

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450408

研究課題名(和文) ERストレスにおけるタンパク輸送抑制へのrER膜局在三量体Gタンパクの関与

研究課題名(英文) Involvement of rER localized trimeric G protein in inhibitory regulation of protein transport in ER stress

研究代表者

中川 博史 (Nakagawa, Hiroshi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：60336807

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)：ERストレス時に、ERからGolgi装置へのタンパク輸送が制御されることは予想されていたが、その調節機構は不明であった。本研究ではrER膜局在三量体Gi2タンパクが、ERからGolgi装置へのタンパク輸送は制御することから、ERストレス応答への関与を調べた。

三量体Gi2タンパクのノックダウンにより、ERストレスは抑制された。PERKは活性化されていたが、下流のCHOPは活性化されていなかった。またATF6の活性化は抑制されていた。この結果はERストレス応答へのrER膜局在三量体Gタンパクの関与を示し、アポトーシスを調節する新たなターゲットの発見につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although it was expected that existence of ER to Golgi protein transport regulatory system in ER stress induced cells, regulation of ER to Golgi protein transport remained unclear. Since rER membrane localized trimeric Gi2 protein regulated ER to Golgi protein transport, we examined relationship between ER stress responses and rER membrane localized trimeric G protein. Knockdown of trimeric Gi2 protein suppressed ER stress. Although PERK was activated in ER stress, knockdown of trimeric Gi2 protein inhibited CHOP activation, downstream signal molecule of PERK. Furthermore, knockdown of Gi2 protein inhibited ATF6 activation. This results suggests that rER membrane localized trimeric G protein involves in ER stress response. Thus, we conclude that rER membrane localized trimeric G protein is a new target of apoptosis regulation.

研究分野：トキシコロジー

キーワード：ERストレス 細胞内小胞輸送 アポトーシス 三量体Gタンパク

### 1. 研究開始当初の背景

rER はタンパクの合成の場であり、順次合成されたタンパクは Coat Complex II coated vesicle (COPII 小胞)により、さらなる修飾を受けるために Golgi 装置へと輸送されていく。rER において折りたたみ不良等を伴う異常タンパクが産生された場合、GRP78 タンパク等の感知機構によって、細胞内輸送が抑制されると同時に、分子シャペロン産生が促進され、異常タンパクの構造の修復が速やかに行われる。この一連の応答を Unfolded Protein Response (UPR)と呼び、細胞生存のための保護機構と考えられている。一方、異常タンパクの蓄積が多く、UPR による対処が不可能となった場合、プログラム性細胞死が起こり(ER ストレス由来アポトーシス)、細胞は死に至る。多くの組織障害の原因となることから、ER ストレス由来アポトーシスの実行機構・制御機構の解明が必要とされている。

UPR から ER ストレス由来アポトーシス実行に至るシグナル伝達過程については多くの知見が得られている。一方で同時に調節される細胞内輸送に至るシグナル伝達については、詳細は不明なままである。

rER から Golgi 装置に向かうタンパク輸送小胞：COPII 小胞は ER 膜上に COPIIcoat タンパクと呼ばれる小胞 coat タンパク群が集積することにより、ER 膜が湾曲し輸送小胞が出芽し、切り離され Golgi に移動していくことにより開始される。COPIIcoat タンパクの集積は、先ず細胞質に局在する small G タンパクである Sar1 が GTP 結合活性型となり ER 膜へ移動することにより始まる。申請者はラット肝組織由来細胞質画分とラット腎由来株化細胞 NRK cell から分画したミクロソーム膜画分を組み合わせた Cell free 系での Sar1 の rER 膜への移動を評価する実験系を作出した(ミクロソーム結合実験)。申請者はこれまでの研究で、rER 膜に三量体 G タンパクが存在すること、およびそのサブクラスは Gi2であることを示してきた。さらに三量体 Gi タンパク活性化ペプチド mastoparan-7 を rER 膜に処置することにより Sar1 の rER 膜への移動が抑制されることを明らかにした。しかし rER 膜局在三量体 G タンパクの活性化が、何によって引き起こされているか、そしてこの調節機構の存在意義については不明なままであった。

これまで、異常タンパクの感知機構と UPR 発現そして ER ストレス由来アポトーシスへの実行過程におけるシグナル伝達については、数多くの知見が報告されているが、異常タンパクの感知機構と rER からのタンパク輸送停止調節の間を繋ぐシグナル伝達については、全く触れられていなかった。そのような中、ER ストレスが COPII 小胞輸送を特異的に抑制する初めての報告が 2013 年になされた。この報告で明らかにされたことは、COPII 小胞輸送が ER ストレスにより抑制されたという事象の結果だけであり、そこに至

るシグナル伝達や制御機構については、未だ不明なままであった。

### 2. 研究の目的

そこで申請者らは、ER ストレス時に COPII 小胞輸送が抑制されるのかどうかについての確認を行い、制御機構を探ることとした。本研究では存在意義が不明であった ER 膜局在三量体 G タンパクによる COPII 小胞輸送制御機構がその役割を果たすのではないかと考え、ER 膜局在三量体 G タンパクと UPR による COPII 小胞輸送抑制の関連を解析する目的で、以下の項目について検討を行った。

(1) ER ストレス時に見られるタンパク小胞輸送阻害制御に、rER 膜局在三量体 G タンパクが関与しているかを調べ、UPR 感知機構が rER 膜局在三量体 G タンパクを介して COPII 輸送小胞形成制御に関わるかについて調べることにした。

(2) また、ER ストレス発現時における rER 膜局在三量体 G タンパクの有無による UPR への影響を解析することにより、UPR 発現・制御機構の解明の一助とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ER ストレス誘導時に COPII 小胞形成の抑制が起こることを、NRK 細胞を用いた評価系において確認した。また COPII 小胞輸送の抑制性制御の作用機構については、申請者が作出した Cell free の Sar1 移動評価系を用いて検討を行った。作用点については Sar1 だけでなく、次のステップである Sec23/24 複合体、そして更に次のステップである Sec13/31 複合体の移動についても検討を行い、どのステップにおいて COPII 小胞コート形成が抑制されているのかについて調べた。

(2) 次に COPII 小胞形成の抑制が rER 膜局在三量体 Gi2 タンパク依存であることを証明するために、三量体 Gi2 $\alpha$  タンパクを百日咳毒素事前処置によりあらかじめブロックさせ、ER ストレスにより COPII 小胞形成抑制が阻害されるかを検討した。この実験についても、Sar1 だけでなく Sec23/24 複合体、そして Sec13/31 複合体の移動について検討を行い、UPR による COPII 小胞形成過程への作用点について調べた。

(3) rER 膜局在三量体 G タンパクと UPR 感知機構である GRP78 タンパクの結合親和性を調べ、両者の結合親和性が ER ストレスの有無・程度の違いによって、変動を起こすかについて検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) BrefeldinA 処置により Golgi 装置の cis-Golgi 領域は断片化し拡散し、ER と癒合する。BrefeldinA 除去と同時に拡散していた cis-Golgi 領域構成タンパク群は COPII 小胞

輸送により Golgi へと輸送され、Golgi 装置は再構成される。この現象を利用し COPII 小胞輸送を評価する Golgi 回復実験を用い、ER ストレス条件化における COPII 小胞輸送量の解析を行った。Tunicamycin 処置 NRK 細胞を用いて Golgi 回復実験を行った結果、無処置細胞に比べ、Golgi 装置の回復が遅延しており、ER ストレス条件化において COPII 小胞輸送は抑制されていることが示された。

(2) ER ストレス下での COPII 小胞輸送が抑制されていたことから、COPII 小胞形成過程への ER ストレスの影響の解析を行った。ER 膜上で COPII 小胞を形成するためには、細胞質から ER 膜上へと (i) Sar1、(ii) Sec23/24、(iii) Sec13/31 の COPII コート構成タンパクが順次移動する必要がある。そこで ER 膜と細胞質からなる cell free 実験系 (ミクロソーム結合実験) を用いて、細胞質から ER 膜への COPII コート構成タンパクの移動を観察した。抗ラット Sar1 抗体は市販されているものに適切なものが存在せず、自作を行った。過去に作成し保有しているラット Sar1b 全長発現プラスミドより、抗原蛋白を得、抗ラット Sar1 ウサギポリクローナル抗体を作成した。細胞質局在 Sar1 タンパクの正常細胞由来の ER 膜への移動を、tunicamycin および thapsigargin により ER ストレスを誘導した細胞由来の ER 膜への移動と比較したところ、正常細胞と ER ストレス細胞の ER 膜への Sar1 の親和性に違いは認められなかった。加えて Sec23/24 複合体および Sec13/31 複合体の移動に関しても、同様の結果が得られた。以上より ER ストレスにより COPII 小胞輸送は抑制されるが、ER 膜上での COPII 小胞形成過程における COPII コートタンパクの結合親和性の変化によるものではないことが明らかとなった。

ER ストレスにおける COPII 小胞形成への ER 膜局在三量体 Gi2 タンパクの関与の証明については、百日咳毒素により三量体 Gi2 タンパクを不活化した ER 膜を用いて上述のミクロソーム結合実験を行ったが、百日咳毒素による ER 膜への事前処置の間に ER 膜へダメージが起きたと考えられ、有効な結果が得られなかった。その為、研究計画を一部変更し siRNA 法による三量体 Gi2 タンパクノックダウン細胞の作出を試みた。ミクロソーム結合実験に用いたが、統計上有意な結果を得られなかった。よって本手法では COPII 小胞形成過程への rER 膜局在三量体 Gi2 タンパクの関与を証明することはできなかった。

(3) もう一方の研究計画の項目である ER ストレスにおける COPII 小胞形成への ER 膜局在三量体 Gi2 タンパクの関与の証明を試みた。Gi2 ノックアウト細胞の作出は間に合わず、siRNA 法による三量体 Gi2 タンパクノックダウン細胞を用いて解析を行った。ノッ

クダウン条件検討を行い、siRNA による Gi2 タンパクの発現レベルを 20%程度に抑制した細胞の作出に成功し、tunicamycin 処置による ER ストレス誘導を行った結果、ER ストレスマーカーである GRP78 発現の有意な抑制が観察された (図 1)。

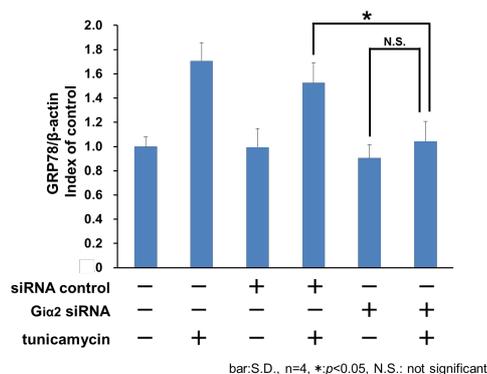


図 1 .ER ストレスマーカー GRP78 発現に対する三量体 Gi2α タンパクノックダウンの影響

Tunicamycin 処置で見られる GRP78 発現の増加が Gi2α ノックダウンにより消失している。

ER ストレスセンサー経路には PERK、IRE1、ATF6 の 3 つのレセプターによる 3 系列のシグナリングがあるが、その中で ATF6 の活性化は Gi2 ノックダウンにより抑制された。一方他の ER ストレスセンサーである PERK 経路について、興味深い結果が得られたので以下に期する。PERK の下流の eIF2α 活性化は、Gi2 ノックダウンの影響を受けずに活性化は維持されていた (図 2)。

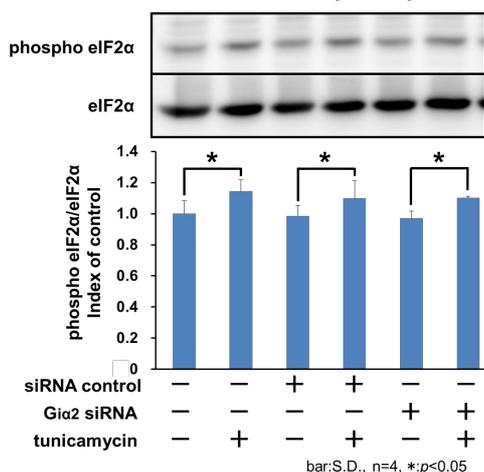
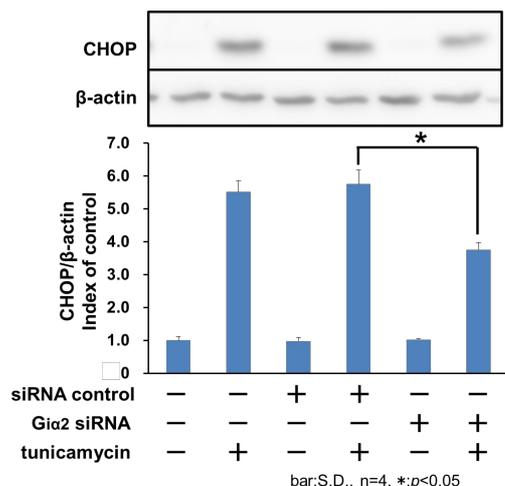


図 2 . eIF2α 活性化に対する三量体 Gi2α タンパクノックダウンの影響

Tunicamycin 処置で見られる eIF2α リン酸化による活性化の増加は Gi2α ノックダウンの影響を受けていない。

PERK、eIF2α へとシグナリングが活性化され ER ストレス由来アポトーシスが実行される場合、eIF2α の下流のシグナリング因子として CHOP の発現が誘導される。CHOP

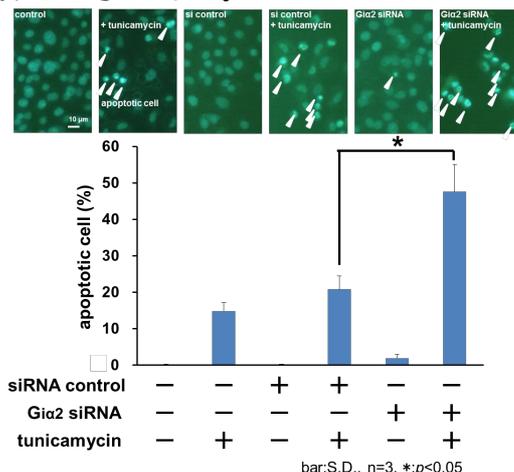
発現を調べたところ、tunicamycin 処置による ER ストレスで見られる CHOP 発現誘導が Gi2 ノックダウンにより抑制されていることが明らかとなった (図 3)。



**図 3 . CHOP 発現に対する三量体 Gi2 $\alpha$  タンパクノックダウンの影響**

Tunicamycin 処置で見られる CHOP タンパク発現誘導が、Gi2 $\alpha$  ノックダウンにより抑制された。

一方 CHOP タンパクの発現が抑制されたものの、apoptosis 誘導自体は増加していた (図 4)。この事象は他に報告が見られず、CHOP 経路を介さない ER ストレス由来アポトーシス発現経路が作用したことを示唆しているが、詳細は不明であり、今後の検討を要すると考えられる。



**図 4 . apoptosis 発現に対する三量体 Gi2 $\alpha$  タンパクノックダウンの影響**

Tunicamycin 処置で見られる apoptosis 発現誘導が、Gi2 $\alpha$  ノックダウンにより抑制されることがなく、より増加した。

PERK 経路が活性化されていたにも関わらず CHOP 発現が抑制されたことは、ATF6 活性化が抑制された結果と考えられることから、ER 膜局在三量体 Gi2 タンパクを介した COPII 小胞輸送の調節が、ER ストレス応答に必要であることが示唆された。

(4) GRP78 タンパクと ER 膜局在三量体 Gi2 タンパクの相互関係についても検討を行った。共焦点レーザー顕微鏡による GRP78 と Gi2 の共局在の観察について、ER ストレスの有無により変化が見られなかった。加えて免疫沈降法による両タンパクの結合親和性についても検討を行ったが、ER ストレスの有無に影響は受けず、新しい知見を得ることは出来なかった。

以上より、ER 膜局在三量体 Gi2 タンパクが直接作用する点を明らかにすることが出来なかったが、本研究により、ER ストレス応答に ER 膜局在三量体 Gi2 タンパクを介した COPII 小胞輸送制御が必要であることが示され、細胞生存のためのストレス応答システムの一端が明らかとなったと考えられる。

## 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)

Iwasaki N, Sugiyama Y, Miyazaki S, Nakagawa H, Nishimura K, Matsuo S. An ATF4-Signal-Modulating Machine Other Than GADD34 Acts in ATF4-to-CHOP Signaling to Block CHOP Expression in ER-Stress-Related Autophagy. *J Cell Biochem*. 査読有, 116(7):1300-9, 2015. doi: 10.1002/jcb.25085.

Murakami K, Nakagawa H, Nishimura K, Matsuo S. Changes in peptidergic fiber density in the synovium of mice with collagenase-induced acute arthritis. *Can J Physiol Pharmacol*. 査読有, 93(6):435-41, 2015. doi: 10.1139/cjpp-2014-0446.

Nishimura K, Katuyama H, Nakagawa H, Matsuo S. Stimulating Effect of Ethanol on Erythropoietin Production in the Liver Cells. 査読有, *J Metabolic Syndr*. 4:164, 2014. doi:10.4172/2167-0943.1000164.

Nishimura K, Tokida M, Katsuyama H, Nakagawa H, Matsuo S. The effect of hemin-induced oxidative stress on erythropoietin production in HepG2 cells. *Cell Biol Int*. 査読有, 38(11):1321-9, 2014. doi: 10.1002/cbin.10329.

[学会発表](計 2 3 件)

中川博史, 小森雅之, 西村和彦. 三量体 Gi2 タンパクの rER-Golgi 間輸送および ER ストレス由来 apoptosis への影響 第 159 回日本獣医学会, 2016 年 9 月 6 日、日本大学(神奈川県・藤沢市)

西村和彦, 松本理沙, 中川博史. HepG2細胞におけるケルセチンによる細胞保護作用とエリスロポエチン産生との関係 第 159 回日本獣医学会、2016 年 9 月 6 日、日本大学(神奈川県・藤沢市)  
後藤啓介, 西村和彦, 中川博史. 低酸素下での HepG2 細胞におけるエリスロポエチン産生とオートファジー誘導の関係 第 159 回日本獣医学会、2016 年 9 月 6 日、日本大学(神奈川県・藤沢市)  
松田拳翔, 西村和彦, 中川博史. グルコース飢餓が HepG2 細胞のエリスロポエチン産生に及ぼす影響 第 159 回日本獣医学会、2016 年 9 月 6 日、日本大学(神奈川県・藤沢市)  
野間夏実, 中川博史, 西村和彦. HepG2 細胞におけるエクソソーム分泌調節機構の解 第 159 回日本獣医学会、2016 年 9 月 6 日、日本大学(神奈川県・藤沢市)  
中川博史, 裕一樹, 小森雅之, 西村和彦. PLD 阻害によるアポトーシスへの ER ストレスの関与 第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月 29 日、ウインクあいち(愛知県・名古屋市)  
西村和彦, 松本理沙, 中川博史. ケルセチンが HepG2 細胞のエリスロポエチン産生とアポトーシス誘導に及ぼす影響 第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月 29 日、ウインクあいち(愛知県・名古屋市)  
松田拳翔, 平林愛里沙, 西村和彦, 中川博史. グルコース飢餓が HepG2 細胞のエリスロポエチン産生に及ぼす影響 第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月 29 日、ウインクあいち(愛知県・名古屋市)  
後藤啓介, 西村和彦, 中川博史. 低酸素下での HepG2 細胞の細胞保護作用におけるエリスロポエチン産生とオートファジー誘導の関係 第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月 29 日、ウインクあいち(愛知県・名古屋市)  
中川博史, 裕一樹, 石田勝政, 小森雅之, 松尾三郎, 西村和彦. rER-Golgi 間輸送小胞形成への PLD1 および PLD2 の関与の検討 第 158 回日本獣医学会、2015 年 9 月 7 日、北里大学(青森県・十和田市)  
志田原一葉, 中川博史, 松尾三郎, 西村和彦. COP11 小胞輸送調節における casein kinase II の役割 第 158 回日本獣医学会、2015 年 9 月 7 日、北里大学(青森県・十和田市)  
平林愛里沙, 平岡真弘, 勝山英明, 中川博史, 松尾三郎, 西村和彦. HepG2 細胞におけるピルビン酸のエリスロポエチン産生促進作用 第 158 回日本獣医学会、2015 年 9 月 7 日、北里大学(青森県・十和田市)

松本理沙, 中川博史, 松尾三郎, 西村和彦. ケルセチンによるエリスロポエチン産生促進とアポトーシス誘導 第 158 回日本獣医学会、2015 年 9 月 7 日、北里大学(青森県・十和田市)  
中川博史, 石田勝政, 大竹潤, 裕一樹, 志田原一葉, 西村和彦, 松尾三郎. シスゴルジマーカーを用いた細胞内小胞輸送評価系 第 42 回日本毒性学会学術年会、2015 年 6 月 29 日、石川県立音楽堂(石川県・金沢市)  
松尾三郎, 中川博史, 西村和彦. ストレスに対する細胞防御反応: autophagy と apoptosis の誘導調節 第 42 回日本毒性学会学術年会、2015 年 6 月 29 日、石川県立音楽堂(石川県・金沢市)  
西村和彦, 米澤祐樹, 中川博史, 松尾三郎. HepG2 細胞のエリスロポエチン産生抑制によるシスプラチンの抗ガン作用の増強 第 42 回日本毒性学会学術年会、2015 年 6 月 29 日、石川県立音楽堂(石川県・金沢市)  
中川博史, 小森雅之, 西村和彦, 松尾三郎. rER-Golgi 間タンパク輸送小胞形成に rER 膜と  $\gamma$ -tubulin の結合が関与する 第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、北海道大学(北海道・札幌市)  
裕一樹, 中川博史, 西村和彦, 松尾三郎. COP11 小胞輸送に關与するホスホリパーゼ D (PLD) アイソフォームの検討 第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、北海道大学(北海道・札幌市)  
西村和彦, 勝山英明, 平岡真弘, 中川博史, 松尾三郎. ソルビトールおよび乳酸添加が HepG2 細胞のエリスロポエチン産生に及ぼす影響 第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、北海道大学(北海道・札幌市)  
杉山慶樹, 松尾三郎, 中川博史, 西村和彦. autophagy 活性化に伴う eIF2 -ATF4-CHOP 経路における CHOP 発現の抑制調節について 第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、北海道大学(北海道・札幌市)  
21 米澤祐紀, 西村和彦, 中川博史, 松尾三郎. HepG2 細胞が産生するエリスロポエチンによる細胞保護作用 第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、北海道大学(北海道・札幌市)  
22 岩崎登, 杉山慶樹, 中川博史, 西村和彦, 松尾三郎. ストレス刺激に対して細胞が選ぶ autophagy と apoptosis の選択過程における eIF2 -ATF4 経路と GADD34 の役割 第 42 回日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月 2 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)  
23 西村和彦, 平岡真弘, 勝山英明, 中川博史, 松尾三郎. HepG2 細胞におけるエリスロポエチン産生に対するソルビトールおよび乳酸添加の影響 第 42 回日

本毒性学会学術年会、2014年7月2日、  
神戸コンベンションセンター(兵庫県・  
神戸市)

〔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.vet.osakafu-u.ac.jp/toxi/tox.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 博史 (NAKAGAWA, Hiroshi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：60336807