

所属 (主指導教員)	動物細胞工学講座 (河野 憲二 教授)		
氏名	今川 佑介	提出	平成19年12月25日
題目	小胞体ストレスセンサーIRE1の機能解析		

要旨

細胞が正常に機能するためには、遺伝情報に従って合成されたタンパク質が正しい高次構造をとることが必要不可欠である。しかし、細胞がグルコース飢餓などのストレスを受けると、小胞体でのタンパク質の折りたたみに不具合が生じ、構造異常タンパク質が小胞体内に蓄積する。この状態は、小胞体ストレスと呼ばれ、細胞にとって致命的なダメージとなる。そこで細胞は、これらのストレスに対抗するため、Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれる一群の遺伝子の転写レベルでの誘導とタンパク質の翻訳抑制からなる細胞内シグナル経路や Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD) と呼ばれる異常タンパク質をユビキチン-プロテアソーム系により分解する経路を活性化する。小胞体ストレスセンサー分子 IRE1 は、小胞体ストレス応答において重要な分子のひとつであり、哺乳動物には IRE1 α と IRE1 β の二つのパラログが存在する。これらのアイソフォームはともに小胞体内腔にセンサー領域を、サイトゾル側にキナーゼ領域、リボヌクレアーゼ (RNase) 領域を有する I 型膜貫通タンパク質で、小胞体ストレスを感知すると二量体化し、自己リン酸化することによって活性化するが、小胞体ストレス応答におけるその役割は異なっている。IRE1 α は、小胞体ストレス条件下で転写因子 XBP1 の mRNA をスプライソソーム非依存的に選択的スプライシングし、フレームシフトした mRNA から翻訳された活性型 XBP1 が小胞体分子シャペロンや ERAD 関連因子などの UPR 標的遺伝子群を転写レベルで誘導する。一方、IRE1 β は、同条件下で 28S rRNA の部位特異的切断およびタンパク質の翻訳抑制を導くことが示されている。

本研究は、この IRE1 の各機能の詳細を明らかにすることを目的に行った。本論文では、(1)「IRE1 α と IRE1 β の機能の違いにおける RNase 領域の役割」、(2)「XBP1 mRNA スプライシングの *in vitro*での解析」の2点に関し報告する。

(1) IRE1 α と IRE1 β の機能の違いにおける RNase 領域の役割

この研究において、私は、IRE1 α と IRE1 β の機能の違いが、それぞれの RNase 領域の基質特異性の違いによるものであるかを調べた。*In vivo*において、IRE1 β の RNase 領域を IRE1 α の RNase 領域と入れ換えたキメラ体 (IRE1 β / α R) を HeLa 細胞に過剰発現させた場合には、野生型 IRE1 α と同様、XBP1 mRNA のスプライシングを引き起こすことが観察され、

IRE1 α の RNase 領域を IRE1 β の RNase 領域と入れ換えたキメラ体 (IRE1 α/β R) を過剰発現させた場合には、野生型 IRE1 β と同様、28S rRNA の切断を導くことが観察された。また、組換えタンパク質を用いた *in vitro* での切断解析の結果、*XBPI* mRNA は、IRE1 α によってより強く直接切断されていることが確認された。一方で、28S rRNA は、どちらの IRE1 によっても直接切断されるが、IRE1 α に比べて IRE1 β がより強い切断活性を示した。これらの結果から、IRE1 α と IRE1 β の機能の違いは、それらの RNase 領域の基質特異性の違いに依存することが示唆された。IRE1 α は、さまざまな組織で発現しているが、IRE1 β は、消化器系組織特異的に発現していることから、IRE1 β に依存した臓器特異的な小胞体ストレス応答の存在が考えられる。

(2) *XBPI* mRNA スプライシングの *in vitro* での解析

酵母の UPR において、転写因子 Hac1p の mRNA がスプライソソーム非依存的に特異な選択的スプライシングを受けることが知られている。この反応は、*HAC1* mRNA が小胞体ストレスセンサー分子 Ire1p により切断され、次いで Rlg1p という tRNA リガーゼにより連結される。哺乳動物においては、転写因子 XBP1 の mRNA が同種のスプライシングを受けることが知られているが、IRE1 α によって切断された後の連結反応に関してはほとんど知られていない。そこで、本研究において、私は、*XBPI* mRNA スプライシング機構を解明するため、*in vitro* でこの連結反応を再構成することを試み、IRE1 α 組換えタンパク質で切断した *XBPI* mRNA 断片が HeLa 細胞の抽出液に含まれる RNA リガーゼ活性により連結されることを見出した。また、この再構成系を用いて、各細胞内画分抽出液のリガーゼ活性を比較した結果、細胞質画分において強いリガーゼ活性が観察され、さらに、この活性の局在は小胞体ストレス処理による影響を受けないことが確認された。このことから、*XBPI* mRNA スプライシングは、核ではなく細胞質で起きている可能性が強く示唆された。また、この連結反応には、GTP は必須であるが、ATP は必須ではないことが示された。*HAC1* mRNA のスプライシングでは、tRNA スプライシングと同様に GTP と ATP が必須であることが知られていることから、*XBPI* mRNA のスプライシングは、*HAC1* mRNA スプライシングとは異なる新たなスプライシング様式であると考えられた。

さらに、このリガーゼ活性を有する物質を細胞抽出液から分離精製することを試み、現在までに約 30 種の候補タンパク質を同定した。今後さらに精製を進め、リガーゼ活性物質を同定し、*XBPI* mRNA スプライシング機構を解明したい。

小胞体ストレスセンサーIRE1 の機能解析

今川 佑介

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物細胞講座

(河野 憲二 教授)

平成19年12月25日提出

目 次

第一部 「IRE1 α と IRE1 β の機能の違いにおける RNase 領域の役割」・・・ 3

序 論・・・・・・・・・・・・・・・・ 4

材料と方法・・・・・・・・・・・・ 9

結 果・・・・・・・・・・・・・・・・ 13

考 察・・・・・・・・・・・・・・・・ 25

第二部 「XBPI mRNA スプライシングの *in vitro* での解析」・・・ 27

序 論・・・・・・・・・・・・・・・・ 28

材料と方法・・・・・・・・・・・・ 29

結 果・・・・・・・・・・・・・・・・ 35

考 察・・・・・・・・・・・・・・・・ 62

謝 辞・・・・・・・・・・・・・・・・ 66

参考文献・・・・・・・・・・・・ 70

第一部

「IRE1 α と IRE1 β の機能の違いにおける RNase 領域の役割」

序 論

小胞体は、真核生物細胞において高度に発達した膜構造をとる細胞小器官の一つで、分泌タンパク質や膜タンパク質の産生と品質管理を行っている。これらのタンパク質となるポリペプチド鎖は、粗面小胞体上のリボソームで合成され、トランスロコンを通じて小胞体内腔に入る。小胞体に入った新生ポリペプチド鎖は、小胞体分子シャペロンやオリゴ糖転移酵素などの酵素によって正しく折りたたまれ修飾されることにより、成熟型タンパク質となる(Gething and Sambrook, 1992; Helenius et al., 1992)。

細胞がグルコース飢餓や低酸素状態、ウイルス感染、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵の乱れなどの環境要因にさらされると、小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積する。この状態は、小胞体ストレスと呼ばれ、細胞にとって致命的なダメージとなり(Schroder and Kaufman, 2005)、近年では、アルツハイマー病やグルタミン病などの神経変性疾患や糖尿病などの生活習慣病、癌などさまざまな疾患と関わっていることが報告されている(Katayama et al., 1999; Ozcan et al., 2004; Marciniak and Ron, 2006; Moenner et al., 2007)。そこで、細胞は、小胞体ストレスから身を守るため、Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれる経路を活性化させる。この反応は、少なくとも二つの経路からなる(Kaufman, 1999)。一つは、BiP などの小胞体分子シャペロンや PDI などのタンパク質の折り畳みを促進する酵素を含む UPR 遺伝子群の転写レベルでの誘導で(Lee et al., 2003; Ron, 2002)、タンパク質のフォールディングを促進し、小胞体内のタンパク質フォールディングの許容量を増大させる(Kozutsumi et al., 1988; Kaufman, 1999;)。もう一つの経路は、全般的なタンパク質の翻訳抑制で、小胞体への新生ポリペプチド鎖の流入量を減少させ、小胞体内で折りたたむべきタンパク質を減少させる経路である(Brostrom and Brostrom, 1990; Lu et al., 2004)。これとは別に、Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD) と呼ばれる異常タンパク質をユビキチン-プロテアソーム系により分解する経路も活性化させる(Bonifacino and Weissman, 1998; Plemper and Wolf, 1999) (Fig. 1)。ERAD に働く因子のいくつかは UPR での転写誘導により発現制御されており、これらの因子が誘導されなければ ERAD は持続的に働き得ないこと、ERAD が機能しないと UPR の活性が高まるなどの結果から、小胞体内のタンパク質折り畳み機構において UPR と ERAD は協調的、補完的に作用していると考えられている(Hosokawa et al., 2001; Lee et al., 2003; Yoshida et al., 2003)。

I 型小胞体膜タンパク質である IRE1 は、小胞体ストレス応答において鍵となる分子で、小胞体内腔センサードメインとキナーゼドメインとエンドリボヌクレアーゼ (RNase) ドメインを含むサイトゾル機能領域からなる。IRE1 は、小

胞体ストレスを感知すると、二量体化し、キナーゼドメインによる自己リン酸化とそれに続く RNase ドメインの活性化を導く (Cox et al., 1993; Mori et al., 1993; Welihinda and Kaufman, 1996; Sidrauski and Walter, 1997)。哺乳動物細胞において、IRE1 には、IRE1 α と IRE1 β の2つのアイソフォームが見つかっており、ともに小胞体ストレスセンサーとして知られている (Tirasophon et al., 1998; Wang et al., 1998; Iwawaki et al., 2001)。IRE1 α は全組織的に発現しているが、IRE1 β は、消化器官においてのみ発現が確認されている (Tirasophon et al., 1998; Bertolotti et al., 2001)。ヒト IRE1 α (hIRE1 α) とヒト IRE1 β (hIRE1 β) のアミノ酸配列を比較すると、センサードメインで 48%、キナーゼドメインで 80%、RNase ドメインで 61% の相同性がある (Iwawaki et al., 2001) (Fig. 2)。しかし、これらの構造的相似に反して、その機能は異なっている (Tirasophon et al., 1998; Wang et al., 1998; Iwawaki et al., 2001)。小胞体ストレス条件下で、IRE1 α は、スプライソソーム非依存的な *XBPI* プレ mRNA の選択的プロセッシングを触媒し、活性型の転写因子 XBP1 タンパク質の産生を導く (Yoshida et al., 2001; Calfon et al., 2002; Lee et al., 2002)。この活性型 XBP1 は、小胞体シャペロン分子 BiP のほか (Yoshida et al., 2001)、レクチン様タンパク質 EDEM (Yoshida et al., 2003) や ディスロコンチャネルの候補として報告されている Derlin 2/3 (Oda et al., 2006)、トランスロコン会合複合体 (TRAP) (Nagasawa et al., 2007) など ERAD に関わる分子の転写を促進する。一方、当研究室の以前の解析において、hIRE1 β は 28S rRNA の部位特異的切断とタンパク質翻訳の抑制を引き起こすことを見だし、報告している (Iwawaki et al., 2001)

そこで、第一部では、小胞体ストレス応答の主要な経路にさまざまに関わる IRE1 の機能差について解析を行った。*In vivo* において、IRE1 β の RNase ドメインを IRE1 α の RNase ドメインと入れ換えたキメラ体を HeLa 細胞に過剰発現した場合には、野生型 IRE1 α と同様、*XBPI* mRNA のスプライシングを引き起こし、反対に、IRE1 α の RNase ドメインを IRE1 β の RNase ドメインと入れ換えたキメラ体を過剰発現した場合には、野生型 IRE1 β と同様、28S rRNA の切断を引き起こすことを確認した。また、組換えタンパク質を用いた *in vitro* の切断解析から、*XBPI* mRNA の切断は、IRE1 α 存在下で、より強く引き起こされるが、28S rRNA の切断は、IRE1 α と比較して IRE1 β 存在下で、より強く引き起こされることを確認した。そして、これらの結果から、IRE1 α と IRE1 β の機能の違いは、それらの RNase ドメインに依存することを示し、その基質特異性によるものであると示唆した。

Fig. 1

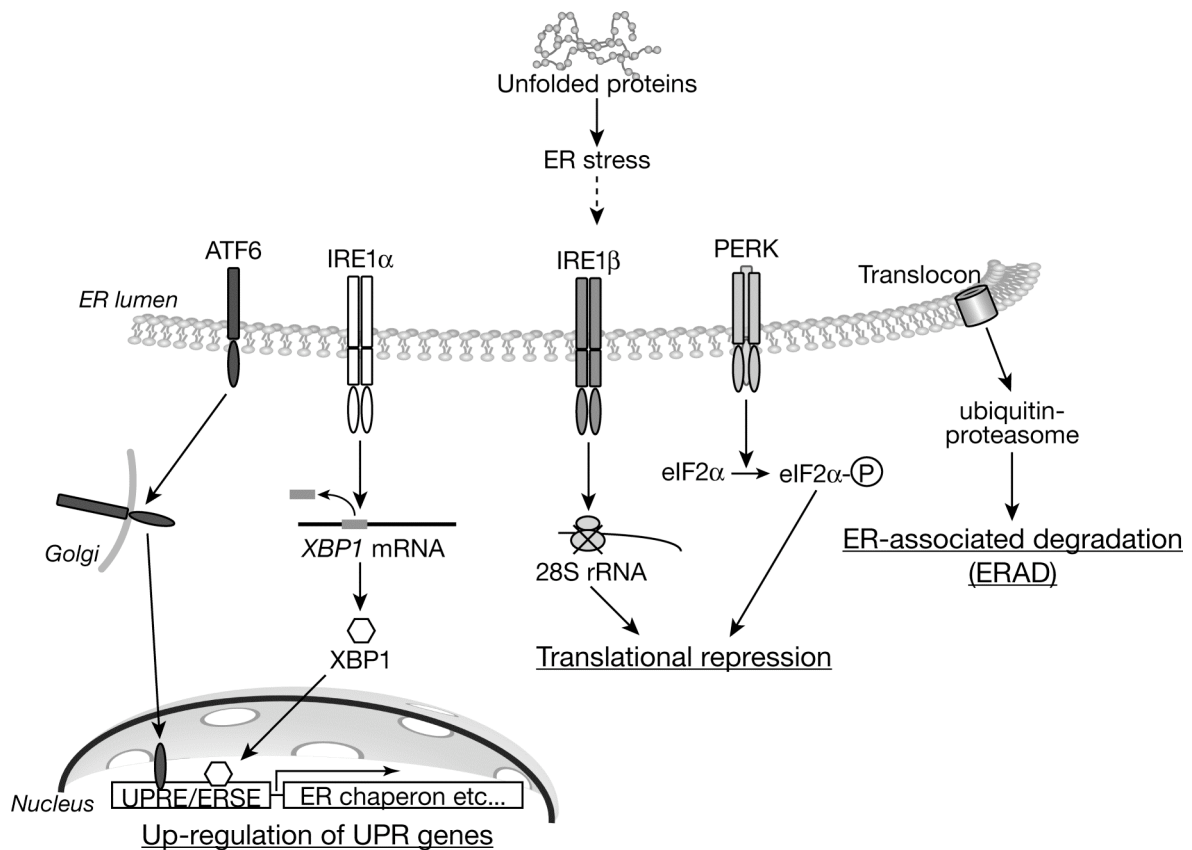


Fig. 1

哺乳動物における小胞体ストレス応答の概略図

小胞体ストレス条件下で、II型小胞体膜貫通転写因子である ATF6 はゴルジ体に移行し、そこで S1P、S2P プロテアーゼにより切断され細胞質に断片を生じる。その遊離した ATF6 の断片は核に移行し転写因子として働き、UPR 遺伝子群の上流にある ER Stress response Element (ERSE) と呼ばれるシス配列に結合し、UPR 遺伝子群の転写を誘導する (Haze et al., 1999; Ye et al., 2000; Yoshida et al., 2000)。また、IRE1 α は同条件下で転写因子 XBP1 の mRNA をスプライソソーム非依存的にフレームスイッチ型でスプライシングし、そのスプライシングされた mRNA から翻訳された転写因子 XBP1 が ERSE や ERAD 関連因子などの UPR 遺伝子群の上流にあるシス配列 Unfolded Protein Response Element (UPRE) に結合し UPR 標的遺伝子群を誘導する (Yoshida et al., 2001; Calton et al., 2002; Lee et al., 2002)。これにより小胞体内でのタンパク質の折り畳みを促進する。

一方、IRE1 β は小胞体ストレス条件下で 28S rRNA の部位特異的切断とタンパク質の翻訳抑制をする (Iwawaki et al., 2001)。また、I型小胞体膜貫通プロテインキナーゼである PERK (Harding et al., 1999) は、同条件下で、翻訳開始因子 2 の α サブ

ユニット(eIF2 α)のリン酸化を引き起こす(Bertolotti et al., 2000)。eIF2 α のリン酸化は、転写開始コドンの認識を減少させ、43S 翻訳開始複合体の形成を抑えることにより、タンパク質の翻訳を抑える(Clemens, 1994)。これにより小胞体内でフォールディングすべき新生ポリペプチドの増加を抑え、小胞体分子シャペロンの負担を軽減できる。

さらに、構造異常タンパク質は、小胞体からトランスロコンを通して細胞質に逆輸送され、細胞質のユビキチンプロテアソーム系により分解される。

Fig. 2

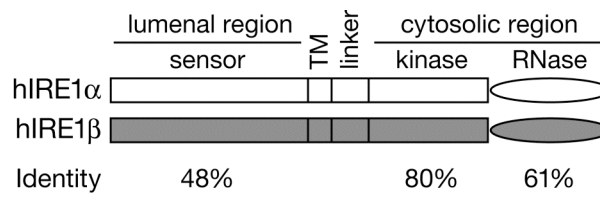


Fig. 2

ヒト IRE1 の構造と相同性

IRE1 は、I 型小胞体膜タンパク質で、小胞体内腔センサードメインとキナーゼドメインとエンドリボヌクレアーゼ (RNase) ドメインを含むサイトゾル機能領域からなる。TM は、膜貫通領域を示す。

また、hIRE1 α と hIRE1 β のアミノ酸配列は、センサードメインで 48%、キナーゼドメインで 80%、RNase ドメインで 61%の相同性がある(Iwawaki et al., 2001)。

材料と方法

プラスミドの作成

hIRE1 α と hIRE1 α K599A cDNA を含むプラスミドは、R.J. Kaufman 博士(ミシガン大学)からいただいた。これらのインサートは、*EcoRI* サイトを含むプライマーを用いて PCR を行った。IRE1 変異体は、以前に示された方法(Higuchi, 1990)で、オーバーラップ PCR によって作製し、DNA シーケンスによって配列を確認した。一過的発現プラスミド hIRE1 α 、hIRE1 α K599A、hIRE1 α K907A、hIRE1 β / α R、hIRE1 β 、hIRE1 β K547A、hIRE1 β K855A、hIRE1 α / β R は、哺乳動物発現ベクター-pCAGGS (Niwa et al., 1991)の *EcoRI* に挿入した(Sasaka, 2003)。pGL3-hBiP (-132)は K. Mori 博士(京都大学)からいただいた。

バキュロウイルス発現用プラスミド pFB-WT α (hIRE1 α のサイトゾル領域)は、hIRE1 α のリンカードメインを含む 510 アミノ酸の領域(アミノ酸 468-977)をコードする PCR 産物を pFastBacHTa (Invitrogen #10584-027)の *EcoRI*-*HindIII* サイトに挿入して作製した。同様に、pFB-WT β (hIRE1 β のサイトゾル領域)は、hIRE1 β のアミノ酸 451-925 をコードする PCR 産物を pFastBacHTa の *EcoRI*-*HindIII* サイトに挿入して作製した(Imagawa, 2004)。

ヒト *XBPI* cDNA の 410-633 ヌクレオチドと FLAG タグを含む *XBPI* mRNA *in vitro* 転写用ベクターは、PCR を用いて増幅し、pBluescript II SK+ (Stratagene)の *KpnI*-*BamHI* サイトに挿入した。*XBPI* 変異体ベクター[5' G(-1)C, 3' G(-1)C, 5', 3' G(-1)C]は、以前に報告された方法(Higuchi, 1990)でオーバーラップ PCR を行い、作製した。*XBPI* mRNA 5' G(-1)C は、530 番目のグアニン(G)をシトシン(C)に、3' G(-1)C は、556 番目の G を C に、5', 3' G(-1)C は、530 番目と 556 番目の G を C にそれぞれ置換した(Yanagitani, 2005)。

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°C、5% CO₂ 下で培養した。Sf9 昆虫細胞(Invitrogen #11496-015)は Sf-900 II SFM (Invitrogen #10902)中、28°Cで培養した。

hIRE1 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。2 x 10⁵ 個の HeLa 細胞を 100 mm プレートに播き、18 時間後(トランスフェクション開始 2 時間前に培地を交換した)、発現プラスミド 20 μ g をトランスフェクトした。プラスミド DNA 20 μ g を 50 μ l の TE (pH8.0)に溶解し、2.5 M CaCl 250 μ l、滅菌蒸留水 400 μ l、を

加え、この溶液を 2x HBS (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂H₂O₄-12H₂O [pH 7.1]) 500 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 6 時間通常培養条件で培養した。その後、Hank's 溶液 5 ml で細胞を 2 回洗い、通常培地を加えさらに図に示した時間培養し解析に用いた。

ウェスタンブロット解析

細胞は、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM EDTA、1% Nonidet (N)P-40、10 µg/ml aprotinin、10 µg/ml leupeptin、10 µg/ml pepstatin A、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)で溶解した。そのライセートは、SDS Sample Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% SDS、50 mM DTT、10% glycerol and 0.01% bromophenol blue)中で 98°C、5 分間インキュベートし、変性した。そして、ライセート中のタンパク質は、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (12%ゲル)によって分離された。電気泳動後、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(Schleicher & Schuell)上に転写し、hIRE1 の C 末端 14 アミノ酸を認識する抗 hIRE1 抗体(Rb5, Rb8)を用いて、一般的な方法により行った。

RT-PCR による *in vivo* XBPI mRNA スプライシング解析

Total RNA は、Isogen (Nippon Gene #311-02501)を用いて抽出した。一本鎖 cDNA 合成は、oligo-dT 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。XBPI mRNA を増幅するため、ヒト XBPI 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 25 サイクル(96°C、30 秒; 55°C、30 秒; 72°C、1 分[最後のサイクルは 10 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[S]とスプライシング前[U]の XBPI mRNA 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。

ルシフェラーゼ解析

5x10⁴ の HeLa 細胞を 6 ウェルプレートに巻き、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。トランスフェクション 16 時間後、対照に用いた細胞には、2 µg/ml のツニカマイシン(タンパク質への糖鎖付加を阻害し ER ストレスを誘導する薬剤)で 6 時間処理した。BiP のプロモーター活性は、

Dual-luciferase assay system (Promega # E1980)を用いて行い、その蛍光レベルは、ルミノメーター(AB-2200-R, ATTO)で検出した。相対的なルシフェラーゼ活性は、内部標準である *Renilla luciferase* のルシフェラーゼ活性で補正した。結果は、3回の実験の平均値±SDで示す。

ノザンブロットティングによる *in vivo* 28S rRNA 切断解析

Total RNA は、Isogen を用いて抽出した。Total RNA (5 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。ハイブリダイズは、一般的な溶液(5x SSC、50% (v/v)ホルムアミド、0.1% SDS、5x デンハルト溶液) (Sambrook et al., 1989)を用いて 42°Cで行った。28S rRNA は、28S rRNA の 3'末端特異的なプローブ (5'-ACAAACCCTTGTGTCGAGGGCTGA-3')を T4 polynucleotide kinase (TaKaRa #2021A)で 5'末端を ³²P ラベルしたものをを用いて検出した。ハイブリダイズ後のメンブレンは、室温の 2x SSC 溶液で 15分 2回、45°Cの 2x SSC / 0.1% SDS 溶液で 15分 1回、50°C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。ハイブリダイズしたシグナルは、BAS2500 Analyzer (Fuji Film)で検出した。

バキュロウイルスを用いたヒト IRE1 タンパク質の発現および精製

ヒト IRE1 タンパク質の発現は、*Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems* マニュアル(Invitrogen)に記されたとおり行った。各プラスミドに一致した Bacmid DNA は Sf9 細胞にトランスフェクトし、得られたウイルスは、Sf9 細胞に感染させる前に 2 回以上増幅した(Imagawa, 2004)。Sf9 細胞は、100rpm で攪拌したスピナーフラスコ中で、Sf-900 II SFM を用いて 28°Cで培養した。約 2 L の Sf9 細胞(6×10^5 cells/ml)に培地の 1/50 量のウイルス液を加え 28°Cで 72 時間培養後、3,000 rpm、10分、4°Cで遠心し細胞を回収した。回収した細胞は 1 度液体窒素で凍結し、30 ml の Lysis Buffer (20 mM Tris-NCl [pH 7.4]、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM aprotinin、1 mM leupeptin、1 mM pepstatin、1 mM PMSF)を加え氷上で融解した後、さらに 30 分間静置し細胞を溶解した。その細胞抽出液を $1,000 \times g$ 、10分、4°Cで遠心後、上清を 30,000 rpm、1 時間、4°C (SW40Ti)で超遠心し、最上層にある脂質を除き、あらかじめ Lysis Buffer で平衡化した TALON Metal Affinity Resins (Clontech #635502) 500 µl を充填したカラムに 3 回通した。その後、BufferI (50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、10% glycerol [pH 8.0 at 4°C]) 5 ml、1 M NaCl を含む BufferI 5 ml、BufferI 5 ml、BufferII (50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、5 mM MgCl₂、1.5 mM imidazole、10 mM ATP [pH 8.0 at 4°C]) 5 ml、20 mM

imidazole を含む BufferI 5 ml でカラムを洗浄し、5 ml の 50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、10% Glycerol、200 mM Imidazol (pH 8.0 at 4°C)で溶出した。溶出したフラクションを BufferI で 20 時間透析し、再び、あらかじめ BufferI で平衡化した TALON Metal Affinity Resins 500 µl を充填したカラムに 3 回通した。その後、BufferI 5 ml、1 M NaCl を含む BufferI 5 ml、BufferI 5 ml、BufferII 5 ml、20 mM imidazole を含む BufferI 5 ml、BufferI (RNase free) 5 ml でカラムを洗浄し、50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、50% glycerol、200 mM imidazol (pH 8.0 at 4°C)で 500 µl ずつ 6 回溶出した。その内 2、3 回目のフラクションを 20 mM HEPES、10 mM MgCl₂、50 mM KCl、50% Glycerol (pH 7.3 at 4°C)に 20 時間透析した。

In vitro IRE1 自己リン酸化解析

精製された IRE1 組換えタンパク質(5 pmol; α : 0.29 µg, β : 0.27 µg)は、0.74 MBq [γ -³²P] ATP と 20 µl の kinase buffer (-) (20 mM HEPES、1 mM DTT、10 mM Mg(OAc)₂、50 mM KOAc [pH 7.3 at 4°C])中で 30°C、30 分間反応させた。反応後、10% (w/v) trichloroacetic (TCA)を加え、30 分水上に静置し、組換え IRE1 タンパク質を沈殿させた。その沈殿に、SDS Sample Buffer を加えて 98°Cで 5 分間加熱後、10% SDS-PAGE により分離し、BAS2500 を用いてオートラジオグラフィーで検出した。

In vitro XBPI mRNA 切断解析

³²P ラベルされた XBPI mRNA は Riboprobe System - T7 (Promega #P1440) を用いて、*in vitro*で転写した。その XBPI 転写産物(4 fmol; 0.38 ng)は、5 pmol の組換え IRE1 タンパク質と 20 µl の kinase buffer (20 mM HEPES、1 mM DTT、10 mM Mg(OAc)₂、50 mM KOAc [pH 7.3 at 4°C]、2 mM ATP)中、30°Cで図に示した時間反応させた。反応後、放射線ラベルされた RNA 断片は、Isogen で抽出し、7 M urea 変性 6% polyacrylamide gel で電気泳動し、BAS2500 を用いて、オートラジオグラフィーで検出した。

In vitro 28S rRNA 切断解析

リボソームは、Matasova らの方法(Matasova et al., 1991)を参考に HeLa 細胞から分離した。6x10⁷ 個の HeLa 細胞を 3,000 rpm、15 分、4°Cで遠心して回収し、36 ml の Buffer A (20 mM Tris-HCl [pH7.5]、125 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.5 mM EDTA、4 mM β -mercaptoethanol)で溶解し、25,900 × g で 15 分間、4°Cで遠心した。その上清に、sodium deoxycholate を 1.2%になるように加え、1 時間 4°Cで混合した。7 ml のその上清を 48% sucrose in Buffer

B (20 mM Tris-HCl [pH7.5]、3 mM Mg(CH₃COO)₂、100 mM NH₄Cl、0.15 mM EDTA、5 mM β-mercaptoethanol)の上に25% sucrose in Buffer Bを2 ml 重層したスクロース勾配の上に重層し、122,000 × gで20時間、4°Cで遠心した。得られた沈殿を DEPC 処理水で洗浄し、1.5 ml の DEPC 処理水に再懸濁した。

リボソーム画分(10 μl、約 2.25 μg の RNA を含む)は 5 pmol の組換え IRE1 タンパク質と 20 μl の kinase buffer 中、37°Cで図に示した時間反応した。反応後、リボソーム RNA は Isogen を用いて抽出し、28S rRNA は、*in vivo* 28S rRNA 切断解析と同様ノザンブロットにより検出した。

結 果

XBPI mRNA のスプライシングにおける hIRE1 α の RNase ドメインの必要性

以前の研究で、マウスの IRE1 α と IRE1 β はともに、XBPI mRNA を切断することが示されている(Calfon et al., 2002; Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2001)。しかし、当研究室では、hIRE1 β は、28S rRNA の切断を導くことを報告している(Iwawaki et al., 2001)。そのことから、私は、IRE1 α と IRE1 β は異なる機能を持っており、活性化した IRE1 α と IRE1 β は、それぞれ異なる RNA の切断を促し、かつ、二つの IRE1 のアイソフォームは、ともに RNase ドメインを持つことから、IRE1 α と IRE1 β の機能的な違いが、それぞれの RNase ドメインに依存すると推測した。この考えを確かめるため、さまざまな IRE1 変異体が XBPI mRNA のスプライシング、UPR 遺伝子群の転写誘導、そして 28S rRNA の切断に及ぼす影響について調べた。

IRE1 は、ER ストレスがない通常の状態においても、細胞に過剰発現すると活性化することが知られている(Tirasophon et al., 2000)。そこで、hIRE1 のどのドメインが XBPI mRNA のスプライシングに必要であるか確認するため、種々の hIRE1 変異体を過剰発現した HeLa 細胞において、XBPI mRNA スプライシングへの影響を解析した。本研究で用いた hIRE1 は、Fig. 3A に示した。また、各 hIRE1 変異体の発現量は、IRE1 の C 末端 14 アミノ酸を認識するポリクローナル抗体で免疫ブロットにより確認した(Fig. 3B)。これらの抗体では、内在性の hIRE1 α と hIRE1 β の発現は確認されなかったので(Fig. 3B, lane “Vector”)、これらのブロットは、各発現プラスミドによる hIRE1 の発現量を示している。

XBPI mRNA のスプライシングは、野生型 hIRE1 α (α WT)および、hIRE1 β のセンサー/キナーゼドメインと hIRE1 α の RNase ドメインからなるキメラ

hIRE1 ($\beta/\alpha R$)を過剰発現した細胞で確認されたが(Fig. 4A, lanes 3, 6)、他の hIRE1 を過剰発現した細胞では、確認されなかった(Fig. 4A, lanes 4, 5, 7-10)。 αWT の発現レベルが、*XBPI* mRNA のスプライシングを引き起こさない野生型 hIRE1 β (βWT)の発現レベルより低いことを考えると、hIRE1 α は、明らかに hIRE1 β よりも高い *XBPI* mRNA の切断活性を持っている。また、 $\beta/\alpha R$ のスプライシング活性は、 αWT と同程度であった。

さらに、転写因子 *XBPI* による UPR 遺伝子群の転写誘導を、*XBPI* の標的遺伝子のひとつである小胞体シャペロン分子 BiP (Yoshida et al., 2001)のプロモーターを用いたレポーターアッセイによって確認した。*XBPI* mRNA スプライシングの結果と一致して、ルシフェラーゼの翻訳は、 αWT と $\beta/\alpha R$ を過剰発現した細胞で誘導が確認されたが、他の hIRE1 過剰発現細胞では確認されなかった(Fig. 4B)。これらの結果は、hIRE1 α の RNase ドメインが *XBPI* mRNA のスプライシングに必要であることを示している。

28S rRNA の部位特異的切断における hIRE1 β の RNase ドメインの必要性

次に、hIRE1 のどのドメインが 28S rRNA の部位特異的切断に必要であるか確認するため、種々の hIRE1 変異体を過剰発現した HeLa 細胞において、28S rRNA の切断への影響をノザンブロットにより確認した。明らかな 28S rRNA の切断は、 βWT と hIRE1 α のセンサー/キナーゼドメインと hIRE1 β の RNase ドメインからなるキメラ hIRE1 ($\alpha/\beta R$)を過剰発現した細胞で確認された(Fig. 5, lanes 6, 9)。しかし、キナーゼ活性を欠損した変異体 hIRE1 α ($\alpha K599A$)、hIRE1 β ($\beta K547A$)やキナーゼ活性を欠損した変異体 hIRE1 α ($\alpha K907A$)、hIRE1 β ($\beta K855A$)、さらに、 $\beta/\alpha R$ を過剰発現した細胞では確認されなかった(Fig. 5, lanes 3-5, 7, 8)。 $\alpha/\beta R$ は、 βWT や αWT に比べ発現量が非常に低いですが、28S rRNA の切断は確認できた。意外なことに、 αWT を過剰発現した細胞においても、28S rRNA の切断が、わずかに観察された(Fig. 5, lane 2)。おそらく、*in vivo* において hIRE1 α も弱いながら 28S rRNA 切断活性を持っているのであろう。しかし、これらの結果は、hIRE1 β の RNase ドメインは、28S rRNA の切断により効率的に働くことを示している。すなわち、hIRE1 α と hIRE1 β 間の機能的な違いは、hIRE1 の RNase ドメインに依存していることを示唆している。

ヒト IRE1 組換えタンパク質の精製

さらに、hIRE1 α と hIRE1 β の *XBPI* mRNA および 28S rRNA の切断への直接的な影響を確認するため、hIRE1 α と hIRE1 β の組換えタンパク質を作製した。hIRE1 α と hIRE1 β のリンカードメイン(hIRE1 α : amino acid [aa]

468-564, hIRE1 β : aa 451-512)とキナーゼドメイン(hIRE1 α : aa 565-825, hIRE1 β : aa 513-773)、RNase ドメイン(hIRE1 α : aa 826-977, hIRE1 β : 774-925)からなるサイトゾル機能領域の N 末端にヘキサヒスチジンタグを付加した組換えタンパク質を、バキュロウイルスタンパク質発現システムを用いて作成した。この組換え hIRE1 タンパク質(rIRE1)は、Co²⁺を固定したレジンによって精製した(Fig. 6A)。IRE1 α と IRE1 β はともに、自身のキナーゼドメインによるトランス自己リン酸化活性を有していることが知られており(Tirasophon et al., 2000)、この精製した組換えタンパク質のリン酸化活性を確認した結果、rIRE1 α と rIRE1 β は、ともに自己リン酸化活性を有していることが確認された(Fig. 6B)。このことから、今回作製した IRE1 組換えタンパク質は、機能を有していると考えられる。

XBPI mRNA 切断における hIRE1 α のより強い RNase 活性

hIRE1 α と hIRE1 β それぞれの XBPI mRNA に対する切断能を評価するため、*in vitro*で各rIRE1を、XBPIの*in vitro*転写産物と直接反応させた。rIRE1 α を反応させた場合、XBPI mRNAの切断は明瞭に観察された(Fig. 7A, lane 2)。また、その切断は、時間依存的に起こった(Fig. 7D)。rIRE1 β においても、非常に弱い切断が観察されたが(Fig. 7A, lanes 1-3)、このことは、マウスのIRE1 β が、XBPI mRNAを直接切断するという報告と一致している(Calfon et al., 2002)。この解析において、rIRE1 β の活性が、非常に弱く感じられるが、同様のrIRE1 β は、rIRE1 α 同様、リン酸化能を有しており(Fig. 6B)、28S rRNAの切断活性を有していることが確認されている(Fig. 8)。すなわち、rIRE1 β は機能的であり、rIRE1 α は、rIRE1 β に比べて非常に高いXBPI mRNA切断活性を有していることを示している。

XBPI mRNAの5'、3'切断部位はともに、Fig. 7Bに示すように特徴的なステムループ構造をとっている。各ループのIRE1 α による切断部位の一つ前のヌクレオチド(-1)は、この切断に必須であることが報告されている(Lee et al., 2002)。そこで、*in vitro*におけるXBPI転写産物の切断が、rIRE1によって特異的に起きているかを確認するため、XBPI変異型転写産物と反応させた。5' G(-1)C 転写産物(5'切断部位の一つ前のグアニン[G]をシトシン[C]に換えたもの)は、rIRE1 α 依存的切断が、3'ループでのみ確認されたが(Fig. 7A, lanes 4-6)、3' G(-1)C 転写産物(3'切断部位の一つ前のGをCに換えたもの)においては、5'ループでのみ切断が確認された(Fig. 7A, lanes 7-9)。また、5' G(-1)C / 3' G(-1)C 転写産物(5'と3'切断部位両方の一つ前のGをCに換えたもの)において、切断は確認されなかった(Fig. 7B, lanes 10-12)。これらの結果は、IRE1 α は、XBPI mRNAの切断に特異的な役割をしているという考えを支持している。

28S rRNA 切断における hIRE1 β のより強い RNase 活性

また、IRE1 の 28S rRNA の切断に対する能力を評価するため、rIRE1 と HeLa 細胞から単離したリボソームを *in vitro* で直接反応した。Fig. 8 に示すように、28S rRNA の部位特異的切断は、rIRE1 α と rIRE1 β のどちらの組換えタンパク質と反応させたときにも観察された。しかし、その切断は、rIRE1 α と比較して、rIRE1 β 存在下において強く観察された(Fig. 8A, upper panel)。また、この切断は、28S rRNA 特異的で、18S rRNA はこの反応中、影響を受けていないことが確認された(Fig. 8A, lower panel)。また、その切断は、時間依存的に起こった(Fig. 9)。この結果は、hIRE1 α と hIRE1 β はともに、完全なりボソームの 28S rRNA の部位特異的切断を直接触媒するが、28S rRNA の切断に対する活性は、異なっていることを示している。すなわち、hIRE1 α と hIRE1 β は、異なる基質特異性を有していることを示唆している。

Fig. 3

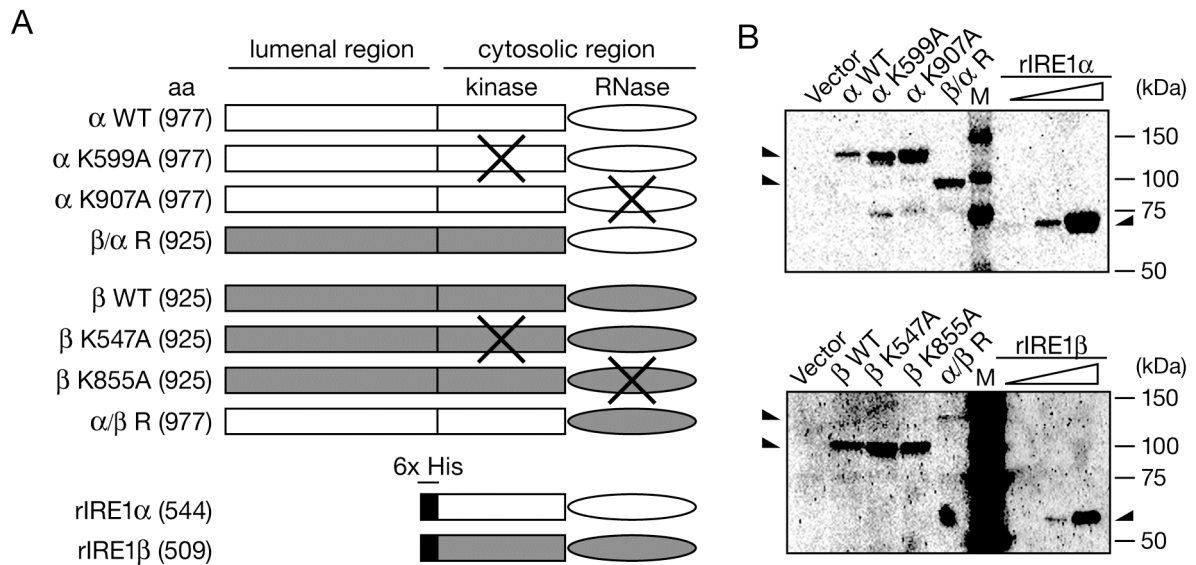


Fig. 3

A, 本研究で使用した各 hIRE1 変異体と hIRE1 組換えタンパク質の模式図

α WT は野生型 hIRE1 α を示している。 α K599A と α K907A は、それぞれ、hIRE1 α のキナーゼ活性欠損変異体と RNase 活性欠損変異体を示している (Tirasophon et al., 2000; Tirasophon et al., 1998)。×は、アミノ酸置換をしたドメインを示している。 β/α R は hIRE1 β のセンサードメインとキナーゼドメイン、それと hIRE1 α の RNase ドメインからなる hIRE1 β のキメラ体を示している。 β WT は野生型 hIRE1 β を示している。 β K547A と K855A は、それぞれ、hIRE1 β のキナーゼ活性欠損変異体と RNase 活性欠損変異体を示している (Tirasophon et al., 2000; Tirasophon et al., 1998)。 α/β R は hIRE1 α のセンサードメインとキナーゼドメイン、それと hIRE1 β の RNase ドメインからなる hIRE1 α のキメラ体を示している。括弧内の数字は、各分子のアミノ酸残基数を示している。

B, hIRE1 変異体の HeLa 細胞への一過的発現

各変異体の発現量を確認するため、トランスフェクション 30 時間後にウェスタンブロット解析を行った。hIRE1 α の各変異体(109.7 kDa)と β/α R (102.6 kDa) (10 μ g/lane) は、SDS-PAGE (12%)により分離し、hIRE1 α の C 末端 14 アミノ酸に対する抗 hIRE1 α ポリクローナル抗体(Rb5)を用いて検出した。また、hIRE1 β の各変異体(102.3 kDa)と α/β R (109.4 kDa) (20 μ g/lane) は、hIRE1 β の C 末端 14 アミノ酸に対する抗 hIRE1 β ポリクローナル抗体(Rb8)を用いて検出した。

IRE1 α -CD と IRE1 β -CD は、それぞれ 0.5, 1, 2 pmol/lane の IRE1 α 組換えタンパク質と 1, 2, 4 pmol/lane の IRE1 β 組換えタンパク質を泳動し検出した。M は、分子量マーカー Precision Plus Protein standards (Bio Rad)を示している。

Fig. 4

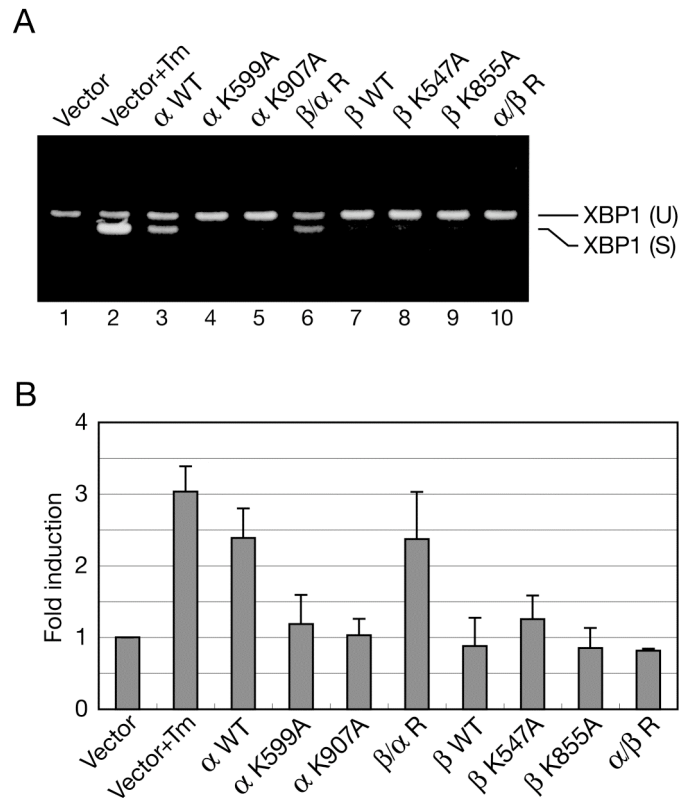


Fig. 4

A, XBPI mRNA スプライシングの RT-PCR による解析

XBPI mRNA のスプライシングは、図に示した IRE1 発現プラスミドをトランスフェクトした HeLa 細胞から、トランスフェクション 36 時間後に回収した total RNA と XBPI 特異的なプライマーを用いて、一般的な RT-PCR によって検出した。スプライイス型と非スプライイス型の XBPI は、それぞれ XBPI(U)、XBPI(S)と示した。

B, UPR レポーターアッセイ

HeLa 細胞に、図に示した IRE1 発現プラスミドとレポータープラスミド、内部標準プラスミドをトランスフェクトし、トランスフェクション 30 時間後、対照に用いた細胞には、2 μ g/ml のツニカマイシン(Tm)で 6 時間処理した。その後、ルシフェラーゼ活性を測定した。エラーバーは、3 回実験を行った標準偏差を示している。

Fig. 5

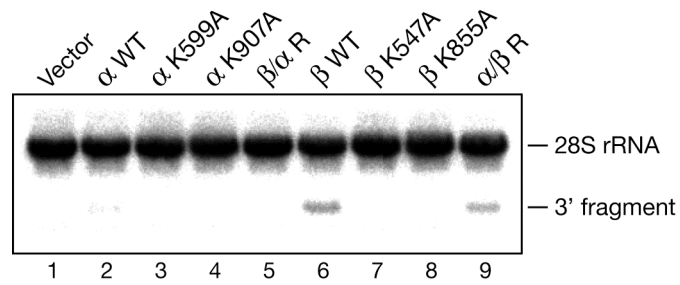


Fig. 5

28S rRNA 切断のノザンブロットによる検出

28S rRNA の切断は、28S rRNA の 3'末端特異的なプローブを用いて、ノザンブロットにより検出した。Total RNA は、図に示した IRE1 発現プラスミドをトランスフェクトした HeLa 細胞から、トランスフェクション 36 時間後に回収した。5 μ g の total RNA は、1%変性アガロースゲルで泳動し、ナイロンメンブレンに転写した。

Fig. 6

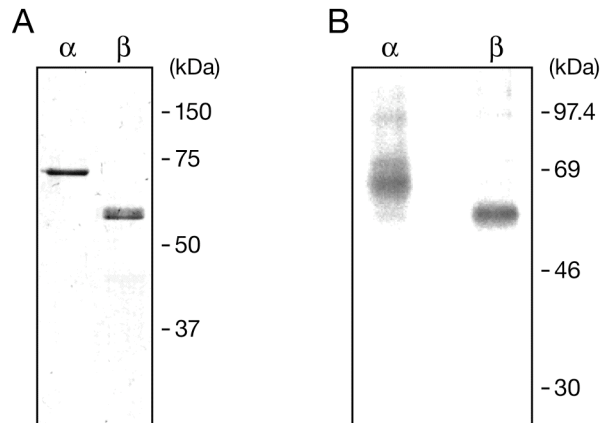


Fig. 6

A, ヒト IRE1 組換えタンパク質の精製

hIRE1 と hIRE1 β のサイトゾル作用領域は、バキュロウイルスを用いて *Spodoptera frugiperda* (Sf9) 昆虫細胞に発現させた。ヘキサヒスチジンを含む hIRE1 タンパク質は、 Co^{2+} を結合したレジンを用いて精製した。精製したタンパク質は、10% SDS-PAGE により分離し、Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色した。

B, *In vitro* 自己リン酸化解析

精製したタンパク質は、キナーゼバッファー中で、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP と反応させ SDS-PAGE により分離した。そして、そのゲルは、BAS2500 を用いてオートラジオグラフィで可視化した。

Fig. 7

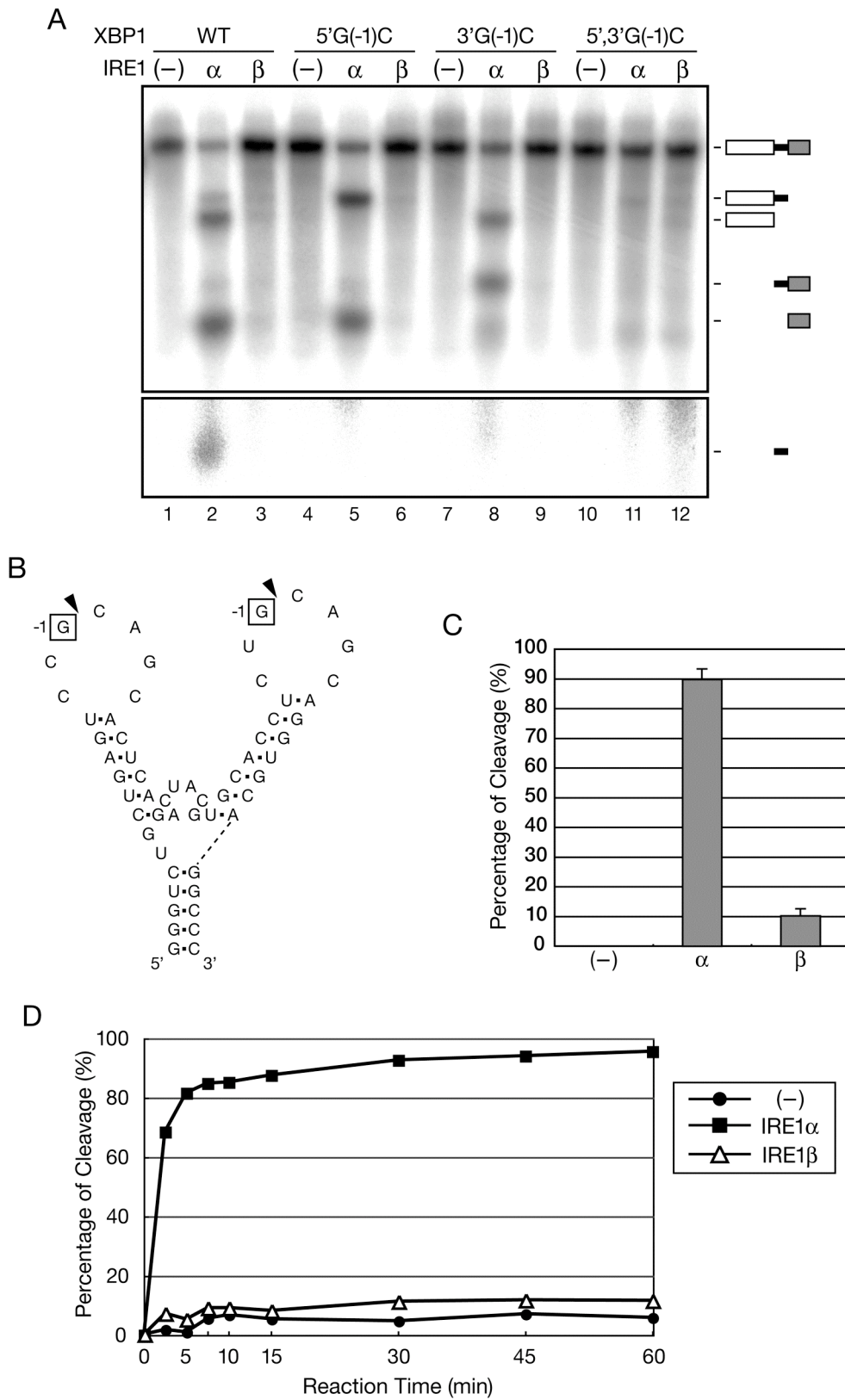


Fig. 7

A, *In vitro* XBPI mRNA 切断解析.

放射線ラベルした *XBPI* 転写産物は、*in vitro* 転写システムを用いて合成した。転写された、*XBPI* mRNA は、組換え IRE1 タンパク質と、30 分間、30°C で、キナーゼバッファー中で反応した。反応後、ラジオラベルされた RNA 断片は、urea 変性アクリルアミドゲルで分離し、オートラジオグラムで検出した。5' G(-1)C は、5'切断部位の一つ前のグアニン[G]をシトシン[C]に換えた。3' G(-1)C は、3'切断部位の一つ前の G を C に換えた。また、5' G(-1)C / 3' G(-1)C は、5' と 3'切断部位両方の一つ前の G を C に換えた。図の右側のアイコンは、IRE1 による切断反応で生じる *XBPI* mRNA の断片を示している。四角と線は、それぞれ *XBPI* mRNA のエキソンとイントロンを示す。

B, ヒト *XBPI* mRNA の IRE1 切断部位周辺の予測された二次構造

IRE1 による *XBPI* mRNA の切断部位は矢頭で示した。各ループの切断部位直前のヌクレオチド(-1)は、IRE1 特異的な切断に必須である。

C, *XBPI* mRNA 切断の定量

XBPI 転写産物は、組換え IRE1 タンパク質と、30 分間、30°C で、キナーゼバッファー中で反応した。その後、*XBPI* mRNA の切断断片は、電気泳動で分離し、それらの相対量は、BAS2500 によるオートラジオグラムで定量した。エラーバーは、3 回実験を行った標準偏差を示している。

D, *XBPI* mRNA 切断の時間経過による定量

XBPI 転写産物は、組換え IRE1 タンパク質と、図に示した時間、30°C で、キナーゼバッファー中で反応した。その後、*XBPI* mRNA の切断断片は、電気泳動で分離し、それらの相対量は、BAS2500 によるオートラジオグラムで定量した。

Fig. 8

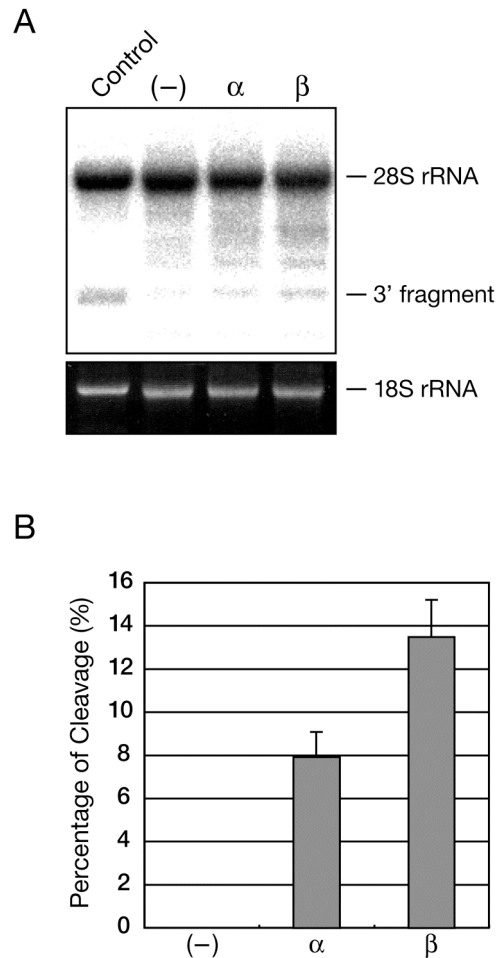


Fig. 8

A, *In vitro* 28S rRNA 切断解析

HeLa 細胞から単離したインタクトなリボソームサブユニットは、30 分間、30°C で組換え IRE1 タンパク質とキナーゼバッファー中で反応した。2.25 ng のリボソーム RNA は 1%変性アガロースゲルで分離し、ナイロンメンブレンに転写した。28S rRNA の切断は、28S rRNA の 3'末端特異的なプローブを用いて一般的なノザンブロットで検出した。Control は、hIRE1 β 発現プラスミドをトランスフェクトし、36 時間後の HeLa 細胞から分離した、10 μ g の total RNA (Fig. 5, lane 6)を泳動した。

B, 28S rRNA 切断の定量

28S rRNA 切断断片は、電気泳動により分離し、その相対量を BAS2500 により定量した。エラーバーは、3 回実験を行った標準偏差を示している。

Fig. 9

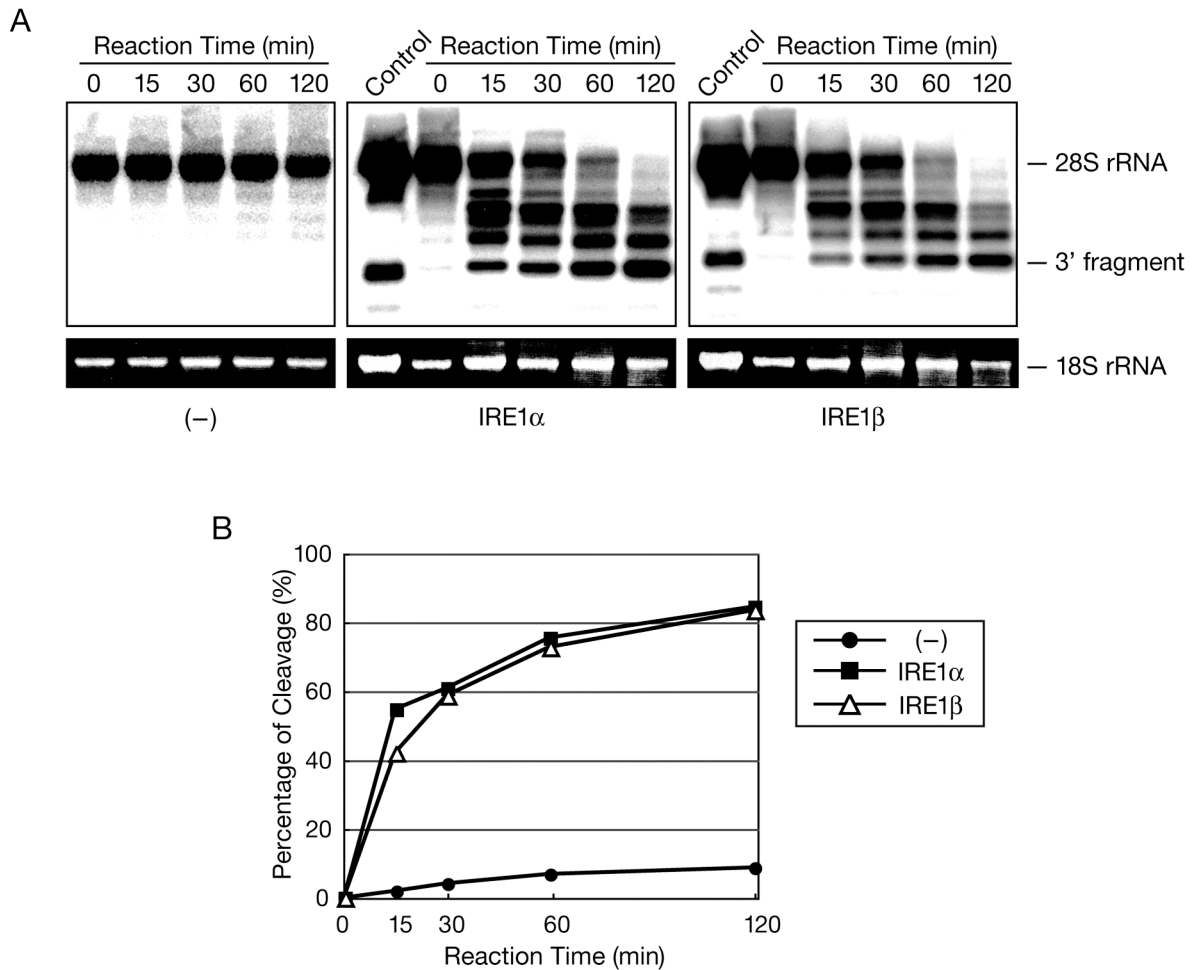


Fig. 9

A, *In vitro* 28S rRNA の時間経過による切断解析

HeLa 細胞から単離したインタクトなリボソームサブユニットは、示した時間、37°C で組換え IRE1 タンパク質とキナーゼバッファー中で反応した。2.25 ng のリボソーム RNA は 1%変性アガロースゲルで分離し、ナイロンメンブレンに転写した。28S rRNA の切断は、28S rRNA の 3'末端特異的なプローブを用いて一般的なノザンブロットで検出した。Control は、hIRE1 β 発現プラスミドをトランスフェクトし、36 時間後の HeLa 細胞から分離した、10 μ g の total RNA (Fig. 5, lane 6)を泳動した。

B, 28S rRNA 切断の時間経過による定量

28S rRNA 切断断片は、電気泳動により分離し、その相対量を BAS2500 により定量した。

考 察

hIRE1 α と hIRE1 β は、酵母の小胞体ストレスセンサー分子 Ire1 のオルソログである(Iwawaki et al., 2001; Tirasophon et al., 1998; Wang et al., 1998)。しかし、小胞体ストレス応答において、これらのパラログが同じ役割を担っているのか異なるのかは議論がある。以前の研究で、IRE1 α は *XBPI* mRNA のスプライシングに関わっていることが報告されており(Calfon et al., 2002; Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2001)、さらに、マウスの IRE1 β も、IRE1 α と同様に *XBPI* mRNA を切断するという報告もある(Calfon et al., 2002)。しかしながら、当研究室の以前の研究において、hIRE1 β は、28S rRNA の部位特異的切断を導き、タンパク質合成を翻訳レベルで抑えることを報告している(Iwawaki et al., 2001)。このことから、私は、IRE1 α と IRE1 β の UPR における役割は異なっており、その原因は、RNase としての IRE1 α と IRE1 β の基質が異なっているからであると考えた。そこで、これらの分子間の機能の違いが、それぞれの RNase ドメインに依存するか明らかにするため、*in vivo* と *in vitro* の解析から、各 IRE1 の RNase ドメインが機能を決定しているのか、また、それぞれの基質特異性が異なっているのか確認した。

それぞれの RNase ドメインを入れ換えたキメラ IRE1 を細胞に過剰発現させた実験の結果から、hIRE1 α の RNase ドメインは、*XBPI* mRNA のスプライシングに必要であり(Fig. 4A)、hIRE1 β の RNase ドメインは、28S rRNA の切断に必要であることが必要であることが示された(Fig. 5)。このことは、hIRE1 α と hIRE1 β の機能の違いは、それらの RNase ドメインに依存していることを示している。そこで、hIRE1 α と hIRE1 β の基質特異性を *in vitro* で比較した。hIRE1 α と hIRE1 β のサイトゾル機能領域の組換えタンパク質を用いた *in vitro* の解析の結果、rIRE1 α によって *XBPI* mRNA は、非常に効率的に正しく切断されたが、rIRE1 β では、ほとんど切断されなかった(Fig. 7B, C)。この rIRE1 β は、リン酸化活性を有しており(Fig. 6B)、28S rRNA を特異的に切断することから(Fig. 8)、活性を持ったタンパク質であることが示されている。しかし、予想外なことに、rIRE1 α は 28S rRNA も切断した。この結果は、*in vivo* の解析で見られる hIRE1 α の弱い 28S rRNA 活性を反映している(Fig. 5, lane 2)が、rIRE1 α と rIRE1 β の活性の差は小さい(Fig. 8, 9)。この理由として、細胞内では、それぞれの IRE1 の小胞体膜上におけるロケーションが異なっているか、基質特異性をさらに決定するような他の分子と複合体を形成しているなどシチュエーションが異なっているということが考えられる。28S rRNA 切断の実験結果は、この特異的切断反応が、リボソームの大サブユニットの三次構造が必要であることを示している。なぜなら、*in vitro* の 28S

rRNA 切断反応は、基質として、インタクトなりボソームも用いた場合にのみ、部位特異的な切断が観察され、HeLa 細胞から分離した total RNA と反応させた場合には、非特異的な切断が引き起こされたからである(data not shown)。実際、hIRE1 β による 28S rRNA の切断部位は 60S リボソームの L1 protuberance を構成しており、リボソームの E サイトの形成に関係していると考えられる(Brimacombe, 1995; Dube et al., 1998; Gutell and Fox, 1988)ので、この考えは理にかなっている。さらに、hIRE1 β が小胞体膜結合型リボソームの 28S rRNA を選択的に切断することにより、小胞体への新生ポリペプチド鎖の流入を特異的に抑制している可能性も考えられる。しかしながら、28S rRNA の切断を通して、小胞体への新生ポリペプチド鎖の流入を特異的に抑制するという考えを支持する結果は得られていない。

では、小胞体ストレス応答における、これら IRE1 の基質特異性の違いには、どのような生理的な意義があるのだろうか。最近、ショウジョウバエの IRE1 が ER 局在 mRNA の素早い分解に関与しており、小胞体の負荷を減らし、小胞体ストレス下でのフォールディング容量の増加に寄与していることが報告された(Hollien and Weissman, 2006)。また、hIRE1 α の mRNA は、シス型の hIRE1 α 依存的な新規機構で、自身の mRNA を切断することによって負に制御されていることも報告されている(Tirasophon et al., 2000)。さらに、最近では、哺乳類の IRE1 α の新規の切断ターゲットも同定されている(Oikawa et al., 2007)。このように、IRE1 α には、*XBPI* mRNA 以外に、多くの切断ターゲットが同定されている。IRE1 α はさまざまな組織で発現しているが、IRE1 β は消化器組織でのみ発現していることを考えると(Bertolotti et al., 2001; Tirasophon et al., 1998)、IRE1 β も、特異的な基質 RNA を切断することによって、組織特異的な小胞体ストレス応答を行っている可能性が考えられる。IRE1 β によるタンパク質翻訳抑制の機構はまだ明らかになっていないが、28S rRNA を直接切断することによって、リボソームの機能を阻害しているという考え以外に、当研究室における最近の解析から、小胞体ストレスにより活性化した IRE1 β が、分泌タンパク質や膜タンパク質など、小胞体を通るタンパク質の mRNA を特異的に切断し、小胞体への新生タンパク質の流入を特異的に抑えているという可能性も示されはじめている(中村ら、未発表データ)。今後の研究では、IRE1 β 特異的な切断ターゲットを同定し、IRE1 β 依存的な小胞体ストレス経路を証明する必要がある。

第二部

「*XBPI* mRNA スプライシングの *in vitro* での解析」

序 論

酵母の UPR において、Ire1p は、転写因子である *HAC1* mRNA のスプライソソーム非依存的な選択的スプライシングに関与することが知られている (Cox and Walter, 1996)。この *HAC1* mRNA のスプライシングは、非常に特殊である。*HAC1* mRNA は、恒常的に転写されているが、5'非翻訳領域とイントロンとの間に、長い塩基対形成が存在するため、通常翻訳が抑制されている (Cox and Walter, 1996; Mori et al., 1996; Ruegsegger et al., 2001; Travers et al., 2000)。活性化した Ire1p は、*HAC1* mRNA の特徴的な 2 つのステムループ構造を認識し切断することにより *HAC1* mRNA のスプライシングを開始する。切断により生じた 2 つのエキソンは、tRNA リガーゼである Rlg1p によりプレ tRNA スプライシングと同様の機構で連結される (Abelson et al., 1998; Gonzalez et al., 1999; Sidrauski and Walter, 1997)。これにより、翻訳抑制が解除され、さらに翻訳領域のフレームシフトも引き起こされるため、スプライシング後の翻訳産物である Hac1p は、転写活性化領域を持つようになる (Mori et al., 2000; Ruegsegger et al., 2001)。この活性型 Hac1p は、小胞体シャペロン遺伝子などの UPR 遺伝子群を転写レベルで誘導し、小胞体ストレスを緩和する (Cox and Walter, 1996; Mori et al., 1996)。また、第一部で述べたように、哺乳動物の UPR においても類似のスプライシング反応が存在し、Ire1p のオルソログである IRE1 α が、スプライソソーム非依存的な *XBPI* mRNA のスプライシングに関与することが知られている (Patil and Walter, 2001; Tirasophon et al., 1998)。活性化した IRE1 α は、*XBPI* mRNA の特徴的な 2 つのステムループ構造を認識し切断することにより、この特殊なスプライシング反応を開始する (Calton et al., 2002; Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2001)。続いて、切断された 5'、3'断片は RNA リガーゼ活性によって連結され、これにより 26 ヌクレオチドのイントロンが取り除かれる。このスプライシング反応は、*XBPI* mRNA の翻訳領域のフレームシフトを引き起こす。これにより、スプライシング後の翻訳産物である XBPI は、転写活性化領域を持つようになる。*XBPI* mRNA と *HAC1* mRNA のスプライシングは、類似の反応であると考えられるが、その証拠は得られていない。酵母において同定されている RNA リガーゼ Rlg1p のホモログは、哺乳動物においては確認されていないため、哺乳動物においては、IRE1 α による *XBPI* mRNA の切断以後の反応に関して、RNA リガーゼが何なのか、細胞内のどこで起きているのか、どのようなプロセスで起きているのかなど、疑問のほとんどが解明されていない。しかし、このようなフレームスイッチ型の選択的 mRNA スプライシングは、UPR において特異的に観察される現象で、唯一、酵母から高等真核生

物まで保存されている小胞体ストレス応答経路であるため、小胞体ストレス応答を理解するには、このスプライシングを詳しく理解することが非常に重要である。

そこで、本研究において、私は、*XBPI* mRNA スプライシング機構を解析するため、組換え IRE1 α タンパク質と細胞抽出液を用いた *XBPI* mRNA スプライシング無細胞反応系を構築した。この *in vitro* 再構成系を用いた *XBPI* mRNA のスプライシング機構の解析から、*XBPI* mRNA のスプライシング反応は、サイトゾルで行われている可能性が示唆され、その機構は、現在までに知られている *HAC1* mRNA スプライシングや、mRNA 前駆体、グループ I イントロン、グループ II イントロンのスプライシングとも異なる、新たな RNA スプライシング機構であることが示唆された。

材料と方法

プラスミドの作製

バキュロウイルス発現用プラスミド pFB-WT α (hIRE1 α のサイトゾル領域) は、hIRE1 α のリンカードメインを含む 510 アミノ酸の領域(アミノ酸 468-977) をコードする PCR 産物を pFastBacHTa (Invitrogen) の *EcoRI-HindIII* サイトに挿入して作製した。同様に、pFB-WT β (hIRE1 β のサイトゾル領域) は、hIRE1 β のアミノ酸 451-925 をコードする PCR 産物を pFastBacHTa の *EcoRI-HindIII* サイトに挿入して作製した(Imagawa, 2004)。

ヒト *XBPI* cDNA の 410-633 ヌクレオチドと FLAG タグを含む *XBPI* mRNA *in vitro* 転写用ベクターは、PCR を用いて増幅し、pBluescript II SK+ (Stratagene) の *KpnI-BamHI* サイトに挿入した。*XBPI* 変異体ベクター[5' G(-1)C, 3' G(-1)C, 5', 3' G(-1)C]は、以前に報告された方法(Higuchi, 1990)でオーバーラップ PCR を行い、作製した。*XBPI* mRNA 5' G(-1)C は、530 番目のグアニン(G)をシトシン(C)に、3' G(-1)C は、556 番目の G を C に、5', 3' G(-1)C は、530 番目と 556 番目の G を C にそれぞれ置換した(Yanagitani, 2005)。

細胞培養

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

バキュロウイルスを用いたヒト IRE1 タンパク質の発現および精製

ヒト IRE1 α タンパク質の発現は、*Bac-to-Bac Baculovirus Expression*

Systems マニュアル(Invitrogen)に記されたとおり行った。各プラスミドに一致した Bacmid DNA は Sf9 細胞にトランスフェクトし、得られたウイルスは、Sf9 細胞に感染させる前に 2 回以上増幅した(Imagawa, 2004)。Sf9 細胞は、100rpm で攪拌したスピナーフラスコ中で、Sf-900 II SFM を用いて 28°C で培養した。約 2 L の Sf9 細胞(6×10^5 cells/ml)に培地の 1/50 量のウイルス液を加え 28°C で 72 時間培養後、3,000 rpm、10 分、4°C で遠心し細胞を回収した。回収した細胞は 1 度液体窒素で凍結し、30 ml の Lysis Buffer (20 mM Tris-NCl [pH 7.4]、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM aprotinin、1 mM leupeptin、1 mM pepstatin、1 mM PMSF)を加え氷上で融解した後、さらに 30 分間静置し細胞を溶解した。その細胞抽出液を $1,000 \times g$ 、10 分、4°C で遠心後、上清を 30,000 rpm、1 時間、4°C (SW40Ti)で超遠心し、最上層にある脂質を除き、あらかじめ Lysis Buffer で平衡化した TALON Metal Affinity Resins (Clontech #635502) 500 μ l を充填したカラムに 3 回通した。その後、BufferI (50 mM NaH_2PO_4 、300 mM NaCl、10% glycerol [pH 8.0 at 4°C]) 5 ml、1 M NaCl を含む BufferI 5 ml、BufferI 5 ml、BufferII (50 mM NaH_2PO_4 、300 mM NaCl、5 mM MgCl_2 、1.5 mM imidazole、10 mM ATP [pH 8.0 at 4°C]) 5 ml、20 mM imidazole を含む BufferI 5 ml でカラムを洗浄し、5 ml の 50 mM NaH_2PO_4 、00 mM NaCl、10% Glycerol、200 mM Imidazol (pH 8.0 at 4°C)で溶出した。溶出したフラクションを BufferI で 20 時間透析し、再び、あらかじめ BufferI で平衡化した TALON Metal Affinity Resins 500 μ l を充填したカラムに 3 回通した。その後、BufferI 5 ml、1 M NaCl を含む BufferI 5 ml、BufferI 5 ml、BufferII 5 ml、20 mM imidazole を含む BufferI 5 ml、BufferI (RNase free) 5 ml でカラムを洗浄し、50 mM NaH_2PO_4 、300 mM NaCl、50% glycerol、200 mM imidazol (pH 8.0 at 4°C)で 500 μ l ずつ 6 回溶出した。その内 2、3 回目のフラクションを 20 mM HEPES、10 mM MgCl_2 、50 mM KCl、50% Glycerol (pH 7.3 at 4°C)に 20 時間透析した。

XBPI mRNA の *in vitro* スプライシング反応

XBPI mRNA は Riboprobe System - T7 (Promega)を用いて、*in vitro* で転写した。切断と連結を二段階で行う場合は、*XBPI* 転写産物(25 kcpm または 100 fmol; 9.58 ng)を、5 pmol の組換え IRE1 α タンパク質と 20 μ l の kinase buffer (20 mM HEPES、1 mM DTT、10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 、50 mM KOAc [pH 7.3 at 4°C]、2 mM ATP)中で、30 分間、30°C で反応させた後、40 nmol の ATP、60 nmol の GTP、80 unit の Recombinant Rnasin Ribonuclease inhibitor (Promega)、図にそれぞれ示した量の各細胞抽出液を加え、DEPC 処理水で 40 μ l にメスアップし、30°C で 30 分間反応させた。一段階で行う場合は、*XBPI* 転写産物(25kcpm

または 100 pmol)を、5 pmol の組換え IRE1 α タンパク質と図にそれぞれ示した量の各細胞抽出液を、0.1 μ mol の ATP、60 nmol の GTP、80 unit の Recombinant Rnasin Ribonuclease inhibitor を含む 40 μ l の 0.5 \times kinase buffer 中で、60 分間、30 $^{\circ}$ Cで反応させた。

反応した RNA 断片は、Isogen (Nippongene)で抽出し、7 M urea 変性 6% polyacrylamide gel で電気泳動し、BAS2500 を用いて、オートラジオグラフィーで検出、もしくは、XBPI_RT プライマー(5'- GGATCTTGAATCTGAAGAGTC -3') を用いて、Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)により RT-PCR により検出した。XBPI mRNA を増幅するため、ヒト XBPI 特異的プライマー5X (5'- GAACCAGGAGTTAAGACAGC -3')と 3X (5'- AGTCAATACCGCCAGAATCC -3')で、rTaq DNA Polymerase (TaKaRa)を用いて 25 サイクル(96 $^{\circ}$ C、30 秒; 55 $^{\circ}$ C、30 秒; 72 $^{\circ}$ C、1 分[最後のサイクルは 10 分]) PCR を行った。199 と 173 bp の PCR 産物(それぞれ非スプライス型 XBPI mRNA [U]とスプライス型 XBPI mRNA [S]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。

細胞分画法

HeLa 細胞の核抽出液および細胞質抽出液の調整は、Dignam らの方法に従った(Dignam et al., 1983)。HeLa 細胞は、540 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心して回収し、5 packed cell pellet volume (cpv)の氷冷 PBS(-)で洗浄した。その後、5 cpv の BufferA (10 mM HEPES [pH 9.7 at 4 $^{\circ}$ C]、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl、0.5 mM DTT)に懸濁し、10 分間氷上に静置した。540 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心して回収した沈殿に、2 cpv の BufferA を加え再懸濁し、loose フィット (type B) の Dounce homogenizer または 25 G のシリンジで 50 ストロークして細胞膜を破碎した。この懸濁液を、540 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心した。上清には、0.11 倍量の BufferB (0.3 M HEPES [pH 7.9 at 4 $^{\circ}$ C]、1.4 M KCl、0.03 M MgCl₂)を加え、さらに 25,000 \times g、20 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心して、その上清をサイトゾル画分として回収した。また、沈殿には、2 cpv の BufferA を加えて、loose フィットの Dounce homogenizer または 25 G のシリンジで 5 ストロークし、25,000 \times g、20 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心した。その沈殿を、1 cpv の BufferC (20 mM HEPES [pH 9.7 at 4 $^{\circ}$ C]、25% [v/v] glycerol、0.24 M NaCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM EDTA、0.5 mM PMFS、0.5 mM DTT)で懸濁し、loose フィットの Dounce homogenizer で 30 ストロークまたは 25 G のシリンジで 5 ストローク後、27 G のシリンジで 25 ストロークした後、30 分間、4 $^{\circ}$ Cで緩やかに攪拌して、核タンパク質を抽出した。この懸濁液を、25,000 \times g、20 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心し、その上清を核画分とし

て回収した。サイトゾルおよび核画分は、50 倍量以上の BufferD (20 mM HEPES [pH 9.7 at 4°C], 20% [v/v] glycerol, 0.1 M KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMFS, 0.5 mM DTT)で 5 時間透析し、その後、25,000 × g、20 分間、4°Cで遠心した各上清を、液体窒素で凍結し-80°Cで保存した。

TA クローニング

In vitro スプライシング反応後、RT-PCR により増幅された PCR 産物を 2%アガロースゲル電気泳動により分離し、各バンドをゲルから切り出した。切り出したゲルから、EASYTRAP Ver.2 (TaKaRa #9410)により DNA を回収後、各 DNA 断片約 3.5 ng を TA Cloning Kit (Invitrogen #K2020-20)を用いて、マニュアルに従い、pCR2.1 ベクター(Invitrogen)に挿入した。これを、大腸菌 DH5 α に導入して、得られた形質転体の DNA 配列を確認した。

ウェスタンブロット解析

サイトゾルおよび核抽出液は、SDS Sample Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% SDS、50 mM DTT、10% glycerol and 0.01% bromophenol blue)中で 98°C、5 分間インキュベートし、変性した。各抽出液中のタンパク質は、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (10%ゲル)によって分離した。電気泳動後、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(Schleicher & Schuell)上に転写し、抗 GAPDH 抗体(abcam #ab9484)、抗 nuclear pore complex 抗体(BAbCO #MMS-120R)、抗 KDEL 抗体(Stressgen #SPA-827)、抗 Calnexin 抗体(Stressgen #SPA-860)を用いて、一般的な方法により行った。

硫酸アンモニウム分画

サイトゾルおよび核抽出液を、4°Cで穏やかに攪拌しながら、乳鉢で細かく砕いた硫酸アンモニウムを目的の濃度になるまで、ゆっくりと徐々に添加した。硫酸アンモニウムが完全に溶解した後、4°Cで 15 分間攪拌し、15 分間静置した。その後、25,000 × g、30 分間、4°Cで遠心し、沈殿は、BufferD に懸濁し、上清は、再び 4°Cで穏やかに攪拌しながら、硫酸アンモニウムを目的の濃度になるまで添加し、硫酸アンモニウムが完全に溶解した後、同様に攪拌、静置、遠心を繰り返した。

RNA ゲルシフトアッセイ

XBPI mRNA は Riboprobe System - T7 を用いて、*in vitro* で転写した。100

kcpm の放射線ラベルした *XBPI* 転写産物を、10 μ l の Binding Buffer (20 mM Tris-HCl [pH7.5]、5 mM DTT、5 mM MgCl₂、10 % glycerol、100 mM KCl) 中で、40 unit の Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor、2 μ g の HeLa 細胞から抽出した total RNA、1 μ g の組換え IRE1 α タンパク質または 5 μ g の全細胞抽出液と、20 分間、4°C で反応した。また、競合阻害 RNA の反応は、放射線ラベルした *XBPI in vitro* 転写産物を加える前に、100 倍量の放射線ラベルされていない *XBPI* 転写産物を加え、20 分間、4°C で前反応することで行った。反応後、全量を 4%アクリルアミドゲルで泳動した。

StreptoTag 法による *XBPI* mRNA 結合タンパク質の精製

XBPI mRNA 結合タンパク質の精製は、410 から 633 番目の *XBPI* mRNA の 3'末端に、ストレプトマイシン結合性の RNA 配列である StreptoTag を付加した転写産物と、HeLa 細胞の全細胞抽出液を用いて、Bachler らの方法に従って行った(Bachler et al., 1999)。StreptoTag 付きの *XBPI* 転写産物は、Riboprobe System - T7 を用いて、*in vitro* で転写した。ストレプトマイシンを結合したレジンは、epoxy-activated Sepharose 6B (GE Healthcare)を、Sepharose の乾燥重量の 5 倍量の 3 mM dihydrostreptomycin を含む 10 mM NaOH (pH 10.0)と 37°Cで、攪拌しながら一晩反応して作製した。StreptoTag 付きの *XBPI* 転写産物は、3 分間、65°Cでインキュベートし変性した。150 pmol の変性した *XBPI* 転写産物は、0,25 mM DTT を含む 100 μ l の Column Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、3 mM MgCl₂)中で、1 mg の HeLa 全細胞抽出液と 20 分間、室温で反応後、2 μ g/ μ l の heparin を加えて、さらに 10 分間、室温で反応した。この反応液を、Column Buffer で平衡化した 1 ml のストレプトマイシン結合レジンに通し、8 ml の Column Buffer で、レジンに吸着していないタンパク質を洗浄した。続いて、レジンに結合したタンパク質を、4 ml の 10 μ M streptomycin を含む Column Buffer で溶出した。溶出画分 1 ml に、10% (w/v) TCA を加え、30 分水上に静置し、*XBPI* mRNA 結合タンパク質を沈殿させた。その沈殿に、SDS Sample Buffer を加えて 98°Cで 5 分間インキュベート後、10% SDS-PAGE により分離し、ゲルと同体積の SYPRO Ruby Protein Gel Stain 染色液(Molecular Probes)にゲルを浸して遮光下で 24 時間、染色した。染色後、紫外線トランスイルミネーターによりゲルを観察し、各バンドを切り出した。切り出したゲルは、それぞれ蒸留水に浸して 4°C で保存した。

質量分析によるタンパク質の解析

プロテアーゼによるゲル内消化法を行い、質量分析のためのサンプル調製をし

た。切り出したゲルを、チューブ内で $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 程度に細分化し、チューブ当たり $200 \text{ }\mu\text{l}$ の ddH_2O 入れ、室温で 3 分間振盪攪拌した。攪拌後、 ddH_2O を取り除き、 $100 \text{ }\mu\text{l}$ の $60\% \text{ CH}_3\text{CN}$ を加えて室温で 20 分間振盪攪拌した。攪拌後、 CH_3CN 液を取り除き、遠心減圧乾燥機を用いて 30 分間ゲルを乾燥させ、 $40 \text{ }\mu\text{l}$ の還元液 ($10 \text{ mM} / 100 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$) を加え、 56°C で 45 分間静置した。その後、室温に戻し、還元液を除き、 $40 \text{ }\mu\text{l}$ のアルキル化液 ($55 \text{ mM ICH}_2\text{CONH}_2 / 100 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$) を加え、遮光下で 30 分間、室温で静置した。静置後、アルキル化液を除き、 $20 \text{ }\mu\text{l}$ の CH_3CN と $20 \text{ }\mu\text{l}$ の ddH_2O をそれぞれ加え、室温で 3 分間振盪攪拌した。攪拌後、溶液を除き、 $40 \text{ }\mu\text{l}$ の CH_3CN を加え、室温で 20 分間振盪攪拌した。攪拌後、 CH_3CN を除き、 $30 \text{ }\mu\text{l}$ の $100 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ を加え、室温で 3 分間振盪攪拌し、さらに $60 \text{ }\mu\text{l}$ の CH_3CN を加え、室温で 3 分間振盪攪拌した。その後、溶液を除き、遠心減圧乾燥機を用いて 30 分間ゲルを乾燥した後、 $40 \text{ }\mu\text{l}$ の Trypsin 溶液 ($12.5 \text{ }\mu\text{g/ml Trypsin} / 50 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$) を加え、氷上で 45 分間静置した。静置後、Trypsin 溶液を除き、 $100 \text{ }\mu\text{l}$ の $50 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ を加え、ピペッティングして余分な Trypsin を洗い出し、溶液を除いた後、 $20 \text{ }\mu\text{l}$ の $50 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ を加え、 37°C で一晩反応させた。次いで、 NH_4HCO_3 溶液を回収し、残ったゲル片に、 $20 \text{ }\mu\text{l}$ の $25 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ を入れ、室温で 10 分間振盪攪拌し、さらに $40 \text{ }\mu\text{l}$ の CH_3CN を加え、室温で 10 分間振盪攪拌した。攪拌後、溶液を再び回収し、残ったゲル片に、 $20 \text{ }\mu\text{l}$ の $5\% \text{ HCOOH}$ を入れ、室温で 10 分間振盪攪拌し、さらに $50 \text{ }\mu\text{l}$ の CH_3CN を加え、室温で 10 分間振盪攪拌した。攪拌後、この溶液も再び回収し、この操作をもう 1 度繰り返した。回収した抽出液は全て合せて遠心減圧乾燥機で $10 \text{ }\mu\text{l}$ 程度になるまで濃縮した。濃縮後に $10 \text{ }\mu\text{l}$ の $5\% \text{ HCOOH}$ を加え、 -20°C で保存した。これを試料溶液として質量分析による解析に用いた。

質量分析 (MS/MS 法) は本学ベンチャービジネスラボラトリーに委託し、質量分析計 LCQ-Advantage (ThermoElectron) により解析された。MS/MS スペクトルのデータベース検索には、TIGR Human Gene Index を用いた。

赤血球抽出液の採取

New Zealand white 種のウサギ (19 週齢, メス) (北山ラベス) から、ベノジェクトヘパリン含有真空採血管 (TERUMO) を用いて 30 ml 採血した。 $120 \times g$, 12 分間、 4°C で遠心し、沈殿を回収した。 1 cpv の氷冷生理食塩水 (0.14 M NaCl , 1.5 mM MgCl_2 , 5 mM KCl) に懸濁し、 $650 \times g$, 5 分間、 4°C で遠心し、沈殿を回収した。この生理食塩水による wash を 6 回行った後、 1 cpv の生理食塩水で懸濁し、 $1020 \times g$, 15 分間、 4°C で遠心し、沈殿した赤血球を回収した。次に、沈

殿と等量の蒸留水を添加し、30 秒間激しく攪拌し、赤血球をバーストした。この懸濁液を 16,000×g、18 分間、4°Cで遠心し、上清を回収し、これを赤血球抽出液とした。赤血球抽出液は分注し、液体窒素で凍結し-80°Cで保存した。

スクロース密度勾配遠心分離

20%または 40%スクロースを含む 20 mM Tris buffer (pH 8.9 at 4°C)を用いて、20-40%のスクロース勾配を作成した。500 µl の赤血球抽出液を、11.5 ml の 20-40%のスクロース勾配に重層し、130,000 ×g、12 時間、4°Cで遠心した。遠心後、上層から 500 µl ずつ回収した。

イオン交換クロマトグラフィー

Mono Q HR 5/5 (GE Healthcare)を使用し FPLC system (Pharmacia)で行った。流速はサンプルアプライ時は 0.1 ml/min.、洗浄、溶出時は 0.5 ml/min.で行い、A(T) buffer (20 mM Tris (pH 8.9 at 4°C), 20% v/v glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT)と B(T) buffer (A buffer + 1 M KCl)で 0.05 M KCl/min.のリニアグラジエントによって溶出させた。サンプルアプライ時は 0.5 ml、洗浄、溶出時は 1 ml ずつサンプルを回収した。溶出面分は A buffer で 2 時間透析を行った。

Heparin sepharose を用いたアフィニティークロマトグラフィー

Heparin sepharose (GE Healthcare)を使用し FPLC system で行った。流速はサンプルアプライ時、毎分 0.2 ml、洗浄、溶出時、毎分 0.5 ml で行い、A(T) buffer と B(T) buffer で KCl 濃度 0.4 M、1.5 M で段階的に溶出した。全て 2 ml ずつ回収し、溶出面分は A buffer で 2 時間透析を行った。

結 果

XBPI mRNA スプライシング反応の *in vitro* での再構成

XBPI mRNA スプライシング機構を解析する一つ的手段として、このスプライシング反応を *in vitro* で再構成することを目指した。先に述べたように、現在までに、*XBPI* mRNA スプライシングにおける RNA リガーゼは、同定されていない。そこで、*in vitro* でスプライシング反応を再現する方法として、リガーゼ活性の供給源として細胞抽出液を用いた、無細胞反応系を構築することを試みた。第一部で示したように、*XBPI* mRNA は、IRE1 α により直接切断されて、*in vitro*

で組換え IRE1 α タンパク質(rIRE1 α)と *XBPI in vitro* 転写産物を直接反応することにより、IRE1 α による *XBPI* mRNA の部位特異的切断を再現することができる(Fig. 7A)。そこで、放射線ラベルした *XBPI* 転写産物を rIRE1 α と 30°C、30 分間反応し、切断反応を行った後、リガーゼ活性物質の供給源として HeLa 細胞の全細胞抽出液を加え、さらに 30°C で 30 分間反応し、切断された 5'、3' 断片の連結反応を試みた(Fig. 10A)。その結果、*XBPI* mRNA のスプライス型断片と考えられる位置に、非常に弱い、細胞抽出液の濃度依存的にシグナルが検出された(Fig. 11)。この結果は、HeLa 全細胞抽出液にリガーゼ活性が含まれ、この活性によって、rIRE1 α によって切断された *XBPI* mRNA が連結される可能性を示唆している。しかし、この HeLa 全細胞抽出液に含まれるリガーゼ活性は非常に弱いため、より高いリガーゼ活性を保った細胞抽出液の探索を行った。その結果、*HeLaScribe(R) Nuclear Extract* (Promega)に、高いリガーゼ活性が確認された(Fig. 12A)。この抽出液は、Dignam らによって構築された方法(Dignam et al., 1983)で取得された HeLa 細胞の核抽出液である。この核抽出液を用いた *in vitro* *XBPI* mRNA スプライシング再構成系によって得られた RNA 断片を、*XBPI* mRNA 特異的なプライマーを用いた RT-PCR によって検出した結果、オートラジオグラムの結果と一致して、スプライス型 *XBPI* 断片と考えられる長さの断片が検出された(Fig. 12B)。さらに、RT-PCR により増幅された非スプライス型およびスプライス型 *XBPI* の DNA 配列を確認した結果、正しい配列でスプライシングが行われていることが確認された(Fig. 12C)。よって、この *in vitro* *XBPI* mRNA スプライシング再構成系は、正しく機能していると考えられる。また、この再構成系は、*XBPI* 転写産物と rIRE1 α 、細胞抽出液を同時に加え、30°C で 1 時間反応させることにより、一段階で行うことも可能であった(Fig. 10B, data not shown)。これ以降の反応は、特に断りのない場合、一段階の反応で行っている。

サイトゾルに局在する *XBPI* mRNA リガーゼ活性

上記の解析で、核抽出液に *XBPI* mRNA リガーゼ活性が含まれることが確認されたが、実際には、*XBPI* mRNA スプライシングが、細胞内のどこで起こるのかはわかっていない。そこで、この RNA リガーゼ活性の細胞内局在を、Dignam らによって構築された遠心分離による細胞分画法により分離した核および細胞質抽出液を用いて比較した(Fig. 13, 14)。その結果、サイトゾル画分にも高いリガーゼ活性が確認され、その活性は、核画分と比較して、より高いことが確認された(Fig. 14, lanes 4, 6)。さらに、この活性の強さや局在が、小胞体ストレスに応じて変化するかを確認するため、N 型糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシンに

よる人為的な小胞体ストレスを誘導した HeLa 細胞から抽出した各画分の活性を比較したが、その活性に変化は見られなかった (Fig. 14, lanes 5, 7)。また、サイトゾル画分によるスプライシング反応で得られた PCR 産物についても、その DNA 配列を確認したが、核画分を用いた場合と同様、部位特異的にスプライシングが起きていることが確認できた (data not shown)。これらの結果から、リガーゼ活性物質は定常状態で十分に発現しており、小胞体ストレスによっても、その局在および活性には影響を受けないことが示唆された。

XBPI mRNA スプライシングの GTP 依存性

序論で述べたように、酵母の *HAC1* mRNA スプライシングは、tRNA スプライシングと類似しており、tRNA リガーゼによって ATP および GTP 依存性の反応が進行することが知られている (Fig. 15) (Cox and Walter, 1996; Greer et al., 1983)。そこで、*XBPI* mRNA のスプライシングも、tRNA スプライシングと類似の反応であるかを確認するため、ATP および GTP の必要性を確認した。上述の *in vitro* *XBPI* mRNA スプライシング再構成系は、tRNA スプライシングとの類似性を考慮して、ATP および GTP を含むバッファーで構築した。そのため、ATP および GTP 不含のバッファーを用いて解析を行ったが、細胞抽出液を用いた *in vitro* 再構成系では、細胞抽出液に内在性の ATP や GTP を多く含むため、その必要性を判断することができなかった (data not shown)。そこで、これら内在性の ATP、GTP の影響を除くため、核およびサイトゾル画分を硫酸アンモニウム分画により粗精製した。核画分では硫酸アンモニウム濃度 45~65%の画分において、強い活性が確認され (Fig. 16A)、内在性の ATP 量は、検出限界以下であった (data not shown)。また、サイトゾル画分においても、硫酸アンモニウム濃度 30~70%の画分に、強い活性が確認され (Fig. 16B)、内在性の ATP 量は、検出限界以下であった (data not shown)。内在性の GTP 量は測定できていないが、ATP と同様、減少しているものと考えられる。

そこで、これらの硫酸アンモニウム分画後の画分を用いて、*XBPI* mRNA スプライシングにおける ATP および GTP の必要性を確認した。硫酸アンモニウム濃度 45~65%の核抽出液画分を用いた解析の結果、ATP、GTP を共に添加した場合に比べて、GTP を添加しなかった場合には、スプライシングの効率は、約 30% 減少した (Fig. 17A, lanes 1, 2, B)。しかし、ATP を添加しなかった場合には、減少は見られなかった (Fig. 17A, lanes 1, 3, B)。ATP および GTP の必要性をさらに詳しく検証するため、GTP の γ 位のリン酸基が加水分解されないアナログである GTP- γ S、ATP の α 位、 γ 位それぞれのリン酸が加水分解されないアナログである ATP- α S、AMPPNP を用いた競合阻害解析の結果、GTP- γ S を加えた場

合には、ATP、GTP 存在下で、スプライシング効率は、約 40%減少した(Fig. 17A, lanes 1, 5, B)。また、予想に反して、ATP- α S および AMPPNP を加えた場合においても同様に、スプライシング効率は、約 30%減少した(Fig. 17A, lanes 1, 6, 7, B)。また、この傾向は、硫酸アンモニウム濃度 30~70%のサイトゾル画分を用いた場合でも同様であった(Fig. 17C)。

さらに、各アナログによるスプライシング効率の減少が、IRE1 α による *XBPI* mRNA の切断反応の阻害によるのか、連結反応の阻害によるのかを確認するため、各アナログが、切断反応に及ぼす影響を確認した。その結果、どのアナログについても、切断反応には大きく影響していないことが確認された(Fig. 18)。これらの結果から、*XBPI* mRNA スプライシング反応、特に連結反応に GTP が必要であり、GTP の γ 位のリン酸基が加水分解され、利用されることが示唆された。

そこで、GTP が、このスプライシング反応にどのように利用されているのかを探るため、*HACI* mRNA スプライシングで観察される GTP の γ 位のリン酸基の切断断片およびスプライス型断片への取り込み(Fig. 15) (Cox and Walter, 1996) が、*XBPI* mRNA スプライシングでも観察されるか確認した。その結果、GTP の γ 位のリン酸基の取り込みは、*XBPI* mRNA のどの断片にも観察されなかった(Fig. 19, lane 5)。また、GTP の γ 位のリン酸基と同様に *HACI* mRNA スプライシングで観察される切断断片のアデニル化に伴う ATP の α 位のリン酸基の取り込み(Cox and Walter, 1996)も観察されなかった(Fig. 19, lane 6)。 α - 32 P ATP を加えた場合に見られる二つのシグナルは、*XBPI* 転写産物を加えていない場合も見られることから(Fig. 19, lanes 4, 6)、細胞抽出液に含まれる何らかの物質がリン酸化ないしアデニル化されたシグナルである可能性が高い。

XBPI mRNA 結合タンパク質の同定

次に、*XBPI* mRNA スプライシングにかかわる分子を同定するため、*XBPI* mRNA 結合タンパク質の解析を行った。まず、上記の *in vitro* *XBPI* mRNA スプライシング再構成系で用いた *XBPI* 転写産物をプローブに、RNA ゲルシフトアッセイを行ったところ、rIRE1 α と反応した場合には、バンドのシフトは観察されなかった(Fig. 20, lanes 2, 3)が、HeLa 全細胞抽出液と反応した場合には、バンドのシフトが観察され、このシフトバンドは、放射線ラベルされていない 100 倍量の *XBPI* 転写産物による競合阻害で消失した(Fig. 20, lanes 4, 5)。このことから、HeLa 全細胞抽出液中に含まれる何らかの分子が、*XBPI* 転写産物特異的に結合していることが示唆された。そこで、この結合している分子を同定するため、StreptoTag 法を用いて、*XBPI* mRNA 結合タンパク質を分離した。StreptoTag 法とは、ストレプトマイシン結合性の RNA 配列である StreptoTag を付加した

RNA プローブ(Fig. 21A)を用いて、ストレプトマイシンを結合したレジンでその RNA プローブを捕捉し、結合分子を分離精製する方法である(Bachler et al., 1999)。ゲルシフトアッセイで何らかの分子の結合が確認された *XBPI* 配列の 3' 末端に、StreptoTag を付加した RNA プローブと HeLa 全細胞抽出液を反応させ、ストレプトマイシン結合レジンで、*XBPI* 結合タンパク質を取得した結果、SDS-PAGE により、約 15 本のバンドが確認された(Fig. 21B)。LC-MS/MS 解析により、Table 1 に示すように、この内 8 本のバンドで 9 種類のタンパク質を同定した。

この同定した *XBPI* mRNA 結合タンパク質が、*XBPI* mRNA スプライシングに関わっているか確認するため、RNA 干渉法によって各遺伝子をノックダウンし、それに伴う *XBPI* mRNA スプライシングへの影響を観察した。この同定したタンパク質の中で、RNA スプライシングにかかわることが知られている、SFPQ (Dong et al., 1993; Patton et al., 1993) (Table 1, Sample No. 1)と NONO (p54nrb) (Sewer et al., 2002; Sewer and Waterman, 2002) (Table 1, Sample No. 6)について解析を行った。その結果、SFPQ、NONO それぞれをノックダウンした HeLa 細胞においては、*XBPI* mRNA スプライシングへの影響は観察されなかった(Fig. 22)。SFPQ と NONO は相同性が 60%と比較的高く、さらに SFPQ と NONO は複合体を形成して RNA スプライシングを制御していることが知られている(Dong et al., 1993; Sewer et al., 2002; Sewer and Waterman, 2002)ので、SFPQ と NONO を同時にノックダウンした HeLa 細胞において、*XBPI* mRNA スプライシングへの影響を確認したが、影響は観察されなかった(Fig. 22 lanes 9, 10)。その他のタンパク質については、現在検討中である。

赤血球抽出液からの RNA リガーゼ活性物質の分離精製

また、*XBPI* mRNA に対するアフィニティーだけでなく、*in vitro* *XBPI* mRNA スプライシング再構成系を用いて活性のある画分を同定し、*XBPI* mRNA リガーゼ活性物質を細胞抽出液から分離することを試みた。HeLa 細胞抽出液の解析から、細胞質により高い RNA リガーゼ活性が局在することが確認された(Fig. 14)。そこで、精製に用いる細胞抽出液として、脱核され細胞質のみとなった赤血球に注目した。市販のウサギ網状赤血球抽出液(*Rabbit Reticulocyte Lysate* [Promega])を用いて活性を確認した結果、網状赤血球抽出液にも *XBPI* mRNA リガーゼ活性が含まれることが確認されたが、その活性は、HeLa 細胞質抽出液よりも約 20 倍低かった(Fig. 23A)。しかし、網状赤血球抽出液の SDS-PAGE の結果から、ヘモグロビン以外の夾雑タンパク質はある程度少ない状態であることが確認でき(Fig. 23B)、ヘモグロビンを除くことができれば、リガーゼ活性物質

の精製に十分用いることが出来ると考えた。そこで、網状赤血球より簡便に取得できる赤血球の抽出液を用いても、同様の活性が得られるかを確認した。その結果、赤血球抽出液を用いた場合でも強いリガーゼ活性が見られ(Fig. 23C)、SDS-PAGEの結果も網状赤血球抽出液とほぼ同様であった(Fig. 23D)。そこで、ウサギから採取した赤血球抽出液を用いてリガーゼ活性物質の精製を試みた。

粗精製として、まず、赤血球抽出液を20~40%のスクロース密度勾配遠心で分離した結果、スクロース濃度約22~25%の画分で、特に強いリガーゼ活性が見られた(Fig. 24, Fraction No. 2-5)。次に、スクロース密度勾配遠心で得られた高活性画分(No. 2-5)を、陰イオン交換クロマトグラフィー(MonoQ)により分画した。その結果、1 M KClで溶出を開始してから6番目の画分に最も高いリガーゼ活性が確認できた(Fig. 25A, Fraction No. 21)。その画分をSDS-PAGEで確認したところ、ヘモグロビンの混入は大きく減少し、リガーゼ活性物質が精製されていることが確認された(Fig. 25B)。しかし、この画分には、まだ多くの夾雑タンパク質が含まれるため、更なる精製法として、陰イオン交換クロマトグラフィーで最も活性の高かった画分(No. 21)を、核酸結合タンパク質に親和性を持つヘパリンセファロースを用いて分画した。その結果、非吸着画分にも多くのリガーゼ活性が流出しているが(Fig. 26, Fraction No. 1-10)、リガーゼ活性物質の一部はヘパリンに吸着し、0.4 M KClで溶出させた場合リガーゼ活性が溶出後6フラクション目(10~12 ml)の画分に溶出することが確認された(Fig. 26, Fraction No. 41)。SDS-PAGEの結果、この画分に含まれるタンパク質の種類は非常に少なく、銀染色で確認した結果、約4本のバンドが確認された(Fig. 26B)。そこで、これらのバンドを切り出し、LC-MS/MS解析により同定した。その結果、Table 2に示すように、計25種類のタンパク質が同定された。しかし、同定されたタンパク質が多いため、更なる精製方法を現在検討中である。

Fig. 10

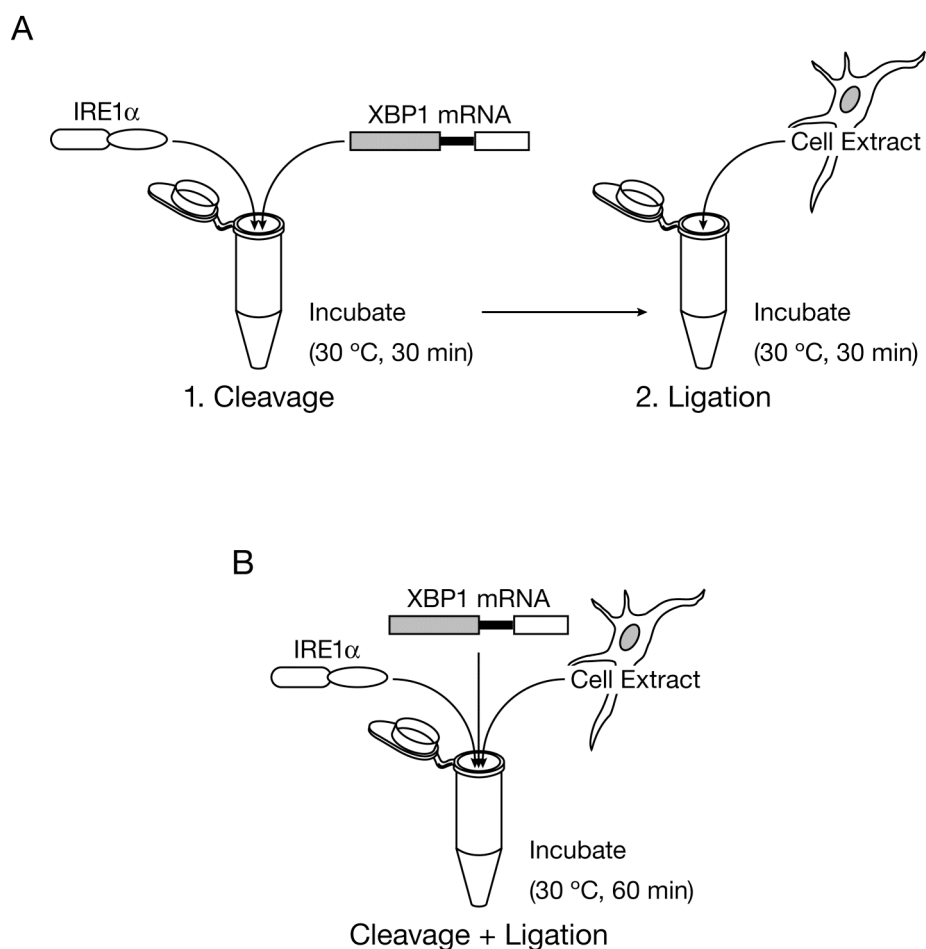


Fig. 10

In vitro XBP1 mRNA スプライシング再構成系の概略図

(1) XBP1 転写産物は、rIRE1 α と、30°Cで、30 分間、キナーゼバッファー中で、切断反応を行う。(2) 種々の細胞抽出液を加え、30°Cで、30 分間、キナーゼバッファー中で、連結反応を行う(A)。また、切断と連結からなるスプライシング反応を一段階で行う場合は、XBP1 転写産物と、rIRE1 α 、種々の細胞抽出液を同時に、30°Cで、60 分間、キナーゼバッファー中で反応する(B)。

Fig. 11

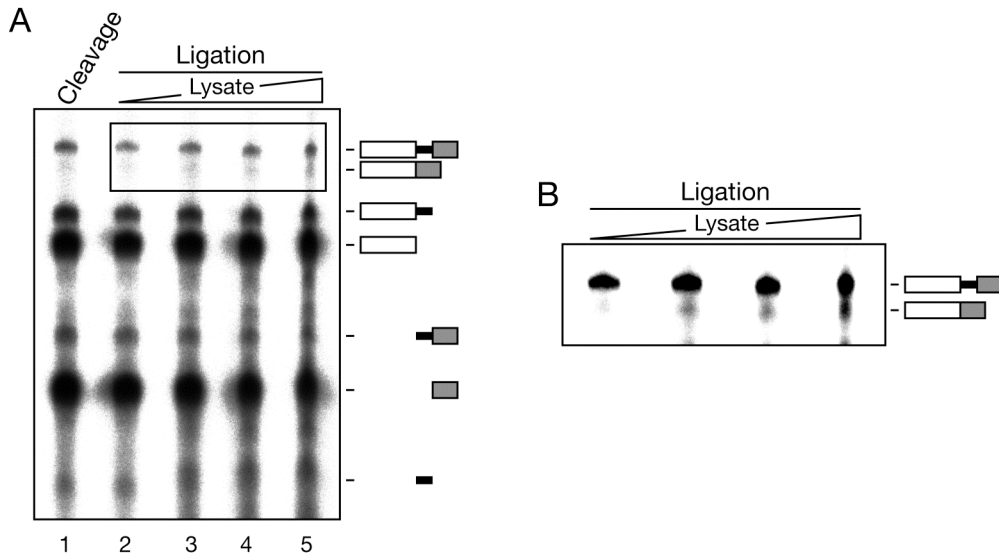


Fig. 11

A, HeLa 全細胞抽出液を用いた XBPI mRNA スプライシングの再構成

放射線ラベルした XBPI 転写産物は、rIRE1 α と、30°Cで、30 分間、キナーゼバッファ中で、切断反応を行った。その後、HeLa 全細胞抽出液を、それぞれ、1.0, 2.5, 5.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 加え、30°Cで、30 分間、連結反応を行った。Cleavage は、細胞抽出液を加えていない反応の結果を示している。反応後、放射線ラベルされた RNA 断片は、urea 変性アクリルアミドゲルで分離し、オートラジオグラムで検出した。図の右側のアイコンは、IRE1 による切断反応で生じる XBPI mRNA 断片と、連結反応で生じる XBPI mRNA 断片を示している。四角と線は、それぞれ XBPI mRNA のエクソンとイントロンを示す。

B, スプライシングされた断片の拡大図

A の四角で囲んだ範囲を拡大した。

Fig. 12

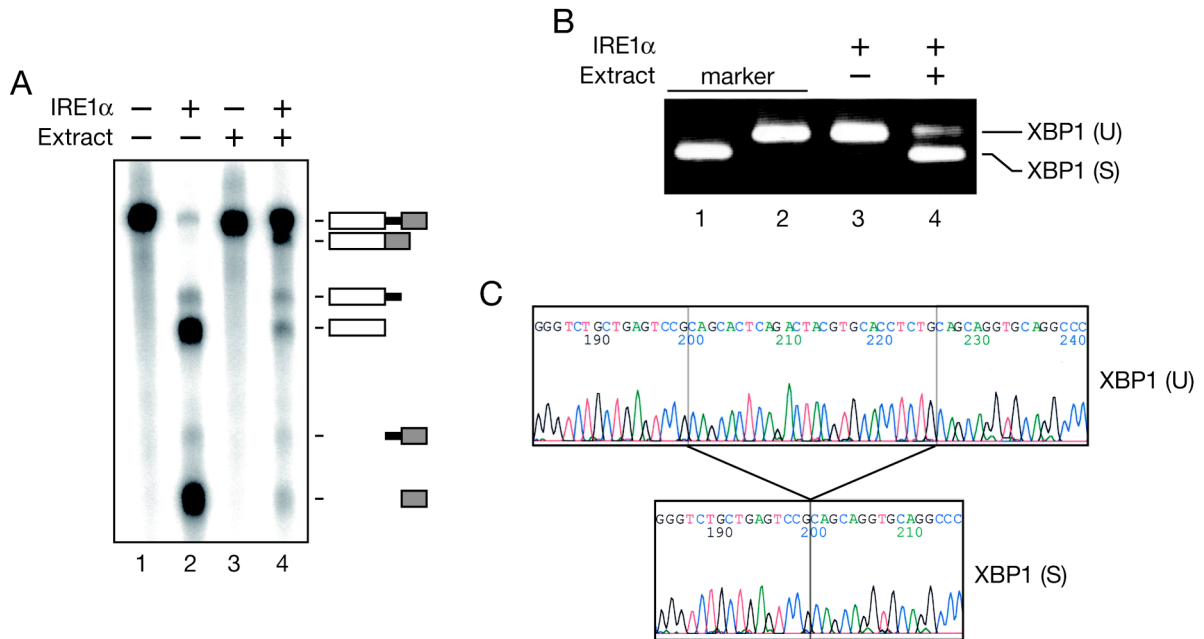


Fig. 12

A, 核抽出液を用いた *XBPI* mRNA スプライシングの再構成

XBPI 転写産物と、rIRE1 α 、1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の HeLa 核抽出液を、30°Cで、60 分間、キナーゼバッファー中で反応し、切断と連結からなるスプライシング反応を一段階で行った。反応後、放射線ラベルされた RNA 断片は、urea 変性アクリルアミドゲルで分離し、オートラジオグラムで検出した。図の右側のアイコンは、IRE1 による切断反応で生じる *XBPI* mRNA 断片と、連結反応で生じる *XBPI* mRNA 断片を示している。四角と線は、それぞれ *XBPI* mRNA のエクソンとイントロンを示す。

B, *XBPI* mRNA スプライシングの RT-PCR による検出

XBPI 転写産物と、rIRE1 α 、1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の HeLa 細胞核抽出液を、30°Cで、60 分間、キナーゼバッファー中で反応し、スプライシング反応を行った。反応後、抽出した RNA を、*XBPI* 特異的なプライマーを用いて、一般的な RT-PCR によって検出した。スプライイス型と非スプライイス型の *XBPI* は、それぞれ *XBPI*(U)、*XBPI*(S)と示した。

C, *XBPI* mRNA スプライシング断片の配列の確認

B で検出された、*XBPI*(U)、*XBPI*(S)それぞれの cDNA 断片を、ゲルから切り出し、DNA シーケンサーで配列を確認した。

Fig. 13

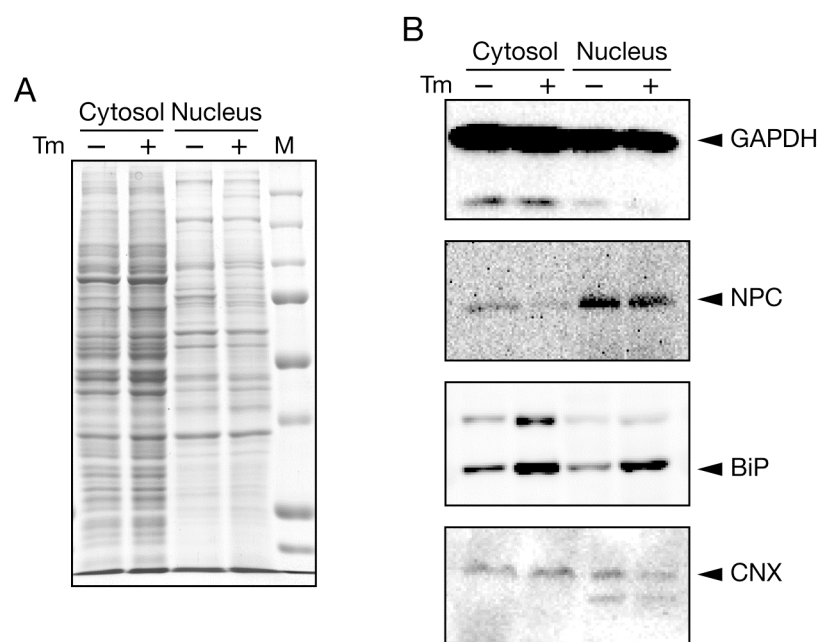


Fig. 13

A, サイトゾルと核の細胞分画

低調処理後の細胞を遠心分離により、核画分とサイトゾル(S-100)画分に分画した。分画前に、一部の細胞は、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のツニカマイシン(Tm)で6時間処理した。分画した各画分 10 μg を、SDS-PAGE (10%)により分離し、CBB で染色した。M は、分子量マーカー *Precision Plus Protein standards* (Bio Rad)を示している。

B, 各画分に含まれるタンパク質の確認

分画した各画分 10 μg を、SDS-PAGE (10%)により分離し、それぞれ、サイトゾルのマーカータンパク質として GAPDH、核のマーカータンパク質として Nuclear Pore Complex (NPC)、小胞体のマーカーとして小胞体保留シグナル KDEL (図には、KDEL 配列を持つ小胞体シャペロン分子 BiP のシグナルを示す)、膜画分のマーカータンパク質としてカルネキシン(CNX)に対する抗体を用いてウェスタンブロットにより検出した。

Fig. 14

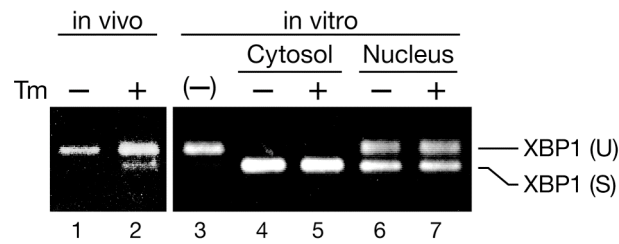


Fig. 14

サイトゾルおよび核抽出液のリガーゼ活性の比較

XBPI 転写産物と、*rIRE1 α* 、1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の各画分を、30°Cで、60 分間、キナーゼバッファー中で反応し、スプライシング反応を行った。分画前に、一部の細胞は、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のツニカマイシン(Tm)で6時間処理した。反応後、抽出した RNA を、*XBPI* 特異的なプライマーを用いて、一般的な RT-PCR によって検出した。in vivo は、HeLa 細胞から抽出した totalRNA を、*XBPI* 特異的なプライマーを用いて、一般的な RT-PCR によって検出した結果を示す。スプライス型と非スプライス型の *XBPI* は、それぞれ XBPI(U)、XBPI(S)と示した。

Fig. 15

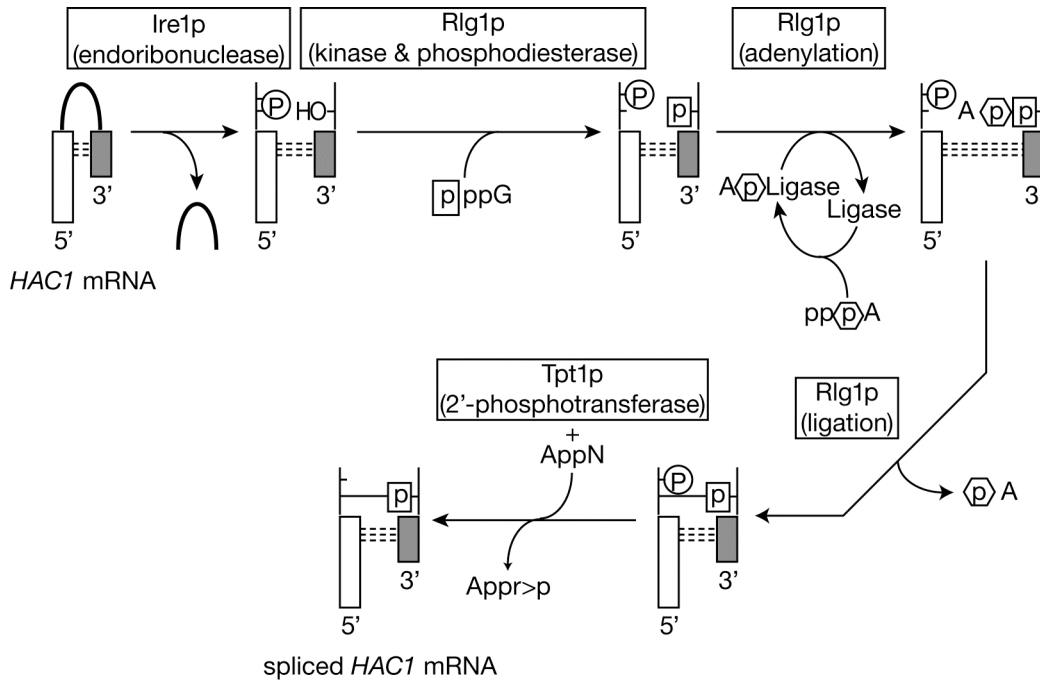


Fig. 15

HAC1 mRNA スプライシング機構の概略図

活性化した Ire1p は、*HAC1* mRNA の 5'、3'両エクソン-イントロン接合部を切断し、5'エクソンの 3'末端に 2', 3'環状リン酸と 3'エクソンの 5'末端に遊離の 5'-OH 基を産生する。tRNA リガーゼとして知られている Rlg1p は、対になったエクソンに作用し、GTP の γ 位に由来するリン酸基で 3'エクソンの 5'末端をリン酸化する。この GTP に由来するリン酸基は、最終的にスプライスされた *HAC1* mRNA において二つのエクソンを連結する。また、Rlg1 のリン酸ジエステル加水分解酵素活性は、2', 3'環状リン酸を 2'位に開く。次に、Rlg1p は、3'エクソンの 5'末端をアデニル化し、この結合に貯えたエネルギーを使って二つのエクソンを連結する。新たにスプライスされた *HAC1* mRNA のスプライス接合部は、5'スプライス部位に由来する 2'リン酸基を保有する。そこで、NAD 依存的な 2'リン酸基転移酵素である Tpt1p が、このリン酸基を NAD に転移し、ADP リボース 1'-2'環状リン酸と 2'リン酸基の遊離した *HAC1* mRNA を産生する。

Fig. 16

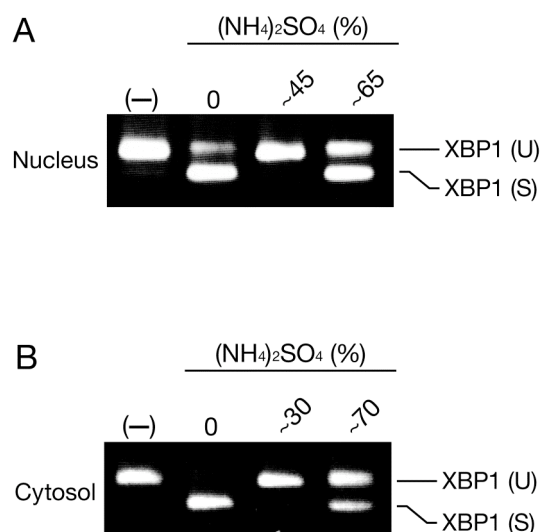


Fig. 16

A, 核画分の硫酸アンモニウム分画による精製

4.5 mg/ml の HeLa 細胞核抽出液を硫酸分画し、硫酸アンモニウム濃度 0-45%、45-65% の画分に分けた。1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の各画分を、*XBPI* 転写産物、rIRE1 α と、30°C で、60 分間、キナーゼバッファー中で反応し、スプライシング反応を行った。反応後、抽出した RNA を、*XBPI* 特異的なプライマーを用いて、一般的な RT-PCR によって検出した。

B, サイトゾル画分の硫酸アンモニウム分画による精製

5 mg/ml の HeLa 細胞サイトゾル抽出液を硫酸分画し、硫酸アンモニウム濃度 0-30%、30-70% の画分に分けた。1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の各画分を、*XBPI* 転写産物、rIRE1 α と、30°C で、60 分間、キナーゼバッファー中で反応し、スプライシング反応を行った。反応後、抽出した RNA を、*XBPI* 特異的なプライマーを用いて、一般的な RT-PCR によって検出した。

スプライス型と非スプライス型の *XBPI* は、それぞれ XBP1(U)、XBP1(S) と示した。(–) は、抽出液を加えていない反応の結果を示している。

Fig. 17

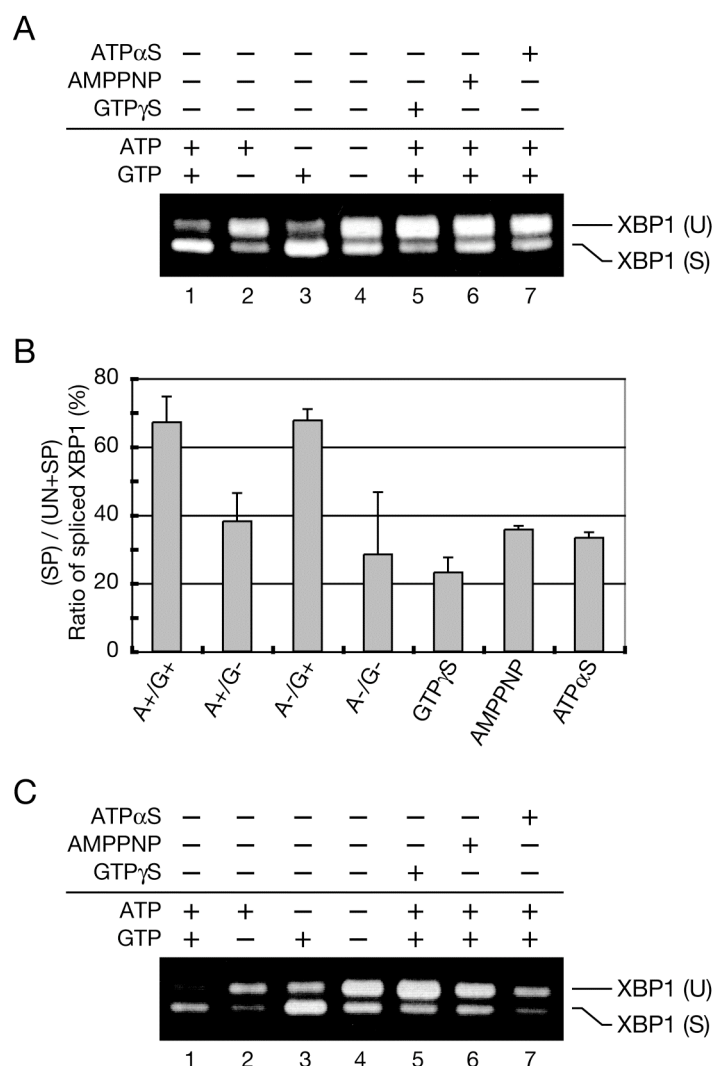


Fig. 17

A, *XBP1* mRNA スプライシングにおける ATP および GTP の必要性 (核抽出液)

XBP1 転写産物と、rIRE1 α 、1.0 μ g/ μ l の核抽出液の硫酸アンモニウム 45-65%の画分を、30°Cで、60 分間、キナーゼバッファー中で反応し、スプライシング反応を行った。この時、1.5 mM ATP および GTP、4.5 mM ATP α S、AMPPNP、GTP γ S を図に示したように添加した。反応後、抽出した RNA を、*XBP1* 特異的なプライマーを用いて、一般的な RT-PCR によって検出した。スプライス型と非スプライス型の *XBP1* は、それぞれ XBP1(U)、XBP1(S)と示した。

B, スプライシング効率の定量

XBP1 mRNA スプライシングは、RT-PCR により検出し、その相対量を BAS2500 により定量した。各スプライシング効率は、非スプライス型 *XBP1* 断片量/(非スプライス型 *XBP1* 断片量+スプライス型 *XBP1* 断片量) \times 100 (%)で示している。エラーバーは、3

回実験を行った標準偏差を示している。

C, *XBPI* mRNA スプライシングにおける ATP および GTP の必要性 (細胞質抽出液)

XBPI 転写産物と、rIRE1 α 、1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の細胞質抽出液の硫酸アンモニウム 45-65% の画分を、30°Cで、60 分間、キナーゼバッファー中で反応し、スプライシング反応を行った。この時、1.5 mM ATP および GTP、4.5 mM ATP α S、AMPPNP、GTP γ S を図に示したように添加した。反応後、抽出した RNA を、*XBPI* 特異的なプライマーを用いて、一般的な RT-PCR によって検出した。スプライス型と非スプライス型の *XBPI* は、それぞれ *XBPI*(U)、*XBPI*(S)と示した。

Fig. 18

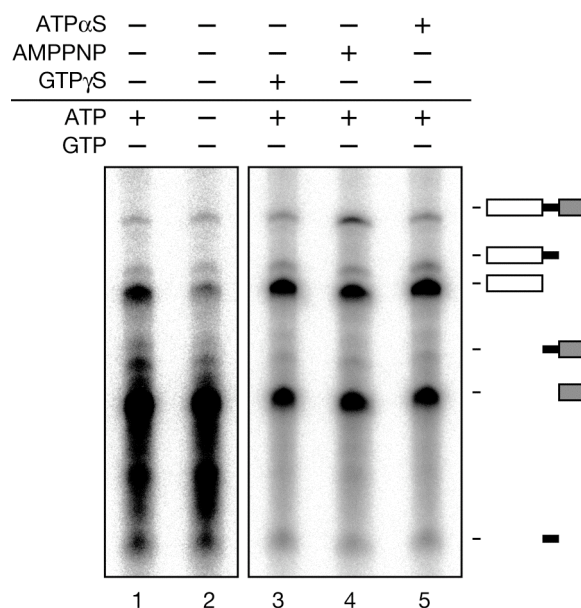


Fig. 18

ATP、GTP アナログが *XBPI* mRNA 切断に及ぼす影響

放射線ラベルした *XBPI* 転写産物と、rIRE1 α を、30°Cで、30 分間、キナーゼバッファ中で反応し、切断反応を行った。この時、1.5 mM ATP および GTP、4.5 mM ATP α S、AMPPNP、GTP γ S を図に示したように添加した。反応後、各 RNA 断片は、urea 変性アクリルアミドゲルで分離し、オートラジオグラムで検出した。図の右側のアイコンは、IRE1 による切断反応で生じる *XBPI* mRNA 断片と、連結反応で生じる *XBPI* mRNA 断片を示している。四角と線は、それぞれ *XBPI* mRNA のエクソンとイントロンを示す。

Fig. 19

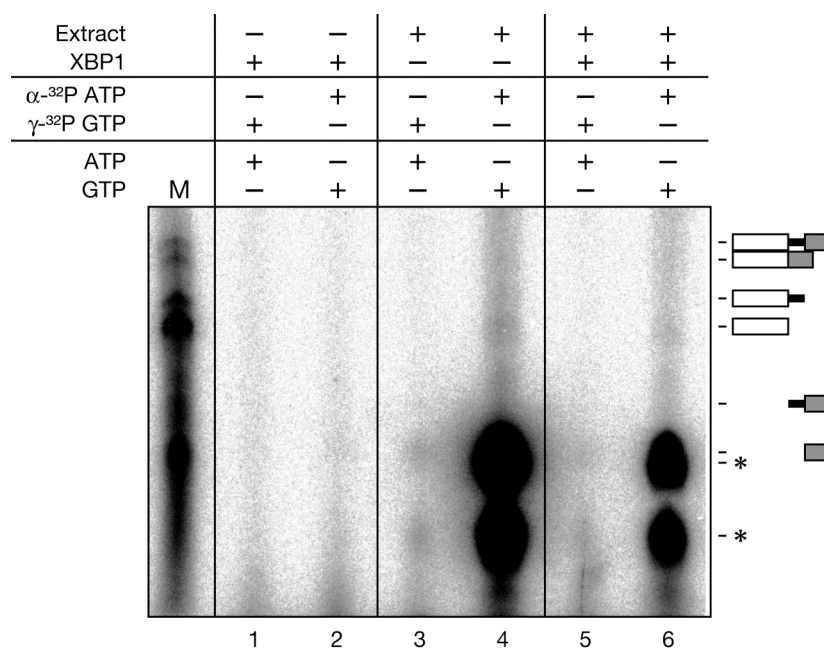


Fig. 19

XBP1 mRNA 断片への GTP および ATP の取り込み

XBP1 転写産物と、rIRE1 α 、1.0 μ g/ μ l の核抽出液の硫酸アンモニウム 45-65%の画分を、30°Cで、60分間、キナーゼバッファー中で反応し、スプライシング反応を行った。この時、1.5 mM ATP、65 μ Ci の α -³²P ATP、200 μ Ci の γ -³²P GTP を図に示したように添加した。反応後、RNA 断片は、urea 変性アクリルアミドゲルで分離し、オートラジオグラムで検出した。M は、放射線ラベルした *XBP1* 転写産物と、rIRE1 α 、1.0 μ g/ μ l の核抽出液の硫酸アンモニウム 45-65%の画分を、30°Cで、60分間、キナーゼバッファー中で反応し、スプライシング反応を行った結果を示しており、IRE1 による切断反応で生じる *XBP1* mRNA 断片と、スプライシング反応で生じる *XBP1* mRNA 断片のマーカールとして示している。図の右側のアイコンは、IRE1 による切断反応で生じる *XBP1* mRNA 断片と、連結反応で生じる *XBP1* mRNA 断片を示している。四角と線は、それぞれ *XBP1* mRNA のエクソンとイントロンを示す。

Fig. 20

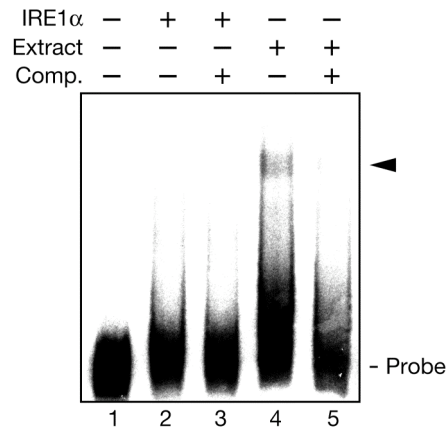


Fig. 20

RNA ゲルシフトアッセイによる *XBPI* mRNA 結合タンパク質の確認

放射線ラベルした *XBPI* 転写産物をプローブとして用い、1 μ g の rIRE1 α もしくは 3 μ g の HeLa 全細胞抽出液と Binding Buffer 中で反応させた。反応後、各サンプルは、4%ポリアクリルアミドゲルで分離し、オートラジオグラムで検出した。Comp.は、競合阻害 RNA を示しており、プローブとして用いた *XBPI* 転写産物の 100 倍量の放射線ラベルされていない *XBPI* 転写産物を示す。

Fig. 21

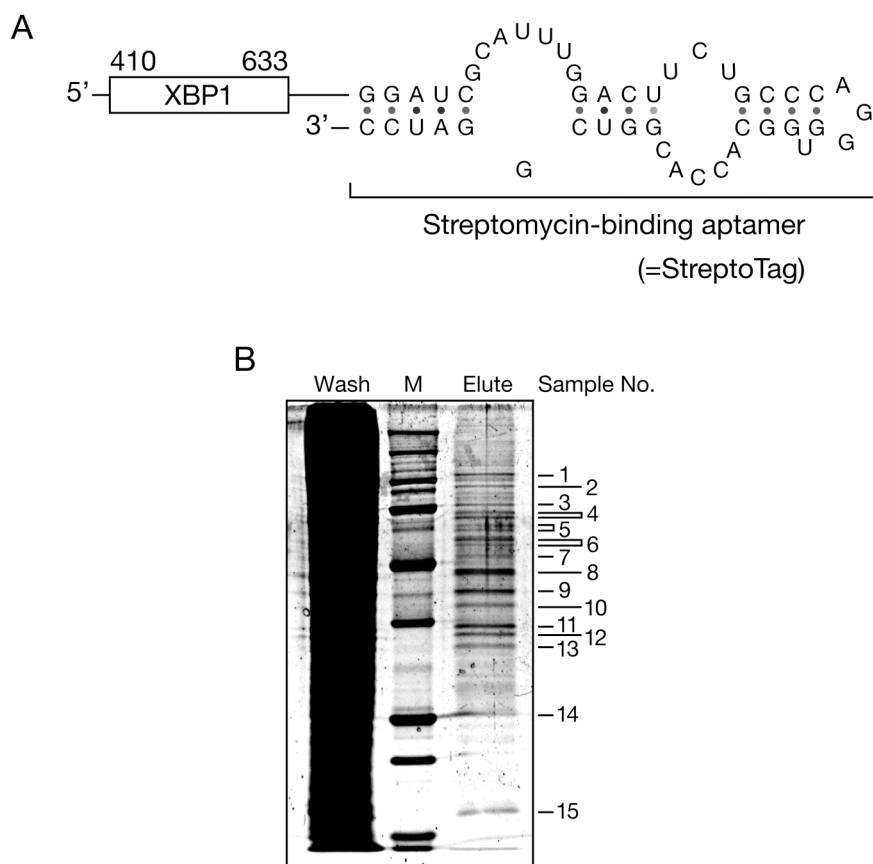


Fig. 21

A, Streptomycin-binding aptamer (StreptoTag)を含む XBP1 転写産物の概略図

410 から 633 番目の XBP1 mRNA の 3'末端に、ストレプトマイシン結合性の RNA である StreptoTag を付加した。

B, StreptoTag 法による XBP1 mRNA 結合タンパク質の精製

StreptoTag 法により分離した洗浄画分(wash)と溶出画分(Elute)各 1 ml を TCA で沈殿させた。その沈殿を、10% SDS-PAGE により分離後、SYPRO Ruby Protein Gel Stain 染色液で染色し、確認された各バンドを切り出した。図の右側の数字は、確認されたバンドを切り出し、MS 解析を行ったサンプルの通し番号を示す。M は、分子量マーカー Precision Plus Protein standards (Bio Rad)を示している。

Table 1

Sample No.	候補タンパク質	ペプチド数
1	SFPQ	9
2	同定できず	—
3	Ezrin / Radixin / Moesin (ERM)	9
4	HSP70	24
5	同定できず	—
6	NONO (p54nrb)	8
7	同定できず	—
8	同定できず	—
9	同定できず	—
10	Aldolase A	8
11	GAPDH	3
	Uracil DNA glycosylase	1
12	hnRNP A2 / B1	2
13	hnRNP A1	14
14	同定できず	—
15	同定できず	—

Table 1

XBPI mRNA 結合タンパク質

StreptoTga 法により分離精製した各サンプルを、質量分析した。質量分析による解析の結果は、TIGR Human Gene Index を用いてデータベース検索を行った。*XBPI* mRNA 結合タンパク質 15 種類の内、LC-MS/MS 解析により、8 種類のサンプルについて、部分アミノ酸配列を取得し、タンパク質を同定した。Sample No.は、Fig. 21 に示す、通し番号と一致している。

Fig. 22

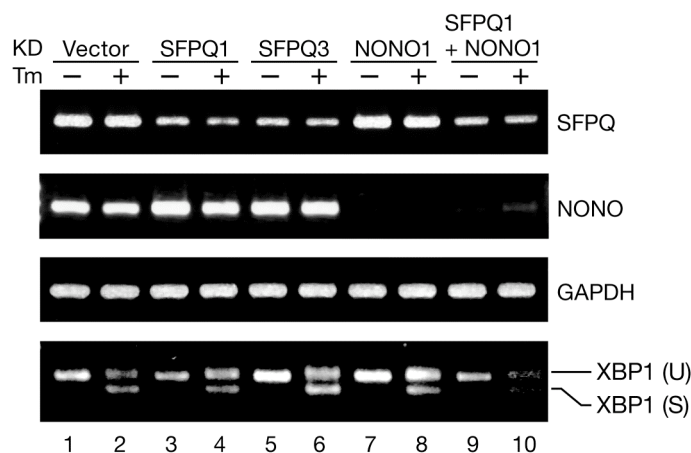


Fig. 22

XBPI mRNA 結合タンパク質の XBPI mRNA スプライシングに及ぼす影響

SFPQ1、SFPQ3 は、SFPQ に対する配列を挿入したノックダウンプラスミドを、NONO1 は、NONO に対する配列を挿入したノックダウンプラスミドを示している。各遺伝子のノックダウン効果および、XBPI mRNA のスプライシングは、各ノックダウンプラスミドをトランスフェクトした HeLa 細胞から、トランスフェクション 36 時間後に回収した total RNA と、oligo-dT プライマー、SFPQ、NONO、GAPDH、XBPI の各遺伝子特異的なプライマーを用いて、一般的な RT-PCR によって検出した。スプライス型と非スプライス型の XBPI は、それぞれ XBPI(U)、XBPI(S)と示した。一部の細胞は、2 μg/ml のツニカマイシン(Tm)で 6 時間処理した。

Fig. 23

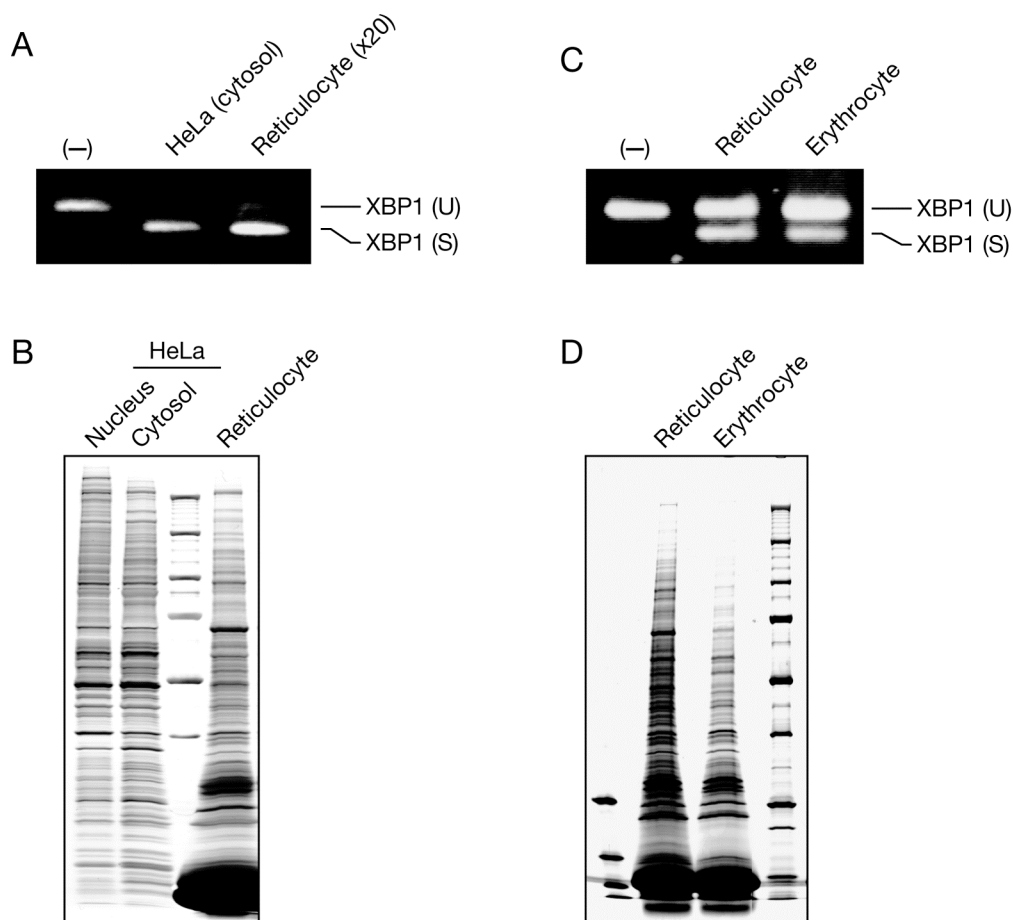


Fig. 23

A. 網状赤血球抽出液の RNA リガーゼ活性

HeLa 細胞質抽出液 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ と網状赤血球抽出液 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ で *in vitro* splicing 反応後、RT-PCR を行い 2% アガロースゲルで電気泳動した。

B. 細胞抽出液に含まれるタンパク質

HeLa 細胞核抽出液、細胞質抽出液各 5 μg と網状赤血球抽出液 30 μg を 4-20% 濃度勾配ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。その後、銀染色でバンドを検出した。

C. 赤血球抽出液の RNA リガーゼ活性

網状赤血球抽出液と赤血球抽出液各 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ で *in vitro* splicing 反応後、RT-PCR を行い、2% アガロースゲルで電気泳動した。

D. 赤血球抽出液に含まれるタンパク質

網状赤血球抽出液と赤血球抽出液各 30 μg を、4-20% 濃度勾配ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。その後、銀染色でバンドを検出した。

Fig. 24

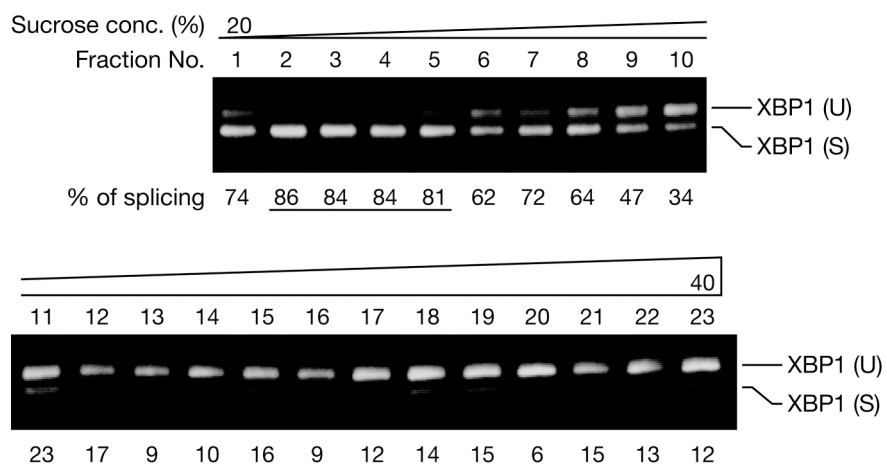


Fig. 24

赤血球抽出液のスクロース密度勾配遠心分離

得られたサンプルフラクションを 500 μ l ずつ分取し、*in vitro* splicing 反応後、RT-PCR を行い、2% アガロースゲルで電気泳動した。

Fig. 25

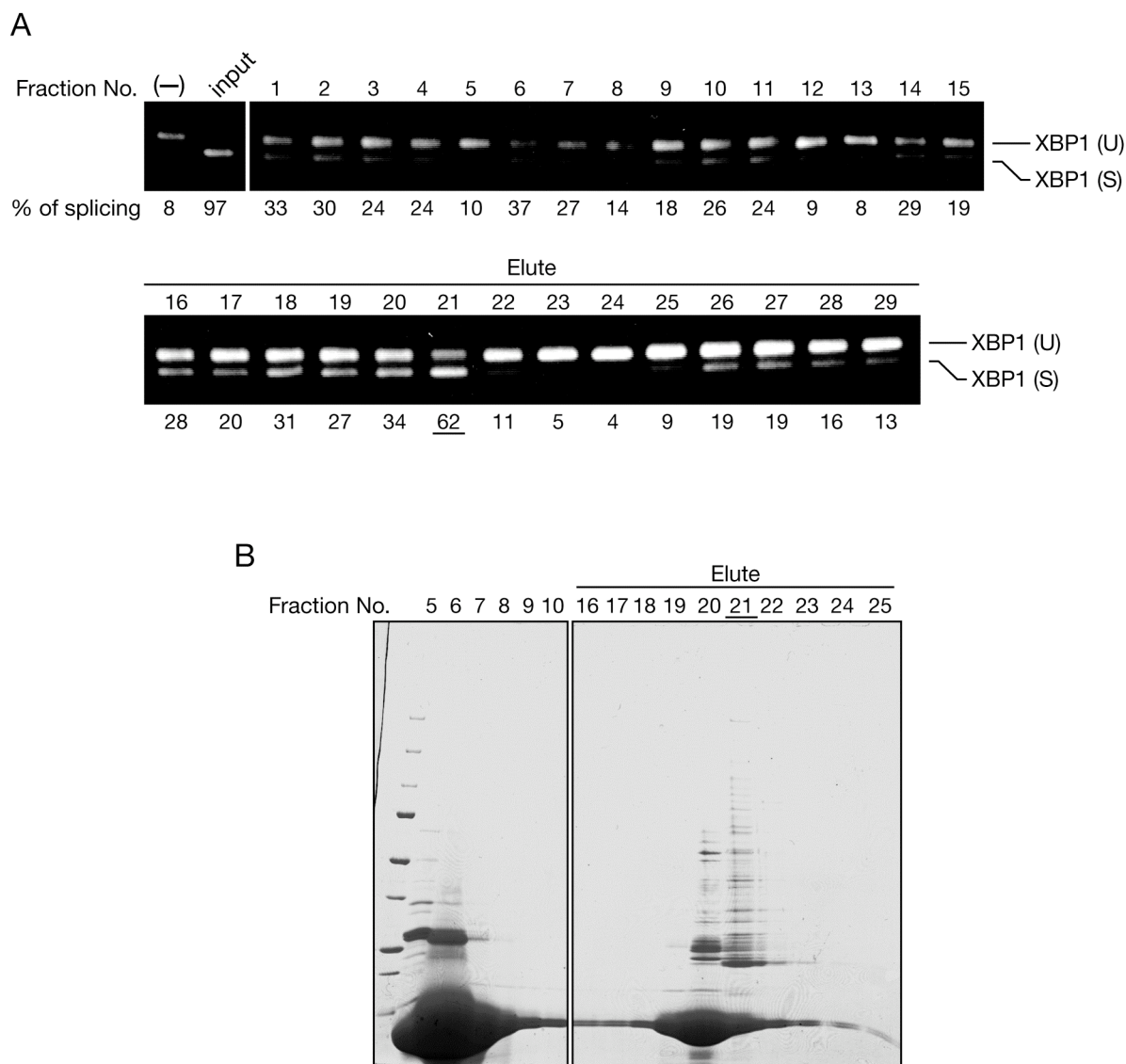


Fig. 25

A. 陰イオン交換クロマトグラフィー

スクロース濃度勾配遠心分離で得られた活性フラクション(Fig. 24, Fraction No. 2-5)を陰イオン交換カラム(MonoQ)で分画した。溶出は0~1 M KClのリニアグラジェントで行い、1 ml ずつ分取した。得られた elute フラクションは A buffer で2時間の透析を行った。透析後、*in vitro* splicing 反応し、RT-PCR を行い、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。

B. 各画分に含まれるタンパク質

陰イオン交換クロマトグラフィーで得られたフラクション各 10.4 μ l を、4-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。その後、CBB でバンドを検出した。

Fig. 26

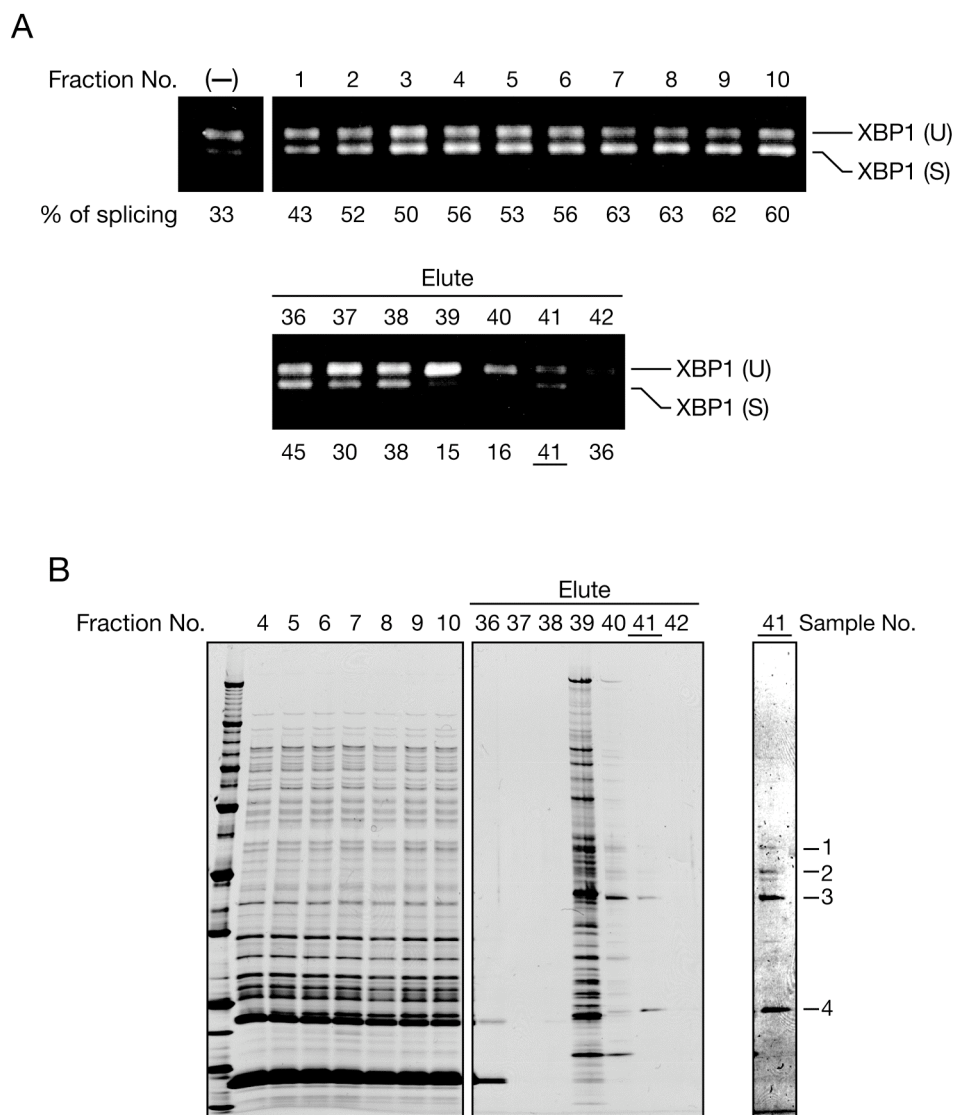


Fig. 26

A. アフィニティークロマトグラフィー (ヘパリンセファロース)

陰イオン交換クロマトグラフィーで得られた活性フラクション(Fig. 25A, Fraction No. 21)をヘパリンセファロースで分画した。溶出は 0.4 M KCl で行い、2 ml ずつ分取した。得られた elute フラクションは A buffer で 2 時間の透析を行った。得られたフラクションについて *in vitro* splicing 反応と RT-PCR を行い、2% アガロースゲルで電気泳動を行った。

B. 各画分に含まれるタンパク質

得られたフラクション各 10.4 μ l を、4-20% 濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、銀染色でバンドを検出した。

Table 2

Sample No.	候補タンパク質	ペプチド数
1	USP14	9
	CCT4	9
	CCT7	8
	PACSIN2	3
	WARS	2
	CCT6A	1
	CCT6B	1
	CCT2	1
	YARS	1
2	EIF2S3	5
	EIF5	3
	NPEPL1	1
	WARS	1
	HARS	1
	RPS27A	1
	RP6-213H19.1	1
	PACSIN2	1
3	PA2G4	9
	EIF4A1	5
	USP14	2
	Pip5k2a	2
	WARS	1
	EEF1A1	1
	UBADC1	1
	4	RAN
PSMA6		1
ARHGDIA		1
MGC4172		1
DENR		1
PA2G4		1

Table 2

リガーゼ活性物質の同定

ヘパリンセファロースクロマトグラフィーにより分離精製した各サンプルを、質量分析した。質量分析による解析の結果は、NCBI mammal を用いてデータベース検索を行

った。Sample No.は、Fig. 26 に示す、通し番号と一致している。

考 察

XBPI mRNA のスプライシングにおける切断反応は、IRE1 α によって行われていることは知られているが(Calfon et al., 2002; Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2001)、連結反応については、リガーゼ活性物質の存在を含め、どのように行われているのか明らかになっていない。そこで、本研究では、*XBPI* mRNA スプライシング機構を解析するため、このスプライシング反応を、*in vitro* で再構成することを試みた。この再構成系は、2つの反応に分けて検討を行った。第一の反応は、第一部で示した、rIRE1 α による *XBPI* mRNA の切断反応である(Fig. 7)。第二の反応は、細胞抽出液に含まれるリガーゼ活性による *XBPI* mRNA 断片の連結反応である。この連結に用いた細胞抽出液は、IRE1 が、ER ストレスのない定常状態においても、細胞に過剰発現すると活性化することから(Tirasophon et al., 2000)、定常状態の HeLa 細胞にもリガーゼ活性が十分に含まれていると考え、定常状態の HeLa 細胞から取得した全細胞抽出液を用いた。予想通り、この HeLa 全細胞抽出液にリガーゼ活性が含まれ、*in vitro* で *XBPI* mRNA スプライシング反応を再構成することができた (Fig. 10, 11)。しかし、この再構成系で観察されたりガーゼ活性は、非常に弱く、Fig. 12 および 14 で観察される、核およびサイトゾル抽出液のリガーゼ活性と比較して大きな差がある。この原因は、界面活性剤にあると考えられる。実際、Fig. 11 で用いた全細胞抽出液は、界面活性剤による細胞膜および核膜の破碎を行っており、さらに、界面活性剤を含むバッファーを用いて細胞分画を行った場合では、核とサイトゾルどちらの画分においてもリガーゼ活性は非常に低かった(data not shown)。

次に、この再構成系を用いて、小胞体ストレス誘導剤の一つであるツニカマイシン処理によるリガーゼ活性の変化を確認したが、活性の強度および局在に変化は認められなかった(Fig. 14)。このことから、リガーゼ活性を持つ分子は、定常状態で細胞内に十分存在している分子であると考えられ、*XBPI* mRNA スプライシング反応は、IRE1 α の活性化の有無により制御されており、他要素の追加的な供給を必要としていないということが示唆された。このことは、小胞体内の異常を感知した IRE1 α が、すばやくその異常に対処するのに非常に都合がよい。しかし、他の小胞体ストレス誘導剤による活性変化の解析は、今後の課題である。

また、*HAC1* mRNA や *XBPI* mRNA スプライシングが、細胞質で起こるのか核で起こるのかについては、論争が続いている。酵母においては、tRNA リガーゼである Rlg1p が *HAC1* mRNA スプライシングに関わっており、tRNA スプライシングは一般に核で行われていると考えられていたため、*HAC1* mRNA スプライシングも核で行われていると考えられていた(Sidrauski et al., 1996)。しか

し、ポリソームに結合している *HAC1* プレ mRNA が Ire1p によるスプライシングを受けることが明らかとなり (Ruegsegger et al., 2001)、また、酵母の tRNA スプライシングに関しても細胞質で起きていると考えられるようになってきていることから (Takano et al., 2005; Yoshihisa et al., 2003)、*HAC1* mRNA スプライシングは、細胞質で起きていると考えられている。高等真核生物においても、*XBPI* mRNA のスプライシングが、酵母の *HAC1* mRNA と同様に IRE1 によって行われること、また、*XBPI* プレ mRNA が細胞質に存在することから、*XBPI* mRNA スプライシングも細胞質で起こると考えられている。しかしながら、小胞体ストレス時に IRE1 α がプロテアーゼによって切断され、サイトゾル領域が核へ移行してスプライシングを行うという報告があり (Niwa et al., 1999)、さらに、高等真核生物の tRNA スプライシングは、核で起こると考えられていることから (Paushkin et al., 2004)、*XBPI* mRNA スプライシングが、核で起こるの可能性も否定できない。しかし、細胞分画によるリガーゼ活性の比較解析の結果 (Fig. 14) から、スプライシング反応が細胞質で起きていることが強く示唆された。また、最近、細胞質に局在する *XBPI* mRNA が選択的にスプライシングを受けていることが報告されており (Back et al., 2006)、*XBPI* mRNA スプライシングは、細胞質で起きていることを強く示唆している。このことは、小胞体内部の状況に応じて、スプライシング反応を引き起こす際、核まで情報を伝達するよりも、小胞体のすぐ外側でスプライシングする方が簡単であり、すばやい応答を起こすためにも自然である。

核内 mRNA 前駆体や、グループ I イントロン、グループ II イントロンのスプライシング反応は、イントロンの切り出しとエキソンの再結合が、それぞれエンドヌクレアーゼによる RNA 鎖の加水分解による切断と RNA リガーゼによる ATP 依存性の RNA 鎖の連結反応ではなく、二回のエステル結合の転移反応によって行われる (Cech, 1986)。一方、酵母の *HAC1* mRNA のスプライシングは、tRNA スプライシングと類似しており、他のスプライシング反応に共通なエステル転移反応とは異なり、スプライシングエンドヌクレアーゼと tRNA リガーゼによって ATP および GTP 依存性の反応が進行する (Fig. 15) (Cox and Walter, 1996; Greer et al., 1983)。そこで、*XBPI* mRNA スプライシング反応が、tRNA スプライシングや *HAC1* mRNA スプライシングと類似の反応機構によって起きているのかを、ATP および GTP の必要性によって確認した。しかし、リガーゼ活性物質の供給源として、細胞抽出液を用いた場合、内在性の ATP や GTP の影響が大きく、その必要性が判断できなかった。そこで、硫酸アンモニウム分画によって粗精製を行うことにより、細胞抽出液中に含まれるタンパク質以外の成分を除いた (Fig. 16)。この粗精製後画分を用いて、ATP および GTP の必要性を確

認したところ、*XBPI* mRNA スプライシングに GTP は必要であるが、ATP は必要ではないことが示された(Fig. 17, lanes 1-5)。しかしながら、ATP の α 位または γ 位のリン酸基が加水分解されない ATP アナログとともに、このスプライシング反応を阻害した(Fig. 17, lanes 6, 7)。この理由として、IRE1 α の活性化に自己リン酸化が必要であると知られていることから、ATP アナログが、IRE1 α の活性化を阻害し、*XBPI* mRNA スプライシング反応を阻害している可能性を考えたが、ATP アナログは、切断反応に影響を及ぼさなかった(Fig. 18)。しかし、最近、酵母 Ire1p の活性化に、自己リン酸化に続いて、ATP および ADP が Ire1p のキナーゼ領域に結合し立体構造が変化することが重要であると示唆され、 α 位のリン酸基が加水分解されない ATP アナログ(AMPPNP)によって、Ire1p の RNase 活性が阻害されることが示された(Lee et al., 2008)。このことから、ATP アナログが、IRE1 α の立体構造変化を阻害し、スプライシング活性を低下させた可能性もあり、これは、今後の検討課題である。また、*XBPI* mRNA スプライシングにおいて GTP の γ 位のリン酸基の加水分解が必要であることが示された(Fig. 17)。そこで、*HACI* mRNA スプライシングで観察される GTP の γ 位のリン酸基の取り込みおよびアデニル化が *XBPI* mRNA スプライシングにおいても観察されるか確認したが、それらの取り込みは確認されず(Fig. 19)、ATP、GTP がどのように、このスプライシング反応に関わっているのか知ることができなかった。しかし、ATP および GTP の必要性から、*HACI* mRNA スプライシングとも、エネルギーを必要としない核内 mRNA 前駆体や、グループ I イントロン、グループ II イントロンのスプライシングとも異なり、新たな RNA スプライシング機構であることが示唆された。さらに、*HACI* mRNA スプライシングにおいて連結反応後に 5'スプライシング接合部に残る 2'リン酸基を除去する 2'リン酸基転移酵素 Tpt1p (Fig. 15)の哺乳類において唯一知られている機能的ホモログ Trpt1(Hu et al., 2003; Spinelli et al., 1998; Zillmann et al., 1991)のノックアウトマウスにおいても、スプライス型 *XBPI* の翻訳への影響は見られず(Harding et al., 2007)、このことも、*XBPI* mRNA スプライシングが、*HACI* mRNA スプライシングとは異なる機構であることを示唆している。

では、いったい何が、*XBPI* mRNA 断片を連結しているのだろうか。この、*XBPI* mRNA スプライシングを解明する上で一番重要な課題に、二つの方法で取り組んだ。第一の方法として、*XBPI* mRNA 結合タンパク質を確認し、同定した。その結果、結合タンパク質の一つとして、プレ mRNA のイントロン内のポリピリミジン配列に結合し、RNA スプライシングを制御することが知られている Splicing Factor Proline / Glutamine rich (SFPQ) (Patton et al., 1993)が同定された(Fig. 21, Table 1)。しかし、この分子を、RNAi によってノックダウンして

も、*XBPI* mRNA スプライシングには影響を及ぼさなかった。*XBPI* mRNA のイントロンには、ポリピリミジン配列のような共通の配列はなく、この結果は妥当かもしれない。また、この SFPQ と複合体を形成し、同じく RNA スプライシングを制御していることが知られている NONO (p54nrb) (Dong et al., 1993; Sewer et al., 2002; Sewer and Waterman, 2002) も同定された (Fig. 21, Table 1)。しかし、この分子のノックダウンも、*XBPI* mRNA スプライシングには影響を及ぼさなかった。また、SFPQ と NONO は、相同性が 60% と比較的高いため、それぞれの分子が *XBPI* mRNA スプライシングにおいて相補的に働いている可能性も考えられたので、SFPQ と NONO をともにノックダウンしたが、それでも *XBPI* mRNA スプライシングには影響を及ぼさなかった。

第二の方法として、種々のカラムを用いてタンパク質を分離し、*in vitro* *XBPI* mRNA スプライシング再構成系を用いて活性のある画分を同定し、*XBPI* mRNA リガーゼ活性物質を細胞抽出液より分離することを試みた。その結果、スクロース密度勾配遠心法と陰イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーを組み合わせるにより、SDS-PAGE の結果で、約 4 本のバンドにまで精製することができた (Fig. 26B)。しかし、これらのバンドを切り出し、LC-MS/MS 解析した結果、Table 2 に示すように、計 25 種類のタンパク質が同定された。これは、分離精製のサンプルに、簡便で大量に安定的に取得できるウサギの赤血球抽出液を用いたが、質量分析後のデータベース検索の過程で、ウサギの全タンパク質を網羅したデータベースがないため、哺乳動物全体のデータベースを対象に検索し、さまざまな種ホモログタンパク質を同定したためである。そこで、先に同定した *XBPI* mRNA 結合タンパク質と比較したが、同一のタンパク質は同定されなかった。そのため、ウサギ赤血球抽出液から他の精製方法により分離精製したサンプルと比較することにより、*XBPI* mRNA リガーゼ活性物質を同定するため、現在、更なる精製方法を検討しているところである。

現在までに、*XBPI* mRNA リガーゼを特定できていないが、*in vitro* 再構成系の完成により、リガーゼ活性の細胞内局在や、スプライシング反応機構の解析、このスプライシングに必要な *XBPI* mRNA の二次構造の解析 (Yanagitani, 2005) など、今まで解析が行えていなかったさまざまな解析を行うことができ、*XBPI* mRNA スプライシング機構を明らかにする糸口が見出せた。今後は、このリガーゼ活性物質を同定し、これまでに得た知見を含め、*XBPI* mRNA の全容を解明する予定である。

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、MS 解析を行っていただきました、本学ベンチャービジネスラボの桑野晶喜氏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、細田章博士、都留秋雄助教、木俣行雄助教、斉藤美知子助教、岩脇隆夫博士、佐坂真一氏、竹内雅人博士、柳谷耕太君、山本真義君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へ感謝いたします。また、一緒に研究を進め、本研究の進展に大きく貢献してくれた井上倫宏君、新谷紗代子さんに心より感謝いたします。

参考文献

Abelson, J., Trotta, C.R., and Li, H. (1998). tRNA splicing. *J Biol Chem* *273*, 12685-12688.

Bachler, M., Schroeder, R., and von Ahsen, U. (1999). StreptoTag: a novel method for the isolation of RNA-binding proteins. *RNA* *5*, 1509-1516.

Back, S.H., Lee, K., Vink, E., and Kaufman, R.J. (2006). Cytoplasmic IRE1alpha-mediated XBP1 mRNA splicing in the absence of nuclear processing and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* *281*, 18691-18706.

Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J., West, A., 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.

Bonifacino, J.S., and Weissman, A.M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* *14*, 19-57.

Brimacombe, R. (1995). The structure of ribosomal RNA: a three-dimensional jigsaw puzzle. *Eur J Biochem* *230*, 365-383.

Brostrom, C.O., and Brostrom, M.A. (1990). Calcium-dependent regulation of protein synthesis in intact mammalian cells. *Annu Rev Physiol* *52*, 577-590.

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* *415*, 92-96.

Cech, T.R. (1986). The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear

mRNA splicing. *Cell* 44, 207-210.

Clemens, M. (1994). Regulation of eukaryotic protein synthesis by protein kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2. *Mol Biol Rep* 19, 201-210.

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, 1197-1206.

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.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and Roeder, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11, 1475-1489.

Dong, B., Horowitz, D.S., Kobayashi, R., and Krainer, A.R. (1993). Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54nrb, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and *Drosophila* NONA/BJ6. *Nucleic Acids Res* 21, 4085-4092.

Dube, P., Bacher, G., Stark, H., Mueller, F., Zemlin, F., van Heel, M., and Brimacombe, R. (1998). Correlation of the expansion segments in mammalian rRNA with the fine structure of the 80 S ribosome; a cryoelectron microscopic reconstruction of the rabbit reticulocyte ribosome at 21 Å resolution. *J Mol Biol* 279, 403-421.

Gething, M.J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.

Gonzalez, T.N., Sidrauski, C., Dorfler, S., and Walter, P. (1999). Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. *EMBO J* 18, 3119-3132.

Greer, C.L., Peebles, C.L., Gegenheimer, P., and Abelson, J. (1983). Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing. *Cell* *32*, 537-546.

Gutell, R.R., and Fox, G.E. (1988). A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *Nucleic Acids Res* *16 Suppl*, r175-269.

Harding, H., Lackey, J., Hsu, H., Zhang, Y., Deng, J., Xu, R., Damha, M., and Ron, D. (2007). An intact unfolded protein response in Trpt1 knockout mice reveals phylogenetic divergence in pathways for RNA ligation. *RNA*.

Harding, H., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* *397*, 271-274.

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.

Helenius, A., Marquardt, T., and Braakman, I. (1992). The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trends Cell Biol* *2*, 227-231.

Higuchi, R. (1990). Recombinant PCR. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (San Diego, Academic Press), pp. 177-183.

Hollien, J., and Weissman, J.S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* *313*, 104-107.

Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L., Herscovics, A., and Nagata, K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* *2*, 415-422.

Hu, Q., Lu, H., Huo, K., Ying, K., Li, J., Xie, Y., Mao, Y., and Li, Y. (2003). A human homolog of the yeast gene encoding tRNA 2'-phosphotransferase: cloning, characterization and complementation analysis. *Cell Mol Life Sci* 60, 1725-1732.

Imagawa, Y. (2004). ヒト IRE1 α と IRE1 β のリボヌクレアーゼとしての基質特異性の違い. In Graduate School of Biological Sciences (Ikoma, Nara Institute of Science of Technology).

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.

Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., *et al.* (1999). Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 1, 479-485.

Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13, 1211-1233.

Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462-464.

Lee, A., Iwakoshi, N., and Glimcher, L. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23, 7448-7459.

Lee, K., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T., and Sicheri, F. (2008). Structure of the dual enzyme ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell* 132, 89-100.

Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* *16*, 452-466.

Lu, P.D., Jousse, C., Marciniak, S.J., Zhang, Y., Novoa, I., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ron, D., and Harding, H.P. (2004). Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *EMBO J* *23*, 169-179.

Marciniak, S., and Ron, D. (2006). Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* *86*, 1133-1149.

Matasova, N., Myltseva, S., Zenkova, M., Graifer, D., Vladimirov, S., and Karpova, G. (1991). Isolation of ribosomal subunits containing intact rRNA from human placenta: estimation of functional activity of 80S ribosomes. *Anal Biochem* *198*, 219-223.

Moenner, M., Pluquet, O., Bouchecareilh, M., and Chevet, E. (2007). Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res* *67*, 10631-10634.

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*, 803-817.

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*, 743-756.

Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., and Yura, T. (2000). mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proc Natl*

Acad Sci U S A *97*, 4660-4665.

Nagasawa, K., Higashi, T., Hosokawa, N., Kaufman, R., and Nagata, K. (2007). Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation. *EMBO Rep* *8*, 483-489.

Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* *108*, 193-199.

Niwa, M., Sidrauski, C., Kaufman, R.J., and Walter, P. (1999). A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. *Cell* *99*, 691-702.

Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R., Nagata, K., and Mori, K. (2006). Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* *172*, 383-393.

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.

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A., Iwakoshi, N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L., and Hotamisligil, G. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* *306*, 457-461.

Patil, C., and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 349-355.

Patton, J.G., Porro, E.B., Galceran, J., Tempst, P., and Nadal-Ginard, B. (1993). Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* *7*, 393-406.

Paushkin, S.V., Patel, M., Furia, B.S., Peltz, S.W., and Trotta, C.R. (2004). Identification of a human endonuclease complex reveals a link between tRNA splicing and pre-mRNA 3' end formation. *Cell* *117*, 311-321.

Plempner, R.K., and Wolf, D.H. (1999). Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci* *24*, 266-270.

Ron, D. (2002). Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* *110*, 1383-1388.

Ruegsegger, U., Leber, J.H., and Walter, P. (2001). Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* *107*, 103-114.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sasaka, S.-i. (2003). 小胞体ストレスセンサー-humanIRE1 の機能解析. In Graduate School of Biological Sciences (Ikoma, Nara Institute of Science of Technology).

Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* *74*, 739-789.

Sewer, M.B., Nguyen, V.Q., Huang, C.J., Tucker, P.W., Kagawa, N., and Waterman, M.R. (2002). Transcriptional activation of human CYP17 in H295R adrenocortical cells depends on complex formation among p54(nrb)/NonO, protein-associated splicing factor, and SF-1, a complex that also participates in repression of transcription. *Endocrinology* *143*, 1280-1290.

Sewer, M.B., and Waterman, M.R. (2002). Adrenocorticotropin/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated transcription of the human CYP17

gene in the adrenal cortex is dependent on phosphatase activity. *Endocrinology* *143*, 1769-1777.

Sidrauski, C., Cox, J.S., and Walter, P. (1996). tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* *87*, 405-413.

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*, 1031-1039.

Spinelli, S., Malik, H., Consaul, S., and Phizicky, E. (1998). A functional homolog of a yeast tRNA splicing enzyme is conserved in higher eukaryotes and in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 14136-14141.

Takano, A., Endo, T., and Yoshihisa, T. (2005). tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science* *309*, 140-142.

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.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*, 1812-1824.

Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* *101*, 249-258.

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*, 5708-5717.

Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1996). The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *J Biol Chem* *271*, 18181-18187.

Yanagitani, K. (2005). IRE1 による XBP1 mRNA スプライシング機構の解析. In Graduate School of Biological Sciences (Ikoma, Nara Institute of Science of Technology).

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.

Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R., Nagata, K., and Mori, K. (2003). A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* *4*, 265-271.

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.

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* *20*, 6755-6767.

Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tanaka, N., and Endo, T. (2003). Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria. *Mol Biol Cell* *14*, 3266-3279.

Zillmann, M., Gorovsky, M., and Phizicky, E. (1991). Conserved mechanism of tRNA splicing in eukaryotes. *Mol Cell Biol* *11*, 5410-5416.

