

酵母と動物細胞における小胞体ストレス応答活性化機構

河野 憲二

(奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)

研究の目的

真核細胞は、小胞体に構造異常蛋白質を生ずるようなストレスを受けると小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response: UPR と呼ばれるが、ここではわかりやすくするために小胞体ストレス応答と表記する) を起こしストレス状態を解消することが知られている¹⁾。この細胞内シグナル伝達には、進化的に保存されている小胞体膜上の I 型膜貫通蛋白質 Ire1 が重要な機能を担っている^{1,2)}。Ire1 はサイトゾル側にキナーゼ・リボヌクレアーゼ活性領域をもつユニークな I 型膜蛋白質である (図 1)²⁾。Ire1 の小胞体内腔領域は N 末側から I-V と名付けた 5 領域に分けられ、CSSR (Core stress-sensing region: ストレス感知コア領域) は異常蛋白質の感知に必須の役割を果たしている (図 1)³⁾。我々は CSSR と変性蛋白質が試験管内で相互作用することを報告したが⁴⁾、生細胞内で実際に Ire1 が異常蛋白質と相互作用できるかどうかはまだ明らかとなっていない。本研究はこの疑問に答えるために、酵母に構造異常蛋白質のモデルとなる CPY* (R255G のミスセンス変異をもつカルボキシペプチダーゼ Y で、実際に構造異常により小胞体に蓄積し、ER 関連分解により分解されていることがわかっている) を過剰発現させ Ire1 との相互作用を調べた。

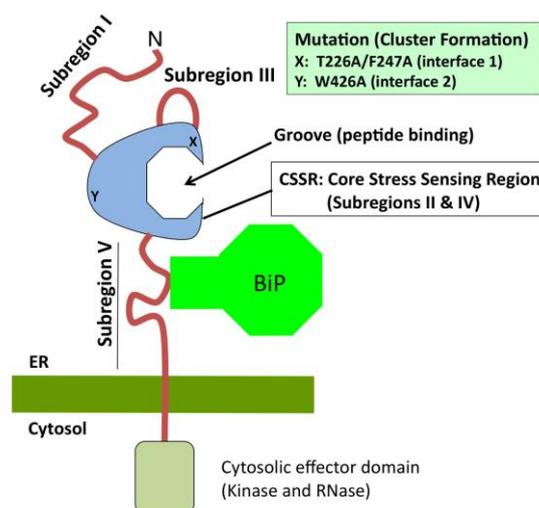


図 1. 出芽酵母 Ire1 の小胞体内腔領域の構造. 小胞体内腔領域は次の 5 つの領域に分けることができる。領域 I (Subregion I: N 末からのアミノ酸残基数 32–111)、III (Subregion III: 243–272)、V (Subregion V: 455–524) は蛋白質の折畳みがゆるい領域。一方領域 II (Subregions II: 112–242)、IV (Subregion IV: 273–454) はしっかりと折畳まれた領域でストレス感知コア領域 (CSSR)^{3,6)} である。CSSR が作用面 I で 2 量体を形成すると、ほどけたペプチドが結合できる窪み (groove) を形成する⁶⁾。作用面 I の変異体 (X: T226A/F247A) ともう 1 つの作用面 II の変異体 (Y: W426A) はそれぞれ、窪みの形成阻害とクラスター形成阻害を起こし、Ire1 の最大活性化を抑える変異である^{3,6)}。

方法

酵母 IRE1 遺伝子及び C 末側に HA タグをもつものをそれぞれ、単コピー用または多コピー用プラスミドに導入した pRS313-IRE1, pRS313-IRE1-HA, pRS315-IRE1-HA, pRS423-IRE1-HA を作製した。IRE1 遺伝子への変異導入は overlap PCR 法と in vivo 相同組換え法を用いて行った^{3,4)}。

結果

野生型 CPY-GFP と変異型 CPY*-GFP を酵母に過剰発現させ、小胞体ストレス誘導活性を β ガラクトシダーゼ・レポーターアッセイにより測定したところ、図 2 A に示すように、野生型 CPY よりも CPY* の発現により、より強い誘導が起こることが観察された。Ire1 の活性化により標的分子の *HAC1* mRNA が細胞質スプライシングを受け *HAC1*ⁱ mRNA に変わるので、スプライシングの程度を RT-PCR 法により測定したところ、レポーターアッセイを再現する結果を得た (データ省略)⁵⁾。次に CPY-GFP と CPY*-GFP を過剰発現させたのち、クロスリンカー DSP を加え、抗 GFP 抗体を用いて共免疫沈降実験 (IP) を行うと、野生型 CPY は高分子量の小胞体型と低分子量の液胞型の 2 種が沈降してくるのに比べ、CPY* では (予想通り) 小胞体型しか合成されていなかった。さらに CPY* では Ire1 がより強く共沈降されてくることがわかった (図 2 B)。次に、抗 HA 抗体により Ire1 を IP し、Ire1 に CPY* が結合してくるかどうかの逆免疫沈降実験を行った。この実験では CPY*-GFP を恒常的に過剰発現する ire 欠失型酵母は生育しないため、誘導型のプロモーター Gal1 により CPY-GFP または CPY*-GFP を発現させることにした。野生型 CPY を発現させ抗 HA 抗体により Ire1 蛋白質を IP すると、液胞型では

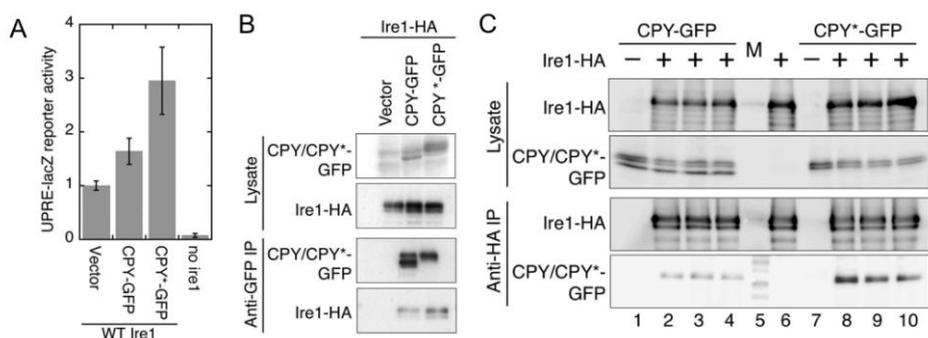


図 2. Ire1 と CPY*-GFP との相互作用。

- (A) ire1 欠失株(KMY1015)に野生型 Ire-HA を発現させた株 (WT Ire1)を作製、これにレポータープラスミド(UPRE-lacZ reporter plasmid pCZY1)と CPY-GFP または CPY*-GFP を過剰発現させ小胞体ストレス誘導活性を測定した。 β ガラクトシダーゼ活性は空ベクターを 1 とし補正して表しており、 $p < 0.05$ であった。
- (B) 多コピープラスミド(pRS426-IRE1-HA)で Ire1 を発現している株に CPY-GFP または CPY*-GFP を恒常的に過剰発現させ DSP によりクロスリンクさせた細胞抽出液を用いて、抗 GFP 抗体により免疫沈降実験を行った。共沈降された Ire1 は抗 HA 抗体により検出した。
- (C) CPY-GFP あるいは CPY*-GFP を GAL1 誘導型プロモーターを用いて誘導発現した以外は実験条件は B と同様。抗 HA 抗体により Ire1 を免疫沈降したのち電気泳動し、抗 HA 抗体と抗 GFP 抗体を用いて Ire1 と CPY を検出した。lanes 2-4, 8-10 はそれぞれ独立した別個の株を用いている。lane 6 は CPY のかわりに空ベクターを発現させた株、lane 5 は分子量マーカーである。

なく小胞体型の CPY のみ共沈降されてくる (図 2C, lanes 2-4) ことは、この実験がうまく動いていることを示している。一方、CPY*-GFP の場合には、小胞体型のバンドが野生型 CPY の場合よりもより強く共沈降されてくることがわかった (図 2C, lanes 8-10)。

結論

上記の結果は、Ire1 ストレスセンサー蛋白質は生きた細胞内でも、構造異常蛋白質を認識し相互作用をしていることを明らかにした。ここでは示さないが、論文 5 ではさらに種々の変異型 Ire1 を用いて Ire1 と異常蛋白質が相互作用していることを明らかにした。

文献

- 1) Walter, P., and Ron, D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**: 1081-1086.
- 2) Kimata, Y., and Kohno, K. (2011) Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**: 135-142.
- 3) Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., and Kohno, K. (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J. Cell Biol.* **167**: 445-456.
- 4) Kimata, Y., *et al.* (2007) Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *J. Cell Biol.* **179**: 75-86.
- 5) Promlek, T., Ishiwata-Kimata, Y., Shido, M., Sakuramoto, M., Kohno, K. and Kimata, Y. (2011) Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. *Mol. Biol. Cell* **22**: 3520-3532.
- 6) Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M., and Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 18773-18784.