

所属 (主指導教員)	動物細胞工学講座 (河野憲二 教授)		
氏名	及川大輔	提出	平成 18 年 12 月 25 日
題目	出芽酵母における小胞体ストレス感知機構の解析 ー多段階制御により保証される小胞体ストレス応答の確実性ー		
<p>酵母からヒトに至るまで、すべての真核生物は細胞内に様々な細胞小器官をもっている。小胞体もそのひとつで、分泌タンパク質や膜タンパク質の合成や修飾・輸送など、重要な役割を担っている。またその一方で、製品であるタンパク質に異常がないか監視する（異常があれば排除する）、品質管理の役割を持つことも知られている。これら小胞体の機能は、細胞周囲の環境変化、例えば栄養素であるグルコース飢餓や強度に還元的な状況、あるいは抗体の産生といった一過的なタンパク質の大量発現などにより損なわれる。その結果、小胞体内に異常な構造を持つタンパク質が蓄積し、細胞全体に障害を与える。このような状態を小胞体ストレスと呼び、その回避、あるいは回復のため、細胞は小胞体ストレス応答と呼ばれる細胞内情報伝達経路を経て、さまざまな遺伝子の発現を誘導する。小胞体ストレス応答の情報伝達については、出芽酵母をモデルとした研究が最も進んでいる。出芽酵母において、この情報伝達経路の起点として知られているのは、Ire1 という小胞体局在 I 型膜貫通タンパク質だけである。小胞体ストレスに応じて Ire1 サイトゾル側末端の RNase ドメインが機能し、スプライシングを介して <i>HAC1</i> mRNA を成熟させる。成熟型 mRNA の翻訳産物は転写因子として機能し、小胞体分子シャペロンを含む多くの遺伝子の転写を誘導する。</p> <p>本研究の目標は、小胞体ストレスに応じて Ire1 が活性化する機構を解明することである。従来の知見として、第一に、Ire1 は活性化するときにホモ会合することが知られている。第二に、小胞体分子シャペロン BiP が Ire1 の活性制御に関与することが指摘されている。BiP は非ストレス時には Ire1 に結合しており、小胞体ストレスに応じて解離する。BiP の過剰発現や、Ire1 から解離できない変異型 BiP を発現する出芽酵母株では、Ire1 の活性化が抑えられる。このことは、BiP の結合が Ire1 の活性化を負に制御していることを強く示唆し、小胞体ストレスに応じた BiP の解離が、そのまま Ire1 のホモ会合と活性化につながると考えられるようになった。本研究では、出芽酵母を材料として、Ire1 小胞体内腔ドメインの構造と機能に関して、Ire1 遺伝子変異体の <i>in vivo</i> 表現型解析と、組換えタンパク質を用いた <i>in vitro</i> 解析の両方により、ストレスに応じた Ire1 の活性制御機構の解明を進めた。その結果、上述の BiP 中心のモデルとは違った Ire1 活性制御機構モデルが強く支持されることとなったので、それを報告する。</p> <p>まず、Ire1 小胞体内腔ドメインの 10 アミノ酸残基欠失スキニングを行い、その結果、N 末から膜貫通領域直前までを 5 つのサブ領域に分け、それらをサブ領域 I から V と命名</p>			

した。サブ領域 II、および VI は、10 アミノ酸残基欠失により Ire1 が失活する領域である。また、Ire1 小胞体内腔ドメイン全長から成る組換えタンパク質の限定的プロテアーゼ消化においてサブ領域 I および V が容易に分解されることから、この領域が強固に折り畳まれていることが明らかとなった。逆に、サブ領域 II から IV は、サブ領域 III を挟んでいるものの、強固に折り畳まれていると考えられ、この領域を Core と名付けた。Core は Ire1 のホモ会合を担っている。すなわち、Core 中のいくつかの 10 アミノ酸欠失により、Ire1 は活性を失うとともに、*in vivo* でのホモ会合能を失った。また、Core から成る組換えタンパク質は *in vitro* でダイマーとして存在するが、*in vivo* でホモ会合能を失わせる変異は、このダイマー構造をも破壊した。

BiP と結合するのがサブ領域 V であることは、サブ領域 V 欠失変異体 Ire1 が全く BiP と結合しないことなどから明らかである。興味深いことに、サブ領域 V 欠失変異体 Ire1 も恒常的活性型ではなく、小胞体ストレスに応じてホモ会合して活性化した。このことは、Ire1 のホモ会合および活性化には、BiP の解離以外の事象が必要であることを示唆している。

次いで、サブ領域 V に加えてサブ領域 I の大半を欠き、小胞体内腔がほぼ Core のみの Ire1 変異体を、Core 変異体と名付けて、さらなる解析に供した。Core 変異体は BiP と結合せず、恒常的にホモ会合していた。このことは、サブ領域 V (おそらく BiP の結合) とともに、サブ領域 I が Ire1 のホモ会合を抑えていることを示す。予想外のことに、Core 変異体 Ire1 は非ストレス条件下でも弱くは活性化していたものの、完全に活性するためにはストレスを与える必要があった。また、Core の N 末近傍(サブ領域 I と II の境界)の点変異 (S96P) によって、Core 変異体 Ire1 は恒常的に活性化した。よって、BiP の解離のみならずホモ会合も、Ire1 の活性化には十分ではないと考えられ、これらとは別の活性制御機構 (S96P によりバイパスされる) が存在しているはずである。Core 変異体 Ire1 はエタノールなど小胞体ストレス以外の要因でも活性化し、「別な活性制御機構」は、それ単独では「精度」が低いと考えられる。

このように、多段階に渡る複数の精巧な仕組みによって小胞体ストレス応答の確実性が保持されていると考えられ、本研究はストレス応答という基本的な生命現象をひもとく上で、大きな手がかりになると期待される。

出芽酵母における小胞体ストレス感知機構の解析
～多段階制御により保証される小胞体ストレス応答の確実性～

及川大輔

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

2007年1月29日 提出

< 目次 >

目次	2
序論	3-4
材料と方法	5-10
結果	11-20
考察	21-24
参考文献	25-29
図表	30-53
謝辞	54
Supplemental figure	55

序論

小胞体は膜タンパク質や分泌タンパク質の合成や修飾、折り畳みや複合体形成などを行う重要な細胞小器官である。小胞体ストレスとは、小胞体におけるタンパク質の高次構造形成が不全をきたし、構造異常タンパク質が小胞体内に蓄積する状態だとされている。酵母から高等動植物に至る全ての真核生物細胞は、この危機的状況を回避するために、小胞体ストレス応答、あるいは **Unfolded protein response (UPR)** と呼ばれる防御反応を示す。

小胞体ストレス応答のシグナル伝達経路は、出芽酵母において最も理解が進んでいる (Cox et al 1993; Mori et al 1993)。この応答機構の起点は小胞体局在 I 型膜タンパク質 **Ire1** であり、ストレスに伴って活性化し下流へとシグナルを伝達する (**Fig1**)。Ire1 はその細胞質領域に、タンパク質キナーゼ活性と RNase 活性を有する。小胞体ストレスに応じて Ire1 は自己リン酸化し、それに伴ってタンパク質構造が変化し、隣接する RNase 領域が活性を持つようになる (Papa et al 2003)。RNase 活性を持った Ire1 は、転写因子 **Hac1** をコードする pre-mRNA の切断を行う。切断された pre-mRNA は再び連結され、タンパク質としての読み枠 (reading-frame) がシフトした、成熟型の mRNA が形成される (Cox and Walter 1996; Sidrauski and Walter 1997)。そこから転写因子 **Hac1p** が産生され、小胞体分子シャペロンである **BiP** (Mori et al 1992; Kohno et al 1993; Mori et al 1996) の他、様々な回復系の遺伝子群が誘導される (Kimata et al 2006)。

出芽酵母とは異なり、哺乳動物では複数の小胞体ストレスセンサーが見いだされている。出芽酵母において 1 つだった Ire1 は、哺乳動物においては 2 種のパラログが存在する。Ire1 α (Tirasophon et al 1998; Wang et al 1998) は小胞体ストレスに応じて活性化し、出芽酵母の場合と同じように転写因子 **XBP1** の pre-mRNA の切断を行うことで、下流の遺伝子群の発現を誘導する (Yoshida et al 2001; Calton et al 2002)。一方の Ire1 β は、消化器官特異的に発現し、ストレス時に ribosomal RNA の切断を行い、タンパク質の合成を抑制する (Iwawaki et al 2001)。PERK は、Ire1 とよく似た構造をしているが RNase 活性をもたず、キナーゼ活性のみを有する。PERK は小胞体ストレスに応じて翻訳因子 **eIF2 α** をリン酸化し、それにより、細胞全体のタンパク質合成が一時的に低下する (Harding et al 1999)。Ire1 β や PERK によるタンパク質合成の抑制は、小胞体への負荷を軽減させる役割があると考えられている。ATF6 は、Ire1 や PERK と構造上の相同性が全く認められない小胞体ストレスセンサーであり、Ire1 α とともに小胞体ストレスに応じた遺伝子の発現誘導を担う

(Yoshida et al 2003)。

小胞体ストレスに応じた Ire1 の活性化のため、センサー領域とも言える小胞体内腔領域では、どのような事象が起きるのだろうか。まず第一に、Ire1 には小胞体内在性分子シャペロン BiP が結合しており、小胞体ストレスに応じて解離する(Bertolotti et al 2000; Okamura et al 2000)(Fig1)。BiP の過剰発現や、Ire1 から解離できない変異 BiP を発現する出芽酵母株では Ire1 の活性化が阻害されることから、BiP の結合が Ire1 の活性化を抑えているのは確かなようである(Kohno et al 1993; Kimata et al 2003)。

第2に、2量体化である(Fig1)。小胞体ストレスに応じて Ire1 はホモ会合するが、少なくとも哺乳動物 Ire1 α においては、小胞体ストレスを与えられた細胞の Lysate から検出されるのは、Multimer ではなく Dimer であると報告されている (Bertolotti et al 2000)。Ire1 の活性化にとって、2量体化が重要であるのは明白である。Ire1 細胞質領域と、2量体化能を持つペプチドとのキメラタンパク質は、常に RNase 活性を有しているし(Liu et al 2000)、小胞体ストレスに応じて起きる Ire1 サイトゾルドメインの自己リン酸化は、ホモ会合した Ire1 分子間で起こるトランスなものである(Shamu et al 1996)。

このような背景から、これまで、Ire1 の小胞体ストレスに応じた活性化は、BiP の解離に伴うホモ会合、つまり Ire1 の2量体形成段階で制御されると考えられてきた。通常は BiP が Ire1 に結合することでその2量体化を抑制しているが、ストレス時、小胞体内に異常タンパク質が蓄積すると、BiP はそれら異常タンパク質の折りたたみを補助するために Ire1 から解離する。その結果、フリーになった Ire1 が小胞体膜上で2量体を形成する。という、BiP を中心としたモデルである(Fig1)。

本研究では、このようなモデルについて、従来から行われていた BiP を用いた解析からではなく、Ire1 自身の解析からアプローチしようと考えた。まず、Ire1 小胞体内腔領域の機能ドメインの探索を行い、その結果を受けて、種々の部分欠失変異体やアミノ酸置換変異体を作成し、*in vivo* 解析を進めた。また、当該領域部分の組み換えタンパク質を用いて、*in vitro* 解析も進めた。その結果、上述したモデルとは異なり、Ire1 のストレスに応じた活性化は、実際には複数の段階で、BiP 以外の要因によっても制御されていることが強く示唆された。また、このような多段階による制御機構によって、Ire1 の小胞体ストレス特異的な応答性が保持されていると考えられた。

材料と方法

出芽酵母実験

出芽酵母株

IRE1 遺伝子欠失出芽酵母菌株として以下を使用した。

- ・ KMY1015(MAT α ,ura3,trp1,leu2,his3,lys2,ire1::TRP1)
- ・ KMY1516(MAT α ura3-52 his3- Δ 200 trp1- Δ 901 LYS2::(UPRE)5-CYC1 core promoter-lacZ::lys2-801 LEU2::UPRE-CYC1 core promoter-GFP::leu2-3,112 Δ ire1::TRP1)

これらは、小胞体ストレスに対して同じ表現型を示しており、栄養要求性に応じて使い分けた。また、plasmid の導入やプレート培養、液体培養などの出芽酵母の基本的操作は、成書(Kaiser 1994)に従った。

Plasmid

pRS315-Ire1-HA は、LEU2 選択マーカータを持つ centromeric plasmid であり、Native promoter から、C 末に 3×HA を付加した yeast Ire1 を発現するベクターである (Kimata et al 2004)。各欠失変異やアミノ酸置換変異は、overlap PCR により導入、あるいは組み合わせた(Oikawa et al 2005)。変異箇所は以下の通り。

欠失変異

Δ I: T25-R84 の欠失。 Δ V: T456-N516 の欠失。 Core: : T25-R84 と T456-N516 の欠失。 Δ 468: L468-T477 の欠失。 Δ 145: Q145-S154 の欠失。 Δ 226:M226-E235 の欠失。 Δ 327: L327-I336 の欠失。

アミノ酸置換変異

CS =C256S,C267S,C318S。 NQ=N104Q,N206Q,N291Q,N390Q。

1 アミノ酸置換の codon usage

S96P: TCT→CCA。 E160D: GAA→GAT。 Q265R:CAG→AGA。 F370S:TTT→TCT。 H439N:CAT→AAT。 K702A:AAG→GCA。 S96A:TCT→GCT。 S96W:TCT→UGG。 S96T:TCT→ACT。 S96R:TCT→:AGA。 S96D:TCT→GAC。

pRS315-Ire1 Δ C-HA は、pRS315-Ire1-HA の Ire1 を overlap PCR により部分的に欠失させ作成した、yeast Ire1 の M1-K585 部分を C 末に 3×HA を付加し発現するベクターである(Oikawa et al 2005)。部分欠失変異は overlap PCR により導入した。

pRS313-Ire1-HA は、HIS3 選択マーカータを持つ centromeric plasmid であ

り、Native promoter から、C 末に 3×HA を付加した yeast Ire1 を発現するベクターである (Kimata et al 2004)。pRS315-Ire1-HA から BamHI-NotI で切り出した IRE1 fragment を、同じ制限酵素サイトで pRS313 に組み込むことにより作成した。他の変異体に付いても同様に作成した。

pRS423-Ire1-HA は、*HIS3* 選択マーカータを持つ 2- μ m plasmid であり、Native promoter から C 末に 3×HA を付加した yeast Ire1 を発現するベクターである (Kimata et al 2004)。pRS315-Ire1-HA から BamHI-NotI で切り出した IRE1 fragment を、同じ制限酵素サイトで pRS423 に組み込むことにより作成した。他の変異体に付いても同様に作成した。

pRS426-Ire1-Flag は、*URA3* 選択マーカータを持つ 2- μ m plasmid であり、Native promoter から C 末に 3×Flag を付加した yeast Ire1 を発現するベクターである (Oikawa et al 2005)。pRS315-Ire1-HA の HA タグ部分を overlap PCR により 3×Flag に置換し、そこから BamHI-NotI で切り出した IRE1 fragment を、同じ制限酵素サイトで pRS426 に組み込むことにより作成した。他の変異体に付いては、pRS315-Ire1-HA から BamHI-SphI で切り出した IRE1 fragment を、同じ制限酵素サイトで pRS426-Ire1-Flag に導入し作成した。

pCZY1 は、*URA3* 選択マーカータを持つ 2- μ m plasmid であり、UPRE(unfolded protein response element)-CYC1 core promoter-lacZ の融合遺伝子を持つ。UPRE-LacZ レポータープラスミドとして使用した。

β -galactosidase assay

OD600=1 の菌体が 1 分間に 1nmol の基質 o-Nitrophenyl- β -D-galactoside を分解する場合を、1unit と定義した。各菌株の over night culture 100 μ l を SD+His,Lys 1ml に植え継ぎ、30°C で 1 時間培養後、Tunicamycin(2 μ g/ml)、DTT (3mM)、エタノール(8%)、あるいは高温下 (39°C) で 4 時間培養後、 β -galactosidase assay を行った。assay は過去の文献(Mori et al 1992) に従った。

出芽酵母 Non-denaturing lysate の調製

各プラスミドを保持した酵母菌株を SD 培地 40ml で、濁度が A600=0.4~0.5 まで 30°C で培養した。ストレス処理として、集菌一時間前に Tunicamycin を 2 μ g/ml 加えた。細胞を 3000rpm、5 分間の遠心により回収し、PBS で洗浄後、200ul の Lysis buffer(50mM Tris-HCl pH8.0、5mM EDTA、1% TritonX-100) に懸濁した。これに 4 種のプロテアーゼインヒビター(100mM PMSF、20mg/ml Aprotinin、20mg/ml Pepstatin、20mg/ml Leupeptin) 及び 200ul のガラスビ

ーズを加え、bead beater(Biospec 社)にて 4200rpm、10 秒で 5 回攪拌することにより細胞を破碎した。これを 10000rpm、10 分、4°C 遠心し、得られた上清を non-denaturing lysate とした。

Western blotting

1 次抗体として、anti-LHS1 抗体(Stirling CJ.博士より分与)、mouse anti-HA mAb 12CA5 (Roche Diagnostics 社)、rabbit anti-yeast BiP antiserum (Takeuchi et al 2006)、anti-Flag mAb M2 (Sigma-Aldrich 社)を用いた。また、2 次抗体として、anti-mouse または anti-rabbit の horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies(DAKO 社)を用いた。ECL system (Amersham Biosciences 社)を用い、そのシグナルを CCD camera system LAS-1000plus、または X-ray film (Fuji)により検出した。得られたシグナル強度を定量するために、Image-J ソフトウェア(<http://rbs.info.nih.gov/nih-image/>)を用いた。

Ire1-HA (Ire1 Δ C-HA) による共免疫沈降

pRS315-Ire1-HA または pRS315-Ire1 Δ C-HA を持つ酵母から得られた Non-denaturing lysate 180ul に、IP buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.0、5 mM EDTA、150 mM NaCl、1% Triton X-100、6%スキムミルク)を 800ul 加えた。これに、IP buffer で平衡化した protein A-Sepharose 4 FF (Amersham Biosciences 社) 50%スラリーを 30ul 加え、4°C で 30 分 rotate した。ビーズとそれに吸着した不純物を遠心により取り除き、得られた上清に anti-HA 抗体を 1ul 加え 4°C で 1 時間 rotate した。その後、平衡化した上述のビーズを 30ul 加え、さらに 4°C で 1 時間 rotate した。そのビーズを、スキムミルクを含まない IP buffer で 5 回洗浄し、2×SDS sample buffer を 30ul 加え、98°C 5 分間熱処理を行った。得られたサンプルを用いて、上述した抗体により Western 解析を行った。

グリセロールグラジエント

pRS315-Ire1-HA を持つ菌株から得られた Nondenaturing lysates 又は high-molecular-weight markers (Pharmacia 社) 400ul を、11ml の 5-25%のグリセロールグラジエント (50 mM Tris-Cl pH 8.0、5 mM EDTA、150 mM NaCl、1% Triton X-100 にグリセロールを各濃度で加えた)に load し、200,000 x g、4°C、12 時間遠心した。得られたグラジエントを 500ul×23 fraction とし、て回収した。その後、各 fraction を anti-HA 抗体を用いて免疫沈降し(上述の

プロトコール)、Western 解析を行った。

Northen Blotting

HAC1 遺伝子の-11~654 に相当する fragment を、酵母ゲノムを template にした PCR により調製し、ノーザン解析用のプローブとした。プローブは Random primer DNA labeling kit ver2(Takara 社)を用いて [α - 32 P]dCTP で標識した。

ホットフェノール法により酵母菌体から Total RNA を抽出し(Collart and Oliviero, 1993)、3 μ g の Total RNA を 1%アガロース、1.8%ホルムアルデヒドの変性ゲルで泳動した。ナイロン膜(Hybond-N; Amersham Biosciences 社)に blot した後に、チャーチリン酸 buffer を用いて 32 P ラベルした probe とともに 65°C で一晩インキュベートした。Buffer で洗浄したメンブレンを、imaging screen (BAS-MS2040, Fuji)とともにカセットにはさみ、Fuji BAS2500 image analyzer によりシグナルを検出した。HAC1 mRNA の切断効率は、 $(I_t - I_u)/I_t \times 100\%$ という式により算出した。It は total HAC1 mRNA、Iu は unspliced HAC1 mRNA を示す。

組み換えタンパク質実験

酵母細胞質発現ベクターと発現条件

pYEX は、*LEU2* 選択マーカータを持つ 2- μ m plasmid であり、Cup1 promoter からタンパク質発現を誘導させることが出来る。pYEX-His は、pYEX に 8His coding 配列を導入したものである(平成 15 年度及川大輔修士論文参照)。これらに、yeast Ire1 の部分断片を挿入し、各タンパク質の発現ベクターとした。

(詳細は Table I に示す) これらのベクターを FY23 酵母株 (MATa,ura3-52,trp1 Δ 63,leu2 Δ 1,GAL2) に導入し、30°C、0.5mM CuSO₄ を添加し、1 時間培養することで組み換えタンパク質を発現させた。

大腸菌細胞質発現ベクターと発現条件

pQE-80L は大腸菌細胞質内で 8His 融合タンパク質を発現させるベクターである (QUIAGEN 社)。これらに、yeast Ire1、あるいは human Ire1 α 、Ire1 β 、PERK の部分断片を挿入し、各タンパク質の発現ベクターとした(詳細は Table I に示す)。これらのベクターを BL21(DE3)-RIL 大腸菌株(Stratagene 社)に導入し、2 \times YT 培地で 20°C、1mM IPTG を添加し、1 時間培養すること

で組み換えタンパク質を発現させた。

pMAL-c2x は大腸菌細胞質内で MBP 融合タンパク質を発現させるベクターである (Bio-lab 社)。これらに、yeast Ire1、あるいは human Ire1 α 、Ire1 β 、PERK の部分断片を挿入し、各タンパク質の発現ベクターとした (詳細は Table I に示す)。これらのベクターを BL21(DE3)-RIL 大腸菌株に導入し、2 \times YT 培地で 20 $^{\circ}$ C、0.3mM IPTG を添加し、1 時間培養することで組み換えタンパク質を発現させた。

なお、これら大腸菌で発現させた組み換えタンパク質の精製条件などについては、第 2 章で述べる。

出芽酵母で発現させた yeast Ire1 NLD タンパク質の調製

上述の発現ベクターを持つ菌体をプレートストックから起こし、SC-leu 培地で 30 $^{\circ}$ C、full-growth まで 2 晩 pre-culture した。SC-leu 培地 500ml に pre-culture を加え (OD600=0.5 にあわせる、1 種類のタンパク質について全部で約 500ml 1×5 本、250ml 1×4 本培養する)、30 $^{\circ}$ C、270rpm で OD600=1.0 まで培養した。CuSO₄ を添加し (final 0.5mM) 2 時間発現誘導をかけた後、全菌体を回収し 50ml チューブ 2 本に分けて -80 $^{\circ}$ C に保存した。

菌体の破碎から精製タンパク質の取得にいたるまでの操作は全て氷上、あるいは低温室で行った。50ml チューブ 1 本分の菌体に対して、15ml の Lysis buffer (50mM HEPES pH8.0、300mM KCl、5mM MgCl₂、10mM イミダゾール)、TritonX-100 (Final 1%)、プロテアーゼインヒビター (100mM PMSF、20mg/ml Aprotinin、20mg/ml Pepstatin、20mg/ml Leupeptin) 各 300ul を加え、氷上で菌体を溶かし、懸濁した。Lysis buffer で平衡化したガラスビーズをセットしたホモジェナイザーにサンプルを入れ、(30 秒間破碎+4.5 分間氷上静置) $\times 15$ セットの条件で細胞を破碎した。破碎した菌液を取り出し、6000rpm、4 $^{\circ}$ C、3 分遠心し、上清をさらに 30000rpm、1 時間、4 $^{\circ}$ C 遠心した後、その上清を回収。そこに、平衡化した Ni-NTA agarose(QIAGEN 社)bed 0.5ml を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩ローテートした。

一晩ローテートしたサンプルをカラムにつめ、1M KCl wash buffer (50mM HEPES pH8.0、1M KCl、5mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100) 6 ml \times 1、20mM イミダゾール wash buffer (50mM HEPES pH8.0、300mM KCl、5mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、20mM イミダゾール) 6ml \times 1、40mM イミダゾール wash buffer (50mM HEPES pH8.0、300mM KCl、5mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、40mM イミダゾール) 6ml \times 1、60mM イミダゾール wash buffer (50mM HEPES pH8.0、300mM KCl、5mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、60mM イミ

ダゾール) 3ml×1、10mM ATP wash buffer (50mM HEPES pH8.0、300mM KCl、5mM MgCl₂、10mM ATP) 1ml×5、平衡化 buffer(20mM HEPES pH8.0、100mM KCl、5mM MgCl₂、50%(v/v) glycerol) 3ml で洗浄し、溶出 buffer (50mM HEPES pH8.0、100mM KCl、5mM MgCl₂、200mM イミダゾール、50%(v/v) glycerol) 1ml×6 で溶出する。

各溶出 fraction から 5ul を泳動し、CBB 染色で検出した。該当 fraction を-30℃で保存した。

Endo protease による限定分解

精製した yeast Ire1 NLD タンパク質 3ug を 15ul の elution buffer の系で反応させた。Trypsin(Roche 社)は 37℃で 15ng または 30ng、Glu-C(Roche 社)は 25℃で 240ng、Lys-C(Roche 社)は 37℃で 120ng 反応させた。得られたサンプルを 12%SDS-PAGE で泳動し、fragment を分離した。

CBB 染色により検出した各 fragment を切り出し、ABI protein sequencer467A、492 によりペプチドシーケンスを行った (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科技官塚本純子ら)。

結果

Ire1 小胞体内腔領域の 10 アミノ酸欠失スクリーニング

Ire1 の小胞体内腔領域の解析を進める上で必要な基礎データ取得するために、この領域のアミノ酸欠失スクリーニングを行った。Ire1 の小胞体内腔領域はおよそ 530 アミノ酸からなり、N 末端のシグナル配列を除くと約 500 アミノ酸残基になる。この全領域を対象として、まずは、100 アミノ酸残基の欠失変異体 4 種を作成し、その活性をモニターしたが、いずれの変異体も全く活性を保持しておらず、機能ドメインについての情報を得ることができなかった(data not shown)。そこで次に、10 アミノ酸残基ずつ系統的に欠失させた変異体、49 種を作成し、そのストレス応答性をレポーターアッセイにより評価した(Fig2)。なお、変異体の数が多数にのぼるため、変異体作成の際には通常の plasmid 構築ではなく、*in vivo* gap-repair 法を用いた。(平成 14 年度清水佑介修士論文参照)

結果、この領域には 10 アミノ酸を欠失させても活性を失わない部分 (=Ire1 の活性には必須ではない領域) と、失活してしまう部分 (=Ire1 の活性に必須な領域) が存在することが分かった(Fig2 A)。これらを、N 末端から順に region I-V とした。10 アミノ酸残基欠失により、活性が損なわれないのが region I, III, V、失活するのが region II, IV である(Kimata et al 2004)(Fig2 B)。

出芽酵母 Ire1 小胞体内腔領域の構造評価

次に、このように必須性に応じて区分けした 5 つの region が、構造的にどのような状態にあるのか評価しようと考えた。方法としては、これら全ての region を含む組み換えタンパク質を用いて、各種プロテアーゼによる限定分解を行うことで、タイトにフォールドした部分を明らかにしようと考えた。そのために、私は Ire1 小胞体内腔領域の組み換えタンパク質の取得を目指し、大腸菌や酵母細胞質でのタンパク質の発現系の構築を行った。

Table I に示すように、出芽酵母 Ire1 の小胞体内腔領域全長タンパク質、あるいは各領域部分のみを His タグを付加した形で、酵母細胞質中で発現させる系を構築した。Ire1 の小胞体内腔領域全長を含む組み換えタンパク質は、大腸菌では可溶性タンパク質として発現させることはできず、MBP などと融合させても凝集体を形成してしまった(data not shown)。しかし、酵母細胞質で発現させることで、可溶性発現が可能になった。(8His-yIre1 NLD (N terminal liminal domain) :Table I)

なお、哺乳動物における小胞体ストレスセンサーの Ire1 α 、あるいは PERK、

ATF6 についても、同様に小胞体内腔領域全長、あるいは細胞質領域を MBP との融合タンパク質として、大腸菌内で可溶性発現させることができた(Table I)。

酵母細胞質で発現させた 8His-yIre1 NLD タンパク質は、さらに Ni カラムを用いての精製が可能であり、これを用いて当該領域部分の構造評価を試みた。

Fig3 A に示すように、精製した Ire1 タンパク質を配列特異的な各種エンドプロテアーゼで短時間処理し、その切断片を SDS-PAGE により展開した。次に、これらの切断片を切り出し、ペプチドシーケンスを行うことで、各片の N 端のアミノ酸部位を同定し、また、泳動度から予想される分子量と、各種プロテアーゼの切断配列から、各片の C 端のアミノ酸配列を予測した(Table II)。それらの結果から決定されたプロテアーゼによる切断部位を、Fig3 B にまとめた。

いずれの切断部位も、region I あるいは V に集中しており、これらの領域は限定分解において素早く消化されることから、タイトに folding していないと考えられた。逆に、タイトにフォールドしていると思われる部分 (a.a 92-451) は、上述した活性に必須な部分 (region II-IV) と見事に一致していた(Oikawa et al 2005) (Table II & Fig3 B)。

我々は、活性に必須であり、かつ構造的にも安定な region II-IV を Core stress-sensing region と名付け、その後の解析を進めた。

なお、昨年、Credle 等もこの region II-IV の組み換えタンパク質を用いた X 線結晶構造解析を行い、Core stress-sensing region がタイトに折りたたまれたひとつのモジュールを形成していることを示している(Credle et al 2005)。

Core stress-sensing region が担う Ire1 の 2 量体形成

上述したように、Core stress-sensing region はその活性への必須性、及び構造的な観点からも非常に重要であると考えられた。よって、この領域が Ire1 の活性化に必須とされる、2 量体形成を担うことが十分に考えられた。この点について検討するために、まずはこの領域を含む組み換えタンパク質を用いて、その 2 量体形成能を評価した。

Fig4 では、Ire1 の小胞体内腔領域を MBP と融合させた組み換えタンパク質を取得し、その 2 量体形成を Native-PAGE により確認した。使用した組み換えタンパク質は、Fig4A で示すように Core stress-sensing region を全て含み、N 末端に MBP を、C 末端に His タグを付加したものである。このようなタンパク質を、大腸菌発現系と Ni カラムによる 1 段階精製により取得し、Native-Page を行った。Fig4 B の右パネルで示すように、各タンパク質は

SDS-PAGE において一様に単量体としての分子量を示す。一方で、左で示す Native-PAGE では、野生型は 2 量体を形成しているのに対して、Core stress-sensing region 内に 10 アミノ酸欠失を持つ $\Delta 327$ 型では、単量体のみバンドが検出され、2 量体の形成は見られなかった。

$\Delta 327$ 変異は、[Fig5](#) で見られるように、*in vivo* における Ire1 のホモ会合も阻害した。小胞体内腔領域依存的な *in vivo* でのホモ会合を見るために、HA タグを付加した細胞質領域を欠く Ire1 と、Flag タグを付加した完全長 Ire1 を共発現させ、共免疫沈降実験を行った([Fig5 A](#))。なお、Ire1-FLAG が Pull-down される効率を上げるため、Ire1(ΔC)-HA はシングルコピー (centromeric) プラスミドから、Ire1-FLAG はマルチコピー (2 μ) プラスミドから発現させた。野生型では非ストレス時には見えなかった共沈降のシグナルが、ストレス時には強く見られるのに対して、 $\Delta 327$ 変異体では、ストレスの有無にかかわらずそのシグナルが全く見られなかった([Fig5 B](#))。

このように、Core stress-sensing region からなる組換えタンパク質は、溶液中では 2 量体として存在し、また、この 2 量体化能をなくす 10 アミノ酸欠失変異は、*in vivo* での Ire1 分子全体のホモ会合も出来なくした。よって、Ire1 の 2 量体形成は、region II-IV が形成する Core stress-sensing region が担っていると考えられた(Oikawa et al 2005)。

BiP 結合部位を欠失した変異体 Ire1 のストレス応答性

先の 10 アミノ酸欠失スキニングにおいて、作成した変異体のうちいくつかを用いて BiP との相互作用を確認したところ、region V 内に 10 アミノ酸欠失を持つ変異体において、その結合量が減弱していた(data not shown :Kimata et al 2004)。よって、BiP の結合部位が region V 内に存在すると考え、この領域の大部分を欠失した変異体、 ΔV mutant を作成し([Fig6 A](#))、その解析を行った。

まずは、共免疫沈降により、 ΔV mutant が小胞体ストレスの有無にかかわらず BiP と結合しないことを確認した。[Fig6 B](#) で、野生型 Ire1 は非ストレス時に BiP と結合しており、小胞体ストレス時にはその結合がほとんど見られなくなっていた。一方、 ΔV mutant では、ストレスの有無にかかわらず BiP との結合が全く見られなかった([Fig6 B](#))。

このように、 ΔV mutant は BiP とよる制御を受けないことから、ストレスの有無にかかわらず、常にホモ会合体を形成し活性化すると考えられた。このことを検証するために、[Fig5](#) と同じように、HA タグと Flag タグを付加した Ire1 同士の共免疫沈降を行い、 ΔV mutant のホモ会合状態を確認した。その

結果、予想とは異なり、この ΔV mutant も、野生型と同じようにストレス依存的なホモ会合を示すことが分かった(Fig7 A)。また、その活性化パターンを見てみたところ、 ΔV mutant も小胞体ストレスに応じて正常に ON/OFF 制御を行うことが分かった(Kimata et al 2004)(Fig7 B)。

よって、BiP の解離により Ire1 の活性が制御されるという従来のモデルとは異なり、BiP の解離以外の要因によっても、Ire1 の活性化が、ホモ会合の段階で制御されていることが考えられた。この制御機構がどのような分子メカニズムかは不明だが、後述するように region I に由来する可能性が考えられる。

また、野生型 Ire1 と ΔV mutant のストレス応答性について、その内在性のターゲットである HAC1 mRNA precursor (uninduced form; HAC1u; (Cox and Walter, 1996)) の切断によって評価した(Fig8)。小胞体ストレス処理である Tunicamycin や DTT を用いた場合には、野生型 Ire1 も ΔV mutant もほぼ同じ応答性を示した。しかし、小胞体ストレス以外の刺激、熱処理やエタノール処理では、野生型 Ire1 はほとんど応答していないのに対して、 ΔV mutant では、顕著に Hac1 mRNA の切断が見られた。このように、野生型 Ire1 と異なり、 ΔV mutant は小胞体ストレス以外の刺激に対しても部分的に応答してしまうことが分かった。

Core mutant のストレス応答性

次に、活性に必須ではない region I や region V の大部分を欠失させ、上述の Core stress-sensing region のみを小胞体内腔領域に持つ変異体 (Core mutant) を作成し、その解析をすすめた。

Fig9 A に示すように、Core mutant は、非ストレス時は活性化せず、ストレスに応じて活性化するという野生型と同じ活性化パターンを見せた。このことから、Core stress-sensing region のみでストレスに応じた Ire1 の ON/OFF 制御を行うことが可能であると考えられた。また、Core mutant は野生型と異なり、エタノールや熱ショックなどの小胞体ストレス以外の刺激にも応答してしまった(Fig9 B)。よって、Core mutant が持たない region I や region V (= BiP の結合) は、Ire1 のストレス感受性を小胞体ストレス特異的なものに補正する役割を持つと考えられた。

S96P 変異は Core mutant の活性を上昇させる

これまで、Ire1 の活性を消失させる変異はさまざま同定されてきたが、逆に上昇させるような変異は見つかっていなかった。もし仮に、このような変異を見つけることができれば、今後の解析にも非常に有用なツールになると考え、

ランダム mutagenesis を含めた様々な方法により、このような変異の探索を行った。

Papa 等は、Ire1 の小胞体内腔ドメインに複数の点変異を導入することで、非ストレス時の活性がわずかに上昇することを報告している (Papa et al 2003)。私は、上述した Core mutant にこれらの点変異を導入することで、その活性が著しく上昇することを確認した(Fig10)。また、これら5つの点変異の中で最も効果があるのは S96P 変異であり、この1つのアミノ酸置換のみによって、Core mutant の活性が、劇的に上昇することが分かった(Fig10 A&B)。

この S96P という変異は、非ストレス時の Core mutant の活性は劇的に上昇させるが、完全長の Ire1 や、 ΔI や ΔV といった部分欠失変異体に対しては、その活性をわずかに上昇させるにとどまり、大きな影響を及ぼさなかった(Fig11)。

このような S96P 変異と Core mutant の関連について、これまでのレポーターアッセイの他に、Ire1 の内在性のターゲットである HAC1 mRNA precursor の切断によっても評価した(Fig12)。

野生型 Ire1 や S96P mutant では、ストレスが無い状態では Hac1 mRNA の切断が見られず (<5% cleavage)、小胞体ストレス時にのみ切断が見られた (wt:57%、S96P:58%)。Core mutant においても、非ストレス時に 13%だった切断効率が、ストレス時には 61%に上昇し、ストレス応答性が確認できた。しかし、Core S96P mutant では、非ストレス時においても既に 58%の mRNA が切断されており、ツニカマイシン処理を行っても 65%までしか上昇しなかった(Fig12 B)。

この結果は、Core mutant は若干非ストレス時の活性が高いもののストレスに対する応答性を保持しており、Core S96P mutant は非ストレス下でも非常に高い活性を持つという、レポーターアッセイの結果と一致した。

Core mutant と各種変異の組み合わせ

Fig13 では、これら S96P 変異を持つ各種部分欠失変異体について、小胞体ストレスとしての Tunicamycin 処理のほか、エタノール刺激や熱ストレスに対する応答パターンを確認した。いずれの部分欠失変異体においても、S96P 変異により全体的に活性値が上昇するのみであり、特定のストレス刺激によってそのパターンが劇的に変化するという事はなかった(Fig13)。

上述したように、Ire1 小胞体内腔の region II-IV 内に 10 アミノ酸欠失変異を導入すると、その活性が完全に失われる。しかし、S96P 変異により Ire1 の活性が上昇したことから、この変異が 10 アミノ酸欠失による活性の消失を相

補する可能性も考えられた。そこで、Core mutant において、代表的な 10 アミノ酸欠失変異と S96P 変異を組み合わせ、S96P 変異により 10 アミノ酸欠失変異体の活性が回復するかどうか検討した(Fig14)。しかし、結果としてそのような現象は認められなかった。

さらに、S96P 変異による Core mutant の活性上昇と、Disulfide-bond や N-glycosylation などのタンパク質修飾との関連を探るために、これらの修飾部位のアミノ酸を置換した変異体を作成し、ストレス応答性を比較した(Fig15)。しかし、これらの変異により Core S96P mutant の活性化パターンが変化することはなく、これらタンパク質修飾と Core stress-sensing region による Ire1 の活性制御との関連性は低いと考えられた。

S96P 変異による活性化への自己リン酸化の必要性

序論で述べたように、Ire1 が小胞体ストレスに応じて RNase として働くためには、細胞質領域での自己リン酸化が必要である。S96P 変異による Core mutant の活性上昇に、このリン酸化は必要なのだろうか？

過去の研究から、K702A という細胞質 kinase 領域におけるアミノ酸置換が、Ire1 の活性化に伴う自己リン酸化を阻害することが分かっている(Shamu and Walter 1996)。そこで、種々の Core mutant に K702 変異を導入し、その活性をレポーターアッセイで評価した(TableIII)。

野生型、あるいは S96P、Core mutant はストレス依存的な活性化を示す一方 (WT:3.07%→100%、S96P:6.27%→140%、Core:23.8%→128%)、これらに K702A 変異を導入することで、いずれの活性も完全に消失した (3%以下)。非ストレス時に高い活性を持っていた Core S96P mutant についても同様に、K702A という変異によりその活性が完全に消失してしまった(TableIII)。

よって、S96P 変異による Core mutant の活性上昇にも、通常の Ire1 の活性化と同じように、細胞質領域で生じる自己リン酸化が必要であると考えられた。このことから、S96P 変異は、細胞質リン酸化を skip するような artificial な作用により Core mutant の活性を上昇させるのではなく、あくまで、リン酸化以前に Ire1 の小胞体内腔側で生じる何らかの現象に影響を与え、結果、その活性を上昇させていると想像された。

ここまで述べたように、小胞体内腔領域に Core stress-sensing region のみを持つ Core mutant は、ストレスに応じた ON/OFF 制御を正常に行うこと、さらに、S96P という 1 アミノ酸置換によりその活性が著しく上昇することが

明らかになった。また、S96P 変異による活性上昇は、細胞質領域での自己リン酸化を bypass するような artificial なものではなく、ストレス時に Ire1 の小胞体内腔側で生じる、何らかの現象に影響を与えていると想像された。

それではいったい、S96P という変異は、小胞体内で生じるどのような事象に影響を与え、Core mutant の活性を上昇させているのだろうか？この疑問に答えるために、Core S96P mutant を用いて以下の解析を進めた。

各種欠失変異体と BiP の相互作用

序論で述べたように、非ストレス時の Ire1 には BiP が結合しており、小胞体ストレスに応じて解離する。この BiP の結合と解離は、Ire1 の活性を制御する。S96P 変異は、この BiP の結合と解離にどのような影響を与えるのだろうか？Fig16 では、共免疫沈降法により、HA タグを付加した各種変異 Ire1 と BiP との相互作用を検出した。

Fig16 A では、 ΔI や ΔV 、Core mutant とその S96P 変異体について、Fig16 B では、特に野生型と Core mutant に絞って解析した。なお、Fig16 B では、共沈降する BiP のシグナル強度を、免疫沈降された Ire1-HA のシグナル強度で補正した値を、パネルの下に示した。

野生型 Ire1 や S96P mutant においては、非ストレス条件下で BiP の結合が見られ、ストレス処理によってその結合量がほぼ同等に減少していることが分かる。よって、S96P 変異は BiP の結合・解離へは何の影響も及ぼさないと考えられる(Fig16 B)。

一方の Core mutant や Core S96P mutant においては、Ire1-HA を発現させていない control と同じく、ストレスの有無に関わらず BiP の結合が全く見られなかった(Fig16 B)。Core mutant や Core S96P mutant は、region V の大部分を欠失していることから、この結果は、BiP 結合部位が region V 内に存在するという先の知見とも一致する。

これらの結果から、S96P 変異による Core mutant の活性上昇と、BiP の結合・解離との関連性は低いと思われた。

各種欠失変異体のホモ会合状態

次に私は、S96P 変異とストレス依存的な Ire1 のホモ会合との関連性を調べた。各種変異体 Ire1 のホモ会合状態を見るために、 $\Delta ire1$ 株で、HA タグを付加した Ire1 と、Flag タグを付加した Ire1 を共発現させた。抗 HA 抗体による共免疫沈降後、共沈降してくる Flag タグ付き Ire1 を Western により検出した。なお、Ire1-FLAG が Pull-down される効率を上げるため、この場合も Ire1-HA

はシングルコピー (centromeric) プラスミドから、Ire1-FLAG はマルチコピー (2 μ) プラスミドから発現させた(Fig17&18)。Fig17 B で見られるように、Ire1-HA を発現しない株では Ire1-FLAG の共沈降が認められないことから、この実験では Ire1-HA と Ire1-FLAG のホモ会合が正当に観察されていると考えられる。

Fig17 A では、 ΔI や ΔV 、Core mutant とその S96P 変異体について、Fig18 では、特に野生型と Core mutant に絞って解析した。なお、Fig18 では、共沈降する Ire1-FLAG のシグナル強度を、免疫沈降された Ire1-HA のシグナル強度で補正した値を、パネルの下に示した。

Fig17 A で見るように、野生型 Ire1 では、検出される Ire1-FLAG のシグナルがストレス依存的に増加しており、S96P mutant でも同じ結果が得られた。 ΔI や ΔV 、またその S96P 変異体についても、部分的にはあるが、ストレス依存的なホモ会合が見られた。

しかし、Core mutant や Core S96P mutant では、非ストレス下においても強いホモ会合のシグナルが見られ、その量はストレス処理によって増加することとはなかった。また、いずれの部分欠失変異体においても、S96P 変異によるホモ会合状態の変化は見られなかった(Fig17A&18)。

これらの結果から、Core mutant は BiP と相互作用せず、また、ストレスの有無に関係なく常にホモ会合しているにもかかわらず、ストレスに対する応答性は保持することが分かった。よって、Core mutant の活性化は、これまで考えられてきた Ire1 のホモ会合以外の、別の機構により制御されると考えられる。

仮にこれを unknown event と呼ぶと、S96P 変異と BiP の結合・解離、あるいはホモ会合との関連性は見られなかったことから、先に述べたように、S96P 変異は unknown event を介して Core mutant の活性を上昇させていると思われる。

グリセールグラジエントによる Ire1 ホモ会合体の解析

それでは、この unknown event とは一体どのような事象であるか？その候補として、まずは Ire1 の多量体化の可能性を考えた。通常は単量体として存在する Ire1 が、ストレス時により大きな多量体を形成することが unknown event であるという考えである。これを Core mutant に置き換えると、通常は 2 量体を形成しており、ストレス時にはさらに大きな多量体を形成すると考えられる。上述の免疫沈降実験では、この点について厳密に評価することはできていない。

そこで、Ire1 がより大きな多量体を形成するかどうか確認するために、グリセールグラジエントを行った(Fig19)。各種 Ire1 を single copy plasmid 上から native promoter 制御下で発現させ、ストレス処理後に Lysate を調製、5-25% のグリセールグラジエントにより分画した。なお、同様のグラジエントで分子量マーカーを分離し、各 fraction に存在するタンパク質複合体がどれくらいの大きさかも評価した。

Ire1-HA は理論上 128kDa、Core mutant は 114kDa であるから、もしこれらが多量体を形成すれば、fraction16 以降の画分に検出されるはずであった。しかし実際には、野生型、あるいはいずれの変異体 Ire1 もそのような大きな画分に検出されることなく、単量体あるいは2量体と考えられる部分にのみ検出された(Fig19)。よって、この結果からは、Ire1 が多量体を形成する可能性は低いと考えられる。

S96R 変異による Core mutant の活性上昇

Fig10&11 で示したように、S⁹⁶ のプロリンへの置換は Core mutant の活性を大きく上昇させる。しかし、そのほかのアミノ酸への置換については検討していなかった。そこで、プロリン以外のアミノ酸に置換した場合について、Core mutant への活性の影響を確認した。

Fig20 に示すように、新たに5種類の mutant を作製した。極性を持たない、側鎖の小さいアミノ酸としてアラニン、また、側鎖の大きいものとしてトリプトファン。電荷を持たないものとしてトレオニン、塩基性アミノ酸のアルギニン、酸性アミノ酸のアスパラギン酸。Core mutant 上の S⁹⁶ を、以上5種類のアミノ酸に置換した変異体について、その活性をレポーターアッセイによりモニターした。

これらの変異体のうち、Core S96R は非ストレス時から非常に高い活性を示した。また逆に、S96D 変異により非ストレス時の Core mutant の活性が低下した(Fig20)。

Core mutant の活性を上昇させるプロリンへの置換は、その側鎖の特性上、周囲の二次構造を破壊することが予想される。また、Positive charge のアミノ酸であるアルギニンへの置換によっても、Core mutant の活性が上昇することから、S⁹⁶ 付近の局所的な構造や電荷が unknown event と何らかの形で関連する可能性が考えられる。

Ire1 と相互作用する小胞体シャペロン LHS1

これまで示してきたように、Ire1 のストレスに応じた活性化は、BiP の結合・解離以外の要因によって、複数の段階で制御されることが考えられた。

その分子メカニズムとして、従来知られていない、BiP 以外の Ire1 相互作用タンパク質が存在し、ストレスに応じた Ire1 の活性化を制御している可能性も考えられた。そのような観点から過去の論文を検索していると、ある候補が挙がってきた。

Lhs1 は、小胞体内で BiP と協調的に働く分子シャペロンであり、IRE1 とダブル KO にすると致死を示すという、遺伝的な相互作用が見られていた (Baxter et al 1996)。よって私は、この Lhs1 と Ire1 がタンパク質レベルで相互作用する可能性があると考え、免疫沈降実験を行った。

Fig21 A に示すように、HA タグを付加した Ire1 を、single copy plasmid 上から native promoter 制御下で発現させ、抗 HA 抗体による免疫沈降を行った。抗 Lhs1p 抗体による Western の結果から、Ire1 と Lhs1 が確かに相互作用していることが確認できた。

そこで次に、Lhs1 を過剰発現させた場合、Ire1 のストレス応答性がどのように変化するか、レポーターアッセイにより確認した (**Fig21 B&C**)。

Lhs1 の過剰発現は、Tunicamycin や DTT などのストレス下での活性に対しては何の影響も与えなかった。しかし、非ストレス下での活性を見ると、Lhs1 の過剰発現により、特に $\Delta 468$ という BiP 結合部位を部分的に欠失した変異体 Ire1 の活性が上昇していた (**Fig21 B&C**)。 ($\Delta 468$ は region V 内の 10 アミノ酸を欠失した部分欠失変異体)

このことから、Lhs1 は、BiP のように負の制御因子として Ire1 に機能しているわけではないが、何らかの形で Ire1 の活性制御に影響を与えられた。

考察

本研究では、小胞体ストレスセンサーIre1の活性制御機構について、これまで行われてこなかった、Ire1自身の解析からのアプローチを試みた。その中で、これまで明らかにされてこなかった様々な事象が明らかになった。

まずは、Ire1小胞体内腔領域に存在するCore stress-sensing regionの同定である。本研究において明らかになったregion IIとIVは、Ire1の活性に必須であり(Fig2)、構造的にも安定な1つのモジュールを形成していることが分かった(Fig3)。また、この領域はIre1の活性化に必須なホモ会合を担っており、ストレスに応じた活性化の際に、まさに「コア」として機能する部分である。

また、Ire1の活性がBiPの結合・解離によって制御されるという従来のモデルとは一致しない、複数の制御段階が存在することが新たに分かってきた。

BiPの結合部位は、Ire1のストレス応答には必須ではない領域(region V)に存在し、この領域を欠失させてもIre1のストレスに応じたホモ会合、活性化が正常に制御されることが分かった(Fig7)。従って、従来から考えられてきたBiPによる制御以外の機構によっても、Ire1の活性がホモ会合の段階で制御されると考えられた。

さらに本研究では、region IとVの両者を欠失し、小胞体内腔領域にCore stress-sensing regionのみを持つCore mutant Ire1を作成し、解析を進めた。その結果、この変異体は常にホモ会合していることが明らかになった(Fig18)。これに対して、region Iを保持する ΔV mutantはストレスに応じてホモ会合することから、region Iも、Ire1のストレス依存的なホモ会合を制御する機能を有すると考えられる。アミノ酸の配列比較によると、region Iは出芽酵母Ire1のみに存在し、哺乳動物のIre1 α やPERKには含まれていない。よって、高等動植物におけるIre1 α のホモ会合は、BiPの結合のみによって制御されている可能性がある。

Core mutantは常にホモ会合しているにも関わらず、ストレスに応じた活性のON/OFF制御が行われていた。よって、Ire1のストレスに応じた活性化は、Core stress-sensing regionが担う、別の新たな段階においても制御されると考えられる。仮にこれを「unknown event」と呼ぶと、unknown eventはホモ会合後に発生する制御段階であると思われる。非ストレス時のCore mutantの活性を上昇させるS96P変異は、BiP解離やホモ会合には影響を与えず(Fig16&18)、また、ストレス依存的なホモ会合を示す野生型Ire1や ΔI 、 ΔV mutantの活性は上昇させないからである(Fig11)。

それでは、この unknown event とは、一体どのようなものなのであろうか？ Core stress-sensing region は、アミノ酸配列上、高等真核生物の Ire1 α 、および PERK の間である程度保存されていることから (Durose et al 2006)、上述した unknown event は、これら小胞体ストレスセンサーに共通の事象である可能性が高い。また、Credle 等によると、Core stress-sensing region はタイトに折りたたまれたひとつのモジュールを形成している (Credle et al 2005)。

このモジュール上には、Disulfide-bond 形成の potential site として Cys 残基が複数存在するほか、N-glycosylation を受ける可能性のある Asn 残基も複数存在している。しかし、これらのアミノ酸を置換し、タンパク質修飾をできなくした場合にも、Core mutant のストレス応答パターンは変化しないことから (Fig15)、これらタンパク質修飾と Unknown event との関連性は低いと考えられる。

Credle 等により報告された出芽酵母 Ire1 の Core stress-sensing region の立体構造には (Credle et al 2005)、MHC like な groove が含まれる。この groove は、2 量体を形成した Ire1 分子間の Dimer-forming face に存在する。

MHC がこの groove を介して様々なペプチドと結合することを考えると、2 量体を形成した Ire1 が、この MHC like groove を介して unfold なペプチドと直接相互作用する可能性が考えられる。これを支持するように、我々は、Core stress-sensing region 部分の組み換えタンパク質が、抗凝集活性を持つことを明らかにしている (data not shown)。抗凝集活性とは、構造を部分的に破壊したモデルタンパク質と直接結合し、その凝集を抑制する活性であると考えられている。よって、Ire1 と構造異常タンパク質が *in vivo* においても相互作用する可能性が考えられる。

近年、エリスロポエチンレセプターの構造解析の結果などから、このレセプターが下流にシグナルを伝達するためには、リガンドの結合によって誘導されるレセプター自身の構造変化が必要であることが分かっている (Remy et al 1999; Livnah et al 1999)。また、Gram-negative bacterial に対する細胞膜局在性 kinase である PhoQ の解析からも、この kinase が活性化するためには、リガンドの結合と、金属イオンにより誘導される自身の構造変化が必要であることが明らかになっている (Bader et al 2005)。よって、小胞体膜上に存在するセンサー型 kinase である Ire1 についても、このような、リガンド (unfolded proteins?) の結合により誘発される構造変化が、その活性に大きな影響を及ぼす可能性が考えられる。

一般に、プロリンへのアミノ酸置換は周囲の二次構造をさせる。また実際に、

Core stress-sensing region の組み換えタンパク質を用いたプロテアーゼによる限定分解から、Core stress-sensing region の野生型と S96P 型では、その切断パターンに違いがあることがわかっている (data not shown)。これらのことを考えると、「unknown event は、unfold peptide の結合により 2 量体 Ire1 の構造が活性化型へと変換される現象」と考えるのは、とても理にかなっているように思える。

また、別の可能性として Ire1 の多量体化が考えられる。ストレス時、Ire1 が 2 量体を形成するだけでは不十分であり、多量体を形成することで、始めて下流のシグナルを活性化させるのに十分な活性を持つようになるという考えである。

Credle 等は、Core stress-sensing region に相当するタンパク質 fragment が、結晶中で多量体を形成することを示している (Credle et al 2005)。その知見をもとに、彼らは、Ire1 が小胞体ストレス下で Unfolded protein を介して higher oligomer を形成すると考えている。

Fig19 の結果では、2 量体よりも大きな多量体を検出することはできなかった。しかし、この実験で用いた buffer 中には界面活性剤や DTT が含まれることから、この結果が、本来の *in vivo* での状態を反映していない可能性も考えられる。Ire1 の多量体が、Lysate 中での速やかな解離のため検出しにくいと仮定すると、2 量体のアセンブルにより多量体が形成されるという可能性も否定できない。

さらに、新規の Ire1 相互作用因子として、本研究では Lhs1 を同定している (Fig21)。Lhs1 が Ire1 上のどの領域に結合するかは分からないが、過去の研究において、BiP 以外のタンパク質因子が Ire1 の小胞体内腔領域に結合するという知見はまったく報告されていない。よって、現在は明らかにされていない複数の因子を介して、ストレスに応じた Ire1 の活性化が様々に制御される可能性も考えられる。

このような、あるタンパク質の活性が複数の因子によって制御される例は他にもたくさんある。例えば、ASK1 は様々なストレスシグナルを仲介する伝達因子であるが、細胞質中で非常に大きなタンパク質複合体を形成し、その活性が、複数のタンパク質により制御されることが分かっている (Noguchi et al 2005)。

よって、Ire1 の小胞体内腔領域と結合する新規因子の探索を行い、その解析を進めることによっても、Ire1 の活性を制御する個々のシステムの詳細を明ら

かにすることができるかもしれない。

このように、本研究によって Ire1 のストレスに応じた活性化が複数の段階で制御されることが分かってきた。まず、Ire1 のホモ会合は、①BiP の解離、②BiP に依存しない region I が持つ機能、の 2 つによって制御される。また、ホモ会合後も、③Unknown event という更なる制御段階が存在する。更に Ire1 がその活性を発揮するには、④細胞質領域での自己リン酸化、が必要である。この段階においても、複数のタンパク質が調節因子として関与することが、最近示唆され始めている(Guo et al 2006)。

なぜ、このような複数の（少なくとも 4 段階の）制御システムが Ire1 には必要なのであろうか？これらの制御システムを部分的に欠如している ΔV や Core mutant は、小胞体ストレス以外のストレス刺激に対しても応答してしまう(Fig8&9)。特に、Core mutant はエタノール刺激に対して非常に高い活性を示し、また、熱処理に対しても部分的に応答する。それに対して、野生型の Ire1 は全く応答を示さないし、また、 ΔV mutant のエタノールに対する応答性は Core mutant ほどは大きくない。このような、Core mutant の間違った応答性は、その活性制御システムが部分的に欠如しているために発生するのかもしれない。逆を言えば、これら複数の制御段階が存在するのは、Ire1 の応答性を小胞体ストレス特異的なものに補正するためかもしれない。つまり、小胞体ストレス応答のストレス特異性、確実性はこれら複数の制御段階があってはじめて保証されるものであるとも考えられる。

今後は、これらの制御システムが一体どのようなものなのか、個々の分子機構を明らかにし、小胞体ストレス応答がどのように制御されるのか理解を深める必要があると考えている。このようなアプローチにより、ストレス応答という基本的な生命現象をひもとく上で、重要な手がかりを得ることができると期待している。

参考文献

- Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H. and Miller, S. I. (2005).** Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* **122**, 461-72.
- Baxter, B. K., James, P., Evans, T. and Craig, E. A. (1996).** SSI1 encodes a novel Hsp70 of the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **16**, 6444-56.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. and Ron, D. (2000).** Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-32.
- Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. and Ron, D. (2002).** IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-6.
- Cox, J. S., Shamu, C. E. and Walter, P. (1993).** Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73**, 1197-206.
- Cox, J. S. and Walter, P. (1996).** A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391-404.
- 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 U S A* **102**, 18773-84.
- DuRose, J. B., Tam, A. B. and Niwa, M. (2006).** Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **17**, 3095-107.

Guo, J. and Polymenis, M. (2006). Dcr2 targets Ire1 and downregulates the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep* **7**, 1124-7.

Harding, H. P., Zhang, Y. and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271-4.

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**, 158-64.

Kaiser, C., S. Michaelis, and A. Mitchell. (1994). *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY. 230 pp.

Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Yamada, S. and Kohno, K. (2006). Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes Cells.* **11**, 56-69.

Kimata, Y., Kimata, Y. I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I. C., Takeuchi, M., Rose, M. D. and Kohno, K. (2003). Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell* **14**, 2559-69.

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**, 445-56.

Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M. J. and Mori, K. (1993). The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **13**, 877-90.

- Liu, C. Y., Schroder, M. and Kaufman, R. J. (2000).** Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **275**, 24881-5.
- Livnah, O., Stura, E. A., Middleton, S. A., Johnson, D. L., Jolliffe, L. K. and Wilson, I. A. (1999).** Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* **283**, 987-90.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H. and Yura, T. (1996).** Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* **1**, 803-17.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M. J. and Sambrook, J. (1993).** A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* **74**, 743-56.
- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M. J. and Sambrook, J. F. (1992).** A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J* **11**, 2583-93.
- Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J. and Ichijo, H. (2005).** Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem* **280**, 37033-40.
- Oikawa, D., Kimata, Y., Takeuchi, M. and Kohno, K. (2005).** An essential dimer-forming subregion of the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1. *Biochem J* **391**, 135-42.

- 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**, 445-50.
- Papa, F. R., Zhang, C., Shokat, K. and Walter, P.** (2003). Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science* **302**, 1533-7.
- Remy, I., Wilson, I. A. and Michnick, S. W.** (1999). Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* **283**, 990-3.
- Shamu, C. E. and Walter, P.** (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* **15**, 3028-39.
- Sidrauski, C. and Walter, P.** (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**, 1031-9.
- Tirasophon, W., Welihinda, A. A. and Kaufman, R. J.** (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**, 1812-24.
- Wang, X. Z., Harding, H. P., Zhang, Y., Jolicoeur, E. M., Kuroda, M. and Ron, D.** (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* **17**, 5708-17.
- Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K. and Mori, K.** (2003). A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* **4**, 265-71.
- 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**, 881-91.

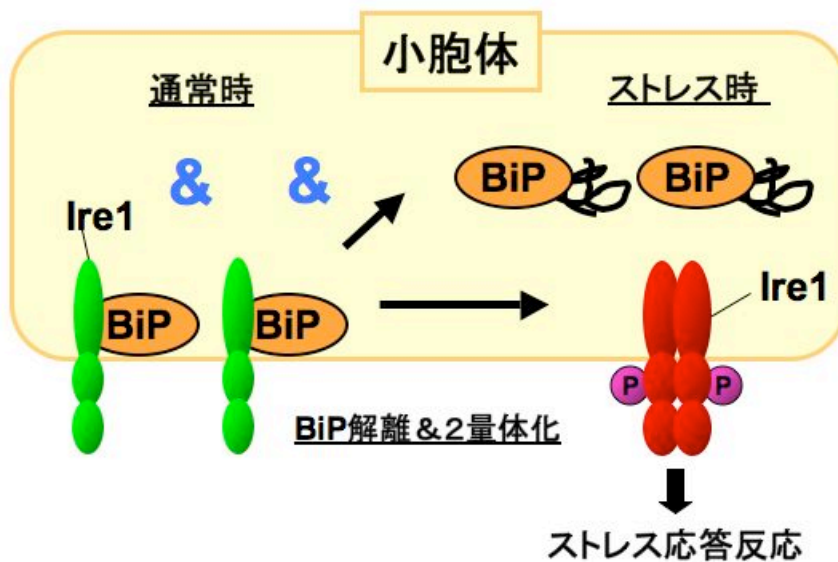


Fig.1 出芽酵母における小胞体ストレスに応じたIre1の活性制御モデル(従来モデル)

通常時、小胞体シャペロンであるBiPがIre1に結合し、そのホモ会合(2量体化)を抑制している。
 ストレス時、小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積すると、BiPがそれらのリフォールディングを行うためにIre1から解離する。結果、フリーになったIre1が2量体を形成し、細胞質領域での自己リン酸化により活性化する。

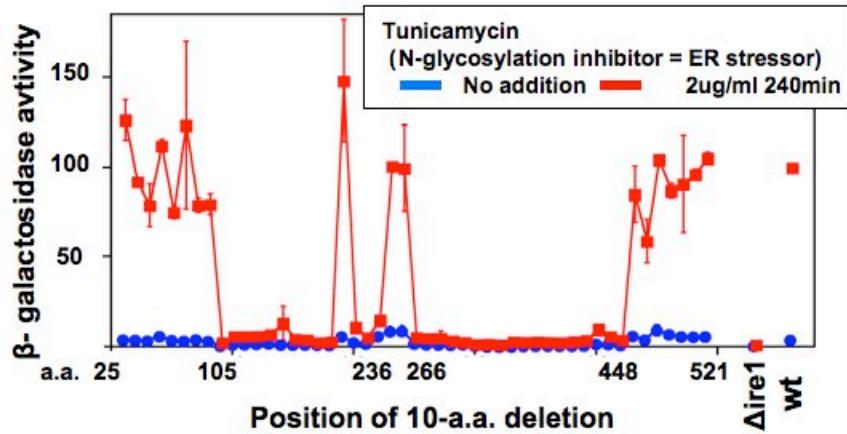
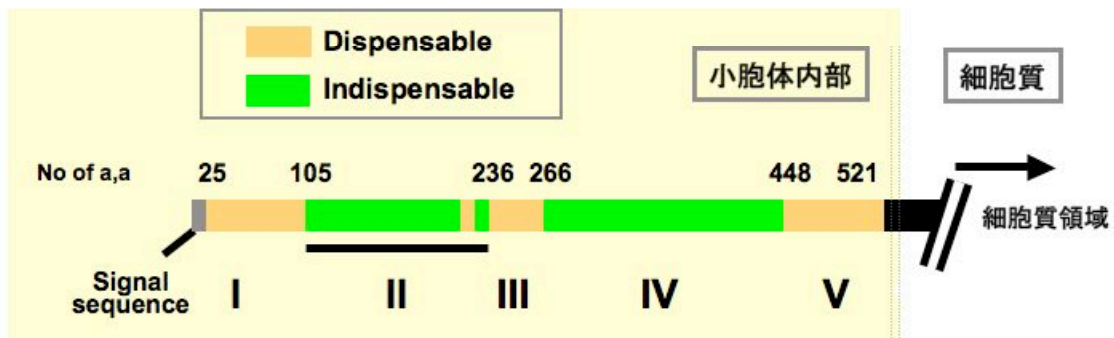
A**B**

Fig.2 系統的10アミノ酸欠失スキニングによるIre1小胞体内腔領域の機能ドメイン探索

(A):Ire1の小胞体内腔領域をターゲットにした10アミノ酸欠失スキニング
 UPRE-LacZレポーター(pCZY1)を持つ Δ ire1株(KMY1015)に、各10アミノ酸を欠失したHAタグ付きの変異Ire1を導入した(pRS315-Ire1-HA)。小胞体ストレスとしてツニカマイシン(2ug/ml 4hr)で処理した後、各Ire1の活性値を測定した。各値は、ストレス時の野生型Ire1を100として補正した。青は通常時、赤はストレス時の値を示す。

(B):(A)の結果をもとにIre1の小胞体内腔領域を5つの領域に区分けした。Region II、IVはIre1の活性に必須な領域。Region I、III、Vは必須ではない領域

発現タンパク質	元発現ベクター	導入部位	発現状況	精製状況
8His-ylre1NLD	pYEX(-GST)	yeast Ire1 a.a 25-520	可溶性発現	Ni-NTAにて精製可能
ylre1NLD-8His	pYEX-His	yeast Ire1 a.a 25-520	発現せず	-
8His-regionI	pYEX-His	yeast Ire1 a.a 25-105	可溶性発現	-
8His-regionII	pYEX-His	yeast Ire1 a.a 106-245	発現せず	-
8His-regionIV	pYEX-His	yeast Ire1 a.a 265-437	発現せず	-
8His-regionV	pYEX-His	yeast Ire1 a.a 438-520	可溶性発現	-

出芽酵母FY23を用いて、0.5mM CuSO₄、30°Cで1hr発現誘導を行った。

*すべてcup1 promoterからの発現誘導

発現タンパク質	元発現ベクター	導入部位	発現状況	精製状況
MBP-ylre1NLD-8His	pMAL-c2x	yeast Ire1 a.a 80-472	可溶性発現	Ni-NTAにて精製可能
MBP-ylre1NLD-8His (Δ 327)	pMAL-c2x	yeast Ire1 a.a 80-472(Δ 327)	可溶性発現	Ni-NTAにて精製可能
MBP-ylre1NLD-8His (Δ 145)	pMAL-c2x	yeast Ire1 a.a 80-472(Δ 145)	(部分的に可溶性発現 & Ni-NTAにて精製可能)	
MBP-hIre1aNLD-8His	pMAL-c2x	human Ire1a a.a31-443	可溶性発現	Ni-NTAにて精製可能
MBP-hIre1bNLD-8His	pMAL-c2x	human Ire1b a.a35-432	可溶性発現	収量が著しく少ない(Ni-NTA精製)
MBP-hPERKNLD-8His	pMAL-c2x	human PERK a.a29-517	可溶性発現	Ni-NTAにて精製可能
MBP-hATF6alumen-8His	pMAL-c2x	human ATF6a a.a401-670	可溶性発現	-
MBP-hIre1aCter-8His	pMAL-c2x	human Ire1a a.a472-977	可溶性発現	大腸菌Hsp70、60が混入
MBP-hIre1bCter-8His	pMAL-c2x	human Ire1b a.a455-925	可溶性発現	大腸菌Hsp70、60が混入
8His-ylre1NLD	pQE-80L	yeast Ire1 a.a 25-520	封入体発現	-
8His-hIre1aNLD	pQE-80L	human Ire1a a.a31-443	可溶性発現	Ni-NTAにて精製可能
8His-hIre1aNLD CS	pQE-80L	human Ire1a a.a31-443 (C109S,C148S,C332S)	可溶性発現	Ni-NTAにて精製可能
8His-hIre1bNLD	pQE-80L	human Ire1b a.a35-432	封入体発現	-
8His-hPERKNLD	pQE-80L	human PERK a.a29-517	(部分的に可溶性発現 & Ni-NTAにて精製可能)	
8His-hATF6alumen	pQE-80L	human ATF6a a.a401-670	封入体発現	-

大腸菌BL21(DE3)-RILを用いて、0.3mM IPTG、1hr@20°Cで発現誘導を行った。

*これ以外のストレスセンサー組み換えタンパク質発現ベクターについては、
修士論文(平成15年度:及川大輔)参照

Table. I 小胞体ストレスセンサー部分組み換えタンパク質発現ベクターの構築と精製条件

小胞体ストレスセンサーの小胞体内腔領域、または細胞質領域部分を融合タンパク質として発現するベクターを構築し、それぞれについて発現条件の確認、精製条件の確認を行った。

なお、上に記述の無いものについては、修士論文(平成15年度:及川大輔)参照のこと
各タンパク質の精製条件については、材料と方法に記述する。

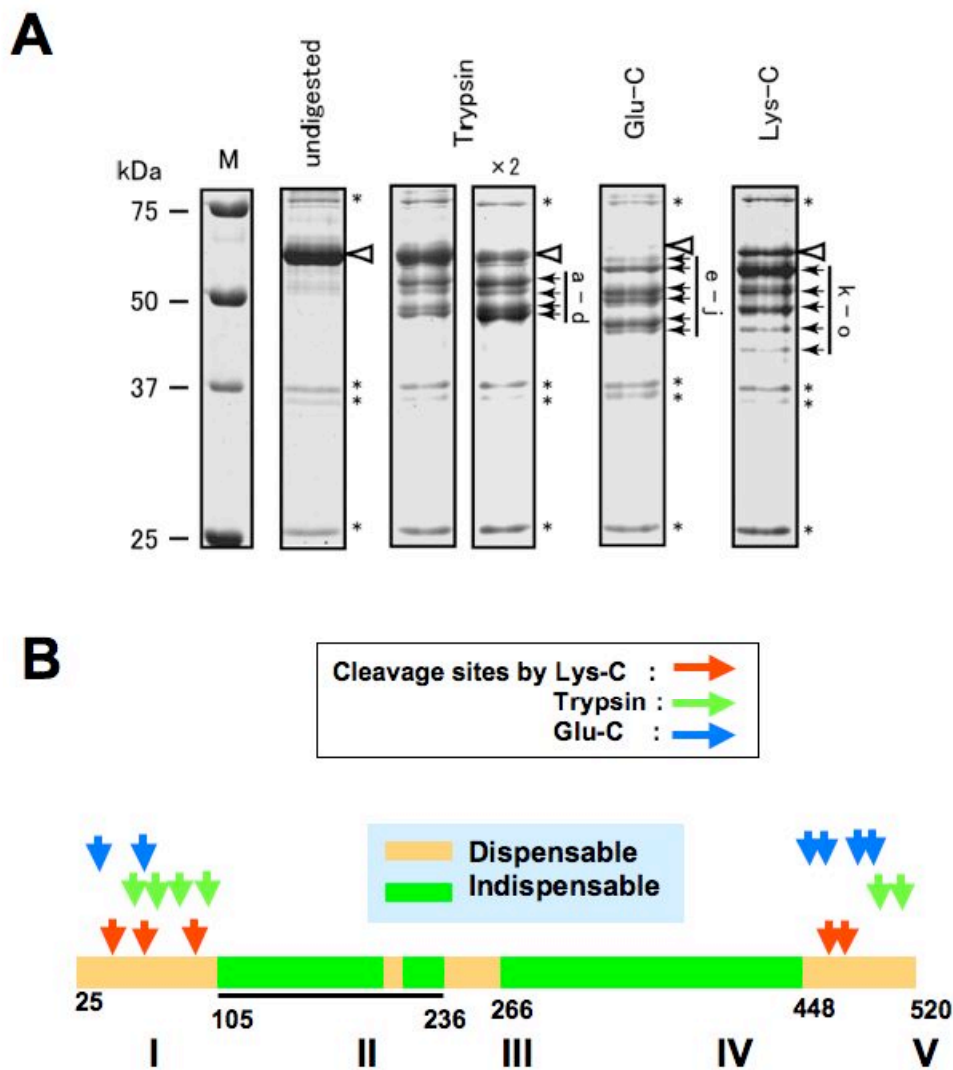


Fig.3 プロテアーゼ限定分解による出芽酵母Ire1小胞体内腔領域の構造評価

(A): 各種プロテアーゼによる限定分解

精製した8His-yeast Ire1NLDタンパク質を用いて、各種プロテアーゼによる限定分解を行った。3ugの精製タンパク質を、15ngまたは30ngのトリプシン、240ngのGlu-C、120ngのLys-Cと反応させ、反応後の生成fragmentを12% SDS-PAGE CBB染色により検出した。

(B): 限定分解による切断部位の模式図

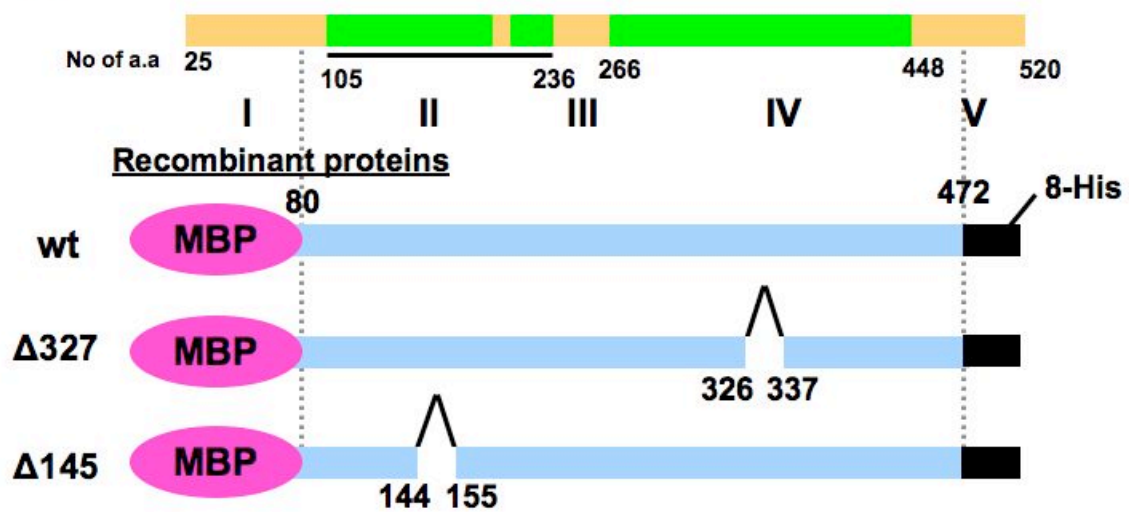
限定分解後の各切断片について、N端、C端のアミノ酸配列を同定、予測し、その結果から予想される切断部位を示した。

Fragment	Protease	N-terminal sequence	Position of N-terminal aa	Predicted molecular mass (kDa)	Predicted position of C-terminal aa
a	Trypsin	TTEGL	60	52	520
b	Trypsin	LSSYP	69	50	515
c	Trypsin	RANKK	85	47	501 or 502 or 503
d	Trypsin	RAANS	92	46	501 or 502 or 503
e	Glu-C	VASTK	35	55	520
f	Glu-C	VASTK	35	52	495 or 498
g	Glu-C	GLPNM	63	49	484
h	Glu-C	VASTK	35	47	451 or 454
i	Glu-C	GLPNM	63	44	451 or 454
j	Glu-C	GLPNM	63	43	451 or 454
k	Lys-C	NINSP	50	53	520
l	Lys-C	LSSYP	69	50	520
m	Lys-C	NINSP	50	46	464
n	Lys-C	LSSYP	69	43	455
o	Lys-C	GRRAA	90	41	455

Table. II プロテアーゼ限定分解による出芽酵母Ire1小胞体内腔領域の構造評価

限定分解後の各切断片について、N端のアミノ酸配列を同定した。また、泳動度から予想される各fragmentの大きさと、プロテアーゼの認識部位から、C端のアミノ酸配列を予想した。

A Ire1 luminal domain



B

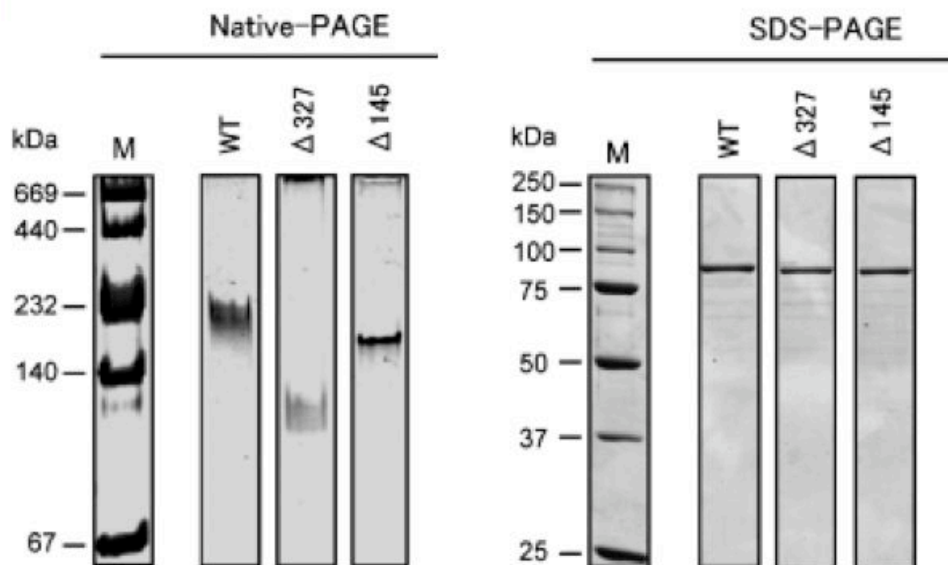


Fig.4 Core stress-sensing regionが担うIre1の2量体形成

(A): 作製したMBP融合タンパク質の模式図

(B): Core stress-sensing regionタンパク質は*in vitro*で2量体を形成する

左: 各種MBP融合タンパク質を用いてNative- PAGE (4–20% gradient gel)を行った。(CBB染色)

右: 同様のサンプルを用いてSDS-PAGE (10% gel)を行った。(CBB染色)

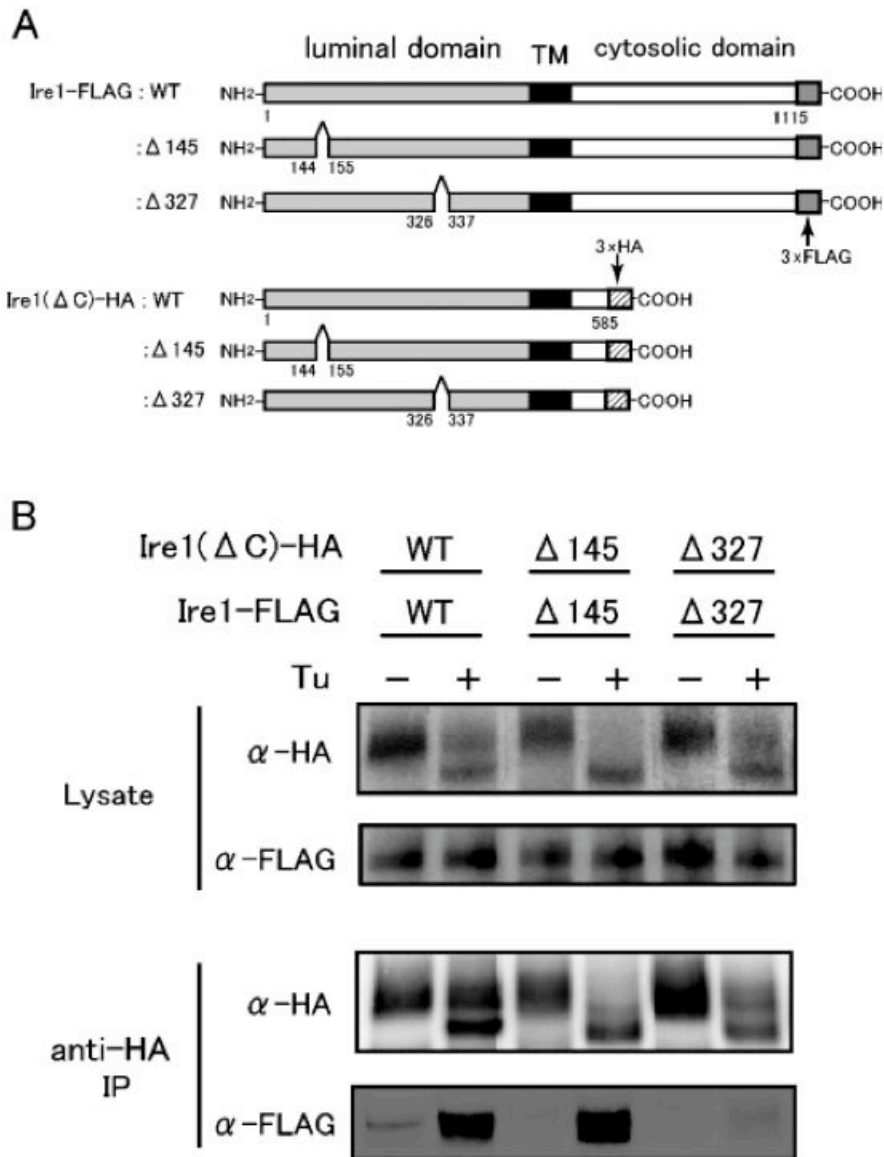


Fig.5 Δ327変異による*in vivo*でのホモ会合の阻害

(A):使用した各種コンストラクトの模式図

(B):ダブルタグIPによる*in vivo*ホモ会合の検出

*Dire1*株(KMY1015)内で、HAタグを付加した細胞質領域を持たないIre1(pRS315 Ire1ΔC-HA)と、Flagタグを持つ完全長Ire1(pRS426-Ire1-Flag)を発現させた。ストレス処理(ツニカマイシン2ug/ml, 1hr)の後、抗HA抗体で免疫沈降を行い、共沈降してくるIre1-Flagを、抗Flag抗体によるWesternにより検出した。

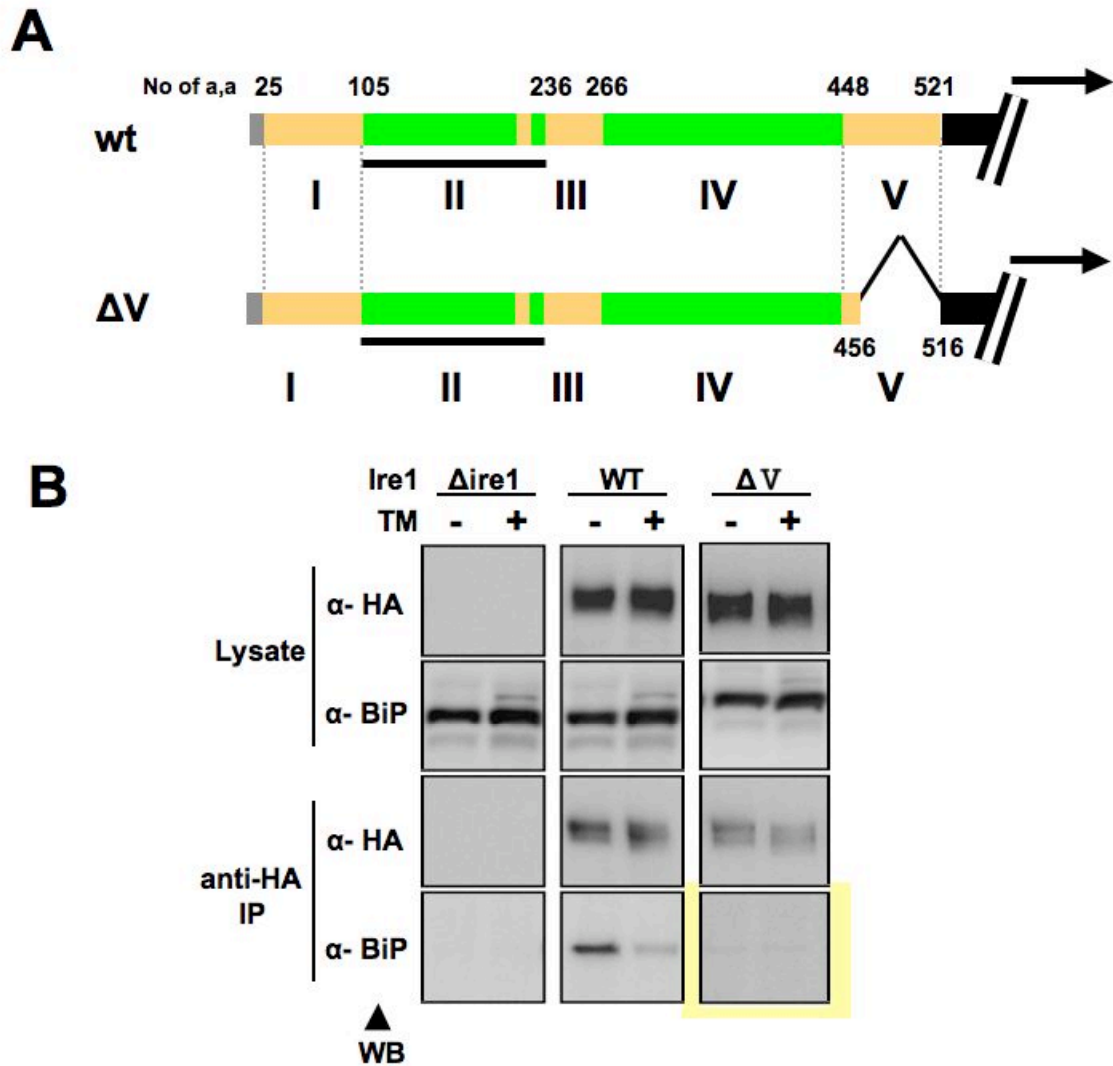


Fig.6 BiP結合部位はRegion Vに存在する

(A): Δ V mutantの模式図

(B): Δ V mutantにはBiPは結合しない

Δ ire1株(KMY1516)に、HAタグを付加した野生型 Ire1、または Δ V mutantを導入した(pRS-423-Ire1-HA)。抗HA抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈降してくるBiPを、抗BiP抗体によるWesternにより検出した。小胞体ストレスとしてツニカマイシン(2ug/ml 1hr)処理を行った。

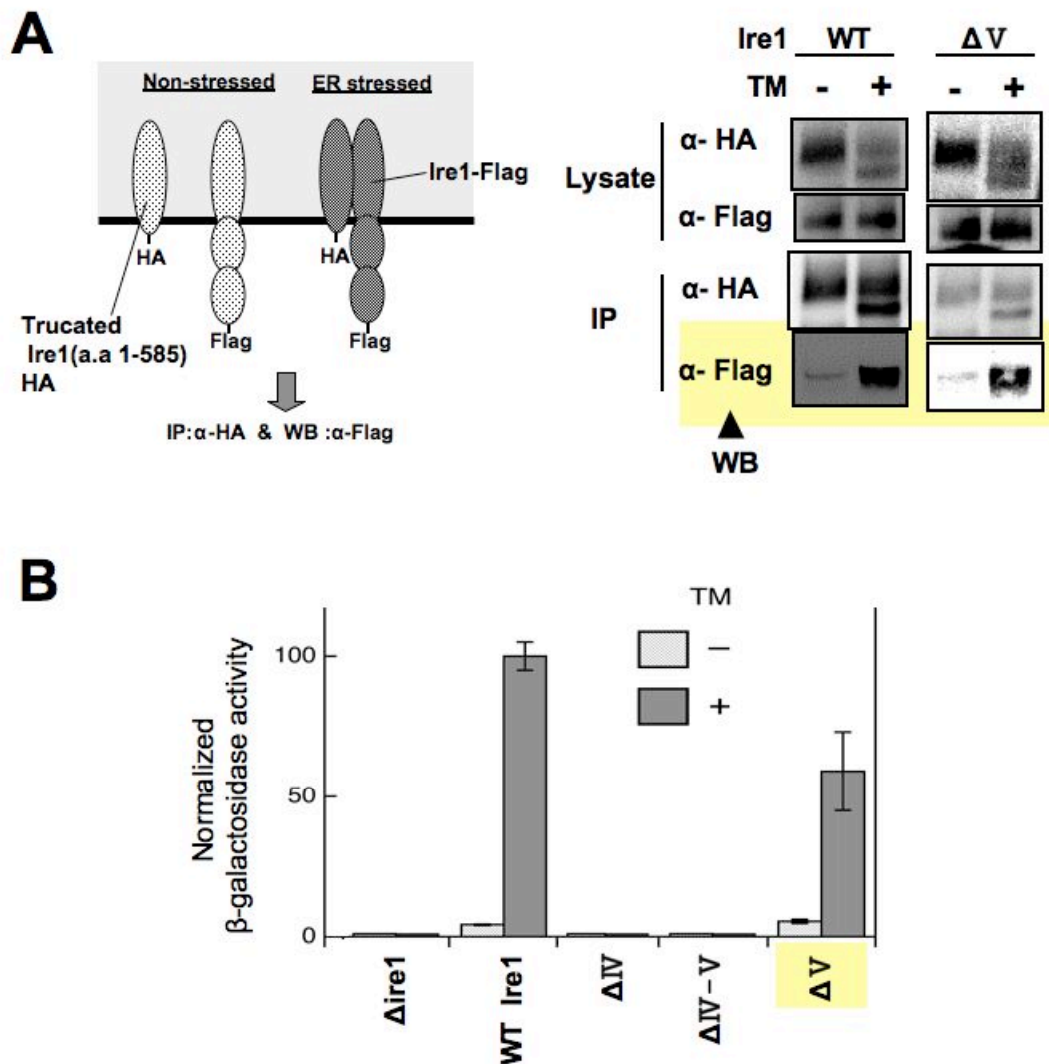


Fig.7 ΔV mutantは、ストレス依存的にホモ会合し正常なストレス応答性を保持している

(A): ΔV mutantはストレス依存的にホモ会合する

左: 実験の模式図

右: Western blot結果

$\Delta ire1$ 株 (KMY1015) 内で、HAタグを付加した細胞質領域を持たないIre1 (pRS315 Ire1 ΔC -HA)と、Flagタグを持つ完全長Ire1 (pRS426-Ire1-Flag)を発現させた。ストレス処理(ツニカマイシン2ug/ml, 1hr)の後、抗HA抗体で免疫沈降を行い、共沈降してくるIre1-Flagを、抗Flag抗体によるWesternにより検出した。

(B): ΔV mutantは正常なストレス応答性を持つ

UPRE-LacZレポーター (pCZY1)を持つ $\Delta ire1$ 株 (KMY1015)に、HAタグ付きの野生型Ire1、あるいは ΔV mutantを導入した (pRS315-Ire1-HA)。小胞体ストレスとしてツニカマイシン (2ug/ml 4hr)で処理した後、各Ire1の活性値を測定した。各値は、ストレス時の野生型Ire1を100として補正した。

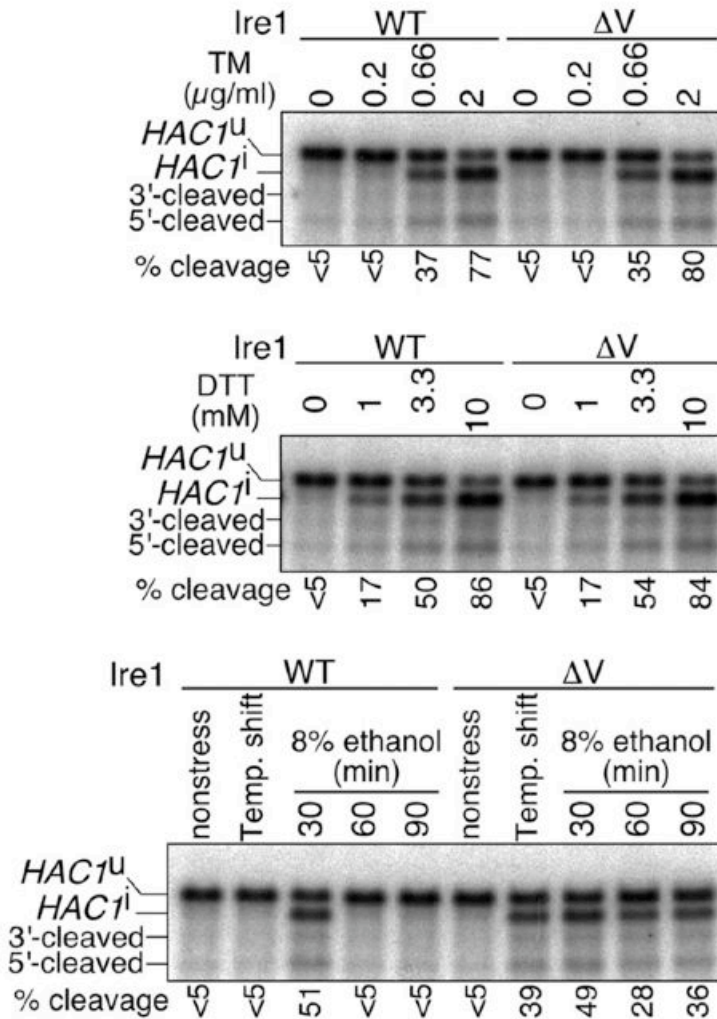
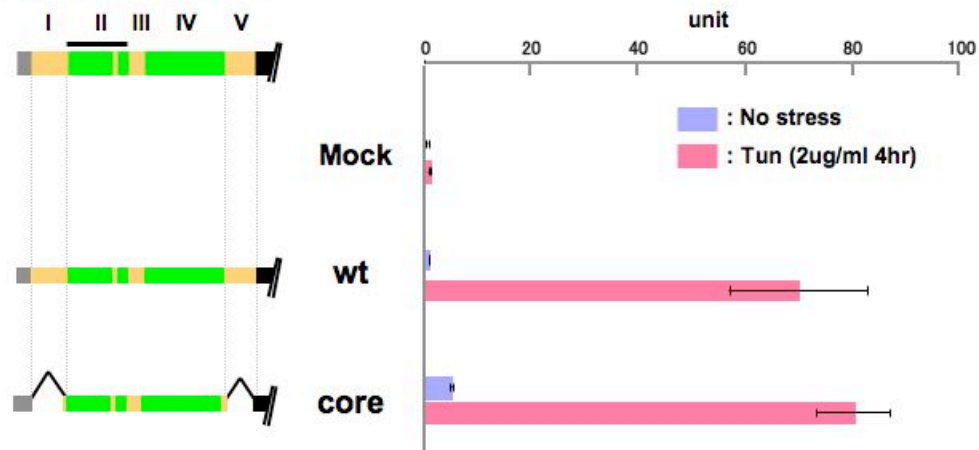
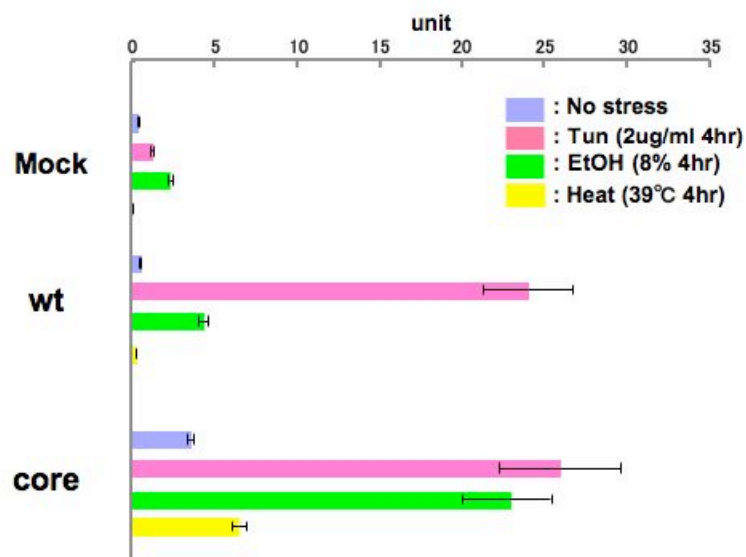


Fig.8 ΔV mutantの種々のストレスに対する応答性

*Δire1*株 (KMY1516) に野生型 *Ire1* または ΔV mutant を発現させ (pRS313-*Ire1*)、各種ストレス処理を行った。ツニカマイシン処理は各60 min、DTT処理は各40min、Temp.shiftは37°C 30minの後、さらに39°C 30min、エタノール処理は各時間行った。HAC1 mRNAに対するプローブによりNorthern blotを行い、その切断効率を算出した。

A**Diagram of each mutants****B****Fig.9 core mutant のストレス応答性**

(A):core mutantは正常なストレス応答性を保持している。

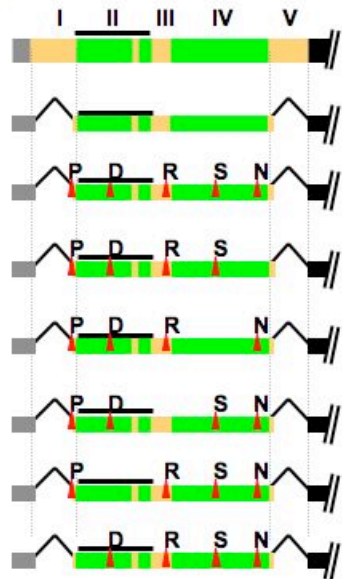
左:使用した変異体の模式図

右:UPRE-LacZレポーター(pCZY1)を持つ $\Delta ire1$ 株(KMY1015)に、野生型あるいはcore mutant Ire1を導入した(pRS315-Ire1-HA)。小胞体ストレスとしてツニカマイシン(2ug/ml 4hr)で処理した後、各Ire1の活性値を測定した。

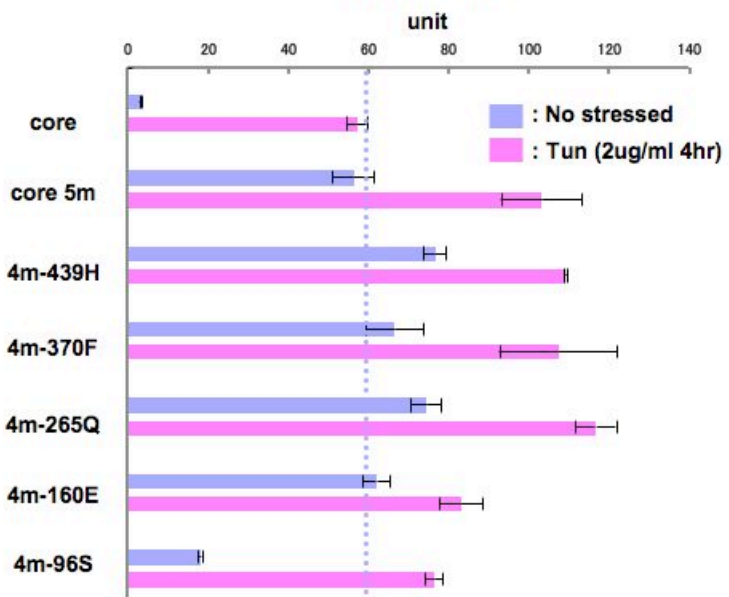
(B):core mutantはエタノールに対してhyper-sensitiveである。

同様のアッセイを、エタノール(8% 4hr)、熱処理(39°C4hr)について行った。

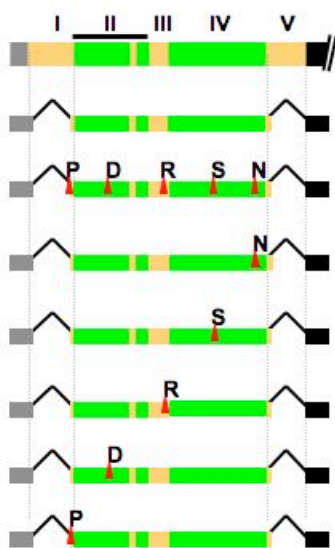
A Diagram of each mutants



β-gal assay



B Diagram of each mutants



β-gal assay

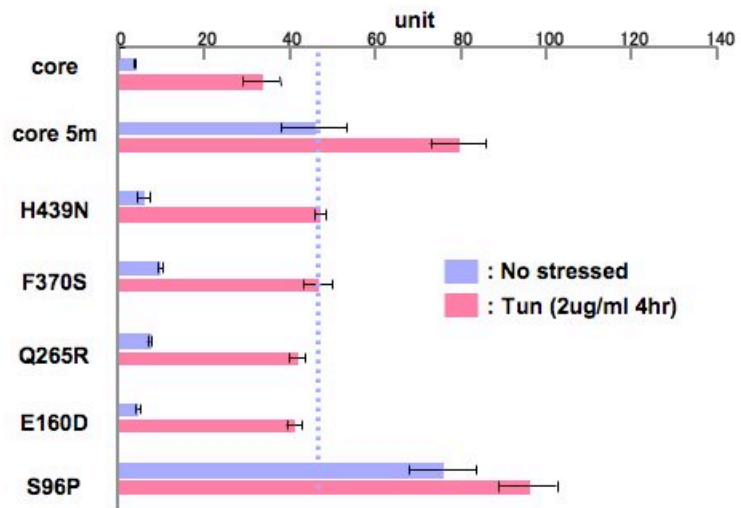


Fig.10 S96P変異はcore mutant の非ストレス下での活性を上昇させる

(A) (B): S96Pの1アミノ酸置換により、core mutantの活性が著しく上昇する。

左: 使用した変異体の模式図

右UPRE-LacZレポーター(pCZY1)を持つ*Δire1*株(KMY1015)に、各種アミノ酸置換を持ったcore mutant Ire1を導入した(pRS315-Ire1-HA)。小胞体ストレスとしてツニカマイシン(2ug/ml 4hr)で処理した後、各Ire1の活性値を測定した。

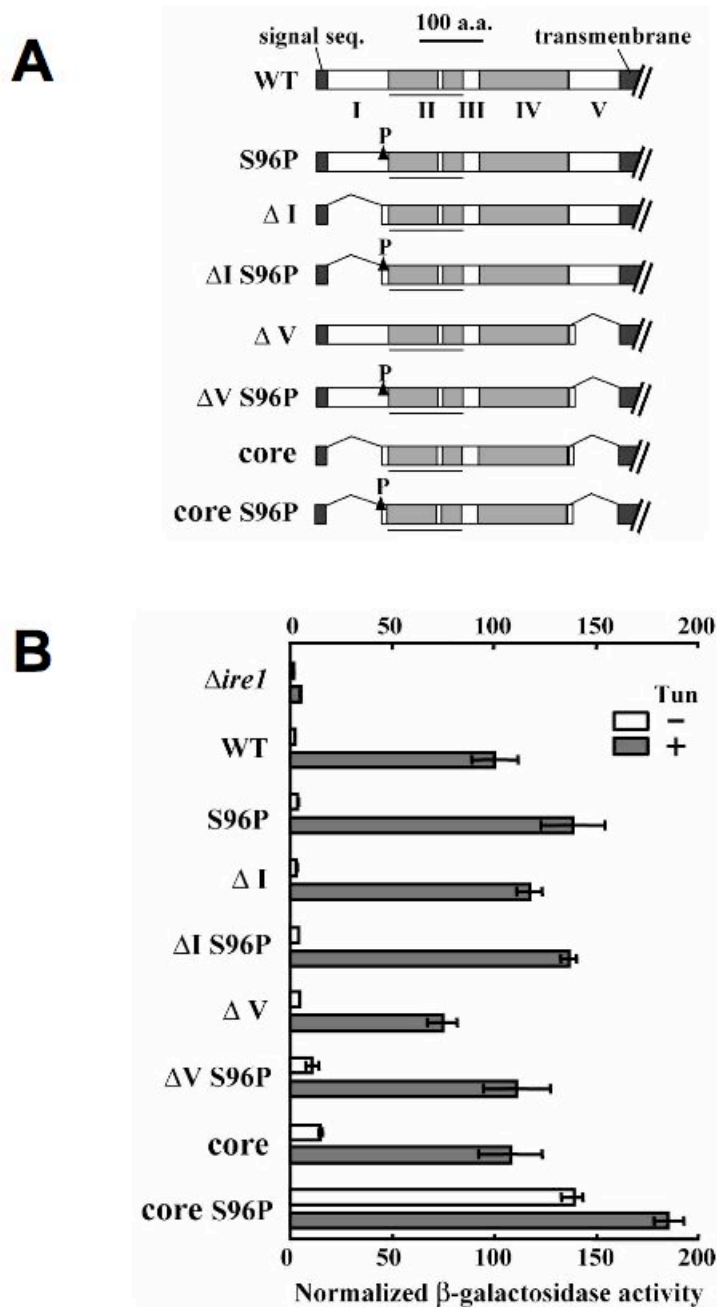


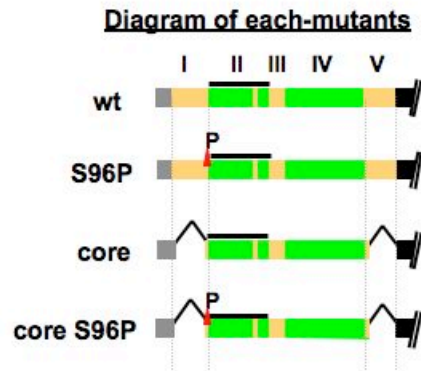
Fig.11 S96P変異はcore mutantの活性値を上昇させる

(A): アッセイに用いた各種変異体の模式図

(B): S96P変異はcore mutantの活性値を強く上昇させる

UPRE-LacZレポーター(pCZY1)を持つ $\Delta ire1$ 株(KMY1015)に、各種の変異Ire1を導入した(pRS315-Ire1-HA)。小胞体ストレスとしてツニカマイシン(2ug/ml 4hr)で処理した後、各Ire1の活性値を測定した。各値は、ストレス時の野生型Ire1を100として補正した。

A



B

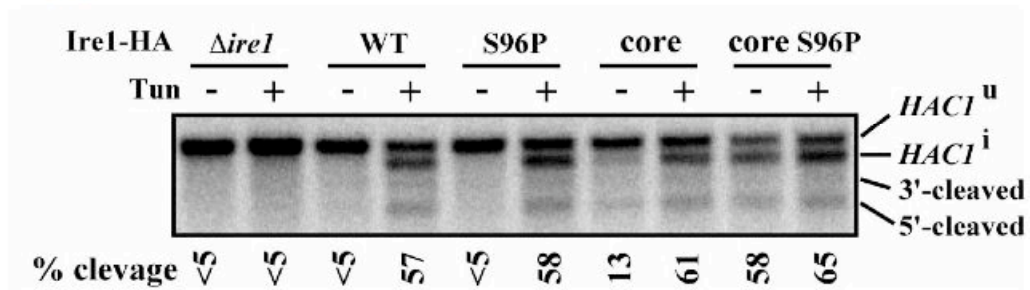


Fig.12 core S96P mutantによるHAC1 mRNAの切断効率

(A):用いた各種変異体の模式図

(B):各変異体によるHAC1 mRNAの切断効率

$\Delta ire1$ 株(KMY1516)に各種変異Ire1を発現させ(pRS313-Ire1-HA)、ツニカマイシン(2ug/ml 1hr)でストレス処理を行った。Total RNA 3ugを用いて、HAC1 mRNAに対するプローブにより Northern blotを行い、その切断効率を算出した。

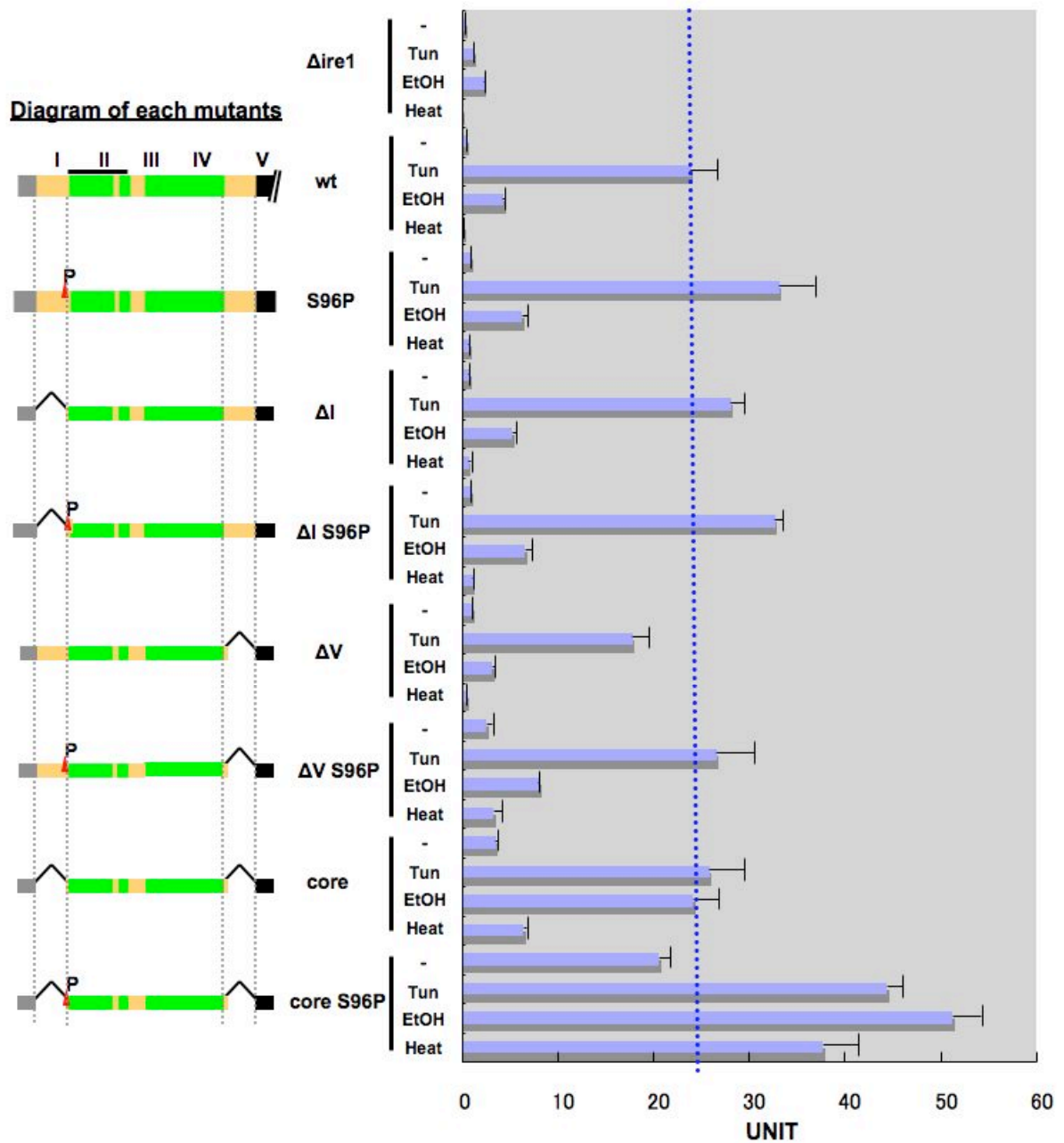


Fig.13 部分欠失変異体の種々のストレスに対する応答性

左:アッセイに用いた各種変異体の模式図

右:各ストレス下での変異Ire1の活性値

UPRE-LacZレポーター(pCZY1)を持つ Δ Ire1株(KMY1015)に、各種の変異Ire1を導入した(pRS315-Ire1-HA)。ツニカマイシン(2ug/ml 4hr)、エタノール(8% 4hr)、高温(39°C4hr)で処理した後、各Ire1の活性値を測定した。

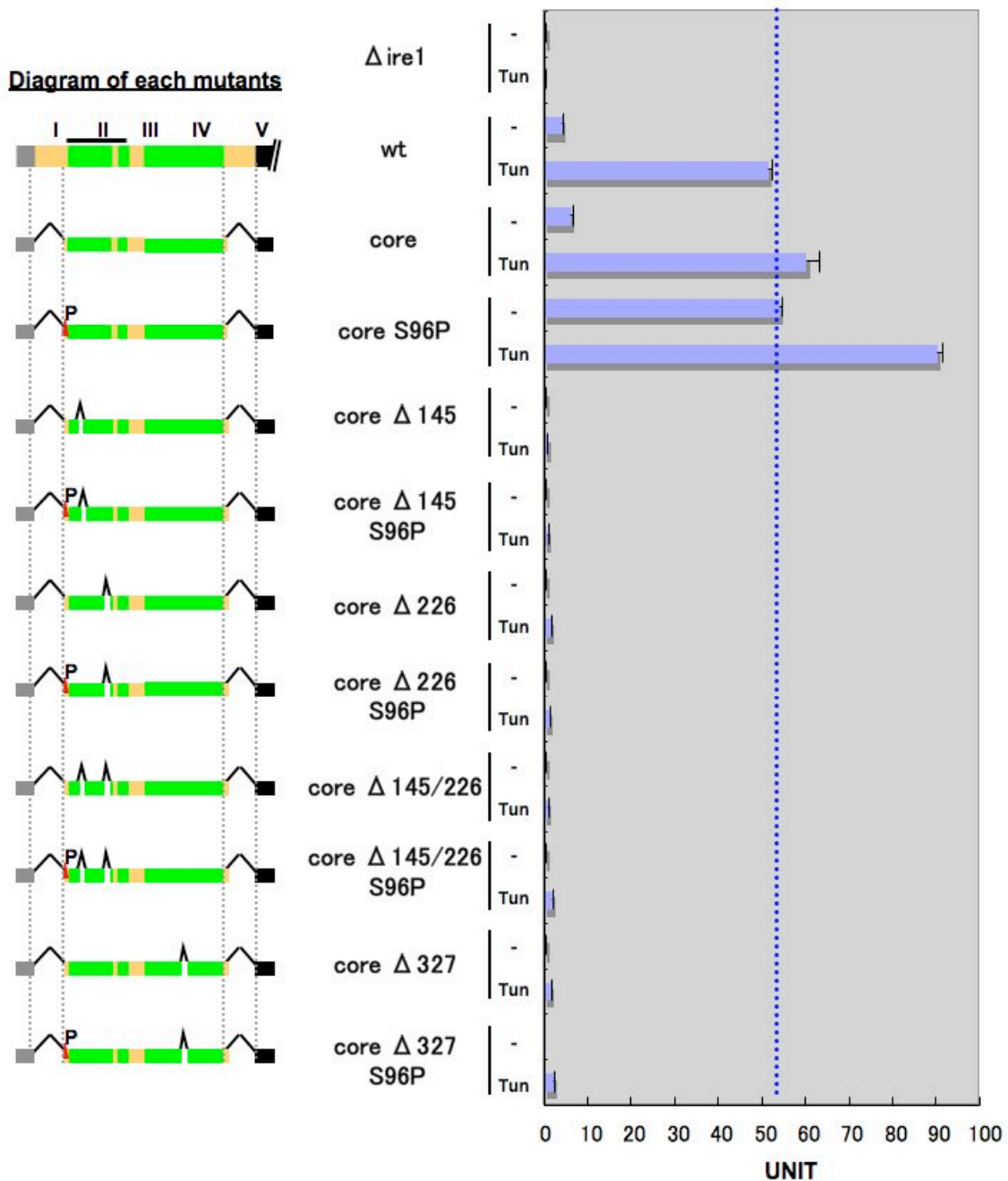


Fig.14 S96P変異は10アミノ酸欠失によるIre1の活性消失を相補しない

左:アッセイに用いた各種変異体の模式図

右:各ストレス下での変異Ire1の活性値

UPRE-LacZレポーター(pCZY1)を持つ $\Delta ire1$ 株(KMY1015)に、各種の変異Ire1を導入した(pRS315-Ire1-HA)。小胞体ストレスとしてツニカマイシン(2ug/ml 4hr)で処理した後、各Ire1の活性値を測定した。

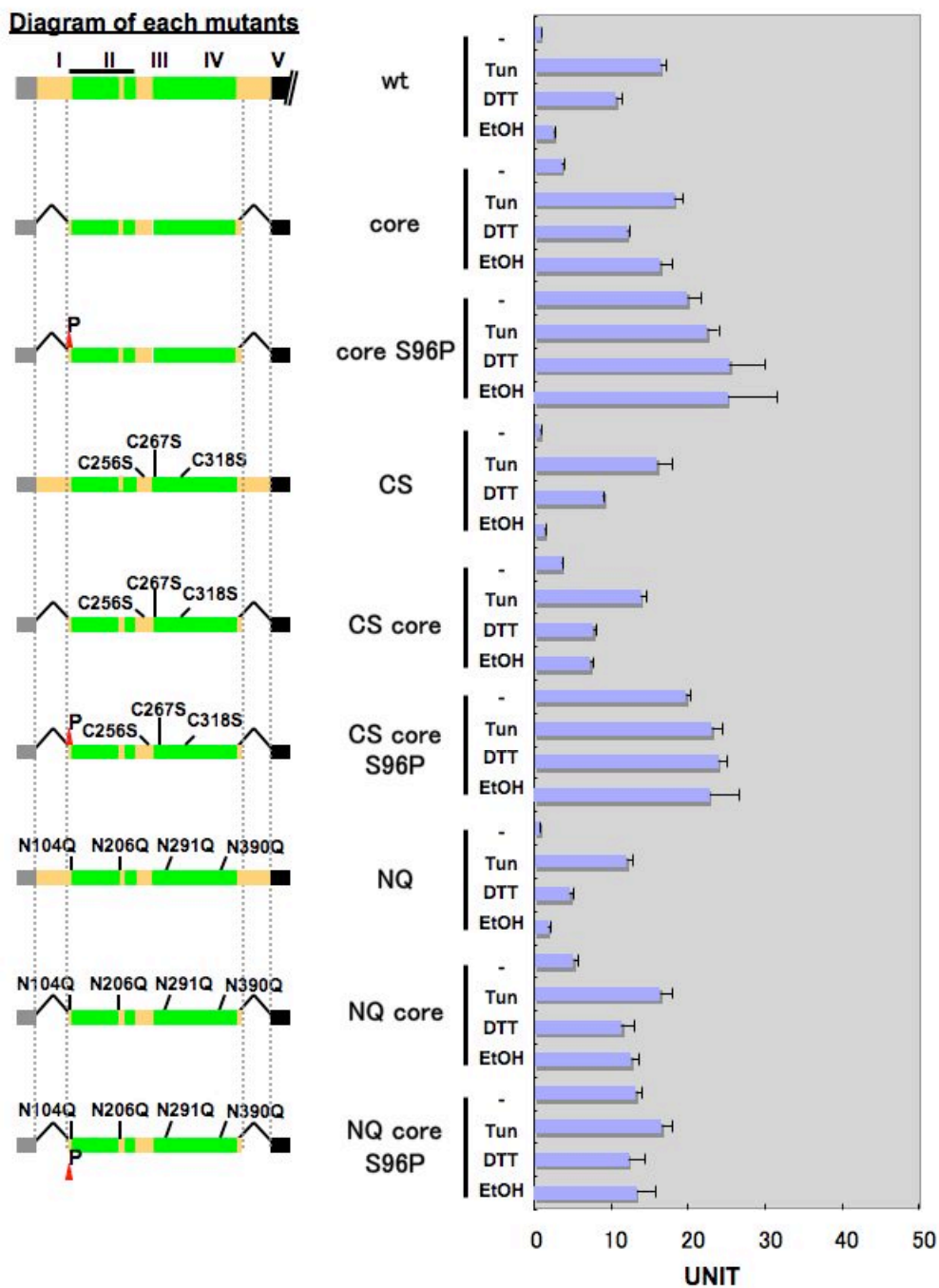


Fig.15 CS、NQ変異による各部分欠失変異体のストレス応答パターンへの影響

左:アッセイに用いた各種変異体の模式図

右:各ストレス下での変異Ire1の活性値

UPRE-LacZレポーター(pCZY1)を持つ $\Delta ire1$ 株(KMY1015)に、各種の変異Ire1を導入した(pRS315-Ire1-HA)。小胞体ストレスとしてツニカマイシン(2ug/ml 4hr)またはDTT(3mM 4hr)、あるいはエタノール(8% 4hr)で処理した後、各Ire1の活性値を測定した。

<i>IRE1</i> allele	Tun	β -galactosidase activity	
<i>Aire1</i>	-	0.55	\pm 0.09
	+	2.92	\pm 0.28
Wild type	-	3.07	\pm 0.38
	+	100.00	\pm 8.69
K702A	-	0.53	\pm 0.22
	+	2.16	\pm 0.71
S96P	-	6.27	\pm 0.44
	+	140.28	\pm 11.79
S96P/K702A	-	0.50	\pm 0.12
	+	2.04	\pm 0.82
core	-	23.81	\pm 4.50
	+	134.20	\pm 7.99
Core/K702A	-	0.58	\pm 0.32
	+	3.30	\pm 1.07
Core/S96P	-	128.11	\pm 8.24
	+	177.76	\pm 14.79
Core/S96P/K702A	-	0.82	\pm 0.19
	+	2.14	\pm 0.20

Table. III S96P変異による活性化には、細胞質領域のリン酸化が必要

UPRE-LacZレポーター (pCZY1) を持つ $\Delta ire1$ 株 (KMY1015) に、各種の変異 *Ire1* を導入した (pRS315-*Ire1*-HA)。小胞体ストレスとしてツニカマイシン (2ug/ml 4hr) で処理した後、各 *Ire1* の活性値を測定した。各値は、ストレス時の野生型 *Ire1* を100として補正した。

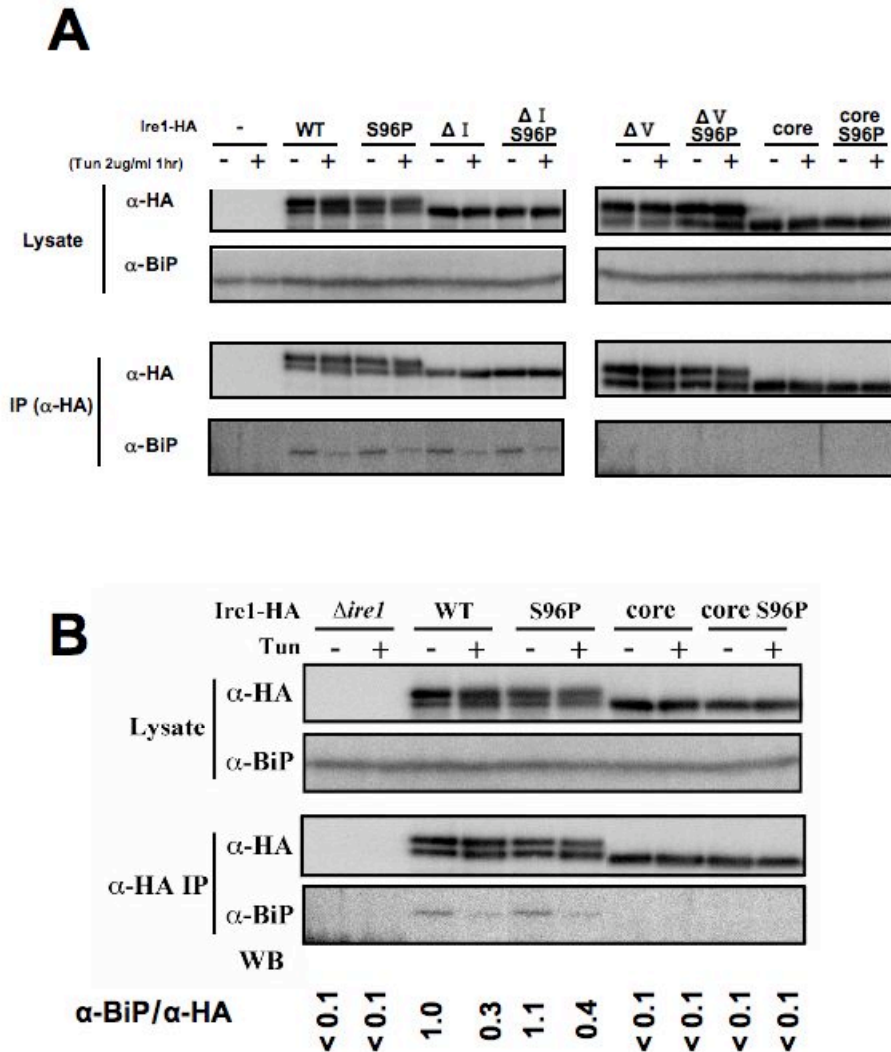


Fig.16 各種部分欠失変異体とBiPの相互作用

(A):各変異Ire1とBiPの相互作用

$\Delta ire1$ 株 (KMY1516) 内で、HAタグを付加した各種Ire1 (pRS423-Ire1-HA) を発現させた。ストレス処理 (ツニカマイシン2ug/ml, 1hr) の後、抗HA抗体で免疫沈降を行い、共沈降してくるBiPを、抗BiP抗体によるWesternにより検出した。

(B):core mutantはBiPと結合しない

(A)のうち、特にcore mutant、core S96P mutant変異について相互作用するBiPの量を、そのバンドから定量した。各値は野生型Ire1の非ストレス時を1.0として補正した。

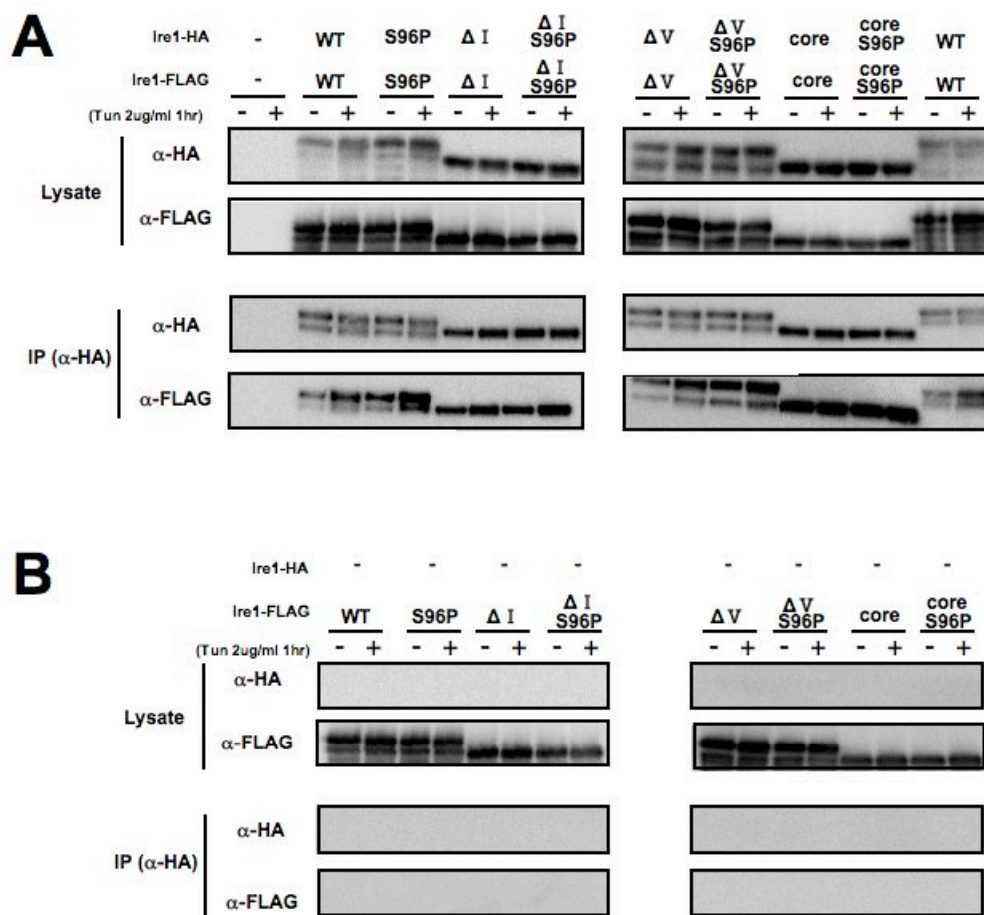


Fig.17 各種部分欠失変異体のストレス依存的なホモ会合

(A): 共免疫沈降法による各変異体のストレス依存的なホモ会合の評価
 $\Delta ire1$ 株 (KMY1015) 内で、HAタグを付加したIre1 (pRS315-Ire1-HA) と、Flagタグを付加したIre1 (pRS426-Ire1-Flag) を発現させた。ストレス処理 (ツニカマイシン 2ug/ml, 1hr) の後、抗HA抗体で免疫沈降を行い、共沈降してくるIre1-Flagを、抗Flag抗体によるWesternにより検出した。

(B): 各種Ire1-HAを発現していないコントロール実験
 (A)と同様の実験をIre1-HAの代わりにempty vector (pRS315) を用いて行った。

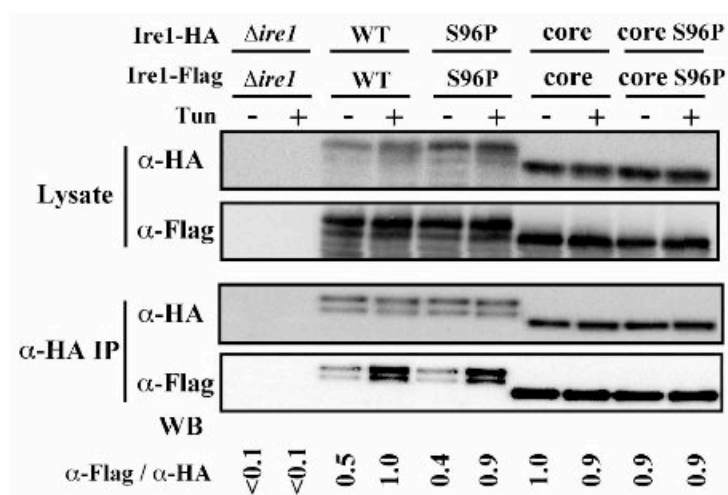


Fig.18 core mutantは恒常的にホモ会合体を形成する

共免疫沈降法によるcore mutantの恒常的なホモ会合の評価

*Δire1*株 (KMY1015) 内で、HAタグを付加したIre1 (pRS315-Ire1-HA)と、Flagタグを付加したIre1 (pRS426-Ire1-Flag)を発現させた。ストレス処理(ツニカマイシン2ug/ml、1hr)の後、抗HA抗体で免疫沈降を行い、共沈降してくるIre1-Flagを、抗Flag抗体によるWesternにより検出した。

Ire1-HAと共沈降してくるIre1-Flagの量を、そのバンドから定量した。各値は野生型Ire1のストレス時を1.0として補正した。

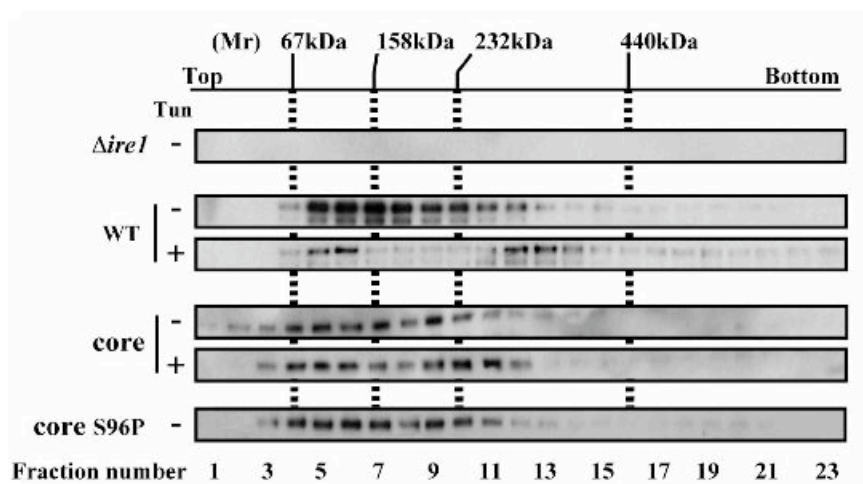


Fig.19 グリセロールグラジエント法によるIre1の2量体形成の評価

$\Delta ire1$ 株 (KMY1015) 内で、HAタグを付加した各変異Ire1 (pRS315-Ire1-HA)を発現させた。ストレス処理(ツニカマイシン2ug/ml、1hr)の後、細胞抽出液を5-25%のグリセロールグラジエントにより23のフラクションに分画した。各分画に含まれるIre1-HAを抗HA抗体によるWesternで検出した。

なお、同様の手法によりProtein size markerを分画し、各分画に含まれるprotein complexのサイズを評価した。

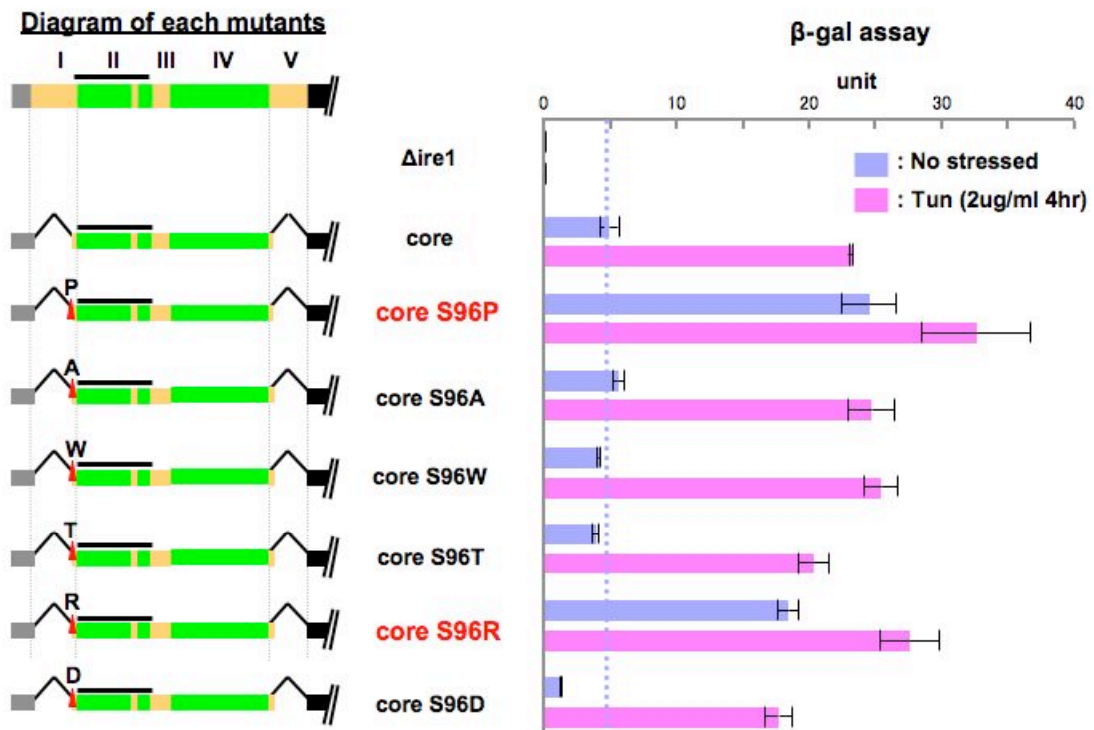


Fig.20 S96R変異もcore mutant の非ストレス下での活性を上昇させる。

左:アッセイに用いた各種変異体の模式図

右:ストレス下での各変異Ire1の活性値

UPRE-LacZレポーター(pCZY1)を持つ $\Delta ire1$ 株(KMY1015)に、各種の変異Ire1を導入した(pRS315-Ire1-HA)。小胞体ストレスとしてツニカマイシン(2ug/ml 4hr)で処理した後、各Ire1の活性値を測定した。

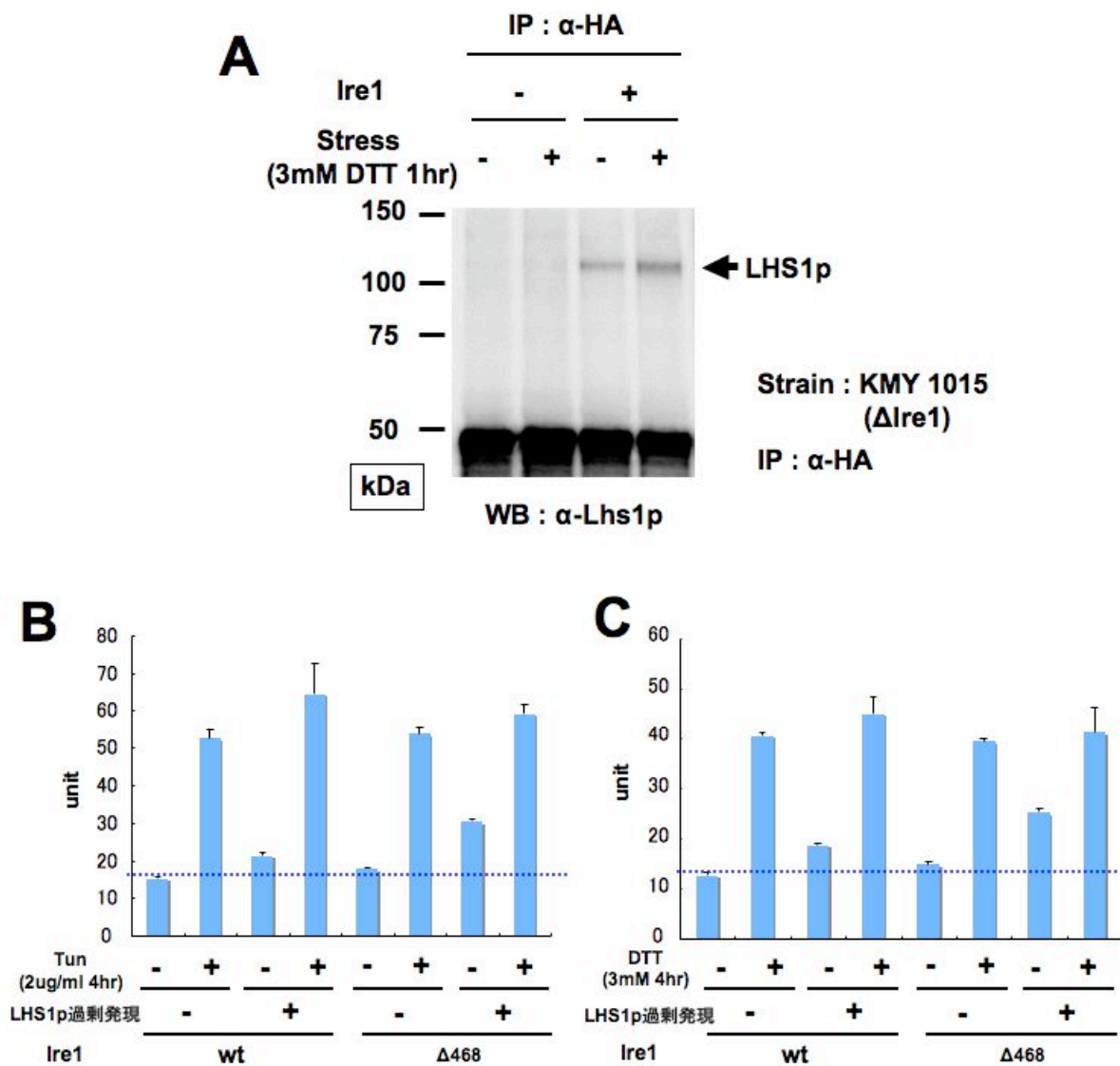


Fig.21 Ire1と相互作用する小胞体シャペロンLHS1p

(A):LHS1pはIre1と相互作用する

Δ ire1株(KMY1015)内で、HAタグを付加したIre1(pRS315-Ire1-HA)を発現させ、ストレス処理(DTT 3mM、1hr)後、抗HA抗体で免疫沈降を行い、共沈降してくるLHS1pを抗LHS1p抗体によるWesternにより検出した。

(B)(C):LHS1p過剰発現のIre1活性値への影響

UPRE-LacZレポーター(pCZY1)を持つ Δ ire1株(KMY1015)に、野生型あるいは Δ 468変異Ire1を導入した(pRS315-Ire1-HA)。小胞体ストレスとしてツニカマイシン(2ug/ml 4hr for B)またはDTT(3mM 4hr for C)で処理した後、各Ire1の活性値を測定した。

謝辞

このような研究の機会を与えて下さいました河野憲二教授、木俣行雄助手、都留秋雄助手、並びに斎藤美知子助手には、お礼の言葉ありません。特に、木俣行雄助手には、研究方針の決定や論文の作成など、様々な側面でご指導いただきました。深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、技術補佐員の飯田純子さん、博士研究員の竹内雅人氏、木村太地氏をはじめとする当研究室の皆様には、適切な指導や助言を頂き、また、様々な側面でサポートして頂きました。厚く御礼を申し上げます。

理化学研究所岩脇独立主幹研究ユニットの岩脇隆夫氏、細田章氏には特別な御助言、御協力をいただきました。この場を借りて、深く感謝いたします。



Supplemental figure

出芽酵母Ire1小胞体内腔領域のアミノ酸配列と変異導入箇所

論文目録

所属 (主指導教員)	動物細胞工学講座 (河野憲二 教授)		
氏名	及川大輔	提出	平成 19年 1月 29日
<p>学位論文の主たる部分を公表した論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)</p> <ul style="list-style-type: none"> • “An essential dimer-forming subregion of the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1.” Oikawa D, Kimata Y, Takeuchi M, Kohno K. Biochemical Journal vol391(pt1), pp135-142, 2005. • “A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1.” Kimata Y, Oikawa D, Shimizu Y, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K. The Journal of Cell Biology vol167, pp445-456, 2004. <p>参考論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 「小胞体ストレス感知機構」 (日本語総説) 及川大輔 木俣行雄 河野憲二 実験医学 (増刊号) vol23, No15, 117(2327)-122(2332), 2005 			