

小胞体ストレスセンサーIRE1 β の翻訳抑制機構

中村 大祐
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23年1月25日

目次

第一部 モデルタンパク質を用いた IRE1 β の翻訳抑制機構の解析

1.	序論	5
2.	材料と方法	10
2.1.	プラスミドの構築	
2.2.	細胞培養とトランスフェクション	
2.3.	デュアルルシフェラーゼ解析	
2.4.	ウェスタンブロット解析	
2.5.	プロテアーゼプロテクションアッセイ	
2.6.	ジギトニンによる細胞分画	
2.7.	細胞質タンパク質および糖タンパク質のタンパク合成量の測定	
2.8.	Real-time PCR 解析	
2.9.	RT-PCR による <i>XBP1</i> mRNA スプライシング解析	
2.10.	免疫染色法による IRE1 の局在観察	
2.11.	免疫沈降解析	
3.	結果	16
3.1.	細胞内翻訳量解析のアッセイ系の構築	
3.2.	IRE1 β は RNase 活性により小胞体局在タンパク質の翻訳のみを抑制する	
3.3.	IRE1 β の RNase ドメインは小胞体局在タンパク質の mRNA を減少させる	
3.4.	IRE1 β は小胞体局在 mRNA を特異的に減少させることで小胞体膜上での新規合成タンパク質の合成量を抑制する	
3.5.	IRE1 β は活性の有無に関わらずトランスロコン複合体に存在する	
3.6.	IRE1 β は細胞質領域依存的にクラスターを形成する	
4.	考察	21
4.1.	IRE1 β の小胞体経路タンパク質選択的な翻訳抑制機構について	
4.2.	IRE1 α と IRE1 β の RNase の基質特異性の違いについて	
4.3.	Fluc-ER の IRE1 β 活性化レポーターとしての利用	
4.4.	細胞内翻訳量アッセイシステムの有用性について	
5.	図表	24

第二部 ヒト大腸癌由来 LS174T 細胞株における IRE1 β の機能

6.	序論	4 4
7.	材料と方法	4 6
7.1.	プラスミドの構築	
7.2.	細胞培養とトランスフェクション	
7.3.	IRE1 β 安定発現株のクローニング	
7.4.	ウェスタンブロット解析	
7.5.	糖タンパク質のタンパク合成量の測定	
7.6.	Real-time PCR 解析	
7.7.	ノーザンブロッティングによる in vivo 28S rRNA 切断解析	
7.8.	デュアルルシフェラーゼ解析	
7.9.	リプレーティングアッセイと酪酸ナトリウム感受性アッセイ	
8.	結果	4 9
8.1.	LS174T 細胞における IRE1 β の翻訳抑制	
8.2.	IRE1 β は <i>MUC2</i> mRNA を減少させる	
8.3.	LS174T 細胞では IRE1 β による 28S rRNA の切断活性は低い	
8.4.	LS174T 細胞の電子顕微鏡観察	
8.5.	IRE1 β は小胞体ストレスを軽減する	
8.6.	IRE1 β は小胞体ストレスに対する耐性をもたらす	
9.	考察	5 3
9.1.	杯細胞における IRE1 β の役割	
9.2.	IRE1 α と IRE1 β の違いについて	
9.3.	杯細胞における XBP1 経路について	
9.4.	IRE1 の活性化によるアポトーシスについて	
10.	図表	5 7
11.	謝辞	7 4
12.	参考文献	7 5

第一部

モデルタンパク質を用いた **IRE1** β の翻訳抑制機構の解析

1. 序論

小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質が機能的な構造を作るための細胞内小器官である。これらのタンパク質はリボソームによって mRNA から疎水性に富む N 末端の小胞体シグナル配列が翻訳されると、細胞質の小胞体シグナル認識粒子 (signal recognition particle : SRP) に結合し、翻訳が停止する。その後、小胞体膜上の SRP 受容体を介して、リボソームが小胞体膜透過チャネルであるトランスロコンと結合すると翻訳が再開され、翻訳と共役して新生ポリペプチドが小胞体内へと送り込まれる (Figure 1)。小胞体内に送り込まれたポリペプチド鎖は、糖鎖修飾を受けると共に小胞体分子シャペロンやフォールディング酵素などによって正しく折りたたまれ、機能的なタンパク質へと成熟する。タンパク質折りたたみ能力を超えた新規合成タンパク質が小胞体内に流入してくると、折りたたみ不全のタンパク質が生じ、これが小胞体内に蓄積すると小胞体ストレスとなる。重度の小胞体ストレスや長時間にわたる小胞体ストレスは細胞にとって害であり、細胞は小胞体ストレスを感知し、緩和するための応答機構 (小胞体ストレス応答 : UPR) を有している (Ron and Walter, 2007)。小胞体ストレスは分泌の盛んな細胞で起こりやすく膵臓ランゲルハンス島 β 細胞 (Lipson et al., 2006) や抗体産生の盛んな B 細胞 (Gass et al., 2002)、骨芽細胞 (Saito et al., 2009)、ウイルス感染によってタンパク合成が増加した細胞 (Dimcheff et al., 2004; He, 2006) などでは、UPR が起きている。

哺乳動物細胞において、小胞体ストレスを感知し下流にシグナルを伝達する小胞体ストレスセンサー分子には IRE1、PERK、ATF6 が存在する (Figure 2)。それぞれのセンサーの下流では、構造異常タンパク質の折りたたみを促進する小胞体分子シャペロンや、小胞体に蓄積した構造異常タンパク質の分解に関わる因子を誘導したり、小胞体への新規合成タンパク質の流入を減少させるために翻訳を抑制したりすることで小胞体ストレスを解消する (Ron and Walter, 2007)。小胞体ストレスセンサー分子のストレス感知機構には、小胞体分子シャペロンである BiP を介した感知機構が存在する。それぞれのセンサーの小胞体内腔領域には、BiP の結合領域が存在し、定常状態では BiP が結合した単量体の状態で存在しているが、小胞体ストレスにより小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積してくると、BiP が競合的に構造異常タンパク質に奪われ、BiP の解離したセンサーは活性化することが可能となる (Bertolotti et al., 2000; Okamura et al., 2000; Shen et al., 2002)。

ATF6 は、BiP の結合領域近傍にゴルジ体移行シグナルが存在し、BiP 結合時にはゴルジ体移行シグナルが BiP によってマスクされており、BiP が解離するとゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体に局在する S1P、S2P プロテアーゼによって膜内切断を受ける (Shen et al., 2002; Ye et al., 2000)。切断によって遊離した細胞質ドメインは、転写因子として核内に移行し、主に ERSE 配列 (ER stress response element) に結合することで小胞体シャペロンなどの UPR 標的遺伝子の転写を誘導する (Haze et al., 1999; Yamamoto et al., 2004)。PERK および IRE1 は、小胞体ストレス時に BiP が

解離すると、立体障害がなくなることによりオリゴマー化し、自己リン酸化によって活性化する(Bertolotti et al., 2000)。PERK は、自身のキナーゼ活性により翻訳開始因子である eIF2 α をリン酸化し、細胞内の全般的な翻訳を抑制する(Harding et al., 2000b; Harding et al., 1999)。IRE1 は酵母からヒトに至るまで真核生物に広く保存されている小胞体ストレスセンサー分子で、哺乳動物細胞には IRE1 α と IRE1 β の 2 つのパラログが存在している(Tirasophon et al., 1998; Wang et al., 1998)。これらのアイソフォームは共に、I 型の小胞体膜タンパク質で小胞体内腔側にストレスセンサー領域を、サイトゾル側にキナーゼ領域、リボヌクレアーゼ (RNase) 領域を有している。IRE1 は小胞体ストレスを感知すると二量体化もしくは多量体化し(Bertolotti et al., 2000; Kimata et al., 2007; Li et al., 2010)、自己リン酸化することによって活性化し RNase として機能するが、小胞体ストレス応答における IRE1 α と IRE1 β の RNase の役割は異なっている(Imagawa et al., 2008)。小胞体ストレスによって活性化した IRE1 α は、転写因子 XBP1 の mRNA をスプライソソーム非依存的に選択的にスプライシングし、スプライシングによってフレームシフトした *XBP1* mRNA からは活性型の XBP1 が翻訳される(Calfon et al., 2002; Yoshida et al., 2001)。XBP 1 は主に UPRE 配列 (unfolded protein response element) に結合して ERAD (ER associated degradation ; 小胞体関連分解) や脂質合成酵素などの UPR 標的遺伝子を転写誘導する(Yamamoto et al., 2004)。一方、IRE1 β は 28S rRNA を部位特異的に切断し、これが直接の原因かどうかは示されていないが、タンパク質の翻訳を抑制することが明らかとなっている(Iwawaki et al., 2001)。これまでに、小胞体ストレス時に翻訳抑制を引き起こす小胞体ストレスセンサーとして、PERK と IRE1 β が報告されている(Harding et al., 1999; Iwawaki et al., 2001)。PERK の翻訳抑制機構が詳細に明らかになっているのに対し、IRE1 β の翻訳抑制機構については不明な点が多いことから、我々は IRE1 β の翻訳抑制機構を明らかにすることを目的に、研究を行った。

私は、PERK による翻訳抑制が非常に効率の高い翻訳抑制であるのに対し、IRE1 β による翻訳抑制の効率が低いことに注目し、IRE1 β の翻訳抑制には選択性があるのではないかと考えた。細胞内における翻訳は、遊離型リボソームによる翻訳と小胞体結合型リボソームによる翻訳の大きく二つに分類することができる。前者は細胞質や核で機能するタンパク質、後者は分泌タンパク質や膜タンパク質を翻訳する。小胞体ストレスによって活性化した PERK はこの両者の翻訳を抑制する。しかし、小胞体ストレスを緩和するための翻訳抑制は小胞体膜結合型リボソームによる翻訳抑制だけで十分で、細胞質で翻訳される生存に必須な遺伝子の翻訳まで抑制してしまうのは、細胞にとって好ましくないように思われる。そこで私は、IRE1 β による翻訳抑制は、この小胞体膜結合型リボソームによる翻訳にのみ影響しているのではないかと考えた。第一部では、この仮説を検証するために遊離型リボソームと膜結合型リボソームによる翻訳量を簡便に測定できるアッセイ系を構築し、小胞体ストレスセンサーがそれぞれの翻訳に与える影響を調べた。その結果、IRE1 β が自身の RNase 活性に

よって膜結合型リボソームによって翻訳される mRNA を減少させ、小胞体へ流入する新規合成タンパク質の合成量を抑制していることが明らかとなった。また、IRE1 β が活性の有無に関わらず常にトランスロコン複合体に存在することで、小胞体ストレスに応じて素早く応答し、効率よく小胞体局在 mRNA を切断している可能性が示唆された。

Figure 1

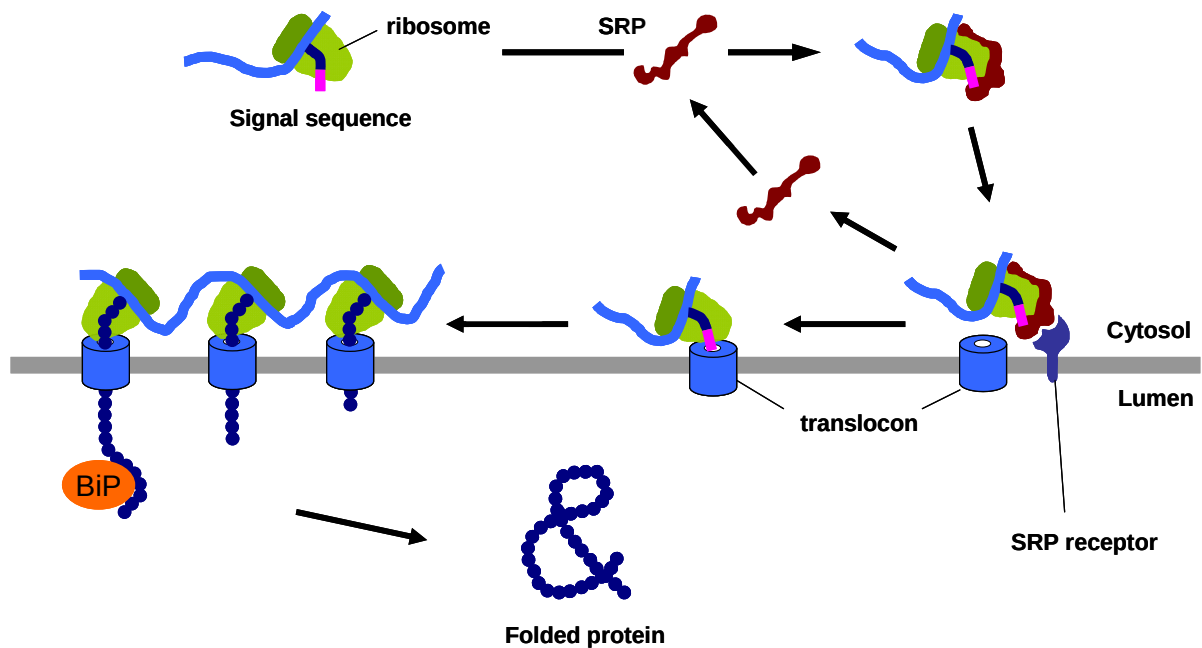


Fig. 1 SRP を介した小胞体膜へのターゲッティング

分泌タンパク質や膜タンパク質は、リボソームによって mRNA から疎水性に富む N 末端の小胞体シグナル配列が翻訳されると、小胞体シグナル認識粒子 (signal recognition particle : SRP) に結合し、翻訳が停止する。その後、小胞体膜上の SRP 受容体を介して、リボソームが小胞体膜透過チャネルであるトランスロコンと結合すると翻訳が再開され、翻訳と共役して新生ポリペプチドが小胞体内へと送り込まれる。小胞体内に送り込まれたポリペプチド鎖は、小胞体分子シャペロンである BiP やフォールディング酵素などによって正しく折りたたまれ、機能的なタンパク質へと成熟する。

Figure 2

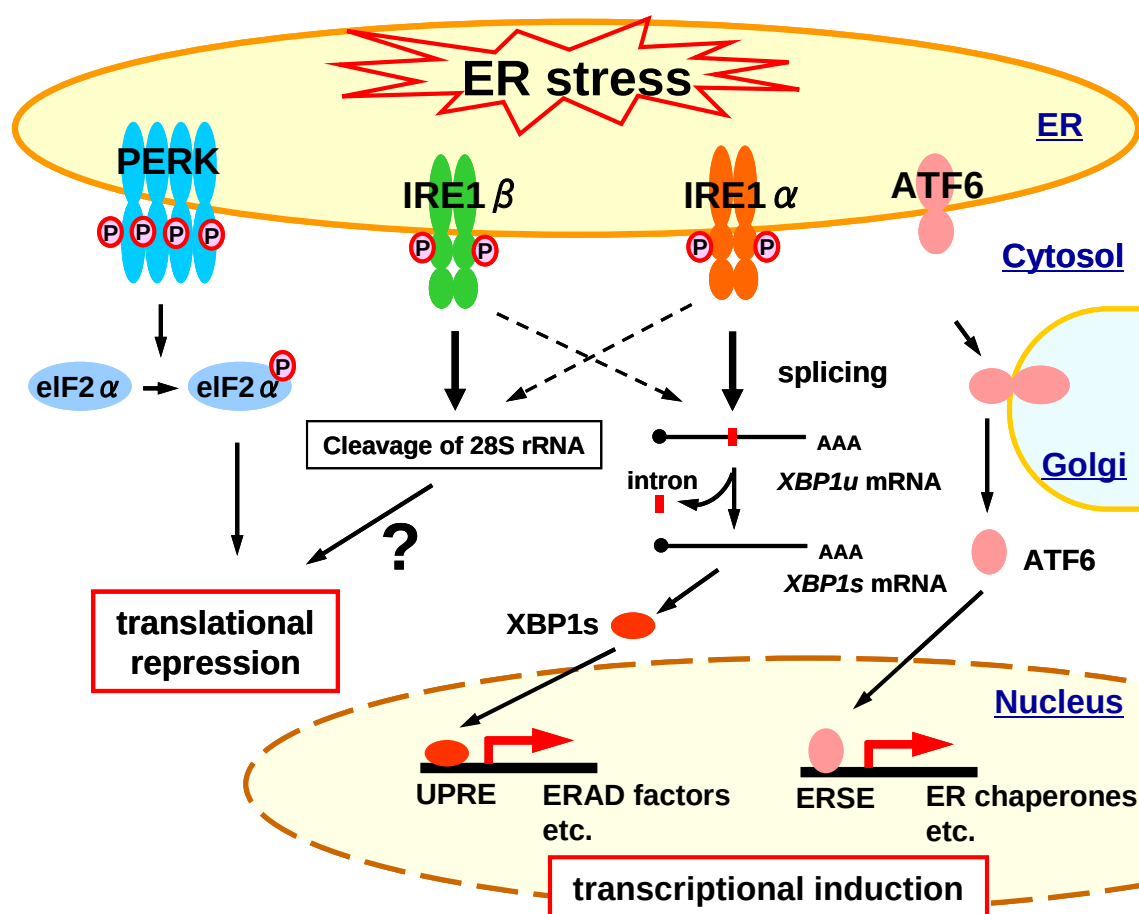


Fig. 2 小胞体ストレス応答

哺乳動物細胞には、PERK、IRE1、ATF6 の小胞体ストレスセンサーがあり、IRE1 は IRE1 α と IRE1 β の二つのパラログが存在する。PERK は小胞体ストレスにより活性化するとオリゴマー化し、自己リン酸化によって活性化すると自身のキナーゼ活性により翻訳開始因子である eIF2 α をリン酸化し、細胞内の全般的な翻訳を抑制する。ATF6 は、小胞体ストレスによってゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体に局在する S1P、S2P プロテアーゼによって膜内切断を受ける。切断によって遊離した細胞質ドメインは、転写因子として核内に移行し、主に ERSE 配列に結合することで小胞体シャペロンなどの転写を誘導する。IRE1 α および IRE1 β は、小胞体ストレスによってダイマーもしくはオリゴマー化し、自己リン酸化によって活性化すると RNase 活性を有するようになる。IRE1 α は、その RNase 活性により *XBP1u* mRNA を部位特異的切断することでスプライシングし、スプライシングによって生じた *XBP1s* mRNA から翻訳された XBP1s タンパク質は転写因子として機能を発揮し、主に UPRE 配列に結合して ERAD 因子や脂質合成酵素などの転写を誘導する。一方で、過剰発現によって活性化した IRE1 β はその RNase 活性により 28S rRNA の部位特異的な切断をする。また、28S rRNA の切断が直接の原因かどうかは明らかになっていないが、翻訳抑制能があることが示されている。IRE1 α と IRE1 β は RNase の基質特異性が異なることが示されており、過剰発現により活性化した IRE1 α は XBP1 をより強くスプライシングし、28S rRNA の切断活性は弱い。また、IRE1 β は XBP1 のスプライシング活性が弱く、28S rRNA の切断活性は強い。

2. 材料と方法

2.1. プラスミドの構築

小胞体局在型 Firefly luciferase の発現ベクター (pFL-SV40-ER) は、以下の手順で N 末端にウサギ (*Orytolagus cuniculus*) の calreticulin 由来の小胞体移行シグナルを、C 末端に小胞体残留シグナルである KDEL 配列を付加することによって作製した。

pCAX-F-XBP1-venus(Iwawaki et al., 2004)をテンプレートに primer A と primer B (Table 1) を用いて PCR を行った。得られた増幅断片をテンプレートとし、primer C と primer D (Table 1) で PCR を行った (この増幅断片を Ampricon ①とする)。次に、pGL3-BASIC (promega)をテンプレートに Primer E と primer F (Table 1) で PCR することで Firefly luciferase の C 末端に小胞体残留シグナルである KDEL 配列を付加した (この増幅断片を Ampricon ②とする)。Ampricon ①と Ampricon ②を overlap PCR によってつなぎ、pRL-SV40 (promega)の *Nhe* I、*Xba* I サイトに導入することで小胞体局在型 Firefly luciferase の発現ベクター (pFL-SV40-ER) を構築した。

小胞体局在型 Renilla luciferase の発現ベクター (pRL-SV40-ER) は以下のように作製した。上記 pFL-SV40-ER をテンプレートとし、primer C と primer G (Table 1) で PCR を行った (この増幅断片を Ampricon ③とする)。次に、pRL-SV40 をテンプレートに primer H と primer I (Table 1) で PCR を行った (この増幅断片を Ampricon ④とする)。Ampricon ③と Ampricon ④を overlap PCR によってつなぎ、pRL-SV40 (promega)の *Nhe* I、*Xba* I サイトに導入することで小胞体局在型 Renilla luciferase の発現ベクター (pRL-SV40-ER) を構築した。

Table 1 プラスミド構築に用いたプライマー

	名前	配列
A	Kpn I-signal-ERAI-S	5'- GGG GTA CCC CAC CAT GCT GCT CCC TGT GCC GCT GCT GCT CGG CCT GCT CGG CCT GGC CGC CGC CGA CTA CAA GGA CGA CGA TGA C -3'
B	Venus-BamH I-AS	5'- CGC GGA TCC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC -3'
C	Nhe I-ER SS-F	5'- CTA GCT AGC TAG CAT GCT GCT CCC TG -3
D	ER SS-Luc+-R	5'- GTT TTT GGC GTC TTC GGC GGC GGC CA -3'
E	ER SS-Luc-F	5'- CGC CGA AGA CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG -3'
F	Luc-KDEL-Xba I-R	5'- GCT CTA GAG CTC ACA GCT CGT CCT TCA CGG CGA TCT TTC CGC CCT TCT TG -3'
G	ER SS-Rluc-Rev	5'- GGA TCA TAA ACT TTC GAA GTG GCG GCG GCC A -3'
H	ER SS-Rluc-Fwd	5'- CGC CAC TTC GAA AGT TTA TGA TCC AGA ACA AAG -3'
I	Rluc-KDEL-XbaI-Rev	5'- GCT CTA GAG CTC ACA GCT CGT CCT TTT GTT CAT TTT TGA GAA CTC GCT CAA CG -3'

2.2. 細胞培養とトランスフェクション

HeLa 細胞(HeLa Tet-Off, Clontech #C3005-1)は 10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma #D6546)中で 37℃、5% CO₂ 下で培養した。

hIRE1、hPERK、Firefly luciferase および Renilla luciferase 発現プラスミドの HeLa 細胞へのトランスフェクションはリン酸カルシウム-DNA 共沈殿による方法で行った。1 x10⁵ cells / well の HeLa 細胞を 6 well プレートに播き、16 時間後に培地を交換し、2 時間培養した後に発現プラスミド 4 µg をトランスフェクトした。プラスミド DNA 4 µg を 10 µl の TE (pH8.0)に溶解し、2.5 M CaCl₂ 10 µl、滅菌蒸留水 80 µl、を加え、この溶液を 2x HBS (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂H₂O₄·12H₂O [pH 7.1]) 100 µl に滴下懸濁し室温で 20 分間静置した。その後、全量を細胞に滴下し 8 時間通常培養条件で培養した。その後、Hanks'溶液 2 ml で細胞を 2 回洗い、通常培地を加えさらに 16 時間培養し解析に用いた。

2.3. デュアルルシフェラーゼ解析

1x10⁵ の HeLa 細胞を 6 well プレートに播き、18 時間後、発現プラスミド 0.5 µg とレポータープラスミド pBL3-hBiP(-132) (K. Mori 博士からいただいた) 0.25 µg、standard plasmid (pRL-SV40 Vector) (Promega #E2231) 10 ng をトランスフェクトした。Dual-luciferase assay system (Promega # E1980)を用いて行い、その発光レベルは、ルミノメーター(AB-2200-R, ATTO)で検出した。

2.4. ウェスタンブロット解析

細胞は、10 µg/ml leupeptin、10 µg/ml pepstatin A、1 mM benzamidine を含む 1% Nonidet (N)P-40 / PBS で溶解した。その細胞抽出液または、デュアルルシフェラーゼ解析に用いた細胞抽出液は、SDS Sample Buffer (終濃度 50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2 % SDS、50 mM DTT、10 % glycerol and 0.01 % bromophenol blue)中で 98℃、5 分間熱変性処理をした。上述のサンプルは、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)によって分離し、そのタンパク質を、エレクトロブロッティング装置を用いてニトロセルロース膜 (Whatman) 上に転写した。本研究では以下の抗体を用いた；抗 GAPDH 抗体 ab9484 (Abcam)、抗 β-actin 抗体(Affinity BioReagent)、マウスモノクローナル抗 HA 抗体 12CA5 (Roche)、抗 Firefly luciferase 抗体 (promega)、抗 Renilla luciferase 抗体 (CHEMICON)、抗 KDEL 抗体 (Stressgen)。

2.5. プロテアーゼプロテクションアッセイ

細胞質局在型ルシフェラーゼと小胞体局在型ルシフェラーゼの遺伝子を導入した細胞 (6 well プレート) を、氷冷 PBS で 2 回洗浄し、100 µg/ml digitonin を含む KHM buffer (110 mM KAc, 20 mM HEPES, pH 7.2, 2 mM MgAc₂, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml

pepstatin A and 1 mM benzamidine)で氷上に5分間静置して細胞膜の透過処理を行った。その後、digitonin を含まない KHM buffer で洗浄し、trypsin 未処理サンプルを回収した。trypsin 処理サンプルは、それぞれ 50、100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ trypsin を含む KHM buffer で5分間室温に静置した。反応液に、終濃度 2 mg/ml になるように trypsin inhibitor を加え、さらに5分間室温に静置した。その後 KHM buffer で洗浄し、trypsin 処理サンプルを回収した。

2.6. ジギトニンによる細胞分画

ジギトニンによる細胞分画は以前に行われている方法を参考に行った(Stephens et al., 2005; Yanagitani et al., 2009)。細胞をトリプシン処理し、遠心分離 (500 x g、5 分) によって細胞を沈降した。細胞ペレットを、0.008%ジギトニン (Sigma) を含む緩衝液 A (150 mM KOAc, 20 mM HEPES/KOH (pH 7.5)、2.5 mM MgAc₂, 2 mM DTT、10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin、10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A、1 mM benzamidine、200 U/mL RNAsin (Promega))で懸濁、氷上に5分静置し、その細胞膜を透過させた。次に、細胞懸濁液を 500 x g、5 min、4°Cにて遠心分離し、上清を遊離リボソーム画分として回収した。続いて沈殿を、2 %ドデシルマルトシド (Sigma) を含む緩衝液 A で再懸濁し、氷上で5分間静置した。この懸濁液を 500 x g、5 min、4°Cにて遠心分離し、得られた上清を膜結合型リボソーム画分とした。細胞分画後の画分からの RNA 抽出では、ISOGEN-LS (Nippon Gene)を用いて抽出精製した。

2.7. 細胞質タンパク質および糖タンパク質のタンパク合成量の測定

細胞質タンパク質画分と糖タンパク質画分の分画は以前に報告されている方法で行った(Rutkowski et al., 2007)。6-well プレートに 80-90% コンフルエントの細胞をメチオニン、システイン不含培地で30分前培養し、1.85 MBq/ml の³⁵S]メチオニン / システインを加えた。30分のラベルの後、氷冷した PBS で2回洗浄し、1 ml/well の 100 $\mu\text{g/ml}$ digitonin を含む KHM buffer (110 mM KAc, 20 mM HEPES, pH 7.2, 2 mM MgAc₂, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A and 1 mM benzamidine)で氷上に5分間静置して細胞質タンパク質 を抽出し、上清を細胞質画分とした。その後 digitonin を含まない KHM buffer で一度洗浄し、細胞残渣を IP buffer (1% Triton X-100, 50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A and 1 mM benzamidine)で溶解した。その溶解液に concanavalin-A (ConA) ビーズを加え、4 °C で4時間攪拌した後、ConA ビーズを IP buffer で3回洗浄した。洗浄した ConA ビーズを、競合糖を含む Buffer (0.2M α -d-methyl-mannopyranoside in IP buffer) で1時間室温にて攪拌し、ConA ビーズに結合した糖タンパク質を溶出し、糖タンパク質画分を得た。それぞれの画分を TCA 沈殿し、³⁵S の放射活性を測定した。また、それぞれの画分の抽出液を SDS-PAGE にて分離し、オートラジオグラフィーで検出した。

2.8. Real-time PCR 解析

Total RNA は RNAiso plus (TaKaRa) を用いて抽出精製した。その後、イソプロパノール沈殿法で RNA を精製し、80%エタノールで洗い、DEPC 処理水に溶解した。得られた RNA を RNase free DNase I (TaKaRa) で処理し、RNAiso plus で RNA を再抽出した。Total RNA 1.0 µg に 2.5 mM dNTPmix (TaKaRa #R019A) 2 µl と 50 ng/µl Random Hexamer (invitrogen #51709) 1 µl、総量が 6 µl となるように DEPC 水を加え、65°C で 5 分間反応させた。この溶液に逆転写反応液 (DEPC 水 0.375 µl, 5×RT buffer 2 µl, 0.1M DTT 1 µl, RNaseOUT 0.5 µl, 200 U/µl SuperScriptII (invitrogen #18064-014) 0.125 µl) を加えて逆転写反応 (25°C, 10 分間、42°C, 50 分間、70°C, 15 分間) を行った。その後、反応液に Ribonuclease H (RNaseH) (invitrogen #18021-014) 0.5 µl を加えて 37°C で 20 分間反応させたものを cDNA サンプルとした。得られた cDNA サンプルをテンプレートとし、10 µM 5'プライマー 0.5 µl、10 µM 3'プライマー 0.5 µl、dH₂O 3.5 µl、SYBR premix Taq TM (TaKaRa #RR0419) 5 µl を Multiwell Plate384 にアプライし、LightCycler®480 (Roche) を用いて Real Time-PCR を行った。使用したプライマーは Table 2 に示す。

Table 2 Real-time PCR に用いたプライマー

Gene	Accession No.	Primer sequence	Amplicon size (bp)
ACTB	NM_001101.3	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'	97
		5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'	
B2M	NM_004048.2	5'-TTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'	86
		5'-TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC-3'	
TBP	NM_003194.3	5'-GCTGGCCCATAGTGATCTTT-3'	60
		5'-CTTCACACGCCAAGAAACAGT-3'	
GAPDH	NM_002046.3	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	66
		5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	
18S rRNA	NR_003286.1	5'-CGATTGGATGGTTTAGTGAGG-3'	87
		5'-AGTTGACCGTCTTCTCAGC-3'	
FBN1	NM_000138.3	5'-AGCGGGGATTCTCACTTGAT-3'	60
		5'-CCTCACACTCGTCCACGTC-3'	
GYLTL1B	NM_152312.3	5'-CCGGGGATTTAACACAGGT-3'	80
		5'-TCAGCCTCCACATCTGCTC-3'	
SCARA3	NM_016240.2	5'-CAAGAAGCTTGTGTTAATGCAGA-3'	77
		5'-CATGGCAGAAAGAGCAGTTG-3'	
FBLN1	NM_006485.3	5'-CGAATGCAAGACGGGTACT-3'	68
		5'-GCTGGCACTCGTTGACATC-3'	

CD59	NM_203330.2	5'-GGAGGGTCTGTCCTGTTTCG-3'	73
		5'-AGCACTGCAGGCTATGACC-3'	
TFRC	NM_003234.1	5'-TTGAGAAAACAATGCAAAATGTG-3'	69
		5'-CCCAGTTGCTGTCCTGATATAGA-3'	
LAMP1	NM_005561.3	5'-GTGGGTCCAGGCTTTCAA-3'	78
		5'-AGCATGCTGTTCTCGTCCA-3'	
NFKB1	NM_003998.2	5'-CTGGCAGCTCTTCTCAAAGC-3'	71
		5'-TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA-3'	

2.9. RT-PCR による *XPB1* mRNA スプライシング解析

Total RNA は、RNAiso plus (TaKaRa)を用いて抽出した。一本鎖 cDNA 合成は、Random Hexamer プライマーを用いて、Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen #11904-018)により行った。*XPB1* cDNA を増幅するため、ヒト *XPB1* 特異的プライマー5X (5' - GAACCAGGAGTTAAGACAGC -3') と 3X (5' - AGTCAATACCGCCAGAATCC -3')で、rTaq DNA Polymerase (TaKaRa #R001A)を用いて 27 サイクル(98℃、30 秒; 55℃、30 秒; 72℃、30 秒[最後のサイクルは 7 分]) PCR を行った。173 と 199 bp の PCR 産物(それぞれスプライシング後 [*XPB1s*]とスプライシング前[*XPB1u*]を示す)は、2%アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色により検出した。

2.10. 免疫染色法による IRE1 の局在観察

HeLa 細胞を 6well プレートにまき、16 時間培養後、2.2. に従い目的の IRE1 発現プラスミドをトランスフェクションした。2 ml/well の PBS 溶液 [1.37 M NaCl、27 mM KCl、100 mM Na₂HPO₄·12H₂O、18 mM KH₂PO₄] で 2 回洗浄後、2 ml/well の 4%PFA / PBS で室温、15 分間反応させ細胞を固定した。2 ml/well の PBS 溶液で 2 回洗浄した後、2 ml/well の Methanol で -30℃、5 分間 permeabilize 処理を行った。更に、2 ml/well の PBS 溶液で 3 分間、2 回洗浄した後、2ml/well の 3 % BSA (CALBIOCHEM)を含む PBS 溶液で 4℃にて一晩、blocking を行った。次に 3 % BSA / PBS で希釈を行った 1 次抗体と室温で 1 時間反応させた。その後、2 ml / well の PBS 溶液で 3 分間×4 回、2 ml / well の 0.03 % BSA / PBS で 3 分間×1 回洗浄し、3 % BSA / PBS で希釈を行った蛍光色素標識 2 次抗体と遮光しながら、室温で 1 時間反応させた。更に、2 ml / well の PBS 溶液で 3 分間×5 回洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)で封入した。封入後、暗室の水平な場所で一晩乾かし、マニユキアでシールドしたものをサンプルとした。観察は Apotome(ZEISS)顕微鏡で観察した。

2.11. 免疫沈降解析

10 cm dish の HeLa 細胞に HA タグ付の hIRE1 β を過剰発現させ、IP Buffer (1 % NP-40、10 μ g/ml leupeptin、10 μ g/ml pepstatin A、1 mM benzamidine を含む PBS 溶液) 1 ml で lysis し、遠心により核を除いた。その lysate 1 ml に、IP Buffer で平衡化した protein G Sepharose 4 Fast Flow (pharmacia Biotech) 20 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C、1 時間攪拌した。その後、遠心 (3000 rpm、4 $^{\circ}$ C、30 秒間) し、上清を新しいエッペンドルフチューブに移し、抗 HA 抗体 12CA5 (Roche) もしくは抗 Sec61 β 抗体 5 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C、1 時間攪拌した後に、protein G Sepharose 4 Fast Flow 20 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C、4 時間攪拌した。次いで、遠心 (3000 rpm、4 $^{\circ}$ C、30 秒間) し、上清を除き、IP Buffer で 5 回洗浄した。これを 2 $\times$ Sample Buffer (+ DTT) を 20 μ l 加えて 98 $^{\circ}$ C、5 分間加熱処理し、免疫沈降サンプルとし、ウェスタンブロット解析を行った。

3. 結果

3.1. 細胞内翻訳量解析のアッセイ系の構築

我々の研究グループは、IRE1 β が翻訳抑制に関与することを以前報告している (Iwawaki et al., 2001)。しかし、この翻訳抑制は PERK による翻訳抑制と比較して効率の低いものであった。そこで我々は、IRE1 β による翻訳抑制は小胞体を経由するタンパク質に選択的なものではないかと考えた。細胞内における翻訳は、細胞質の遊離型リボソームによる翻訳と小胞体膜上の膜結合型リボソームによる翻訳の大きく二つに分別できる。我々は、dual-luciferase assay の改良により、この二つの翻訳量を簡便に検出するための assay 系の構築を行った。通常、Firefly luciferase および Renilla luciferase は、細胞質で翻訳されるタンパク質であるが、Firefly luciferase に小胞体移行シグナルおよび小胞体残留シグナルを付加することで、強制的に小胞体膜上の膜結合型リボソームによって翻訳され、小胞体内に留められるように設計した (Fig. 3A)。この小胞体局在型の Firefly luciferase (Fluc-ER) および細胞質局在型 Renilla luciferase (Rluc-Cyt) を共発現させることで、遊離型リボソームおよび膜結合型リボソームによる翻訳量を同一細胞内で簡便に計測することが可能になると考えた。

Firefly Luciferase には、小胞体局在にした際に N 型糖鎖修飾を受けると予測される配列 Asn-Gly-Ser を 1 つ有していたため、細胞に発現させた Fluc-ER が小胞体局在であることを糖鎖修飾の有無で明らかにできるのではないかと考えた。HeLa 細胞に Fluc-ER と Rluc-Cyt を過剰発現しウェスタンブロッティングにより検出すると、小胞体局在型ルシフェラーゼのバンドが二つ検出された (Fig. 3B 上段 lane1)。N 型糖鎖修飾阻害剤である Tunicamycin (Tm) で処理したサンプルでは、二つのバンドのうち上のバンドが減少し (Fig. 3B 上段 lane2)、N 型糖鎖の糖鎖分解酵素である endoglycosidase H (endo H) で処理したサンプルでは上のバンドが完全になくなった (Fig. 3B 上段 lane4)。このことから、上のバンドが糖鎖修飾された Fluc-ER、下のバンドが糖鎖修飾を受けていない Fluc-ER であることが明らかとなり、少なくとも糖鎖修飾を受けている一部の Fluc-ER に関しては小胞体に局在していることが確認された。しかし、糖鎖修飾を受けていない Fluc-ER が、小胞体に入らずに細胞質にもれてしまったものなのか小胞体に局在しているけれども糖鎖修飾を受けていないものなのかははっきりしない。そこでプロテアーゼプロテクションアッセイにより、小胞体局在を確認することにした。HeLa 細胞に Fluc-ER と Rluc-Cyt を過剰発現させ、ディッシュ上で低濃度のジギトニンを作用させることで細胞膜特異的に膜透過処理をし、洗浄後にトリプシン処理により細胞質局在のタンパク質を分解した。その後、細胞を溶解しルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、細胞質局在の Rluc-Cyt の活性はジギトニン処理で細胞外に流出したために減少し、トリプシン処理でさらに分解を受けて活性が減少した。一方、小胞体局在型の Fluc-ER はジギトニン処理、ト

リプシン処理をしても活性の減少は認められなかった (Fig. 4A)。この細胞溶解液を用いウェスタンブロット解析すると、ジギトニン処理+トリプシン処理サンプルでサイトゾルマーカの β -actin のバンドが減少したのに対し、小胞体マーカの BiP は減少しなかったことから、プロテアーゼプロテクションアッセイが正しく解析できていることが確認できた (Fig. 4B)。このサンプルにおいて、Rluc-Cyt のバンドはジギトニン、トリプシン処理で減少したことから、Rluc-Cyt が細胞質局在であること、Fluc-ER のバンドが減少しなかったことから、Fluc-ER は小胞体局在であることが示された (Fig. 4B)。ここで注目すべき点は、Fluc-ER の二本のバンド両者が減少しなかったことである。このことから、糖鎖修飾を受けていない Fluc-ER も細胞質で翻訳されているのではなく、小胞体膜上で翻訳され、正しく小胞体内に挿入されていることが明らかになった。

3.2. IRE1 β は RNase 活性により小胞体タンパク質の翻訳を抑制する

この assay 系を用いて、小胞体ストレスセンサーが遊離リボソームによる翻訳 (Rluc-Cyt) および膜結合型リボソームによる翻訳 (Fluc-ER) に与える影響を検証した。小胞体ストレスセンサー分子は、過剰発現によって活性化するため (Tirasophon et al., 2000)、Fluc-ER および Rluc-Cyt をそれぞれのセンサー分子とコトランスフェクションすることで、それぞれのセンサー分子が遊離型リボソームおよび膜結合型リボソームによる翻訳に与える影響を調べた。PERK の過剰発現では、eIF2 α のリン酸化を介した翻訳の開始が阻害されるため (Harding et al., 2000a)、遊離型リボソームおよび膜結合型リボソームの両者の翻訳が抑制される。実際、この assay 系においても、Fluc-ER および Rluc-Cyt の両者の翻訳が抑制されることが確認された (Fig. 5A 左)。Figure では、膜結合型リボソーム選択的翻訳抑制を示す値として、Fluc-ER 活性 / Rluc-Cyt 活性 (Fluc-ER / Rluc-Cyt) を表しており、PERK による翻訳抑制は選択性がないため、この値は約 0.9 と 1.0 に近い値を示した (Fig. 5A 左)。この Fluc-ER / Rluc-Cyt の値は、値が小さいほど膜結合型リボソーム選択的な翻訳抑制が起きているということを表している。IRE1 β の過剰発現では、Fluc-ER の翻訳を顕著に抑制したのに対し、Rluc-Cyt の翻訳にはほとんど影響を与えなかったため、Fluc-ER / Rluc-Cyt の値は約 0.2 と小さくなった (Fig. 5A 中央)。この結果から、IRE1 β が小胞体膜上での翻訳を選択的に抑制していることが示唆された。また、IRE1 α の過剰発現では、Fluc-ER の活性はほとんどコントロールと変わらなかったが、Rluc-Cyt の活性が上がっていたため、Fluc-ER / Rluc-Cyt の値が 1 より小さくなった (Fig. 5A 右)。細胞質局在型ルシフェラーゼを Firefly luciferase にしたときも、細胞質局在の Fluc-Cyt の活性が上昇していたことから (Fig. 8A 右)、IRE1 α の過剰発現でなぜ細胞質局在型ルシフェラーゼの活性が上昇するのかは定かではないが、IRE1 α による選択的な翻訳抑制はほとんどないか限定的なものであると考えている。また、活性測定に用いた細胞抽出液をウェスタンブロッティング解析した結果、それぞれのセンサ

一の発現および、Fluc-ER の活性値と同様の Fluc-ER の発現が確認できた (Fig. 5B)。以上の結果は、小胞体局在型ルシフェラーゼを Renilla に置き換えてもほぼ同様の結果であった (Fig. 6-8)。

次に、IRE1 のどの領域が小胞体タンパク質選択的な翻訳抑制に重要であるかを調べるために、様々な IRE1 変異体を用いて検証した。まず、実験で用いた IRE1 変異体について記述しておく (Fig. 9)。hIRE1 α K599A (α K599A) と hIRE1 β K547A (β K547A) はキナーゼ活性欠損変異体で、自己リン酸化による活性化能がないためリボヌクレアーゼ活性を有さない変異体である。 α K907A と β K855A はリボヌクレアーゼ変異体で、キナーゼ活性は有するがリボヌクレアーゼ活性はない (Tirasophon et al., 2000)。 β Δ R は RNase ドメイン欠損変異体を示す。 α/β R は IRE1 α の RNase ドメイン (829-977 a.a.) を IRE1 β の RNase ドメイン (777-925 a.a.) に置き換えたキメラ体で、 β/α R は IRE1 β の RNase ドメインを IRE1 α の RNase ドメインに置き換えたキメラ体である。

Fluc-ER および Rluc-Cyt を各種 IRE1 とコトランスフェクションし、それぞれの変異体が翻訳に与える影響を調べた。その結果、hIRE1 β WT の過剰発現で効率よく選択的な翻訳抑制が起こっているのに対し、 β K547A および β K855A 変異体では選択的な翻訳抑制が起こらなかった (Fig. 10)。また、Fig. 5A 同様 hIRE1 α WT において Fluc-ER / Rluc-Cyt の値がわずかに減少していたが、 α K599A および α K907A 変異体では選択的な翻訳抑制が起こらなかった。面白いことに、IRE1 α の RNase domain を IRE1 β の RNase domain と置き換えた α/β R キメラ体では、IRE1 β WT と同様に顕著な選択的な翻訳抑制が観察されたが、IRE1 β の RNase domain を IRE1 α の RNase domain と置き換えた変異体では、選択的な翻訳抑制が起こらなかった。これらの変異体の RNase 活性は、ともに機能的であることが確認されていることから (Imagawa et al., 2008)、この assay 系における選択的な翻訳抑制には IRE1 β の RNase domain が重要であることが示唆された。以上のことから、IRE1 β はその RNase 活性によって小胞体を経由する膜タンパク質や分泌タンパク質の翻訳のみを抑制する可能性が示唆された。

3.3. IRE1 β の RNase ドメインは小胞体局在タンパク質の mRNA を減少させる

IRE1 β の RNase domain に依存して起こる現象としてこれまでに明らかになっているのは 28S rRNA の切断である (Imagawa et al., 2008; Iwawaki et al., 2001)。そこで、28S rRNA の切断が選択的な翻訳抑制に関与している可能性について検討した。IRE1 β の過剰発現細胞において、遊離型リボソームと膜結合型リボソームのどちらのリボソームがより切断されているかを経時的に調べた結果、意外にも遊離型リボソームにおいても 28S rRNA が切断されていた (Fig. 11)。これは、小胞体膜上で切断された 28S rRNA が細胞質に遊離したものであると考えられるが、この切断されたりリボソームが大量に存在している細胞質において、翻訳に影響が見られないことから、

少なくとも切断された 28S rRNA からなるリボソームも翻訳能を有していると考えられる。

次に、RNase domain を介して mRNA が切断されている可能性について検討した。IRE1 の RNase ドメインと低いながらも相同性を示す分子に、RNase L がある。RNase L は、ウイルス RNA の分解に関与していることが示唆されており (Liang et al., 2006)、細胞内の mRNA を切断することや (Li et al., 2000)、IRE1 β と同様 28S rRNA を切断することなどが報告されている (Silverman et al., 1983)。そこで私は、IRE1 β が mRNA を切断する可能性があるのではないかと考えた。実際に、Fluc-ER および Rluc-Cyt の mRNA に与える影響を Real-time PCR により調べると、IRE1 β の RNase domain を有する hIRE1 β WT と hIRE1 α/β R でのみ有意に Fluc-ER mRNA が減少していた (Fig. 12)。以上の結果から、IRE1 β が小胞体膜上で翻訳されている mRNA をその RNase 活性を介して分解し、小胞体内に流入する新規合成タンパク質の合成量を調節している可能性が示唆された。

3.4. IRE1 β は小胞体局在 mRNA を特異的に減少させることで小胞体膜上での新規合成タンパク質の合成量を制限する

これまでに、遊離型リボソームおよび膜結合型リボソームの翻訳量 assay において、モデルタンパク質への IRE1 β の影響を観察してきた。そこで次に、IRE1 β が内在性タンパク質の合成に与える影響について調べた。IRE1 β 過剰発現細胞を [35 S] メチオニン/システインで pulse label した後に、ジギトニンを用いた細胞分画によって細胞質画分と膜画分に分画した。その後、膜画分を Con A (α 結合型マンノースと末端グルコース基に結合するレクチン) -sepharose ビーズを用いて糖タンパク質を精製した (糖タンパク質画分)。それぞれの画分の TCA 沈殿物の放射活性を測定した結果、IRE1 β WT の過剰発現で糖タンパク質選択的なタンパク合成量の減少が観察された (Fig. 13A)。それぞれの画分を SDS-PAGE で分離すると、合成量の減少している糖タンパク質の中でもはっきりとした特異性があるわけではなく糖タンパク質の合成が全般的に減少していることが明らかとなった (Fig. 13B)。さらに、いくつかの細胞質局在タンパク質をコードする内在性の mRNA および小胞体移行シグナルを有する遺伝子をコードする内在性の mRNA 量を Real-time PCR により計測した。その結果、計測した 4 種類の細胞質局在 mRNA (ACTB、GAPDH、NFKB1、TBP1) の量には影響なかったが、計測した 8 種類の小胞体移行型 mRNA (FBLN1、B2M、FBN1、CD59、LAMP1、TFRC、SCARA3、GYLTL1B) 全てにおいて、mRNA の減少が確認された (Fig. 14)。以上の結果から、過剰発現によって活性化した IRE1 β が小胞体を経由するタンパク質をコードした mRNA のみを分解することで小胞体に流入する新規合成タンパク質の量を減少させることが示唆された。

3.5. IRE1 β は活性の有無に関わらずトランスロコン複合体に存在する

IRE1 β が小胞体ストレス時に活性化し、効率よく小胞体膜結合型リボソームによって翻訳されている mRNA を直接切断しているのであれば、IRE1 β が小胞体のトランスロコンの近くに存在していると都合がいいように思われる。実際、トランスロコンの構成因子である Sec61 β -GFP と hIRE1 β -HA を共発現させ、抗 HA 抗体にて免疫沈降すると、hIRE1 β -HA と Sec61 β -GFP の共沈降が観察された (Fig. 15)。また、hIRE1 β -HA を過剰発現させた細胞の細胞抽出液で、内在性 Sec61 β を免疫沈降すると、hIRE1 β -HA も共沈降された (Fig. 16)。IRE1 β と Sec61 β の相互作用は、IRE1 β WT および IRE1 β KM でほとんど差がなかったことから (Fig. 15, 16)、IRE1 β の活性に関わりなく IRE1 β は常にトランスロコン複合体に存在していることが示唆された。

3.6. IRE1 β は細胞質領域依存的にクラスターを形成する

これまでに、酵母 Ire1p が高活性化状態にあるときにクラスターを形成することが明らかになっている。しかし、動物細胞において IRE1 がクラスターを形成するかどうかは明らかになっていなかった。そこで、過剰発現により活性化した IRE1 α および IRE1 β がクラスターを形成するかどうかを免疫蛍光染色法により観察した。HeLa 細胞に HA tag を付加した IRE1 α WT、K599A および IRE1 β WT、K547A を過剰発現させ、抗 HA 抗体で検出した。その結果、IRE1 α WT、K599A の過剰発現では小胞体全般的に局在していたのに対し、IRE1 β WT の過剰発現ではクラスター形成によるドット状に局在していることが観察された (Fig.17)。また、IRE1 β K547A の過剰発現ではクラスター形成は観察されず、小胞体全般的に局在していた (Fig.17)。このことから、IRE1 α にはクラスター化能がなく、IRE1 β はキナーゼ活性依存的にクラスター化することが明らかになった。次に、IRE1 β のクラスター化に重要な領域がどこなのかを、IRE1 のキメラ体を用いて調べた。IRE1 α 全長ではクラスター化が観察されなかったのに対し、IRE1 α の細胞質領域を IRE1 β の細胞質領域に換えたキメラ体 IRE1 α/β ではクラスター化が観察された (Fig.18)。一方、IRE1 β の細胞質領域を IRE1 α の細胞質領域に換えたキメラ体 IRE1 β/α では、クラスターの形成は観察されなかった (Fig.18)。このことから、IRE1 β のクラスター化には細胞質領域が重要であることが明らかになった。さらに、IRE1 β の細胞質領域のうちキナーゼ領域と RNase 領域のどちらが重要か RNase 領域のキメラ体を用いて観察したところ、IRE1 β の RNase 領域を IRE1 α の RNase 領域に置換したキメラ体 IRE1 β/α R、および IRE1 α の RNase 領域を IRE1 β の RNase 領域に置換した IRE1 α/β R ではクラスター化が観察されなかった。以上の結果から、IRE1 β は細胞質領域依存的にクラスター化することが明らかとなった。

4. 考察

4.1. IRE1 β の小胞体経由タンパク質選択的な翻訳抑制機構について

今回示した結果は、IRE1 β が分泌タンパク質の mRNA を分解することで小胞体に流入する新規合成タンパク質の合成量を減少させるという IRE1 β の翻訳抑制モデルを示唆する結果である (Fig. 19)。第一に、IRE1 β の過剰発現で小胞体局在の *Fluc-ER* の翻訳量が顕著に減少し、細胞質局在の *Rluc-Cyt* の翻訳量には影響しなかった (Fig. 5A)。また、mRNA レベルでも同様の結果が得られた (Fig. 12)。第二に、その mRNA の減少には IRE1 β の RNase ドメインおよび RNase 活性が重要であり、IRE1 β の RNase 活性に依存して小胞体局在の *Fluc-ER* mRNA が減少していた (Fig. 12)。第三に、IRE1 β の過剰発現細胞では内在性の小胞体を経由するタンパク質である糖タンパク質全般の合成が減弱しており、いくつかの小胞体経由タンパク質の mRNA レベルを調べた結果、調べた全ての小胞体経由タンパク質の mRNA の減少が観察された (Fig. 13, 14)。

しかし、このモデルを完全に証明するためにはまだ証拠が足りていないのも事実である。例えば、小胞体局在の *Fluc-ER* mRNA の減少が IRE1 β の RNase 活性によってもたらされているのは明らかだが、IRE1 β が直接 mRNA を分解していることは示せていない。前任者の研究では、昆虫細胞で IRE1 α および IRE1 β のキナーゼ、RNase ドメインを含む C 末端を発現させ、精製したリコンビナント IRE1 の RNase 活性の基質特異性が異なることが示されていた (Imagawa et al., 2008)。このリコンビナント IRE1 β で Firefly luciferase mRNA や Renilla luciferase mRNA を反応させても切断活性はほとんど観察されなかった (今川、未発表データ)。また、これまでにいくつかの方法で精製してきた IRE1 α と IRE1 β を用いて *in vitro* mRNA cleavage 反応を行ってきたが、IRE1 α において mRNA の切断活性が検出されることがあっても、同じように精製してきた IRE1 β では mRNA の切断活性を検出することができていない。私はこの理由として、精製 IRE1 β が RNase 活性を維持した状態で精製できていないことが原因なのではないかと考えている。

私はこれまでに、IRE1 α と IRE1 β を培養細胞内に過剰発現させた際の両者の蛍光免疫染色像が明らかに異なることを見出している。それは、IRE1 α の過剰発現では、IRE1 α が細胞内の小胞体全体に広く局在しているのに対し、IRE1 β の過剰発現では、IRE1 β が小胞体の中でも核に近い場所に局在化しているということである (Fig. 17)。酵母の Ire1p では、高活性化状態ではクラスターを形成することが示されていることから (Kimata et al., 2007)、IRE1 β はクラスター形成能が高いのに対して、IRE1 α はクラスター形成能が低く、IRE1 β の高活性化状態の維持にはこのクラスター化状態が重要なのではないかと考えている。最近の報告で、酵母 Ire1 の細胞質ドメインを精製する際に、その N 末端を少し長くしてやることで高度にクラスター化した状態の細胞質ドメインを精製することができ、その RNase 活性が劇的に上昇すること

が示されている(Korennykh et al., 2009)。著者は、IRE1 β の様々な変異体の局在観察をすることで、IRE1 β のクラスター化に必要な領域が IRE1 β の細胞質領域全長が必要であることを明らかにしている (Fig.18)。このことから、IRE1 β の mRNA 分解活性には、細胞質領域のクラスター化状態が重要であると考えられる。今までの精製方法では IRE1 は二量体の状態でしか精製されていないため、十分な RNase 活性が維持されておらず、mRNA 切断活性が検出できていないものと思われる。今後は、IRE1 の細胞質ドメインをクラスター化した状態で精製してくるための工夫が必要であると考えている。

4.2. IRE1 α と IRE1 β の RNase の基質特異性の違いについて

これまでに、IRE1 α と IRE1 β の RNase の基質特異性が異なることが報告されており、*in vivo* で過剰発現させた IRE1 α が XBP1 をよくスプライシングし 28S rRNA の切断活性が弱いのにに対し、IRE1 β は XBP1 のスプライシング活性が弱く 28S rRNA の切断活性が強いことが示されている(Imagawa et al., 2008)。近年、哺乳類 IRE1 が小胞体局在の mRNA を分解することが次々に報告されてきているが(Hollien et al., 2009; Iqbal et al., 2008; Lipson et al., 2008; Oikawa et al., 2007)、IRE1 α と IRE1 β で分解する mRNA の特異性に違いがあるのかどうかについてはまだ明らかになっていない。Fig. 14 で HeLa 細胞に IRE1 β を過剰発現させた際に、小胞体局在の内在性 mRNA の量を調べたように、IRE1 α を過剰発現して調べてみると、基質特異性に違いがある可能性が示唆された。IRE1 β に関してはこれまでに調べた全ての小胞体局在 mRNA を減少させたが、IRE1 α ではまれにあまり影響を受けない小胞体局在 mRNA があることがわかった (Fig. 20)。今回構築した、*Fluc-ER* mRNA もその 1 つである (Fig. 12)。私は、IRE1 α が *XBP1u* mRNA のループの部分の特異的に切断するように(Yoshida et al., 1998)、mRNA のループ構造を好んで切断するのに対し、IRE1 β の基質特異性は IRE1 α よりも低く配列や構造の特異性があまりないのではないかと考えている。実際、IRE1 β の過剰発現では、XBP1 のスプライシングがほとんど起こらないだけでなく、*XBP1u* mRNA の量も減少する (Fig. 21 lane 4)。これは、XBP1 のループ構造以外の場所で切断されていることを示唆する結果である。これまでに調べられている mRNA の分解は、IRE1 の過剰発現によるものがほとんどで、生理的な発現量の IRE1 α と IRE1 β で基質特異性が異なるのかどうかは今後明らかにするべき命題である。

4.3. Fluc-ER の IRE1 β 活性化レポーターとしての利用

今後、IRE1 α と IRE1 β の詳細な研究を進めていく上で、それぞれの活性化をモニタリングできるレポーターがあると便利であると思われる。現時点で、IRE1 α の活性化をモニタリングすることが可能なレポーターは、XBP1 のスプライシング反応を

利用したレポーターが開発されている(Iwawaki et al., 2004)。これにより生物個体のどの組織で IRE1 α が活性化されているのかが明らかになり、IRE1 α の機能解析の様々な場面で利用され、小胞体ストレス応答の解明に大きく貢献してきた(Iwawaki and Akai, 2006; Iwawaki et al., 2009; Yoshiuchi et al., 2009)。しかし、IRE1 β の活性化をモニタリングするレポーターは未だ開発されていない。今回の実験で、小胞体局在型 Firefly luciferase (Fluc-ER) の mRNA は IRE1 β の過剰発現によって減少するが、IRE1 α の過剰発現ではほとんど影響を受けなかったことから (Fig. 12)、Fluc-ER を IRE1 β の活性化特異的なレポーターに応用できる可能性が示唆された。また、XBP1 のスプライシングは IRE1 α で非常に強く、IRE1 β で非常に弱いことから、ERAI システムでは IRE1 α の活性化をモニタリングするレポーターとして利用できる。IRE1 α と IRE1 β の活性化を別々にモニターできるようになれば、小胞体ストレスの感知機構の違いがあるのか、小胞体ストレスの状況によって活性化状態の違いがあるのかどうかなどを調べるのによいツールになると考えられる。

4.4. 細胞内翻訳量アッセイシステムの有用性について

今回我々が作製した細胞内翻訳量アッセイシステムでは、小胞体局在型ルシフェラーゼと細胞質局在型ルシフェラーゼを組み合わせることによって、細胞内における遊離型リボソームによる翻訳量と膜結合型リボソームによる翻訳量の両者を同一細胞内で簡便に検出することが可能となったこれまでにない画期的なアッセイシステムである。これまでによく知られている翻訳抑制は遊離型リボソームと膜結合型リボソームの両者に対する翻訳抑制で、そのどちらかの翻訳のみを抑制する機構に関してはあまり知見がない。近年、様々な病気や傷害において小胞体ストレスを介したアポトーシスによって症状が重篤化することが報告されており、ケミカルシャペロンや小胞体分子シャペロン特異的な誘導剤によって病状を和らげることが期待されている(Back et al., 2009; Hino et al., 2010; Kudo et al., 2008; Ozcan et al., 2006)。分泌の盛んな細胞などでは、小胞体への新規合成タンパク質の流入量を減少させることによって小胞体ストレスを緩和することが可能になると推測されることから、今回作製した細胞内翻訳量アッセイシステムを用いて小胞体膜上での翻訳を選択的に抑制する薬剤をスクリーニングすることで新たな小胞体ストレス緩和剤として有用な薬剤を得ることが出来るかもしれない。

Figure 3

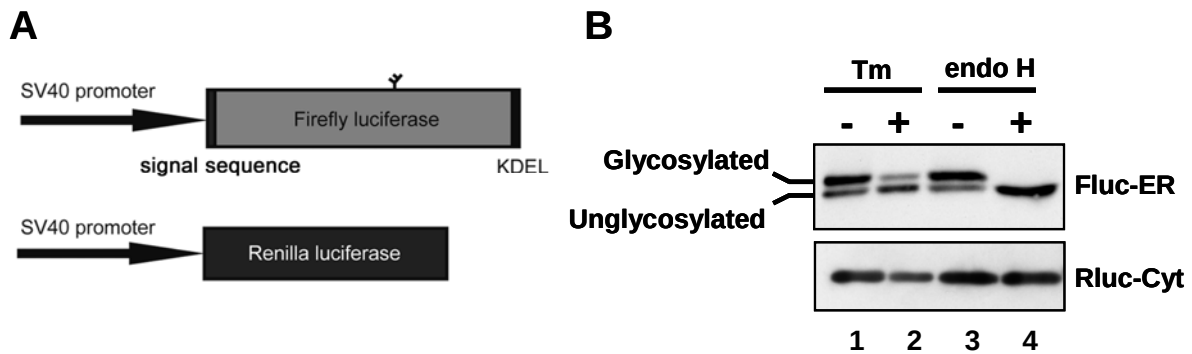


Fig. 3

A. 小胞体局在型 Firefly luciferase および細胞質局在型 Renilla luciferase の模式図

小胞体局在型 Firefly luciferase (Fluc-ER) は、Firefly luciferase の N 末端に Calreticulin 由来の signal sequence を、C 末端に小胞体残留シグナルである KDEL 配列を付加した。Firefly luciferase は、小胞体局在にした際に N 型糖鎖修飾を受けると予測される・N-X-S-配列が 1 ヶ所存在する (Firefly luciferase の 197 番目のアスパラギン残基)。細胞質局在型 Renilla luciferase (Rluc-Cyt) は特に手は加えていない。両者の luciferase は SV40 promoter によって発現する。

B. 小胞体局在型 Firefly luciferase の N 型糖鎖修飾の解析

HeLa 細胞に Fluc-ER と Rluc-Cyt の発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間後に N 型糖鎖修飾阻害剤である tunicamycin(Tm) ± 処理 (0.5 µg/ml) をし、12 時間後に細胞を回収し溶解した。さらに溶解した Tm 未処理サンプルを、N 型糖鎖の分解酵素である endoglycosidase H(endo H)± で反応させ、ウェスタンブロット解析を行った。Fluc-ER は抗 Firefly luciferase 抗体、Rluc-Cyt は抗 Renilla luciferase 抗体で検出した。

Figure 4

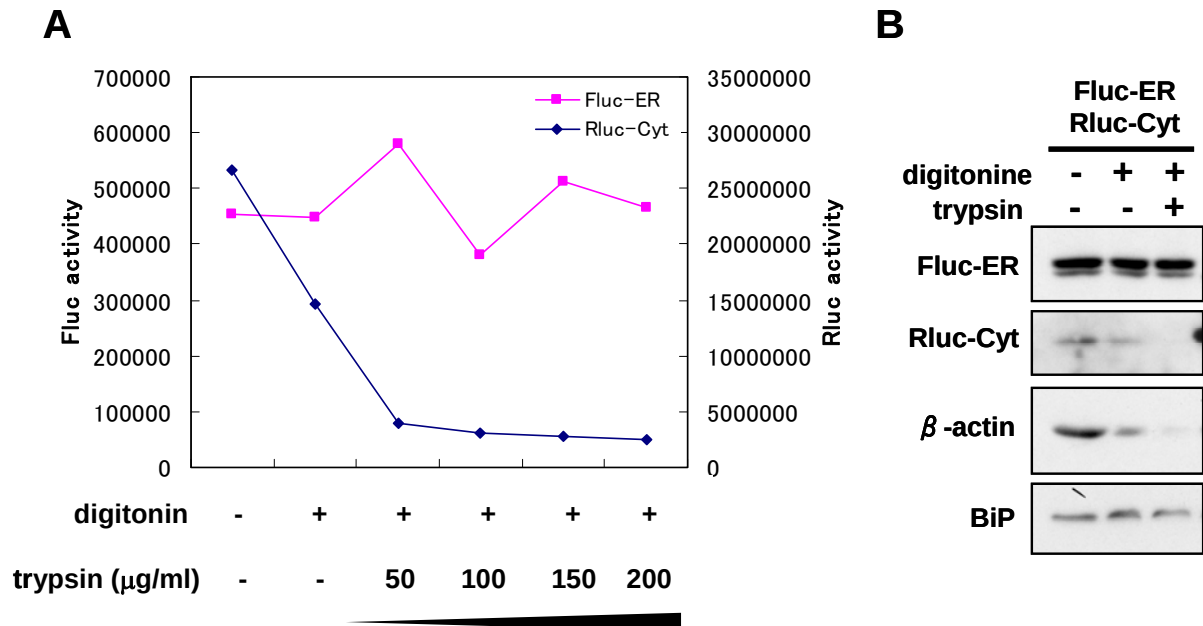


Fig. 4 Fluc-ER および Rluc-Cyt のプロテアーゼプロテクションアッセイ

- A. HeLa 細胞に Fluc-ER および Rluc-Cyt の発現プラスミドを導入し、プロテアーゼプロテクションアッセイを行った。細胞を 6 well プレートに接着させた状態で、低濃度の digitonin 処理により細胞膜を透過し wash した後に trypsin 0、50、100、150、200 µg/ml で処理し、trypsin inhibitor 処理の後に細胞を溶解した。溶解したサンプルのデュアルルシフェラーゼ解析を行い、活性値をグラフ化した。
- B. A で回収した digitonin -、trypsin -サンプル、 digitonin +、trypsin -サンプルおよび digitonin +、trypsin 200 µg/ml サンプルでウェスタンブロット解析を行った。検出は抗 Firefly luciferase 抗体、抗 Renilla luciferase 抗体、抗 β actin 抗体および抗 KDEL 抗体で行った。

Figure 5

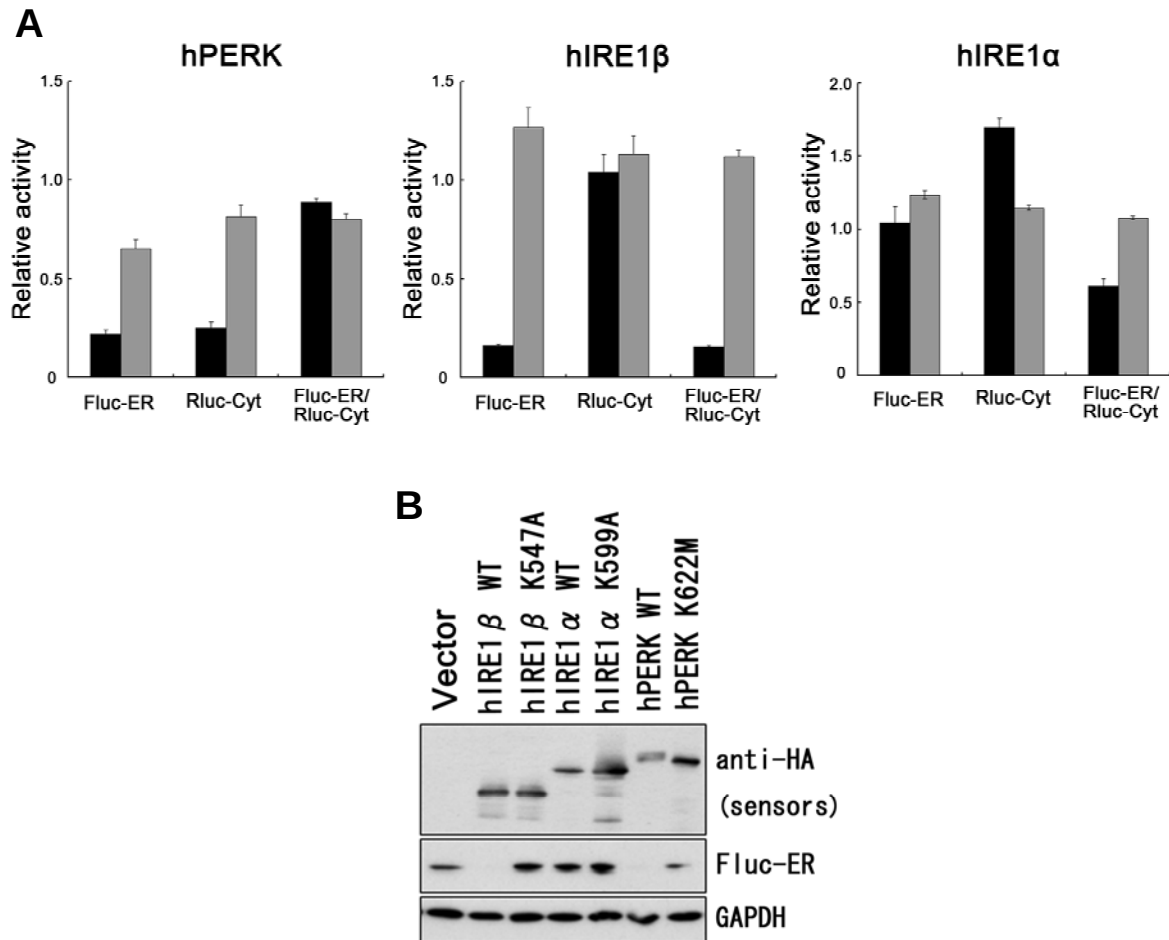


Fig. 5 各種小胞体ストレスセンサーの翻訳抑制活性

- A. 小胞体局在型 Firefly luciferase (Fluc-ER) と細胞質局在型 Renilla luciferase (Rluc-Cyt) の発現プラスミドと小胞体ストレスセンサー発現プラスミドをコトランスフェクションし、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。小胞体ストレスセンサーは過剰発現により活性化するため、それぞれのセンサーが翻訳に与える影響を検出することが出来る。グラフは、空ベクターと Fluc-ER、Rluc-Cyt の発現ベクターをコトランスフェクションした時のルシフェラーゼ活性を 1.0 として示している。黒色のバーがそれぞれのセンサーの野生型 (hPERK WT、hIRE1 β WT、hIRE1 α WT)、灰色のバーがそれぞれのセンサーのキナーゼ活性欠質変異体 (hPERK K622M、hIRE1 β K547A、hIRE1 α K599A) の過剰発現時の値を示している。エラーバーは、3 回実験を行った標準偏差を示している。
- B. A でルシフェラーゼ活性を測定した細胞抽出液のウェスタンブロット解析を行った。検出は抗 HA 抗体により発現させた HA 標識した小胞体ストレスセンサーを、抗 Firefly luciferase 抗体により Fluc-ER を、抗 GAPDH 抗体で内部標準となる GAPDH を検出した。

Figure 6

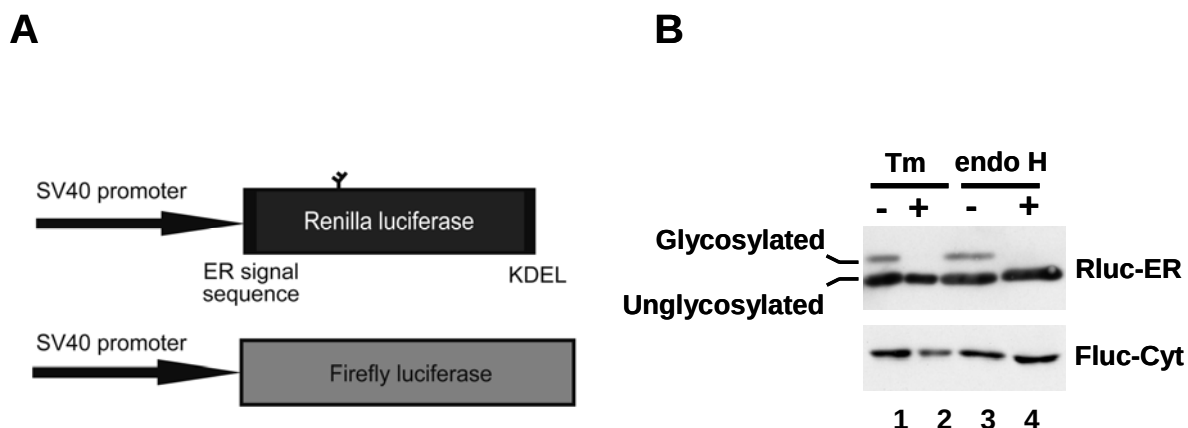


Fig. 6

A. 小胞体局在型 Renilla luciferase および細胞質局在型 Firefly luciferase の模式図

小胞体局在型 Renilla luciferase (Rluc-ER) は、Renilla luciferase の N 末端に Calreticulin 由来の signal sequence を、C 末端に小胞体残留シグナルである KDEL 配列を付加した。Renilla luciferase は、小胞体局在にした際に N 型糖鎖修飾を受けると予測される-N-X-S-配列が 1 ヶ所存在する (Renilla luciferase の 89 番目のアスパラギン残基)。細胞質局在型 Firefly luciferase (Fluc-Cyt) は特に手は加えていない。両者の luciferase は SV40 promoter によって発現する。

B. 小胞体局在型 Renilla luciferase の N 型糖鎖修飾の解析

HeLa 細胞に Rluc-ER と Fluc-Cyt の発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間後に N 型糖鎖修飾阻害剤である tunicamycin(Tm) ± 処理 (0.5 µg/ml) をし、12 時間後に細胞を回収して溶解した。さらに溶解した Tm 未処理サンプルを、N 型糖鎖の分解酵素である endoglycosidase H(endo H)± で反応させ、ウェスタンブロット解析を行った。Rluc-ER は抗 Renilla luciferase 抗体、Fluc-Cyt は抗 Firefly luciferase 抗体で検出した。

Figure 7

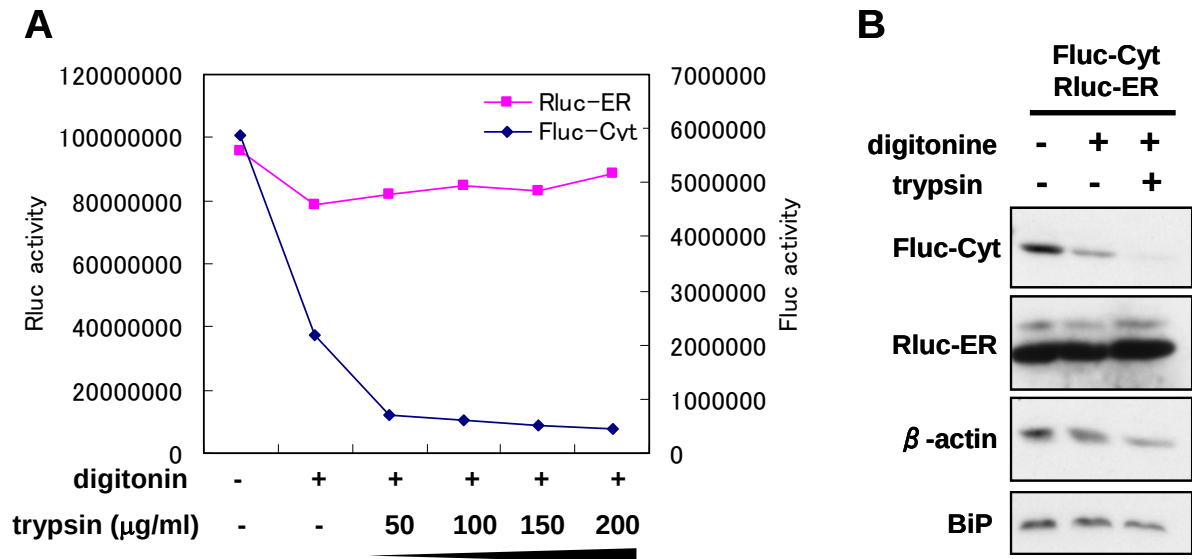


Fig. 7 Rluc-ER および Fluc-Cyt のプロテアーゼプロテクションアッセイ

- A. HeLa 細胞に Rluc-ER および Fluc-Cyt の発現プラスミドを導入し、プロテアーゼプロテクションアッセイを行った。細胞を 6 well プレートに接着させた状態で、低濃度の digitonin 処理により細胞膜を透過し wash した後に trypsin 0、50、100、150、200 µg/ml で処理し、trypsin inhibitor 処理の後に細胞を溶解した。溶解したサンプルのデュアルルシフェラーゼ解析を行い、活性値をグラフ化した。
- B. A で回収した digitonin -、trypsin -サンプル、 digitonin +、trypsin -サンプルおよび digitonin +、trypsin 200 µg/ml サンプルでウェスタンブロット解析を行った。検出は抗 Firefly luciferase 抗体、抗 Renilla luciferase 抗体、抗 β actin 抗体および抗 KDEL 抗体で行った。

Figure 8

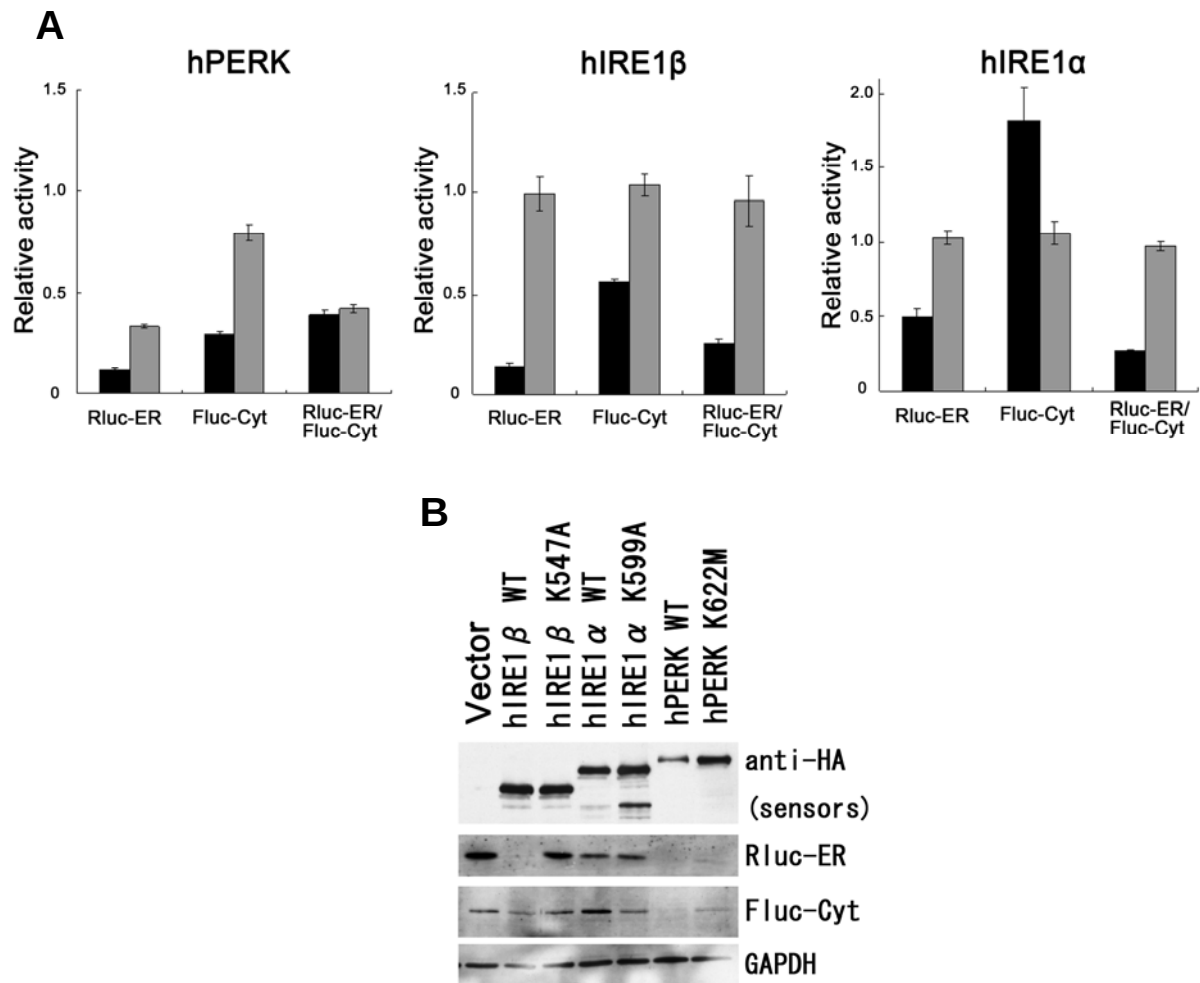


Fig. 8 各種小胞体ストレスセンサーの翻訳抑制活性

- A. 小胞体局在型 Renilla luciferase (Rluc-ER) と細胞質局在型 Firefly luciferase (Fluc-Cyt) の発現プラスミドと小胞体ストレスセンサー発現プラスミドをコトランスフェクションし、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。小胞体ストレスセンサーは過剰発現により活性化するため、それぞれのセンサーが翻訳に与える影響を検出することが出来る。グラフは、空ベクターと Rluc-ER、Fluc-Cyt の発現ベクターをコトランスフェクションした時のルシフェラーゼ活性を 1 として示している。黒色のバーがそれぞれのセンサーの野生型 (hPERK WT、hIRE1 β WT、hIRE1 α WT)、灰色のバーがそれぞれのセンサーのキナーゼ活性欠質変異体 (hPERK K622M、hIRE1 β K547A、hIRE1 α K599A) の過剰発現時の値を示している。エラーバーは、3 回実験を行った標準偏差を示している。
- B. A でルシフェラーゼ活性を測定した細胞抽出液でウェスタンブロット解析を行った。検出は抗 HA 抗体により発現させた HA 標識した小胞体ストレスセンサーを、抗 Renilla luciferase 抗体により Rluc-ER を、抗 Firefly luciferase 抗体により Fluc-Cyt を、抗 GAPDH 抗体で内部標準となる GAPDH を検出した。

Figure 9

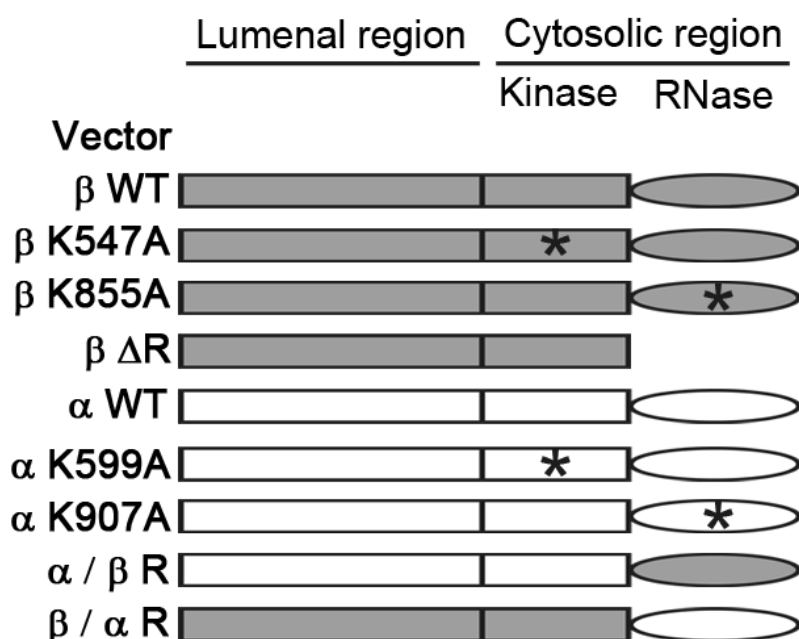


Fig. 9 本研究で使用した各 hIRE1 変異体の模式図

α WT、 β WT はそれぞれの野生型を示している。 α K599A、 β K547A はそれぞれのキナーゼ欠損変異体を示しており、この変異体は自己リン酸化による活性化が出来ないため、RNase 活性も発揮できない。 α K907A、 β K855A はそれぞれの RNase 活性欠損変異体で、キナーゼ活性は有するが RNase 活性のない変異体である。 $\beta \Delta R$ は、hIRE1 β の RNase ドメインを欠損させた変異体を示す。図は、IRE1 α 由来の領域を白抜きで、IRE1 β 由来の領域を灰色で表しており、* は、アミノ酸置換した領域を示している。 α / β R は、hIRE1 α のセンサードメインとキナーゼドメイン (hIRE1 α 1-828 a.a.)、hIRE1 β の RNase ドメイン (hIRE1 β 777-925 a.a.) からなる hIRE1 α のキメラ体を示している。 β / α R は、hIRE1 β のセンサードメインとキナーゼドメイン (hIRE1 β 1-776 a.a.)、hIRE1 α の RNase ドメイン (hIRE1 β 829-977 a.a.) からなる hIRE1 β のキメラ体を示している。それぞれのキメラ体の RNase 活性は維持されていることが明らかになっている (imagawa)。

Figure 10

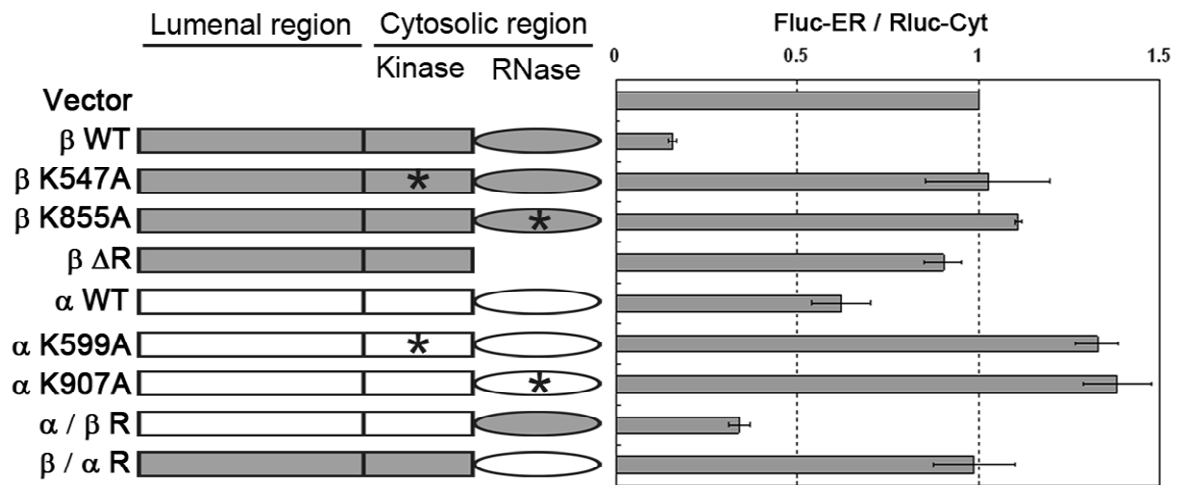


Fig. 10 各 hIRE1 変異体の翻訳抑制活性

小胞体局在型 Firefly luciferase (Fluc-ER) と細胞質局在型 Renilla luciferase (Rluc-Cyt) の発現プラスミドと各種 hIRE1 発現プラスミドをコトランスフェクションし、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。グラフの右には Fig. で示した hIRE1 変異体の模式図を示している。グラフは、空ベクターと Fluc-ER、Rluc-Cyt の発現ベクターをコトランスフェクションした時のルシフェラーゼ活性を 1.0 として示している。エラーバーは、3 回実験を行った標準偏差を示している。

Figure 11

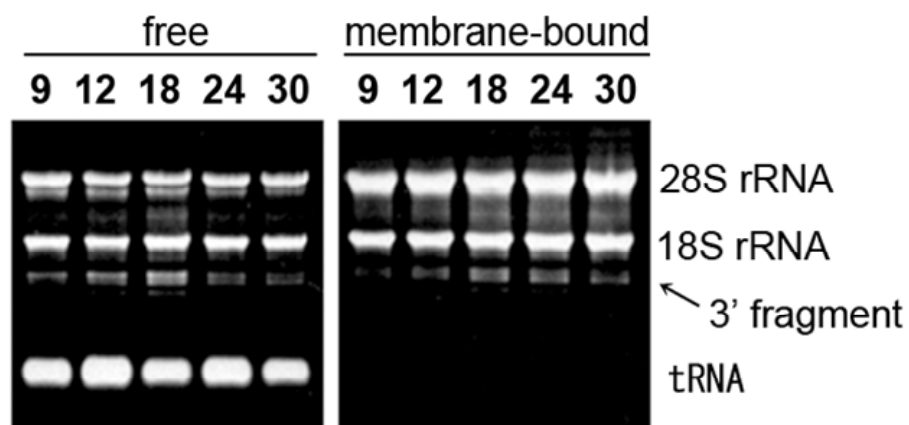


Fig. 11 IRE1 β 過剰発現による 28S rRNA の切断

HeLa 細胞に hIRE1 β WT の発現ベクターを導入後、図に示した時間に細胞を回収し、遊離リボソームと膜結合リボソームに分画し、RNA を抽出した。抽出した RNA を 1 % の変性アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドにより染色した。

Figure 12

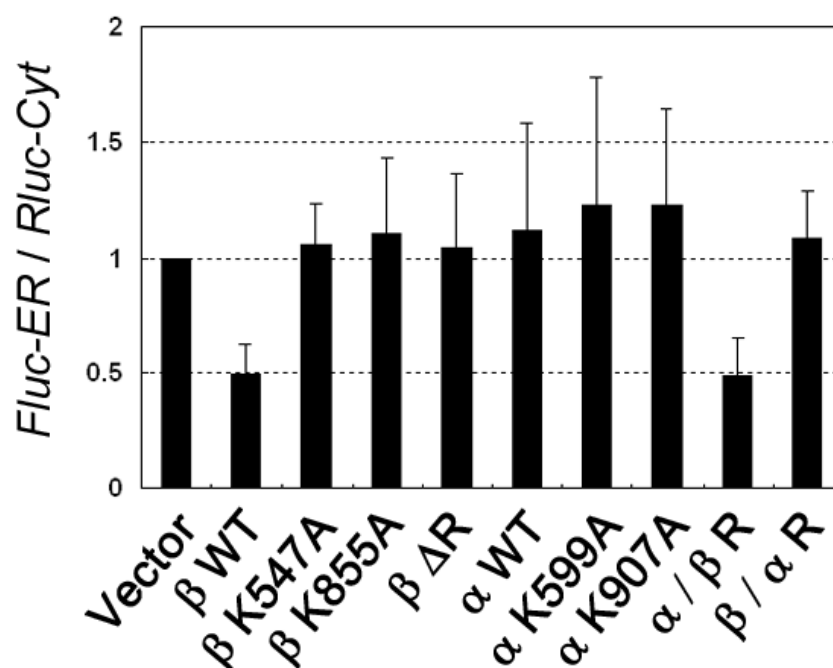


Fig. 12 各 hIRE1 変異体が *Fluc-ER* mRNA に与える影響

小胞体局在型 Firefly luciferase (Fluc-ER) と細胞質局在型 Renilla luciferase (Rluc-Cyt) の発現プラスミドと各種 hIRE1 発現プラスミドをコトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収し、Real-time PCR により Fluc-ER mRNA および Rluc-Cyt mRNA 量を測定した。グラフは、空ベクターと Fluc-ER、Rluc-Cyt の発現ベクターをコトランスフェクションした時の Fluc-ER / Rluc-Cyt を 1.0 として示している。エラーバーは、4 回実験を行った標準偏差を示している。

Figure 13

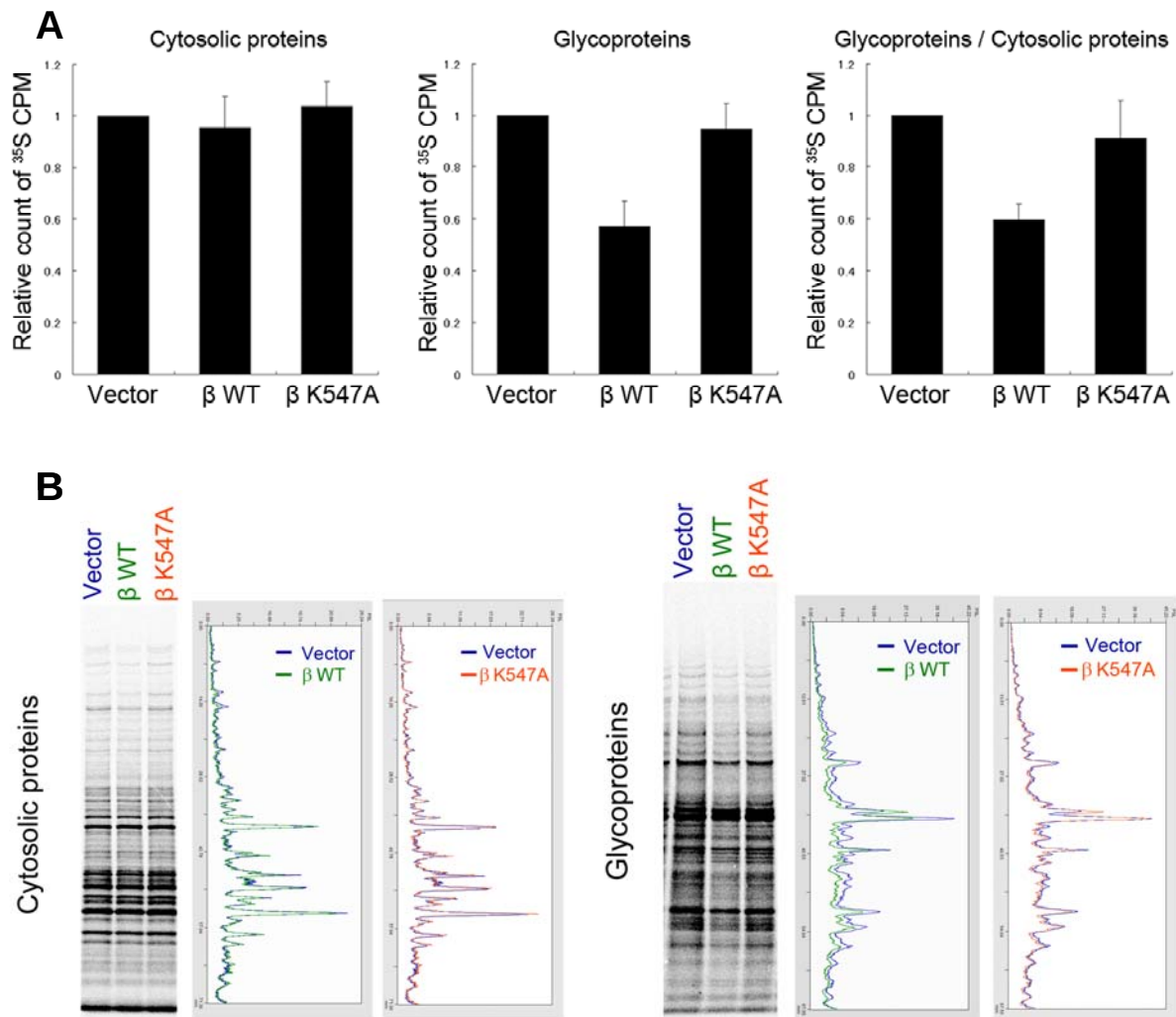


Fig. 13 hIRE1 β が内在性タンパク質の合成に与える影響

HeLa 細胞に hIRE1 β 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に ^{35}S メチオニンシステインでメタボリックラベルした。30 分のラベリングの後に細胞分画し、細胞質タンパク質画分 (Cytosolic proteins) と糖タンパク質画分 (Glycoproteins) を回収した。

- A. それぞれの画分を TCA 沈殿し、沈殿画分の ^{35}S 放射能を測定した。コントロールベクターを導入した細胞における測定値を 1 とし、それぞれの画分および糖タンパク質画分の測定値を細胞質タンパク質画分の測定値で割った値 (Glycoproteins / cytosolic proteins) を示している。エラーバーは 4 回の実験の標準偏差を示す。
- B. それぞれの画分を SDS-PAGE で分離し、オートラジオグラフィーにより検出した。グラフは、泳動像のシグナル強度を Multi Gauge (Fuji film) により測定したものである。青色がコントロールベクター、緑色が hIRE1 β WT、オレンジ色が hIRE1 β KM を表している。

Figure 14

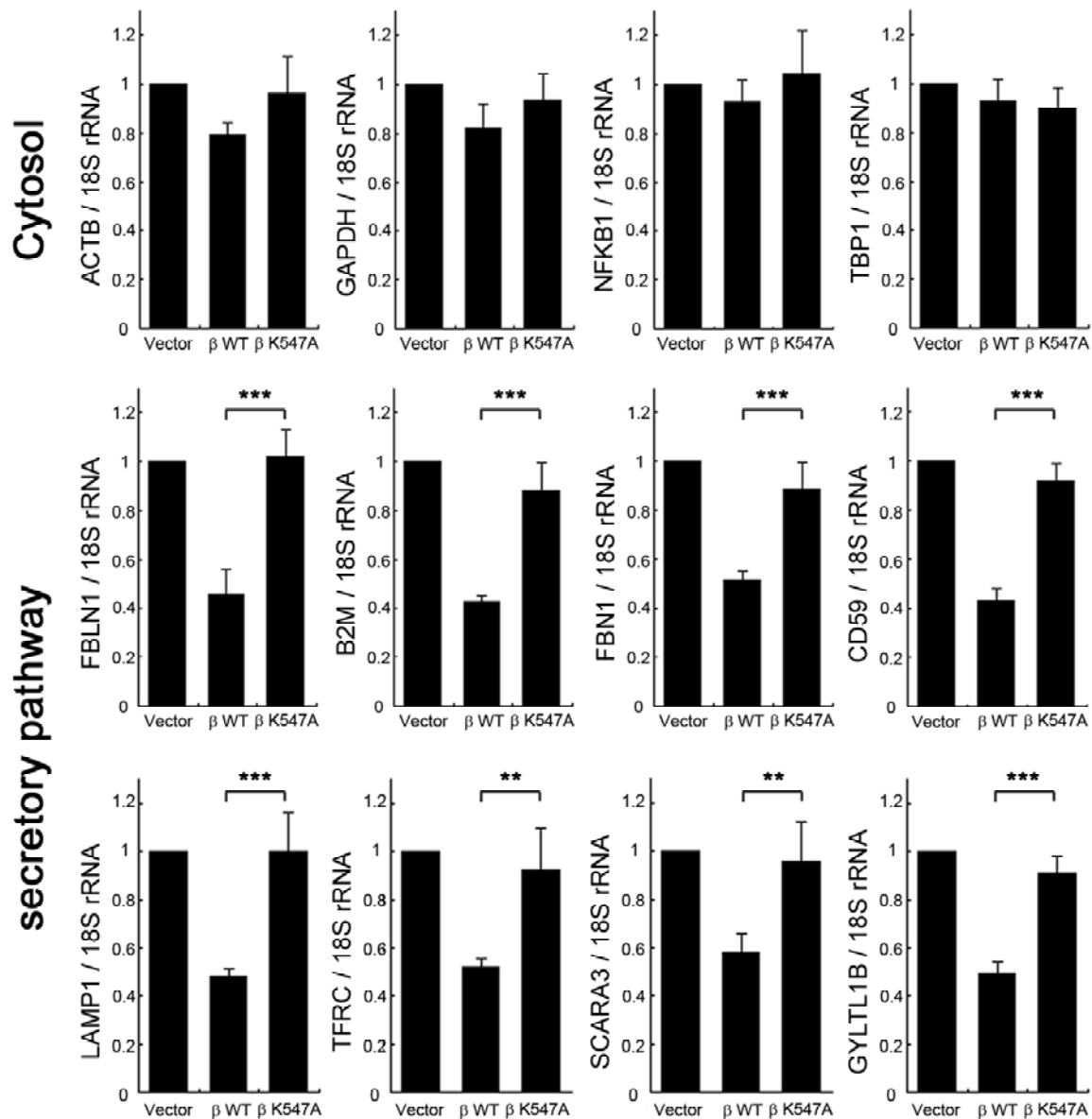


Fig. 14 hIRE1 β が内在性 mRNA に与える影響

HeLa 細胞に hIRE1 β 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収した。Real-time PCR により各種内在性 mRNA 量を測定した。上段の 4 種は、遊離型リボソームで翻訳されると考えられる細胞質局在 (ACTB、GAPDH) および核局在 (NFKB1、TBP1) のタンパク質をコードした mRNA を示す。中段および下段の 8 種は、膜結合型リボソームにより翻訳されると考えられる分泌タンパク質 (FBLN1、B2M、FBN1) および膜タンパク質 (CD59、LAMP1、TFRC、SCARA3、GYLTL1B) をコードした mRNA を示す。グラフは、空ベクターと Fluc-ER、Rluc-Cyt の発現ベクターをコトランスフェクションした時の値を 1.0 として表している。エラーバーは、4 回実験を行った標準偏差を示している。*は β K547A との有意差を示している。(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$) (student's t test)

Figure 15

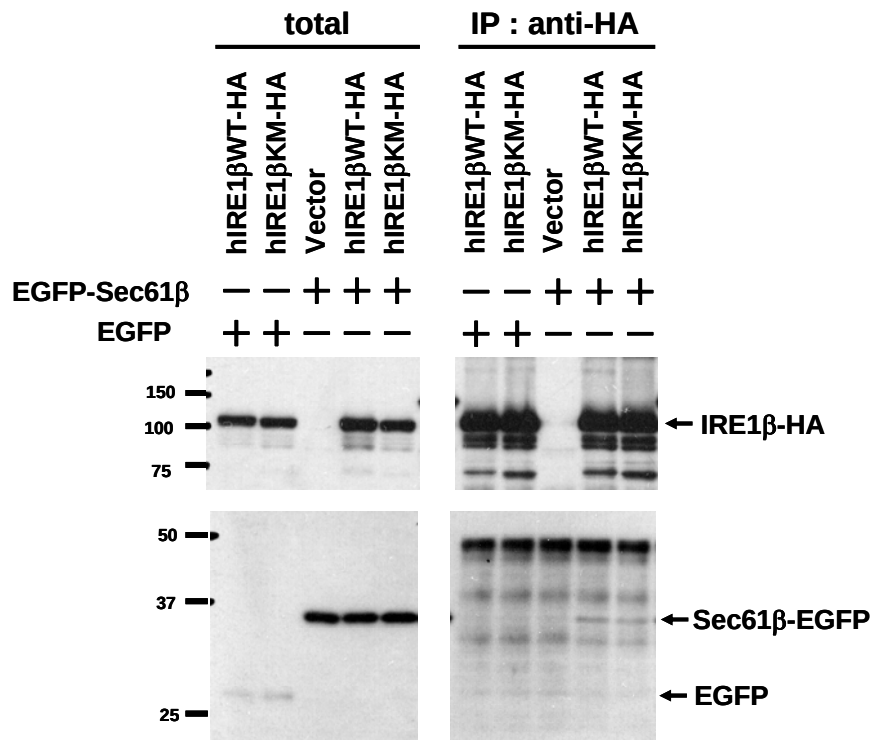


Fig. 15 hIRE1 β -HA と Sec61 β -EGFP の共免疫沈降

HeLa 細胞に HA タグ付の IRE1 の発現ベクターと EGFP 融合 Sec61 β をトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収して抗 HA 抗体により免疫沈降を行い、IRE1 β と Sec61 β の相互作用を調べた。左が total cell lysate (total)、右が免疫沈降産物上(IP)である。上段に、抗 HA 抗体で、下段に抗 GFP 抗体でウェスタンブロット解析した結果。hIRE1 β WT-HA および hIRE1 β KM-HA と共にトランスロコンの構成因子である Sec61 β -EGFP が共沈降した。

Figure 16

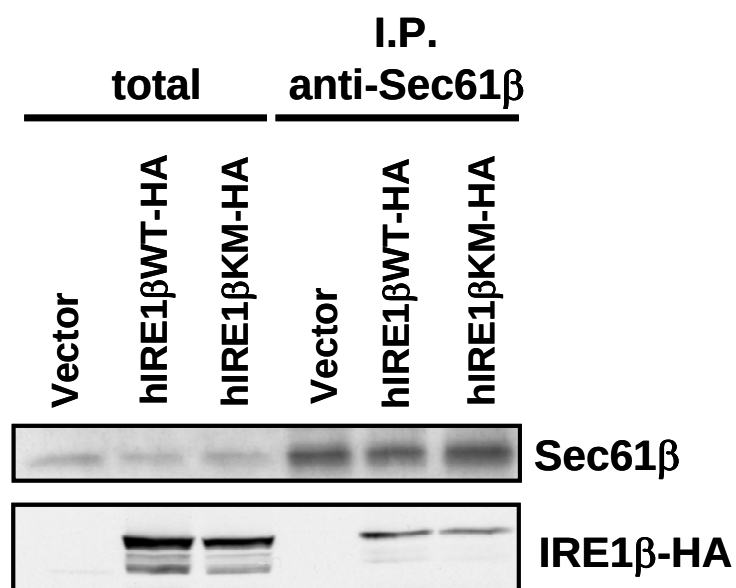


Fig. 16 内在性 Sec61 β と hIRE1 β -HA の共免疫沈降

HeLa 細胞に HA タグ付 IRE1 の発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収して抗 Sec61 β 抗体により免疫沈降を行い、内在性 Sec61 β と IRE1-HA の相互作用を調べた。左が total cell lysate (total)、右が免疫沈降産物上(I.P.)である。上段に、抗 Sec61 β 抗体で、下段に抗 HA 抗体でウェスタンブロット解析した結果を示す。内在性 Sec61 β と共に hIRE1 β WT-HA および hIRE1 β KM-HA が共沈降した。

Figure 17

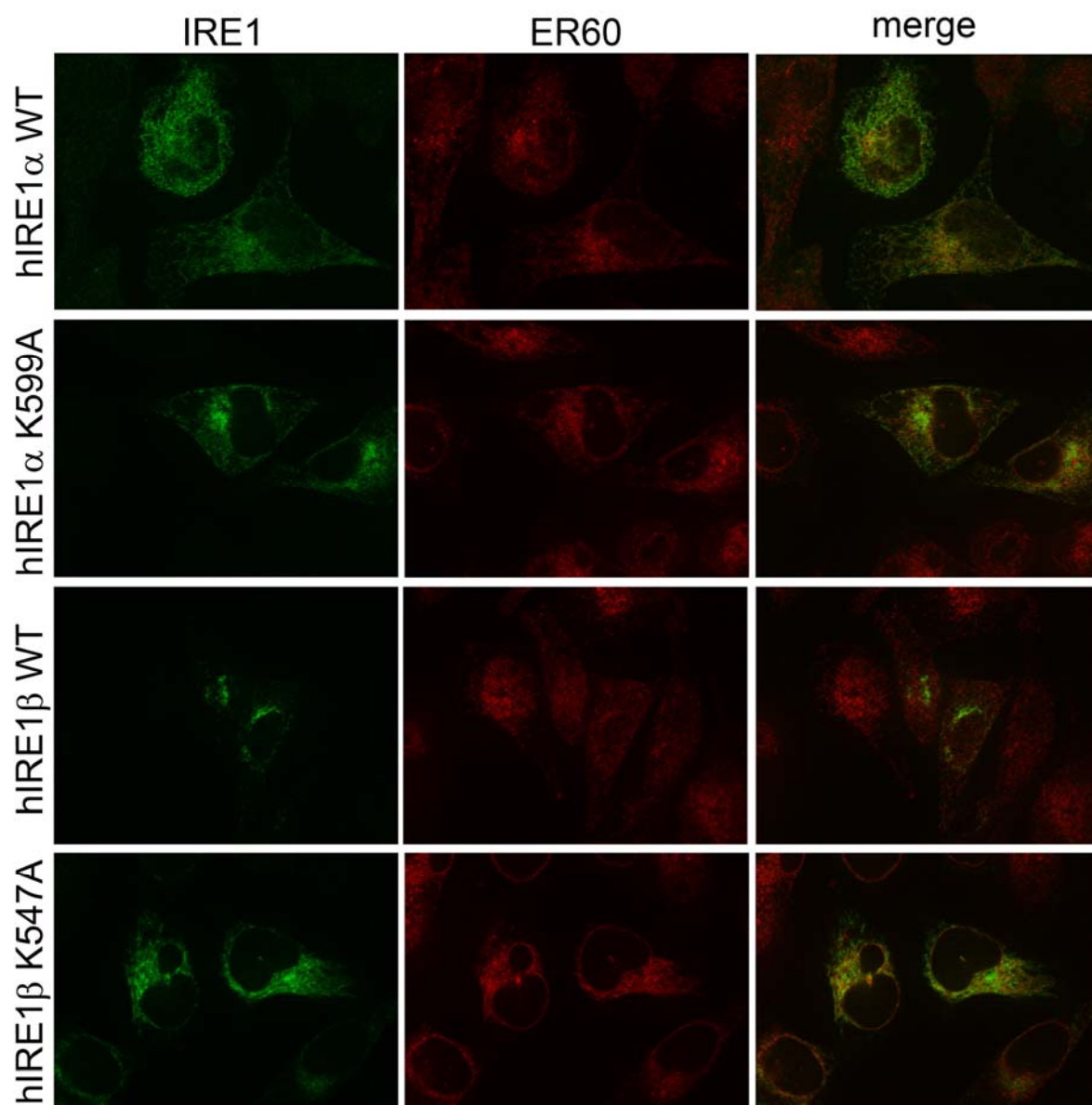


Fig. 17 HA タグ付加した各種 IRE1 の細胞内局在

HeLa 細胞に HA タグ付加した各種 IRE1 を過剰発現させ、免疫染色によりその局在を観察した。hIRE1 α WT は野生型 hIRE1 α 、hIRE1 α K599A は hIRE1 α のキナーゼ欠損変異体を示す。hIRE1 β WT は野生型 hIRE1 β 、hIRE1 β K599A は hIRE1 β のキナーゼ欠損変異体を示す。それぞれの IRE1 を抗 HA 抗体で、小胞体マーカーである ER60 を抗 ER60 抗体で染色した。緑色が各 IRE1、赤色が小胞体マーカーである ER60 を示す。

Figure 18

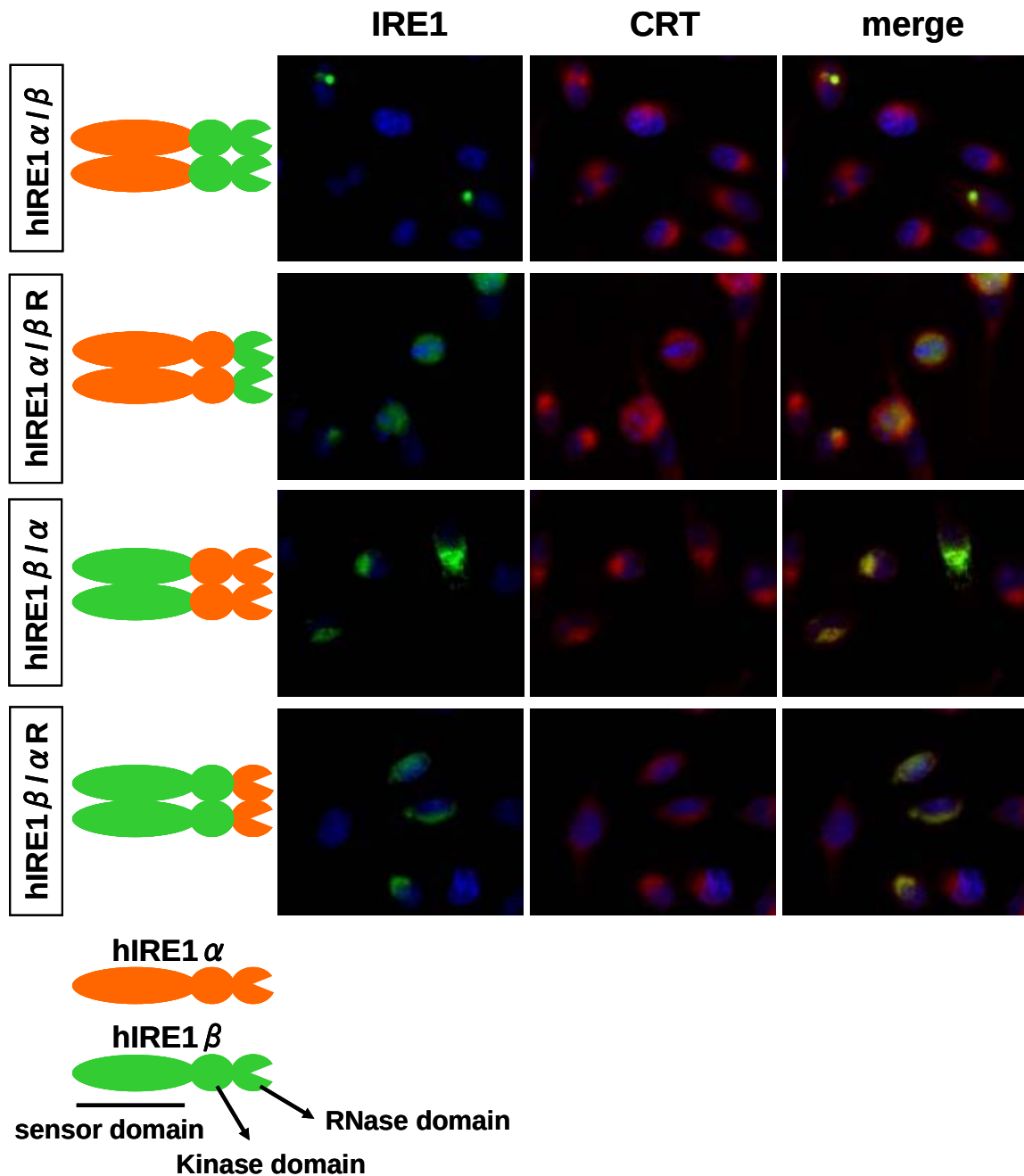


Fig. 18 hIRE1 β の局在化に必要な領域

HeLa 細胞に各種 hIRE1 変異体発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に細胞を固定し、免疫染色によりその局在を観察した。hIRE1 α/β は小胞体内腔領域が hIRE1 α 、細胞質領域が hIRE1 β からなるキメラ体で、hIRE1 α/β R は小胞体内腔領域および Kinase 領域が hIRE1 α 、RNase 領域が hIRE1 β からなるキメラ体を表す。それぞれの IRE1 を抗 IRE1 β 抗体および抗 IRE1 α 抗体で、小胞体マーカーである Calreticulin(CRT)を抗 Calreticulin 抗体で染色した。緑色が各 IRE1、赤色が小胞体マーカーである Calreticulin を示す。

Figure 19

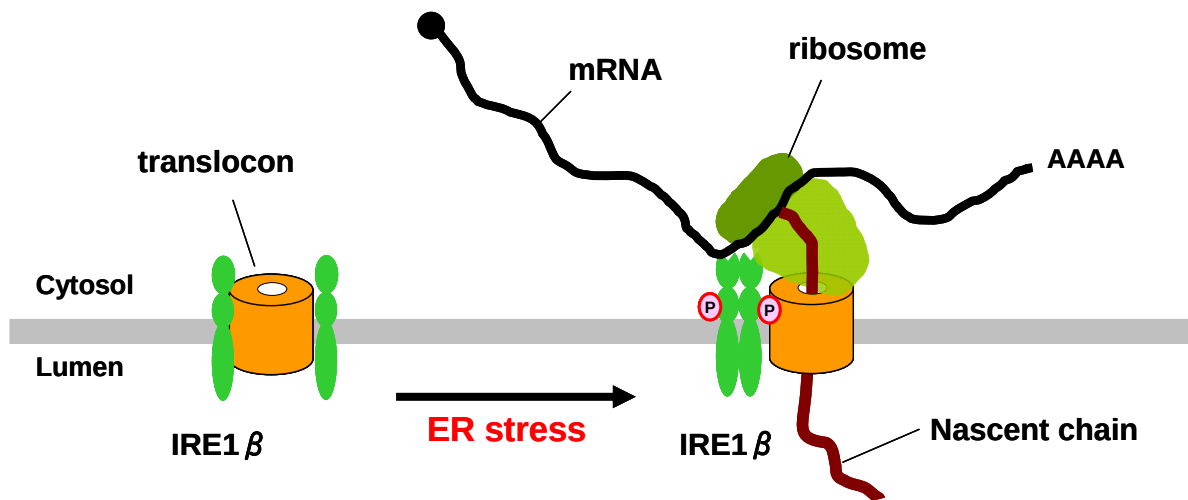


Fig. 19 IRE1 β の翻訳抑制モデル

IRE1 β は、定常状態から小胞体膜のトランスロコン複合体に含まれており、小胞体ストレスを感知し活性化すると、トランスロコンに結合したリボソームによって翻訳されている mRNA を自身の RNase 活性により分解することで小胞体に流入する新規合成タンパク質の翻訳を減少させる。

Figure 20

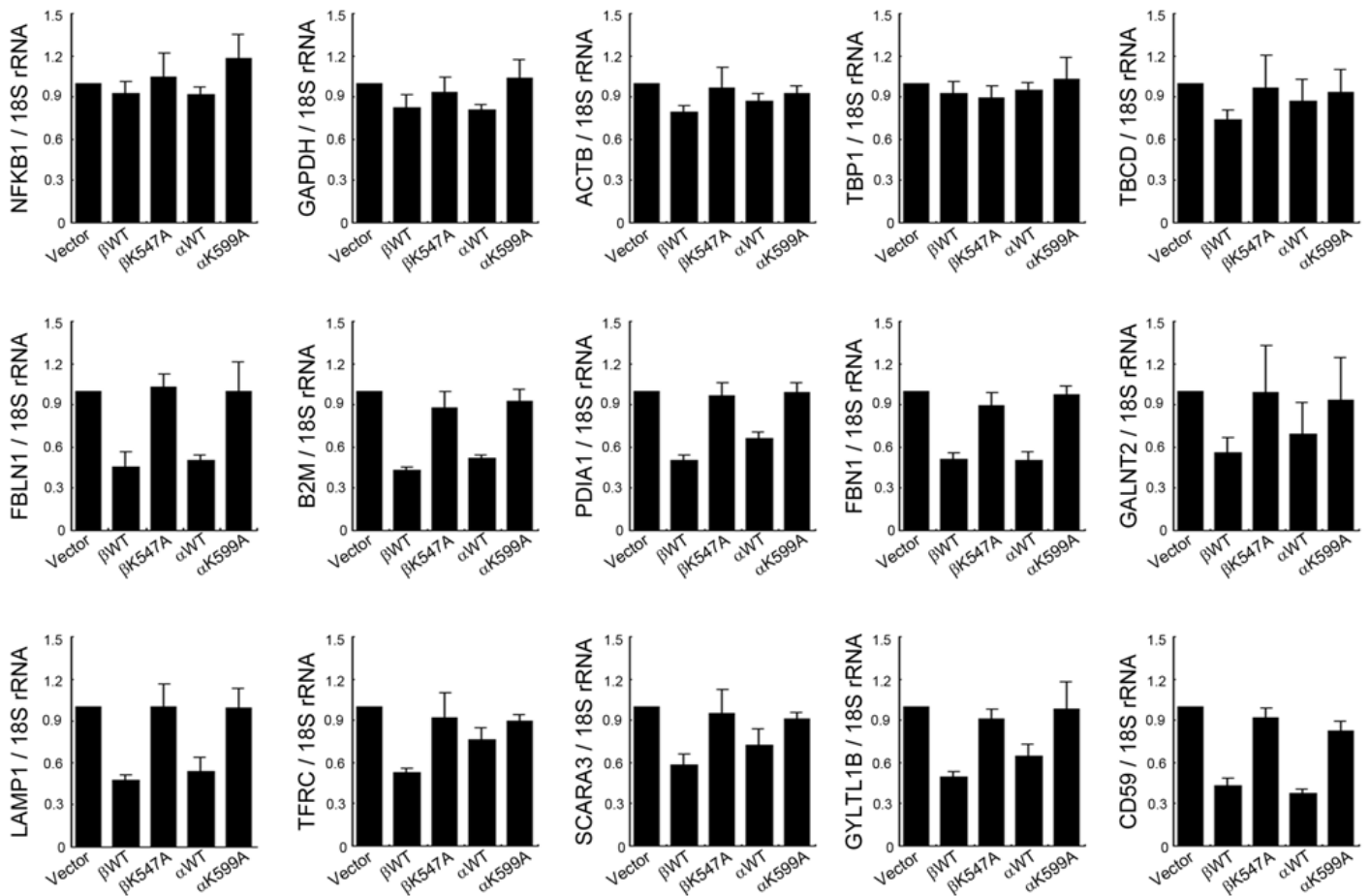


Fig. 20 hIRE1 α が内在性 mRNA に与える影響

HeLa 細胞に hIRE1 β 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収した。Real-time PCR により各種内在性 mRNA 量を測定した。上段の 5 種は、遊離型リボソームで翻訳されると考えられる細胞質局在 (ACTB、GAPDH、TBCD) および核局在 (NFKB1、TBP1) のタンパク質をコードした mRNA を示す。中段および下段の 10 種は、膜結合型リボソームにより翻訳されると考えられる分泌タンパク質 (FBLN1、B2M、PDIA1、FBN1) および膜タンパク質 (GALNT2、LAMP1、TFRC、SCARA3、GYLTL1B、CD59) をコードした mRNA を示す。グラフは、空ベクターと Fluc-ER、Rluc-Cyt の発現ベクターをコトランスフェクションした時の値を 1.0 として表している。エラーバーは、4 回実験を行った標準偏差を示している。

*Fig. 14 と一部重複したデータ

Figure 21

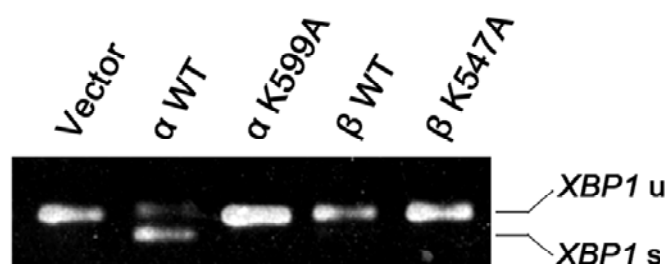


Fig. 21 IRE1 α および IRE1 β の XBP1 スプライシング活性

HeLa 細胞に HA タグ付の IRE1 の発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収して RT-PCR により XBP1 のスプライシングを調べた。上が *XBP1u* mRNA 由来のシグナルで、下が IRE1 α の活性化によってスプライシングされた *XBP1s* mRNA 由来のシグナルである。IRE1 α WT の過剰発現では、*XBP1u* mRNA がスプライシングされ *XBP1s* mRNA の割合が増加している。一方、IRE1 β の過剰発現では *XBP1s* mRNA の増加はほとんど見られず、total の *XBP1* mRNA が減少する傾向にある。

第二部

ヒト大腸癌由来 LS174T 細胞株における IRE1 β の機能

6. 序論

IRE1 は酵母からヒトに至るまで真核生物に広く保存されている小胞体ストレスセンサー分子で、哺乳動物細胞には IRE1 α と IRE1 β の 2 つのパラログが存在している (Tirasophon et al., 1998; Wang et al., 1998)。IRE1 α が生体内の組織全般に発現しているのに対し (Tirasophon et al., 1998)、IRE1 β は消化管の上皮細胞特異的に発現している (Bertolotti et al., 2001) ことが報告されている。また、IRE1 β のノックアウトマウスは、大腸炎を誘発する薬剤による刺激に感受性が高いことが報告されているが、通常飼育においては異常なく生育する (Bertolotti et al., 2001)。近年、我々の研究グループにおいて内在性 IRE1 β を検出可能な抗体の作製に成功し、IRE1 β の発現細胞が粘液産生細胞である杯細胞に特異的であることが明らかとなった。さらに、IRE1 β ノックアウトマウスにおいて杯細胞に異常がないか電子顕微鏡観察を行ったところ、異常に肥大化した小胞体が観察され、IRE1 β が杯細胞の小胞体の恒常性維持に重要な遺伝子であることが明らかとなった。このような小胞体の異常な肥大化は、PERK のノックアウトマウス (Harding et al., 2001) や、常時翻訳活性型 eIF2 α のノックインマウス (Scheuner et al., 2005) などのように、小胞体への新規合成タンパク質の流入を抑えることが出来なくなっている細胞や、ATF6 型小胞体ストレスセンサーである BBF2H7 ノックアウトマウスのように小胞輸送に異常を来して小胞体の恒常性に異常が生じている細胞において観察されている (Saito et al., 2009)。近年、組織特異的に発現している ATF6 型小胞体ストレスセンサーが次々に報告されており、組織や細胞種特異的な小胞体ストレスに対応するために必要なセンサーであると考えられている (Chin et al., 2005; Kondo et al., 2005; Labrie et al., 2008; Saito et al., 2009)。IRE1 β も杯細胞に特異的な小胞体ストレスに対応するために機能しているものと考えられる。

最近、消化管における小胞体ストレス応答の重要性が注目されてきており、厚生労働省により特定疾患に指定されているクローン病および潰瘍性大腸炎といった消化管の炎症性疾患の患者の大腸組織で小胞体ストレスが亢進していることや、IRE1 α の下流の転写因子である XBP1 が炎症性腸疾患の遺伝的なリスクになることが報告された (Kaser et al., 2008)。また、XBP1 を消化管の上皮細胞特異的にノックアウトすると、パネート細胞と呼ばれる抗菌物質である α -デフェンシンやリゾチームを腸管腔に分泌する細胞がアポトーシスによりほとんどなくなってしまうことによって小腸炎を誘発することも示されている (Kaser et al., 2008)。しかし、XBP1 の消化管上皮細胞特異的なノックアウトマウスでは、IRE1 β の発現細胞である杯細胞にはほとんど影響を与えないことから、杯細胞では XBP1 経路によらない小胞体ストレス応答が重要な役割を担っていると考えられる。

IRE1 β の発現している杯細胞は、粘液の合成、分泌に特化した細胞である。粘液の主要構成因子であるムチンタンパク質は分泌型ムチンと、膜結合型ムチンがあり、IRE1 β の発現の高い小腸や大腸の杯細胞では分泌型の MUC2 が主な構成因子となっ

ている。ヒトの *MUC2* mRNA は 15 Kb 以上と非常に大きく、ジスルフィド結合を形成するシステインを非常に多く持っており、N 型糖鎖修飾や O 型糖鎖修飾などの糖鎖修飾部位も非常に多く含んでいる(Allen et al., 1998)。このように高度に修飾を受ける巨大分子が盛んに作られる杯細胞では、他の細胞における小胞体の品質管理機構だけでは十分でなく、それに加えて IRE1 β による品質管理機構が必要となったのではないかと考えられる。

第一部では、内在性 IRE1 β の発現の認められない HeLa 細胞で IRE1 β の過剰発現実験を行い、IRE1 β が自身の RNase 活性によって分泌タンパク質の mRNA を減少させ、小胞体へ流入する新規合成タンパク質の量を減らしていることを示した。また、過剰発現した IRE1 β がアポトーシスを誘導することも明らかになっている(Iwawaki et al., 2001)。しかし、HeLa 細胞で明らかとなった分泌タンパク質特異的な合成抑制やアポトーシス誘導が、IRE1 β の発現細胞である杯細胞でも機能しているかどうかは不明であった。そこで第二部では、内在性 IRE1 β の発現の認められるヒト大腸がん由来細胞株である LS174T 細胞を用いて、IRE1 β の機能解析を行った。その結果、LS174T 細胞において IRE1 β は、*MUC2* mRNA を減少させることで *MUC2* の合成量を負に制御していること、IRE1 β が小胞体ストレス状態を軽減させることに貢献していること、アポトーシスを誘導するよりも小胞体ストレスによる細胞死から細胞を守っていることが明らかとなった。

7. 材料と方法

7.1 プラスミドの構築

低発現プラスミドを構築するために pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) の CMV promoter を phRL-TK (Promega) の herpes simplex virus thymidine kinase promoter に置き換え、pTK3.1 (+) neo と名付けた。C 末端に 3 回リピートの HA タグを付加した野生型およびキナーゼ欠損変異体の IRE1 β cDNA を pTK3.1 (+) neo の Apa I サイトと BamHI サイトの間に挿入した。

小胞体ストレスのレポータープラスミドである pGL3-hBiP (-132) は森和俊博士 (京都大学) から頂き、p5 $\times$ ATF6-GL3 (Wang et al., 2000) は addgene から購入した。

7.2. 細胞培養とトランスフェクション

LS174T 細胞は ATCC から購入し、10% ウシ胎児血清、0.1 mM Non-Essential Amino Acids (GIBCO)、を含む minimum essential medium eagle (Sigma#M4655) 中で 37°C、5% CO₂ 下で培養した。LS174T 細胞へのトランスフェクションには Lipofectamine 2000 を用いた。薬剤処理は、1 mM もしくは 3 mM の sodium butyrate、2 μ g/ml の Tunicamycin、0.05 μ g/ml の thapsigargin で Figure に示した時間処理した。

7.3. IRE1 β 安定発現株のクローニング

LS174T 細胞における IRE1 β の安定発現株のクローニングは以前に報告されている方法を参考にした (Yin et al., 2006)。35 mm dish の細胞に、pTK3.1(+)-neo-hIRE1 β WT-HA もしくは pTK3.1(+)-neo-hIRE1 β K547A-HA を Lipofectamine 2000 を用いて遺伝子導入した。トランスフェクション後 2 日培養した後に、24 well プレートに播種し直し、750 μ g/ml の G418 で遺伝子導入細胞をセクションした。コロニーを形成したクローンを随時拾い、導入遺伝子の発現確認を行った。セクションの間、3 日に一回培地交換を行った。

7.4. ウェスタンブロット解析

細胞は、10 μ g/ml leupeptin、10 μ g/ml pepstatin A、1 mM benzamidine を含む 1% Nonidet (N)P-40 / PBS もしくは 1 % TritonX-100 / PBS で溶解した。そのライセートは、SDS Sample Buffer (終濃度 50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2 % SDS、50 mM DTT、10 % glycerol and 0.01 % bromophenol blue) 中で 98°C、5 分間熱変性処理をした。上述のサンプルは、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によって分離し、そのタンパク質を、エレクトロブロッティング装置を用いてニトロセルロース膜 (PROTRAN, Whatman) もしくは PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore) 上に転写した。本研究では以下の抗体を用いた ; 抗 GAPDH 抗体 ab9484 (Abcam)、抗 actin 抗体 (Affinity BioReagent)、マウスモノクローナル抗 HA 抗体 (12CA5)

(Roche)。抗 hIRE1 β 抗体（河野研, masuda）

7.5. 糖タンパク質のタンパク合成量の測定

糖タンパク質画分の分画は以前に報告されている方法で行った。6-well プレートに 80-90% コンフルエントの細胞をメチオニン、システイン不含培地で 30 分前培養し、1.85 M Bq/ml の ^{35}S メチオニン / システインを加えた。30 分のラベルの後、氷冷した PBS-で 2 回洗浄し、IP buffer (1% Triton X-100, 50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A and 1 mM benzamidine)で溶解した。細胞溶解液の一部を total cell lysate として保存し、残りの細胞溶解液に concanavalin-A (ConA) ビーズを加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間攪拌した後、ConA ビーズを IP buffer で 3 回洗浄した。洗浄した ConA ビーズを、競合糖を含む Buffer (0.2M α -d-methyl-mannopyranoside in IP buffer) で 1 時間室温にて攪拌し、ConA ビーズに結合した糖タンパク質を溶出し、糖タンパク質画分を得た。それぞれの画分を TCA 沈殿し、 ^{35}S の放射活性を測定した。また、それぞれの画分の抽出液を SDS-PAGE にて分離し、オートラジオグラフィーで検出した。

7.6. Real-time PCR 解析

Total RNA は RNAiso plus (TaKaRa) を用いて抽出し、イソプロパノール沈殿法で RNA を精製し、80%エタノールで洗い、DEPC 処理水に溶解した。Total RNA 1.0 μg に 2.5 mM dNTPmix (TaKaRa #R019A) 2 μl と 50 ng/ μl Random Hexmer (invitrogen #51709) 1 μl 、総量が 6 μl となるように DEPC 水を加え、65 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間反応させた。この溶液に逆転写反応液 (DEPC 水 0.375 μl , 5 $\times$ RT buffer 2 μl , 0.1M DTT 1 μl , RNaseOUT 0.5 μl , 200 U/ μl SuperScriptII (invitrogen #18064-014) 0.125 μl を加えて逆転写反応 (25 $^{\circ}\text{C}$, 10 分間、42 $^{\circ}\text{C}$, 50 分間、70 $^{\circ}\text{C}$, 15 分間) を行った。その後、反応液に Ribonuclease H (RNaseH) (invitrogen #18021-014) 0.5 μl を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間反応させたものを cDNA サンプルとした。得られた cDNA サンプルをテンプレートとし、10 μM 5'プライマー 0.5 μl 、10 μM 3'プライマー 0.5 μl 、dH₂O 3.5 μl 、SYBR premix Taq TM (TaKaRa #RR0419) 5 μl を Multiwell Plate384 にアプライし、LightCycler@480 (Roche) を用いて Real Time-PCR を行った。使用したプライマーは Table 3 に示す。

Table 3 Real-time PCR に用いたプライマー

Gene	Accession No.	Primer sequence	Amplicon size (bp)
MUC2	NM_002457.2	5'-GCTGCTATGTCGAGGACACC-3'	90
		5'-GGGAGGAGTTGGTACACACG-3'	
GAPDH	NM_002046.3	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	66

		5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	
18S rRNA	NR_003286.1	5'-CGATTGGATGGTTTAGTGAGG-3'	87
		5'-AGTTCGACCGTCTTCTCAGC-3'	

7.7. ノザンプロッティングによる *in vivo* 28S rRNA 切断解析

Total RNA は、RNAiso plus (TAKARA)を用いて抽出した。Total RNA (1 µg)を 1.5%ホルムアルデヒド変性ゲルで泳動し、Hybond-N membrane (GE Healthcare #RPN203N)に転写した。ハイブリダイゼーションは、DIG Easy Hyb (Roche) を用い、42℃で行った。28S rRNA は、28S rRNA の 3'末端特異的なプローブ(5'-ACA AAC CCT TGT GTC GAG GGC TGA-3')を DIG Oligonucleotide 5'-End Labeling Set (Roche) で 5'末端を DIG 標識したものをを用いて検出した。ハイブリダイゼーション後のメンブレンは、室温の 2x SSC 溶液で 15 分 2 回、45℃の 2x SSC / 0.1% SDS 溶液で 15 分 1 回、50℃の 2x SSC / 0.1% SDS 溶液で 15 分 2 回、室温の 0.1x SSC / 0.1% SDS 溶液で 10 分 2 回洗浄した。検出は、アルカリホスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche) を用いて DIG 標識プローブをプロットし、CSPD (Roche) にて発色し X 線フィルムに露光させて検出した。

7.8. デュアルルシフェラーゼ解析

1x10⁵ の LS174T 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、18 時間後レポータープラスミド pBL3-hBiP(-132)もしくは p5×ATF6-GL3 を 760 ng と standard plasmid (pRL-SV40) (Promega #E2231) 40 ng を Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後、Tunicamycin 処理し Figure に示した時間培養して細胞を回収し Dual-luciferase assay system (Promega # E1980)を用いてそれぞれの活性を、ルミノメーター(AB-2200-R, ATTO)で検出した。

7.9. リプレーティングアッセイと酪酸ナトリウム感受性アッセイ

リプレーティングアッセイでは、各細胞株を 2 µg/ml の Tunicamycin で Figure に示した時間処理し、6 cm dish に播種し直した。その後、Tunicamycin を含まない通常培地で 5 日間培養し、生細胞をクリスタルバイオレットで染色した。酪酸ナトリウム感受性アッセイでは、各細胞株を 12 well プレート上で 1 mM もしくは 3 mM の酪酸ナトリウム (Sodium Butyrate) を含む培地で 5 日間培養 (3 日目培地交換した) し、生細胞をクリスタルバイオレットで染色した。染色は、0.5 ml/dish もしくは 0.1 ml/well の 4 % (w/v) crystal violet (Nacalai Tesque) /メタノールで室温にて 30 分染色した。その後、流水で洗浄し、風乾した。風乾した染色 dish を写真に撮り、Multi gauge (FUJIFILM)により染色強度を定量した。

8. 結果

8.1. LS174T 細胞における IRE1 β の翻訳抑制

我々の研究グループの解析により、IRE1 β が粘液分泌細胞である杯細胞特異的に発現していることが明らかとなったため、杯細胞様の特徴を示すヒト大腸癌由来の細胞株 LS174T 細胞を用いて、IRE1 β の生理的機能の解明を目指した。LS174T 細胞は、わずかながら内在性 IRE1 β が発現していることが確認できた (Fig. 22 lane 1)。しかし、LS174T 細胞は遺伝子導入効率の非常に悪い細胞で、siRNA によるノックダウン実験が困難であることが明らかになった。そこで、低発現プラスミド（ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーター）を用いて IRE1 β WT-HA および IRE1 β KM-HA の安定発現株を取得し、それぞれの細胞株を解析することにした。それぞれ発現量の異なる二種の株を取得し、以降の実験に使用した (Fig. 22)。はじめに、第一部で明らかになった IRE1 β による小胞体経路タンパク質選択的な翻訳抑制が、今回得られた IRE1 β 安定発現株でも観察されるかを調べた。各細胞株で糖タンパク質の合成量がどうなっているかを調べたところ、親株である LS174T 細胞と比べ、IRE1 β WT の安定発現株では糖タンパク質の合成量が減少し、IRE1 β KM の安定発現株では合成量が増加する傾向にあった (Fig. 23A)。HeLa 細胞において IRE1 β を過剰発現した際 (Fig. 13) と比べて効果が少ないのは、HeLa 細胞での過剰発現では β アクチンプロモーターで一過的に高発現させているため IRE1 β が常時活性化状態にあるのに対し、LS174T 細胞では低発現プロモーターで発現させているため IRE1 β がある程度ストレスに依存して活性化していることによると考えられる。実際、マウス胎児繊維芽細胞株である MEF において低発現プロモーターで IRE1 β 安定発現株を取得すると、定常状態では 28S rRNA の切断は観察されず、ストレスに依存して 28S rRNA の切断が観察されるようになり、低発現の IRE1 β がストレスに依存して活性化していた (Fig. 24)。それぞれの細胞株の糖タンパク質画分を SDS-PAGE により分離すると、IRE1 β WT の安定発現株のサンプルにおいて分子量の大きなタンパク質の合成量が顕著に減少していた (Fig. 23B)。面白いことに、それ以外の分子量のタンパク質の合成量にはあまり影響がなかった。この分子量の大きなタンパク質は杯細胞で大量に合成されている MUC2 タンパク質である可能性が高いと考えられた。そこで、それぞれの細胞株における MUC2 タンパク質の存在量をウェスタンブロッティングにより検出した。LS174T 細胞では、HDAC (Histone Deacetylase) 阻害剤である酪酸ナトリウム (Sodium Butyrate) で処理すると MUC2 の合成が促進されることが報告されているため (Hatayama et al., 2007)、それぞれの細胞株を酪酸ナトリウムで処理した際の MUC2 タンパク質の挙動を調べた。その結果、親株の LS174T 細胞では酪酸ナトリウム処理により MUC2 タンパク質の増加が観察されたのに対し、IRE1 β WT の安定発現株では定常状態でも MUC2 タンパク質の発現が LS174T 細胞より少なく、酪酸ナトリウム処理でも MUC2 タンパク質の発現量の増

加はほとんど見られなかった (Fig. 25)。また、IRE1 β KM 安定発現株では明らかな MUC2 タンパク質の発現量の増加が観察された。このことから、LS174T 細胞において IRE1 β が粘液の主要構成因子である MUC2 タンパク質の発現を負に制御していることが明らかとなった。

8.2. IRE1 β は *MUC2* mRNA を減少させる

次に、IRE1 β が *MUC2* mRNA を減少させている可能性を検討した。第一部で明らかにしたように、MUC2 の発現抑制が mRNA を減少させることによるものなのかを明らかにするため、各細胞株において酪酸ナトリウム処理の有無で *MUC2* mRNA 量を Real time PCR により測定した。その結果、定常状態でも親株と比較して IRE1 β WT 安定発現株では *MUC2* mRNA 量が減少しており、IRE1 β KM 安定発現株では増加していた (Fig. 26)。また、酪酸ナトリウム処理によって親株では *MUC2* mRNA が約 2.5 倍に増加したのに対し、WT 安定発現株ではほとんど増加せず、KM 安定発現株ではより増加した。このことから、IRE1 β が *MUC2* mRNA を減少させていることが示唆された。しかし、IRE1 β が自身の RNase 活性によって直接 *MUC2* mRNA を減少させているかどうかは示せていない。つまり、IRE1 α が自身の RNase 活性によって *XBPlu* mRNA をスプライシングし、転写活性をもった XBP1s が翻訳されて様々な遺伝子の転写が誘導されるように、IRE1 β にも XBP1 のような転写因子を介して誘導された RNase 活性をもった遺伝子の発現によって mRNA が分解されている可能性も否定できない。そこで、IRE1 β による *MUC2* mRNA の減少が転写を介した現象でない事を示すため、転写阻害剤を効かせた状態で各細胞株における *MUC2* mRNA の安定性を調べた。その結果、Tg 処理した際に、親株および WT 安定発現株で *MUC2* mRNA 安定性が減少し、KM 安定発現株で増加した (Fig. 27)。このことから、IRE1 β が *MUC2* mRNA を切断していることが強く示唆された。

8.3. LS174T 細胞では IRE1 β による 28S rRNA の切断活性は低い

HeLa 細胞において、過剰発現によって活性化した IRE1 β は 28S rRNA を切断する (Iwawaki et al., 2001)。そこで、LS174T 細胞においても IRE1 β による 28S rRNA の切断が起きているのかどうかを検証した。もし、MUC2 の翻訳抑制に 28S rRNA の切断が関与しているのであれば、IRE1 β WT 安定発現株で 28S rRNA の切断が亢進し、IRE1 β KM 安定発現株では 28S rRNA の切断が検出されなくなることが予想される。しかし、各細胞株を小胞体ストレス誘導剤の Thapsigargin (Tg) で処理し、28S rRNA の切断の有無をノーザンブロッティングにより検出した結果、各細胞株間で 28S rRNA の切断に顕著な差は見られなかった (Fig. 28)。第一部において、IRE1 β の活性化による翻訳抑制に 28S rRNA の切断が関与しないことを示唆していたが (Fig. 11)、今回の結果からも、IRE1 β は 28S rRNA の切断よりも mRNA の切断に

よって小胞体に流入するタンパク質の量を制限している可能性が強く示唆された。

8.4. LS174T 細胞の電子顕微鏡観察

IRE1 β のノックアウトマウスの杯細胞で観察された異常に肥大化した小胞体が、IRE1 β のドミナントネガティブ変異体である IRE1 β KM の安定発現株でも観察されるかどうか電子顕微鏡観察を行った。それぞれの細胞株の未処理サンプルと酪酸ナトリウム処理サンプルで電子顕微鏡観察したところ、親株の LS174T 細胞では、酪酸ナトリウム処理によってムチンの合成が促進され、細胞内にムチン顆粒が多数形成されていることが観察されたが、異常な小胞体は観察されなかった (Fig. 29)。IRE1 β WT の安定発現株では、酪酸ナトリウム処理をしてもムチン顆粒の形成は観察されず、異常な小胞体も観察されなかった (Fig. 30)。しかし、IRE1 β KM の安定発現株では、未処理のサンプルでもムチン顆粒を有する細胞や、異常な小胞体を有する細胞が少量のもの観察され、酪酸ナトリウム処理したサンプルではほとんどの細胞で異常に肥大化した小胞体が観察された (Fig. 31)。以上の結果から、杯細胞様細胞株である LS174T 細胞では、ムチンの合成が促進されるような条件において IRE1 β が小胞体の恒常性維持に重要であることが明らかとなった。

8.5. IRE1 β は小胞体ストレスを軽減する

電子顕微鏡観察により、IRE1 β KM の安定発現株で小胞体の肥大化が観察され (Fig. 31)、LS174T 細胞における小胞体ストレスの軽減に IRE1 β が関与していることが示唆された。そこで、それぞれの細胞株において小胞体ストレス誘導剤でストレスを誘導した際のストレス状態を、レポーターを用いて調べた。用いたレポーターは、ATF6 のシス配列である ERSE 配列の下流に Firefly luciferase 遺伝子をつなげたものと、XBP1 のシス配列である UPRE 配列の下流に Firefly luciferase 遺伝子をつなげたものを用いた。それぞれの細胞株にレポーター遺伝子とトランスフェクションコントロールとなる Renilla luciferase 発現ベクターを導入し、導入後 24 時間で N 型糖鎖の修飾阻害剤であるツニカマイシン (Tm) で処理し、レポーターアッセイを行った。親株において Tm 処理を行うと ERSE および UPRE の両者のレポーター活性が増加した。しかし、Tm 処理 12 時間において親株と IRE1 β 安定発現株のレポーター活性の増加を比較すると、IRE1 β WT 安定発現株増加ではレポーター活性の上昇が抑制され、IRE1 β KM 安定発現株ではレポーター活性の上昇が促進された (Fig. 32)。以上の結果から、IRE1 β は小胞体ストレス時に小胞体に流入する新規合成タンパク質の量を制限することで小胞体ストレスを軽減することが示唆された。

8.6. IRE1 β は小胞体ストレスに対する耐性をもたらす

HeLa 細胞で IRE1 β を過剰発現させるとアポトーシスが誘導されることが報告されている(Iwawaki et al., 2001)。LS174T 細胞においても IRE1 β は細胞死を誘導するのだろうか？我々は、それぞれの細胞株に小胞体ストレスを誘導した際に、細胞生存性がどうなるかを調べた。それぞれの細胞株を図に示した時間 T_m で小胞体ストレスを与え、その後リプレーティングして培養し、細胞生存率を調べた。その結果、親株である LS174T 細胞では 8 時間 T_m 処理した細胞で生存細胞が 60%に減少したのに対し、IRE1 β WT の発現量の少ない WT-10 では親株と同程度、IRE1 β WT の発現量の高い WT-1 では生存細胞が 80%以上に増加した。一方、IRE1 β KM の安定発現株では二株とも親株よりストレス感受性が増し、生存細胞が 20%弱にまで減少した (Fig. 33)。また、ムチンの合成を誘導する酪酸ナトリウム処理を続けて培養すると、IRE1 β KM 安定発現株では有意に細胞死が増加した (Fig. 34)。以上の結果から、IRE1 β は小胞体ストレス時に小胞体へ流入する新規合成タンパク質の合成量を減少させることで小胞体ストレスを軽減し、小胞体ストレスによる細胞死を抑制するのに貢献していることが示唆された。

9. 考察

9.1. 杯細胞における IRE1 β の役割

第二部では、IRE1 β の発現細胞である杯細胞における IRE1 β の役割を明らかにすることを目的に、杯細胞様の特徴を示す LS174T 細胞株の解析を行ってきた。LS174T 細胞において IRE1 β は粘液の主要構成因子である MUC2 の発現量を負に制御していることが明らかとなった (Fig. 25)。その制御機構は、MUC2 mRNA を減少させることによる MUC2 タンパク質の発現抑制であることが示唆された (Fig. 26、27)。MUC2 タンパク質は、N 型糖鎖修飾部位やジスルフィド結合されると予測されるシステイン残基を非常に多く有するタンパク質で、小胞体での修飾過程が非常に複雑なタンパク質である (Allen et al., 1998)。そのため、小胞体内へ流入する MUC2 の新規合成タンパク質の量が増えると修飾反応がスムーズに行われなくなり、小胞体ストレスを引き起こすと考えられる。実際、LS174T 細胞において IRE1 β のキナーゼ欠損変異体の安定発現株では、小胞体ストレスが亢進している事が明らかとなり、IRE1 β が MUC2 タンパク質の合成量を負に制御することで小胞体ストレスの軽減に貢献していることが示された (Fig. 32)。

第一部では、HeLa 細胞に過剰発現させた IRE1 β が小胞体局在 mRNA を非選択的に減少させ、その合成量を減少させていることを明らかにした。しかし、LS174T 細胞で低発現プロモーターにより IRE1 β を発現させると、小胞体局在の MUC2 mRNA を減少させたが、その他の小胞体局在 mRNA では IRE1 β による影響が観察されなかった (Fig. 35)。これは、MUC2 mRNA にのみ IRE1 β により切断されやすい構造や配列が存在しているか、そもそも MUC2 の合成の盛んな細胞なため絶対量が多く、さらに mRNA も 15kb と非常に長いため確率的に IRE1 β と出合いやすいことによると考えられる。

9.2. IRE1 α と IRE1 β の違いについて

LS174T 細胞において IRE1 β が MUC2 mRNA の分解によって MUC2 タンパク質の発現量を負に制御していることを示してきたが、IRE1 β と相同性の高い IRE1 α は、同様に機能するのだろうか？ LS174T 細胞には内在性 IRE1 α の発現も認められた (Fig. 36)。つまり、IRE1 β KM の安定発現株においても IRE1 α は発現しているにも関わらず、IRE1 β KM の安定発現株において酪酸ナトリウム処理をすると小胞体の肥大化が観察されたことから、IRE1 α には MUC2 の発現量を制御する機能がないことを示唆している。しかし、IRE1 α と IRE1 β の相同性が高いことから IRE1 β KM が IRE1 α の活性にも影響を与えている可能性が考えられるが、各細胞株に Tm によって小胞体ストレスを誘導すると、IRE1 β KM の安定発現株でも XBP1 のスプライシングが観察されたことから IRE1 β KM は IRE1 α の活性にはあまり影響しないも

のと考えられた (Fig. 37)。実際、IRE1 α と IRE1 β のアミノ酸相同性は、小胞体内腔ドメインで低く、細胞質ドメインで高くなっている(Iwawaki et al., 2001)。IRE1 は小胞体内腔ドメインを介してダイマー化することから(Bertolotti et al., 2000)、IRE1 α と IRE1 β はヘテロダイマーを形成しないのかもしれない。

それでは、IRE1 β と IRE1 α の機能差は何によってもたらされているのだろうか？ 私は、この答えとして二つの可能性を考えている。一つは、第一部でも記述したように RNase の基質特異性の違いである。二つ目は、小胞体ストレスの感知機構の違いである。IRE1 β と IRE1 α では小胞体内腔ドメインの相同性が低いことから、IRE1 β と IRE1 α で小胞体ストレスのセンシングに違いがあるのではないかと考えている。つまり、IRE1 β が MUC2 の蓄積による小胞体ストレスを感知できるのに対し、IRE1 α はこれを感知できないのではないかと考えている。実際、IRE1 β KM の安定発現株では、酪酸ナトリウム処理で異常に肥大化した小胞体が観察され (Fig. 31)、小胞体ストレスが起きているにもかかわらず XBP1 のスプライシングはほとんど観察されなかった (Fig. 37)。酵母 Ire1 および哺乳類 IRE1 α の小胞体内腔ドメインは、その構造が明らかになっており、酵母 Ire1 の小胞体内腔ドメインはホモダイマーにより MHC (Major Histocompatibility Complex) に見られるようなペプチドの入り込む溝が形成され、その溝に折りたたみ不全のペプチドが入ることで完全な活性化を引き起こすことが示唆されている(Credle et al., 2005; Kimata et al., 2007)。一方で、哺乳類 IRE1 α の小胞体内腔ドメインは、この溝の構造が酵母 Ire1 より狭く、ペプチドが入り込めないことやオリゴマーを形成せずダイマーであることが示唆されている(Oikawa et al., 2009; Zhou et al., 2006)。IRE1 β の小胞体内腔ドメインの構造は明らかになっていないが、IRE1 β の小胞体内腔ドメインにはタンパク質が結合する可能性が示されていることから (Oikawa)、MUC2 による小胞体ストレスを感知するためには、yeast Ire1 と同様小胞体内腔ドメインの溝にタンパク質が作用することが重要なかもしれない。

現在、LS174T 細胞において PERK、IRE1 α の活性化状態の検出が可能となっており、LS174T 細胞を Tm で処理すると、両者のリン酸化による活性化が見られる。PERK の小胞体内腔領域は IRE1 と低いながらも相同性を示すが (Fig. 38)、面白いことに酪酸ナトリウム処理をした際には、PERK の活性化はほとんど見られず、一方で IRE1 α は一過的ではあるもののリン酸化による活性化が観察された (Fig. 36)。これは、小胞体ストレスの感知機構がセンサーによって異なる可能性を示唆している。今後は IRE1 β 、ATF6 の活性化状態も検出できるようにし、それぞれの小胞体ストレスセンサーの活性化状態の違いも明らかにしていく必要がある。

9.3. 杯細胞にのみ IRE1 β が必要となった理由

第一部で見てきたように、過剰発現によって活性化した IRE1 β は小胞体局在の mRNA は非特異的に減少させる可能性が示唆されたが、XBP1 のスプライシングは

ほとんど起こさなかった (Fig. 21)。IRE1 β の発現細胞である杯細胞では、XBP1 経路を促進することなく小胞体局在の mRNA を減少させることが必要となる場面があるのかもしれない。繊維芽細胞において XBP1 経路を活性化させることは、小胞体ストレスに対して細胞生存に貢献することが報告されており (Lin et al., 2007)、一方で膵臓 β 細胞では XBP1s を過剰に発現させると細胞死を引き起こすことが報告されている (Allagnat et al., 2010)。これは、細胞種によって XBP1 経路の役割や重要性が異なっていることを示唆している。XBP1 は ERAD (小胞体関連分解) に関わる因子の転写を誘導するが、ERAD では、一度翻訳されて小胞体内に送り込まれた構造異常タンパク質を小胞体から細胞質への逆行輸送する際にタンパク質の構造を解き、ジスルフィド結合を解消していく必要がある。また、小胞体で付加された N 型糖鎖は細胞質に輸送された後に N 型糖鎖分解酵素によって分解される。こうし過程を経た後にプロテアソームによってアミノ酸にまで分解されるため、ERAD はかなりエネルギー効率の悪い細胞応答であると言える。特に、ジスルフィド結合や N 型糖鎖修飾部位が非常に多く存在する MUC2 タンパク質を ERAD で分解することは非効率的であるように思われる。私は、巨大な分子であるムチンの合成、分泌に特化した杯細胞では、ERAD を促進することで小胞体ストレスを緩和するよりも、小胞体における折り畳み、修飾の許容量を越えた時点で小胞体への新規合成タンパク質の流入量を減らしてしまう方が効率的なのではないかと考えている。

小胞体へのタンパク質流入量を抑制する分子としては PERK が有名であるが、PERK による翻訳抑制は、全般的な翻訳を抑制するため、細胞質での翻訳にも影響を与える点で細胞の活動に大きな影響を与えてしまうと考えられる。また、PERK による翻訳抑制は、翻訳の開始を抑制するため、MUC2 のように非常に大きなタンパク質をコードした mRNA の翻訳においては、翻訳途中のリボソームによる翻訳はしばらくの間続くことになる。その点、IRE1 β による翻訳抑制機構では、小胞体ストレス時に小胞体膜上で翻訳されている mRNA を分解することで小胞体への新規合成タンパク質の流入を素早く抑えることができるのではないかと考えられる。事実、LS174T 細胞には PERK の発現も認められ、IRE1 β のドミナントネガティブ変異体である IRE1 β KM の安定発現株でも PERK が機能していると考えられるが、MUC2 の合成促進による小胞体ストレスを十分に抑制することが出来ていない。このことから、杯細胞における小胞体ストレスでは、PERK による翻訳抑制機構ではストレス解消に不十分であり、IRE1 β による制御が必要となったと考えられる。

9.4. IRE1 の活性化によるアポトーシスについて

小胞体ストレスにより活性化したストレスセンサー分子は、小胞体ストレスを緩和するためのシグナルを促進するが、強い小胞体ストレス状態や長期に渡る小胞体ストレスにおいては細胞死を誘導することが報告されている (Faitova et al., 2006)。IRE1 の下流でも、いくつかのシグナルによってアポトーシスが誘導されることが知られて

いる(Hetz and Glimcher, 2009)。また、IRE1 α の過活性化状態において小胞体局在 mRNA が分解されることが原因で細胞死が起きることも示されている(Han et al., 2009)。HeLa 細胞において IRE1 β を過剰発現させた際のアポトーシスも、小胞体局在 mRNA の分解が原因なのではないかと考えている。それは、HeLa 細胞に IRE1 β を過剰発現させると IRE1 β が常時活性化状態になるため、生存に必須な小胞体経路タンパク質の発現量が減少してしまうためであると考えられる。LS174T 細胞において低発現プロモーターで IRE1 β WT を発現させた場合では、アポトーシスは誘導されず、むしろ小胞体ストレスを緩和し、細胞の生存に貢献していることが明らかとなった。また、IRE1 β のドミナントネガティブ変異体である IRE1 β KM の安定発現株では、小胞体ストレスに対する抵抗性が低下し、細胞死が促進された。このことから杯細胞では、IRE1 β が小胞体へ流入するタンパク質の量を適度に調整する事で小胞体ストレスを軽減し、細胞生存に貢献していると考えられる。

Figure 22

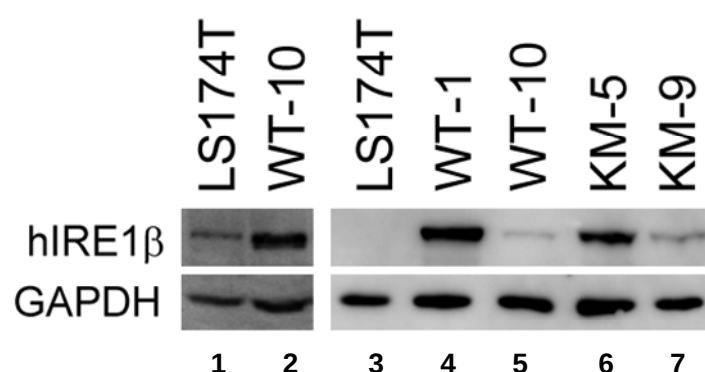


Fig. 22 LS174T 細胞と hIRE1 β 安定発現株における IRE1 β の発現量

LS174T 細胞に、hIRE1 β WT-HA および hIRE1 β K547A-HA の低発現ベクター (neomycin 耐性遺伝子を含む) を導入し、G418 でセレクションし、それぞれの安定発現株を得た。得られた hIRE1 β 安定発現株および LS174T 細胞における IRE1 β の発現量をウェスタンブロット解析により調べた。hIRE1 β WT-HA の安定発現株は、それぞれ WT-1、WT-10 と表記した。hIRE1 β K547A-HA の安定発現株は、それぞれ KM-5、KM-9 と表記した。上段は抗 human IRE1 β CD 抗体で hIRE1 β を検出し、下段は抗 GAPDH 抗体により内部標準である GAPDH を検出した。

Figure 23

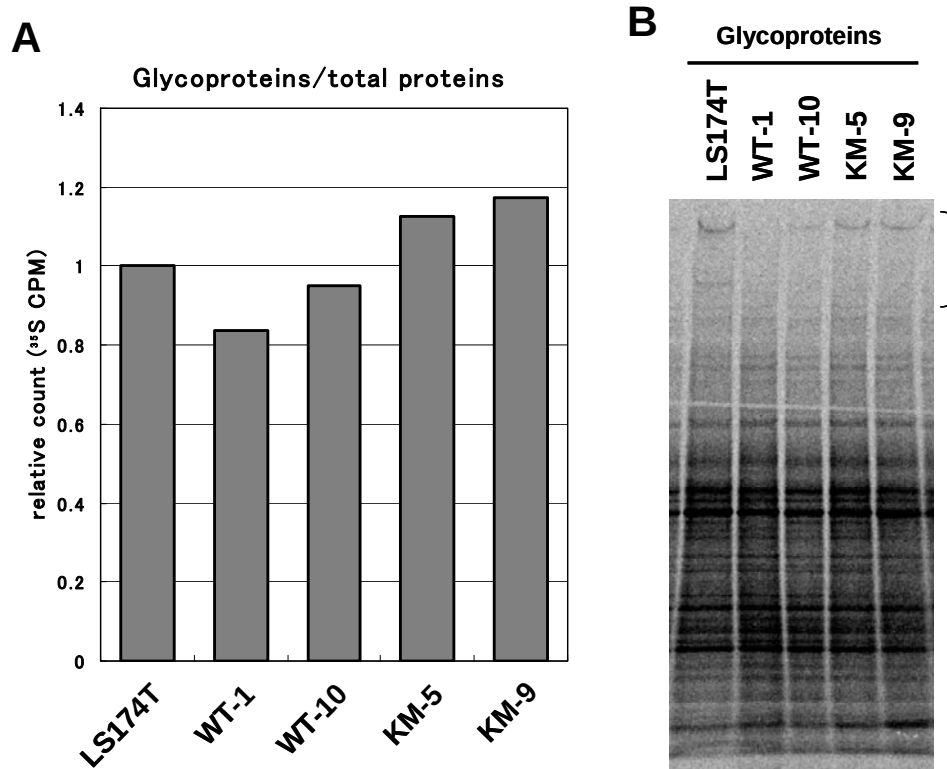


Fig. 23 それぞれの細胞株における糖タンパク質の合成量の違い

- A. LS174T 細胞および、各種 hIRE1 β 安定発現株を、30 分間 ³⁵S メチオニン、システインを含む培地でラジオラベルし、細胞溶解後にレクチンである Con A ビーズを用いて糖タンパク質画分を得た。細胞溶解液および糖タンパク質画分を TCA 沈殿し、沈殿画分の ³⁵S 放射線量を測定した。グラフは、各種細胞株の糖タンパク質画分(Glycoproteins)の測定値を細胞溶解液 (total proteins) の測定値で割った値を示しており、親株である LS174T 細胞での値を 1 とした。
- B. 各種細胞株における糖タンパク質画分 (A において計測された細胞溶解液の測定値で補正した量) を 2-15% のグラディエントゲルで SDS-PAGE し、オートラジオグラフィーにより検出した。

Figure 24

PERK KO MEF
hIRE1 β stable transfectant

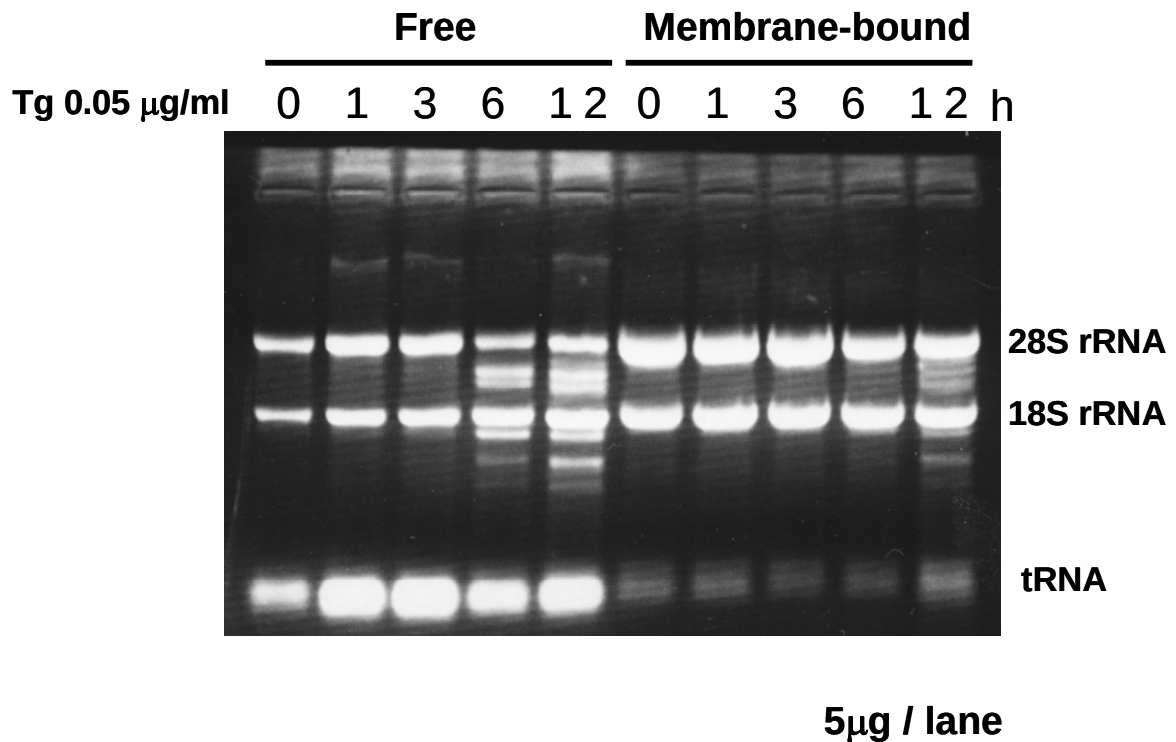


Fig. 24 MEFに低発現プロモーターでIRE1 β を発現させた時の28S rRNAの切断

PERK KOのMEF細胞において、低発現プラスミド(チミジンキナーゼプロモーター)でIRE1 β -HAの安定発現株を取得した。取得したIRE1 β 安定発現株を0.05 μ g/ml Tgで図に示した時間処理し、遊離リボソームと膜結合リボソームに分画し、RNAを抽出した。抽出したRNAを1%の変性アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドにより染色した。低発現のIRE1 β は小胞体ストレスのない状態では28S rRNA切断活性がなく、ストレスに応じて28S rRNAが切断されている。

Figure 25

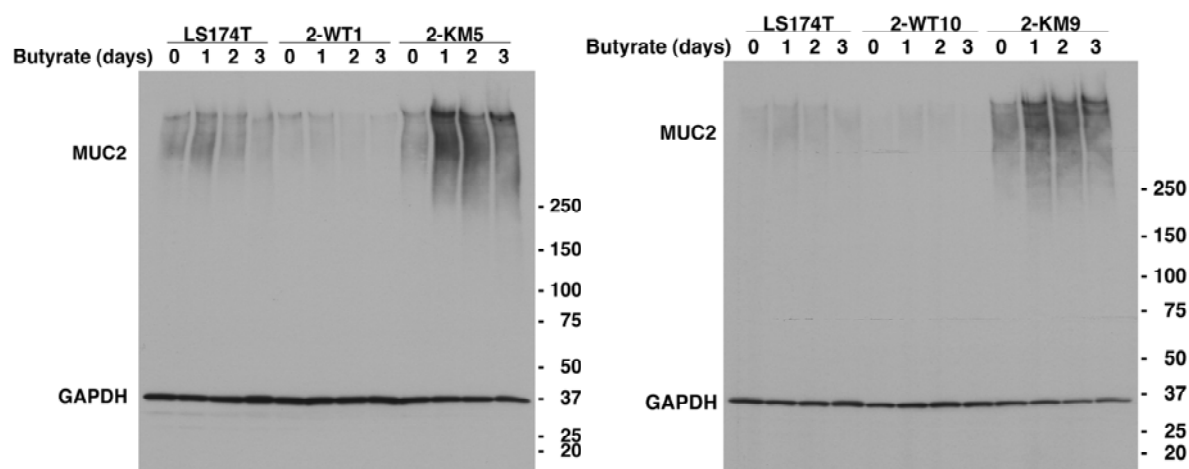


Fig. 25 それぞれの細胞株における MUC2 タンパク質量

LS174T 細胞および、各種 hIRE1 β 安定発現株を、1 mM の酪酸ナトリウム (Butyrate) で処理し、0、1、2、3 日培養した後に細胞を回収した。それぞれのサンプルにおける MUC2 のタンパク質量をウェスタンブロット解析により調べた。左のパネルは、LS174T 細胞と WT-1、KM-5 のサンプル、右のパネルは LS174T 細胞と WT-10、KM-9 のサンプルの結果を示す。検出は、抗 MUC2 抗体および抗 GAPDH 抗体で行った。MUC2 タンパク質は多くの糖鎖修飾を受けるため 250KD のマーカーの上の方でスメア状に検出される。

Figure 26

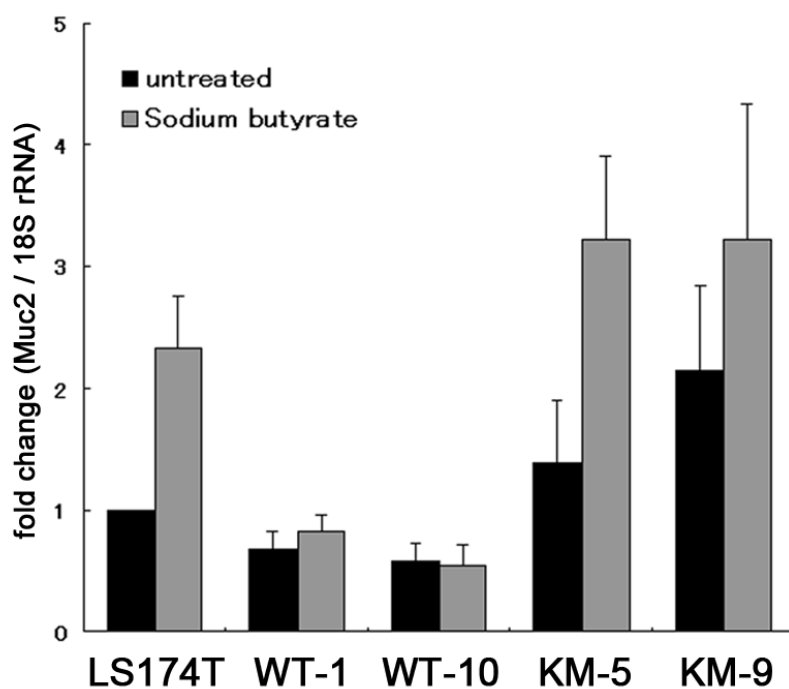


Fig. 26 それぞれの細胞株における *MUC2* mRNA 量

LS174T 細胞および、各種 hIRE1 β 安定発現株を、1 mM の酪酸ナトリウム (Butylate) で処理し、24 時間培養した後に細胞を回収し、RNA を抽出した。それぞれのサンプルにおける *MUC2* mRNA 量を Real-time PCR により解析した。グラフは、LS174T 細胞の未処理サンプルを基準とし、*MUC2* mRNA 量を 18S rRNA 量で補正した値を示した。黒色のバーは未処理サンプル (untreated) を、灰色のバーは酪産ナトリウム処理サンプル (Sodium butylate) を表している。

Figure 27

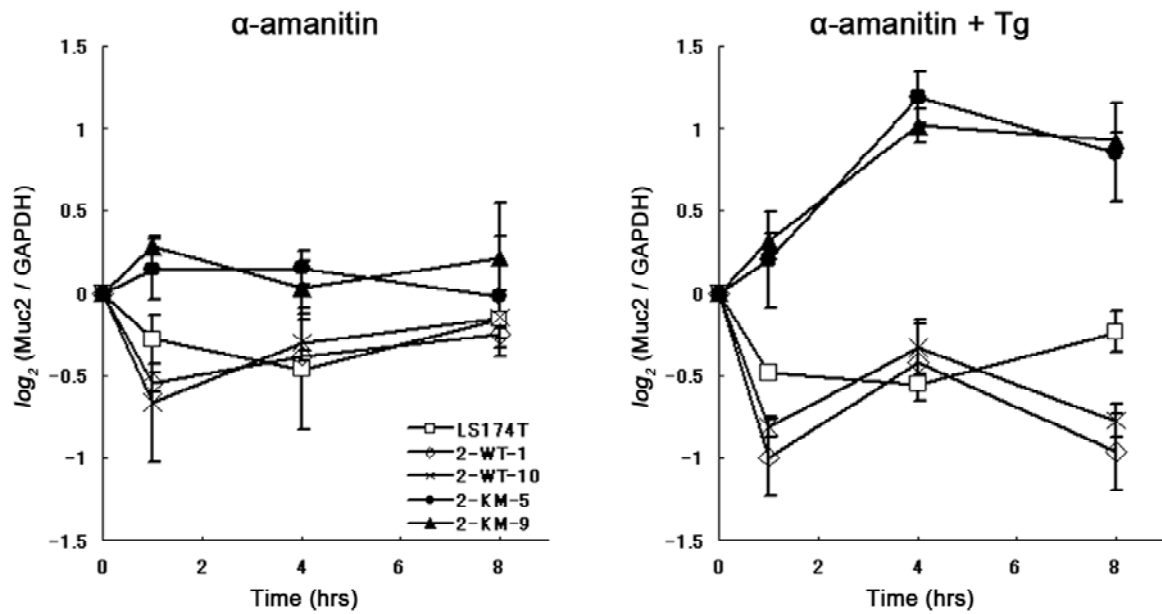


Fig. 27 各細胞株における *MUC2* mRNA の安定性

LS174T 細胞および、各種 hIRE1 β 安定発現株における *MUC2* mRNA の安定性を調べるために、RNA polymerase II 特異的な阻害剤である α -amanitin (2 μ g/ml) で処理し、Thapsigargin(Tg) 士で 2、4、6、8 時間後に細胞を回収して RNA を抽出した。各細胞株のサンプルにおける *MUC2* の mRNA 量および *GAPDH* の mRNA 量を Real-time PCR により解析した。グラフは、各細胞株の未処理サンプルを基準とし、*MUC2* mRNA 量を *GAPDH* mRNA 量で補正した値を示した。左のグラフが Tg-サンプル、右のグラフが Tg+サンプルの結果を示す。エラーバーは、3 回実験を行った標準偏差を示している。

Figure 28

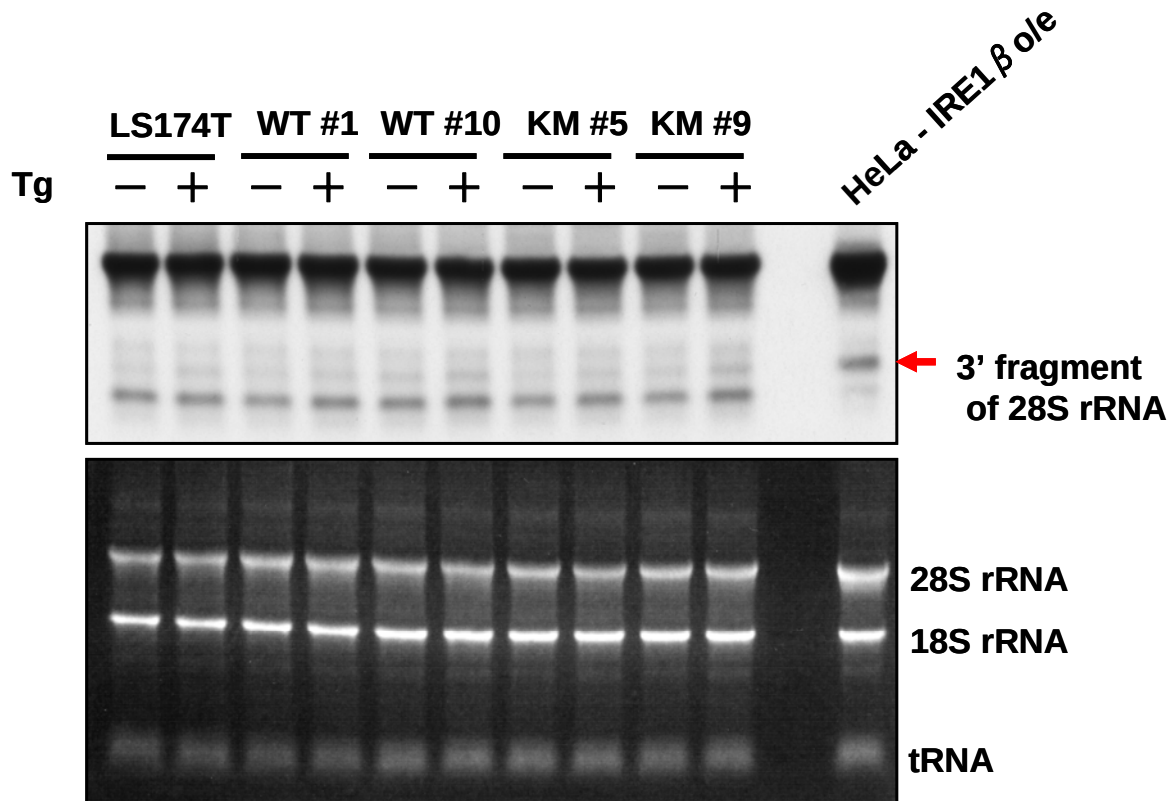


Fig. 28 各細胞株における 28S rRNA の切断

各細胞株を 0.2 μ g/ml Thapsigardin (Tg) $\pm$ で 9 時間処理し、RNA を抽出してノーザンブロットにより 28S rRNA の切断を調べた。上段が 28S rRNA の 3'側を probe にノーザンブロットにより検出したもの、下段が RNA を変性アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UV トランスイルミネーターで検出したものを示す。一番右のレーン HeLa 細胞に hIRE1 β WT を過剰発現させたサンプルで、ポジティブコントロールである。赤矢印で示した位置に IRE1 β の過剰発現による 28S rRNA の切断で生じた 28S rRNA の 3' fragment のシグナルが検出される。

Figure 29

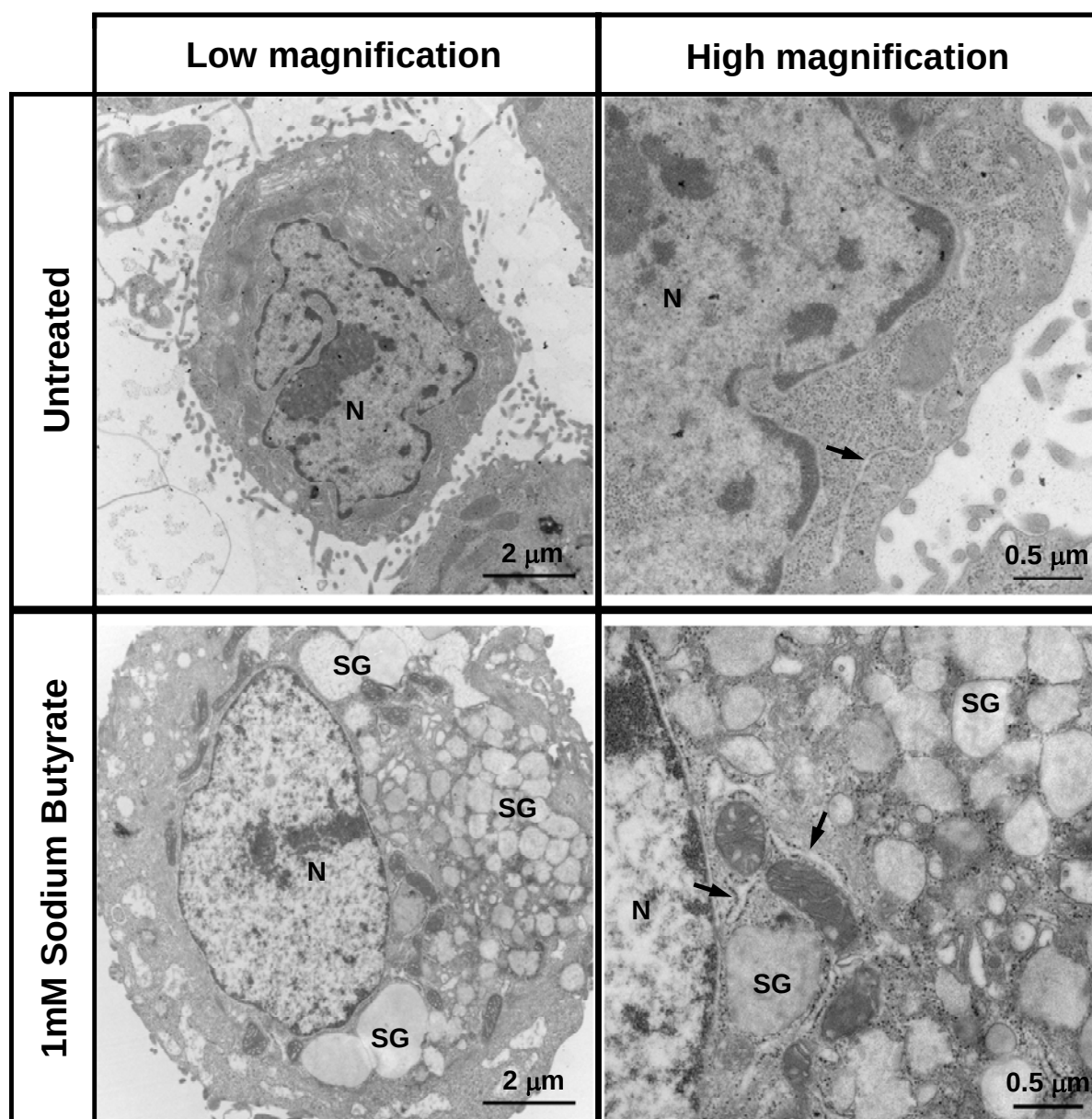


Fig. 29 LS174T の電子顕微鏡像

LS174T 細胞の未処理サンプルと、1 mM の酪酸ナトリウム (Sodium Butyrate) 1 日処理サンプルで電子顕微鏡観察を行った。上段が未処理サンプル、下段が 1 mM Sodium Butyrate 1 日処理サンプルを示す。左側が低倍率での電子顕微鏡像、右側が高倍率での電子顕微鏡像を示している。N は核、SG は分泌顆粒、矢印は小胞体を示している。

Figure 30

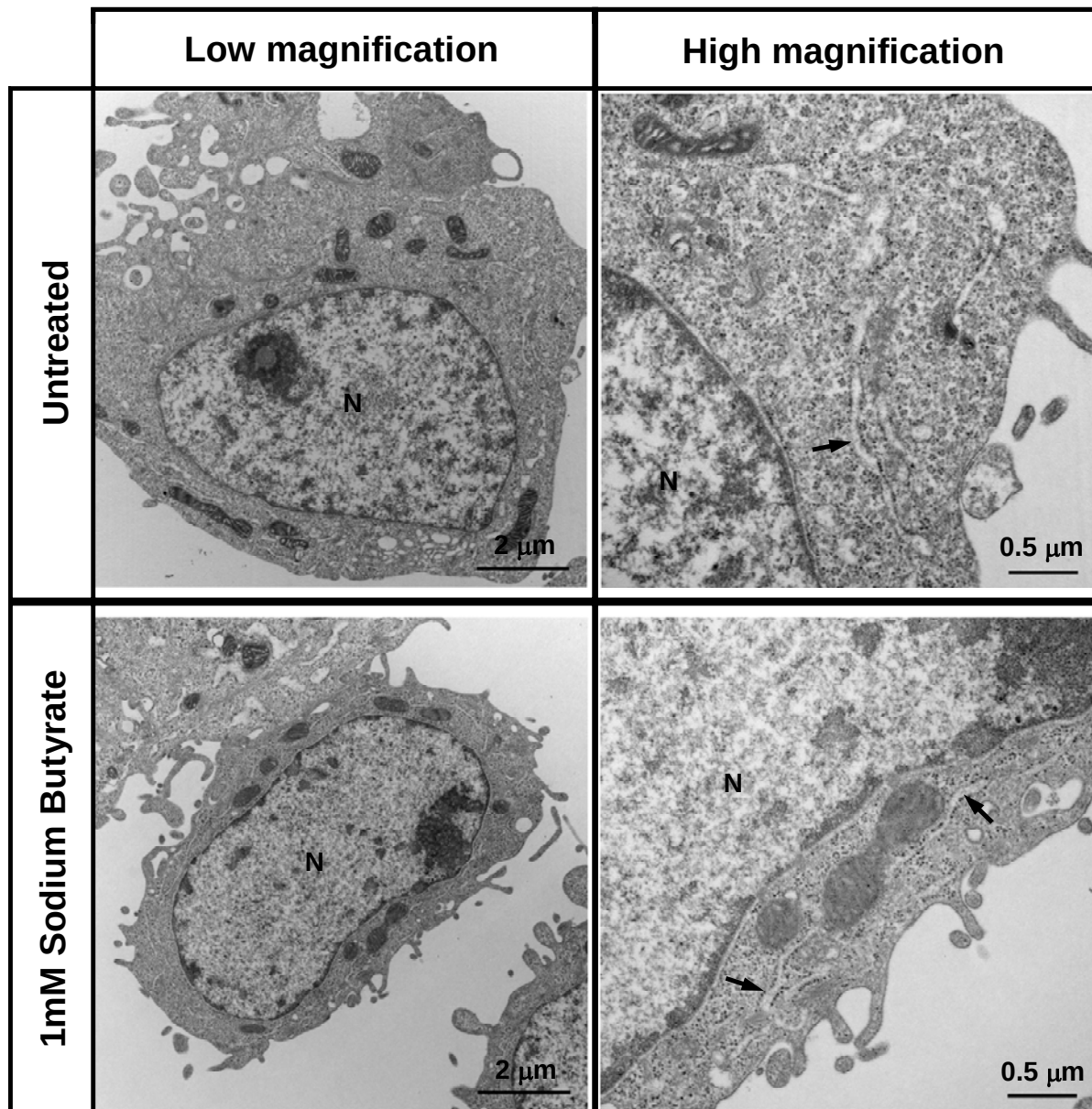


Fig. 30 WT-10 の電子顕微鏡像

WT-10 の未処理サンプルと、1 mM の酪酸ナトリウム (Sodium Butyrate) 1 日処理サンプルで電子顕微鏡観察を行った。上段が未処理サンプル、下段が 1 mM Sodium Butyrate 1 日処理サンプルを示す。左側が低倍率での電子顕微鏡像、右側が高倍率での電子顕微鏡像を示している。N は核、矢印は小胞体を示している。

Figure 31

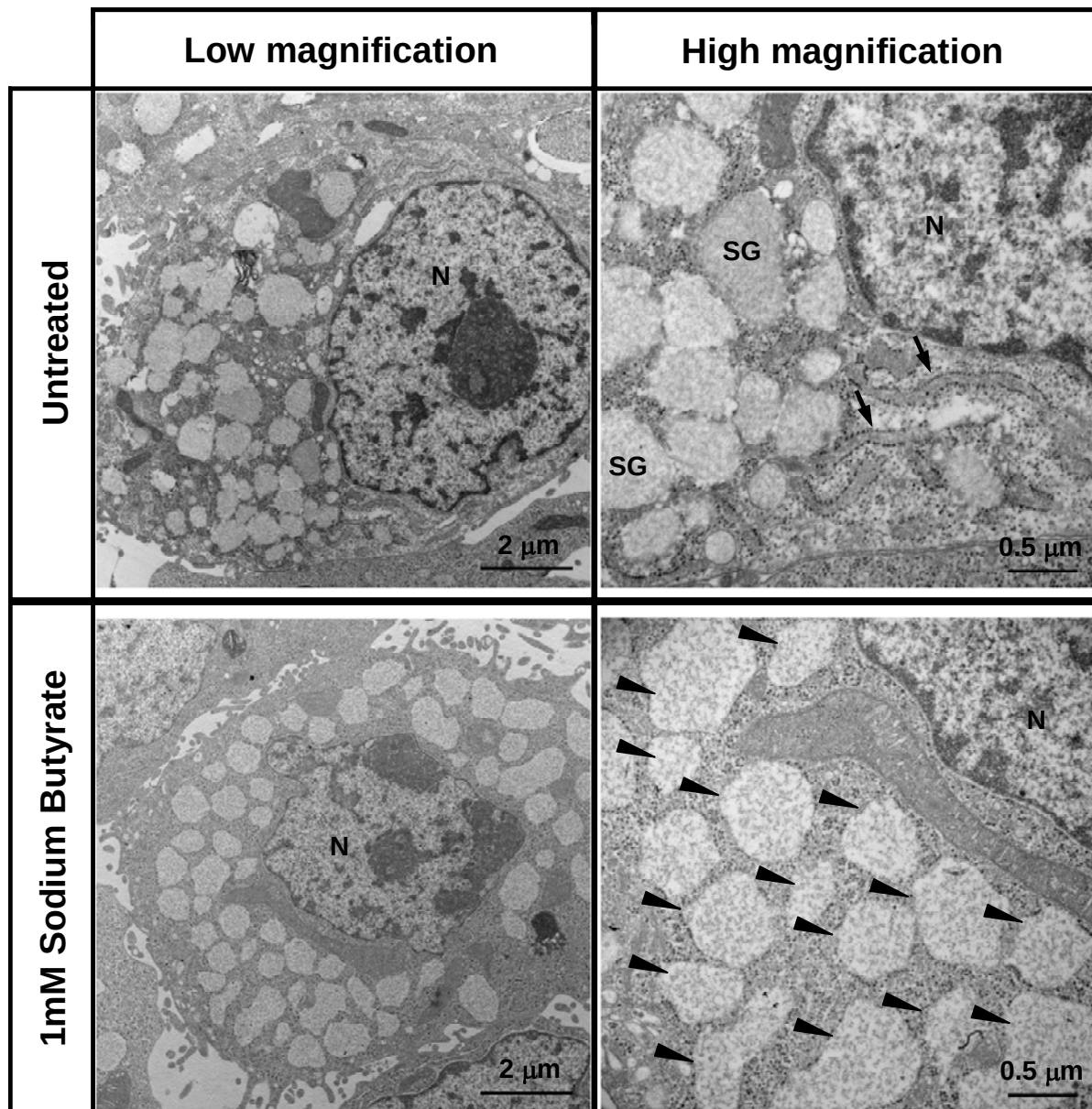


Fig. 31 KM-9 の電子顕微鏡像

KM-9 の未処理サンプルと、1 mM の酪酸ナトリウム (Sodium Butyrate) 1 日処理サンプルで電子顕微鏡観察を行った。上段が未処理サンプル、下段が 1 mM Sodium Butyrate 1 日処理サンプルを示す。左側が低倍率での電子顕微鏡像、右側が高倍率での電子顕微鏡像を示している。N は核、SG は分泌顆粒、矢印は正常な小胞体を、矢頭は異常に肥大化した小胞体を示している。

Figure 32

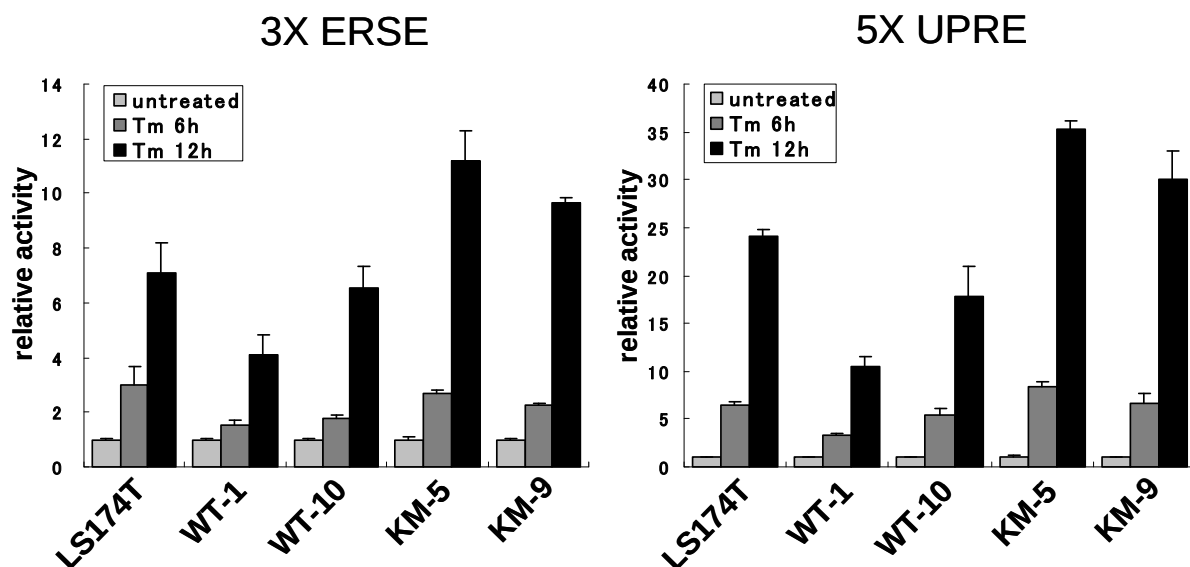


Fig. 32 各細胞株における小胞体ストレスレポーターアッセイ

実験に用いた小胞体ストレスレポーターは、主に XBP1 が結合するシス配列である ERSE element を 3 回タンデムにつなげその下流に firefly luciferase 遺伝子の ORF をつなげたもの (3X ERSE) と、主に ATF6 が結合するシス配列である UPRE element を 5 回タンデムにつなげその下流に firefly luciferase 遺伝子の ORF をつなげたもの (5X UPRE) を用いた。トランスフェクションコントロールとして Renilla luciferase の発現プラスミド (pRL-SV40) を用いた。

LS174T 細胞および、各種 hIRE1 β 安定発現株に小胞体ストレスのレポータープラスミド (pBL3-hBiP(-132)、p5XATF6-GL3) とトランスフェクションコントロールプラスミド (pRL-SV40) をトランスフェクションし、2 mg/ml の Tunicamycin (Tm) で 6、12 時間処理し細胞を回収した。それぞれのサンプルをデュアルルシフェラーゼアッセイによりレポーター活性を測定し、グラフに示した。左のグラフが 3X ERSE レポーターの比活性を、右のグラフが 5X UPRE レポーターの比活性を表しており、それぞれの細胞株の未処理サンプルの活性を 1 としてグラフに示した。エラーバーは 3 回の実験の標準偏差を示す。

Figure 33

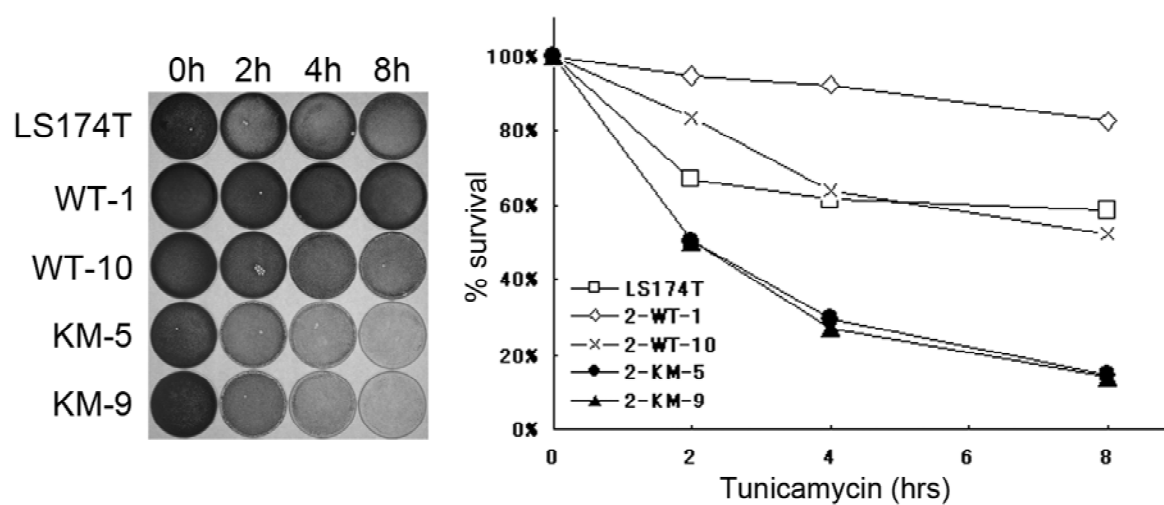


Fig. 33 各細胞株の小胞体ストレスに対する生存活性

LS174T 細胞および、各種 hIRE1 β 安定発現株を、2 mg/ml の Tunicamycin (Tm) で 0、2、4、8 時間処理した後に、トリプシンで細胞をはがし細胞を播種し直した。その後 5 日間培養し、生着した生細胞をクリスタルバイオレット染色した。その染色像を左に示した。グラフは、染色細胞の染色強度を Multi gauge (FUJIFILM) ソフトウェアで定量し、各細胞株の 0 時間処理の染色強度を 100% として示した。

Figure 34

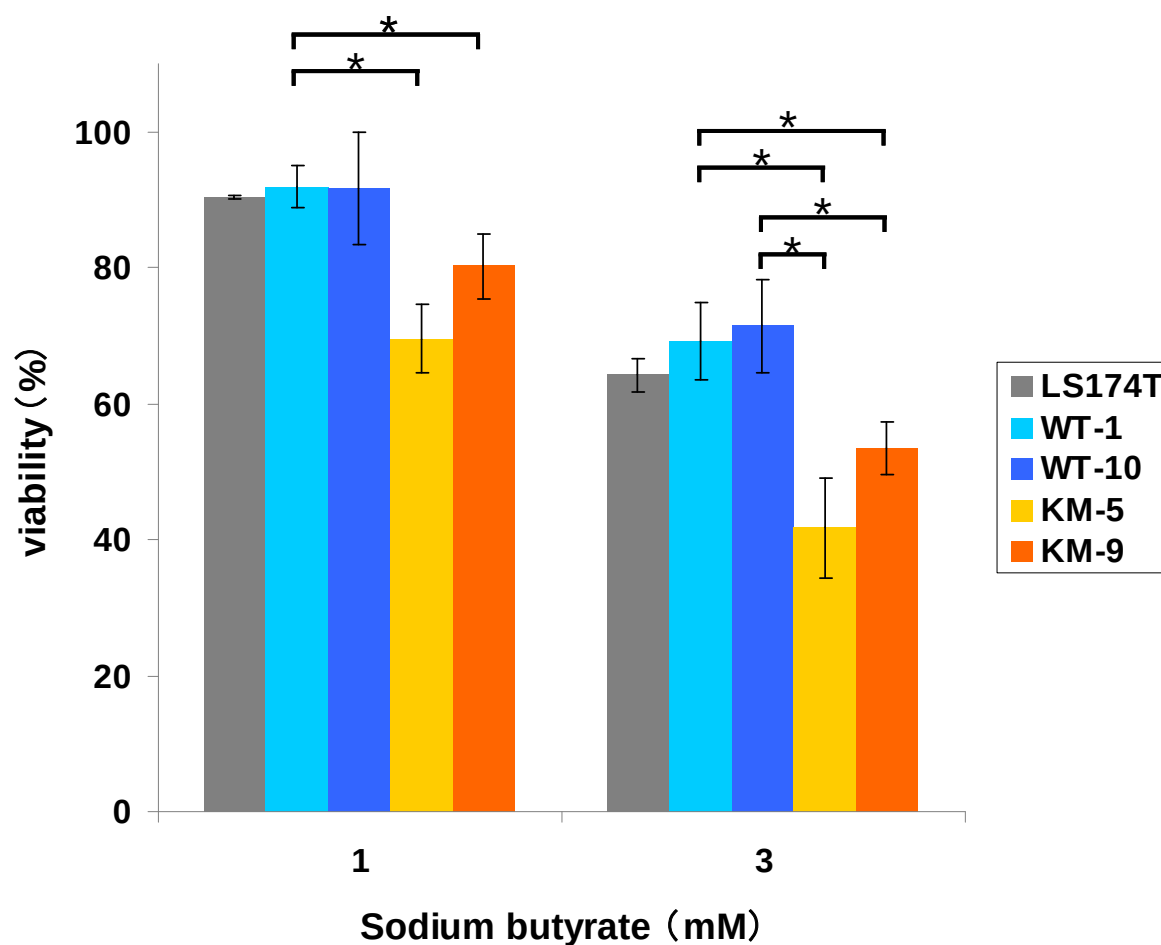


Fig. 34 各細胞株における酪酸ナトリウム処理による小胞体ストレスに対する生存活性

LS174T 細胞および、各種 hIRE1 β 安定発現株を、1 mM もしくは 3 mM の Sodium Butyrate で処理し、5 日間培養し、生存細胞をクリスタルバイオレットで染色した。染色強度を Multi gauge (FUJIFILM) ソフトウェアで定量し、各細胞株の未処理サンプルの染色強度を 100% としてグラフに示した。エラーバーは 3 回の実験の標準偏差を示す。*は有意差を示す。(*, $P < 0.01$) (Student's t test)

Figure 35

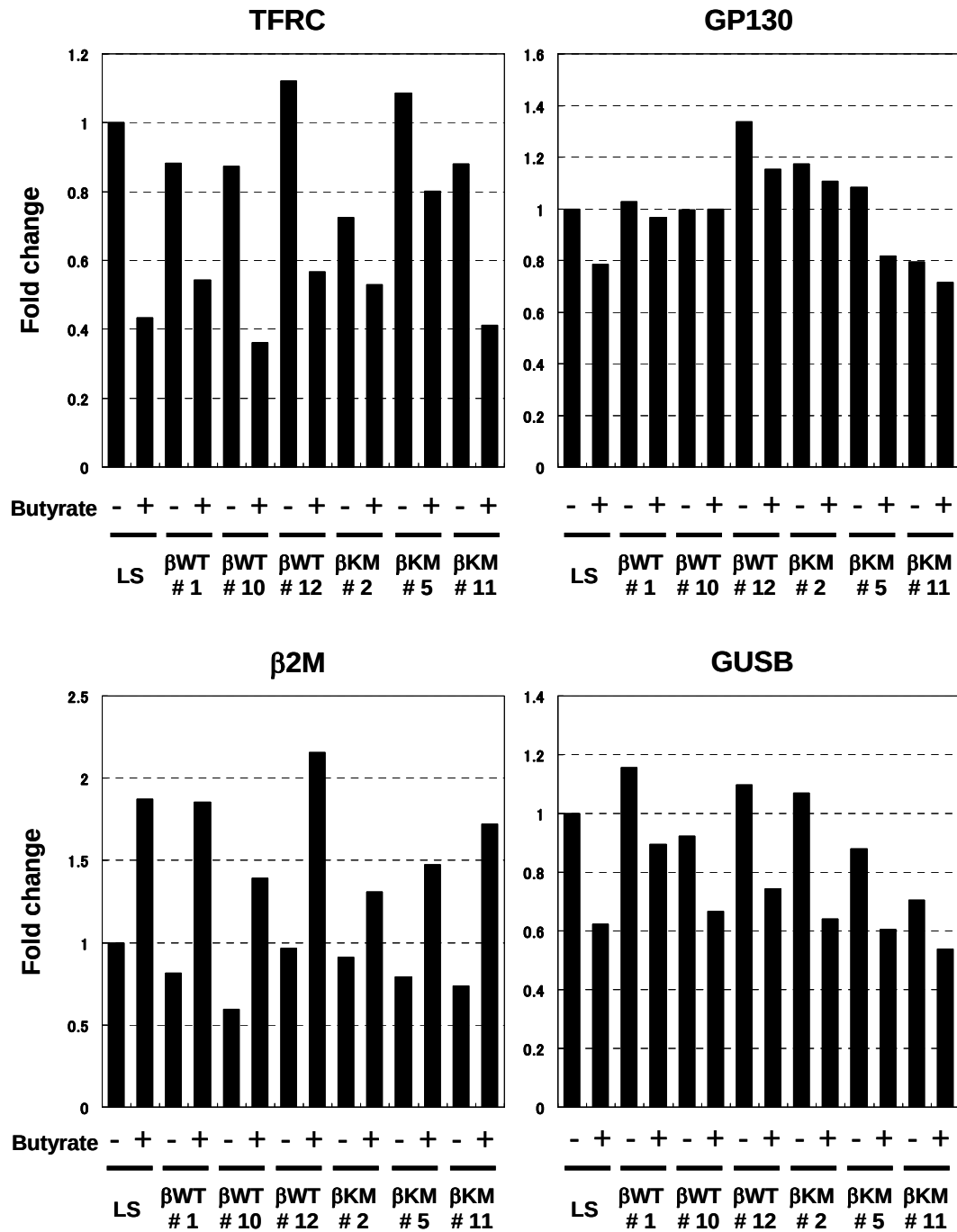


Fig. 35 それぞれの細胞株における小胞体局在 mRNA 量

LS174T 細胞および、各種 hIRE1β 安定発現株を、1 mM の酪酸ナトリウム (Butylate) で処理し、24 時間培養した後に細胞を回収し、RNA を抽出した。それぞれのサンプルにおける小胞体局在の mRNA (TFRC、GP130、B2M、GUSB) 量を Real-time PCR により解析した。グラフは、LS174T 細胞の未処理サンプルを基準とし、それぞれの mRNA 量を 18S rRNA 量で補正した値を示した。

Figure 36

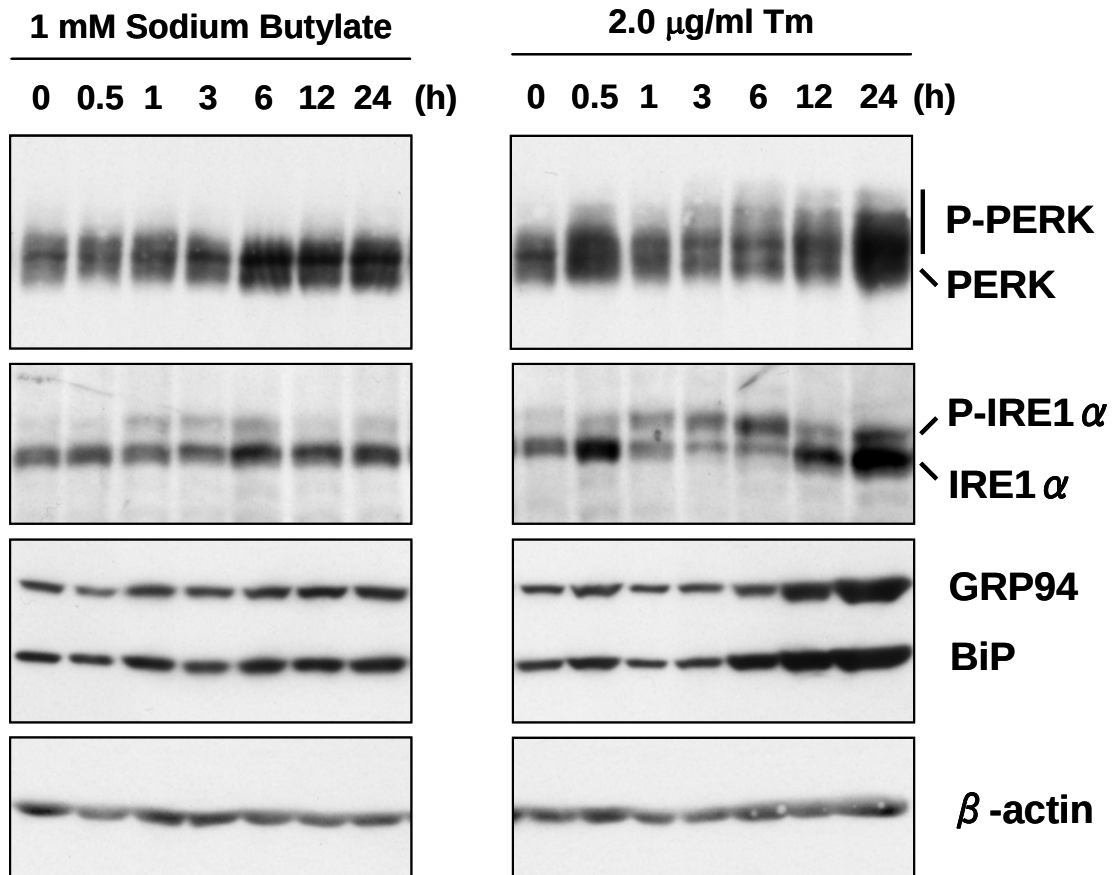


Fig. 36 LS174T 細胞における IRE1 α と PERK の活性化状態

LS174T 細胞を、1 mM Sodium Butyrate もしくは 2.0 $\mu\text{g/ml}$ Tm で処理し、図に示した時間に細胞を回収してウェスタンブロット解析を行った。PERK のリン酸化を検出するには 7%ポリアクリルアミドゲルで 75 kDa のマーカーが流れきるまで泳動した。IRE1 α のリン酸化を検出するには、25 μM の Phos-tag 入り 7%ポリアクリルアミドゲルで 75 kDa のマーカーが流れきるまで泳動し、リン酸化シフトを大きくした。上段から、抗 PERK 抗体、抗 mIRE1 α 抗体、抗 KDEL 抗体、抗 β -actin 抗体により PERK、IRE1 α 、GRP94、BiP、 β -actin をそれぞれ検出した。

Figure 37

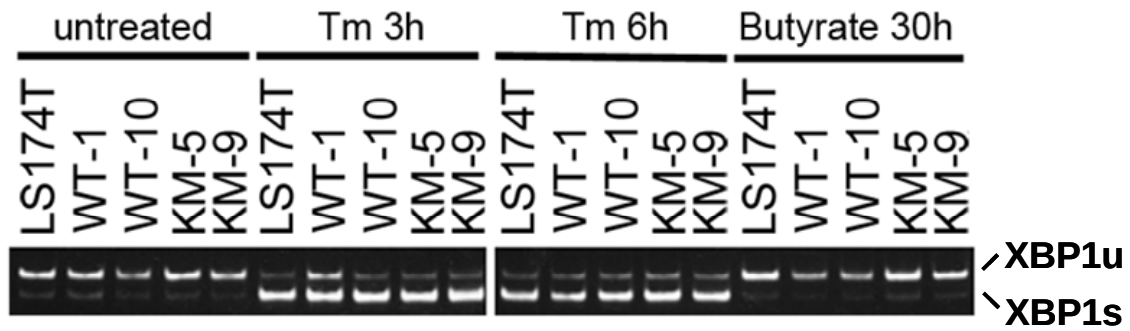


Fig. 37 各細胞株における XBP1 スプライシング

各細胞株を、2.0 $\mu\text{g/ml}$ Tm で 3、6 時間処理もしくは 1 mM Sodium Butyrate で 30 時間処理し、RT-PCR により XBP1 のスプライシングを調べた。上のシグナルが *XBP1u* mRNA 由来の cDNA が増幅されたもので、下のシグナルが IRE1 α の活性化によってスプライシングされた *XBP1s* mRNA 由来の cDNA が増幅されたものである。

Figure 38

Mouse IRE1a	1	--SFGRTSTVTLPETLLFVSTLDGSLHAV-SKRTGSIKWTLKEDFVLQVPTHVEEP-AF-	55
Mouse IRE1b	1	-----RPESLFVSTWDGSLHAL-NKQTGDLKWTVKDDPIIQGPMYVTEM-AF-	46
Mouse PERK	58	TEPDDDVELRPRGRSLVITSLDGRIAALDAENIGKKQWDLVDVSGSLVSSSLSKPEVEFG	117
Human IRE1a	1	--IFGSTSTVTLPETLLFVSTLDGSLHAV-SKRTGSIKWTLKEDFVLQVPTHVEEP-AF-	55
Human IRE1b	1	-----LRPENLLLVSTLDGSLHAL-SKQTGDLKWTLRDDFVIEGPMYVTEM-AF-	47
Human PERK	61	PEPDDETELPRGRSLVITSLDGRIAALDPENHGKKQWDLVDVSGSLVSSSLSKPEVEFG	120
Mouse IRE1a	56	--LPDPN-DGSLYTLGSKNNEGLTKLPFTIPELVQASPCRSSDGILYMGKKQDIWYVIDL	112
Mouse IRE1b	47	--LSDPA-DGSLYVLGTHKLQGLMKLPFTIPELVHASPCRSSDGVFYTGKQDAWFVVDP	103
Mouse PERK	118	NKMIIPSLDGDLEQWD-RDRESMEAVPFTVESILE-SSYKFGDDVVLVGGKSLITYGLSA	175
Human IRE1a	56	--LPDPN-DGSLYTLGSKNNEGLTKLPFTIPELVQASPCRSSDGILYMGKKQDIWYVIDL	112
Human IRE1b	48	--LSDPA-DGSLYILGTQKQGLMKLPFTIPELVHASPCRSSDGVFYTGKQDAWFVVDP	104
Human PERK	121	NKMIIPSLDGALEQWD-QDRESMETVPFTVESILE-SSYKFGDDVVLVGGKSLITYGLSA	178
Mouse IRE1a	113	LTGEKQQTLSAFADSLCPSTSLLYLGRTEYITIMYDTKTRELRWNATYFDYAASLPEDD	172
Mouse IRE1b	104	ESGETQMTLT---TEG--LSTPQLFIGRTQYTVSMHDLRTPAIRWNTTYRRYSAPLLNGS	158
Mouse PERK	176	YSGKLRYICSAALGCRWDSDEMEEDILLQRTQKTAVRAGVRSSEKWNFSVGHFELR	235
Human IRE1a	113	LTGEKQQTLSAFADSLCPSTSLLYLGRTEYITIMYDTKTRELRWNATYFDYAASLPEDD	172
Human IRE1b	105	ESGETQMTLT---TEG--PSTPRLYIGRTQYVTMHDPRAPAIRWNTTYRRYSAPPMDGS	159
Human PERK	179	YSGKVRYICSAALGCRQWDSDEMEQEDILLQRTQKTAVRAGVRSSEKWNFSVGHFELR	238
Mouse IRE1a	173	VDYKMSHFVSNNGDGLVVTVDSESGDVLWIQNYASPVVAFYVWQGEVLRKVVHINVAVETL	232
Mouse IRE1b	159	PGKYMSHLTSCGMGLLLTVDPGSGIVLWTQDLGVPVTGIYTWHDGLHQLPHLTLRDRTL	218
Mouse PERK	236	YIPDMETRAGFIESTFKPGGNKEDSKIIISDVEEQEATMLDTVIKVSADWKVMAFSRKGG	295
Human IRE1a	173	VDYKMSHFVSNNGDGLVVTVDSESGDVLWIQNYASPVVAFYVWQREGLRKVMHINVAVETL	232
Human IRE1b	160	PGKYMSHLASCGMGLLLTVDPGSGTVLWTQDLGVPVMGVYTWHDGLRQLPHLTLRDRTL	219
Human PERK	239	YIPDMETRAGFIESTFKPNENTEESKIIISDVEEQEAAIMDIVIKVSADWKVMAFSKKG	298
Mouse IRE1a	233	RYLTFMSGEVG-RITKWYPFPKETEAKSKLTPTLYVGKYSTSLYASPSMVHEGVAVVPR	291
Mouse IRE1b	219	HFLVLRWGHIRLPASSYQDTATQFSSLDLTQLLMTLYVGKEEAGFYVSKALVHAGVALVPR	278
Mouse PERK	296	RLEWEYQFCTPIASAWLVRDGKVIPIISLFDDTSYTASEEALGDEEDIVEAARGATENSVY	355
Human IRE1a	233	RYLTFMSGEVG-RITKWYPFPKETEAKSKLTPTLYVGKYSTSLYASPSMVHEGVAVVPR	291
Human IRE1b	220	HFLALRWGHIRLPASGPRDTATLFTSLDTQLLMTLYVGKDETGFYVSKALVHTGVALVPR	279
Human PERK	299	HLEWEYQFCTPIASAWLLKDGKVIPIISLFDDTSYTSNDDVLEDEEDIVEAARGATENSVY	358
Mouse IRE1a	292	GSTLPLLEGPQTDGVTIGDKGECVITPSTDLKFDPGGLKGSKNLYLRNYWLLIGHHETPL	351
Mouse IRE1b	279	GLTLAPMDGPTTDEVTLQVSGEREGSPSTAVRYPSG-----SVA-LPSQWLLIGYHEPPP	332
Mouse PERK	356	LGMYRGQLYLQSSVRVSEKFPTSPKALESVNGENAIPLPTIKWKPLIHSPSRTPVLVGS	415
Human IRE1a	292	GSTLPLLEGPQTDGVTIGDKGECVITPSTDVKFDPGLKSKNLYLRNYWLLIGHHETPL	351
Human IRE1b	280	GLTLAPADGPTTDEVTLQVSGEREGSPSTAVRYPSG-----SVA-LPSQWLLIGHHELPP	333
Human PERK	359	LGMYRGQLYLQSSVRISEKFPTSPKALESVTNENAIPLPTIKWKPLIHSPSRTPVLVGS	418
Mouse IRE1a	352	SASTKMLERFPNNLPKHRENVIPADSEKRS-FEEVINIVGQTSNDTPTTVSQDVEEKLAR	410
Mouse IRE1b	333	VLHTTMLRVHPIPGKVSATRAEDLHAPPVFFELLNLRRE---DPELHPPEEKASDSYPG	389
Mouse PERK	416	DEFDKCLSNCKYSHEEYSNGALSILQYPYDNGYYLPYYKRERNKRSTQITVRFLDSPHYS	475
Human IRE1a	352	SASTKMLERFPNNLPKHRENVIPADSEKKS-FEEVINLVDQTSENAPTTVSRDVEEKPAH	410
Human IRE1b	334	VLHTTMLRVHPTLGSGTAETRPENTQAPAFFLELLSLSREKLWDSELHPPEKTPDSYLG	393
Human PERK	419	DEFDKCLSNCKFSHEEYSNGALSILQYPYDNGYYLPYYKRERNKRSTQITVRFLDNPHYN	478

Fig. 38 IRE1 α 、IRE1 β 、PERK の小胞体内腔領域のアライメント

Mouse および Human の IRE1 α 、IRE1 β 、PERK の小胞体内腔領域をアライメント解析した。灰色は 50%以上一致しているアミノ酸、黒色は 100%一致しているアミノ酸を示している。小胞体内腔領域の中でも N 末端領域の相同性が高い。

11. 謝辞

本研究で使用しました、レポータープラスミド pBL3-hBiP-132、hIRE1 α の cDNA はそれぞれ森和俊博士と Randal J. Kaufman 博士により供与いただきました。この場を借りて両博士に厚く御礼申し上げます。また、電子顕微鏡観察を行っていただきました本学細胞間情報学講座の岩野恵助教、永井里奈研究員に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めて行くにあたり、適切な指導、助言を下さいました河野憲二教授、木俣行雄准教授、都留秋雄助教、斉藤美知子助教、門倉広博士、竹内雅人博士、今川佑介博士、柳谷耕太博士および多大な御協力をいただきました河野研究室の皆様には感謝いたします。また、技術補佐の松村美樹さん、橋本純子さん、藤本直子さんには実験補助の面で大変お世話になりました。

12. 参考文献

- Allagnat, F., Christulia, F., Ortis, F., Pirot, P., Lortz, S., Lenzen, S., Eizirik, D., and Cardozo, A. (2010). Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis. *Diabetologia* *53*, 1120-1130.
- Allen, A., Hutton, D.A., and Pearson, J.P. (1998). The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell Biol* *30*, 797-801.
- Back, S., Scheuner, D., Han, J., Song, B., Ribick, M., Wang, J., Gildersleeve, R., Pennathur, S., and Kaufman, R. (2009). Translation attenuation through eIF2alpha phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells. *Cell Metab* *10*, 13-26.
- Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J.H., West, A.B., and Ron, D. (2001). Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest* *107*, 585-593.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L., Harding, H., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* *2*, 326-332.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J., Hubbard, S., Harding, H., Clark, S., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* *415*, 92-96.
- Chin, K., Zhou, H., Wong, C., Lee, J., Chan, C., Qiang, B., Yuan, J., Ng, I., and Jin, D. (2005). The liver-enriched transcription factor CREB-H is a growth suppressor protein underexpressed in hepatocellular carcinoma. *Nucleic Acids Res* *33*, 1859-1873.
- Credle, J., Finer-Moore, J., Papa, F., Stroud, R., and Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 18773-18784.
- Dimcheff, D.E., Faasse, M.A., McAtee, F.J., and Portis, J.L. (2004). Endoplasmic reticulum (ER) stress induced by a neurovirulent mouse retrovirus is associated with prolonged BiP binding and retention of a viral protein in the ER. *J Biol Chem* *279*, 33782-33790.
- Faitova, J., Krekac, D., Hrstka, R., and Vojtesek, B. (2006). Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett* *11*, 488-505.
- Gass, J., Gifford, N., and Brewer, J. (2002). Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J Biol Chem* *277*, 49047-49054.

Han, D., Lerner, A., Vande Walle, L., Upton, J., Xu, W., Hagen, A., Backes, B., Oakes, S., and Papa, F. (2009). IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* *138*, 562-575.

Harding, H., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000a). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* *6*, 1099-1108.

Harding, H., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D., and Ron, D. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* *7*, 1153-1163.

Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000b). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* *5*, 897-904.

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.

Hatayama, H., Iwashita, J., Kuwajima, A., and Abe, T. (2007). The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. *Biochem Biophys Res Commun* *356*, 599-603.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* *10*, 3787-3799.

He, B. (2006). Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ* *13*, 393-403.

Hetz, C., and Glimcher, L. (2009). Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome. *Mol Cell* *35*, 551-561.

Hino, S., Kondo, S., Yoshinaga, K., Saito, A., Murakami, T., Kanemoto, S., Sekiya, H., Chihara, K., Aikawa, Y., Hara, H., *et al.* (2010). Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis. *J Bone Miner Metab* *28*, 131-138.

Hollien, J., Lin, J., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol* *186*, 323-331.

Imagawa, Y., Hosoda, A., Sasaka, S., Tsuru, A., and Kohno, K. (2008). RNase domains determine the functional difference between IRE1alpha and IRE1beta. *FEBS Lett* *582*, 656-660.

Iqbal, J., Dai, K., Seimon, T., Jungreis, R., Oyadomari, M., Kuriakose, G., Ron, D., Tabas, I., and Hussain, M.M. (2008). IRE1 β inhibits chylomicron production by selectively degrading MTP mRNA. *Cell Metab* 7, 445-455.

Iwawaki, T., and Akai, R. (2006). Analysis of the XBP1 splicing mechanism using endoplasmic reticulum stress-indicators. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 709-715.

Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., and Miura, M. (2004). A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med* 10, 98-102.

Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., and Kohno, K. (2009). Function of IRE1 α in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16657-16662.

Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2001). Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol* 3, 158-164.

Kaser, A., Lee, A.H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., *et al.* (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743-756.

Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., and Kohno, K. (2007). Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *J Cell Biol* 179, 75-86.

Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A., and Imaizumi, K. (2005). OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat Cell Biol* 7, 186-194.

Korennykh, A., Egea, P., Korostelev, A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K., Stroud, R., and Walter, P. (2009). The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* 457, 687-693.

Kudo, T., Kanemoto, S., Hara, H., Morimoto, N., Morihara, T., Kimura, R., Tabira, T., Imaizumi, K., and Takeda, M. (2008). A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death Differ* 15, 364-375.

Labrie, C., Lessard, J., Ben Aicha, S., Savard, M., Pelletier, M., Fournier, A., Lavergne, E., and Calvo, E. (2008). Androgen-regulated transcription factor AIBZIP in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108, 237-244.

- Li, H., Korennykh, A., Behrman, S., and Walter, P. (2010). Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 16113-16118.
- Li, X., Blackford, J., Judge, C., Liu, M., Xiao, W., Kalvakolanu, D., and Hassel, B. (2000). RNase-L-dependent destabilization of interferon-induced mRNAs. A role for the 2-5A system in attenuation of the interferon response. *J Biol Chem* *275*, 8880-8888.
- Liang, S., Quirk, D., and Zhou, A. (2006). RNase L: its biological roles and regulation. *IUBMB Life* *58*, 508-514.
- Lin, J., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K., Lavail, M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* *318*, 944-949.
- Lipson, K., Fonseca, S., Ishigaki, S., Nguyen, L., Foss, E., Bortell, R., Rossini, A., and Urano, F. (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* *4*, 245-254.
- Lipson, K., Ghosh, R., and Urano, F. (2008). The role of IRE1alpha in the degradation of insulin mRNA in pancreatic beta-cells. *PLoS One* *3*, e1648.
- Oikawa, D., Kimata, Y., Kohno, K., and Iwawaki, T. (2009). Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp Cell Res* *315*, 2496-2504.
- Oikawa, D., Tokuda, M., and Iwawaki, T. (2007). Site-specific cleavage of CD59 mRNA by endoplasmic reticulum-localized ribonuclease, IRE1. *Biochem Biophys Res Commun* *360*, 122-127.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* *279*, 445-450.
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R., Görgün, C., and Hotamisligil, G. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* *313*, 1137-1140.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 519-529.
- Rutkowski, D.T., Kang, S.W., Goodman, A.G., Garrison, J.L., Taunton, J., Katze, M.G., Kaufman, R.J., and Hegde, R.S. (2007). The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* *18*, 3681-3691.

Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Kanemoto, S., Kondo, S., Saitoh, M., Nishimura, R., Yoneda, T., Furuichi, T., Ikegawa, S., *et al.* (2009). Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nat Cell Biol* *11*, 1197-1204.

Scheuner, D., Vander Mierde, D., Song, B., Flamez, D., Creemers, J.W., Tsukamoto, K., Ribick, M., Schuit, F.C., and Kaufman, R.J. (2005). Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat Med* *11*, 757-764.

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* *3*, 99-111.

Silverman, R., Skehel, J., James, T., Wreschner, D., and Kerr, I. (1983). rRNA cleavage as an index of ppp(A2'p)nA activity in interferon-treated encephalomyocarditis virus-infected cells. *J Virol* *46*, 1051-1055.

Stephens, S., Dodd, R., Brewer, J., Lager, P., Keene, J., and Nicchitta, C. (2005). Stable ribosome binding to the endoplasmic reticulum enables compartment-specific regulation of mRNA translation. *Mol Biol Cell* *16*, 5819-5831.

Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., and Kaufman, R.J. (2000). The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev* *14*, 2725-2736.

Tirasophon, W., Welihinda, A., and Kaufman, R. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* *12*, 1812-1824.

Wang, X., Harding, H., Zhang, Y., Jolicoeur, E., Kuroda, M., and Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* *17*, 5708-5717.

Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R., and Prywes, R. (2000). Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* *275*, 27013-27020.

Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R., and Mori, K. (2004). Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J Biochem* *136*, 343-350.

Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., and Kohno, K. (2009). Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its

own mRNA. *Mol Cell* *34*, 191-200.

Ye, J., Rawson, R., Komuro, R., Chen, X., Davé, U., Prywes, R., Brown, M., and Goldstein, J. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* *6*, 1355-1364.

Yin, J., Hashimoto, A., Izawa, M., Miyazaki, K., Chen, G., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Furuhata, K., Cheng, F., *et al.* (2006). Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res* *66*, 2937-2945.

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. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* *273*, 33741-33749.

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.

Yoshiuchi, K., Kaneto, H., Matsuoka, T., Kasami, R., Kohno, K., Iwawaki, T., Nakatani, Y., Yamasaki, Y., Shimomura, I., and Matsuhisa, M. (2009). Pioglitazone reduces ER stress in the liver: direct monitoring of in vivo ER stress using ER stress-activated indicator transgenic mice. *Endocr J* *56*, 1103-1111.

Zhou, J., Liu, C., Back, S., Clark, R., Peisach, D., Xu, Z., and Kaufman, R. (2006). The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 14343-14348.