において、何らかの様式でミトコンドリアが寄与している可能性を考え、そのことにアプローチすることを目指した。

## 3. 研究の方法

定法に基づき、出芽酵母株の培養をSD培地あるいはSC培地にて30で行った。RNAの抽出にはホットフェノール法を用い、HAC1 mRNAのスプライシングの程度の判定には、当該mRNAをRT-PCRにて増幅し、その産物のサイズをアガロースゲル電気泳動により検討した。

## 4. 研究成果

ミトコンドリアに局在するタンパク質のほとんどは核ゲノムにコードされているが、ミトコンドリアは独自のゲノムも有し、電子伝達系に関わるタンパク質などがコードされている。よって、ミトコンドリアゲノム欠損(rho<sup>0</sup>変異)によって、電子伝達系は駆動しなくなり、酸化的リン酸化によるATP産生も不能となる。しかし、出芽酵母は発酵(解糖系)によってエネルギーを得ることも可能であるため、グルコースを炭素源とする培地では、rho<sup>0</sup>株も良好に増殖する。そこで本研究では、ミトコンドリアがUPRにどのように

寄与するのかを調べるため、rho<sup>+</sup>株とrho<sup>0</sup>株におけるIre1活性化(HAC1 mRNA スプライシング)を比較した。

本研究ではまず、野生型菌株としてBY4681を用い(rho<sup>+</sup>)、細胞をエチジウムブロマイド処理することによりrho<sup>0</sup>株を得た。そして私は、グルコースを炭素源とする培地(SC培地)にてこれらの菌株を対数増殖させ、次いで、10mM DTTの添加(30分間)あるいはイノシトール欠乏にてストレスを与えた。そして細胞を集め、総RNAを抽出し、HAC1 mRNAを標的としたRT-PCRに供した。次いで、RT-PCR産物をアガロース電気泳動した後に、そのゲルをエチジウムブロマイド染色した。非ストレス条件ではHAC1 mRNAはほとんど非スプライシング型(HAC1<sup>u</sup>)であるのに対し、ストレスによりスプライシング反応が進み、スプライシング型(HAC1<sup>s</sup>)が生じていることが観察された。そのデータを定量化して、HAC1 mRNAのスプライシングの程度を算出したところ、10mM DTTではrho<sup>+</sup>株とrho<sup>0</sup>株は同程度にHAC1 mRNAのスプライシングが進んだのに対し、イノシトール欠乏によるHAC1 mRNA スプライシングは、rho<sup>0</sup>変異による減弱が認められた。

次いで私は、低濃度のDTTを培地に添加した時の、HAC1 mRNA スプライシングを検討した。3mM DTTを30分間添加すると、rho<sup>+</sup>株とrho<sup>0</sup>株ともに約80%のHAC1 mRNAがスプライシングされていることが確認できる。しかし、1mM DTTを30分間添加した場合、rho<sup>+</sup>株では約65%のHAC1 mRNAがスプライシングされているのに対し、rho<sup>0</sup>株では約35%と低くなっていた。

なお、SC培地ではrho<sup>+</sup>株とrho<sup>0</sup>株の間で増殖速度はほとんど同じであり、よって、HAC1 mRNA スプライシング効率の差は増殖能の差には起因しないと考えられる。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に分類される出芽酵母の実験室菌株は、由来(自然界から分離された場所や年代)が異なるものがいくつも存在している。ちなみに、BY4681株はS288C株由来である。よって次に、それとは由来が異なる菌株でも、同様の知見を得られるかどうか検討した。用いたのは、IRE1 遺伝子を欠くW303由来菌株(W303ire1; rho<sup>+</sup>)とSEY6210由来菌株(KMY1516; rho<sup>+</sup>)、および、それらをエチジウムブロマイド存在下で培養することによりミトコンドリアゲノムを欠失させた菌株のそれぞれに、シングルコピープラスミドにてIRE1 遺伝子を導入した(pRS313-IRE1)形質転換体である。それらを1mM DTT30分間という条件でストレスを与えた後に、HAC1 mRNA スプライシングを定量した。その結果、W303由来株でもSEY6210由来株でも、rho<sup>0</sup>変異によりHAC1 mRNA スプライシングが減弱することが分かった。

自家蛍光が弱くGFP蛍光の観察が容易であること、および、1NM-PP1によるIre1 L745G変異のレスキューがきちんと認められることから、今後の実験では主として、W303由来

IRE1 遺伝子破壊株(W303ire1 株(rho<sup>+</sup>))およびそのrho<sup>0</sup>変異体を用いることにした。次の実験では、それらにシングルコピープラスミドにてIRE1 遺伝子を導入し、1mM DTTでストレスを与えた場合の、HAC1 mRNA スプライシングの経時変化を調べた。これまでの実験(30分間のDTT処理)で認められていたrho<sup>+</sup>株とrho<sup>0</sup>株の間のHAC1 mRNA スプライシングの程度の差は、ストレス処理の時間を60分間に延ばすことによって、さらに顕著となった。

次の実験では、さまざまな濃度のツニカマイシンを培地に添加し、それによるHAC1 mRNA スプライシングを評価した。低濃度のツニカマイシンが添加された場合に、rho<sup>0</sup>変異によるHAC1 mRNA スプライシングの減弱が認められた。

次の実験では、C末端にHAエピトープ標識を付加したIRE1 遺伝子(IRE1-HA)を有するシングルコピープラスミドをW303由来IRE1 遺伝子破壊株(W303ire1 株(rho<sup>+</sup>))およびそのrho<sup>0</sup>変異体に導入した。そして、SC培地にて培養後に細胞抽出液を調製し、抗HAエピトープ抗体によるWestern blot解析に供した。シングルコピープラスミドからIre1-HAを発現させた場合、W303ire1 株(rho<sup>+</sup>)もそのrho<sup>0</sup>変異体も、その位置にほとんど同じ濃さのバンドが認められた。よって、rho<sup>0</sup>変異によりIre1の発現量あるいは安定性にほとんど変化は生じないと考えられる。

ここまで述べた研究により、rho<sup>0</sup>株は比較的弱い小胞体ストレスへのIre1の応答性を低下させることが示された。では、rho<sup>0</sup>変異はIre1活性化のどのステップに影響するのだろうか?この疑問に答えるため、サイトゾル側ドメインにGFPが挿入されたIre1(Ire1-GFP)発現プラスミドをW303由来IRE1 遺伝子破壊株(W303ire1 株(rho<sup>+</sup>))やそのrho<sup>0</sup>変異体に導入し、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、rho<sup>+</sup>株、rho<sup>0</sup>株ともに非ストレス条件下ではIre1-GFPは小胞体全体に広がって存在し(小胞体の形態そのものがGFP蛍光として認められる)、一方、10mM DTTの培地への添加時には点状の分布、つまりクラスター化した状態で存在していることが示された。1mM DTT添加時においても、ほとんどのIre1-GFPはクラスターとして存在しており、その程度はrho<sup>+</sup>株とrho<sup>0</sup>株の間で差は認められなかった。

Ire1は自己リン酸化とキナーゼ領域へのADPの配位を経て、RNaseとしての活性を示す。Ire1サイトゾル側ドメインで起こるこれらの事象とrho<sup>0</sup>変異との関係にアプローチするため、キナーゼドメインに点変異が導入されたL745G変異型Ire1を用いた解析を行った。L745G変異型Ire1は自己リン酸化もADPの配位も出来ず、UPRを惹起する能力を欠く。しかし、L745G変異型Ire1を有するW303由来株の培養液にADPアナログである1-NM-PP1を添加すると、小胞体ストレス時に

HAC1 mRNA がスプライシングされ、UPR が惹起される。これは L745G 変異型 Ire1 に 1-NM-PP1 が配位し、自己リン酸化および ADP 配位が起こったのと同様の構造変化が起きるためであると考えられる。

そこで私の研究では、W303 由来 IRE1 遺伝子破壊株(W303ire1 株(rho<sup>+</sup>))あるいはその rho<sup>0</sup> 変異体に、野生型 IRE1 遺伝子あるいは L745G 変異型 IRE1 遺伝子を有するシングルコピープラスミド (pRS313-IRE1 あるいは pRS313-IRE1-L745G) を導入し、1 mM DTT にて 30 分間のストレスを与えた後の HAC1 mRNA スプライシングを定量した。野生型 IRE1 株は 1-NM-PP1 の有無で HAC1 mRNA スプライシング効率に変化は無く、また、これまでのデータと同じく、rho<sup>0</sup> 変異により HAC1 mRNA のスプライシングは減弱した。一方、L745G 変異型 Ire1 は 1-NM-PP1 存在時のみ活性化した。そして、1mM DTT および 1-NM-PP1 存在下の L745G 変異型 Ire1 の活性は、rho<sup>+</sup> 株と rho<sup>0</sup> 株との間で差は認められなかった。すなわち、Ire1 のリン酸化が必要のない条件にすると、UPR 減弱における rho<sup>0</sup> 変異の効果は認められなくなるのである。

#### 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4件) 査読有

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

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  
10.1080/09168451.2014.921561.

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 (5-year impact factor 2.855)  
10.1111/gtc.12035.

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

<http://doi.org/10.1247/csf.12033>

[学会発表](計3件)

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)

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)

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)

[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 有紀 (KIMATA, Yuki)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員  
研究者番号：10706261

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者