

博士論文番号：0481037

小胞体ストレス応答における脂質代謝関連因子の転写誘導

山田 誠子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座

(河野 憲二 教授)

平成 19 年 1 月 29 日提出

目次

1. 序論	3
2. 材料と方法	
2.1 Lipoprotein-deficient serumの作成	10
2.2 細胞の培養と薬剤処理	10
2.3 ノザンブロット解析	10
2.4 プラスミド構築	11
2.5 ルシフェラーゼアッセイ	12
2.7 HeLa細胞を用いた細胞分画	12
2.8 ウェスタンブロット解析	12
2.6 HEL細胞を用いた蛍光抗体染色	17
3. 結果	
3.1 動物細胞における小胞体ストレス応答遺伝子の探索	18
3.2 STARD4は小胞体ストレスに応答して発現誘導される	21
3.3 小胞体ストレスによるSTARD4遺伝子の発現誘導はプロモーター 依存的である	21
3.4 STARD4遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導にATF6が関与 している	26
3.5 STARD4遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導に ERSE様配列2が関与している	26
3.6 STARD4遺伝子は、ストレス応答初期に特徴的な発現誘導を受ける	34
3.7 STARD4 mRNAのストレス処理後の分解速度	34
3.8 STARD4は細胞質に局在する	40
3.9 出芽酵母における、小胞体ストレス応答経路の活性化により誘導 される脂質代謝関連遺伝子	40
4. 考察	46
5. 謝辞	49
6. 参考文献	50

1. 序論

真核生物において、小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の合成に重要な働きを行う細胞内小器官である。分泌タンパク質や膜タンパク質は、小胞体内腔で糖鎖付加やジスルフィド結合の形成などの修飾を受けて機能的な立体構造へと折り畳まれ、その後ゴルジ体以降の各細胞小器官や細胞外へと輸送される。しかし、グルコース飢餓や小胞体内の酸化的環境の攪乱、小胞体からのカルシウムの流出などは、小胞体の負担の増大や機能低下をもたらす。これらのストレスは小胞体ストレスと呼ばれるが、小胞体ストレスが惹起されるとタンパク質は構造異常なタンパク質となる。この異常タンパク質は小胞体の厳密な品質管理機構によりゴルジ体以降へ輸送されず、小胞体に蓄積する [1]。構造異常なタンパク質が長時間小胞体に蓄積することは細胞にとって非常に有害であり、やがて細胞はアポトーシスを起こし死滅する [2]。このような状況を回避するために、細胞は小胞体ストレス応答を引き起こして自身を防御する (Fig.1) [3-8]。小胞体ストレス応答の一つとして特に研究されているのが、小胞体分子シャペロンやフォールディング酵素などの遺伝子発現誘導機構である [1, 3, 9]。この機構は、酵母や動物細胞において特に研究が進められている。発現した小胞体シャペロンやフォールディング酵素は、構造異常タンパク質が凝集するのを防いで、再び正しい形に折り畳まれるのを介助する。

この遺伝子発現誘導機構で働く因子として、酵母においては、現在までに小胞体膜局在型センサー分子 Ire1p (Inositol requirement 1) と、その下流の転写因子 Hac1 (homologus to ATF/CREB 1) が知られている [1, 9]。小胞体ストレスがおきると、Ire1 が構造異常タンパク質を感知して 2 量体化・自己リン酸化し、自身の RNase 領域を活性化して、Hac1 mRNA の特異的スプライシングを行う。スプライシングされた Hac1 mRNA からは活性型転写因子が翻訳され、標的遺伝子の上流プロモーター領域に存在するシスエレメント、UPRE (unfolded protein response element) を介して、下流遺伝子の転写誘導を行う。

動物細胞では小胞体膜局在型のセンサー分子が Ire1p のみでなく 3 つ存在するなど、この遺伝子発現機構はより複雑化している。小胞体ストレスを感知する小胞体膜局在型のセンサー分子として、PERK (PKR like ER kinase)、ATF6 (Activation transcription factor 6)、および酵母 Ire1p オルソログである IRE1 α の 3 つがそれぞれ重要な働きをする [10]。PERK は小胞体ストレスにより他量体化・自己リン酸化して自身の kinase 領域を活性化し、翻訳開始因子 eIF2- α のリン酸化を行う。eIF2- α のリン酸化によって、40S rRNA の mRNA への結合が阻害され、その結果、5'UTR 領域に short ORF を持つ CREB/ATF ファミリーの転写因子 ATF4 (Activation transcription factor 4) の特殊な翻訳が促進される [10, 11]。

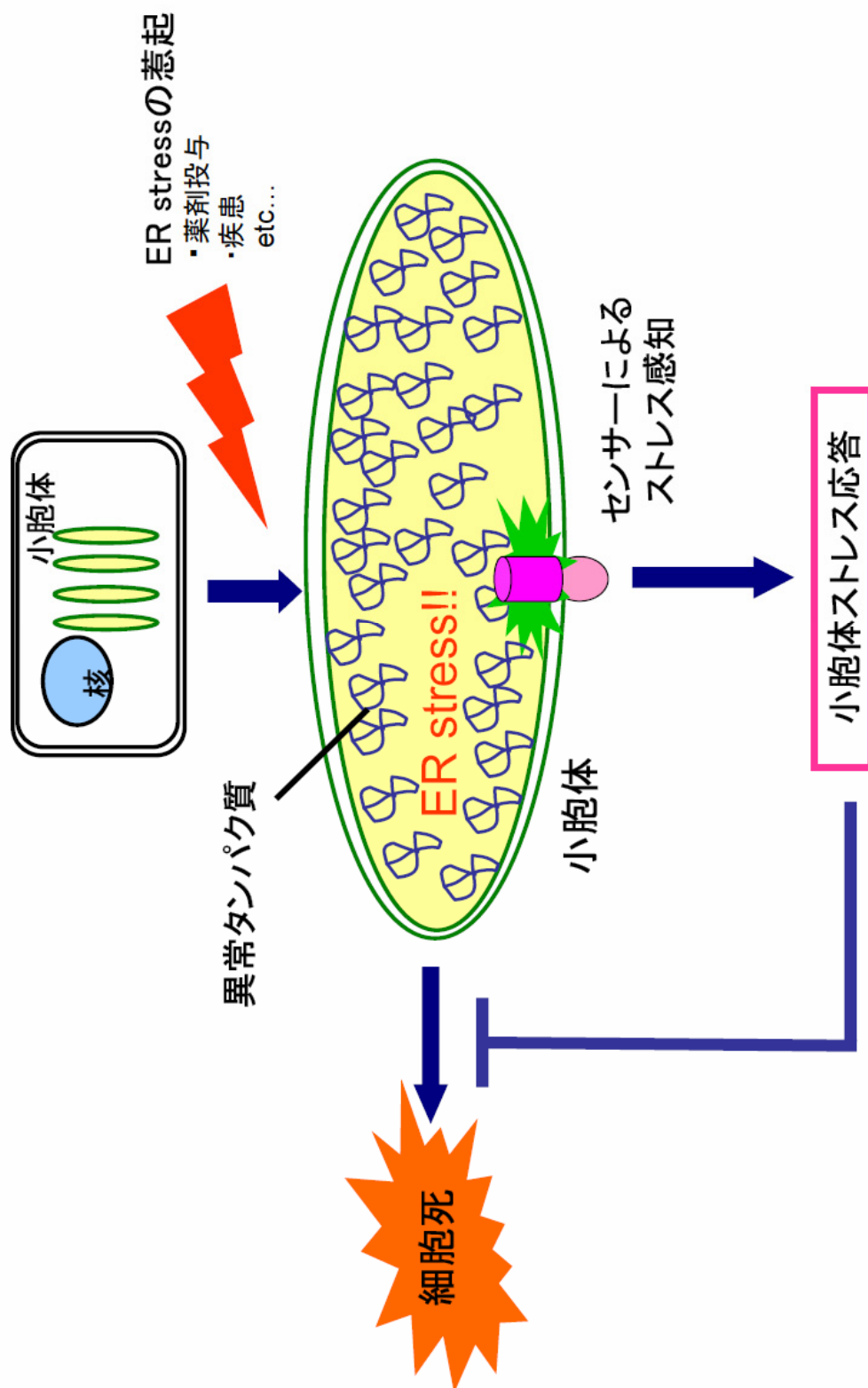


Fig.1 小胞体ストレス応答

Fig.1 小胞体ストレス応答

グルコース飢餓や小胞体内の酸化的環境の攪乱、小胞体からのカルシウムの流出などの小胞体ストレスにより、小胞体内のタンパク質は構造異常になり、小胞体に蓄積する。構造異常なタンパク質が長時間小胞体に蓄積することは細胞にとって非常に有害であり、やがて細胞はアポトーシスを起こし死滅する。このような状況を回避するために、細胞は小胞体ストレス応答を引き起こして自身を防御する

活性型となった ATF4 は、標的遺伝子のプロモーター領域に見られる C/EBP-ATF 結合配列 (TTGCATCA) [12]や ATF/CRE 結合配列(TGACGTC/AG/A) [13]を介して、下流遺伝子の転写調節を行う。ATF6 の場合は、小胞体ストレス時にゴルジ体へ移行し、site-1 protease と site-2 protease による限定分解を受け、活性型転写因子に変化して核へ移行する[14]。活性型になった ATF6 は、標的遺伝子のプロモーター領域上にある ERSE (ER stress response element、CCAAT-N9-CCACG) [15]や ERSE- II (ATTGGNCCACG) [16]を介して下流遺伝子を転写誘導する。多くの小胞体分子シャペロンはそのプロモーター領域に ERSE を有し、ATF6 による発現誘導を受けることが知られている [15]。IRE1 α は、小胞体ストレス時に二量体化・自己リン酸化して自身の RNase 領域を活性化し、転写因子 XBP1 (X-box binding protein 1) mRNA の特殊なスプライシングを誘導する。スプライシングされた XBP1 mRNA からは活性型 XBP1 が翻訳される。活性型 XBP1 は ERSE、あるいは UPRE (TGACGTGG/A)配列を介して下流遺伝子の転写調節を行うとされる [17, 18]。

最近、この遺伝子発現誘導機構はストレスの時間依存的に多段階的に活性化されることが報告された [19]。その報告の中では、ATF6 は小胞体ストレスの初期段階で機能し、IRE1-XBP1 経路は遅れて活性化されることが明らかにされている。例えば小胞体関連分解に関与する EDEM (ER degradation enhancing α -mannosidase like protein)の小胞体ストレス時の発現誘導は、主要な ER 分子シャペロンである BiP と比べて遅れる。これは、BiP が ATF6 と Ire1-XBP1 経路によって発現誘導されるのに対し、EDEM は Ire1-XBP1 経路のみで発現誘導されるために起こる現象であると結論付けられている。また、近年のマイクロアレーを用いた解析などから、小胞体ストレス時に発現誘導される分子はシャペロンやフォールディング酵素に限らず多種多様であり、いろいろな手段で小胞体ストレスを緩和しようとする細胞の働きが明らかになってきた [20-22]。ゆえに新たな小胞体ストレス応答遺伝子の発見やその発現制御メカニズムの解明は、小胞体ストレス応答において未だ知られていない側面を明らかにする上で重要であるといえる。

そこで我々は、動物細胞において小胞体ストレスにより誘導される新規遺伝子の探索を試みた。方法としては、データベース上に登録されていない新規遺伝子の探索も可能なツールとして近年注目されているサブトラクション法を用いた。その結果、小胞体分子シャペロンであり、HSP70 ファミリーに属する BiP/GRP78 [2]、同じく小胞体分子シャペロンで HSP90 ファミリーに属する GRP94 [2]、小胞体ストレス由来のアポトーシスにおいて機能する転写因子 CHOP [2]、小胞体関連分解で機能すると考えられている Herp [23]の他に、現在までに小胞体ストレス応答では誘導されることが報告されていない START domain

containing 4 (STARD4) を得ることができた (Fig.2, H13 年度山口氏修士論文)。
本論文では、今回の新規遺伝子の探索によって得られた STARD4 遺伝子の、発
現誘導機構の解析を中心に報告する。

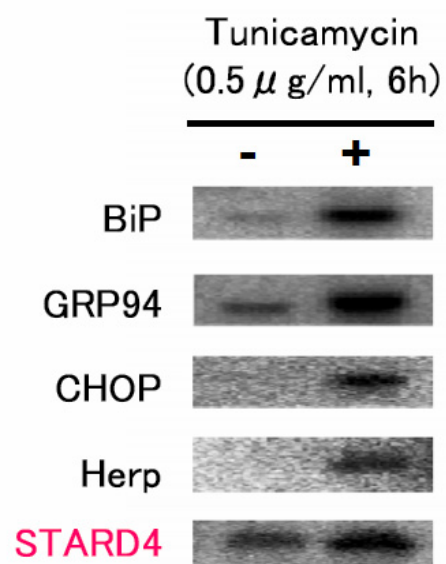


Fig.2 サブトラクション法を用いた小胞体ストレス応答遺伝子のスクリーニング (H13年度山口氏修士論文より抜粋)

Fig.2 サブトラクション法を用いた小胞体ストレス応答遺伝子のスクリーニング (H13 年度山口氏修士論文より改変)

tunicamycin ($0.5 \mu\text{g/ml}$, 6 h)でストレス処理を行った HeLa 細胞と無処理の細胞から全 RNA を抽出し、PCR-select subtraction kit (Clontech)を用いて小胞体ストレス依存的に発現する遺伝子のスクリーニングを行った。図は確認のためのノザンブロット解析である。 $1 \mu\text{g/ml}$ 、6 h でストレス処理を行った細胞と無処理の細胞から全 RNA を抽出し、 $5 \mu\text{g/lane}$ を 1 %ホルマリン変性アガロースゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。シグナルの検出にはサブトラクションで得られた cDNA 断片を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ にてラベルし、プローブとして用いた。

2. 材料と方法

2.1 Lipoprotein-deficient serumの作成

脂質欠損状態での細胞培養のため、脂質欠損血清を作成した [24]。Fetal bovine serum をポリアロマチューブに入れ、密度を KBr にて最終密度 1.215 g/ml に合わせ、36 h、4 °C、250000 ×g で遠心した。その後、チューブの上部を切り落とし、チューブの上清に浮いている黄色の脂質をパスツールピペットで静かに取り除いた。この血清を透析チューブに移し、1 ×PBS に対して 60 h、4 °C 透析した。コントロールの血清は、Fetal bovine serum の密度を KBr で 1.215 g/ml に合わせ、透析チューブに入れ、1 ×PBS に対して 60 h、4 °C 透析した。

2.2 細胞の培養と薬剤処理

HeLa 細胞とHEL細胞は 10 % FBSもしくは Lipoprotein-deficient serumを含む alpha-MEMまたはD-MEM培地(共にSIGMA)を用いて 37 °C、5 % CO₂環境下で培養した。細胞へのストレス処理は、tunicamycin (SIGMA, 最終濃度 0.5–3 μg/ml)、Thapsigargin (SIGMA, 最終濃度 0.05 μg/mlもしくは 0.1 μM)、DTT (nakarai tesque, 最終濃度 1 mM)、Brefeldin A (Wako, 最終濃度 2.5 μg/ml)、を培地に添加することによって行った。培養細胞からの全RNA抽出にはISOGEN (NIPPON GENE)を用いた。

2.3 ノザンブロット解析

出芽酵母全RNAは、当研究室木俣助手から供与された [22]。全RNAをホルマリン変性アガロース (1 %) ゲルにて電気泳動し、Hybond-N膜 (Amersham) に転写した。ハイブリダイゼーションは42 °C、標準的溶液中 [25]、または65 °C、チャーチ溶液中 [26]で行った。膜は2 ×SSC / 0.1 % SDSで2回洗浄、または6 ×SSC / 0.1 % SDS、2 ×SSC / 0.1 % SDS、および1 ×SSC / 0.1 % SDSで2回ずつ洗浄した。ハイブリダイゼーションシグナルの検出にはBAS2500システム (Fuji film) を用いた。BiP/GRP78、GRP94、CHOP、Herp、STARD4、HMG CoA reductase、EDEM、GAPDH、INO1、SCS3のプロブ作成にはRandom primer cDNAラベリングキット (Takara) を利用した。

2.4 プラスミド構築

pGL3-hBiP(-132)は岩脇博士（理研）から供与された（未発表データ）。pGL3-hSTARD4 (-306)の作成のために、HeLa 細胞由来のゲノム DNA を鋳型に、oligo DNA; 5'-CGG GGT ACC CAC TGT GAT CCT TCA CTT CG-3' と oligo DNA; 5'-CCG CTC GAG AGG CGG GCC GAG CCC CCA GC-3' を用いて PCR を行い、産物を KpnI/ XhoI で消化し、pGL3-basic (Promega)に挿入した。このプラスミドは、STARD4 プロモーター解析の際、レポータープラスミドとして使用された。内部標準には pRL-SV40 (Promega)を用いた。DNA 断片である hATF6 (1-373) Flag はヒト ATF6 cDNA を鋳型に oligo DNA; 5'-CCC AAG CTT CTC GAG AAA TGG GGG AGC CGG CTG GGG TTG C-3' と oligo DNA; 5'-CGC GGA TCC CTC GAG CTA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC ACT AGG GAC TTT AAG CCT CTG G-3' を用いて PCR によって合成された。DNA 断片である hATF6 (171-373) Flag はヒト ATF6 cDNA を鋳型に oligo DNA; 5'-CCC AAG CTT CTC GAG CCA TGA TTC AGG TGA ATT CAA AAC CTT CAA TTC AGC-3' と oligo DNA; 5'-CGC GGA TCC CTC GAG CTA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC ACT AGG GAC TTT AAG CCT CTG G-3' を用いて PCR によって合成された。pCAX-hATF6 (1-373) Flag と pCAX-hATF6 (171-373) Flag はそれぞれの DNA 断片、hATF6 (1-373) Flag と hATF6 (171-373) Flag を pCAX [27]の HindIII/BamHI サイトに挿入することによって作成されたトランケート型 ATF6 の発現プラスミドである。ERSE 様配列に変異を導入したレポータープラスミド pGL3-hSTARD4 (-306) mut1、pGL3-hSTARD4 (-306) mut2、及び pGL3-hSTARD4 (-306) mut3 は、pGL3-hSTARD4 (-306) をテンプレートに overlap PCR 法を用いて作成された。使用したオリゴヌクレオチドはそれぞれ、5'-AAC CAA TCC AAA CCT Gac tta AAC CCC AGA CAT CCA-3'、5'-ACC AAT CAG CCC TCC cac atC TCC CGC-3'、および 5'-CAA TCC GAA CAA Gat aca GTT GTT CGG GCC A-3'である。pGL3-hSTARD4 (-306) mut1-2、pGL3-hSTARD4 (-306) mut1-3、pGL3-hSTARD4 (-306) mut2-3、pGL3-hSTARD4 (-306) mut1-2-3 は上記の変異導入したレポータープラスミドをテンプレートに用いて、overlap PCR 法を用いて作成された。C 末端側を FLAG タグでエピトープ標識した発現プラスミド pCAGGS-hSTARD4-FLAG を作成した。tunicamycin 処理 (1 μ g/ml、6 h) した HeLa 細胞から全 RNA を抽出し、1 μ g を鋳型にして、oligo DNA: 5'-GGA GGC TGA GGT AGA ATA ACC-3'を用いて逆転写反応を行った。反応産物をさらに oligo DNA: 5'-GAA GGC CTG TCT GAT GTT GC-3'、5'-TGA TCA TAC CAC TGC CCT CC-3'を用いて hSTARD4 cDNA 断片を合成した。さらに oligo DNA: 5'-CCG GAA TTC CCA CCA TGG AAG GCC TGT CTG ATG TTG C-3'、5'-CCG GAA TTC TCA CTT GTC ATC GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC TAA AGC TTT TCG TAA ATC ACC-3'を用いて hSTARD4-FLAG cDNA 断片

を合成し、pCAGGS ベクターに組み込んで pCAGGS-hSTARD4-FLAG プラスミドを作成した。Fig.3 に、使用したプラスミドの図を収めた。

2.5 ルシフェラーゼアッセイ

HeLa細胞を 24 well plateに 3×10^4 cells/wellで植え継いだ。18 時間後、Lipofectamine (Invitrogen) を用いてレポータープラスミドとpRL-SV40 をそれぞれ 193ng、7ngトランスフェクトした。トランスフェクションから 16 時間後、小胞体ストレス処理は 9 時間行った。Dual-luciferase assay system (Promega)を使用してプロモーター活性の測定を行った。発光レベルはルミノメーター (AB-2200-R ATTO)を用いて測定した。結果は 3 回の実験の平均 $\pm$ S.Dで示されている。STARD4 プロモーターに対するATF6 の影響を測定するために、ATF6 発現プラスミド (エフェクタープラスミド)200 ngをレポータープラスミド 193 ng, pRL-SV40 7 ngとともにトランスフェクションした。ネガティブコントロールとしてpCAXを用いた。

2.6 HeLa細胞を用いた細胞分画

リン酸カルシウム法を用いて、HeLa細胞にpCAGGS-hSTARD4-FLAGを導入した。HeLa細胞を 10cm Culture dish (Corning) 10 枚に 1.0×10^6 cell/dishで培養し、18 時間後培地交換を行った。DNA溶液 (1 mg/ml) 2 μ l、TE 30 μ l、DW 400 μ l、2.5M CaCl_2 50 μ lを 2 $\times$ HBS pH 7.0 (50 mM HEPES、280 mM NaCl、1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 500 μ lに滴下してDNA-リン酸カルシウム沈殿を形成し、20 分間静置してDNA-リン酸カルシウム沈殿を形成し、培地交換後 2 時間の細胞に 50 μ lずつ滴下した。6 時間後Hank's溶液にて洗浄し、通常の培地に交換した。トランスフェクションから 36 時間後セルスクレイパーを用いて細胞を回収した。細胞をPBSで洗浄後、homogenize buffer (5m M Na_2PO_4 、150 mM NaCl、5 mM MgCl_2 、250 mM sucrose)に懸濁し、1ml容downce homogenizer (WHEATON Hussite fit)にて細胞を破碎し、3000 rpm、4 $^\circ\text{C}$ 、10 分遠心して上清を回収した。1 M NaCl、10 M urea、2 M Na_2CO_3 、10 % Triton-Xと回収した上清を等量混ぜて懸濁し、4 $^\circ\text{C}$ 、1 時間静置した後、卓上超遠心機 (veckman)にて 100000 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$ 、1 時間遠心した。上清と沈殿に分け、沈殿をhomogenize bufferで洗浄して、さらに 40 μ lのbufferに懸濁した。得られたサンプルはウエスタンブロット解析に用いた。

2.7 ウエスタンブロット解析

細胞ライセートより調整されたサンプル 5 μ l、DW 8 μ l、1M DTT 2 μ l、sample

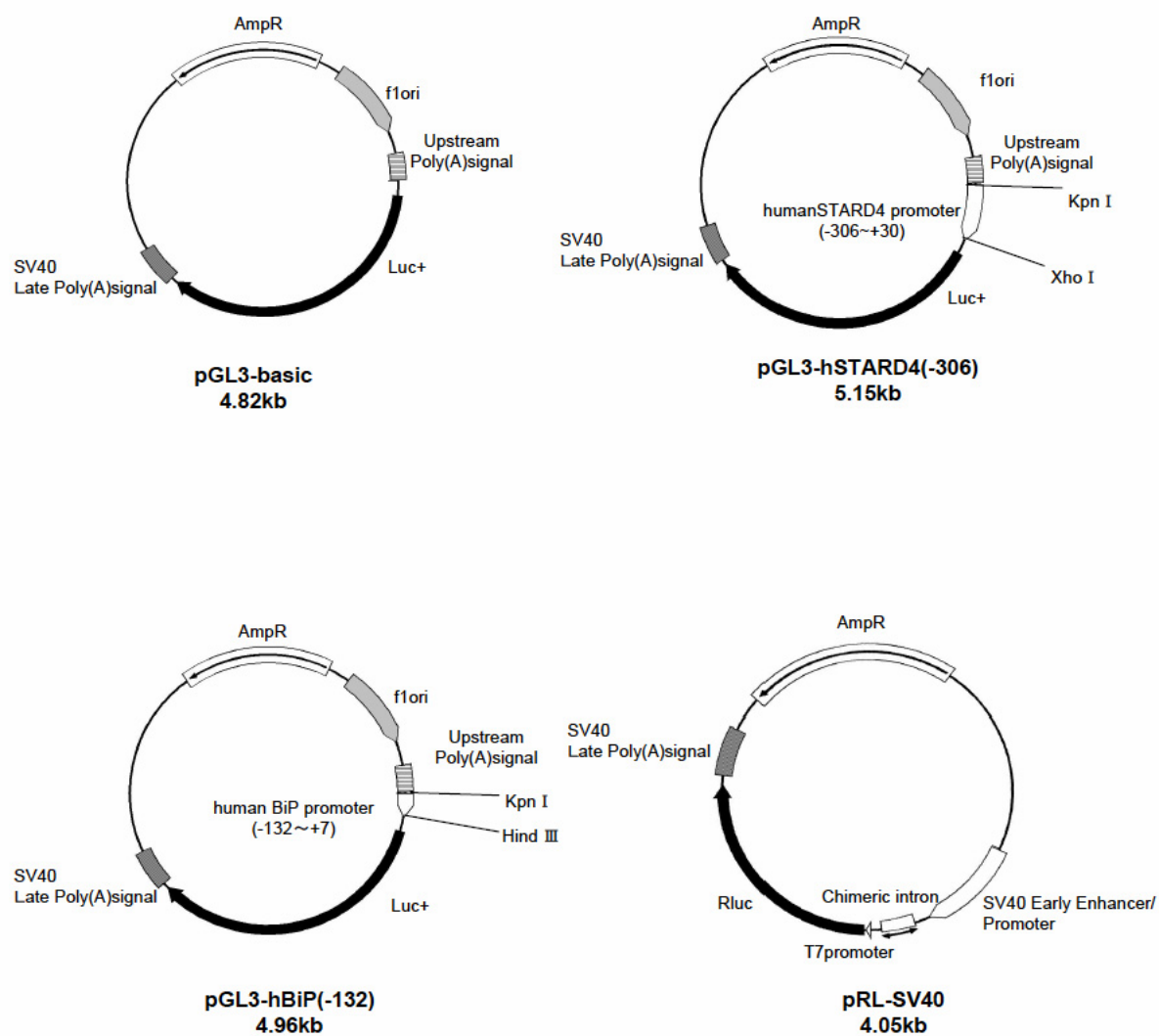


Fig. 3 (A) 使用したプラスミド

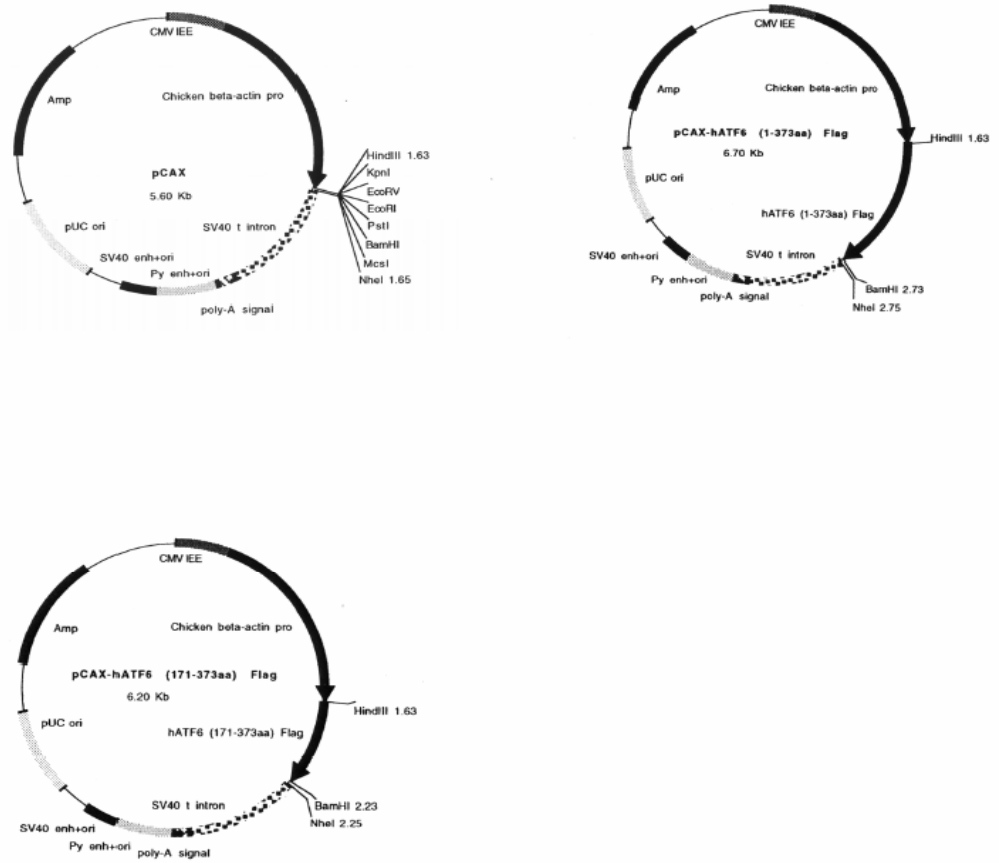


Fig. 3 (B) 使用したプラスミド

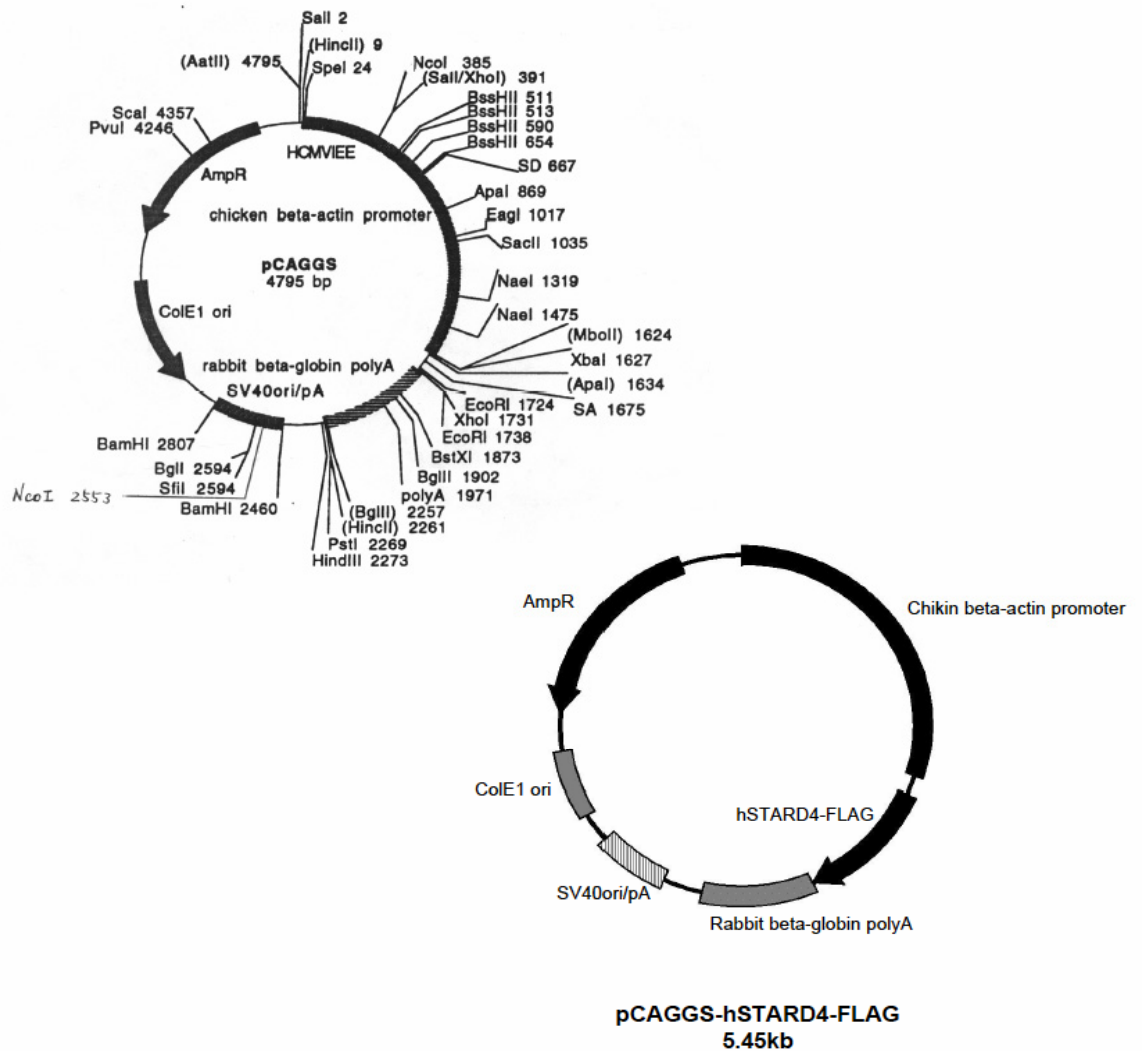


Fig. 3 (C) 使用したプラスミド

Fig.3 使用したプラスミド

- (A) レポータープラスミド (ルシフェラーゼアッセイに使用)
- (B) エフェクタープラスミド (ルシフェラーゼアッセイの際、活性型 ATF6 もしくはドミナントネガティブ型 ATF6 過剰発現のために使用)
- (C) ヒト STARD4 過剰発現用プラスミド

buffer (0.2 M Tris-HCl pH 6.8、8 % SDS、0.04 % Bromophenol blue、40 % Glycerol) 5 μ l を懸濁して 96 $^{\circ}$ C、5 分 boil しこれを泳動サンプルとする。10 % アクリルアミドゲルでサンプルを泳動し、ニトロセルロース膜 (Whatman) に転写した。ブロッキング、抗体希釈には 5 % skimmilk / 0.1 % Tween20-PBS を用いた。一次抗体には mouse anti-FLAG M2 (SIGMA、500 倍希釈)、rat anti-HSC70 (STRESSGEN、10000 倍希釈)、rabbit anti-Calreticulin (ABR、1000 倍希釈)、rabbit anti-Calnexin (STRESSGEN、1000 倍希釈) を用いて 1 時間、室温で反応させた。2 次抗体には anti-mouse IgG-HRP (DAKO、1000 倍希釈)、anti-rat-IgG-HRP (DAKO、1000 倍希釈)、anti-rabbit IgG-HRP (amersham pharmacia biotech、1000 倍希釈) を用いて、室温 1 時間で反応させ、ECL (Amersham) で発色させ、LAS-1000 (Fuji film) にてシグナルを観察した。

2.8 HEL細胞を用いた蛍光抗体染色

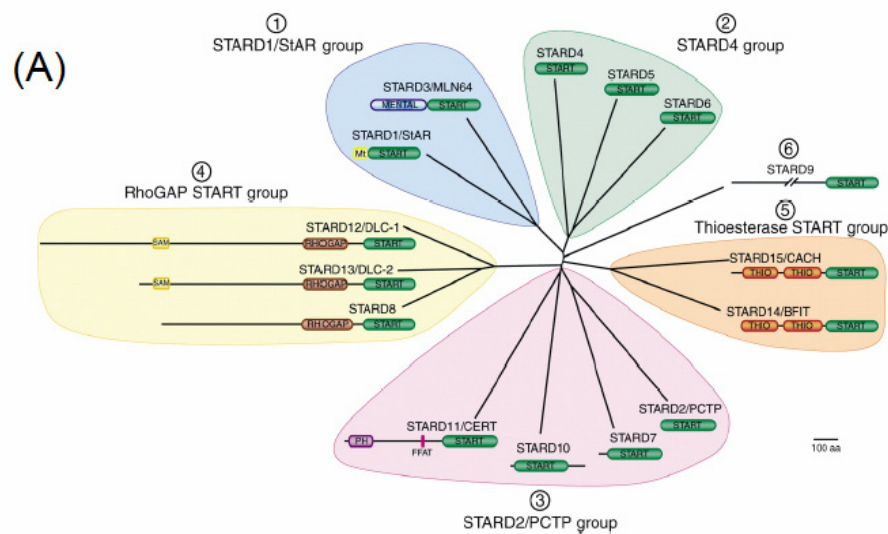
リン酸カルシウム法を用いてHEL細胞にpCAGGS-hSTARD4-FLAGを導入した。HEL細胞を 4well culture slide (becton Dickinson) に 1×10^4 cell/well で培養し、18 時間後に培地交換を行った。DNA 溶液 (1 mg/ml) 1 μ l、TE 1.5 μ l、DW 20 μ l、2.5M CaCl_2 2.5 μ l を 2 $\times$ HBS pH 7.0 (50 mM HEPES、280 mM NaCl、1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 25 μ l に滴下し、20 分間静置してDNA-リン酸カルシウム沈殿を形成し、培地交換後 2 時間の細胞に 50 μ l づつ滴下した。6 時間後Hank's溶液にて洗浄し、通常の培地に交換した。30 時間後に細胞を 3.7 % formaldehyde(nakarai tesque)/ PBSで室温、30 分で固定し、その後Methanolで-20 $^{\circ}$ C、5 分でpermeabilizeした。その後 3 % BSA/PBSで 4 $^{\circ}$ C、overnightでblockingし、PBSで 5 分洗浄した。rabbit-anti calnexin (STRESSGEN、3 %BSA/PBSで 400 倍希釈)、rat anti-H S C 70 (STRESS GEN、3 %BSA/PBSで 400 倍希釈)で 1 時間、室温で反応後、PBSで 3 分、4 回ずつ洗浄し、anti-rabbit IgG rhodamine (3 % BSA/PBSで 400 倍希釈)、anti-rat IgG Cy3 (jackson ImmunoResearch、3 %BSA/PBSで 400 倍希釈)で 1 時間、室温で反応させた。PBSで 3 分、4 回ずつ洗浄後、mouse anti-FLAG M2 (SIGMA、3 % BSA/PBSで 400 倍希釈)で一時間、室温で反応させ、さらにPBSで 3 分、4 回ずつ洗浄してanti-mouse IgG FITC (BIOSOURCE INTERNATIONAL、3 % BSA/PBSで 400 倍希釈)で 1 時間、室温で反応させPBSで 3 分、4 回ずつ洗浄し、VECTASHIELD (VECTOR)にて封入し、アポトーム (carl zeiss) にて 100 倍で検鏡した。

3. 結果

3.1 動物細胞における小胞体ストレス応答遺伝子の探索

小胞体ストレス応答遺伝子のスクリーニングを行う目的で、われわれは PCR-select subtraction kit (Clontech) を用いて、糖鎖付加阻害剤 tunicamycin で誘導される遺伝子の同定を行った。得られた HeLa 細胞由来の 730 種の cDNA 断片に対し、Northern 解析によるツニカマイシン誘導性の確認を行った。うち 21 種の cDNA 断片はツニカマイシン存在下で発現上昇されることが確認された。これら 21 種の cDNA 断片のシーケンス解析を行い、National center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いてヌクレオチドデータベース検索を行った。その結果、21 種類の cDNA 断片は BiP/GRP78、GRP94、CHOP、Herp、および STARD4 遺伝子に由来するものであることがわかった(Fig.2、H13 年度山口氏修士論文)。BiP/GRP78、GRP94、CHOP、および Herp は小胞体ストレス応答遺伝子としてすでによく知られている。一方、STARD4 の小胞体ストレス応答性についてはほとんど解明されていない。そこでわれわれは、小胞体ストレス環境下での STARD4 遺伝子発現制御について研究を進めた。

哺乳動物において、STARD4 を含む STARD 分子はファミリーを形成しており、現在までに 15 種類(STARD1-15)が知られている(Fig.4A) [28]。その全てが START (steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer) ドメインと呼ばれる脂質結合領域をもっている。これらの分子の多くは脂質の輸送や代謝に関与すると報告されている。STARD ファミリーは START ドメインのアミノ酸配列情報からさらに 6 つのサブファミリーに分類でき、STARD4 は STARD5、STARD6 とともに 1 つのグループを形成する [28, 29]。ヒト STARD4 は全長 205 アミノ酸の分子であり(Fig. 4B)、極端な疎水性配列ではなく、START ドメインのほかにシグナル配列やモチーフなども見つかっていない。STARD4 の過剰発現ではステロイド産生量の上昇や酸化ステロールの結合により機能する転写因子 LXR (Liver X Receptor)の活性化が見られることから、STARD4 も脂質の輸送や代謝に関与すると示唆されている。また、STARD4 遺伝子のプロモーター領域にはシスエレメント SRE (sterol regulatory element) が存在し、脂質欠損時にはコレステロール代謝を調節する転写因子 SREBP (SRE-binding protein) 依存的に STARD4 遺伝子が発現誘導されることが報告されている [30]。



(B)

```

10      20      30      40      50      60
atggaaggcctgtctgatgttgctctcttttgcaactaaactaaaaacactotcatccag
M E G L S D V A S F A T K L K N T L I Q

70      80      90      100     110     120
taccatagcattgaagaagataagtggcgagttgctaagaaaacgaaagatgtaactgtt
Y H S I E E D K W R V A K K T K D V T V

130     140     150     160     170     180
tggagaaaaccctcagaagaatttaattggatatctctacaaagcccaaggtgttatagat
W R K P S E E F N G Y L Y K A Q G V I D

190     200     210     220     230     240
gaccttgctctatagtataatagaccatatacgcccagggccttgctcggttggattgggac
D L V Y S I I D H I R P G P C R L D W D

250     260     270     280     290     300
agcttgatgaactctcttgatattctggagaacttgaagagaattgctgtgtgatgcgt
S L M T S L D I L E N F E E N C C V M R

310     320     330     340     350     360
tacctactgctgtgcagctttggaatataattccccaagagaatttgttgatttctcc
Y T T A G Q L W N I I S P R E F V D F S

370     380     390     400     410     420
tatactgtgggtataaagaagggtcttttatctgtggaataagtottgactgggatgaa
Y T V G Y K E G L L S C G I S L D W D E

430     440     450     460     470     480
aagagaccagaatttgttcgaggatataaaccatccctgtggttggttttgtgttccactt
K R P E F V R G Y N H P C G W F C V P L

490     500     510     520     530     540
aaagacaacccaaaccagagtccttttgacaggatatattcagacagatctgcgtgggatg
K D N P N Q S L L T G Y I Q T D L R G M

550     560     570     580     590     600
attctcagtcgtcggttagatacagccatggcaagcactttaaccaacttctatggtgat
I P Q S A V D T A M A S T L T N F Y G D

610
ttacgaaaagctttatga
L R K A L *

```

Fig. 4 STARDファミリー分子とSTARD4アミノ酸配列

Fig.4 STARD ファミリー分子と STARD4 アミノ酸配列

- (A) STARD ファミリー分子は現在までに 15 種類知られている。STARD4 は STARD5、STARD6 とともに STARD4 サブファミリーを形成している。
(文献 28 より抜粋)
- (B) ヒト STARD4 分子のアミノ酸配列

3.2 STARD4 は小胞体ストレスに応答して発現誘導される

STARD4 遺伝子の各種ストレスへの応答性を調べるため、HeLa細胞に小胞体ストレス (tunicamycin)の他、酸化ストレス (H_2O_2)、浸透圧ストレス (NaCl)、熱ストレス (42 °C)を与えてノザンブロット解析を行った。結果、STARD4 遺伝子はtunicamycinで誘導されるが、その他の熱ストレス、浸透圧ストレス、酸化ストレスには応答しないことが明らかになった (Fig.5A、平成 13 年山口氏修士論文)。

一方、STARD4 遺伝子は脂質欠損時に転写因子 SREBP2 依存的に発現誘導されることが以前に報告されている[29, 30]。そこで、脂質欠損により発現誘導されるかを調べるため、脂質欠損状態で培養した HeLa 細胞の全 RNA を用いてノザンブロット解析を行った。小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin、thapsigargin では STARD4 遺伝子の誘導が確認できた。しかし、脂質欠損培地で 30 時間培養したところ、脂質欠損で誘導されることが知られる HMG-CoA reductase (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase)遺伝子[31]は発現誘導されたものの、STARD4 遺伝子は発現誘導されなかった(Fig.5B)。STARD4 の脂質欠損への応答性は、HMG CoA reductase よりも低いのかかもしれない。

3.3 小胞体ストレスによるSTARD4 遺伝子の発現誘導はプロモーター依存的である

BiP などの既知の小胞体ストレス応答遺伝子の発現誘導は、遺伝子転写開始点より数百 bp 以内のプロモーター領域に依存している [15]。そこで STARD4 遺伝子の発現誘導も同様にプロモーター領域に依存するのかを確認するため、レポーターアッセイを用いて STARD4 のプロモーター活性の測定を試みた。まず、ヒト STARD4 遺伝子転写開始点を決定するために、HeLa 細胞由来 mRNA を用いて 5' RACE 解析を行った。その結果、STARD4 の転写開始点は Fig.6 の +1 に示された点であることがわかった。この情報をもとにして STARD4 遺伝子プロモーター域 (-306~+30bp) を HeLa 細胞ゲノムからクローニングし、レポーターベクターpGL3-hSTARD4 (-306)を作成した。pGL3-hSTARD4 (-306)を HeLa 細胞に一過的に導入して小胞体ストレスを与え、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、tunicamycin 処理により約 2 倍、thapsigargin 処理では約 10 倍のプロモーター活性の上昇を示した(Fig.7A)。これらのことから、小胞体ストレスによる STARD4 遺伝子の発現誘導はプロモーター領域依存的であることが明らかになった。

この点について、他の小胞体ストレス誘導剤である DTT、brefeldin A も用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、いずれの処理においても細胞

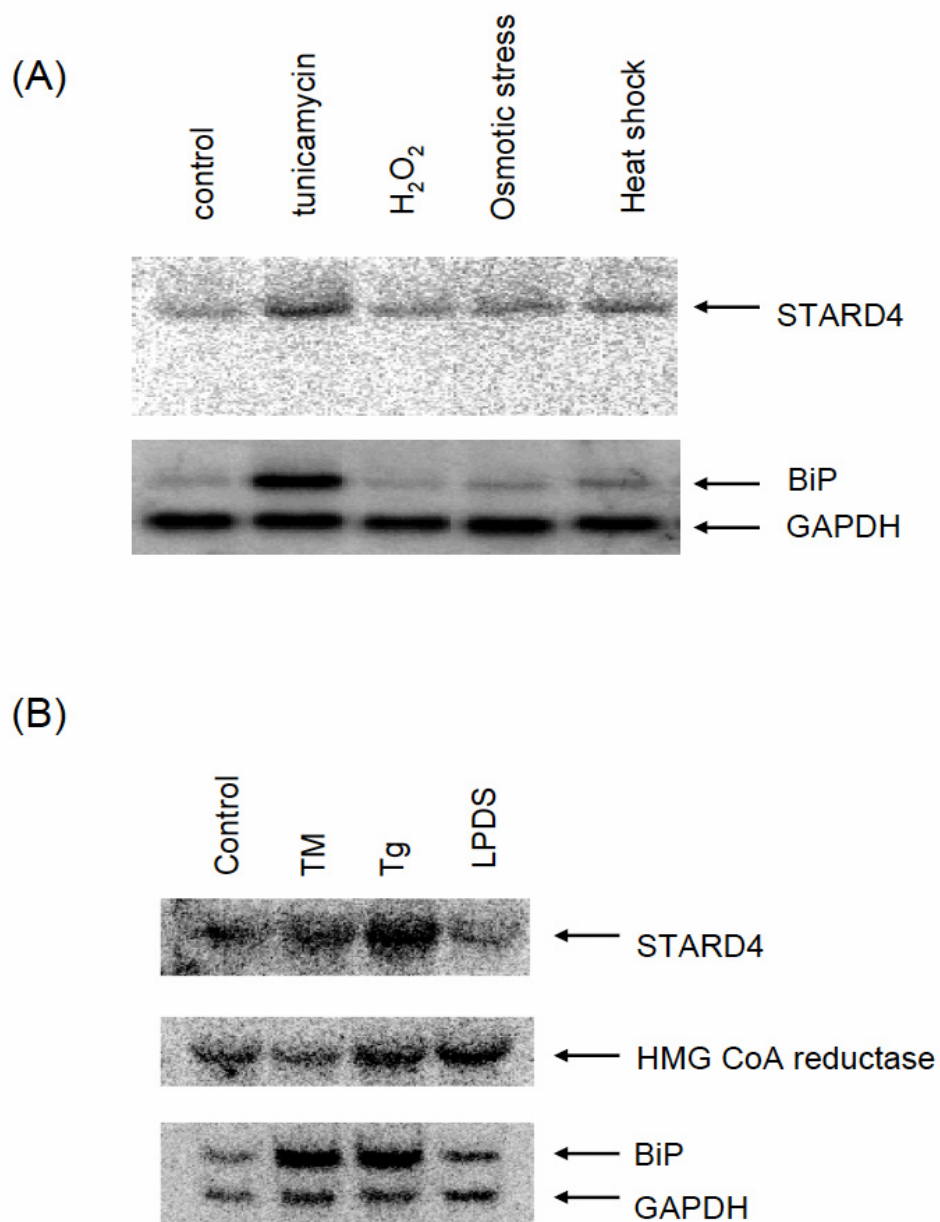


Fig. 5 STARD4遺伝子の各種ストレスへの応答性

Fig.5 ヒト STARD4 遺伝子の各種ストレスへの応答性

(A) tunicamycin ($0.5 \mu\text{g/ml}$ 、6 h)、 H_2O_2 (2 mM、0.5 h)、NaCl (400 mM、0.5 h)、Heat shock (42°C 、1 h)でそれぞれ処理をしたHeLa細胞からの全RNA ($5 \mu\text{g/lane}$)を用いて、ノザンブロット解析を行った。STARD4、BiP、GAPDHのcDNA断片をプローブとして用いた。シグナルの検出にはBAS 2500 system (Fuji film)を用いた。

(B) tunicamycin ($2 \mu\text{g/ml}$ 、6 h)、thapsigargin ($0.05 \mu\text{g/ml}$ 、6 h)、脂質欠損培地 (10 % lipoprotein-deficient serum in DMEM、30 h)で処理をした HeLa 細胞から全 RNA ($15 \mu\text{g/lane}$)を用いて、ノザンブロット解析を行った。STARD4、HMG CoA reductase、BiP、GAPDH の cDNA 断片をプローブとして用いた。シグナルの検出には BAS 2500 system (Fuji film)を用いた。

-306 CACTGTGATC CTTCACTTCG CTTTCTGTT CAATTTCTCC CAGTCGGTTT ACTGCTTGAC

-246 AAAATTCTTT CACAATTAAG TGATCACAGG ACAACCCAAC CCAA^{ac}CCAATC CAAACCTGCA

tta
-186 GGCAACCCCA GACATCCAGG GAACCCTGGC GCGGCTCGGG CCAGCCCACA CCCACGCGGA ERSE-like 1

-126 ATCATTCAT TTATCGGCCA CCAATCAGCC CTCC^{cacat}ACACGC TCCCGCGCCA GCCAATCCGA ERSE-like 2 ERSE-like 3

ataca
-66 ACAAGCGCAC GTTGTTCCGG CCACCTCCTC TCAGCGCCCC CTC⁺CCCGGAG CCCCCGGGAT

+1
-6 CGGGCCAGGG GGCGGGGCTG GGGGCTCGGC CCGCCTTGCC CTGAGGCGCT GGGTGCCTTC

+55 CAGTTGGCTG CGACCAGCGG TGACTTACAA GTTGGCTGCT GTCGCCTGCG CATCGGCGGG

+115 CCGGGAGGCT GAGCAGTACT GTTGAGAGCG GTGTGAGGTG CTTGGTAGCG CGCCGTAGCT

(intron)
+175 GCTTCCACGT CCTTGCTTCA CCTCAGGTAA AG=AGAGA AGTTATGGAA GGCTGTCTG

Fig. 6 ヒトSTARD4プロモーター領域内のERSE様配列

Fig.6 ヒト STARD4 プロモーター領域内の ERSE 様配列

ヒト STARD4 のプロモーター領域の DNA 配列。+1 は転写開始点である。3 箇所の下線部分は ERSE 様配列 1、2、3 である。Open box は 3 つのエLEMENT で共通である。Closed box の上の配列はこれらのELEMENTに入れた変異の配列である。Double box は STARD4 の initiation codon である。

は高いプロモーター活性を呈すること示された (Fig.7A)。より長いプロモーター領域、-949〜+30bp がクローニングされたレポータープラスミドを用いても、細胞は-306〜+30bp を用いたときと同程度の活性を示した(Fig.7A)。小胞体ストレスに応答することが知られている BiP のプロモーターを用いた場合にも、上記で使用したすべての薬剤に応答することを確認している(Fig.7B)。

3.4 STARD4 遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導にATF6 が関与している

ヒト STARD4 遺伝子プロモーター域 (-306〜+30) には、ERSE (CCAAT-N9-CCACG) [15] によく似た配列が3つ存在する。一般に ERSE はその CCAAT 配列に恒常的に転写因子 NF-Y が結合し、CCACG 配列には小胞体ストレス依存的に活性型 ATF6 が結合することによって活性制御を受けていると報告されている [32]。そこで、われわれはヒト STARD4 遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導は ATF6 により制御されているのではないかと考えた。この仮説を検証するために、ATF6 過剰発現下でヒト STARD4 遺伝子プロモーター域 (-306〜+30bp) の活性化レベルをルシフェラーゼアッセイで調べた。その結果、活性型 ATF6 の発現下では、BiP 遺伝子のプロモーターと同様に STARD4 遺伝子のプロモーターが活性化されることが明らかになった (Fig.8A)。これに対して、転写活性化領域を削り、DNA 結合領域のみを残したドミナントネガティブ型 ATF6 発現下では、thapsigargin に対する STARD4 遺伝子プロモーターのレポーター活性は BiP と同様完全に抑制された (Fig. 8B)。これらの結果は STARD4 遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導に ATF6 が関与していることを示唆している。

3.5 STARD4 遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導にERSE様配列 2 が関与している

BiP の小胞体ストレス依存的発現誘導には ERSE が非常に重要な役割を果たしている。このことは ERSE 中の保存的配列 (CCAAT や CCACG) に変異導入を行った実験において確かめられている [15, 32]。そこで、STARD4 遺伝子プロモーター域 (-306〜+30bp) に存在する各 ERSE 様配列の重要性を確かめるため、これらの配列に対して変異導入を行ったレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った(Fig.9A、B)。3つの ERSE 様配列すべてに変異を導入した場合、ERSE 様配列1のみを残した場合、及びERSE 様配列3のみ残した場合には、小胞体ストレスに対する応答性が約半分程度にまで低下した。しかし ERSE 様配列 2 を残した場合にはプロモーター活性はほぼ変わらなかった (Fig.9A)。そこで、STARD4 遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導にはERSE 様

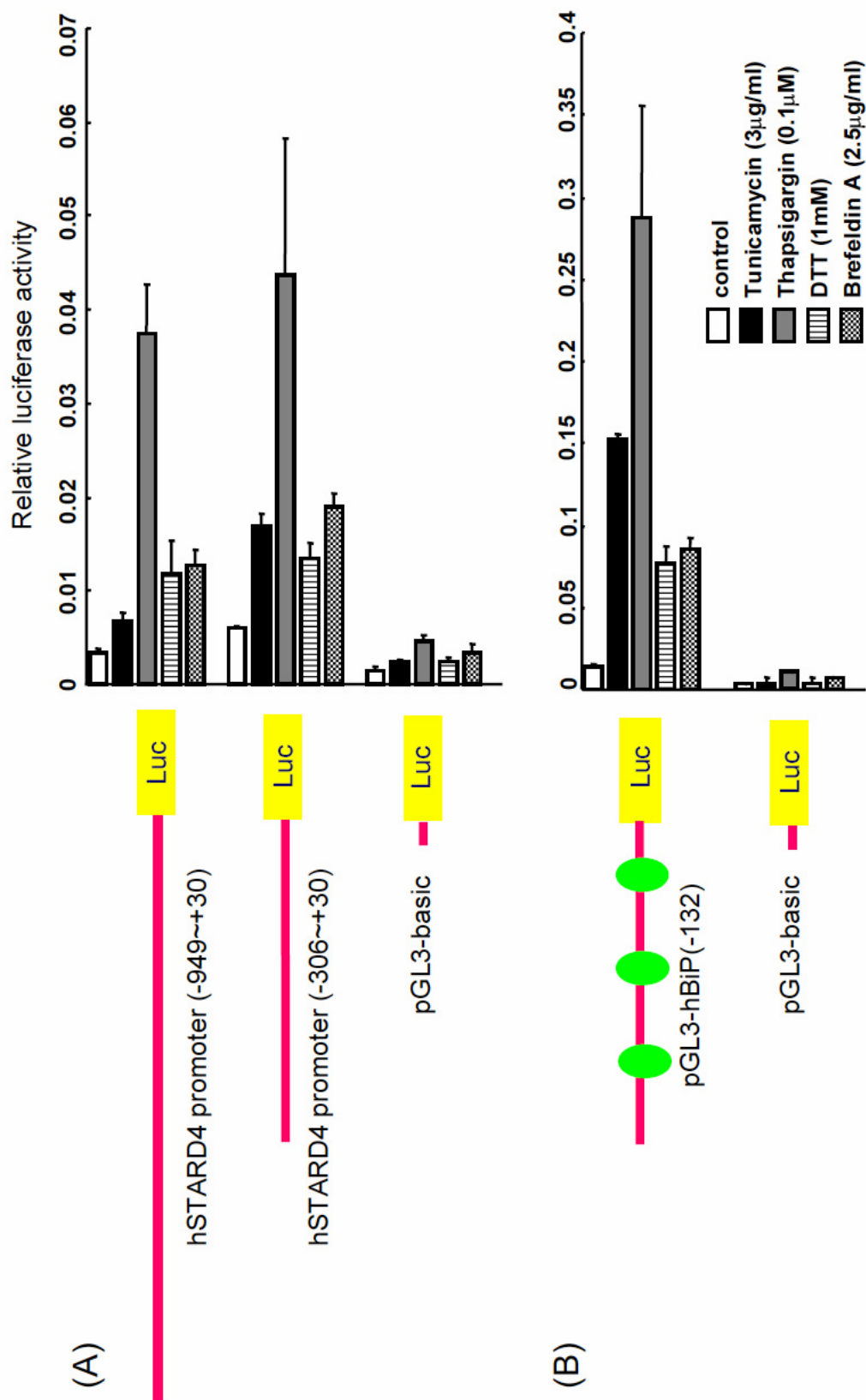


Fig. 7 各小胞体ストレス誘導剤へのSTARD4プロモーターの応答性

Fig. 7 各小胞体ストレス誘導剤への STARD4 プロモーターの応答性

(A), (B) ヒト STARD4 プロモーターが各小胞体ストレス誘導剤で活性化されるかを調べた。プロモーター活性はルシフェラーゼアッセイで測定している。HeLa 細胞に一過的に pGL3-hSTARD4 (-306)と pRL-SV40 を導入し、さらに細胞を tunicamycin ($3 \mu\text{g/ml}$), thapsigargin ($0.1 \mu\text{M}$), DTT (1 mM), or brefeldin A ($2.5 \mu\text{g/ml}$)で9時間処理し、アッセイを行った。pGL3-hBiP (-132)は小胞体ストレスにより活性化されるものとしてのポジティブコントロールである

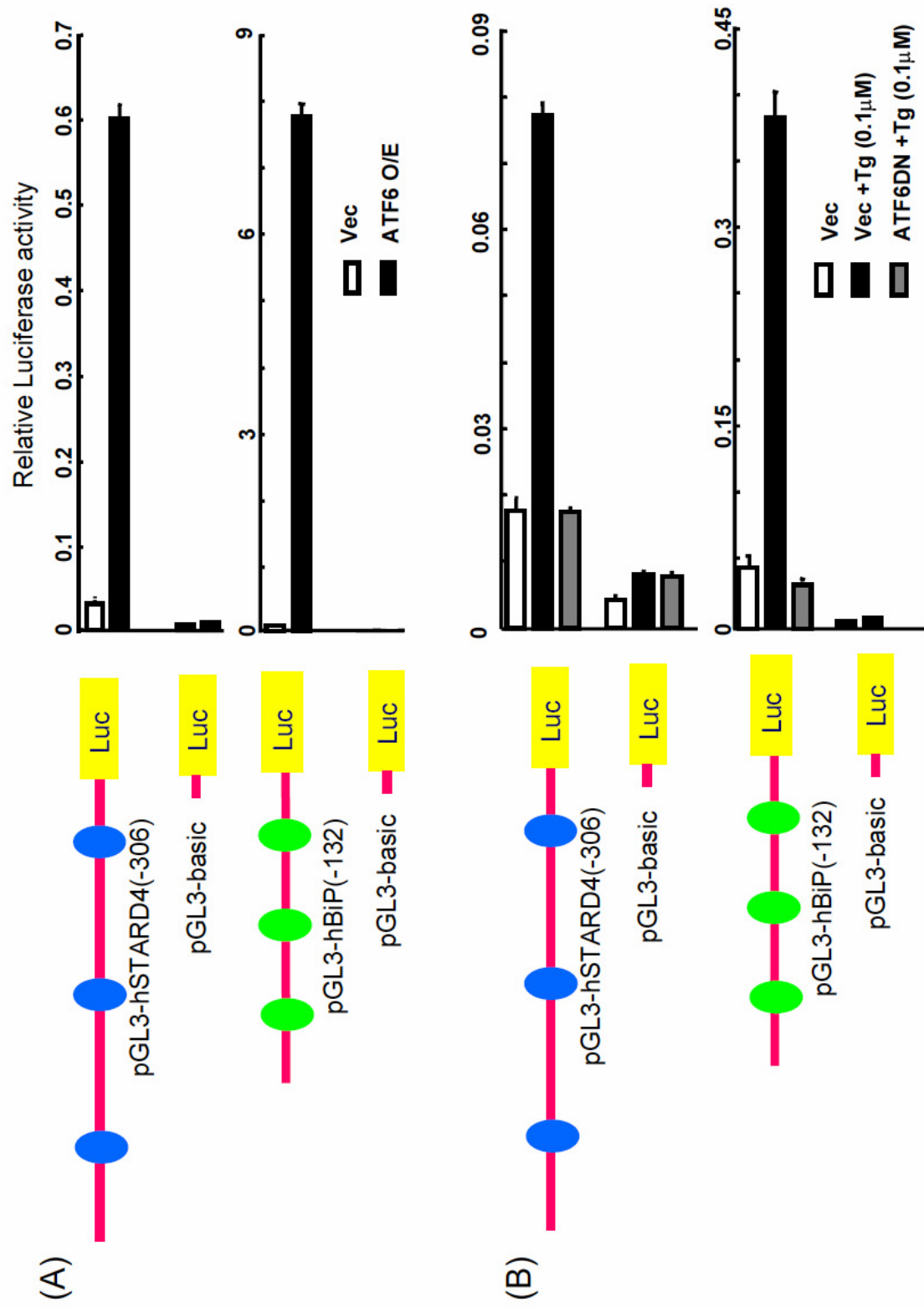


Fig. 8 STARD4のプロモーター活性は転写因子ATF6に依存している

Fig.8 ヒト STARD4 プロモーターの活性化は転写因子 ATF6 に依存している。

(A) STARD4 のプロモーター活性に対する ATF6 (活性型)の効果をルシフェラーゼアッセイで検証した。HeLa 細胞に一過的に pCAX-hATF6 (1-373) Flag、pCAX 、pGL3-hSTARD4 (-306)と pRL-SV40 を導入し、アッセイを行った。pCAX-hATF6 (1-373) Flag は活性型の ATF6 を発現させるために用いた。pCAX は mock transfection として用いた。

(B) STARD4 プロモーターに対する ATF6(ドミナントネガティブ型)の効果をルシフェラーゼアッセイで検証した。HeLa 細胞に一過的に pCAX-hATF6 (171-373) Flag、pCAX、 pGL3-hSTARD4 (-306)と pRL-SV40 を導入し、thapsigargin (0.1 μ M、9 h)にて小胞体ストレス処理後に細胞を回収し、アッセイを行った。pCAX-hATF6 (171-373) Flag はドミナントネガティブ型 ATF6 を発現させるために用いた。pGL3-hBiP(-132)は小胞体ストレスにより活性化されるものとしてのポジティブコントロールである。pGL3-basic はプロモーターを持たないネガティブコントロールである。pCAX は mock transfection として用いた。

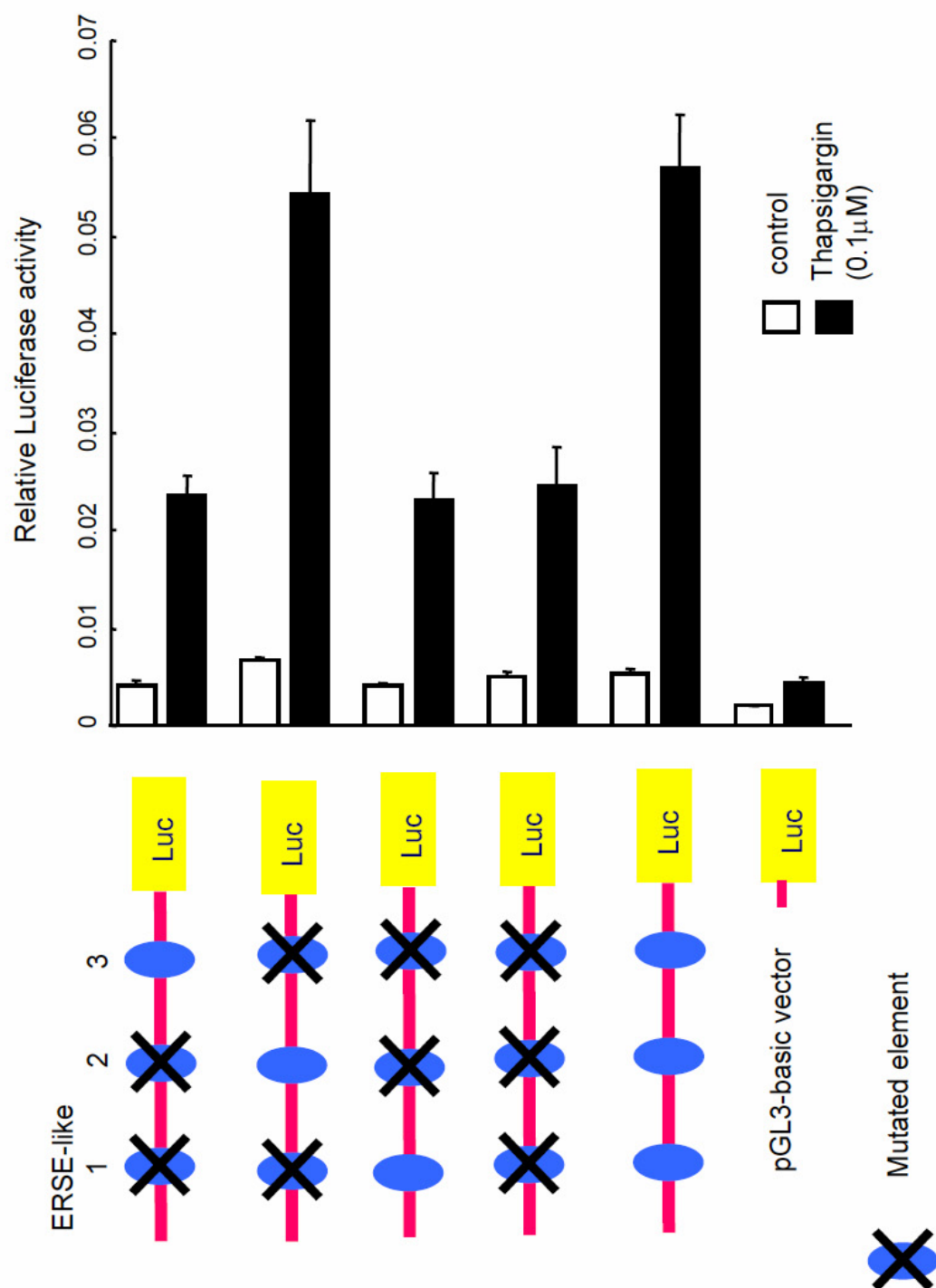


Fig. 9 (A) STARD4遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導にはERSE様配列2が関与する

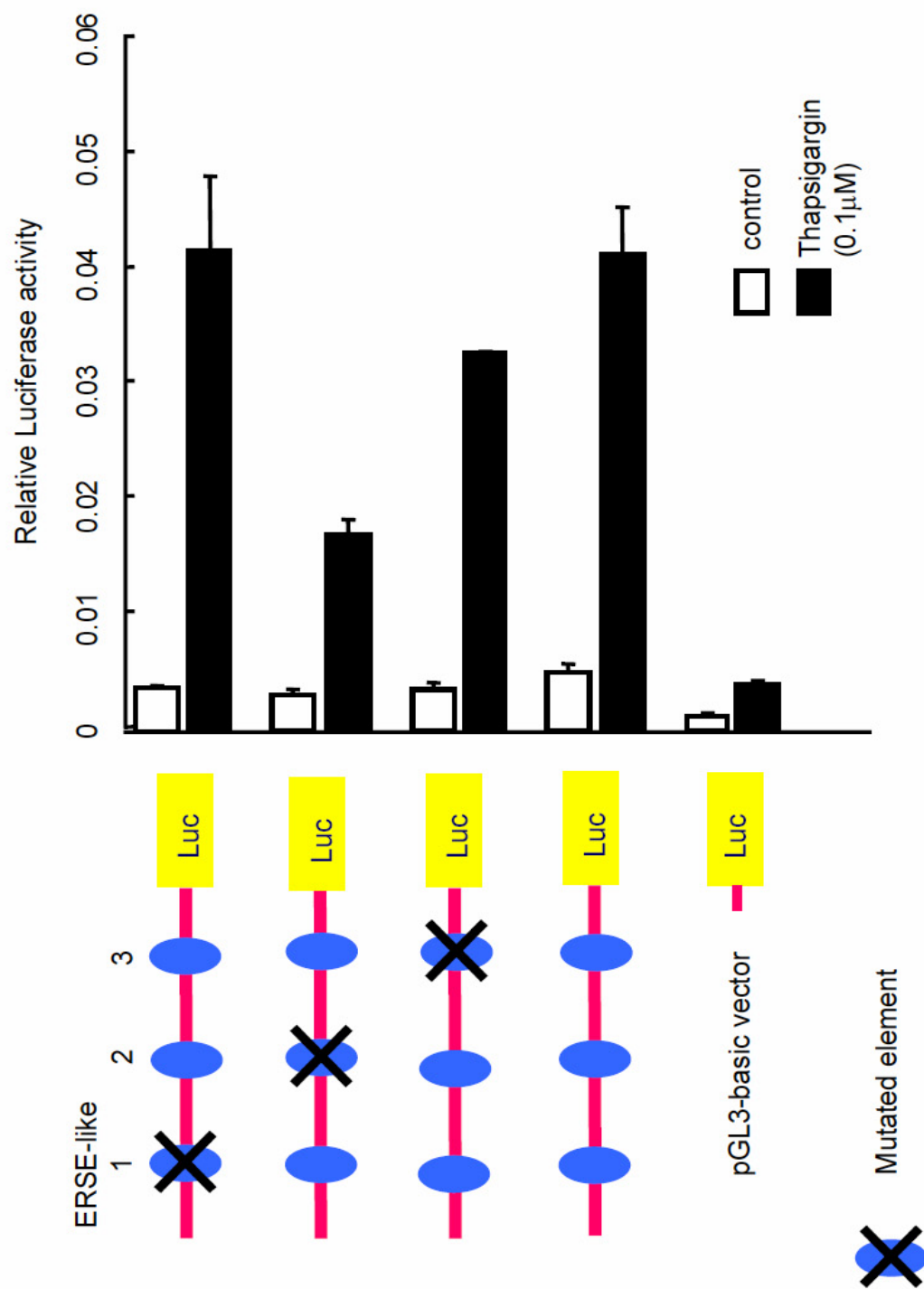


Fig. 9 (B) STARD4遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導にはERSE様配列2が関与する

Fig.9 STARD4 遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導には、ERSE 様配列 2 が関与する。

(A) STARD4 プロモーター上の ERSE 様配列に変異を導入し、プロモーター活性化レベルをルシフェラーゼアッセイにて検証した。HeLa 細胞に、複数のシスエレメントに変異を導入した pGL3-hSTARD4(-306) mut1-2、mut 1-3、mut 2-3、mut 1-2-3 と pRL-SV40 を一過的に導入し、thapsigargin ($0.1 \mu\text{M}$ 、9 h)にて小胞体ストレス処理後に細胞を回収し、アッセイを行った。野生型の pGL3-hSTARD4 (-306) はポジティブコントロール、pGL3-Basic はネガティブコントロールとして用いた。

(B) HeLa 細胞に、各 ERSE 様配列に変異を導入した pGL3-hSTARD4 (-306) mut1、mut2、mut3 と pRL-SV40 を一過的に導入し、thapsigargin ($0.1 \mu\text{M}$ 、9 h)にて小胞体ストレス処理後に細胞を回収し、アッセイを行った。野生型の pGL3-hSTARD4 (-306)はポジティブコントロール、pGL3-Basic はネガティブコントロールとして用いた。

配列 2 が最も関与しているのではないかと考え、各 ERSE 様配列に変異導入してアッセイを行った。その結果、ERSE 様配列 2 に変異を入れた場合にのみ活性が半分以下にまで低下した(Fig.9B)。ERSE 様配列 3 への変異導入の場合でも活性化レベルは若干低下したが、その効果は ERSE 様配列 2 への変異導入に比べ小さかった。これらの結果から、STARD4 遺伝子の小胞体ストレス依存的発現誘導には ERSE 様配列 2 が大きく関与することが示唆された。

3.6 STARD4 遺伝子は、ストレス応答初期に特徴的な発現誘導を受ける

これまで述べたように、小胞体ストレス時の STARD4 の発現誘導は、ATF6 に強く依存すると考えられる。ATF6 により制御される遺伝子は、一般的にストレス応答の初期に誘導されることが知られている [19]。そこで、STARD4 遺伝子の誘導のタイミングについて、既知の小胞体ストレス応答遺伝子と比較した。HeLa 細胞を用いたノザンブロット解析において、BiP と EDEM の遺伝子発現はそれぞれ tunicamycin 処理後 2 時間、または 4 時間で上昇し始め、ともに 24 時間でも高レベル状態を維持していた。しかし、STARD4 遺伝子の発現は tunicamycin 処理後 2 時間で上昇し始め、4 時間でピークに達し、6 時間以降ではしだいに下降した (Fig.10A)。このようにヒト STARD4 遺伝子は既知の小胞体ストレス応答遺伝子とは異なり、ストレス応答初期に特徴的な誘導を受ける。thapsigargin を用いた場合においても、STARD4 の発現は 2-4 時間でピークに達する一方、BiP、EDEM の発現は 6 時間でピークに達するため、これらは異なる発現パターンであることが確認された (Fig.10B)。

3.7 STARD4 mRNAのストレス処理後の分解速度

STARD4 遺伝子発現が一過的である理由として、STARD4 遺伝子が発現誘導後に選択的に分解されている可能性が考えられた。そのため、STARD4 遺伝子を tunicamycin で誘導後、転写阻害剤である Actinomycin D を培地中に加えて mRNA 発現量の変化を経時的に調べ、その分解速度を BiP や GAPDH と比較した(Fig.11)。Actinomycin D のみを培地中に加えた場合には、STARD4、BiP、GAPDH の mRNA 量はほぼ一定である。tunicamycin 処理後に Actinomycin D を添加した場合には、STARD4 mRNA の量は Actinomycin D 処理後 4 時間で急速に減少した。しかし、BiP や GAPDH も同じパターンを示しており、STARD4 が他の遺伝子の mRNA に比べて速く減少しているということは認められなかった。よって、小胞体ストレス時の STARD4 mRNA 発現レベルの一過的な上昇後の急速な低下は、STARD4 mRNA の選択的な分解亢進ではないと考えられた。

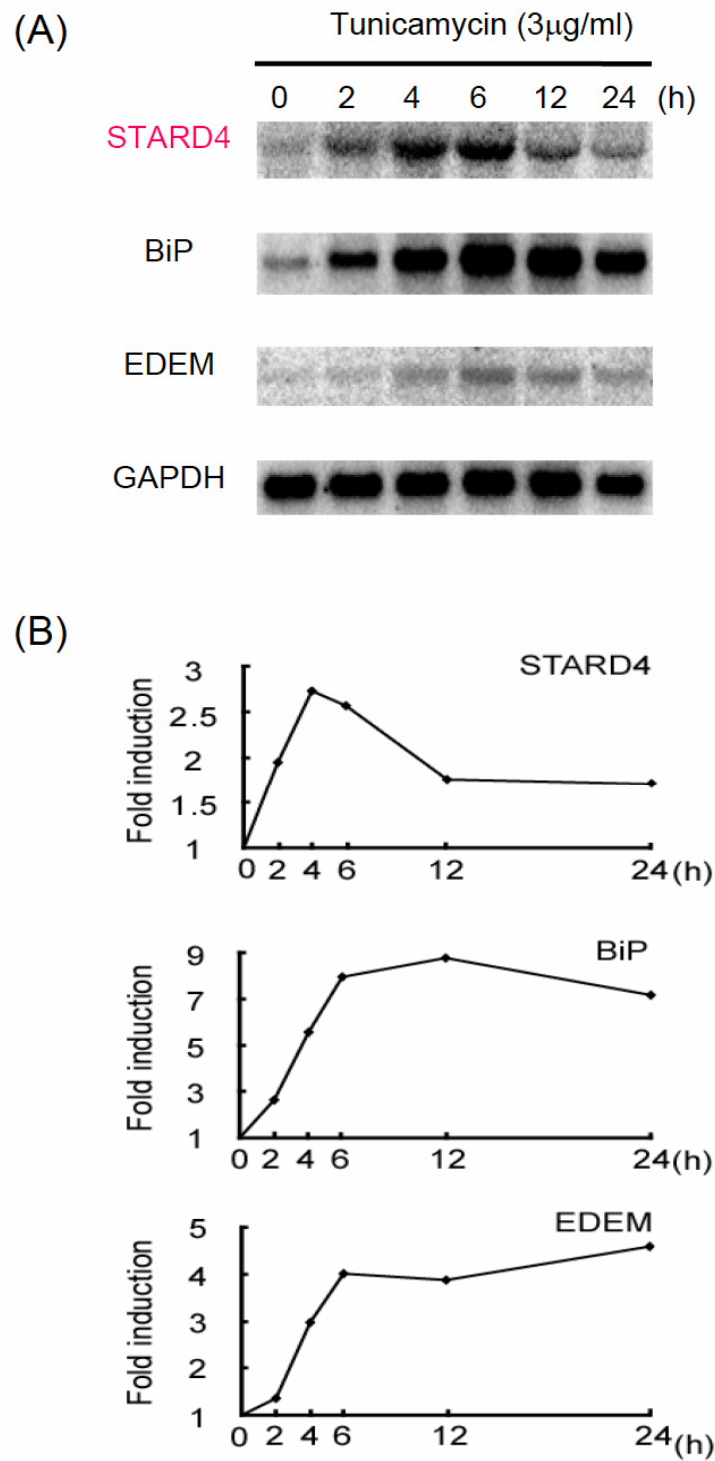


Fig. 10 (A) STARD4遺伝子の発現誘導は初期に限られる

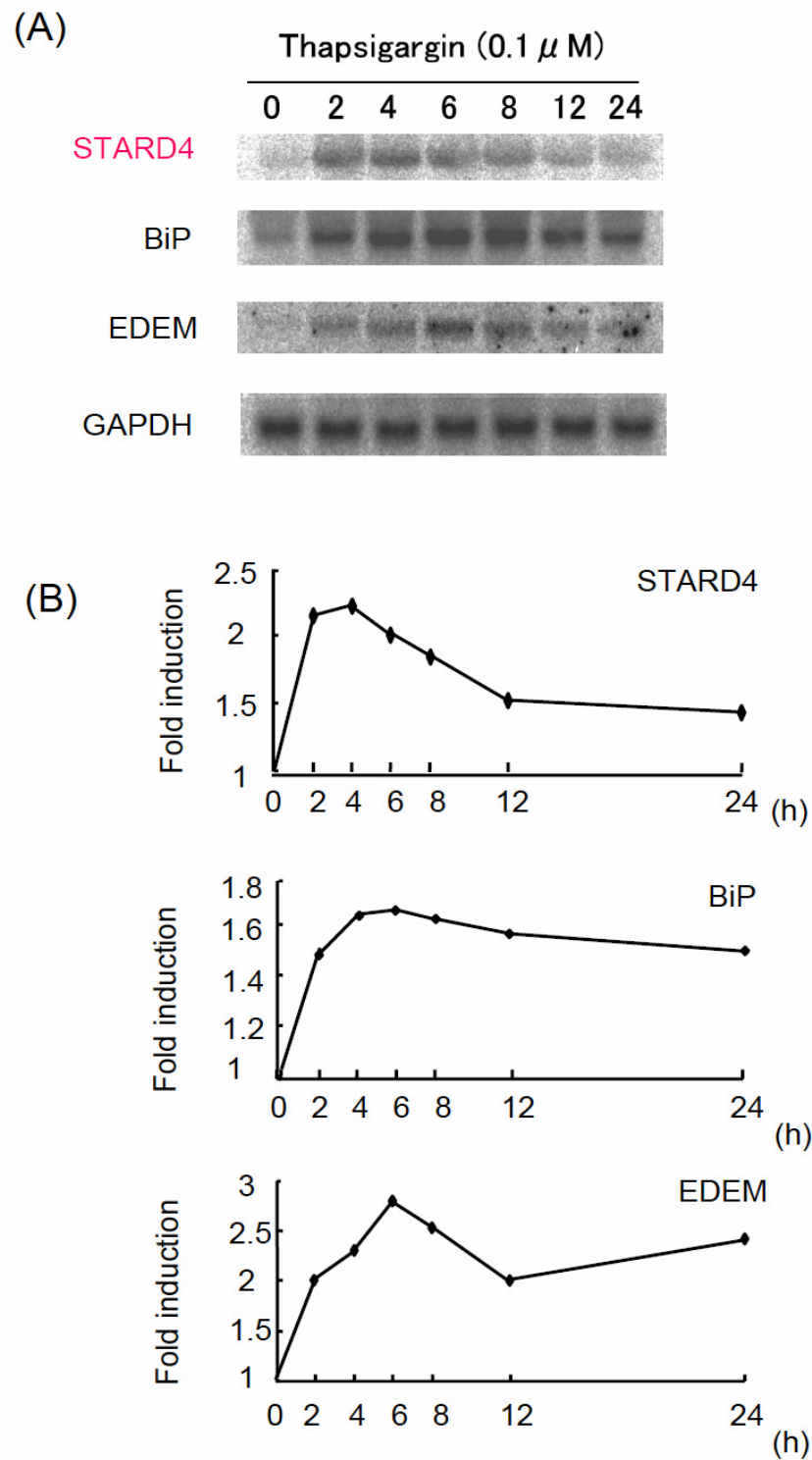


Fig. 10 (B) STARD4遺伝子の発現誘導は初期に限られる

Fig.10 STAD4 遺伝子の発現誘導は初期に限られる

(A) 3 μ g/ml tunicamycin で 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 処理した HeLa 細胞からの全 RNA (4 μ g /lane) をノザンブロット解析に用いた。STARD4, BiP, EDEM, and GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) の cDNA 断片をプローブとして用いた。GAPDH は内部標準である。(B) STARD4、BiP、EDEM の発現レベルは BAS 2500 system と Image gauge(Fuji film)で定量した。それぞれの値は GAPDH で補正してある。

(C) 0.1 μ M Thapsigargin で 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 処理した HeLa 細胞からの全 RNA (4 μ g/lane) をノザンブロット解析に用いた。STARD4, BiP, EDEM, and GAPDH の cDNA 断片をプローブとして用いた。GAPDH は内部標準である。(D) STARD4、BiP、EDEM の発現レベルは BAS 2500 system と Image gauge (Fuji film)で定量した。それぞれの値は GAPDH で補正してある。

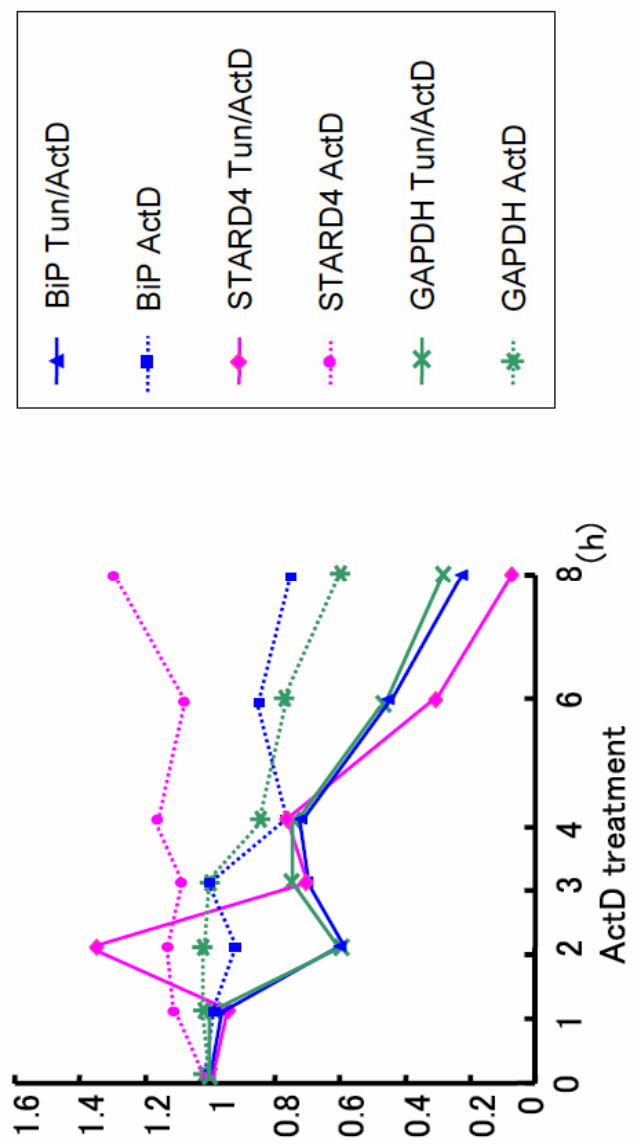
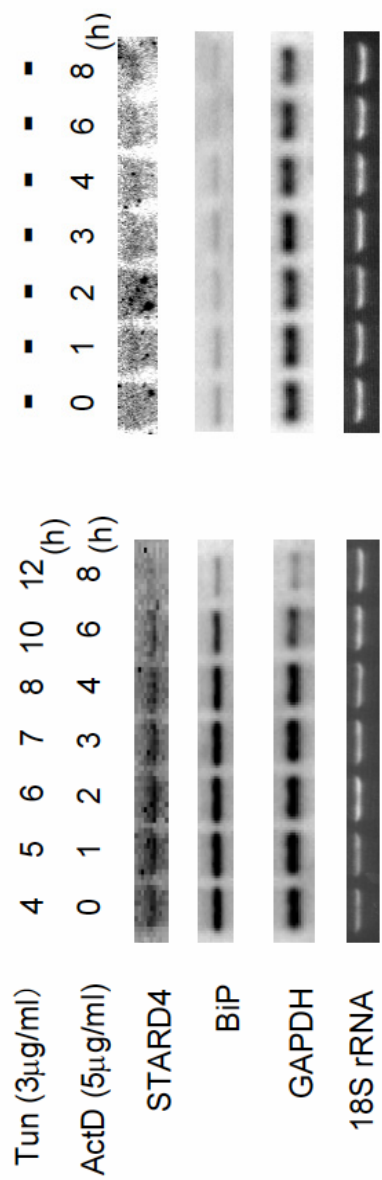


Fig. 11 STARD4の一過的発現はmRNAの選択的分解亢進によるものではない

Fig.11 転写を阻害した場合の STARD4 遺伝子の発現量の変化

HeLa 細胞に Tunicamycin ($3 \mu\text{g/ml}$)で処理後に、4 時間で Actinomycin D ($5 \mu\text{g/ml}$)で転写を阻害し、経時的に細胞を回収して全 RNA ($5 \mu\text{g/lane}$)をノザンブロット解析に用いた。STARD4、BiP、GAPDH の cDNA 断片をプローブとして用いた。シグナルは BAS 2500 system と Image gauge (Fuji film) で定量した。18S rRNA はエチジウムブロマイドで検出している。

下のグラフは、各遺伝子の発現量を 18S rRNA で標準化したものである。Actinomycin D を加えた時間の遺伝子発現量を 1 としている。

3.8 STARD4 は細胞質に局在する

このように、STARD4 遺伝子の発現誘導について解析を行ってきたが、逆にその機能解析に向けてSTARD4 の局在を決定するため、細胞ライセートの分画を用いてSTARD4 の細胞質局在を確認した。C末端にFLAGタグを融合させたSTARD4 を一過的にHeLa細胞へ過剰発現させてライセートを調整し、NaCl、Urea、Na₂CO₃、Triton-Xで段階的に処理後に超遠心で分画した。STARD4 はすべての処理において上清側に検出された(Fig.12A)。この検出パターンは、CalreticulinやCalnexinのパターンと異なる。細胞質に存在するHSC70 はSTARD4 と同様、どの処理においても上清に検出された。このことよりSTARD4 の局在は細胞質であることが示唆された。さらにC末端にFLAGタグを融合させたSTARD4 をHEL細胞に過剰発現させて蛍光抗体染色を試みた。その際、細胞質のマーカーとしてrat anti-HSC70、小胞体のマーカーとしてrabbit anti-Calnexinを用いて比較を行った。その結果、STARD4 はHSC70 と同様に細胞全体に発現していたが、特に濃く染色される領域が細胞膜近くに存在していた。これらのことから、STARD4 は細胞質のタンパクであるが、細胞膜付近に集まり機能している可能性が示唆された(Fig.12B)。

3.9 出芽酵母における、小胞体ストレス応答経路の活性化により誘導される脂質代謝関連遺伝子

以前我々の研究室では、出芽酵母において小胞体ストレス時に発現制御される遺伝子の探索を行うため、マイクロアレーを用いた網羅的解析が行われた[22]。この際、いくつかの脂質代謝関連遺伝子の誘導が示唆されていた。誘導される遺伝子の候補の中には、INO1 (Inositol syntase 1)、SCS3 (Suppressor of Choline Sensitivity 3)、ACB1 (Acyl-CoA binding protein 1)が含まれており、これらはリン脂質合成や脂肪酸代謝に関わる分子であるとされている [33, 34]。そこで私はこれらの脂質代謝関連遺伝子が、小胞体ストレスによって誘導されることをノザンブロット解析により確認した。野生型の出芽酵母、あるいは小胞体ストレス応答経路の中心的役割を果たすIre1pと、その下流の転写因子Hac1を欠損した出芽酵母株に小胞体ストレス処理を行って全RNAを抽出し、ノザンブロット解析によって各遺伝子の発現量を比較した。野生型においてはtunicamycin、DTTによりこれらの遺伝子の発現が誘導された。小胞体ストレスセンサーであるIre1p、その下流で制御されている転写因子Hac1の欠損株ではINO1とSCS3はほとんど誘導されなくなった。ACB1では完全ではないが、発現誘導が抑えられていることがわかった。以上の結果により、出芽酵母においても、小胞体ストレス応答が脂質代謝関連遺伝子の一部の発現を制御していることが示唆された (Fig.13)。

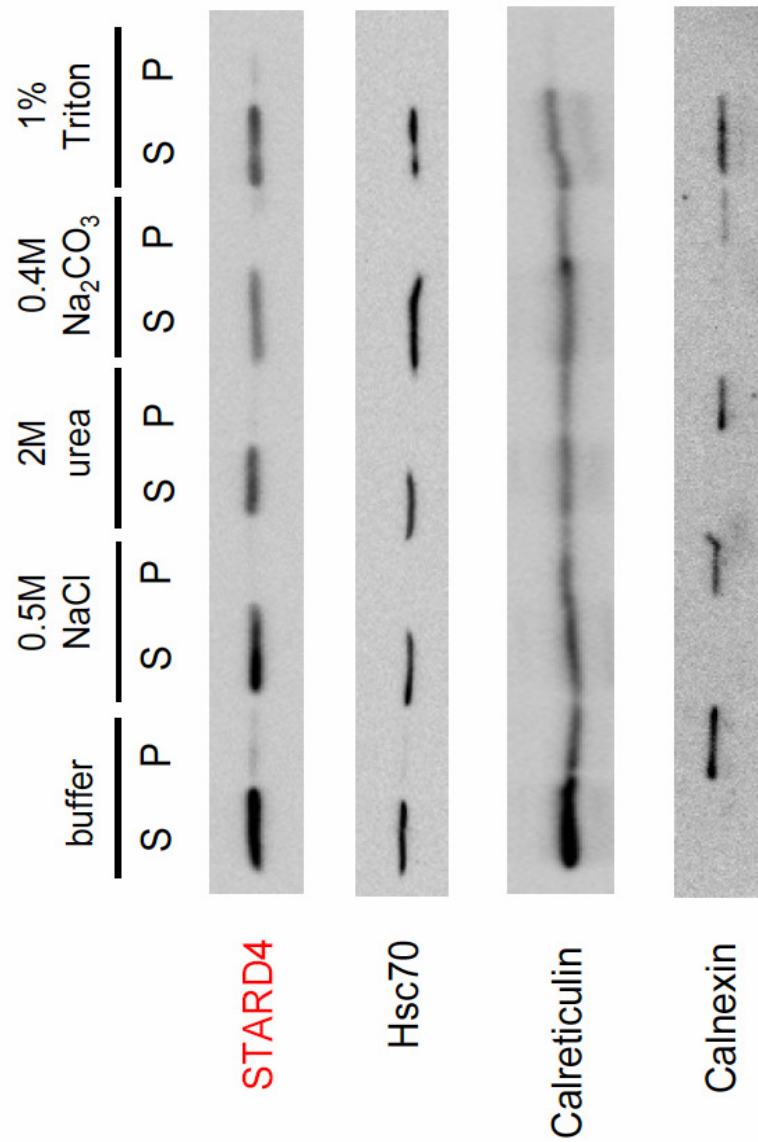


Fig. 12 (A) STARD4は細胞質に局在している

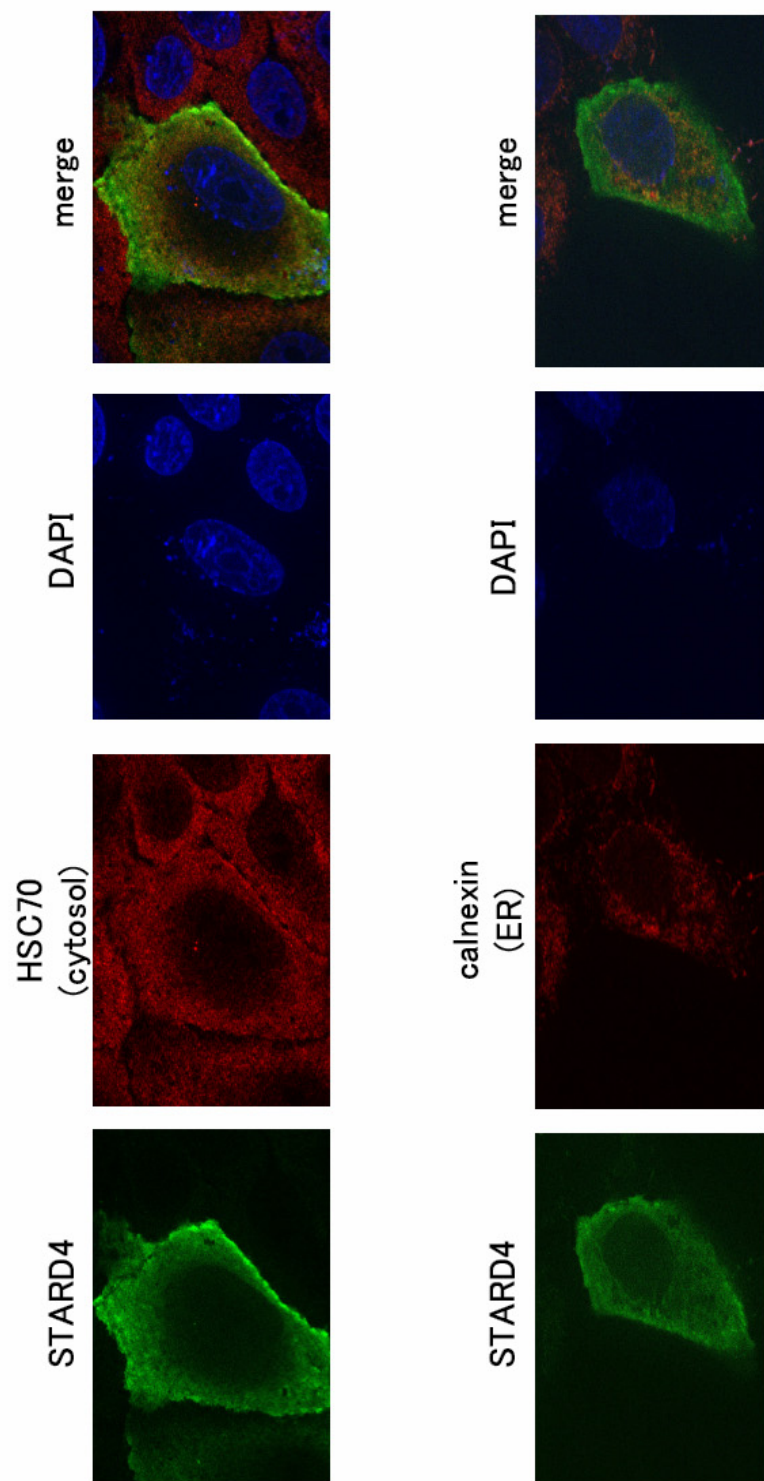


Fig. 12 (B) STARD4は細胞質に局在している

Fig.12 STARD4 は細胞質に局在する

(A) pCAGGS-hSTARD4-FLAG を導入して 3 6 時間培養した HeLa 細胞からライセートを調製し、遠心して上清を回収し、表示した薬剤濃度で 1 h、4 °C で静置後に 100000 ×g で遠心し、上清と沈殿を回収してウェスタンブロット解析を行った。hSTARD4-FLAG は anti-FLAG 抗体、HSC70 は anti-HSC70 抗体、Calreticulin は anti-Calreticulin 抗体、Calnexin は anti-Calnexin 抗体を用いて、検出した。

(B) HEL 細胞に pCAGGS-hSTARD4-FLAG を導入し、30 時間後にホルマリンで固定した後、一次抗体として anti-FLAG 抗体と anti-HSC70、anti-Calnexin 抗体を用いて蛍光抗体染色を行った。ヒト STARD4-FLAG の検出には FITC-conjugated、HSC70 の検出には Cy3-conjugated、calnexin の検出には rhodamine-conjugated の 2 次抗体を使用した。核は封入剤に含まれている DAPI で検出されている。overlay 像はコンピューター上でそれぞれの画像を重ね合わせて作成した。

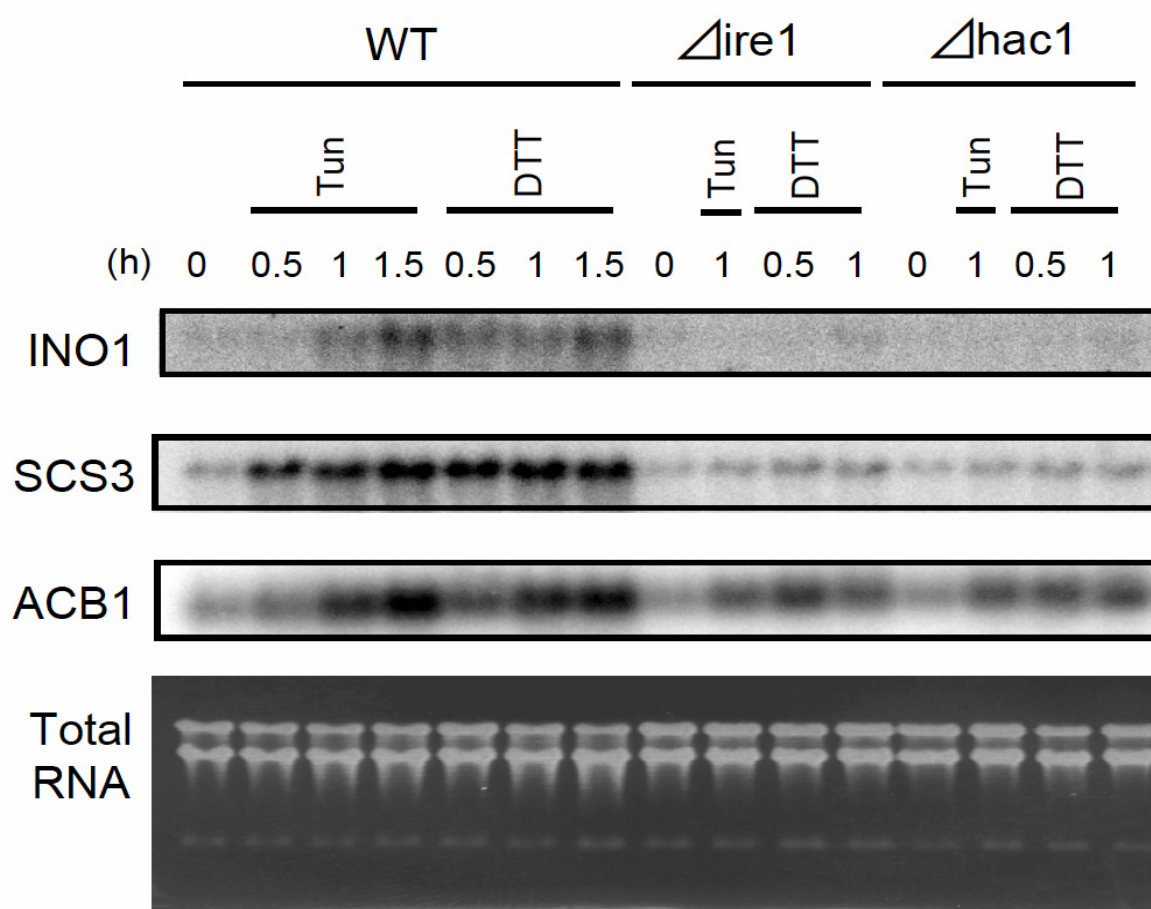


Fig. 13 出芽酵母における、小胞体ストレスにより誘導される脂質代謝関連遺伝子

Fig. 13 出芽酵母における、小胞体ストレスにより誘導される脂質代謝関連遺伝子

Tunicamycin ($2\ \mu\text{g/ml}$)、DTT ($10\ \text{mM}$)で表示した時間処理、もしくは無処理の野生型、Ire1 欠損株、Hac1 欠損株の出芽酵母を回収して、全 RNA ($5\ \mu\text{g/lane}$)を用いてノザンブロット解析を行った。INO1、SCS3、ACB1 の cDNA 断片をプローブとして用いた。シグナルの検出には BAS 2500 system (Fuji film)を用いた

4. 考察

この研究の中で明らかになったことは以下の5点である。(1) 脂質関連因子と報告されるヒト STARD4 は、小胞体ストレス時に発現誘導される小胞体ストレス応答遺伝子のひとつである(Fig. 2、5 および 7)。(2) その発現誘導はプロモーター領域内に存在する ERSE 様配列 2 と転写因子 ATF6 に依存する(Fig. 8 と 9)。(3) STARD4 の小胞体ストレスによる発現誘導は初期段階に限られる(Fig. 10)。(4) STARD4 の局在は細胞質であるが、細胞の蛍光抗体染色では、特に細胞膜付近に濃く染色される領域が認められる (Fig. 12)。(5) 動物細胞だけでなく出芽酵母においても、小胞体ストレス応答経路の下流で脂質代謝関連遺伝子が発現誘導される (Fig. 13)。

STARD4 遺伝子の一過的発現は非常に特徴的である。なぜなら、現在までに知られている多くの小胞体ストレス応答遺伝子の場合、ストレス後期まで高発現状態が続くからである。残念ながら今のところ、STARD4 が小胞体ストレス初期に一過的に発現誘導されるメカニズムは不明である。しかし、本研究において、STARD4 mRNA の安定性をノザンブロット解析で経時的に追跡した場合には、BiP、GAPDH とあまり差が見られなかったことから、STARD4 の分解が選択的に亢進されているわけではないことが示唆された。

STARD4 遺伝子の発現が一過的に上昇し、その後急激に減少するメカニズムとしては以下に示す可能性が考えられる。それは、STARD4 遺伝子プロモーターの小胞体ストレス応答性は小胞体ストレス初期段階に活性化される ATF6 のみに依存して転写制御されており、後期以降に活性化する IRE1-XBP1 経路では誘導されていないということである。小胞体ストレス後期まで高発現状態の続く BiP 遺伝子では、プロモーター上に存在する ERSE には ATF6 も XBP1 も共に作用できる [17]。しかし、STARD4 遺伝子プロモーター上の ERSE 様配列には、わずかな塩基差異のために、ATF6 しか作用できないのかもしれない。実際、UPR 標的遺伝子の中にはあるひとつの UPR 経路だけで制御されているものもある。例えば EDEM は STARD4 とは逆に小胞体ストレスの後期段階で発現誘導されている。この現象は、EDEM の小胞体ストレス応答性が、ストレス後期以降に活性化する IRE1-XBP1 経路のみに依存するというメカニズムで説明されている [19]。もちろん、STARD4 が ATF6、XBP1 により転写誘導されるが、そのプロモーター領域には現在までに知られていない転写抑制因子が結合し、小胞体ストレス後期の発現を抑制している可能性も考えられる。そのためゲルシフトアッセイ等を用いて、プロモーター領域結合タンパクの解析を行うことも必要である。また、STARD4 の転写誘導を行う転写因子が、小胞体ストレス後期に活性

を失う可能性もある。最近では不活性型 XBP1 が活性型 ATF6 や XBP1 に結合して核外へ運び出し、その後期における転写活性を阻害することが報告されている[35]。あるいは未知の因子、もしくは STARD4 自身が ATF6 など転写調節因子に作用し、ネガティブフィードバックを行っているのかもしれない。

STARD4 の機能については、本研究では残念ながら明らかにできなかった。過去の報告においても、その機能は未だ明らかにできていない。しかし同じ STARD4 サブファミリーに属する STARD5 については、少しずつ解析が進められている。STARD5 の局在は細胞質であることが示されているが、蛍光抗体染色ではゴルジ体周辺にも観察されると報告されている[36]。本研究では STARD4 の局在が細胞質であることが示唆されたものの、蛍光抗体染色を用いた場合には細胞膜周辺が特に染色されていた。そのため細胞膜付近で脂質の輸送に働いている可能性が考えられる。今後はミクロソーム画分だけでなく細胞膜画分も回収し、STARD4 の局在を確認する必要もあると考えている。

以前に他グループで行われた X 線構造解析の結果では STARD4 は一分子のステロールを結合できる構造をとることが示唆されている[37]。STARD4 は STARD5 と良く似た構造であることが予測されており、実際に STARD5 はコレステロールや酸化ステロールを結合することが報告されている[38]。さらに最近では、STARD5 も小胞体ストレスによって誘導されることが明らかになった[30]。STARD ファミリー分子は脂質輸送に関与すると考えられているため、STARD4、STARD5 を含む STARD ファミリー分子が小胞体ストレス時の脂質輸送や代謝に関わっている可能性が高い。

近年では真核生物において小胞体ストレス時の膜の形態変化が着目されるが、小胞体ストレスの際には脂質の合成が活発化し、小胞体膜におけるリン脂質の含有量が高くなることが知られている [39]。実際に今回の研究の中で、動物細胞だけでなく出芽酵母でも、小胞体ストレス時に脂肪酸代謝に関わる ACB1 やリン脂質代謝に関わる INO1、SCS3 の mRNA 発現量の増加が確認できた (Fig.13)。真核生物では膜の脂質組成を変化させ、膜の性状や形態を変化させることで小胞体ストレスに対応していると考えられる。このような時、動物細胞では STARD4 や STARD5 が、密な構造をとり脂質膜の形状変化を困難にするステロールを引き抜いてゴルジ体や細胞膜へ輸送し、リン脂質の含有量を増やすことで小胞体膜の形状変化を可能にしているのかもしれない。また、マクロファージが過剰に酸化ステロールを取り込むとそれが小胞体へ輸送されて蓄積し、小胞体ストレス由来のアポトーシスを引き起こすことが知られる [40]。そのような状態を改善するために、STARD4 や STARD5 が細胞外へステロールを排出するように働いている可能性も考えられる。

最近では、小胞体ストレス応答は小胞体内のタンパク質品質管理だけでなく、

タンパク分解、細胞周期などの生理現象や、さらにポリグルタミン病、糖尿病やパーキンソン病、アルツハイマー病などの疾患と関わることが報告されつつあり [3, 10]、脂質代謝と小胞体ストレス応答との関連性にも注目が集まっている。今後、小胞体ストレス応答の全容を解明する上でも STARD4 の解析が進められることが期待される。

謝辞

本研究において、サブトラクション法による新規小胞体ストレス応答遺伝子の探索は、山口哲雄氏により行われたことを明記し、同氏に感謝いたします。

ハムスター HMG-CoA reductase ORF のプローブを供与していただいた名古屋市立大学 医学研究科 代謝細胞学研究室 中西真先生に感謝いたします。

pGL3-hBiP(-132)プラスミドを供与してくださり、様々な助言を頂いた理化学研究所 岩脇独立主幹ユニット 岩脇隆夫博士のご好意に感謝いたします。

研究を進めるに当たって適切な指導と助言及び様々なサポートをしてくださった河野憲二教授、木俣行雄博士、都留秋雄博士、斉藤美知子博士、細田章博士（現岩脇独立主幹ユニット）、竹内雅人博士、木村太地博士に深く感謝いたします。

研究室の実験環境を整えてくださった、松村美樹さん、飯田純子さん、増田尚代さん、有意義な議論をしてくださった河野研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。有難うございました。

参考文献

- [1] Chapman, R., Sidrauski, C.E., and Walter, P. (1998). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 459-485.
- [2] Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress and unfolded protein response. *Mutat. Res.* 569, 29-63.
- [3] Patil, C., and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 349-356.
- [4] Harding, H.P., Zhang, Y. and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.
- [5] Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell.* 5, 897-904.
- [6] Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000) Translation control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat. Cell. Biol.* 3, 158-164.
- [7] Kopito R.R. (1997). ER Quality Control: The cytoplasmic Connection. *Cell* 88, 427-430.
- [8] Plemper, R.K., Wolf, D.H. (1999). Endoplasmic reticulum degradation: Reverse protein transport and its and in the proteasome. *Mol. Biol. Rep.* 1-2, 125-30.
- [9] Sidrauski, C., Chapman, R., and Walter, P. (1998). The unfolded protein response: an intracellular signaling pathway with many surprising features. *Trend Cell Biol.* 8, 245-249.
- [10] Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 739-789.

- [11] Harding, H.P., Novoa, I.I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099-1108.
- [12] Fawcett, T.W., Martindale, J.L., Guyton, K.Z., Hai, T., and Holbrook, N.J. (1999) Complexes containing activating transcription factor (ATF)/ cAMP- responsive element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem. J.* 339, 135-141.
- [13] Luo, S., Baumeister, P., Yang, S., Abcouwer, S.F., and Lee, A.S. (2003) Induction of Grp78/ BiP by translational block: Activation of the Grp78 promoter by ATF4 through an upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *J. Biol. Chem.* 278, 37375-37385.
- [14] Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 355-1364.
- [15] Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998) Identification of the *cis*-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 33741-33749.
- [16] Kokame, K., Kato, H., and Miyata, T. (2001) Identification of ERSE-II, a new *cis*-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 276, 9199-9205.
- [17] Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.
- [18] Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-96

- [19] Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K., and Mori, K. (2003) A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell* 4, 265-271.
- [20] Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.
- [21] Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M., and Mori, K. (2002) Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* 366, 585-594.
- [22] Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Yamada, S., and Kohno, K. (2006) Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes Cells* 11, 59-69.
- [23] Schulze, A., Standera, S., Buerger, E., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., Koning, F., Kloetzel, P.M., and Seeger, M. (2005) The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *J. Mol. Biol.* 354, 1021-1027.
- [24] METHODS IN ENZYMOLOGY Vol.98, 250-251
- [25] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [26] Church, G.M., and Gilbert, W. (1984) Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 1991-1995.
- [27] Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., and Miura, M. (2004) A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* 10, 98-102.
- [28] Alpy, F., and Tomasetto, C. (2005) Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J. Cell Sci.* 118, 2791-2801.

- [29] Soccio, R.E., Adams, R.M., Romanowski, M.J., Sehayek, E., Burley, S.K., and Breslow, J.L. (2002) The cholesterol-regulated StarD4 gene encodes a StAR-related lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 6943-6948.
- [30] Soccio, R.E., Adams, R.M., Maxwell, K.N., and Breslow, J.L. (2005) Differential gene regulation of StarD4 and StarD5 cholesterol transfer proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 19410-19418.
- [31] Edwards, P. A., Tabor, D., Kast, H. R., and Venkateswaran, A. (2000) Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 103–113.
- [32] Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., and Yura, T. (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the *cis*-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6755-6767.
- [33] Henry, S.A., Klig, L.S., and Loewy, B.S. (1984) The genetic regulation and coordination of biosynthetic pathways in yeast: amino acid and phospholipid synthesis. *Annu. Rev. Genet.* 18, 207-231
- [34] Hosaka, K., Nikawa, J., Kodaki, T., Ishizu, H., and Yamashita, S. (1994) Cloning and sequence of the SCS3 gene which is required for inositol prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 116, 1317-21.
- [35] Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006) pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* 172, 565-575.
- [36] Rodriguez-Agudo, D., Ren, S., Hylemon, P.B., Montanez, R., Redford, K., Natarajan, R., Medina, M.A., Gil, G., and Pandak, W.M. (2006) Localization of StarD5 cholesterol binding protein. *J. Lipid Res.* 47, 1168-1175.
- [37] Romanowski, M.J., Soccio, R.E., Breslow, J.L., and Burley, S.K. (2002) Crystal structure of the *Mus musculus* cholesterol-regulated START protein 4 (StarD4)

containing a StAR-related lipid transfer domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 6949-6954.

[38] Rodriguez-Agudo, D., Ren, S., Hylemon, P.B., Redford, K., Natarajan, R., Del Castillo, A., Gil, G., and Pandak, W.M. (2005) Human StarD5, a cytosolic StAR-related lipid binding protein. *J. Lipid Res.* 46, 1615-1623.

[39] Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J.W. (2004) XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 167, 35-41.

[40] Feng, B., Yao, P.M., Li, Y., Devlin, C.M., Zhang, D., Harding, H.P., Sweeney, M., Rong, J.X., Kuriakose, G., Fisher, E.A., Marks, A.R., Ron, D., and Tabas, I. (2003) The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.* 5, 781-792.