

研 究 報 告 書

「細胞内の蛋白質代謝を管理するストレス応答機構の解明」

研究期間：平成19年10月～平成22年3月

研究者：岩脇 隆夫

1. 研究のねらい

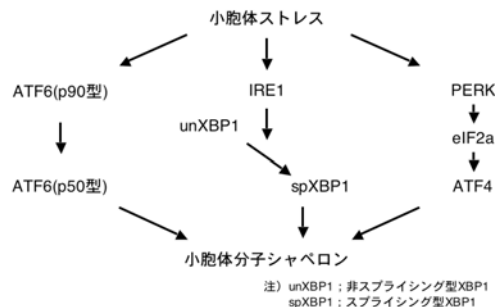
細胞の中または外でタンパク質は様々な生体反応を制御している主要分子である。しかし、そのタンパク質も古くなり機能しなくなれば、壊され、新しいものにとって代わっていく。このようなタンパク質の正常な代謝はわれわれが生きていく上で非常に重要である。例えば神経細胞内でのタンパク質代謝異常、つまり変性タンパク質を壊せず、蓄積させてしまった場合は神経細胞死が起こり、アルツハイマー病等に代表される神経変性疾患等の原因となる。異常なタンパク質の排除や機能的なタンパク質の供給というタンパク質の品質管理は、特に分泌タンパク質(ホルモン、抗体、神経伝達物質など)や膜タンパク質(ホルモン受容体、細胞接着因子、イオンチャンネルなど)の場合、細胞に備わっている小胞体ストレス応答や小胞体関連分解(ERAD)機構がその一部を担っている。本研究では小胞体ストレス応答のメカニズムを分子レベルで詳細に解析することにより分泌タンパク質および膜タンパク質の生成や分解がどのように制御されているのかを解明するべく研究を行ってきた。また、一方で小胞体ストレス応答の役割を生物個体レベルで解析することにより、分泌タンパク質や膜タンパク質の品質管理がどんな生理現象で特に重要になるのかを解明することにもチャレンジしてきた。

2. 研究成果

IRE1alpha による小胞体ストレス感知機構

細胞が高温環境におかれると、多くのタンパク質は熱変性し、機能を失う。変性して異常なフォールディング構造となったタンパク質の蓄積は細胞機能に障害を与える。そこで細胞は熱ストレスからの防衛策として、熱変性したタンパク質を正常なフォールディング構造に戻すため、分子シャペロン(HSP70 や HSP40 など)の発現を誘導する分子機構を発達させた。タンパク質のフォールディング構造に影響を及ぼすストレスは熱ストレスに限った

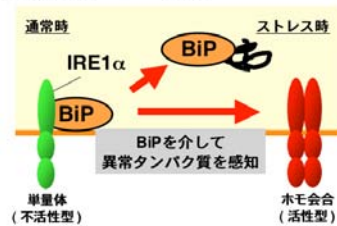
ものではなく、小胞体においても細胞がグルコース飢餓やある種の薬剤に曝されると、多くのタンパク質が異常なフォールディング構造をとり、変性タンパク質が蓄積する。小胞体内に変性タンパク質が蓄積することは一般に「小胞体ストレス」とよばれる。小胞体は真核細胞に存在する細胞小器官の一つで、膜タンパク質や分泌タンパク質の合成・修飾・輸送に関与する。また小胞体はその内腔での変性タンパク質の蓄積を感知し、他の細胞小器官(核など)にシグナル伝達する機能も有している。そのシグナル伝達経路のひとつに小胞体分子シャペロン(BiP や GRP94 など)の発現を誘導するものがあり、熱ストレス時と同様に、細胞を小胞体ストレスから守る。この小胞体分子シャペロンの発現誘導は unfolded protein response (UPR) とよばれており、近年、その分子機構は酵母や培養細胞を用いた研究で明らかになってきた。哺乳動物においては3つの小胞体膜タンパク質、IRE1、ATF6 及び PERK、が UPR 機構において重要な役割を果たす。これら3つの分子は小胞体内腔環境を感知し、それぞれ下流へとシグナルを伝達する。IRE1 は小胞体ストレスにより活性化されると、XBP1 mRNA のスプライソーム非依存的スプライシングを誘導し、活性型 XBP1 の産生を促す。ATF6 (p90 型) は小胞体ストレスを感知すると切断され、細胞質側の切断断片 (p50 型) が核へと移行する。PERK が小胞体ストレスにより活性化されると、eIF-2alpha のリン酸化を介して ATF4 遺伝子の翻訳を



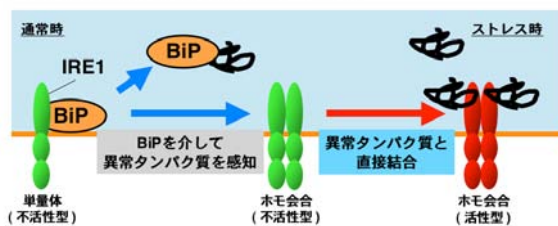
促進する。最終的に、活性型 XBP1、切断型 ATF6 (p50 型) 及び ATF4 は全て転写因子として小胞体分子シャペロン群を活性化する(上図参照)。

ここまでの説明でわかるように、ストレスを受けた後の分子メカニズムは随分理解が進んだ。しかし、研究開始当初、ストレスの感知については(特に哺乳動物に関して)ほとんど未解明であったので、本研究期間ではヒトの IRE1 α に着眼し、この問題に取り組んだ。哺乳動物の小胞体ストレスセンサーには、先に示した図からも分かるように、ATF6、IRE1、PERK が知られるが、これらのうち IRE1 を選んだのには、ATF6 や PERK と異なり IRE1 は酵母から哺乳動物に至るまで進化的に保存されていて、その重要性を予感させたことと、その発見から自身が関わって研究してきたことがあげられる。さて、ここから実際に行ってきた研究について説明する。IRE1 は I 型膜タンパク質として小胞体膜上に局在し、アミノ末端側を小胞体内腔に向けている。IRE1 の小胞体内腔領域は主要な小胞体分子シャペロンである BiP と結合することが、これまでの研究で明らかになっていたので、IRE1 の小胞体ストレス感知について次のような仮説を立てた。小胞体ストレスに曝されていないとき、IRE1 は BiP の結合により活性を負に制御されていて、逆に小胞体内で未フォールディングまたは異常フォールディングのタンパク質が増えてくると、BiP はそれらのタンパク質のフォールディングに駆り出されるため IRE1 からは解離し、抑制が解除された IRE1 は二(多)量体化・自己リン酸化して活性を發揮するようになる。これを証明するために、まず小胞体ストレスを引き起こさせたときには IRE1 から BiP が解離することを確認した。そして IRE1 に対して連続的な部分欠失を施し、恒常的に(ストレスがなくても)活性化する IRE1 変異体の作成に成功した。その後、その変異体が BiP との結合能を部分的に欠損していることを突き止めた。これらの事象は先の仮説を支持するものである。一方、酵母菌の IRE1 は BiP の結合/解離に加え、変性タンパク質の直接的な結合も小胞体ストレス感知において重要であるとの報告があり、ヒトの IRE1 α についても変性タンパク質の直接的な結合の可能性をテストしてみたが、酵母 IRE1 で見られるような活性はなかった。IRE1 の存在は酵母から高等動物に至るまで進化的に保存されていることを述べたが、そのストレス感知機構は進化の過程で変化してきているようで、酵母では BiP の結合/解離と変性タンパク質の直接結合との二段階で調節されるが、本研究においては哺乳動物の IRE1 は BiP の結合/解離だけで調節される可能性を見出し、小胞体ストレス感知の進化における重要な知見を得た(右図参照)。

哺乳動物モデル：BiP解離



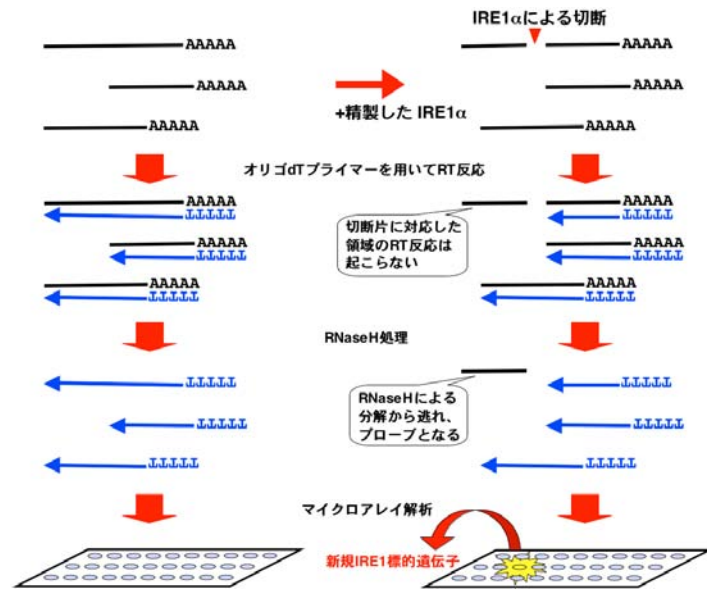
出芽酵母モデル：BiP解離と直接結合の二段階



IRE1 α による基質 RNA 認識機構

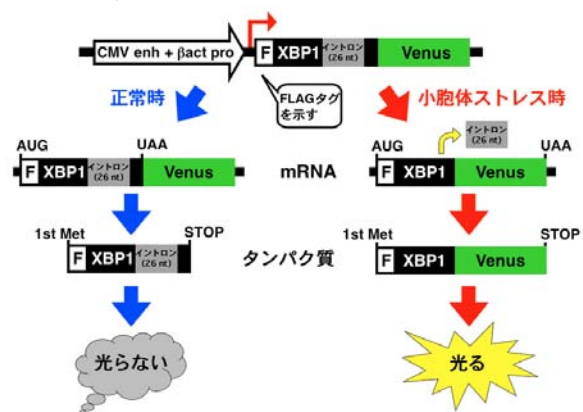
IRE1 が小胞体ストレスにより活性化されると、XBP1 mRNA のスプライソーム非依存的スプライシングを誘導し、活性型 XBP1 の産生を促すことは先に述べた通りである。このとき IRE1 は XBP1 mRNA の特異的なサイトに対して働くエンドリボヌクレアーゼとして機能することが分かっているが、その基質認識機構には未だ多くの謎が残されており、本研究では、この問題にも取り組んだ。研究開始当初、哺乳動物の IRE1 α の基質となる RNA 分子としては XBP1 しか知られていなかったため、IRE1 の基質認識機構に迫る研究は XBP1 mRNA 上に変異を導入し、切断効率を評価するような実験しかできなかった。ここにブレイクスルーをもたらすには網羅的に IRE1 の基質 RNA を探索し、XBP1 以外の基質 RNA を同定して、その切断サイトの決定と切断サイトの特徴比較が重要だと考えた。実際に本研究で行われた IRE1 の網羅的な基質探索の方法は以下の通りで、知恵をしぼり、こだわりをもって考案したので、少し詳しく説明したい(下図参照)。ヒト培養細胞に由来するトータル RNA を精製した IRE1 α と試

験管内で反応させた後、オリゴ dT プライマーと逆転写酵素を用いて、cDNA を合成し、鋳型となった mRNA は RNaseH で分解処理する。この段階で殆どの mRNA は消化されてしまうが、あらかじめ IRE1α によって切断された mRNA の 5' 側断片は逆転写反応の鋳型とならず、RNA/DNA ハイブリッドを形成しないため、RNaseH による分解を受けない。始めの IRE1 との反応を行わなかったものをコントロールに RNaseH 処理後の RNA をマイクロ(エクソン)アレイ解析のプロープに用いれば、IRE1α の特異的基質を網羅的に探索できる。今回、この方法により、新たに IRE1 の基質 mRNA を 13 種類同定することができ、そのうちの 8 種類について切断サイトの決定と切断サイト付近の二次構造比較を行うと、これらは共通したコンセンサス配列 (CUGCAG) および構造 (ステムループ構造) を有し、これらの特徴がおそらく IRE1 の基質認識に重要であることを突き止めた。また奈良先端科学技術大学院大学との共同研究で XBP1 mRNA には小胞体膜上へ局在し、効率良く IRE1 に認識される仕組みが備わっていることも明らかにした。



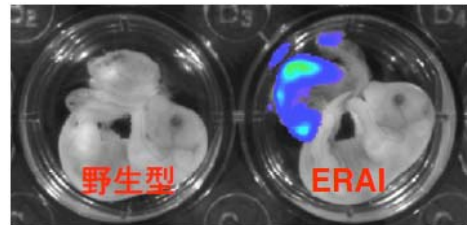
生体レベルでの小胞体ストレスの可視化と IRE1α 条件的破壊マウスの表現型解析

小胞体ストレスの研究は 1990 年代初めに酵母菌を材料にスタートしたことから細胞レベルでの解析が長い間盛んに進められてきた。しかし 1990 年代の終わり頃に大阪大学の遠山博士らのグループが家族性アルツハイマー病と小胞体ストレスの関連性を発表した。これを皮切りに、現在まで、いくつかの神経変性疾患や脳虚血、躁鬱病、ウイルス感染、ガン、糖尿病、動脈硬化、炎症、リウマチなど様々な疾患と小胞体ストレスとの



関連性が世界中で調査・報告されてようになった。一方、私自身も哺乳動物個体レベルでの小胞体ストレス研究の重要性を考え、世界に先駆けて小胞体ストレスをマウス生体でイメージングできる技術を開発してきた。この技術の詳細は次の通り(上図参照)で、小胞体ストレス特異的イントロンを含む部分的 XBP1 cDNA を終止コドンを含み GFP(緑色蛍光タンパク質) やルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子 cDNA と連結する。この人工的遺伝子を発現する細胞が小胞体ストレスに曝されていない場合、スプライシングは起きないため XBP1 タンパク質の部分断片だけが生じるので、蛍光を発することはない。一方、小胞体ストレスに曝された場合、26 塩基からなるイントロンがスプライシングされる。結果としてフレームシフトが生じ、部分的 XBP1 とレポーターとの融合タンパク質が産生され、細胞はレポーター由来の光を発するようになる。このさきがけ研究期間には、さらに小胞体ストレス可視化技術に改良を行い、これまでに明らかとなっていた臓器での生理的小胞体ストレスに加え、他の組織での小胞体

ストレスも検出できるようにした。特に重要なのは胎盤での小胞体ストレス(狭義的にはIRE1alpha 活性)の発見である(下図参照; ERAI は小胞体ストレス可視化モデルマウス)。IRE1alpha ノックアウトマウスは胎生致死となることが知られていたが、その原因は解らないままであった。そこで胎盤に着目した IRE1alpha ノックアウトマウスの解析を行ったところ、胎盤迷路部(胎児・母体間でガス、栄養および老廃物交換を行う血管が高度に発達した部位)の発達不全と血管内皮成長因子(VEGF)の発現レベルの低下が明らかとなった。また、もしかすると胎盤での IRE1alpha の機能がマウス胎児の生死を左右するかも知れないと考え、胎児での IRE1alpha 機能は欠損するが、胎盤での IRE1alpha 機能は残る IRE1alpha 条件的破壊マウスを作製したところ、このマウスは胎生致死を逃れメンデルの法則に従って生まれてきたのである。胎盤でなぜ小胞体ストレスが生じているのか?(IRE1alpha が活性化状態にあるのか?)、未だに、その答えは得られていないが、生体イメージングからノックアウトマウスの解析まで非常に丁寧に研究を進めてきたことで、小胞体ストレス応答分子のマウス個体レベルでの機能解明に近づいたと自負している。また IRE1alpha ノックアウトマウスの胎盤で発現レベルが低下していたのは VEGF だけではなく、CEA ファミリー遺伝子群も IRE1alpha および XBP1 ノックアウトマウスの胎盤で発現レベルが低下していた。胎盤で発現する CEA ファミリー遺伝子群にコードされるタンパク質は胎盤から分泌され、母親の体内で免疫系のクラススイッチを引き起こし、胎児が異物として排除されないようにする働きが知られている。これはこれまで想像もしていなかったような小胞体ストレス応答分子の機能である。



先に、胎盤での IRE1alpha 機能を残せば、胎児の IRE1alpha 機能を欠損させてもマウスは胎生致死にならないことを述べた。しかし、これらマウスも全くの正常という訳ではなく、通常飼育下でも低体重および高血糖の傾向を示した。糖負荷などを施した場合にも、これらマウスはコントロールに比べ高血糖で低インスリン血漿傾向にあった。逆にインスリンを投与した場合はコントロールと同様に血糖値の低下が見られたので、IRE1alpha はインスリン抵抗性というよりも何らかのかたちでインスリン生合成に関わっていると考えられる。今後、この部分を重点的に調査していきたい。

3. 今後の展開

動物個体レベルでの小胞体ストレス研究はまだ始まったばかりで、多くの問題が残されているし、自らの調査で新たに浮かび上がった疑問もある。そこで今後の研究展開として、以下の四つの課題への取り組みを考えている(1; 新たなストレスイメージング技術の開発・改良と応用、2; 個体発生・器官発生・器官機能維持における小胞体ストレス応答分子の機能解明、3; 小胞体ストレス応答における分子メカニズムの徹底解明、4; 小胞体タンパク質の品質管理に関わる分子の機能解析)。これら課題への取り組みを通じて、小胞体ストレスと他のストレスや疾患等との関連性を調べ、生物の環境対応システムの包括的な理解を進めたい。また、小胞体ストレス応答は主に小胞体タンパク質の品質管理機構の 1 つとして見られているが、生物個体レベルにおいて別の機能を持つことも明らかにし、新たな研究分野を開拓したい。もちろん、小胞体ストレス応答の分子メカニズムについて未解明の問題にも新たな研究手法を独自に開発しながら挑戦したい。

4. 自己評価

本さがけ研究において当初掲げていた目標は①XBP1 スプライシング機構の解明、②新規標的分子のスクリーニング、および③動物個体レベルでの機能解析、という 3 つの観点から IRE1 による小胞体タンパク質の代謝制御機構に取り組むことであった。前述した研究成果の通り、この 3 つの課題には十分取り組めたと思う。また、本研究の成果は予想以上の影響があり、国内外問わず多くの方から共同研究の申入れがあった事は大変嬉しく思う。一方で

細かい部分になるが、本研究では哺乳動物の RNA リガーゼの発見を狙っていたのに、それが期間内に出来なかった事は非常に残念である。

5. 研究総括の見解

小胞体ストレスに関与する小胞体分子シャペロンの発現誘導 (UPR: Unfolded Protein Response) の主要因子の一つである IRE1 α は、これに結合する BiP が変性蛋白質に奪われ、遊離した IRE1 α が2量体化し、リン酸化されることで活性化されることを証明した。また、IRE1 α の新規基質の網羅的探索法を開発し、13 種を同定し、8種の IRE1 α 結合部位を特定し、共通の特徴を見出した。更に、IRE1 α ノックアウトの致死性は胎盤における小胞体ストレスが原因であることも明らかにした。これらの成果は、当初計画を達成しており、小胞体ストレスのメカニズム解明に大きな進展をもたらしたものとして評価できる。今後は、疾患治療薬や化粧品開発への応用も期待したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kota Yanagitani, Yusuke Imagawa, Takao Iwawaki , Akira Hosoda, Michiko Saito, Yukio Kimata, and Kenji Kohno. "Cotranslational Targeting of XBP1 Protein to the Membrane Promotes Cytoplasmic Splicing of Its Own mRNA." Mol. Cell , vol. 34, 191-200, 2009.
2. Daisuke Oikawa, Yukio Kimata, Kenji Kohno, and Takao Iwawaki "Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins." Exp. Cell Res. , vol. 315, 2496-2504, 2009.
3. Takao Iwawaki , Ryoko Akai, Shinya Yamanaka, and Kenji Kohno "Function of IRE1alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability." Proc. Natl. Acad. Sci. USA , vol. 106, 16657-16662, 2009.
4. Daisuke Oikawa, Ryoko Akai, and Takao Iwawaki "Positive contribution of the IRE1alpha-XBP1 pathway to placental expression of CEA family genes." FEBS Lett. , vol. 584, 1066-1070, 2010.
5. Daisuke Oikawa, Mio Tokuda, Akira Hosoda, and Takao Iwawaki "Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1alpha." Nucleic Acid Res. , vol. 38, 6265-6273, 2010.
6. Takao Iwawaki , Ryoko Akai, and Kenji Kohno "IRE1alpha Disruption Causes Histological Abnormality of Exocrine Tissues, Increase of Blood Glucose Level, and Decrease of Serum Immunoglobulin Level." PLoS ONE , vol. 5, e13052 (1-11), 2010.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

(3) その他(主要な招待講演(学会発表)、受賞、著作物等)

学会発表

1. 岩脇隆夫 「小胞体ストレスの可視化システムから見えるもの」NAISTシンポジウム・見る生物学 2「イメージングの現在と未来」(2007年11月; 奈良先端大)
2. 岩脇隆夫 「小胞体ストレスの可視化システムから見えるもの」住商ファーマインターナショナル株式会社第3回IVISユーザー会議(2008年11月; 東京国際フォーラム)
3. 岩脇隆夫 「胎盤形成における小胞体ストレスセンサーとビタミンEの役割」エーザイ株式会社第12回Vitamin E Update Forum(2009年8月; 如水会館、東京)
4. 岩脇隆夫 、細田章、赤井良子、徳田美緒「血糖値調節およびインスリン合成における小胞体ストレス応答の役割」第5回臨床ストレス応答学会(2010年11月; 徳島大)