

博士論文番号:0381201

小胞体ストレスによって活性化する
オートファジーシグナルの解析

緒方 麻衣子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座

(塩坂 貞夫 教授)

平成 18 年 10 月 27 日提出

序論

小胞体は細胞の生存に欠かせない細胞内小器官のひとつである。小胞体膜に局在するリボソームにおいて、核からの DNA 情報を鋳型として、特定の配列を持ったアミノ酸の列が作られ、次に小胞体内腔においてそのアミノ酸が折り畳まれ、正しい立体構造を持ったタンパク質が作られる。そのタンパク質は、ゴルジ体を通じたのち、細胞膜や他の細胞内小器官へと輸送される。

多くの細胞内外からのストレスによって、小胞体内での折り畳みが正常に行われなくなることがよく知られている。その結果、間違って折り畳まれた、あるいは折り畳まれなかったミスフォールドタンパク質が生まれ、それらは小胞体からゴルジ体に移動することができず、小胞体内にとどまり、蓄積する。この状態を小胞体ストレスと呼ぶ (Ron, 2002)。

小胞体ストレス状態になると、小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response: UPR) が引き起こされ、小胞体ストレスを緩和するための様々な細胞内シグナルが活性化する。タンパク質の折り畳みを促進する、Bip/GRP78 に代表される分子シャペロンの発現誘導、タンパク質をこれ以上作らせないようにするための翻訳抑制、異常タンパク質を細胞質ゾルに引き出して、プロテアソームで分解する系 (ER-associated degradation: ERAD) の活性化、などがその主なものである。小胞体ストレスが強く、長く続き、上に記したような UPR の系で細胞を正常な状態に回復できない場合には、アポトーシスシグナルが活性化し、最終的に細胞は死に至ることがよく知られている (図 1A; Kaufman, 2002; Mori, 2000)。

近年、小胞体ストレスと UPR が様々な疾病に関与していることが明らかになってきた。アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病といった神経変性疾患も、その一つである。アルツハイマー病においては、原因分子の一つであるプレセニリン 1 変異体を発現する細胞において、UPR の抑制が観察された (Katayama et al., 1999) 。また、アミロイド β 蛋白は小胞体ストレスを介して細胞死を引き起こすことが、小胞体に局在し、小胞体ストレスによって活性化されるカス

ペース 12 の研究を通じて示された (Nakagawa et al., 2000) 。 パーキンソン病においては、原因遺伝子の一つであるパーキンが UPR の一部として機能しており、その変異が発症に結びつくことが示された (Imai et al., 2001) 。

一方で、最近になり、それらの神経変性疾患を含む様々な疾病の病態病理において、「オートファジー」と呼ばれる経路の活性化が報告されるようになってきた。オートファジーとは、細胞内のバルク分解を担う系で、近年ユビキチン・プロテアソーム系に次ぐ第二の細胞内分解系と目されている。オートファジーは、アミノ酸飢餓状態やラパマイシンを始めとする様々な細胞内外の刺激によって活性化し、オートファゴソームと呼ばれる二重膜を持った構造体が細胞質に出現して、細胞内小器官や長寿命タンパク質を含む細胞質を非特異的に分解すると考えられている (Dunn, 1994; Klionsky and Ohsumi, 1999) 。 オートファゴソームの形成過程は、まず単膜の隔離膜が細胞質内に出現し(その形態からしばしば「柿の種状」と称される)、分解対象物を抱き込みながら伸長し、その端同士が融合することによって二重膜のオートファゴソームとなる。オートファゴソームは次いでリソソームと結合し、オートリソソームとなり、その内容物は、オートファゴソームの内膜とともにリソソーム内の酵素によって分解される (図 1B; Levine and Klionsky, 2004)。オートファゴソーム膜上に局在する分子については、図 1B に示したように、まず ATG5/ATG12 は複合体としてオートファゴソーム形成初期の隔離膜に局在し、オートファゴソームの形成に伴い、膜から外れることが知られている。ATG5 はオートファジーの活性化に必須であることが報告されている分子であり、そのノックアウト細胞はオートファジー不全株となることがよく知られている (Kuma et al., 2004; Mizushima et al., 2001) 。 次に、LC3 は、酵母におけるオートファジー活性化に必須の分子 Apg8/Aut7p のホモログであり、哺乳類においてもオートファゴソームに局在することが知られている。LC3 は、通常の状態では非活性化状態の LC3-I として細胞質全体に存在するが、オートファジーが活性化すると、プロセッシングを受け、脂質であるホスファチジルエタノールアミンの結合を受けて、活性化型の LC3-II となり、オートファゴソーム膜に局在する。LC3 は、ATG5/ATG12 とは異なり、オート

ファゴソーム形成の途中で膜から外れることがないので、オートファゴソームならびにオートリソソームのマーカーとして用いられている (Kabeya et al., 2000; Kabeya et al., 2004) 。 オートファジーについての研究は近年めざましく進歩しており、様々な疾病において、その細胞内病理像ではオートファゴソームが多数観察されるとの報告が相次いでいる。しかし、その疾病との関与にはまだ不明な部分も多い (Nixon, 2006) 。

私は、神経変性疾患において、小胞体ストレスとオートファジーというこれら二つのシグナル伝達経路が何らかの関連性を持っているのではないかと考えた。そこで、本研究では、まず始めに電子顕微鏡を用いた観察によって、小胞体ストレス下にある細胞の形態変化を観察した。すると、小胞体ストレス時に、細胞内にオートファゴソームが多数出現するという知見が得られたため、さらにそのシグナル伝達のメカニズムについての解析を行ったので、ここに報告する。

材料と方法

試薬と抗体

GFP-LC3 発現ベクターは、吉森 保 博士(国立遺伝学研究所)より譲渡された。IRE1 α -KA 発現ベクターは、浦野 文彦 博士 (University of Massachusetts Medical School) より譲渡された。細胞は Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して発現ベクターをトランスフェクションした。小胞体ストレスを負荷するには、細胞をツニカマイシン (Tm; Sigma, St. Louis, MO) またはサブシガルギン (TG; Alomone Laboratories Ltd., Jerusalem, Israel) で刺激した。アミノ酸飢餓を誘発するには、細胞の培養液を Hanks' balanced salt solution (Invitrogen) に置換した。オートファジー阻害剤 3-methyladenine (3-MA) は Sigma より購入した。JNK 阻害剤 SP600125、ラパマイシン、リソソームインヒビター E64d は Calbiochem (San Diego, CA) より購入した。ウエスタンブロッティングに用いた抗体については、抗 LC3 抗体は James A. Hammarback 博士 (Wake Forest University School of Medicine) より譲渡された。抗 ATG5 抗体は Eeva-Liisa Eskelinen 博士 (University of Helsinki) より譲渡された。抗 IRE1 α 、抗リン酸化 IRE1 α 抗体は、浦野 文彦 博士より譲渡された。抗 caspase-3 抗体、抗 JNK 抗体、抗リン酸化 JNK 抗体は Cell signaling Technology (Beverly, MA) より購入した。抗 GFP 抗体は Invitrogen より購入した。抗マウス IgG 抗体、抗ラビット IgG 抗体は Sigma より購入した。ウエスタンブロッティングに使用した一次抗体は、全て 1000 倍希釈にて用い、二次抗体はそれぞれ、抗マウス IgG 抗体は 5000 倍で、抗ラビット IgG 抗体は 3000 倍で用いた。

細胞と細胞死の検証

SK-N-SH 細胞は、10% FBS を含む alpha-modified Eagle's medium (MP

Biomedicals, Irvine, CA)で、37°Cインキュベーターにて維持した。ATG5 ノックアウトマウス胚線維芽細胞 (MEFs)、PERK ノックアウト MEFs、ATF6 α β ノックダウン MEFs はそれぞれ 水島 昇 博士 (東京都臨床医学総合研究所)、David Ron 博士 (New York University)、Laurie H. Glimcher 博士 (Harvard School of Public Health) より譲渡された。MEFs は 20% の FBS を含む、Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) にて維持した。細胞死の検証には、一定時間 Tm および TG 処理した細胞を、固定後終濃度 100 μ M の Hoechst33328 (Wako Pure Chemical Co., Tokyo, Japan) にて 20 分染色し、無作為に選ばれた 500 個の細胞について、その核クロマチン濃縮の有無を蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U; Nikon, Kanagawa, Japan) にて観察しカウントした。

GFP-LC3 集積面積の測定

GFP-LC3 をトランスフェクションした細胞は、蛍光顕微鏡と CCD カメラ (ORCA-ER-1394 System; Hamamatsu Photonics K.K., Shizuoka, Japan) を用いて観察・写真撮影した。撮影した写真を用いて、GFP-LC3 のドットをそれぞれ肉眼観察にて抽出し、その面積を Lumina Vision software (Mitani Corporation, Fukui, Japan) を用いて測定した。細胞全体の面積に対する、GFP-LC3 ドットの面積の割合をグラフにて示した。

ウエスタンブロッティング

細胞は PBS で洗浄後、Triton-X100 lysis buffer (0.5% Triton-X100、10 mM HEPES pH 7.9、50 mM NaCl、100 mM EDTA、0.5 M sucrose、0.1% protease inhibitor cocktail (Sigma)) で可溶化した。ライセートは氷上で 30 min 放置し、8,000 g にて 10 分遠心した。上清を回収し、それぞれ 50 μ g のライセートを 15% (LC3)、8% (IRE1、リン酸化 IRE1)、10% (その他) の濃度のゲルを用いて

SDS-PAGE にて展開した。タンパクは PVDF メンブレンにトランスファーし、それぞれの一次抗体にてブロッティングした。メンブレンは TBS/Tween-20 にて洗い、ペルオキシダーゼでラベルされた 2 次抗体にてブロットした。バンドの検出には ECL plus kit (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) を用いた。

IRE1 α 、ATG5 ノックダウン

IRE1 α 、ATG5 ノックダウンに用いた、double-stranded siRNA は、Proligo Japan KK (Kyoto, Japan) より購入した。IRE1 α 、ATG5 siRNA の配列は、以下の論文を参考にした (Pedruzzi et al., 2004; Boya et al., 2005)。コントロール siRNA としては、lamin A/C siRNA (QIAGEN, Valencia, CA) を用いた。HeLa 細胞を 24 穴プレートに 60% コンフルエントの状態に撒き、HyperFect transfection reagent (QIAGEN) を用いて、75 ng の siRNA を細胞に導入した。トランスフェクション後、細胞を 37°C にて 12 時間インキュベートしたのち、各種薬剤にて刺激した。

電子顕微鏡

SK細胞を刺激後、2.5% グルタルアルデヒド、2% パラホルムアルデヒドを含む 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) を用い、室温にて 60 分固定した。細胞は 1% OsO₄を含む 0.1M phosphate buffer にて室温で 60 分後固定し、脱水後、エポキシ樹脂 Quetol 812 (Nissin EM Co., Tokyo, Japan) に包埋した。細胞はブロックにマウントし、70nmの薄さに切った。切片をuranyl acetate (saturated aqueous solution) とlead citrateにて染色し、透過型電子顕微鏡 (H-7100; Hitachi, Ibaraki, Japan) にて観察した。

免疫電顕

GFP-LC3 は、pre-embedding silver-enhanced immunogold 法 (Burry et al., 1992) を多少の改変を加えて用い、検出した。具体的には、SK細胞は、カバーガラス上にて培養し、GFP-LC3 発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから 30 時間後、細胞は 2 $\mu\text{g/ml}$ Tmにて 6 時間刺激し、4% パラホルムアルデヒド、0.01% グルタルアルデヒドを含むPBS液にて 30 分固定した。細胞は 0.1% Triton-X100 を含むPBS液にて 5 分処理した後、blocking buffer (5% BSA、5% normal goat serum、0.02% NaN_3 in PBS) で 30 分インキュベートした。細胞は 100 倍希釈のラットモノクローナル抗GFP抗体 (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) にてオーバーナイトで反応させた。洗浄後、50 倍希釈の 1.4 nm gold particlesでラベルされた抗ラットIgG抗体 (Nanoprobes Inc., Yaphank, NY) にてオーバーナイトで反応させた。洗浄後、細胞は 1% グルタルアルデヒドを含むPBS液で 15 分固定し、洗浄後、gold particles をHQ-silver enhancement kit (Nanoprobes Inc.) を用いて、20°C で 8 分反応させ、増感させた。洗浄後、細胞は 0.1% OsO_4 で 30 分後固定し、脱水後エポキシ樹脂Quetol 812 (Nissin EM Co.) に包埋した。

アミノ酸取り込み解析

アミノ酸の取り込み測定は、Kim et al.の方法を改変して行った (Kim et al., 1980)。MEF は 2 $\mu\text{g/ml}$ Tmまたは 1 μM TG で 2 時間処理し、次に 1 $\mu\text{Ci/ml}$ の [^3H]amino acids mixture (Amersham Biosciences Corp., Cat. No. TRK440) で 1 時間インキュベートした。PBSにて洗浄後、0.1% Triton X-100 にて可溶化し、液体シンチレーションカウンターにて測定した。

結果

小胞体ストレス下の細胞ではオートファゴソームが形成される

まず最初に、SK-N-SH神経芽腫細胞をN-グリコシル化阻害剤である 2 $\mu\text{g/ml}$ ツニカマイシン (Tm)、小胞体 Ca^{2+} -ATPase阻害剤である 1 μM サプシガルギン (TG) にてそれぞれ刺激し、電子顕微鏡を用いて細胞内の様子を観察した。各種小胞体ストレス誘導剤による 2 時間、または 6 時間刺激後に、2 重膜をもち、中に細胞内小器官を含む細胞質を容れた構造体であるオートファゴソームの誘導が観察された (図 2Ac-e)。これらの構造体は、オートファジーが活性化する系としてよく知られているアミノ酸飢餓状態でも同様に観察された (図 2Ab)。また、無処理のコントロール細胞では、オートファゴソームはほとんど観察されなかった (図 2Aa)。電子顕微鏡写真上でオートファゴソームの個数を数えたところ、小胞体ストレス誘導剤刺激によって、オートファゴソームの個数が有意に上昇しているのが確認された (図 2B)。一重膜を持ち、電子顕微鏡下でより電子密度の大きい構造体として確認されるオートリソソームについても、小胞体ストレスによる誘導が観察された (図 2Ad・e)。ここで、小胞体ストレスによってアミノ酸の取り込みが抑制され、結果としてアミノ酸飢餓状態となってオートファジーが活性化し、オートファゴソーム形成が観察されている可能性を検証するために、細胞のアミノ酸取り込み量を測定した。すると、小胞体ストレス刺激後 2 時間では、アミノ酸取り込み量は無処置の細胞と変化がなかったため、小胞体ストレスによるオートファゴソームの形成は、2 次的なアミノ酸飢餓によるものではないことが明らかとなった (図 2C)。

さらに、小胞体ストレスによってオートファジーが活性化しているかどうかを電子顕微鏡以外の方法でも確認するために、図 1B で示した LC3 に GFP を融合させて、可視化させた GFP-LC3 発現ベクターを用いて実験を行った。GFP-LC3 のドット状の集積はすなわちオートファゴソームの存在を示すと考えられるが、小胞体ストレス負荷により、細胞内で GFP-LC3 のドットの増加が観察された (図 3A)。また、

その面積を測定したところ、GFP-LC3 ドットの面積の有意な上昇が確認され、また、オートファジーの阻害剤として知られる 3-methyladenine (3-MA) を作用させることで、その GFP-LC3 ドット面積の増加は阻害された(図 3B・C)。

ここで、これまで主にアミノ酸飢餓状態で研究され、明らかにされてきたオートファジーシグナルが、小胞体ストレス時のオートファゴソーム形成にも必要なのかを確認するために、図 1B で示した ATG5 のノックアウト細胞(オートファジー不全株)を用いて同様の実験を行った。小胞体ストレス刺激により、ATG5 ノックアウト細胞は GFP-LC3 ドット面積の上昇を示さなかったため、小胞体ストレス時に観察されるオートファゴソーム形成には、ATG5 を含むオートファジーシグナルが必須であることが確認された(図 3 A・C)。

次に、ここで観察された GFP-LC3 が確かにオートファゴソーム膜に存在することを確認するために、抗 GFP 抗体を用いて免疫電顕を行った。すると、オートファゴソームの膜上に GFP の存在を示す金粒子の存在が認められたため、GFP-LC3 はオートファゴソーム膜上に局在していることが明らかとなった(図 3D)。

最後に、オートファジーの活性化についての生化学的な検証を行った。プロセシングを受けて活性化型となった LC3-II は、わずかに分子量が減少する。そこで、その現象を利用して、LC3-I と LC3-II の動きについて検討するために LC3 のウェスタンブロッティングを行った。小胞体ストレス負荷時の細胞を可溶化し、そのライセートを用いてウェスタンブロッティングを行い、LC3 を検出したところ、小胞体ストレスによって経時的に LC3-I が減少し、LC3-II が増加していることが確認された(図 4A・B)。

また、リソソーム酵素の阻害剤である E64d を作用させると、オートリソソーム内でのリソソーム酵素による分解が阻害されるため、本来オートリソソーム内で分解される予定であった分解対象物とともに、オートファゴソームの内膜に局在していた LC3 も分解されずに蓄積する。この現象を利用して、小胞体ストレス時に増加してくる LC3-II が正しくオートファゴソームに局在しているかどうかを確認するために、E64d をあらかじめ作用させた細胞とそうでない細胞について、それぞれ LC3 のウ

ウェスタンブロッティングを行った。すると、E64d を前処理した細胞においては、小胞体ストレス負荷時の LC3-II の増加は増強された(図 4C・D)。以上の結果より、小胞体ストレスによって LC3 や ATG5 などのオートファジー必須分子を含むオートファジーシグナルが活性化し、オートファゴソームが形成されていることが明らかとなった。

小胞体ストレス誘導オートファジーには、小胞体ストレスセンサーIRE1 が必要である

UPR の主要なストレスセンサーとして現在知られているものは、IRE1、PERK、ATF6 の 3 種である。これらのセンサーは小胞体内でのミスフォールドタンパク質の集積を感知し、様々な UPR シグナルを活性化する。そこで私は、それらのセンサーのいずれかが小胞体ストレス誘導オートファジーシグナルに関与している可能性があると考え、それぞれのノックアウト・ノックダウン細胞を用いて検証を行った。

実験に使用した各種細胞のうち、IRE1 ノックアウト MEFs において、アミノ酸飢餓状態におけるオートファゴソーム形成は観察されるものの、小胞体ストレスを負荷しても GFP-LC3 のドット面積の増加が見られなかった(図 5A・C)。この結果より、IRE1 ノックアウト細胞では、小胞体ストレスによるオートファジーシグナルが活性化しない可能性が示された。さらに確認するため、IRE1 をノックダウンした HeLa 細胞を用いて同様の実験を行ったところ、同様に IRE1 ノックダウン細胞においても小胞体ストレスによるオートファジー活性化が観察されなかった(図 5D)。

この結果を受けて、私は、IRE1 ノックアウト細胞では小胞体ストレスによる LC3 のプロセッシングは起こっていないであろうと予想した。しかし、その結果は予想に反しており、IRE1 ノックアウト MEFs に小胞体ストレスを負荷したときの、LC3 プロセッシングをウェスタンブロッティングにて観察したところ、LC3 のプロセッシングは野生株と同様に観察された(図 6A)。ここで、続いてリソソーム酵素阻害剤 E64d を用いた実験を行うと、E64d を作用させた場合、野生株では LC3-II 蓄積が増強される

のに対して、IRE1 ノックアウトでは変化がなかった(図 6B)。このことは、リソソーム酵素阻害剤の影響を受けないということから、IRE1 ノックアウト細胞においては、LC3 はプロセッシングを受けるが、オートファゴソームに局在した後オートリソソームにおいて分解されるという経路を経ておらず、これらの反応がある段階で阻害されている可能性を示している。しかし、その詳細については今のところ不明である。

IRE1 以外のストレスセンサー、PERK と ATF6 については、それぞれのノックアウト、ノックダウン細胞を用いて GFP-LC3 のドット蓄積の観察や LC3 のウエスタンブロットティングを行い、小胞体ストレスを負荷した場合でも、野生株と同様に GFP-LC3 ドット面積が増加することが観察された(PERK ノックアウト: 図 6C・D、ATF6 ノックダウン: 図 6E)。以上の実験より、小胞体ストレス誘導オートファジーには、小胞体ストレスセンサーのうちの PERK や ATF6 ではなく、IRE1 が必要であることが示された。

IRE1 には kinase domain と RNase domain の二つのドメインがあり、それぞれが異なる UPR シグナルを伝達している。そのどちらのドメインが小胞体ストレス誘導オートファジーに必要なのかについて、詳細な検討を行うため、各種 IRE1 変異体の発現ベクターを用いて実験を行った。図 7A に、各種変異体の構造を示した。これらの 4 種類の変異体を、それぞれ IRE1 α ノックアウト細胞に GFP-LC3 プラスミドと共にトランスフェクションし、小胞体ストレス刺激後 GFP-LC3 ドットの集積を観察したところ、ポジティブコントロールとして用いた、完全な IRE1 である full ベクターと、RNase domain を欠損させた delta RNase ベクターをトランスフェクションした場合に GFP-LC3 ドット面積の増加が示された。また、ネガティブコントロールとして用いた、両方のドメインが欠損した delta C ベクターと、kinase domain にミューテーションを入れて活性を失わせた、KA ベクターをトランスフェクションした場合は、GFP-LC3 ドット面積の増加は観察されなかった(図 7B・C)。このことは、小胞体ストレス誘導オートファジーにおいては、IRE1 の RNase domain ではなく、kinase domain が必要であることを示している。各種ベクターをトランスフェクションした場合の発現レベルと、リン酸化レベルのウエスタンブロットティングについて示したのが図 7D であ

る。図 7C において、delta RNase ベクターをトランスフェクションして Tm 刺激をした場合の GFP-LC3 ドット集積面積の増加が full に比べて小さい理由は、現在のところ明らかになっていないが、一つの考え方として、図 7D で示されるリン酸化レベルが full に比べて低いという可能性が挙げられる。なぜリン酸化レベルが低いのかについての詳細は不明であるが、一つは RNase domain を削ることによって立体構造などに変化が生じたためという可能性が考えられる。

IRE1 の kinase domain からは、apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) を介して TNF-receptor-associated factor 2 (TRAF2) が ER 膜にリクルートされ、次いで c-jun N-terminal kinase (JNK) が活性化されることがよく知られている (Nishitoh et al., 2002; Urano et al., 2000)。これまでの実験により、小胞体ストレス誘導オートファジーにおいては、IRE1 の kinase domain が必要であることが示されたことから、IRE1-TRAF2-JNK 経路がオートファジー経路に関与している可能性があると考え、その仮説を検証するため、JNK 阻害剤、TRAF2 のドミナントネガティブ (TRAF2 DN) を用いた実験をそれぞれ行った (図 7E・F)。すると、JNK 阻害剤を細胞に作用させた場合、TRAF2 DN を GFP-LC3 と共に細胞にトランスフェクションした場合ともに、小胞体ストレスによる GFP-LC3 ドット面積の上昇は抑制された。また、どちらの場合においても、アミノ酸飢餓時のオートファジー活性については変化がみられなかった。これらの結果より、小胞体ストレスによるオートファジーは、IRE1 の kinase domain から、TRAF2、JNK を介している可能性が強く示唆された。

オートファジーは、小胞体ストレスによるアポトーシスから細胞を保護する

これまでに、オートファジーが細胞死を誘導するという報告 (Daido et al., 2004; Xue et al., 1999) と、細胞死から細胞を保護する役割を持つという報告 (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003) の両方がなされてきており、オートファジーの細胞における存在意義については未だ結論が出ていない状態である。そこで、小胞体ストレスによって誘導されるオートファジーは細胞死と生存のどちらに関与している

のかを調べるために、細胞にオートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) を作用させ、オートファジーをブロックした状態で小胞体ストレスを負荷した(図 8A-C)。3-MA 処理した細胞は、処理していない細胞よりも小胞体ストレスに対して脆弱であり、より多くの細胞がアポトーシスを起こした。この結果より、オートファジーが誘導されない状態では、細胞は小胞体ストレスにより強く反応し細胞死を起こしてしまうことが示唆される。

さらに検証するため、オートファジー不全株である ATG5 ノックアウト MEFs を用いて細胞死の実験を行ったところ、オートファジー阻害剤を作用させた場合と同様に、ノックアウト細胞は小胞体ストレス負荷によってより多くの細胞死を起こした(図 8D・E)。さらに、HeLa 細胞を用いて ATG5 の siRNA を行い、ATG5 をノックダウンした場合も、同様に小胞体ストレスによってより多くの細胞がアポトーシスを起こした(図 8F)。以上の結果より、オートファジーは小胞体ストレスから細胞を保護する役目を持っており、その機能が失われると、小胞体ストレスによるアポトーシスが亢進することが示された。

また、逆に、オートファジーを活性化することが知られている薬剤である rapamycin を細胞に作用させ、あらかじめ細胞をオートファジーが活性化した状態においた後に小胞体ストレスを負荷すると、細胞死が有意に抑制された(図 8G)。以上より、小胞体ストレス誘導オートファジーは、小胞体ストレスから細胞を保護する役割を担っていることが示された。

初期の JNK 活性化が小胞体ストレス誘導オートファジーシグナルに関与している

これまでの検証により、JNK の活性化が小胞体ストレス誘導オートファジーに必要であり、オートファジーが細胞生存のために働くことが示されたが、一方で、JNK の活性化は細胞死シグナルの活性化にとって重要であることがよく知られている (Nishitoh et al., 2002)。このように、一つの分子が、その役割の相反する二つのシグナル伝達系に関与していることから、一見矛盾が生じてしまう。しか

し、オートファジーは刺激後 2 時間、6 時間といった比較的短時間で活性化するのに対し、アポトーシスは刺激後 24 時間以上の長時間で観察されることから、私は、JNK の活性時間の長さがその違いを生み出しているのではないかと予想した。

その仮説を検証するため、このオートファジーとアポトーシスという二つのシグナル伝達系が同時に起きず、分離するような条件を模索した結果、細胞を 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Tm で 1 時間処理し、その後 PBS でシャーレを洗浄し Tm を除いてから、新しい培養液に交換するという系を確立した。この条件では、刺激によりオートファジーは活性化するが、その後試薬を取り除いてしまうため、アポトーシスのスイッチは入らない。この実験系を用い、Tm 刺激開始後 6 時間（試薬を除いてから 5 時間）でのオートファジー活性と JNK 活性を観察すると、Tm を除いた細胞と、除いていない細胞の両方共に活性が見られるが（図 9A・C）、24 時間後（試薬を除いてから 23 時間）になると、Tm を除いた細胞では JNK の活性は消失しており、かつ、アポトーシスも起こっていない（図 9B-D）。これらの結果より、比較的早い段階の JNK 活性化がオートファジー誘導に関与しており、その時点までの JNK 活性はアポトーシス誘導には関与していないこと、その JNK の活性化が長時間に及ぶと、アポトーシスシグナルが活性化し、細胞はアポトーシスを起こしてしまうことが示された。

考察

本研究により、私は小胞体ストレスによってオートファジーが活性化することを見出した。小胞体ストレスにより UPR が活性化すると、ミスフォールドタンパク質は小胞体内からトランスロコンを通過して細胞質ゾルに逆輸送され、そこで ERAD の系により分解されることが知られている。今回の研究により、オートファジー経路は、UPR における ERAD の系に次ぐ第二の分解系としての役割を持つ可能性が示唆された。

これまで、オートファジーが UPR の一環として、ERAD と共にミスフォールドタンパク質の分解を担っている可能性を間接的に示唆する報告が多々なされてきた。ハンチントン病におけるハンチンチンのように、神経変性疾患における原因分子の一つであるポリグルタミンは、小胞体内に蓄積することによって小胞体ストレスを引き起こし、最終的に細胞を死にいたらしめるという報告があるが (Kouroku et al. 2002)、近年、ハンチンチンや、パーキンソン病の原因遺伝子の一つである α -Synuclein がオートファジーによって分解されている可能性が報告されている (Qin et al., 2003; Webb et al., 2003)。また、酵母の系においては、アンチトリプシンの変異体の一つである alpha 1-protease inhibitor Z variant (A1PiZ) を ERAD の系によって分解することのできない系統である Vps30/Atg6 Δ strain と、オートファジー不全株である Atg14 Δ strain では、ともに A1PiZ の分解が低下し、野生株と比較して UPR の活性が常に上昇していることが確認された (Kruse et al., 2006)。これらの知見は、ERAD に加え、オートファジーも UPR の一部としてミスフォールドタンパク質を分解する機能を持つ可能性を示唆している。

また一方で、最近になり、成長因子が不足した細胞において、オートファジーが ATP の供給を維持する役割をもち、細胞を生存させる働きを持つことが報告された (Lum et al., 2005)。小胞体ストレス時に活性化するオートファジーの場合においても、オートファジーがミスフォールドタンパク質の分解によってではなく、エネルギーの恒常性を維持することによって、細胞を保護している可能性も考えられ

る。

次に、本研究において、私は、小胞体ストレスによって活性化されるオートファジーには小胞体ストレスセンサーIRE1 が必要なことを示した。また、数々の変異体や阻害剤、ドミナントネガティブを使用した実験によって、IRE1の kinase domain から TRAF2-JNK 経路を介してオートファジーが活性化する可能性を示した。ここで、IRE1ノックアウト細胞においては、小胞体ストレスによって GFP-LC3 ドットの集積が増加しない一方で、LC3 プロセッシングは野生株と同様に起こる。その理由として考えられることは、まず IRE1 経路は、オートファジー活性化シグナルのうち LC3 プロセッシングのさらに下流に関与しており、ノックアウト細胞では LC3 プロセッシングまでは起こるが、正常なオートファゴソームの形成がなされない、ということが挙げられる。この根拠となる実験結果は、あらかじめリソソーム酵素阻害剤 E64d を作用させた細胞に小胞体ストレスを負荷した後、可溶化して LC3 のウェスタンブロッティングを行うと、野生株ではオートリソソームでの分解が阻害されるため LC3-II の蓄積が増強されるが、IRE1 ノックアウト MEFs の場合ではその増強が見られないということである(図 6B)。この観察結果からは、IRE1 ノックアウトではプロセッシングを受けた LC3 が最終的にオートリソソームまで運ばれないため、阻害剤の影響を受けないという可能性が考えられる。また、もう一つの可能性として、IRE1 とは独立した何らかのシグナルが、小胞体ストレス誘導オートファジーの LC3 プロセッシングに関与していることも考えられる。しかし、その詳細についてはまだよくわかっておらず、今後の研究が待たれるところである。

JNK 経路については、本来アポトーシス誘導経路に関与し、細胞死への役割が大きいことがよく知られている。今回、小胞体ストレス誘導オートファジーは IRE1 から JNK 経路を介して活性化し、細胞保護の役割を持つことが示されたが、本研究では、その JNK 活性の初期段階がオートファジー誘導に関与していることを示した。JNK は、刺激直後に活性化し、最初の数時間はオートファジーの活性に寄与する。しかし、その活性が長期にわたると、アポトーシスシグナルが活性化し、細胞は死に至る。

そのスイッチのオン・オフがどのように行われているのかについては、まだほとんど明らかになっていない。今回、ツニカマイシンを除去する実験系を確立するにあたり、様々な濃度と刺激時間についての検討を行ったが、オートファジーについては刺激の濃度・時間にほとんど左右されず、コンスタントに活性化が観察されたのに対し、アポトーシスシグナルについては、濃度と刺激時間の両方がパラメーターとなり、シグナルのスイッチが制御されているようであった。つまり、強い刺激であれば、刺激時間を短くしてもアポトーシスシグナルのスイッチが入ってしまい、逆に弱い刺激の場合は、多少刺激時間を長くしてもアポトーシスシグナルのスイッチは入らない。このことから、ある一定の刺激量を超えるとアポトーシスシグナルが活性化しているのではないかという可能性が考えられる。また、小胞体ストレスそれ自身についても、初期は Bip の転写誘導などによって小胞体の機能を正常化させ、細胞を保護しようという反応が多く起こるが、ストレスが長引くと細胞はアポトーシスを起こして死んでしまう。そのような UPR の一連のシグナルと同様のメカニズムを持つ可能性も考えられる。

JNK のさらに下流はどのようなシグナルが続いているのか、詳細の判明にはまだ更なる検討が必要であるが、アミノ酸飢餓によるオートファジー活性化時に、細胞の分裂や生存における調節分子である、セリン・スレオニンキナーゼ mammalian target of rapamycin (mTOR) の活性が落ちていることはよく知られている。mTOR は通常状態ではオートファジー活性を抑制していると考えられており、アミノ酸飢餓状態や、mTOR の阻害剤であるラパマイシンによってその抑制が外れ、オートファジーが活性化すると考えられている (Neufeld, 2003)。小胞体ストレス誘導オートファジーも同様のシグナルを介するのかは今のところ不明であるが、近年、インスリンシグナルの一部である Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) を IRE1 からの JNK がリン酸化し、本来のインスリンシグナルを阻害しているという報告がなされた (Ozcan et al., 2004)。インスリンシグナルは Akt を経て mTOR を活性化することが知られているので、IRE1-JNK 経路が IRS-1 のリン酸化によりインスリン経路を阻害することによって、Akt-mTOR 経路が抑制され、その結果オートファジー

が活性化するという可能性が考えられる。また、小胞体ストレスを起こすことが報告されている poly-Q を細胞に発現させると、poly-Q がオートファジーによって分解されるが、IRS-2 のノックダウンによってその分解が阻害されるという報告もあり (Yamamoto, A. et al.)、インスリンシグナル、mTOR と小胞体ストレス誘導オートファジーとの関連性が今後注目されるべきポイントであろうと考えられる。

小胞体ストレスは神経変性疾患を始めとする様々な疾病に関与していることが知られており、一方のオートファジーについてもたくさんの疾患との関与が報告されてきている。本研究により、この二つの経路が密接に関連して、細胞の生存へ寄与していることが示された。私は、今後、これらのシグナル伝達経路、細胞内での役割などを解明することによって、様々な難治性疾患の病態解明と、ひいては治療法の確立へ大きく前進することになるだろうと考えている。本研究が、その突破口となることを強く信じてやまない。

謝辞

私に研究の場を与えてくださり、入学後も折にふれて暖かいご助言をいただきました、奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 細胞構造学教室 塩坂貞夫教授に深く感謝いたします。 実際の研究について指導して下さいました、宮崎大学医学部 解剖学講座 分子細胞生物学分野 今泉和則教授に深く感謝いたします。 また、ともに実験をしてくださり、多大なご助言をいただきました、宮崎大学医学部 日野真一郎助手に深く感謝いたします。

研究の遂行にあたりいつも助けてくださり、公私共に私を支えてくださいました、宮崎大学医学部 吉永一也助教授、富山大学医学部 谷井一郎教授、松本歯科大学 奥村雅代助手、奈良先端科学技術大学院大学 石川保幸助手、大阪大学 谷口学修士に感謝いたします。

同じテーマでともに実験を行い、楽しさや辛さをわけあった、森川恵介修士に深く感謝します。 また同様に、大学院生活をともに楽しく過ごし、私を支えてくださった、塩坂研究室の皆様と、今泉研究室の皆様に、心から感謝します。

最後に、いつも私を支えてくれる家族と、愛兔モモ、愛猫ふくに深く感謝の意を表します。

参考文献

- Boya, P., Gonzalez-Polo, R-A., Casares, N., Perfettini, J-L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P. and Kroemer, G. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 1025-1040.
- Burry, R. W., Vandre, D. D. and Hayes, D. M. 1992. Silver enhancement of gold antibody probes in pre-embedding electron microscopic immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1849-1956.
- Daido, S., Kanzawa, T., Yamamoto, A., Takeuchi, H., Kondo, Y. and Kondo, S. 2004. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res.* **64**: 4286-4293.
- Dumm, W. A. 1994. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* **4**: 139-143.
- Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. and Takahashi, R. 2001. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105**: 891-902.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19**: 5720-5728.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* **117**: 2805-2812.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama,

- Y., Murayama, O., Takashima, A., St George-Hyslop, P., Takeda, M. and Tohyama, M. 1999. Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **1**: 479-485.
- Kaufman, R. J. 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest.* **110**: 1389-1398.
- Kim, K. S., Sapienza, V. J. and Carp, R. I. 1980. Antiviral activity of arildone on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**: 276-280.
- Klionsky, D. J. and Ohsumi, Y. 1999. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**:1-32.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Jimbo, A., Kikuchi, T., Yamagata, T., Momoi, M. Y., Kominami, E., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S. and Momoi, T. 2002. Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Hum. Mol. Gen.* **11**: 1505-1515.
- Kruse, K. B., Brodsky, J. L. and McCracken, A. A. 2006. Characterization of an ERAD Gene as VPS30/ATG6 reveals two alternative and functionally distinct protein quality control pathways: one for soluble Z variant of human α -1 proteinase inhibitor (A1PiZ) and another for aggregates of A1PiZ. *Mol. Biol. Cell* **17**: 203-212.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T. and Mizushima, N. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**: 1032-1036.
- Levine, B. and Klionsky, D. J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **6**: 463-477.
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T. and Thompson, C. B. 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**: 237-248.

- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. 2001. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* **152**: 657-667.
- Mori, K. 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**: 451-454.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. and Yuan, J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* **403**: 98-103.
- Neufeld, T. P. 2003. Body building: regulation of shape and size by PI3K/TOR signaling during development. *Mech. Dev.* **120**: 1283-1296.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. and Ichijo, H. 2002. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* **16**: 1345-1355.
- Nixon, R. A. 2006. Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends Neurosci.* **29**: 528-535.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A-H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L. H. and Hotamisligil, G. S. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**: 457-461.
- Pedruzzi, E., Guichard, C., Ollivier, V., Driss, F., Fay, M., Prunet, C., Marie, J-C., Pouzet, C., Samadi, M., Elbim, C., O'Dowd, Y., Bens, M., Vandewalle, A., Gougerot-Pocidalo, M-A., Lizard, G. and Ogier-Denis, E. 2004. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Cell Biol.* **24**: 10703-10717.

- Qin, Z-H., Wang, Y., Kegel, K. B., Kazantsev, A., Apostol, B. L., Thompson, L. M., Yoder, J., Aronin, N. and DiFiglia, M. 2003. Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum. Mol. Gen.* **12**: 3231-3244.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E-L. Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti G. and Levine, B. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the *beclin 1* autophagy gene. *J. Clin. Invest.* **112**: 1809-1820.
- Ron, D. 2002. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* **110**: 1383-1388.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P. and Ron, D. 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**: 664-666.
- Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N. and Rubinsztein, D. C. 2003. α -Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**: 25009-25013.
- Xue, L., Fletcher, G. C. and Tolkovsky, A. M. 1999. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**: 180-198.
- Yamamoto, A., Cremona, M. L. and Rothman, J. E. 2006. Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *J. Cell Biol.* **172**: 719-731.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. and Heintz, N. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 15077-15082.

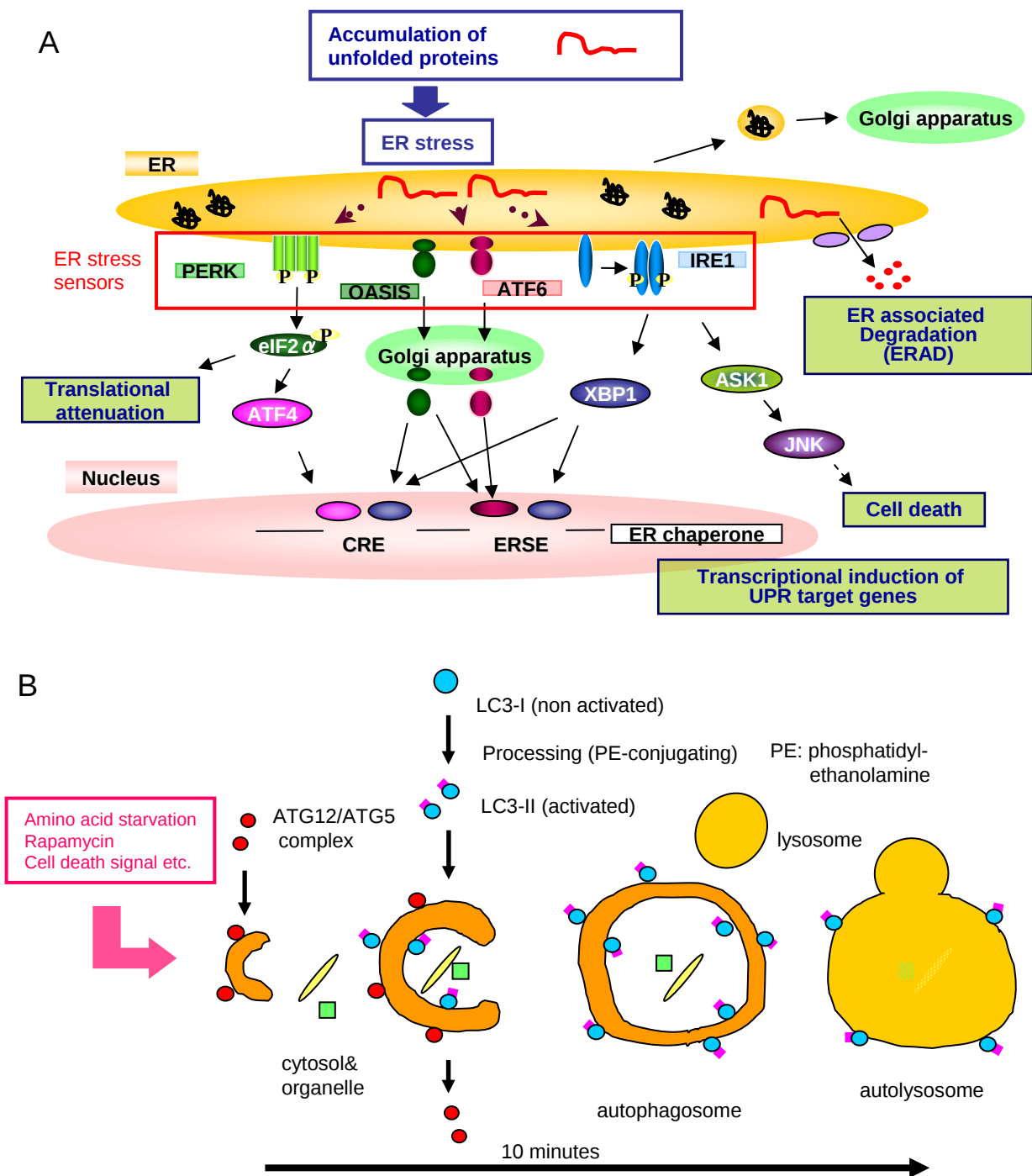


図1. 小胞体ストレス反応とオートファジー

A. 小胞体ストレス反応の全体像

B. オートファジーの活性化によるオートファゴソーム形成の過程とそれに関与する分子。アミノ酸飢餓、ラパマイシンを始めとする様々な刺激によって、オートファジーが活性化し、図に示したような過程をたどってオートファゴソームが形成され、細胞質内のバルク分解が行われる。

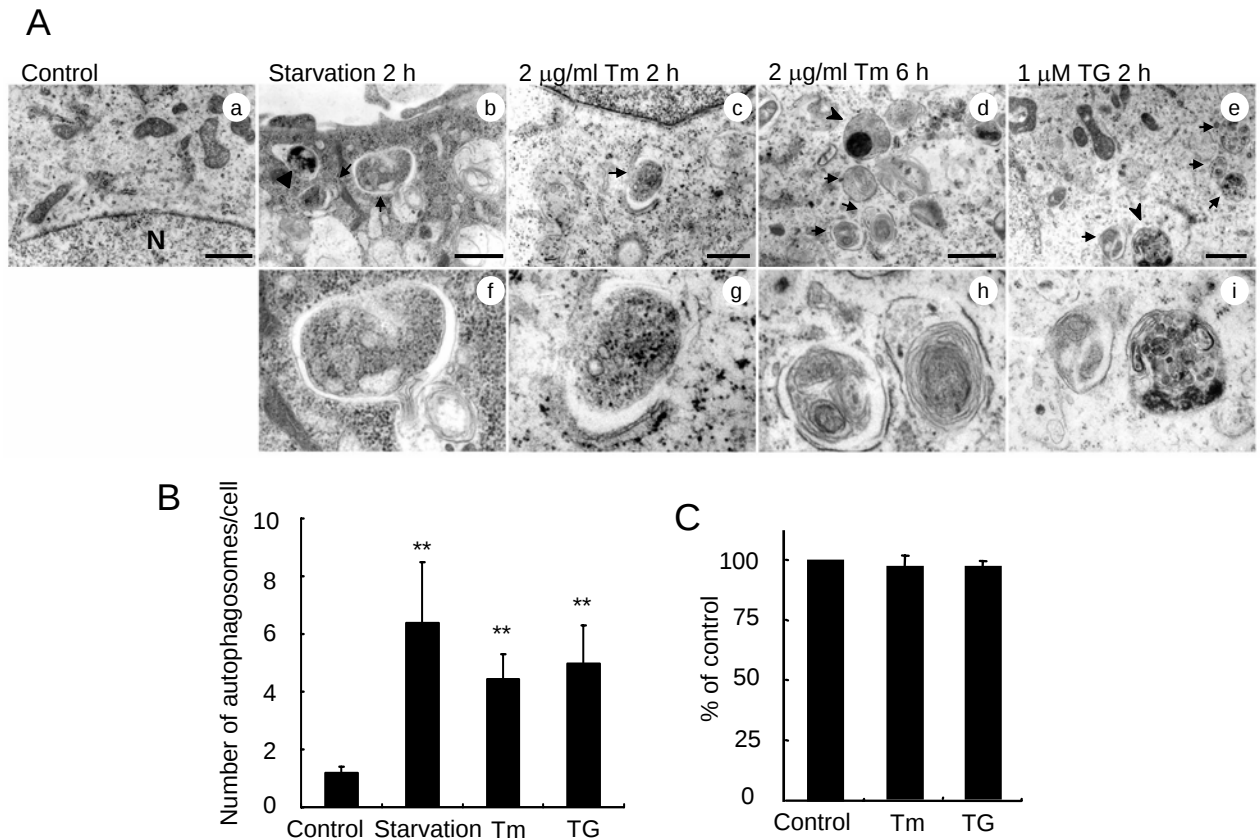


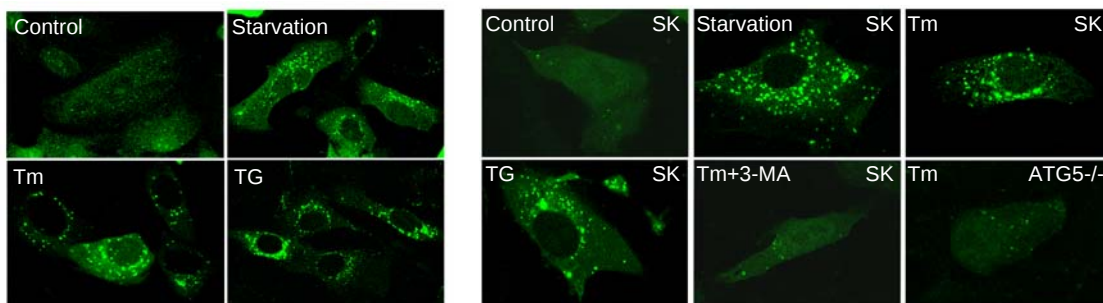
図2. 小胞体ストレスによって細胞質内にオートファゴソームが出現する

A. SK-N-SH細胞を各種小胞体ストレス誘導剤で刺激したときの電子顕微鏡写真。f-iは、それぞれb-eの高倍率のもの。オートファゴソーム(矢印)、オートリソソーム(矢頭)が観察される。スケールバー:1 μ m.

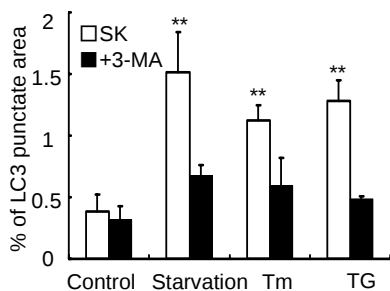
B. SK-N-SH細胞の電子顕微鏡写真における、切片上の1細胞あたりのオートファゴソーム数。刺激はそれぞれ2時間行った。グラフのデータは平均 $\pm$ SDで示す。*** $P < 0.01$ 。

C. MEFsにおける、小胞体ストレス時のアミノ酸取り込み量。無処置のControlと、2 μ g/ml Tm、1 μ M TGでそれぞれ2時間刺激した細胞について、細胞内のアミノ酸量を測定した。グラフのデータは平均 $\pm$ SDで示す。

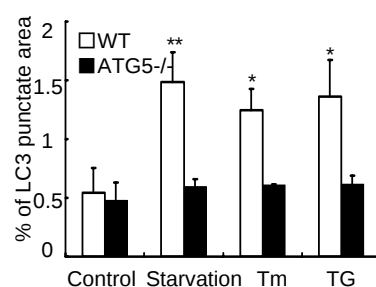
A



B



C



D

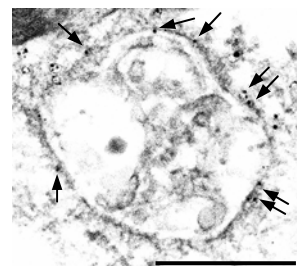


図3. 小胞体ストレスによってオートファゴソーム面積が増加する

A. SK細胞、ATG5ノックアウトMEFsにおけるオートファゴソーム形成の蛍光顕微鏡写真。細胞はGFP-LC3をトランスフェクションした後、アミノ酸飢餓、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tm、1 μM TGにて2時間の薬剤刺激を行い、蛍光顕微鏡で観察した。また、オートファゴソーム阻害剤3-MAを前処理した後、Tm刺激を行った細胞についても蛍光顕微鏡での観察を行った。左図:低倍率、右図:高倍率。

B.C. AのGFP-LC3ドットの面積を定量化した。細胞全体の面積に対するGFP-LC3面積の割合をグラフで示した。グラフのデータは平均 $\pm$ SDで示す。* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 。

D. 免疫電子顕微鏡写真。SK細胞にGFP-LC3をトランスフェクションした後、Tm処理を6時間行い、抗GFP抗体を用いてその局在を電子顕微鏡で観察した。スケールバー:1 μm 。

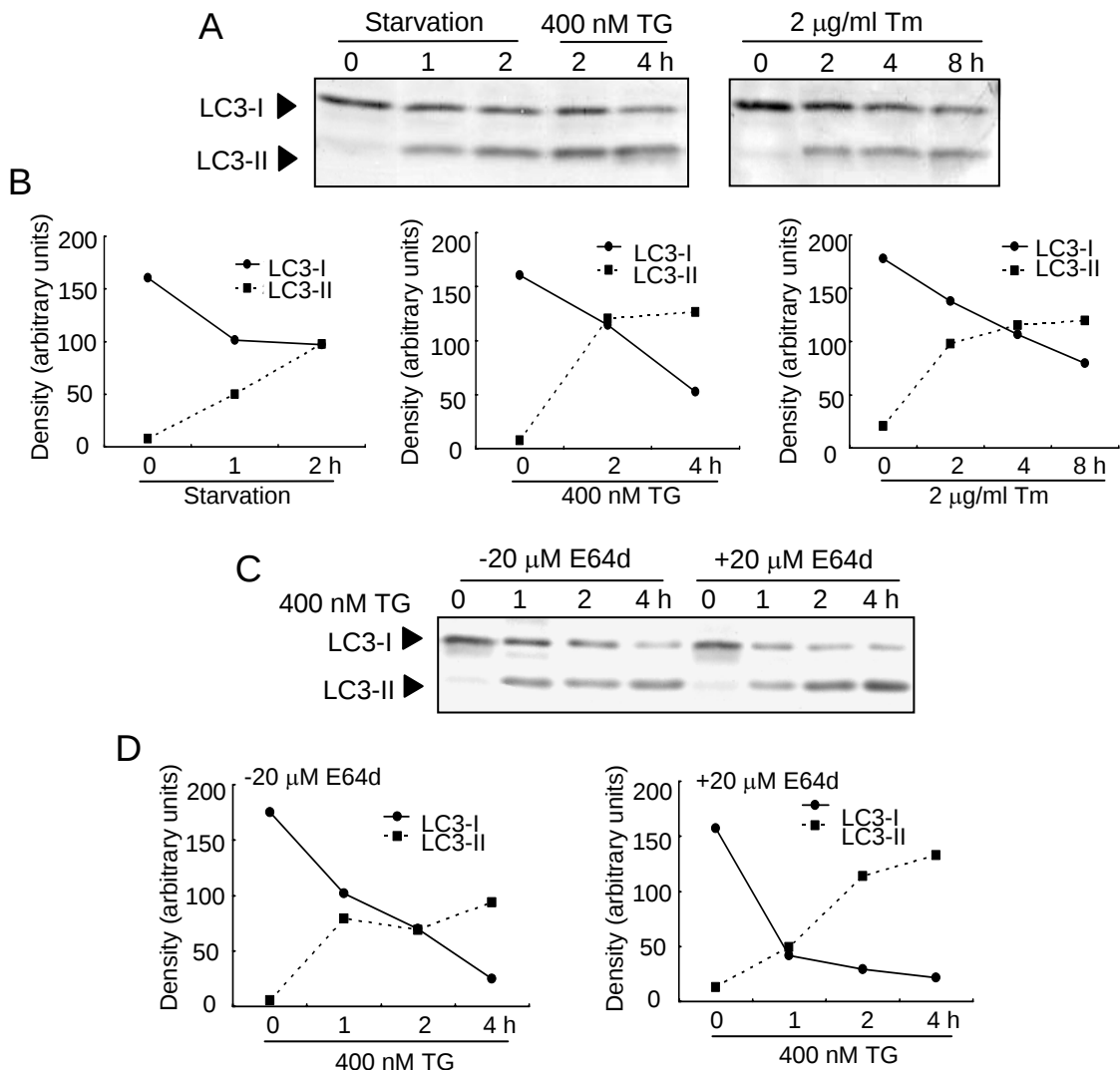


図4. 小胞体ストレスによるLC3の変化

A. LC3のウェスタンブロッティング。MEFsに各種刺激を行った後、経時的に回収し、抗LC3抗体で検出した。

B. Aにおける、LC3-IとLC3-IIの増減をグラフで示した。グラフはバンドの強さをScion Imageを用いて測定し、Arbitrary Unitsとして示した。

C. LC3のウェスタンブロッティング。MEFsを、リソソーム酵素阻害剤E64dにより前処理したものとしていないものとでそれぞれTG刺激した。

D. Cにおける、LC3-IとLC3-IIの増減をグラフで示した。グラフはバンドの強さをScion Imageを用いて測定し、Arbitrary Unitsとして示した。

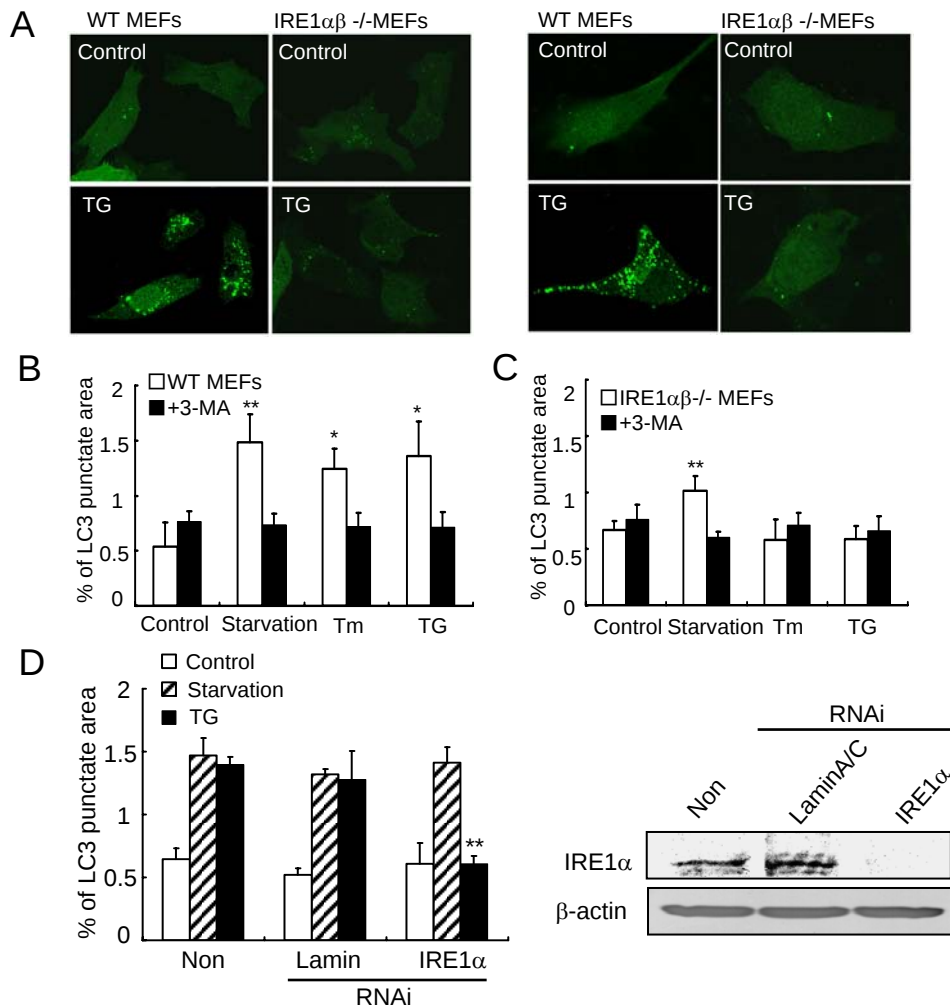


図5. 小胞体ストレスによるオートファゴソーム形成は、IRE1ノックアウト細胞において阻害される

A. 野生株MEFsと、IRE1 $\alpha\beta$ ノックアウトMEFsを用いて、GFP-LC3をトランスフェクション後、2時間のTG刺激を行い、蛍光顕微鏡で観察した。左図:低倍率、右図:高倍率。

B. C. AのGFP-LC3ドットの面積を定量化した。野生株MEFs (B)、IRE1 $\alpha\beta$ ノックアウトMEFs (C)において、それぞれ細胞全体の面積に対するGFP-LC3面積の割合をグラフで示した。グラフのデータは平均 $\pm$ SDで示す。* P <0.05, ** P <0.01。

D. IRE1 α のsiRNAを導入したHeLa細胞において、各種刺激後2時間でのGFP-LC3ドット面積の定量。右図は、siRNAを導入した細胞におけるIRE1 α のウェスタンブロッティングを示す。siRNAを導入していない細胞(Non)、LaminA/C siRNAを導入した細胞(Lamin)をそれぞれコントロールとして用いた。グラフのデータは平均 $\pm$ SDで示す。** P <0.01。

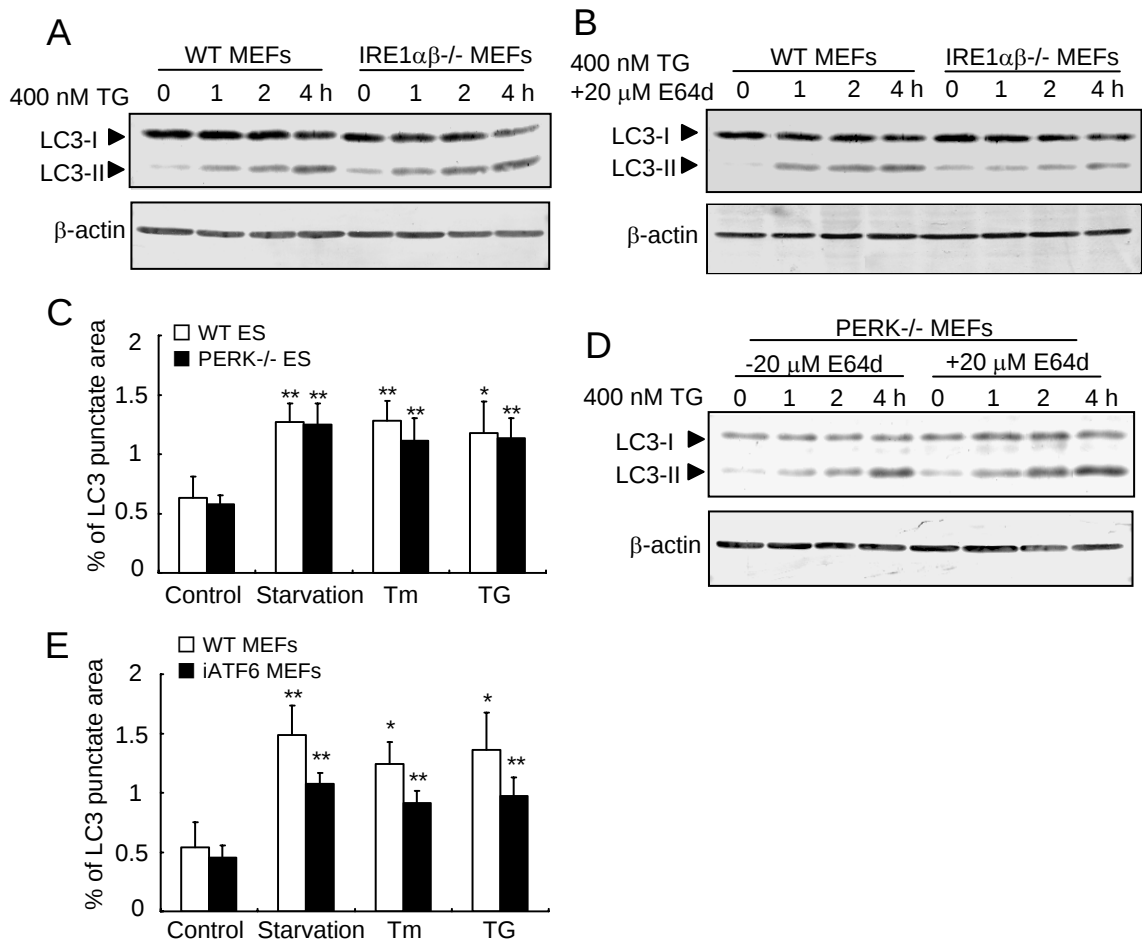


図6. IRE1 $\alpha\beta$ ノックアウト細胞とPERKノックアウト細胞におけるLC3のプロセシングとオートファゴソーム形成

A. 野生株MEFsとIRE1 $\alpha\beta$ ノックアウトMEFsにTG刺激を行ったときの、LC3のウェスタンブロッティング。LC3のプロセシングは、野生株でもIRE1 $\alpha\beta$ ノックアウトでも同様に観察された。

B. 野生株MEFsとIRE1 $\alpha\beta$ ノックアウトMEFsにおいて、E64d前処理した細胞にTG刺激をしたときの、LC3のウェスタンブロッティング。

C. PERKノックアウトES細胞にGFP-LC3を導入し、2時間の薬剤刺激を行ったときのGFP-LC3ドットの面積の定量。グラフのデータは平均 $\pm$ SDで示す。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

D. PERKノックアウトMEFsにおいて、E64d前処理した細胞とそうでない細胞にそれぞれTG刺激をしたときの、LC3のウェスタンブロッティング。

E. ATF6をノックダウンしたiATF6 MEFsにGFP-LC3を導入し、2時間の薬剤刺激をおこなったときのGFP-LC3ドット面積の定量。グラフのデータは平均 $\pm$ SDで示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

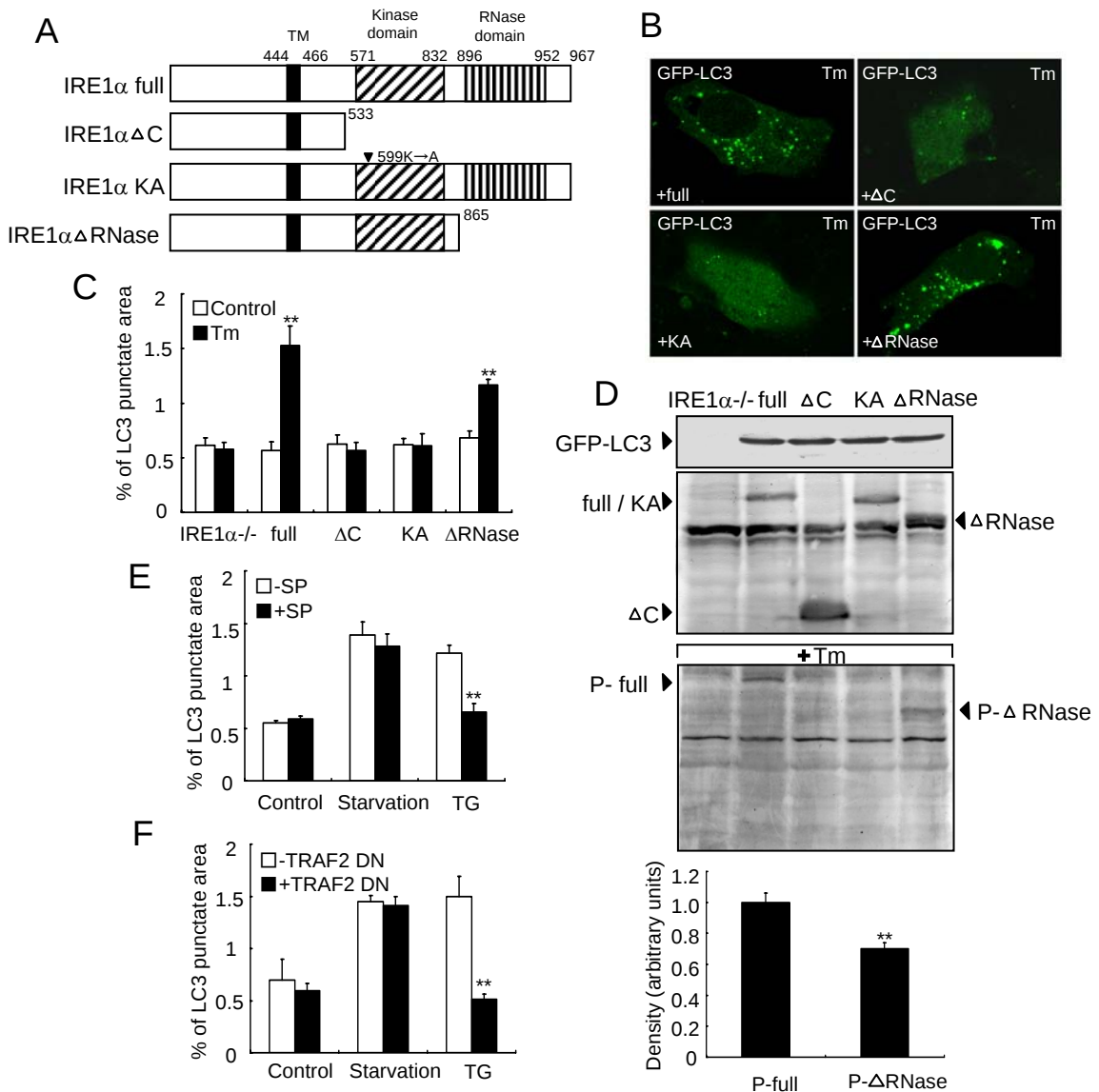


図7. 小胞体ストレスによるオートファジーには、IRE1-JNK経路が必要である

A. 実験に用いたIRE1α変異体の構造。

B. IRE1αノックアウト細胞に、GFP-LC3と各変異体を共導入し、2時間のTm刺激をしたときのGFP-LC3の蛍光顕微鏡による観察。

C. B.のGFP-LC3ドット面積の定量化。細胞全体の面積に対するGFP-LC3面積の割合をグラフで示した。グラフのデータは平均±SDで示す。 **P<0.01。

D. (上段)各変異体をIRE1αノックアウト細胞に導入したときの、GFPまたはIRE1αのウェスタンブロッティング。(中段)それぞれの細胞に2時間のTm刺激を行ったのち細胞を回収し、IRE1αのリン酸化抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。(下段)そのリン酸化レベルをグラフにしたもの。グラフはバンドの強さをScion Imageを用いて測定し、Arbitrary Unitsとして示した。グラフのデータは平均±SDで示す。 **P<0.01。

E. 細胞にGFP-LC3を導入し、JNKインヒビターSP600125 (SP)で前処理したものとしていないのとは、それぞれTG刺激を行ったときの、GFP-LC3ドットの面積を定量化した。グラフのデータは平均±SDで示す。 **P<0.01。

F. 細胞にGFP-LC3と、TRAFのドミナントネガティブ(DN)を同時に導入したものとしていないのとは、それぞれTG刺激を行ったときの、GFP-LC3ドットの面積を定量化した。グラフのデータは平均±SDで示す。 **P<0.01。

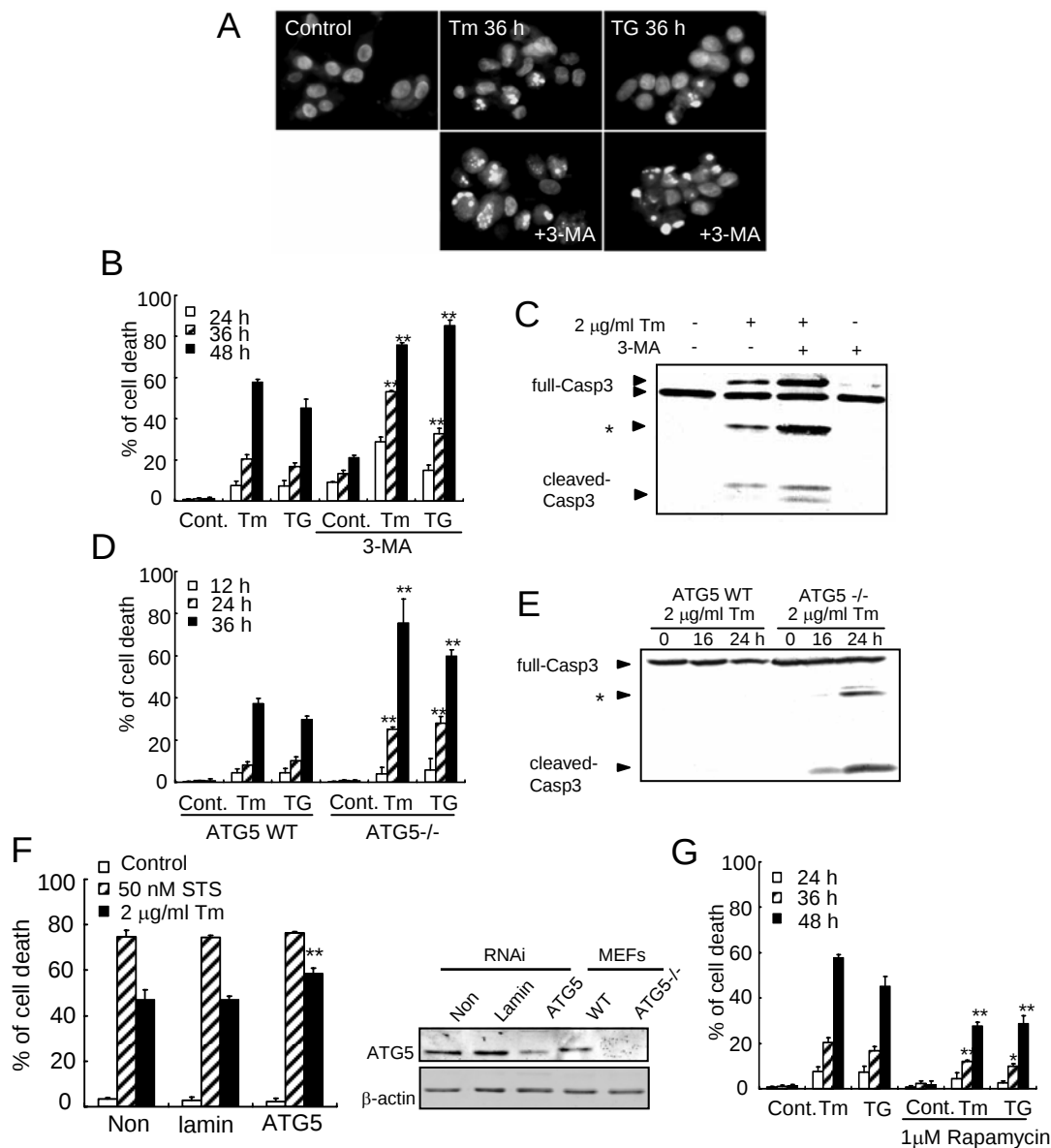


図8. オートファジーは小胞体ストレスによる細胞死から細胞を保護する

A. オートファジー阻害剤3-MAを前処理した細胞としていない細胞にそれぞれTm、TG刺激を行い、36時間後にヘキスト染色を行って、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

B. Aの細胞をそれぞれカウントして定量化した。細胞全体の数に対する、核の断片化・濃縮を起こしている細胞数の割合を示した。グラフのデータは平均±SDで示す。 **P<0.01。

C. Bの細胞(Tm24時間刺激のもの)を可溶化してウエスタンブロッティングを行い、カスプー3の活性化を観察した。*: 非特異的なバンドを示す。

D. 野生株MEFsとATG5ノックアウトMEFsを用いて、Tm、TG刺激を行ったときの細胞死をカウントした。細胞全体の数に対する、核の断片化・濃縮を起こしている細胞数の割合を示した。グラフのデータは平均±SDで示す。 **P<0.01。

E. Dの細胞を可溶化してウエスタンブロッティングを行い、カスプー3の活性化を確認した。

F. HeLa細胞を用いて、ATG5のsiRNAを導入し、各種刺激を行って細胞死数をカウントした。右図はsiRNAを導入したときのATG5タンパク質をウエスタンブロッティングにて確認したものである。

G. MEF細胞に、ラパマイシンを前処理したものとしていないものにそれぞれERストレス刺激を行い、細胞死数を定量化した。細胞全体の数に対する、核の断片化・濃縮を起こしている細胞数の割合を示した。グラフのデータは平均±SDで示す。 **P<0.01。

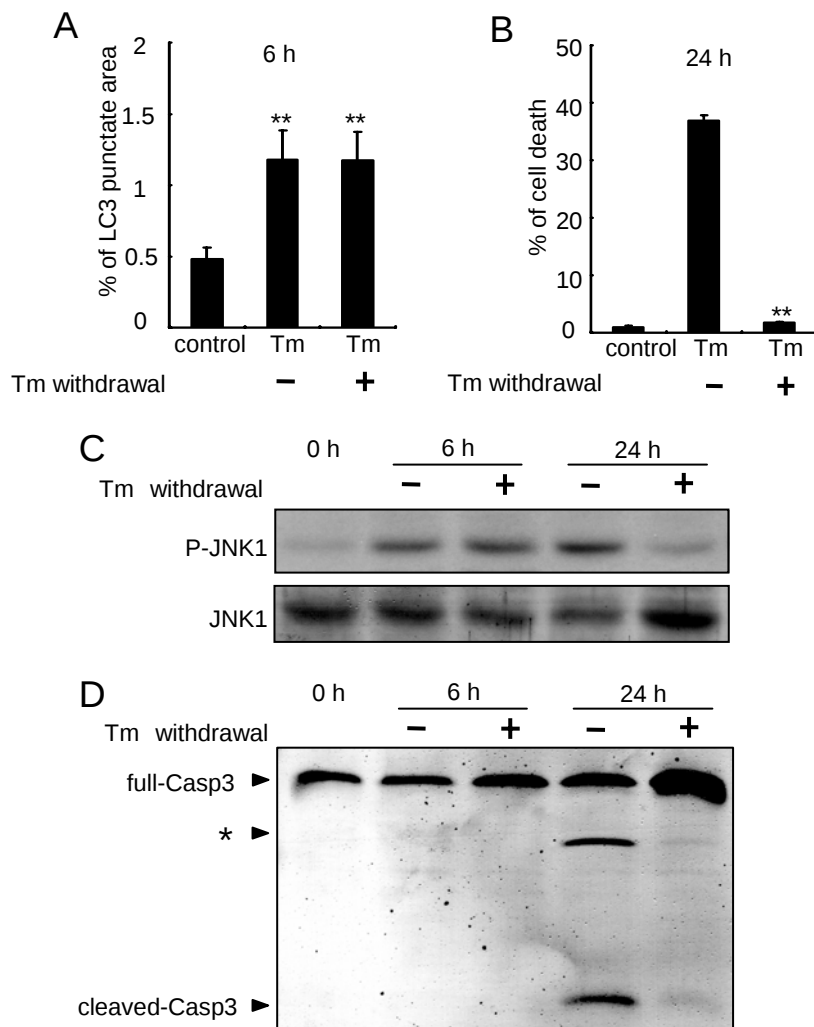


図9. 初期のJNK活性が小胞体ストレス誘導オートファジーに必要である
MEFsは0.5 $\mu\text{g/ml}$ Tmにて1時間処理し、その後シャーレをPBSで洗浄し、Tmを取り除いた (Tm withdrawal)。 Tmを除いた細胞と除いていない細胞において、
A. 6時間後のオートファゴソーム形成
B. 24時間後の細胞死 (ヘキスト染色による核濃縮)
C. 6時間後、24時間後のJNK活性
D. Cと同じサンプルにおけるカスパー3活性
をそれぞれ観察した。 A、Bのグラフのデータは平均 $\pm$ SDで示す。 ** $P < 0.01$ 。