

シロイヌナズナ小胞体シャペロン BiP の
発現制御に関わる研究

田嶋 紘美

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞間情報学講座

(高山 誠司 教授)

平成 20 年 1 月 28 日提出

目次

序論	3
材料と方法	11
結果	17
考察	25
図	36
総括	62
謝辞	64
参考文献	65
論文目録	80

序論

細胞で合成されるタンパク質は、正しい立体構造を形成することで正常に機能する。多くのタンパク質は、HSP70(Heat shock protein 70)、HSP60(Heat shock protein 60) に代表されるシャペロンの助けにより効率よく折りたたまれるが、折りたたみに失敗したタンパク質は単に本来の機能を発揮できないだけでなく、凝集することで細胞に毒性を与え、細胞を死に至らせる場合もある。このため、細胞には正しい高次構造が形成できないタンパク質をすばやく分解する機能があり、この機構はタンパク質の品質管理と呼ばれている。小胞体は細胞で合成されるタンパク質のおよそ4分の1にあたる分泌タンパク質や膜タンパク質を合成する場であり、細胞質と同様にタンパク質の品質管理を備えている(図1)。小胞体で合成されるタンパク質はリボソームでN末端のシグナルペプチドや膜貫通ドメインといった疎水性領域が翻訳されると、小胞体膜上のトランスロコンへと運ばれ、翻訳されると同時に小胞体内へ移入する(Rapoport, 2007)。トランスロコン付近には数種のシャペロン複合体が待機しており、新生ポリペプチドの小胞体への移入を助け、折りたたみが完了するまで凝集を防いでいる(Kleizen and Braakman, 2004; Matlack et al., 1999)。しかし、小胞体内のカルシウムイオンの枯渇や分泌タンパク質合成の上昇、糖鎖付加の阻害、S-S結合の解離などによって小胞体タンパク質の折りたたみは阻害される。このような状況は総称して小胞体ストレスとよばれている。小胞体ストレスにより小胞体内に折りたたみに失敗したタンパク質が蓄積すると、分子シャペロンや酵素を誘導してフォールディング能力をあげる小胞体ストレス応答(The unfolded protein response; UPR)という機構が働く(Schroder and Kaufman, 2005; Bernales et al., 2006)。その一方で、小胞体内の構造異常なタンパク質がトランスロコンを介して細胞質へ逆輸送され、ユビキチン・プロテアソーム系によって分解される小胞体関連分解(ER-associated degradation; ERAD)とよばれる機構が働く(Fewell et al., 2001; Ellgaard and Helenius, 2003; Trombetta and Parodi, 2003)。

小胞体に局在するHSP70類縁体のBinding protein (BiP)は、小胞体タンパク質の品質管理において極めて重要な因子である。タンパク質の折りたたみを助けるだけでなく、タンパク質の小胞体への移入を助けることや、小胞体関連分解にも関わっている(Kleizen and Braakman, 2004)。BiPタンパク質の構造は細胞質型HSP70と類似しており、N末端側のATPaseドメインとC末端側の基質結合ドメインがリンカー配列でつながっている構造をしている(図2A、Daugaard et al, 2007;

Frydman, 2001)。ATP を結合した HSP70 は、基質結合ドメインのコンフォメーションを変化させ、折りたたまれていないタンパク質を結合できるようにする。ATP の加水分解によって ADP 結合状態になった HSP70 は基質と強固に結合する。ヌクレオチド交換因子によって ADP を解離した HSP70 は基質を解離する。このサイクルは ATPase サイクルとよばれ、HSP70 は新生タンパク質や異常タンパク質との結合と解離を繰り返すことで、異常タンパク質どうしの凝集を防いだり、タンパク質の折りたたみを助けたりする (図 2B、Bukau et al., 2006; Mayer and Bukau, 2005)。酵母や哺乳動物の BiP においても ATPase サイクルの存在が示され、BiP が細胞質 HSP70 と同様のシャペロン活性を小胞体内で果たしていることが示唆されている (Misselwitz et al., 1998; Misselwitz et al., 1999)。

植物において BiP が初めて観察されたのは、トウモロコシにおいてである。トウモロコシには胚乳の質感が悪い、病害虫に弱いなどの形質を持つ変異体が見つかり、*floury-2*、*Defective endospermB30 (De-B30)*、*opaque*、*Mucronate (Mc)*、とよばれていた。これらの変異体は変異の入った α -ゼインなどの種子貯蔵タンパク質が小胞体に蓄積するため、異常な穀粒を形成する (Gibbon and Larkins, 2005)。1983 年には Galante らによって、*floury-2* が受精後の登熟に伴って、70kDa のタンパク質を胚乳に蓄積することが観察されていた。のちにその 70kDa のタンパク質は動物の BiP のホモログであることが明らかにされ、その他の変異体でも穀粒の形成にともなって BiP が転写誘導されることが示された (Boston et al., 1991; Fontes et al., 1991)。インゲンマメの成熟種子に存在する貯蔵タンパク質のおよそ 50% を占めるファゼオリンは、高次構造などの解析が進んでいたため、BiP の結合様式の解析によく用いられてきた。タバコのプロトプラストにおいて C 末端を欠失した変異型ファゼオリンを発現させると、BiP は野生型ではなく変異型のファゼオリンにのみ結合することが示されたことから、BiP は種子において変異型の種子貯蔵タンパク質と主に結合すると考えられた (Pedrazzini et al., 1994)。しかし、インゲンマメの子葉を調べると、BiP はファゼオリンをはじめ数種の新生タンパク質と結合していることがわかった (Vitale et al., 1995)。また、イネにおいては種子貯蔵タンパク質プロラミンの新生タンパク質に結合していた (Li et al., 1993)。これらのことから、登熟中の種子において、合成がさかんになる種子貯蔵タンパク質の新生ポリペプチドに BiP は結合して折りたたみを助けていることが考えられた。いずれにおいても BiP と基質タンパク質との結合は ATP の添加によって解離することから、ATP 結合型の BiP は基質タンパク質に低親和性であることが植物においても示された (Li et al., 1993; Pedrazzini et al., 1994; Vitale et al., 1995)。

タンパク質の折りたたみを助ける機能に加えて、酵母において BiP は小胞体関連分解に必要な因子であることが示されている (Kabani et al., 2003; Kleizen and

Braakman, 2004; Nishikawa et al., 2001; Plemper et al., 1997; Romisch, 2005)。BiPは小胞体関連分解に必要な複合体の一部を構成し、標的タンパク質を小胞体から細胞質へ逆輸送するとき、異常タンパク質どうしの凝集を防ぐことで逆輸送をスムーズにするという考え方である (Nishikawa et al., 2001)。植物においても小胞体関連分解の機構が備わっていることは明らかにされている (Brandizzi et al., 2001; Di Cola et al., 2001; Di Cola et al., 2005)。また、分泌型に改変したファゼオリンには BiP が強く結合しており、すばやく分解されることから、BiP が異常タンパク質の分解に関わっていることが示唆された (Nuttall et al. 2003)。しかし、この分解はプロテアソーム阻害剤の影響を受けないことから、小胞体関連分解とは別の機構であると考えられた (Nuttall et al. 2003)。植物には小胞体タンパク質が液胞に輸送され、分解される機構がある (Tamura et al., 2004)。BiP も恒常的に液胞に輸送され分解されていることから、異常タンパク質を液胞に輸送し、分解することに寄与していると考えられている (Pimpl et al., 2006; Tamura et al., 2004)。

構造とシャペロン活性が類似しているにもかかわらず、細胞質 HSP70 と BiP の発現様式には大きな違いがある。もともと細胞質 HSP70 は熱ショックによって大量に合成されるタンパク質として単離された。一方動物細胞において、BiP はグルコース飢餓で誘導されるタンパク質として単離され、Glucose regulated protein 78kDa protein (GRP78) ともよばれている (Shiu et al., 1977)。その後、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質として知られている BiP と同じであることが明らかにされ、糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシンを処理することや糖鎖が結合できない変異タンパク質を発現させることでも BiP は顕著に誘導されることから、グルコース飢餓によって糖鎖供給が減少し、糖鎖が付加されないタンパク質の蓄積によって BiP が誘導されると考えられていた (Chang et al., 1987)。しかし、小胞体内カルシウムの枯渇やタンパク質変性、還元状態によっても BiP は誘導されることから、小胞体内に折りたたみの不完全なタンパク質が蓄積することで BiP が誘導されることが明らかにされた (Lee, 1992; Kozutsumi et al., 1988)。なぜグルコース飢餓が BiP を誘導するのかについては現在でもさまざまな議論があるが、ひとつには小胞体内のタンパク質の折り畳み、輸送小胞の形成、分解除去系、カルシウム濃度勾配の維持などに必要なエネルギーがグルコース飢餓で供給されないため、小胞体ストレスが生じるためという考え方がある (Kaufman et al., 2002)。また、小胞体には折り畳みの異常な糖タンパク質を認識し、UDP-グルコースで標識することによって折り畳みを助ける機構 (calnexin/calreticulin cycle) が存在する (Ellgaard and Helenius, 2003)。グルコース飢餓はこの機構を乱し、小胞体ストレスが生じるという考え方もある (Kaufman et al., 2002)。

植物における BiP の誘導については、大豆、タバコ、シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシで BiP が単離されると、ツニカマイシンによる影響が調べられ、顕著に誘導されることが明らかにされてきた (D'Amico et al., 1992; Denecke et al., 1991; Koizumi, 1996; Okushima et al., 2002; Wrobel et al., 1997)。また、種子貯蔵タンパク質との関わりが示されているように、BiP は種子に豊富に含まれる。シロイヌナズナやカボチャにおいても種子の登熟に従って BiP が誘導される (Hatano et al., 1997; Sung et al., 2001)。また、自然環境でおこるストレスに対しても BiP の発現は誘導される。シロイヌナズナでは熱ショックにおいて BiP が誘導される (Koizumi, 1996; Sung et al., 2001)。一方、ホウレンソウの BiP は熱ショックでは誘導されず、低温処理で誘導された (Anderson et al. 1994)。また、シロイヌナズナと大豆では塩/浸透圧ストレスで BiP が誘導される (Cascardo et al. 2000; Koiwa et al. 2003)。大豆の BiP をタバコで過剰発現させると水分欠乏に対するストレス耐性が上がることから、植物の BiP は浸透圧ストレス下において重要な役割を果たしていると思われる (Alvim et al. 2001)。ベイマツの BiP プロモーターが傷害に応答するという報告もある (Forward et al. 2002)。非生物的なストレスに加えて、BiP は病原菌感染による病害ストレスでも発現誘導が示唆されている。植物の病原体感染に対する免疫応答には、サリチル酸の蓄積を必要とする経路 (Systemic Acquired Resistance; SAR) とサリチル酸非依存的経路があり、それぞれの経路で BiP が誘導されるという報告がある。タバコとシロイヌナズナにおいて BiP はサリチル酸非依存的に cell wall-degrading enzyme; CDE (防御応答を誘導する) 処理で発現誘導される (Jelitto-Van Dooren et al. 1999)。一方、NPR1 (Nonexpressor of pathogenesis related (PR) genes 1) は SAR において下流遺伝子の発現を主要に制御する転写因子であるが、シロイヌナズナではサリチル酸処理によって、NPR1 依存的に BiP の発現が誘導された (Wang et al. 2005)。いずれにおいても、BiP の発現誘導は PR 遺伝子の発現誘導に先立っていることから、分泌タンパク質である PR タンパク質の合成量増加が小胞体ストレスとなり BiP が誘導されたのではなく、小胞体ストレス応答とは独立の経路で、防御応答の際の PR タンパク質合成量増加に対応すべく BiP の発現が誘導されると考えられている。さまざまな刺激や発達段階に応じて BiP の発現が見られ、植物における BiP の重要性が示唆される一方で、動物で際立った BiP の発現を誘導する糖欠乏との関係は調べられていない。

上述のように、植物では独自の発現様式を示すことから、植物特有の BiP の生理機能を発達させてきたことがうかがえる。また、酵母や哺乳動物には BiP が 1 つしか存在しないのに対して植物には複数の BiP があることが知られている。大豆には少なくとも 4 個 (Cascardo et al. 2000)、シロイヌナズナにおいては 3 個の

BiP、BiP1 (At5g28540)、BiP2 (At5g42020)、BiP3 (At1g09080) が存在する (Noh et al., 2003)。タバコやトウモロコシにも少なくとも 2 個は存在する (Noh et al., 2003)。シロイヌナズナの BiP1 のアミノ酸配列の相同性をイネで調べたところ、36 個の cDNA がヒットし、そのうち N 末端に疎水性領域、C 末端に HDEL 配列を持ったものは 4 つあった (Knowledge-based *Oryza* Molecular biological Encyclopedia; <http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>)。シロイヌナズナのそれぞれのアミノ酸配列を比較すると、BiP1 と BiP2 および BiP3 は非常に高い相同性を示している (図 3)。また、プロモーターの配列を比較すると、BiP1 と BiP2 は非常に高い相同性を示すが、BiP3 は他の 2 つと相同性は見られなかった (図 4)。したがって、BiP タンパク質の機能としては BiP1,2,3 において同様の役割を果たしており、発現様式が BiP1,2 と BiP3 で異なることで役割分担を果たしていると考えられる。さらに、イントロンを含んだコード領域の塩基配列を比較すると、BiP1 と BiP3 および BiP2 と BiP3 はいずれも 68% であるのに対し、BiP1 と BiP2 は 91% の相同性であった。BiP1 と BiP2 はどちらも第 5 染色体の近い位置にあることから、これらは比較的最近に遺伝子重複されたものであることが考えられる。

タンパク質の折りたたみが阻害されることによって BiP などのシャペロンが誘導されることを小胞体ストレス応答と定義し、小胞体ストレス応答をひきおこす刺激を小胞体ストレスとよぶようになった経緯から、BiP の発現は酵母から哺乳動物にいたるまで幅広く小胞体ストレス応答の指標とされてきた (Kaufman et al., 1999)。そのため、小胞体ストレス応答の分子機構は BiP の誘導機構解明を中心に研究が進められてきた。最初に BiP 誘導機構の解明が進められたのは酵母である。酵母において小胞体ストレスは小胞体膜上に存在する IRE1 というタンパク質キナーゼ・リボヌクレアーゼによって感知される (Cox et al., 1993; Mori et al., 1993)。IRE1 は N 末端側のセンサードメインが小胞体内腔を向き、C 末端側のキナーゼ・リボヌクレアーゼドメインが細胞質側を向いている I 型膜貫通タンパク質である。小胞体側のセンサードメインが小胞体ストレスを感知すると、IRE1 は結合していた BiP を解離し、多量体化する。多量体化した IRE1 のセンサードメインに異常タンパク質が結合すると、細胞質側ドメインのコンフォメーションが変化し、自己リン酸化によってリボヌクレアーゼドメインが活性化される (Kimata et al., 2007; Shamu and Walter, 1996; Welihinda and Kaufman, 1996)。活性化した IRE1 は bZIP 型転写因子をコードする *Hac1* mRNA をスプライソソーム非依存的にスプライシングする。*Hac1* mRNA のスプライシングによって効率よく合成された HAC1 タンパク質は、シスエレメントである UPRE (CAGCGTG) に結合し、BiP などのシャペロン遺伝子の転写を誘導する (Mori et al., 1992; Kohno et al., 1993; Mori et al.,

1996)。

小胞体ストレスによる BiP の誘導機構は動物細胞でもよく研究されている (図 5)。動物細胞においては、酵母と同様に IRE1 α が bZIP 型転写因子 XBP1 の mRNA をスプライシングする。26 塩基がスプライシングされることによってフレームシフトがおこり、機能的な XBP1 タンパク質が合成されると、XBP1 は BiP のプロモーター上のシス配列 ERSE (CCAAT-N9-CCACG)、ERSE-II (ATTGG-N-CCACG)、XBP1-BS (GA-TGACGT-G(T/G)) に結合し、転写を誘導する (Kokame et al., 2001; Shen et al., 2001; Wang et al., 2000; Yamamoto et al., 2004; Yoshida et al., 1998)。動物には IRE1 経路に加えて ATF6 という転写因子に関わる経路が存在する。ERSE に結合する因子として単離された ATF6 は膜貫通ドメインを有する bZIP 型転写因子で、BiP の誘導に主要な働きをする (Yoshida et al., 1998)。小胞体膜上に存在する ATF6 は小胞体ストレス存在下でゴルジ体に移行し、ゴルジ体膜に存在するプロテアーゼ site-1 protease (S1P) および site-2 protease (S2P) によって順次切断される (Ye et al., 2000)。膜貫通ドメインを切断され、膜から遊離した bZIP ドメインを含む ATF6 の細胞質ドメインは核へ移行し、ERSE に結合し BiP の転写を誘導する (Li et al., 2000; Yoshida et al., 1998)。近年、動物細胞において、ATF6 と同様の機構で小胞体ストレス応答に関わる転写因子の存在が相次いで報告された (Kondo et al., 2005; DenBoer et al., 2005; Nagamori et al., 2005; Stirling et al., 2006; Zhang et al., 2006; Liang et al., 2006; Kondo et al., 2007)。これらの遺伝子はいずれもアミノ酸配列の情報から ATF6 と共通の構造がある、つまり、II 型膜貫通タンパク質であり、膜貫通ドメインより N 末端側に bZIP ドメインをもつものとして注目され、小胞体ストレス応答との関わりが調べられた。さらにこれらは、膜貫通ドメインの近くに S1P 認識配列に相同な RxxL または RxL の配列をもっている。

植物にも小胞体ストレスによりシャペロンやフォールディング酵素、分泌系のタンパク質が誘導されるいわゆる小胞体ストレス応答の機構が備わっていることは以前から示されていた (Boston et al., 1991; Jelitto-Van Dooren et al., 1999; Koizumi, 1996; Koizumi et al., 1999; Leborgne-Castel et al., 1999; Martinez and Chrispeels, 2003)。しかし、その誘導機構についての研究は遅れをとっていた。特に植物は BiP が複数存在することから、BiP の発現制御機構については不明な点が多い。こうした中、植物の小胞体ストレス応答の研究はシロイヌナズナを中心に進められてきた (図 6)。植物の小胞体ストレス応答の分子機構に関する最初の報告は IRE1 ホモログの単離であった (Koizumi et al., 2001)。シロイヌナズナには IRE1 が 2 つあり (Ire1-1, At5g24360; Ire1-2, At2g17520)、AtIre1-2 に関しては細胞質側ドメインに自己リン酸化活性があり、酵母の IRE1 のセンサードメインを Ire1-1 および Ire1-2 のセンサードメインに置き換えても酵母において UPRE を活性化した (Koizumi et

al., 2001; Noh et al., 2002)。また、イネにおいても 1 つの IRE1 ホモログが単離され、自己リン酸化能およびセンサー能が示された (Okushima et al., 2002)。これらの報告は、植物の IRE1 も小胞体ストレスのセンサーおよびトランスデューサーとして機能しうることを示唆しているが、植物における小胞体ストレス応答との関わりは明らかにされていない。つづいての分子機構に関する重要な報告は、シスエレメントの同定である。Oh らは BiP1 および BiP2 のプロモーター上から小胞体ストレス応答に関わるシス配列 P-UPRE (Plant UPR element; GATAATTGGTCCACGTCATC) を同定した (図 4, 2003)。興味深いことに、P-UPRE は動物における小胞体ストレス応答のシスエレメントである XBP1 結合部位と ERSE II を含んでいた。また、BiP3 のプロモーター上にも動物の ERSE に類似したシス配列が存在する (図 4, Noh et al., 2003)。しかし、XBP1 および ATF6 に相同性のある転写因子はシロイヌナズナでは見出せず、動物とは異なる転写因子が小胞体ストレス応答に関わっていることが考えられた。近年、Iwata らによって、小胞体ストレスによって転写量が増加する bZIP60 が同定された (Iwata and Koizumi, 2005)。bZIP60 は膜貫通ドメインを持つと推定され、膜貫通ドメインより N 末側に bZIP ドメインを有する。つまり、ATF6 と同様の転写活性が予想された。実際に bZIP60 Δ C は核に局在し、P-UPRE および ERSE を介して BiP プロモーターを活性化することが示された。また、bZIP60 が通常は小胞体膜に存在しており、小胞体ストレス存在下で切断型が核に移行することが確認されている (未発表データ)。これらのことから、bZIP60 は ATF6 と同様に、普段は小胞体膜上に存在しており、小胞体ストレス依存的に膜上にあると思われるプロテアーゼによって切断され、N 末端部分が核に移行し、下流の遺伝子を転写誘導することが考えられた。しかし、bZIP60 の遺伝子破壊株において、小胞体ストレスによる BiP3 の誘導は抑えられるものの、BiP1,2 は野生型同様に誘導されることから、植物の BiP の誘導には他の転写因子も関与していることが考えられた。

以上述べてきたように、BiP は小胞体タンパク質の品質管理において極めて重要な働きをしている。また、アミノ酸配列から予測される構造や、シャペロン活性については際立った多様性がないこと、発現様式については多様性があることなどから、発現制御がそれぞれの BiP の機能において重要であることが考えられる。植物においては発達段階や環境ストレス条件下で重要な働きをしており、独自の BiP の発現制御がある。しかし、その発現制御機構については不明な点が多い。そこで本研究は、小胞体ストレス応答の分子機構の研究が進んでいるシロイヌナズナを用いて、シロイヌナズナにおける BiP の誘導機構を明らかにすることを目的とした。まず、シロイヌナズナには 3 個の BiP 遺伝子があることから、そ

れぞれについて発現様式を調べた。つづいて、植物においていまだ明らかにされていない糖飢餓による BiP 発現への影響を調べた。また、動物において膜内切断で制御されるいくつかの転写因子が小胞体ストレス応答に関わっていたことなどから、膜内切断で制御されると予想される転写因子について BiP 発現誘導との関わりを調べた。

材料と方法

植物材料

BiP2 プロモーターに GUS レポーター遺伝子を連結したキメラ遺伝子（以下 BiP2-pro::GUS とする）および P-UPRE を 6 個と最小プロモーターを GUS 遺伝子に連結したキメラ遺伝子（以下 6xP-UPRE::GUS とする）、P-UPRE を 6 個と最小プロモーターを LUC に連結したキメラ遺伝子（以下 6xP-UPRE::LUC とする）を導入した形質転換シロイヌナズナは Oh ら（2003）によって作成されたものを使用した。

BiP3 プロモーターに GUS レポーター遺伝子を連結したキメラ遺伝子（以下 BiP3-pro::GUS とする）は、BiP3 の開始コドンから上流 1.5kb を下記のプライマーを用いて PCR によって増幅し、pGEM-T Easy ベクター（Promega）に導入し、Pst I および BamH I によって pBI101 ベクターに導入した。

BiP-L F 5'-CTGCAGATTCAACCATTCCTATTTAG-3'

BiP-L R 5'-GGATCCAAAATCATTTTTCGTTGTTGAG-3'

形質転換植物は Clough ら（1998）の方法に従って作成した。

T-DNA 挿入変異体は Arabidopsis Biological Resource Center（Columbus）より入手した。

芽生えは 1%(w/v)スクロースを含む 1/2MS 培地に播種し、16 時間明期・8 時間暗期で緩やかに振とう培養し、播種後 2 週間のものを用いた。

切り取り葉としては土壌にて 16 時間明期・8 時間暗期で 4 週間生育させた植物を用いた。

糖飢餓処理と糖誘導処理

糖飢餓処理は、切り取り葉は蒸留水に遮光のもと 24 時間浸すことで行い、芽生えは蒸留水で 2 回すすいだものを蒸留水に遮光のもと 24 時間緩やかに振とう培養することで行った。糖誘導処理は 90 mM の糖溶液に遮光のもとそれぞれの処理時間切り取り葉は浸すことで、芽生えは緩やかに振とう培養することで行った。

ツニカマイシンおよび DTT 処理

ツニカマイシンは 5 μ g/ μ l となるように DMSO に溶解し、ストック溶液とした。切り取り葉の場合、5 μ g/ml のツニカマイシン溶液に浸すことで行った。芽生えおよび培養細胞においては、培養液に 5 μ g/ml となるようにツニカマイシンを加えた。DTT は同様に 2mM で行った。コントロールはツニカマイシンストック溶液と同

量の DMSO を溶液に加えることとした。

RT-PCR

器官別の RNA は土に播種後 4 週間の野生型シロイヌナズナから RNeasy plant mini kit (Qiagen, USA) を用いて抽出した。それぞれの RNA は RNA PCR kit (avian myeloblastosis virus) version 3.0 (Takara, Japan) を用いて逆転写反応を行った。bZIP17, bZIP28 および Act8 mRNA の検出には以下のプライマーを用いて 25 サイクルで増幅した。

bZIP17-F-Acc65I 5'-ACGGTACCATGGCTGAACCAATCACCAAGGAGC-3'

bZIP17N-R+stop-Bam

5'-CGGGATCCTCAAGCTTCACTCTTCTTACTCTCGGACTTC-3'

bZIP28-F-Acc65I 5'-ACGGTACCATGACGGAATCAACATCCGTGGTTGC-3'

bZIP28N-R+stop-Bam

5'-CGGGATCCTCAACTTTTACCCTCATTCTTCTTACTCTCTG-3'

Act8-F 5'-GTCGCTGTCGACTACGAGCAAG-3'

Act8-R 5'-CTGTGGACAATGCCTGGACCTGC-3'

bZIP28, S1P, S2P の破壊株は播種後 2 週間の芽生えから RNA を抽出し、上記のように逆転写を行い、bZIP28、S1P および S2P の検出はそれぞれ以下のプライマーを用いて 25 サイクルで増幅した。

bZIP28-F-Acc65I 5'-ACGGTACCATGACGGAATCAACATCCGTGGTTGC-3'

bZIP28N-R+stop-Bam

5'-CGGGATCCTCAACTTTTACCCTCATTCTTCTTACTCTCTG-3'

AtS1P-sqRT-F2 5'-TAAACTGGAGTCGACATCTTCTCGCTCAG-3'

AtS1P-RT-R 5'-ATACACCAACCCGACCTTCA-3'

AtS2P-sqRT-F 5'-CGCCGTATTTGGATTCTCTCCTTCCACG-3'

AtS2P-sqRT-R2 5'-TCAGATCACCGACAAAAACAAACGTGCC-3'

RNA プロット

全 RNA は aurin tricarboxylic acid 法(Gonzalez et al., 1980)によって抽出し、各レーンに 5 μ g ずつを 1.2%のアガロースゲルで電気泳動した。電気泳動終了後、20xSSC 中でナイロンメンブレン(Hybond N, Amercham)に転写し、UV クロスリンカーで固定した。ハイブリダイゼーションは BcaBEST Labeling kit (Takara) によって ³²P で標識された全長の BiP2 および GUS の PCR 産物をプローブとして 42°C で一晩インキュベートした。メンブレンは 0.1%(w/v)SDS を含む 2×SSC および 0.1×SSC にて 65°C で洗浄し、オートラジオグラフィーをおこなった。

リアルタイム RT-PCR

S1P, S2P, bZIP28 の破壊株は播種後 2 週間の芽生えから RNeasy plant mini kit (Qiagen) を用いて抽出した。それぞれの RNA は RNA PCR kit (avian myeloblastosis virus) version 3.0 (Takara) を用いて逆転写反応を行った。BiP1, 2 および BiP3 の検出には以下のプライマーを用いて Act8 によって標準化した。SYBR Premix Ex Taq (Takara) のキットによって PCR 断片を増幅し、LightCycler (Roche Diagnostics) によってシグナルを検出した。

BiP2-F-rt 5'- TGCTTGCGATCATCTTCTTC -3'

BiP2-R-rt 5'- TGATCCTAACTTCGTAGCCTCTTC -3'

BiP3-F-rt 5'- CGAAACGTCTGATTGGAAGAA -3'

BiP3-R-rt 5'- GGCTTCCCATCTTTGTTTAC -3'

Act8-F-rt 5'- TCAGCACTTTCCAGCAGATG-3'

Act8-R-rt 5'- ATGCCTGGACCTGCTTCAT -3'

GUS 活性の組織化学的解析

芽生えおよび成熟個体の各器官は GUS 染色液(25 mM リン酸バッファー pH 7、10 mM EDTA、0.5 mM KFe(CN)₂、0.5 mM KFe(CN)₃、0.1% Triton X-100 and 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)中、37°Cで一晩インキュベートした。組織は 70%エタノールにて脱色し、光学顕微鏡で観察した。

LUC 活性の測定

ルシフェラーゼ活性は Luciferase assay system (Promega) を用いて添付のプロトコールに従って測定した。

タンパク質の抽出と SDS-PAGE

タンパク質はタンパク質抽出液 (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.05% tween20, 1 mM EDTA) にて破碎し、15,000rpm で 5 分間遠心したのち、上清を 10%のポリアクリルアミドゲルで展開した。

抗体の作成と精製

BiP1 および BiP3 に対する抗体は下記のペプチドをそれぞれ抗原として医学生物学研究所 (MBL 株式会社) にてウサギに免疫した。

BiP1 CRSGGAPGGAGGESS

BiP3 CYEKTEGENEDDDGD

bZIP28 抗体作製には、bZIP28 Δ C の部分を下記のプライマーによって増幅し、XhoI および Hind III によりマルチクローニングサイトを導入した pBAD/D-TOPO ベクター (Invitrogen) に導入し、組み換えタンパク質の発現に用いた。このベクターを大腸菌に形質転換し、アラビノースにより融合タンパク質の生産を誘導し、His タグを利用して、ニッケルカラム (Ni-NTA Resin カラム ; QIAGEN) を用いて融合タンパク質を精製した。

bZIP28-F1-Xho 5'-ACTCGAGATGACGGAATCAACATCCGTGGTTG-3'

bZIP28-R561-Hind 5'-AAGCTTATCATCACCTTCGTTGTTCGTAGCG-3'

精製したタンパク質を 1 M 尿素を含むリン酸バッファー (60 mM Na₂HPO₄, 16 mM NaH₂PO₄) に溶解し、最終濃度 1.38 mg/mL とした試料 3.5 mL を調整した。このタンパク質試料を抗原とし、医学生物学研究所 (MBL 株式会社) にてウサギに免疫した。

bZIP28 抗体の精製には、まず大腸菌で発現させた組み換え bZIP28 Δ C タンパク質を上記の方法で SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜にウェット方式で転写させた。つづいてメンブレンの 50-75 kDa の部分を切り取り、5% スキムミルクを含む TBS (10mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl) でブロッキングしたのち、bZIP28 Δ C 免疫血清と室温で 5 時間反応させた。メンブレンを TBS で洗浄したのち、0.1M glycine / 0.15M HCl (pH 3-4) で抗体を溶出し、1M Tris によって中和した。

ウエスタンブロット

SDS-PAGE で展開したタンパク質を、転写用緩衝液 (25mM Tris、192mM グリシン) 存在下で PVDF 膜に転写した。タンパク質の転写された PVDF は、5% スキムミルクを含む PBS (20 mM phosphatebuffer (pH 7.4)、0.9% NaCl) でブロッキングした後、1 次抗体として BiP1 および BiP3、精製した抗 bZIP28 抗体を 1000 倍希釈で、2 次抗体として HRP (horseradish peroxidase) を結合した抗ウサギ IgG 抗体を 2000 倍希釈で反応させた。BiP1 および BiP3 のシグナル検出には ECL kit (Chemi-Lumi One, Nakalai) を、bZIP28 のシグナル検出には Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (MILLIPORE) を用いた。

一過的発現とデュアルルシフェラーゼアッセイ

エフェクターとしての CaMV35S プロモーターに制御された GUS、全長 bZIP60、bZIP60 Δ C、およびレポーターとしての BiP1、BiP3、6 x ERSE、6 x P-UPRE に制御された Luc は以前に報告されているものを用いた (Oh et al., 2003; Iwata and Koizumi, 2005)。エフェクターとしての CaMV35S プロモーターに制御された全長 bZIP17、bZIP17 Δ C、全長 bZIP28、bZIP28 Δ C のための cDNA 断片は以下に示す。

ライマーを用いて増幅し、pBI221 の GUS 遺伝子と入れ替えた。

bZIP17-F-Acc65I 5'-ACGGTACCATGGCTGAACCAATCACCAAGGAGC-3'

bZIP17N-R+stop-Bam

5'-CGGGATCCTCAAGCTTCACTCTTCTTACTCTCGGACTTC-3'

bZIP17-F901 5'-CCTCCGATGGGAATGTATCCACCTATGG-3'

bZIP17-R-BamHI 5'-CGGGATCCTCAAGTGGTCACAAGATGAGGAGCTC-3'

bZIP28-F-Acc65I 5'-ACGGTACCATGACGGAATCAACATCCGTGGTTGC-3'

bZIP28N-R+stop-Bam

5'-CGGGATCCTCAACTTTTACCCTCATTCTTCTTACTCTCTG-3'

bZIP28-F871 5'-CCCATTCCTAAGTTAAATCCTAAGCCTG-3'

bZIP28-R-BamHI 5'-CGGGATCCTCAGGTGGCTACGAGATGGAGACCCG-3'

BiP1 および BiP3 変異型プロモーターは岩田 (2005) によって作成されたそれぞれの m3 を用いた。

プロトプラストはシロイヌナズナ懸濁培養細胞から Ueda ら (2001) に従ってポリエチレングリコールによって一過的に形質転換した。バックグラウンド補正としてはユビキチンプロモーター制御化のウミシイタケルシフェラーゼを用いた。各エフェクターおよびレポーターのプラスミドは 5 μ g ずつ、Ubi::R-Luc は 2.5 μ g ずつ、同時に遺伝子導入した。デュアルルシフェラーゼ解析は、遺伝子導入されたプロトプラストを 23°C、16 時間暗所で培養したのち、ルシフェラーゼ活性を the dual luciferase assay system (Promega) を用いて添付のプロトコールに従って測定した。ホタルルシフェラーゼ活性の値はウミシイタケルシフェラーゼ活性の値によって標準化した。

GFP 蛍光の観察

SP-RFP-HDEL プラスミドの構築には、以下に示すプライマーによって第 1PCR で SP 断片と RFP 断片を SP-GFP-HDEL/pBI221 (Mitsuhashi et al., 2000) と mRFP/pRSETB (Campbell et al., 2002) を鋳型に増幅した。

Xho-SP-F 5'-CTCGAGATGGCCAGACTCACAAGCATCATTG-3'

SP-RFP-R 5'-GTCCTCGGAGGAGGCGCGGTAGGCGTACGC-3'

SP-RFP-F 5'-GCGTACGCCTACCGCGCCTCCTCCGAGGAC-3'

Bgl-RFP-R 5'-AGATCTGCGCCGGTGGAGTGGCGGCCCTC-3'

つづいて、第 2PCR として SP 断片と RFP 断片を鋳型としてプライマー Xho-SP-F と Bgl-RFP-R によって SP-RFP 断片を増幅し、SP-GFP-HDEL/pBI221 の SP-GFP 断片と XhoI と BglIII によって入れ替えた。

GFP-bZIP28 および GFP-bZIP28 Δ C プラスミドの構築には、TOPO-ZIP28-F と

bZIP28-R-BamHI および TOPO-ZIP28-F と bZIP28N-R+stop-Bam によって全長 bZIP28 と bZIP28 Δ C 断片を増幅した。

TOPO-ZIP28-F 5'-CACCACGGAATCAACATCCGTGGTTGCTCC-3'

これらの断片は pENTER™/D-TOPO (invitrogen)に挿入しエンターベクターとした。つづいて、中川博士（鳥取大）によって譲渡された gateway vector pUGW6 (Nakagawa et al., 2007) をデスティネーションベクターとして LR 反応によって挿入し、GFP 連結コンストラクトとした。

SP-RFP-HDEL と GFP-bZIP28 を含むバイナリーベクターの構築には、GFP-bZIP28 断片を pZH2B/35SNos (Hajdukiewicz et al., 1994) の BamHI 部位に挿入した。SP-RFP-HDEL 断片は pUC198AA (Hajdukiewicz et al., 1994) の HindIII と EcoRI を用いて挿入し、GFP-bZIP28 を含む pZH2B/35SNos の AscI 部位に挿入した。シロイヌナズナ懸濁培養細胞への形質転換は Menges らの方法 (2004) に従った。

GFP 蛍光の観察は LSM510 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, Germany) を用いて行った。

結果

シロイヌナズナの 3 個の BiP 遺伝子

植物には複数の BiP 遺伝子が存在し、シロイヌナズナにおいては 3 個の BiP 遺伝子がある。また、植物には多様な BiP の発現様式があり発現制御がそれぞれの BiP の役割において重要であることが考えられた。そこで、シロイヌナズナの 3 個の BiP について発現様式を比較した。序論でも述べたように、シロイヌナズナの 3 つの BiP のうち、BiP1 と BiP2 は比較的最近重複した遺伝子だと考えられる。プロモーターの配列も酷似しているため、発現様式も類似していることが予想される (図 4)。また、5'UTR および 3'UTR を含むコード領域において、それぞれを特異的に検出するプライマーおよびプローブの設計は困難であったため、BiP1 と BiP2 は転写産物の検出において区別しないこととした。一方、BiP1, 2 と BiP3 の間では 5'UTR においてそれぞれに特異的な配列が存在するので、その領域をプローブとして BiP1, 2 と BiP3 の転写量を区別して検出した (Iwata, 2005)。BiP1, 2 および BiP3 のツニカマイシンによる転写量の変化を調べると、BiP1, 2 においてはツニカマイシン非存在下でもある程度発現しており、ツニカマイシン処理後 2 時間以降に強く転写が誘導されている (図 7A)。一方 BiP3 の転写産物は、ツニカマイシン非存在下で検出されず、ツニカマイシン処理後 2 時間で若干検出され、5 時間以降では強く検出された。

植物の BiP はさまざまなストレスで誘導されることが報告されている。それぞれについて BiP1, 2 および BiP3 の転写誘導を調べた (図 7B)。その結果、BiP1, 2 はツニカマイシンおよび DTT といった小胞体ストレス処理で強く転写誘導された。BiP2 はサリチル酸経路の下流で発現することが知られており (Wang et al., 2005)、本研究でも若干 BiP2 がサリチル酸で誘導されていた。塩ストレスに 4 日間さらされた芽生えにおいて、BiP2 が誘導されることが知られているが (Koiwa et al. 2003)、5 時間処理では誘導は見られなかった。ショ糖については生育培地に含まれているので顕著な誘導は見られないが、より濃度の高い溶液で処理することによって若干誘導された。熱ショックで BiP1, 2 の転写が誘導されることが知られているが (Koizumi, 1996; Sung et al., 2001)、本研究においては転写誘導を検出することはできなかった。いずれの処理においても BiP1, 2 はある程度発現している一方、BiP3 はツニカマイシンおよび DTT で強く転写誘導されるが、その他のストレス下で転写産物は検出されなかった。つまり、BiP3 は小胞体ストレス特異的に発現することが分かった。

アミノ酸配列において、C 末端部分に BiP1, 2 と BiP3 の間で相同性の低い領域

が存在するので、その領域のペプチドを抗原として抗体を作成した (図 3)。BiP1 抗体の抗原とした配列に対して、BiP2 は 1 アミノ酸が欠失しているのみなので、この抗体は BiP2 も認識する可能性がある。全長の BiP1 組み換えタンパク質をウエスタンブロットで検出したところ、BiP3 抗体はタンパク質を検出せず、BiP1 抗体は検出したので、少なくとも BiP3 抗体は BiP1 タンパク質を認識しないことは確認している (データは示さない)。BiP1 抗体による BiP1 タンパク質 (おそらく BiP 2 も) を検出すると、ツニカマイシン非存在下でもある程度タンパク質が検出された。そして、ツニカマイシン処理 10 時間でタンパク質量の上昇が見られた (図 7C)。BiP3 タンパク質も転写産物と同様にツニカマイシン非存在下では検出されず、ツニカマイシン処理後 5 時間で誘導がかかり、10 時間でさらに上昇した。

次に、BiP1, 2 および BiP3 の植物体における発現様式の検出を、GUS レポーター遺伝子を用いておこなった。BiP1, 2 の転写誘導の検出には、BiP2 の ATG の上流 1.5kbp を GUS に連結したコンストラクト (BiP2-pro::GUS) を導入した植物を用いた (Oh et al., 2003)。播種後 1 週間目の BiP2-pro::GUS 植物の芽生えにツニカマイシン処理をすると、芽生え全体で GUS の活性が見られた。また、ツニカマイシン非処理の芽生えでも根端および茎頂で GUS 活性が見られた (図 8A)。ツニカマイシン非処理でもある程度 GUS 活性が検出され、ツニカマイシン処理によって GUS 活性が顕著に上昇することから、GUS 活性のパターンが転写のパターンをほぼ反映していると考えられた。そこで、器官別に GUS 染色を観察すると、花の葯で強く GUS 活性が見られた。さらに葯を詳しく調べると、花粉が染色されていることがわかった。また、未熟種子においても GUS の活性が見られた。

BiP3 の発現様式の検出には、BiP3 の ATG の上流 1.5kbp を GUS 遺伝子に連結し (BiP3-pro::GUS)、植物体に形質転換し、GUS 染色をおこない、観察した。播種後 1 週間目の BiP3-pro::GUS 植物は、ツニカマイシン非存在下ではほとんど GUS 活性が観察されなかった。ツニカマイシン処理をした芽生えでは顕著に GUS 活性が上昇した。したがって、BiP3-pro::GUS 植物においても GUS 活性は BiP3 の転写のパターンを反映していると考えられた。そこで器官別に GUS 活性を観察したところ、BiP2-pro::GUS 植物で見られた花粉や種子での GUS 活性は観察されなかった (図 8B)。

BiP の発現に対する糖の効果

糖による BiP1,2 の転写誘導

動物において BiP は GRP78 と呼ばれているように、グルコース飢餓で顕著に誘

導される。植物において糖飢餓と BiP の発現誘導の関わりについては調べられていない。そこで、糖飢餓処理が植物の BiP 転写誘導に及ぼす影響を、植物にとっての糖源であるショ糖を取り除くことで調べた。まず、BiP1, 2 および BiP3 プロモーターはツニカマイシン処理した植物の BiP1, 2 および BiP3 転写産物を強く認識することを確認した (図 9A 左)。その結果、24 時間の糖飢餓処理は BiP1, 2 の転写量を減少させた (図 9A 右)。その後再びショ糖を加えたところ、10 時間後には BiP1, 2 の転写量は回復した。BiP3 においては、糖飢餓で転写が誘導されることはなかった。動物の知見と異なり、BiP1, 2 が糖飢餓によって転写が抑えられ、糖処理によって転写量が増加したので、糖による BiP1, 2 の転写誘導についてさらに詳しく調べることにした。ショ糖を構成する単糖の効果について調べた結果、グルコースおよびフルクトースはいずれも BiP1, 2 を転写誘導した (図 9B)。また、同じ濃度のマンニトール処理は若干 BiP1, 2 を転写誘導した (図 9B)。

糖の BiP1, 2 のプロモーターに対する効果を調べるために、BiP2-pro::GUS 植物を用いた。まず、GUS の転写誘導が内在性の BiP1, 2 の転写誘導を反映しているかを調べた。その結果、内在性の BiP1, 2 は 0.1 μ g/ml のツニカマイシンでも転写誘導され、0.3, 1, 3 μ g/ml のツニカマイシンでさらに誘導された。これに対して GUS は、検出感度は下がるものの、内在性の BiP1, 2 と同様の誘導形態を示した (図 10B)。したがって、GUS の転写誘導は BiP2 の転写誘導を反映していると考え、糖の影響を調べた。BiP1, 2 の転写産物がショ糖処理 10 時間をピークに 5 から 24 時間の間に蓄積しているのと同様、GUS の転写産物も 10 時間をピークに蓄積した。このことから、糖によって BiP1, 2 mRNA が安定化するのではなく、糖によって BiP1, 2 のプロモーターが活性化する結果、BiP1, 2 の転写産物が蓄積することが考えられた。

糖による BiP1,2 転写誘導の P-UPRE 依存性

つづいて、糖による BiP1, 2 の転写誘導が小胞体ストレス応答依存性であるかどうかを調べるために、BiP1, 2 のプロモーター上に存在する小胞体ストレス応答のシス配列である P-UPRE に対する影響を調べた。P-UPRE を 6 個と最小プロモーターおよび GUS を連結したコンストラクト (6x P-UPRE::GUS) を導入した植物はツニカマイシン処理によって、BiP2-pro::GUS 植物同様の GUS 活性の誘導が見られている (Oh et al., 2003)。6x P-UPRE::GUS 植物において、ツニカマイシン非存在下では GUS の転写産物は検出されないのに対し、ツニカマイシン処理したサンプルからは明らかな GUS の転写産物の蓄積が見られた (図 11B)。したがって、6x P-UPRE::GUS 植物の GUS の転写産物によって、小胞体ストレスを特異的に検出できることが示された。そこで、BiP2-pro::GUS 植物および 6x P-UPRE::GUS 植

物を 24 時間飢餓処理し、10 時間の糖処理をおこなった。その結果、BiP2-pro::GUS 植物の GUS の転写産物は内在性の BiP1, 2 と同様に、糖飢餓によって減少し、糖添加によって増加した。一方、6x P-UPRE::GUS 植物の GUS の転写量は内在性の BiP1, 2 と異なり、糖飢餓によって若干増加し、糖添加によって検出されなくなった (図 11C)。

糖飢餓によって P-UPRE が活性化されることをさらに確かめるために、P-UPRE を 6 個と最小プロモーターおよびルシフェラーゼを連結したコンストラクト (6x P-UPRE::LUC) を植物に導入した。6x P-UPRE::LUC をシロイヌナズナのプロトプラストに一過的に発現させると、ツニカマイシンおよび DTT 処理によってルシフェラーゼ活性が上昇することがわかっている (Oh et al., 2003)。6x P-UPRE::LUC 植物をツニカマイシン処理すると、ツニカマイシン処理をしていないサンプルに比べておよそ 15 倍のルシフェラーゼ活性を示した (図 12B)。したがって、6x P-UPRE::LUC 植物のルシフェラーゼ活性によっても小胞体ストレス応答を特異的に検出できることが示された。6x P-UPRE::LUC 植物を糖飢餓処理すると、飢餓処理の時間にしたがっておよそ 7 倍までにルシフェラーゼ活性が上昇した。一方、糖溶液を処理したサンプルではルシフェラーゼ活性の上昇は見られなかった。以上のことは、糖による BiP1, 2 の転写誘導が小胞体ストレス応答とは独立におこっていることを示している。さらに、糖飢餓は P-UPRE を活性化することから、糖飢餓は植物においても小胞体ストレス応答を誘導していることが考えられる。

BiP の発現を誘導する bZIP 型転写因子 bZIP28

膜貫通ドメインを有する bZIP 型転写因子

シロイヌナズナでは BiP を誘導する因子として bZIP60 が知られている。しかし、bZIP60 の破壊株において BiP3 の誘導は抑えられるものの、BiP1, 2 は野生型同様に誘導された。したがって、シロイヌナズナには BiP を誘導する他の因子が存在することが示唆されている。動物細胞において膜貫通ドメインを有するいくつかの bZIP 型転写因子について調べると、小胞体ストレス応答との関わりが示されたことから、シロイヌナズナにおいて膜貫通ドメインをもつ bZIP 型転写因子について BiP の転写誘導との関わりを調べることにした。シロイヌナズナには bZIP 型転写因子が 75 個あると予測され、そのうち bZIP17 (At2g40950)、bZIP28 (At3g10800)、bZIP49 (At3g56660)、bZIP60 (At1g42990) は膜貫通ドメインを持つ (図 14A、Jakoby et al, 2002)。これらは膜貫通ドメインより N 末端側に bZIP ドメインをもつことから、II 型膜貫通タンパク質であると予測される。さらに bZIP17、bZIP28、bZIP49 の 3 つは、膜貫通ドメインから 30 アミノ酸以内に S1P

認識配列である RXL の配列をもっている (図 14B)。したがって、この 3 つの遺伝子について注目した。それぞれの cDNA を単離した際 bZIP49 の cDNA は単離できなかったため bZIP49 は発現していないものと考え、以降は bZIP17 と bZIP28 についてのみ解析をおこなった。

まず、ツニカマイシン処理がこの 2 つの遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。BiP1, 2 および BiP3 はツニカマイシン処理後 2 時間で誘導が見られ、5 時間でさらに誘導が見られた。bZIP60 はストレスの無い状態でも若干発現しており、ツニカマイシン処理後 1 時間から 5 時間にかけて転写量が増加する。一方、bZIP17 および bZIP28 においてはツニカマイシン処理による顕著な転写誘導は見られなかった。また、他の小胞体ストレスを引き起こす薬剤である DTT (ジスルフィド結合の形成を阻害する) の処理によって、BiP1, 2, 3 および bZIP60 は転写誘導されるが、bZIP17 および bZIP28 は顕著な転写誘導が見られなかった (図 15A)。器官別に bZIP17 および bZIP28 の発現に特異性があるかを調べるために、芽生え、ロゼット葉、茎、茎生葉、つぼみ、花、さやから RNA を抽出し RT-PCR をおこなったところ、いずれの器官においても同等程度に発現が見られた (図 15B)。

bZIP17 および bZIP28 による BiP プロモーターの活性化

bZIP17 および bZIP28 が BiP のプロモーターを活性化するかどうかを調べるために、シロイヌナズナのプロトプラストを用いてトランジェントアッセイをおこなった。エフェクターはネガティブコントロールとして GUS を、ポジティブコントロールとして切断型の bZIP60 Δ C を用いた。bZIP17 および bZIP28 は切断型で活性を示すと考えたので、それぞれについて膜貫通ドメインより N 末側を Δ C として用いた。レポーターには BiP1 プロモーター、BiP3 プロモーターおよびネガティブコントロールとして Hsp70 プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結した。これらを一過的に発現させ、デュアルルシフェラーゼ法によってプロモーターの活性を調べた結果、bZIP17 Δ C は BiP1 プロモーターを GUS に比べて 2 倍以上、BiP3 プロモーターを GUS に比べておよそ 7 倍活性化した。bZIP28 Δ C は BiP1 プロモーターを GUS に比べて 5 倍以上、BiP3 プロモーターを GUS に比べて 20 倍以上活性化した。また、これらの遺伝子は Hsp70 のプロモーターを活性化しなかった (図 16B)。

これらの遺伝子が本当に切断型になることで転写因子として活性型になるのかどうかを調べるために、全長を発現させたものとプロモーター活性を比べた。BiP3 は通常の発現レベルが非常に低いため、誘導を顕著に見ることができる。そこでレポーターとしては、BiP3 のプロモーターを用いることにした。その結果、bZIP17 の全長は BiP3 プロモーターに対しておよそ 5 倍の誘導活性を示し、bZIP17 Δ C は

3 倍弱の誘導活性を示した。bZIP28 の全長は BiP3 プロモーターでおよそ 8 倍の誘導活性であったのに対し、bZIP28ΔC はおよそ 20 倍の誘導活性を示した (図 17B)。したがって、切断されることで転写因子として活性化することが考えられたので、bZIP28 はシロイヌナズナにおいて RIP により制御されることで BiP を誘導する重要な因子であると考え、以降は bZIP28 についてのみ解析をおこなった。

つづいて、切断型 bZIP28 による BiP の転写誘導が、小胞体ストレス応答に関わるシス配列を介するかどうかを調べた。BiP1 および BiP3 のプロモーター上にはシス配列としてそれぞれ P-UPRE が 1 つおよび ERSE が 2 つ存在する。それぞれのシス配列に変異を入れたプロモーターをレポーターとしてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、BiP1 に変異を入れたプロモーターでは誘導活性が 1.5 倍に減少した。また、BiP3 に変異を入れたプロモーターでは誘導活性が全く見られなかった (図 18B)。さらに、6x ERSE::LUC および 6x P-UPRE::LUC をレポーターとしてルシフェラーゼ活性を測定したところ、ERSE はおよそ 9 倍に、P-UPRE はおよそ 4 倍の誘導活性を示した (図 19B)。

bZIP28 の細胞内局在

bZIP28 の細胞内局在を調べるために、GFP 融合タンパク質を用いた顕微鏡観察をおこなった。N 末にシグナルペプチド、C 末に小胞体リテンションシグナルである HDEL を連結した GFP (SP-GFP-HDEL) は小胞体のマーカーとして知られている (Mitsubishi et al., 2000)。SP-GFP-HDEL の GFP を RFP に置き換えて (SP-RFP-HDEL) 小胞体を RFP 蛍光で標識することにした。まず、このコンストラクトが小胞体に局在することを確認するために、シロイヌナズナのプロトプラストに SP-GFP-HDEL と一過的に発現させた。その結果、RFP 蛍光と GFP 蛍光は核の周りおよび細胞質で網目状に一致して観察された。したがって、SP-RFP-HDEL は小胞体を標識するマーカーとして利用できると考えた (図 20A)。次に、SP-RFP-HDEL および単独の GFP を一過的に共発現させたところ、GFP は核マトリックスおよび細胞質で観察された (図 20B)。bZIP28ΔC の N 末に GFP を連結し、一過的に SP-RFP-HDEL と共発現させたところ、GFP 蛍光は細胞質および核において観察されたが、核においてより強い蛍光が観察された (図 20C)。したがって、膜貫通ドメインを失って水溶性となる bZIP28ΔC は、bZIP ドメイン内の核移行シグナルによって核に局在すると考えられた。

つづいて、全長の bZIP28 の局在を調べるために、bZIP28 の N 末に GFP を連結したコンストラクト (GFP-bZIP28) を作製した。しかし、GFP-bZIP28 を一過的に発現させた細胞は蛍光が弱く、十分な観察ができなかったため、SP-RFP-HDEL と GFP-bZIP28 を含むバイナリーベクターを作製し、シロイヌナズナの懸濁培養細胞

に導入した。SP-RFP-HDEL-GFP-bZIP28 細胞を小胞体ストレス非存在下で観察すると、GFP 蛍光は RFP 蛍光の局在と大部分で一致した。一方で、ツニカマイシン処理した細胞では GFP 蛍光が核においてより強く観察された。また、DTT 処理した細胞においても、核内に GFP 蛍光が観察された (図 21)。したがって、小胞体ストレス依存的に bZIP28 は切断型となって、核に移行することが考えられた。この核への移行がどのような時間規模でおこるのかを調べるために、ツニカマイシン処理後経時的に画像を取得した。その結果、およそ 30 分後において GFP 蛍光の核局在が確認できた (図 22)。このことから、bZIP28 は小胞体ストレスに対して、早い段階で下流の遺伝子の転写を活性化している可能性が考えられた。

抗 bZIP28 抗体の作製と精製

内在性の bZIP28 タンパク質が小胞体ストレスによって切断することを確かめるために、bZIP28 Δ C の組み換えタンパク質を抗原とし、抗体を作成した。大腸菌で発現させた組み換えタンパク質をウエスタンブロットにより抗 bZIP28 抗体で検出したところ、目的の位置であるおよそ 52kDa の位置にタンパク質が検出されたが、非特異的なタンパク質も多く検出された (図 23D)。そこで、組み換えタンパク質を用いて抗体を精製し、再度ウエスタンブロットをおこなったところ、目的の位置のタンパク質がより特異的に検出された (図 23E)。

精製した抗体を用いて野生型および bZIP28 の遺伝子破壊株をツニカマイシン処理し、ウエスタンブロットをおこなった。野生型においてツニカマイシン処理特異的に 50kDa 弱の位置にバンドが検出された。このバンドは bZIP28 破壊株においては検出されなかったため、bZIP28 タンパク質であると考えられる。全長 bZIP28 は 675 アミノ酸であることから、50kDa 弱のタンパク質は全長 bZIP28 ではなく、切断された N 末側のドメインであると考えた。したがって、bZIP28 は小胞体ストレスにより切断型が生じることが確認できた。また、野生型において 1、2、5 時間のツニカマイシン処理をおこなったところ、処理の時間にしたがって 50kDa のバンドが検出された。つまり、ウエスタンブロットによってもツニカマイシン処理後 1 時間以内という時間規模で bZIP28 の切断型が生じることが確認できた (図 23G)。

bzip28 における BiP の転写誘導

bZIP28 は BiP1, 2 および BiP3 を転写誘導する転写因子であると考えられるので、bZIP28 破壊株において BiP1, 2 および BiP3 の転写誘導が抑えられることが考えられた。そこで、bZIP28 の T-DNA 挿入ラインを入手し、解析をおこなった。RT-PCR により、bzip28 において bZIP28 の転写物は検出されなかったため、この変異体は

遺伝子破壊株であることが確認できた (図 24B)。 *bzip28* における BiP の転写誘導を調べると、ツニカマイシン処理後 1 時間および 5 時間では野生型と同様に BiP1, 2 は転写誘導されたが、ツニカマイシン処理後 2 時間において、野生型のおよそ 3 分の 2 の転写誘導にとどまった。また、BiP3 の誘導においてもツニカマイシン処理後 1 時間および 5 時間は野生型と同様であったのに対し、ツニカマイシン処理後 2 時間において野生型のおよそ 4 分の 1 の転写誘導であった (図 24C)。したがって、bZIP28 はツニカマイシン処理後およそ 2 時間の BiP1, 2 および BiP3 の転写誘導において主要な制御を担う分子の一つであることが考えられた。

s1p および s2p における bZIP28 の切断

bZIP28 が膜内切断の制御を受けて機能を果たしていることが考えられ、さらに、S1P 認識配列である RxL の配列をもつことから、bZIP28 は S1P および S2P によって切断されることが予想された。そこで、S1P および S2P の T-DNA 挿入ラインを入手し、解析をおこなった。RT-PCR により、*s1p-1*、*s1p-2* および *s2p-2* において S1P および S2P の転写物は検出されなかったため、それぞれの変異体は遺伝子破壊株であることが確認できた (図 25B)。 *s1p-1*、*s1p-2* および *s2p-2* において BiP1, 2 および BiP3 の転写誘導を調べた結果、BiP1, 2 のツニカマイシン処理による転写誘導は野生型と変化がなかった。また、BiP3 の転写誘導においても *s1p-1*、*s1p-2*、*s2p-2* で野生型同様に誘導されていた (図 25C)。 S1P および S2P の破壊株で小胞体ストレスによる bZIP28 の切断がおこるかを調べたところ、*s1p-1*、*s1p-2* および *s2p-2* において切断型の bZIP28 と思われるバンドは検出された (図 25D)。したがって、bZIP28 を切断する酵素は S1P および S2P ではないことが考えられた。

考察

2000年にシロイヌナズナの全ゲノム解読が終了した時点で、シロイヌナズナにはすでに単離されていた BiP1 および BiP2 に加えて、第3の BiP が存在することが予測されていた (Sung et al., 2001)。しかしながらゲノム配列の情報に誤りがあったため、BiP3 の単離および解析には至っていなかった。Noh らはシロイヌナズナにおいて小胞体ストレス応答で誘導される遺伝子をマイクロアレイで探索したところ、最も顕著に誘導される BiP-like (BiP-L) の遺伝子を発見した (2003)。彼らは BiP3 である BiP-L はツニカマイシン処理で特異的に転写が誘導されることを報告している (Noh et al., 2003)。本研究ではシロイヌナズナの3個の BiP 遺伝子についてそれぞれの発現様式を詳細に解析し、違いを比較した。BiP1 と BiP2 においてはプロモーターの配列が酷似していること、それぞれの転写物を特異的に検出するプライマーおよびプローブの作成が困難であったことなどから、本研究では区別しないで検出することにした。その結果、BiP1, 2 は恒常的に発現しており、ツニカマイシンや DTT といった小胞体ストレス処理で顕著に転写誘導されることが示された。これに対して BiP3 は、小胞体ストレス以外のストレスやストレス非存在下では転写産物やプロモーター活性が検出されず、ツニカマイシンや DTT といった小胞体ストレスで特異的に誘導されることが明らかになった。さらに本研究では、BiP1 と BiP3 の特異的ペプチドを抗原とする抗体を用いることで、BiP1, 2 と BiP3 のタンパク質を区別して検出することに初めて成功した。その結果、タンパク質レベルでも BiP1, 2 は恒常的に存在するのに対し、BiP3 タンパク質は小胞体ストレス非存在下では検出されず、小胞体ストレスにより特異的に合成されていることが明らかになった。BiP1, 2 と BiP3 の間で発現様式が異なることから、これらを区別して転写産物およびタンパク質を検出することは重要であると考えられた。

BiP2-pro::GUS 植物の GUS 活性が花粉および種子で観察されたことは、小胞体タンパク質の合成量増加に対応するため、BiP2 を発現誘導し小胞体内のフォールディング能力を向上させていることが考えられる。種子は種子貯蔵タンパク質を大量に合成する。植物の BiP はインゲンマメのファゼオリンやイネのプロラミンなど種子貯蔵タンパク質と結合しており、貯蔵タンパク質を隔離する構造であるプロテインボディの形成に必要であるなど、種子における重要性は以前から知られている (Li et al., 1993; Muench et al., 1997; Vitale et al., 1995)。また、シロイヌナズナでも登熟中の種子で発現することは知られており、本研究でも同様の結果が得られた (Koizumi, 1996; Sung et al., 2001)。しかし今回、GUS レポーター遺伝子

を用いて細部の強い発現誘導が観察可能になったことで、花粉において BiP2 が強く発現していることが新たに分かった。シロイヌナズナの花粉では、細胞壁合成に関わる遺伝子群が最も多く転写されている (Becker et al., 2003)。小胞輸送系の遺伝子群も多量に転写されており、小胞体で合成されるタンパク質の合成がさかんな組織である。bZIP60 やツニカマイシンで顕著に誘導される機能未知遺伝子 Tunicamycin Induced 1 (TIN1) も花粉において発現がみられる (未発表データ)。しかし、BiP3-pro::GUS 植物の GUS 活性が花粉および種子で観察されなかったことから、これらの組織での BiP2 の誘導は小胞体ストレス応答とは独立である可能性も考えられた。

BiP は通常必要なタンパク質であるので、BiP1, 2 が恒常的に発現していることから非ストレス下での機能を BiP1, 2 が果たしていることが考えられた。一方、BiP3 が小胞体ストレス特異的に発現誘導されることは、小胞体ストレス存在下において重要な役割を果たしていることが予想された。しかし、BiP3 破壊株を入手し解析したところ、ツニカマイシン存在下において野生型より発芽率が減少するなどの表現型は見られなかった。また、BiP3 破壊株は通常の条件下で野生型と同様に生育する。したがって、BiP3 は通常の生育に必須ではないことが示唆される。BiP3 がシロイヌナズナに存在する意義は不明ではあるが、発現様式において小胞体ストレス特異的に誘導されることは大きな特徴である。BiP の発現は酵母から高等生物まで小胞体ストレス応答の指標とされてきたが、BiP3 が発現しない時期や環境でも BiP1, 2 が発現していたことは、小胞体ストレス応答とは独立に BiP1, 2 が発現することを示唆している。つまり、シロイヌナズナにおいて BiP1, 2 の発現は小胞体ストレス応答の指標としては不適切であることが考えられた。一方、BiP3 は小胞体ストレス条件下で特異的に発現が誘導されるので、シロイヌナズナにおいて BiP3 の発現は小胞体ストレス応答の指標として活用できる。小胞体ストレス応答の分子機構に関わる因子の探索において、小胞体ストレスによる BiP3 の発現誘導が見られなくなることを指標に変異体を単離することなどが期待できる。

動物細胞においてグルコースはエネルギー源として非常に重要である。また、血糖値を一定に保つことは個体の生存に関わる重要な働きであり、血糖値を調節する臓器であるすい臓では恒常的に *Xbp1* mRNA のスプライシングがおこっている (Iwawaki et al., 2004)。グルコース飢餓が BiP を誘導することからも、糖の不足は小胞体ストレス応答を引き起こすと考えられている。ショ糖はグルコースと同様植物において主要なエネルギー源であり、その濃度が変化することで多くの遺伝子発現を誘導するシグナル分子でもある (Contento et al., 2004; Gupta et al., 2005)。つまり、植物細胞にとっても糖濃度を一定に保つことは重要であり、糖濃

度の乱れはさまざまな反応を引き起こすことが示唆される。しかし植物において、糖の過不足と BiP の発現との関係はこれまでに調べられていなかった。本研究において、糖飢餓はシロイヌナズナで恒常的に発現している BiP1, 2 の転写を抑えることが明らかになった。また、飢餓状態の植物細胞に糖を再び与えると、BiP1, 2 の転写が誘導された。植物には浸透圧ストレスにより BiP の転写が誘導されることが知られているが(Cascardo et al. 2000; Koiwa et al. 2003)、マンニトールよりもショ糖、グルコース、フルクトースによる BiP1, 2 の転写誘導が顕著であったため、浸透圧ストレスではなく糖が直接働きかける経路によって BiP1, 2 が誘導されていることが考えられた。BiP2-pro::GUS 植物の GUS の転写量が内在性の BiP1, 2 と同様に糖によって誘導されたことから、糖によって BiP1, 2 の mRNA の安定性が増すのではなく、糖が BiP2 (おそらく BiP1 も) のプロモーターを活性化した結果 BiP1, 2 の転写産物が増加するのだと考えられる。6x P-UPRE::GUS 植物の GUS の転写量が糖飢餓によって誘導されたこと、および 6x P-UPRE::LUC のルシフェラーゼ活性が糖飢餓によって上昇したことから、糖による BiP1, 2 の転写誘導は小胞体ストレス応答とは独立におこっていることが考えられる。さらに、糖飢餓は P-UPRE を活性化することから、植物でも動物同様に糖飢餓によって小胞体ストレスがおこっていることも考えられた。以上のことから植物における糖による BiP1, 2 の転写誘導のモデルを図 13 に示した。BiP1, 2 は糖によって転写が誘導されている。この転写誘導は小胞体ストレス応答のシス配列である P-UPRE を介さないことから、糖に応答する別のシス配列によっておこっていることが考えられる。また、糖飢餓によって P-UPRE は活性化されるが、BiP1, 2 の転写誘導には至っていない。

ジャガイモの塊茎の貯蔵タンパク質であるパタチンは糖によって顕著に誘導されるタンパク質であり、パタチンのプロモーターから糖に応答するシス配列 SURE-1 (AATAGAAAA)が同定されている (Grlerson et al., 1994)。BiP2 の ATG 上流 500bp 以内に TTTTCTAAT や TTTTCTTT といった SURE-1 に似た配列が存在する。また、ジャガイモのスクロース合成酵素のプロモーターからもスクロース誘導に必要なシス配列 SURE-2 (TACTAATA)が同定されている (Fu et al., 1995)。BiP1 の ATG 上流 1000bp 以内に SURE-2 と一致する配列が 1 つと TGTTAGTA といった SURE-2 に似た配列が 1 つあり、BiP2 の ATG 上流 500bp 以内に TATTAGTA といった SURE-2 に似た配列が 2 つ存在する。これらのシス配列を介して BiP1, 2 は糖によって転写誘導されている可能性もある。

動物において BiP が異常タンパク質の蓄積によって顕著に誘導されることが知られて以来、グルコース飢餓から小胞体ストレス応答へと BiP 誘導機構の研究は移行した。したがって、グルコース飢餓でなぜ BiP が誘導されるのかは明らかに

されていない。しかし近年、グルコース飢餓によって ATF6 の切断がおこるということが示された (Nadanaka et al., 2006)。つまり動物において、グルコース飢餓によって何らかの小胞体ストレスが実際におこっていることは明らかなようだ。植物においても糖飢餓によって小胞体ストレス応答のシス配列である P-UPRE が活性化したことは、糖飢餓で実際に小胞体ストレスがおこっていることも考えられる。

ではなぜ糖によって植物の BiP は転写誘導されるのだろうか。植物ではショ糖処理によってリボソームタンパク質や伸長因子などタンパク質の翻訳に関わる遺伝子が多数誘導される (Contento et al., 2004)。糖によってタンパク質合成がさかくなるため、BiP1, 2 を誘導することで小胞体のフォールディング能力を向上させているのかもしれない。植物では病原体の感染に対する防御応答において PR 遺伝子の発現に先立って BiP やその他のシャペロンが誘導される (Jelitto-Van Dooren et al. 1999; Wang et al. 2005)。また、動物においてリンパ球の B 細胞が抗体産生細胞に分化するとき、小胞体ストレス非依存的に *Xbp1* mRNA の量が増える (van Anken et al., 2003)。BiP1, 2 が糖によって小胞体ストレス応答とは独立に転写誘導されることは、タンパク質合成量の増加に備えて細胞がシャペロンを誘導させ、対応する策の一例ではないだろうか。

植物における BiP の発現様式が次第に明らかになる一方、BiP の誘導機構に関する情報にはまだ不明な点が多い。BiP の誘導機構は小胞体ストレス応答の分子機構の研究を中心に進められてきていることから、シロイヌナズナにおいても小胞体ストレス応答の分子機構について検討することにした。IRE1 は酵母と動物に共通する小胞体ストレス応答の主要調節因子である。そしてシロイヌナズナにおいても 2 個の IRE1 (*Ire1-1*、*Ire1-2*) が単離されている。まず、この 2 個の IRE1 について BiP の誘導との関わりを調べるため、IRE1-1 および IRE1-2 の変異体である *ire1-1* と *ire1-2* を入手し解析した。酵母において IRE1 を欠損した変異体は小胞体ストレス存在下で生存できない。また、ヒトの細胞も長期的な小胞体ストレスに晒されているとき、IRE1 の活性がなくなることで細胞は死に至る (Lin et al., 2007)。しかし、*ire1-1* と *ire1-2* はツニカマイシン存在下で野生型と同様の成長を示した。したがって植物の IRE1 は小胞体ストレス応答において、酵母や動物ほど主要な働きをしていないようだ。また、ツニカマイシン処理において、いずれの変異体においても、BiP の転写誘導を顕著に抑える現象は見られなかった。植物の 2 個の IRE1 は重複した働きをしており、単独の破壊株では表現型が見られないのかもしれない。したがって、BiP の誘導には他の小胞体ストレス感知および情報伝達を担う因子が独立に存在することが考えられた。

では植物の BiP を主要に制御する因子とは一体何だろう。動物において、IRE1 が Xbp1 mRNA のスプライシングによって転写因子 XBP1 の合成を促進し、BiP の転写を誘導する経路に加え、転写因子 ATF6 が関わる経路は XBP1 よりも BiP の誘導に強い影響を及ぼす。ATF6 は通常小胞体膜上に局在しており、小胞体ストレスの感知から下流遺伝子の転写誘導までを担う小胞体ストレス応答の主要調節因子である。植物にも ATF6 に代わる因子があるのだろうか。酵母および動物で小胞体ストレス応答のシス配列に結合する転写因子である HAC1、XBP1、ATF6 はたがいには相同性はないものの、いずれも bZIP 型転写因子であるという共通点がある。また、動物には ATF6 同様に膜内切断で制御された複数の bZIP 型転写因子が小胞体ストレス応答に関わっている。さらに、植物の小胞体ストレス応答に関わる bZIP60 も bZIP 型転写因子であった。しかし bZIP60 は、その破壊株において BiP3 の転写誘導が抑えられたが、BiP1, 2 は野生型同様に誘導されることから、別の因子が BiP1, 2 の誘導に関わっていることが考えられた。

そこで、bZIP 型転写因子であり、膜内切断による制御を考慮して膜貫通ドメインを持つものに注目した。シロイヌナズナには 75 個の bZIP 型転写因子があり、そのうち膜貫通ドメインを持つものは bZIP17、bZIP28、bZIP49 であると予想された (Jakoby et al., 2002)。このうち bZIP49 は cDNA が単離できなかったので発現していないものと判断し、bZIP17 および bZIP28 について調べると、いずれも BiP1 および BiP3 のプロモーターを活性化した。しかし、全長と切断型を比較したところ、bZIP17 においては変化がなかったが、bZIP28 においては切断型で顕著なプロモーター活性を示した。したがって、bZIP28 は BiP を転写誘導する因子であり、膜内切断の制御により切断型になることで転写因子として活性化することが示唆された。bZIP17 や bZIP28 の全長でもわずかに活性を示す理由は不明だが、動物細胞内で ATF6 や CREBH (RIP の制御により小胞体ストレス応答に関わる bZIP 型転写因子の 1 つ) においても切断型で顕著に誘導活性を示す一方、全長でもわずかに ERSE や UPRE を活性化する (Zhang et al., 2006)。全長に比べ切断型で顕著に bZIP28 が BiP を誘導することに加え、本研究の遂行中に bZIP17 が塩ストレス応答に関わる転写因子であることが他のグループにより報告された (Liu et al., 2007a)。彼らの実験系において、塩ストレスで明らかな BiP1, 2, 3 の転写誘導はおこらなかったことから、bZIP17 は BiP の誘導には関係ないだろうと考察している。bZIP17 の BiP 転写誘導への関わりを完全には否定できないものの、解析のされていない新規の因子であることから bZIP28 についてのみ以降の研究をおこなうこととした。P-UPRE および ERSE を欠失した BiP1 および BiP3 プロモーターには、切断型 bZIP28 による活性誘導が BiP1 では顕著に減少し、BiP3 では完全に抑えら

れていた。また、P-UPRE および ERSE への直接の関与を調べたところ切断型 bZIP28 はそれぞれのシス配列を活性化したので、bZIP28 は P-UPRE および ERSE を介して BiP1, 2 および BiP3 を転写誘導していることが示唆された。

bZIP28 が ATF6 と同様な機構で BiP の転写を誘導しているとしたら、bZIP28 は通常小胞体膜に存在し、小胞体ストレス条件下でゴルジ体に移行し、ゴルジ体膜状のプロテアーゼによって切断され、核へ移行することが予想された。切断型の bZIP28 が核に局在したことはこの予想を支持する結果であり、切断は bZIP28 の核移行に必要であり転写活性を制御する要因であることがさらに裏付けられた。全長の bZIP28 を発現する細胞において、小胞体ストレス非存在下の GFP 蛍光は大部分が小胞体マーカーの RFP 蛍光と局在が一致したことから、通常 bZIP28 は小胞体に局在していることが示唆された。bZIP28 を発現させた細胞では、小胞体ストレスの有無にかかわらず、GFP 像において粒状の構造がしばしば観察された。最近、Kimata らは酵母において、IRE1 が小胞体ストレス依存的にクラスターを形成することを明らかにした (2007)。これは小胞体ストレス存在下で IRE1 が多量体化する段階であり、下流にシグナルを伝える過程が必要であることが示されている。また、膜内切断により制御される小胞体ストレス応答に関わる転写因子 CREB4 は小胞体ストレス依存的にゴルジ体と思われる点状の構造に局在した (Stirling et al., 2006)。しかし、bZIP28 に連結した GFP はストレス非存在下でも粒状の構造を形成しており、シグナルを伝える過程の動きではないように思われた。さらに、蛍光の分布を調べると、粒状 GFP の部分には RFP 蛍光も分布していたことから、小胞体上で bZIP28 が凝集していることが考えられた (データは示さない)。過剰発現という人為的な要因により bZIP28 が凝集している可能性もある。小胞体リテンションシグナルである HDEL を持つタンパク質は、ゴルジ体において HDEL 受容体によって小胞体へ逆輸送されるが、HDEL を持つタンパク質が過剰にあると HDEL 受容体が飽和し、液胞や分泌の経路に漏れ出ることがある (Pimpl et al., 2006)。液胞において RFP 蛍光が見られることから、過剰発現の影響であることが考えられる。

全長 bZIP28 を発現させ観察する実験は、当初一過的発現によっておこなっていた。しかし、遺伝子の導入は確認できるものの、蛍光が弱い、明確な結果が得られないなどの問題があった。そこで SP-GFP-HDEL と GFP-bZIP28 を同時に発現する形質転換培養細胞を作製することによって問題の克服を試みた。その結果、SP-GFP-HDEL・GFP-bZIP28 形質転換細胞では RFP および GFP の強いシグナルを検出することが可能になった。また、形質転換細胞において、非ストレス下では GFP 蛍光は核では見られず、小胞体ストレス処理存在下では核において GFP 蛍光が観察されるという再現性のある結果が得られた。したがって、小胞体ストレス

依存的に bZIP28 は切断され、核に移行することが示唆された。膜内切断により制御される小胞体ストレス応答に関わる転写因子の局在が、小胞体ストレス依存的に核へと変化する画像はこれまでもいくつか報告されている(Kondo et al., 2005; Kondo et al., 2007; Liang et al., 2006; Nadanaka et al., 2004; Raggo et al., 2002; Shen et al., 2002; Zhang et al., 2006;). しかしこれらは、タグあるいはそれ自身の抗体による免疫染色をおこなうため、同一の細胞での局在変化は観察されていなかった。本研究では小胞体および bZIP28 を蛍光タンパク質で同時に標識することにより、生きた細胞で bZIP28 の細胞内局在変化を追跡することに初めて成功した。その結果、bZIP28 の核移行はツニカマイシン処理後およそ 30 分という早い応答を示すことが明らかとなった。BiP1, 2 および BiP3 がツニカマイシン処理後 2 時間から転写誘導されることから、bZIP28 がそれ以前に局在変化を示すことは BiP1, 2 および BiP3 の誘導に関わっているという考え方に反しない結果となっている。

一過的発現によるレポーター解析や GFP 融合タンパク質の観察によって bZIP28 が小胞体ストレス依存的に切断され、転写活性を示すことが示唆されたが、内在性の bZIP28 が切断されることを確かめるために、抗 bZIP28 抗体を作成した。この抗体によってウエスタンブロットをおこなうと、ツニカマイシン処理特異的に 50kDa 弱のバンドが検出されたことから、このバンドは bZIP28 の切断型を検出していることが考えられた。ATF6 は切断型である 50kDa のタンパク質が小胞体ストレス処理時間にしたがって検出されるのにもなって、ストレス非存在下でも検出される 90kDa の全長 ATF6 の量が減少する。しかし、bZIP28 においては、小胞体ストレス存在下でタンパク質の量が減る全長と考えられるバンドは検出できなかった。その理由として考えられるのは、75kDa 弱の位置に非常に強く非特異的なバンドが検出されているため、それに隠れて全長 bZIP28 が検出できないという可能性がある。切断型と思われる 50kDa のタンパク質は、ツニカマイシン処理後 1 時間ですでに検出された。このことから、内在性の bZIP28 タンパク質もツニカマイシン処理後の早い段階で切断されていることが考えられた。

内在性の bZIP28 が実際に BiP の転写誘導に関わっているかを調べるために、bZIP28 破壊株を入手し解析した。bzip28 においてツニカマイシン処理 0、1、2、5 時間において RNA を抽出し、リアルタイム PCR をおこなったところ、BiP1, 2 および BiP3 の転写誘導は 2 時間目において野生型に比べ低く抑えられていた。しかし、5 時間目では野生型と違いは見られなかった。したがって、bZIP28 は BiP1, 2 および BiP3 の転写誘導において 2 時間といった早い段階で関わっていることが示唆された。また、bZIP60 破壊株において BiP3 の誘導はほぼ抑えられるが、BiP1, 2 は野生型同様に転写誘導される。bZIP28 は BiP1, 2 の転写誘導に関わる新規の因子であることが明らかになった。最近、bZIP28 が小胞体ストレス応答に関わる新

規の転写因子であるという報告がなされた (Liu et al., 2007b)。彼らも bZIP28 が小胞体ストレス依存的に切断され、核へ移行し下流の BiP を含むシャペロンを転写誘導していることを主張しており、本研究と互いに支持する結果となっている。

ATF6 のように膜貫通型タンパク質の膜貫通ドメインがプロテアーゼによって切断され、膜から遊離することで下流にシグナルを伝える制御は **Regulated intramembrane proteolysis; RIP** とよばれている。RIP の制御を受ける膜貫通型の転写因子は、細胞外あるいは小胞体内腔ドメインに情報が伝わると、ルーメン側の膜貫通ドメイン付近で第一の切断を受ける。つづいて脂質二重膜の中で RIP プロテアーゼによって第二の切断を受け、細胞質ドメインは膜から離れる。これまでに多くの転写因子の RIP プロテアーゼが見つかってきており、その分子機構や生理機能も次第に明らかになってきている。最初に RIP での制御をうける因子として見つかったのは、脂質代謝に関わる転写因子 **SREBP** である (Sakai et al., 1996)。SREBP は 2 つの膜貫通ドメインを持ち、両端が細胞質側に向くヘアピン構造をしており、細胞内のコレステロールが低くなると、ゴルジ体へ輸送される。ゴルジ体へと移行した SREBP はゴルジ体膜に存在する S1P によってルーメン側を切断されたのち (Sakai et al., 1998)、S2P によって膜内切断される (Zelenski et al., 1999)。遊離した N 末端部分は転写因子として核へ移行し、脂質代謝遺伝子を誘導する。小胞体ストレス応答に関わる転写因子として ATF6 が同定された当初、小胞体ストレス依存的に ATF6 がタンパク質レベルの切断を受けることが明らかになり、そのことと下流遺伝子の誘導に関係があることが示唆されていた (Yoshida et al., 1998)。その後、ATF6 は SREBP 同様 S1P および S2P によって制御されることがわかり、共通の S1P 認識配列である RxxL が見出された (Ye et al., 2000)。OASIS は膜貫通ドメインを有する bZIP 型転写因子という ATF6 との構造の共通点から注目され、小胞体ストレス応答との関わりが調べられた最初の因子である (Kondo et al., 2005)。神経系を構成する細胞では、細胞種によって小胞体ストレスに対する感受性が異なるが、そのうちアストロサイトと呼ばれる細胞は神経細胞と異なり、小胞体ストレスに対して強い抵抗性を示す。アストロサイトで特異的に発現することが知られていた OASIS について調べると、OASIS は小胞体ストレス依存的にタンパク切断を受け、核へ移行し、BiP プロモーターを活性化することが明らかになった。OASIS は C 末側の膜貫通ドメインに近接した位置に RxxL の配列を持つため、S1P によって切断されることが予想される。肝臓特異的に発現する CREB/ATF ファミリーの転写因子 CREB-H はタンパク切断を受けることで転写因子の機能を得ることが示唆されていたが、そのメカニズムおよび生理機能などについてはわかっていなかった (Omori et al., 2001; Chin et al., 2005)。その後の研究

により、CREB-H は S1P および S2P 依存的に小胞体ストレスで切断され、核へ移行し、小胞体ストレス応答のシス配列を活性化することが明らかになった (Zhang et al., 2006)。Luman は単純ヘルペスウイルスの転写因子が必要とする宿主側因子である。Luman が小胞体から核へ移行することがウイルスの活性化に影響していることが知られており、膜貫通ドメインの近くに RxxL および RxL の配列があることから、S1P による RIP の制御が注目されその関わりが示された (Raggo et al., 2002)。後に Luman は小胞体関連分解の因子である Herp を ERSE を介して誘導することが明らかにされた (Liang et al., 2006)。

最近、植物においても RIP による活性制御が予想されている転写因子の存在がいくつか報告された。AtbZIP60 はその最初の例である。2 つ目の例としては、NAC with transmembrane motif1 (NTM1)がある (Kim et al., 2006)。NTM1 は植物の成長と発達に異常のある変異体 *ntm1-D* の原因遺伝子として単離、同定された。NTM1 は N 末端に転写因子の NAC ドメインを持ち、C 末端に膜貫通ドメインを持っている。*ntm1-D* は NTM1 の膜貫通ドメインより N 末端側で翻訳が終了する、いわゆる ΔC が発現する変異であった。*ntm1-D* ではいくつかの cyclin-dependent kinases inhibitor の発現が上昇していたことから、NTM1 ΔC は細胞分裂をネガティブに制御していることが示唆された (Kim et al., 2006)。NTM1 の他にも膜貫通ドメインを持つ NAC タンパク質が、RIP によって下流遺伝子の転写を調節していることが明らかになっている (Kim et al., 2007a)。NTL8 (NTM1-like)は NTL8 ΔC を過剰発現させると、FT などの開花関連遺伝子の発現が抑えられ、開花が遅れるという表現型が見られた。NTL8 は塩ストレスにより発現が上昇するが、*ntl8* 変異体では塩ストレスによる FT の発現低下が弱まったことから、NTL8 は塩ストレスによって FT の発現を抑制することで、開花の遅れに関与していることが示唆された (Kim et al., 2007a; Kim et al., 2007b)。最近植物では、S1P ホモログの変異体において、塩ストレスに弱くなることを見出された (Liu et al., 2007a)。このことから、RIP により制御される転写因子が塩ストレスによって切断され、抵抗性遺伝子の発現を誘導していることが予想された。その標的遺伝子として、膜貫通ドメインを持ち N 末側に bZIP ドメインをもつ転写因子が注目された。そのうち *atbzip17* 変異体は *s1p* 変異体同様に塩ストレスに弱くなることから、AtbZIP17 が S1P の標的遺伝子であることが考えられた。また、AtbZIP17 は C 末端側に RxxL の S1P 認識配列を持ち、*in vitro* および *in vivo* で S1P によって切断されることがわかった。AtbZIP17 の細胞内局在を見ると、普段は小胞体に存在し、塩ストレスによって核へ移行した。これらのことは、塩ストレスによって、AtbZIP17 が S1P 依存的に切断され、塩ストレス耐性遺伝子の転写を誘導していることを示唆している (Liu et al., 2007a)。植物において転写因子に加え、RIP プロテアーゼの存在も示唆されている。RIP は

原核生物から哺乳動物に至るまで広く保存された機構であり、RIP プロテアーゼも広く分布している。RIP プロテアーゼを4つのファミリーに分類すると、(1) Presenilins、(2) Signal peptide peptidase (SPP)ファミリー、(3) S2P ファミリー、(4) Rhomboid ファミリーに分けられる(Weihofen and Martoglio, 2003)。シロイヌナズナにはそれぞれのファミリーのホモログが存在する。また、ショウジョウバエの Rhomboid に似ている8つの遺伝子のうち、最も似ている2つを解析したところ、Rhomboid-like 2 (AtRBL2)はショウジョウバエ Rhomboid (Rho1)の基質である、Spitz と Keren を動物細胞中で切断したことから、植物にも RIP protease 活性があることが示唆された(Kanaoka et al., 2005)。したがって、RIP で制御される転写因子およびRIPプロテアーゼの存在が示唆されることから、植物においてもRIPの機構が備わっていることが考えられる。

bZIP28にも膜貫通ドメインの近くに RxL の配列が存在することから、S1P および S2P による RIP の制御が考えられた。しかし、S1P および S2P の遺伝子破壊株を調べたところ、BiP1, 2 および BiP3 の転写誘導は野生型同様におこったことから、S1P および S2P は植物において BiP の誘導には関わっていないことが示唆された。また、これらの変異体では bZIP28 もツニカマイシン処理によって切断される。このことから、S1P および S2P は小胞体ストレス存在下での bZIP28 の切断を担う酵素ではないことが示された。先にも述べたように、シロイヌナズナには RIP protease のホモログがいくつか存在する。bZIP28 を小胞体ストレス依存的に切断する酵素を見つけることは、シロイヌナズナにおける小胞体ストレス応答の分子機構および BiP の誘導機構を理解する上で重要であるだけでなく、いまだ乏しいシロイヌナズナにおける RIP に関する情報としても重要な知見となるだろう。

以上のことから、BiP の転写誘導における bZIP28 の挙動をモデルで表した。bZIP28 は bZIP60 が小胞体ストレスによって転写誘導されるのに対し、bZIP28 は通常から小胞体ストレス下においてほとんど変わらない発現量を示している。このため、bZIP28 は早い応答を、bZIP60 はシグナルを増幅させる働きをそれぞれ担っているのではないだろうか。また、実際、bZIP28 の切断型と思われるタンパク質は1時間以内という早い段階で検出されている。bZIP60 はツニカマイシン処理後2時間目から切断型のタンパク質が検出されることから(未発表データ)、それぞれが働く時間によって役割が異なっていることが考えられた。また、bZIP60 破壊株において BiP1, 2 が野生型同様に誘導されるため、BiP1, 2 を主要に制御する因子はこれまで知られていなかった。bZIP28 破壊株においてツニカマイシン処理後2時間で BiP1, 2 の誘導が減少したことから、bZIP28 は BiP1, 2 の誘導に主要に関わる因子の一つであることが考えられた。さらに、bZIP28 と bZIP60 は同じ

シス配列に作用する bZIP 型転写因子である。bZIP 型転写因子はホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成して機能することが知られている (Deppmann et al., 2006)。bZIP 型転写因子のダイマー形成について予測するプログラムによると、シロイヌナズナの bZIP 型転写因子のうち bZIP17, 28, 49, 60 で構成されるグループは互いにダイマーを形成しやすいとされている (Deppmann et al., 2004)。bZIP28 と bZIP60 がヘテロダイマーを形成して P-UPRE や ERSE に協調して作用していることも考えられる。

図

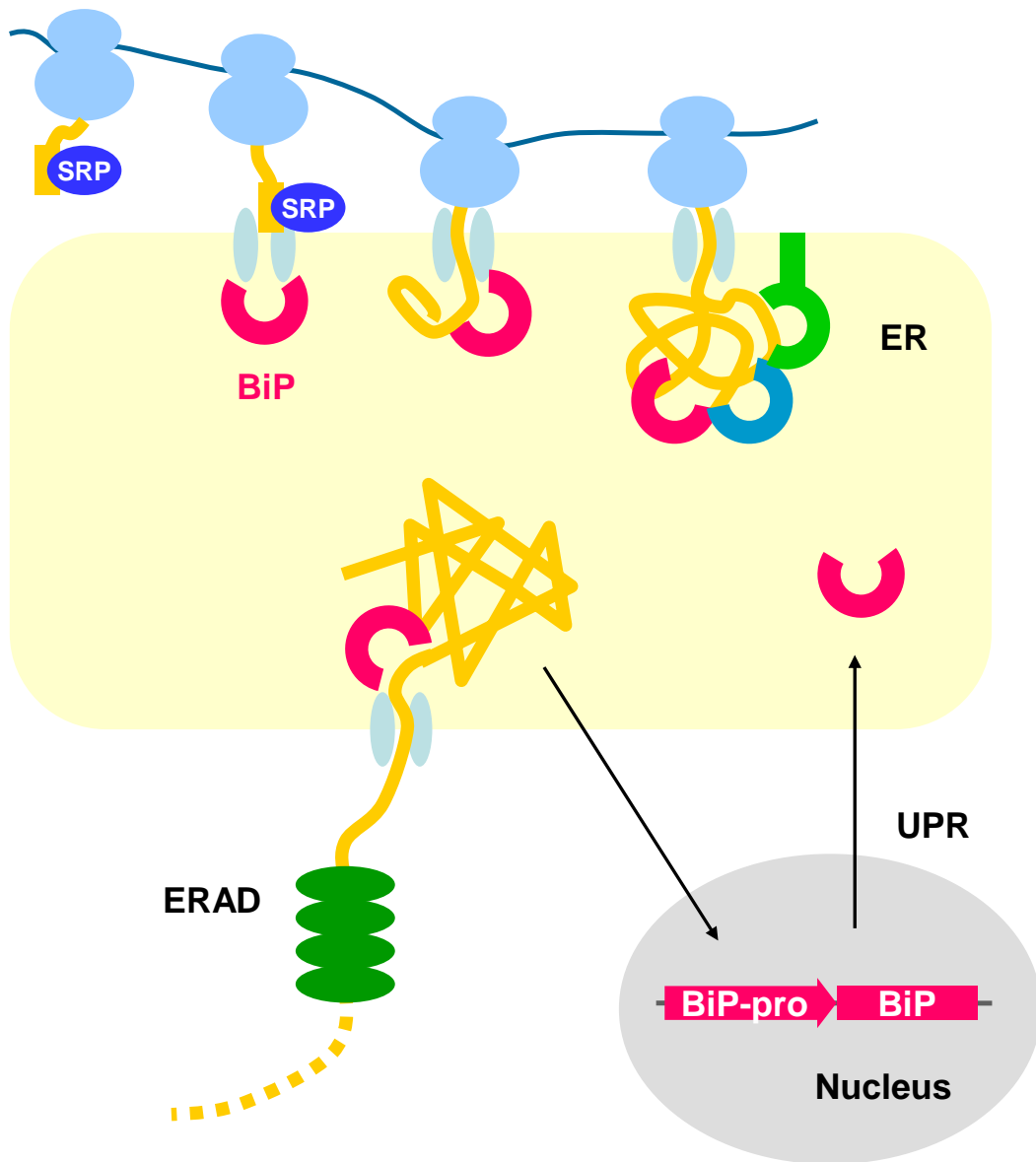
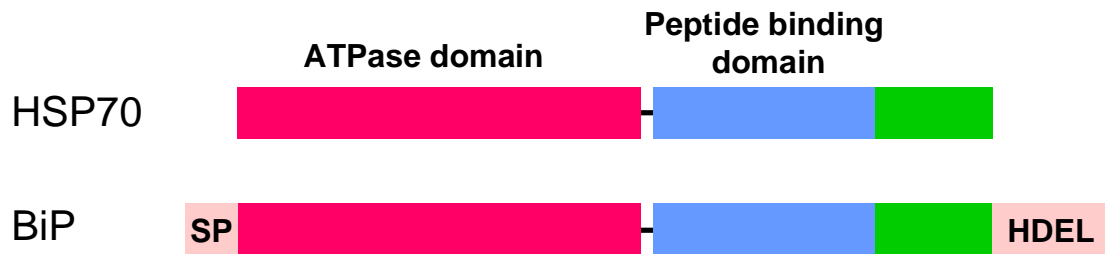


図1 小胞体タンパク質の品質管理

小胞体で合成されるタンパク質はリボソームで合成された疎水性領域がsignal recognition particle; SRPによって認識され、トランスロコンへと運ばれる。翻訳されると同時に小胞体内に移入したタンパク質は、トランスロコン付近のシャペロン複合体によって折りたたみが完了するまで保護される。折りたたみに失敗したタンパク質は細胞質へ逆輸送され、分解される (ER-associated degradation; ERAD)。また、異常タンパク質が小胞体に蓄積したという情報は核に伝わり、BiPなどの発現を誘導する (Unfolded protein response; UPR)。

A



B

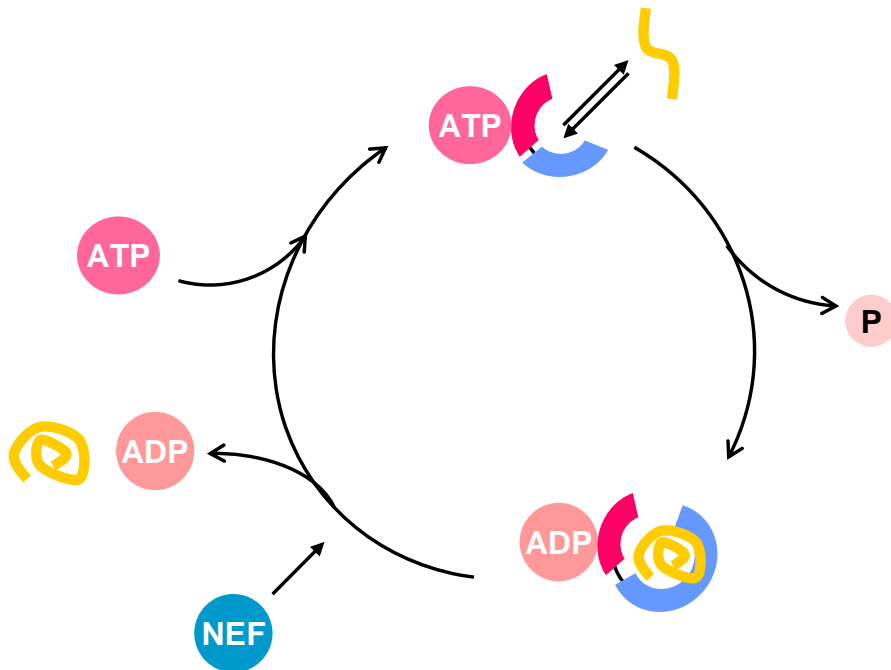


図2 HSP70の構造とATPaseサイクル

(A) 細胞質型HSP70とBiPの構造。両者ともN末端側にATPaseドメイン、C末端側に基質結合ドメインを持っている。BiPはN末に小胞体移行シグナルと、C末端に小胞体リテンションシグナルであるHDELを持っている。(B) ATPaseサイクル。ATPを結合したHSP70は基質と低親和性であり、結合と解離がしやすい。ATPを加水分解すると基質と高親和性になり、ヌクレオチド交換因子 (NEF) によってADPを解離されると同時に基質を解離する。再びATPを結合すると基質を結合できるようになる。



図3 シロイヌナズナの3個のBiPのアミノ酸配列

BiP1およびBiP3のペプチド抗体作製に用いた配列は太字および下線で表した。黄色で囲んだ部分はATPaseドメイン、青色で囲んだ部分は基質結合ドメイン、緑で囲んだ部分はHSP70C末端サブドメインと予測された。矢印はシグナルペプチドの切断されると予想される位置を示している。

```

BiP1-pro 1 TCGGATTCGATTTTTTTG-GATAGAAAAATTTAGGATCCAATAAAAATAATTTCTCAGCTT
BiP2-pro 1 TT-----ATATATTTCG-AATA-AAATATTTAG-ATACGATCAGGT-----TCGGATT
BiP3-pro 1 TA-----ATTCATTATAAACAAAAGAAATTATCCTTATGTAAATTATGACGCAAATCT

BiP1-pro 60 TTAAAATTTAGATTTTGTATCCAATTTTTTCGGAT-GGTTTGGGA-----TTATTTCGGGT--TA
BiP2-pro 45 C-GTATTCCGATTTCAAATCCAATTTTTTCGGGTCAGTTCTGAGTTCGGTTACTCAGGT--TC
BiP3-pro 54 TTTTTATTTTATT---AATCGGTACACGAAAAAATCTTTTAAATAATTCATGCATGTGATA

BiP1-pro 112 GGTTTTTTCTTCGCAGCCCTAGTGATACTAATAGAAGAAGACTGGGCCCAACAAAAGCTCA
BiP2-pro 102 CGGTTCTTTTC-CACTCCTAATGATG-TAATAGAAGAAGACTGG-CCCAACAAAAGCTCA
BiP3-pro 111 AAAACATTGTTAATAATTTAATTTTGATTAATA-ATGATAAATGTTTTTTGGATAACTATACA

BiP1-pro 172 TTGTCTAGAACTAAGAAGAAGAACC---GAAGTAACCAACGGCCACGATTACTCCAACAC
BiP2-pro 159 TTGTCTA--ATTAAGAAGAAGAACC---GAAGTAACCAACGGCCACGATTACTCCAACAC
BiP3-pro 170 T-ACATACGAAGAAGTCGTAAAACCTTTGAAAGATTTTTCGGATGACGATT-TAATGTCAC

BiP1-pro 229 AAGACCAAATCTGATTGGTTGACATTACAAATCGTCGTAAGATAATTGGTCCACGTCATC
BiP2-pro 214 AAGACCAAATCTGATTGGTTGACATTATAGATCGTCGTAAGATAATTGGTCCACGTCATC
BiP3-pro 228 STGTCTGCTTGTGATTGGGT-ACTTTACGTGT----GTAAAAAGTAAGGAGCGCGCCAAC

BiP1-pro 289 TCTGATGACATAGTTAAATTTCTTCGTCTTCCATAAAAAGCTTCTTCTTCAA----AGCT
BiP2-pro 274 TCCGATGACATAGTTAAATTTCTTCGTCTTCCATAAAAAGCGACTACTTCACCATCACCT
BiP3-pro 283 ACAAAATAACCCATTAAGCTTACGTGTCT-----AAGAAGTGATTCGAGAGG-ACACTCT

BiP1-pro 345 TAAAAAACAA-----AAGGAAGCTCTCTCTGTGTTCAAAAC---AAGTTCATTCGA
BiP2-pro 334 TCGGGCACTGGACCTATTTAAGCATCCTAACTTCTTCTTCAAAAGCTTAAAAACCAGAAAA
BiP3-pro 336 ACCGAGGCTAAATACG---AATCATACTGAAGCACATATAAATAGACGACGAAACTTCATA

BiP1-pro 393 TCTATAGAGAC-----GAAACAAAAAGAGAGATCGTACGCAAAAGTTTCCGAT---
BiP2-pro 394 CAAAAGGAAGCTCTCTGTTCAAATCAAAAGAGAGATCGTACGCAAAAGTTTCCGAT---
BiP3-pro 393 CTCTTCCAAAT-----AAACTAACAAACGAGATCGAAG--AAGAGTTCTCAACAAC

BiP1-pro -----
BiP2-pro -----
BiP3-pro 442 GAAAA

```

図4 シロイヌナズナの3個のBiPのプロモーター配列

BiP1、BiP2、BiP3について、ATGの上流500bpを比較した。小胞体ストレス応答に関わるシス配列であるP-UPREおよびERSEはそれぞれ太字および黄緑色、太字および青色で表した。

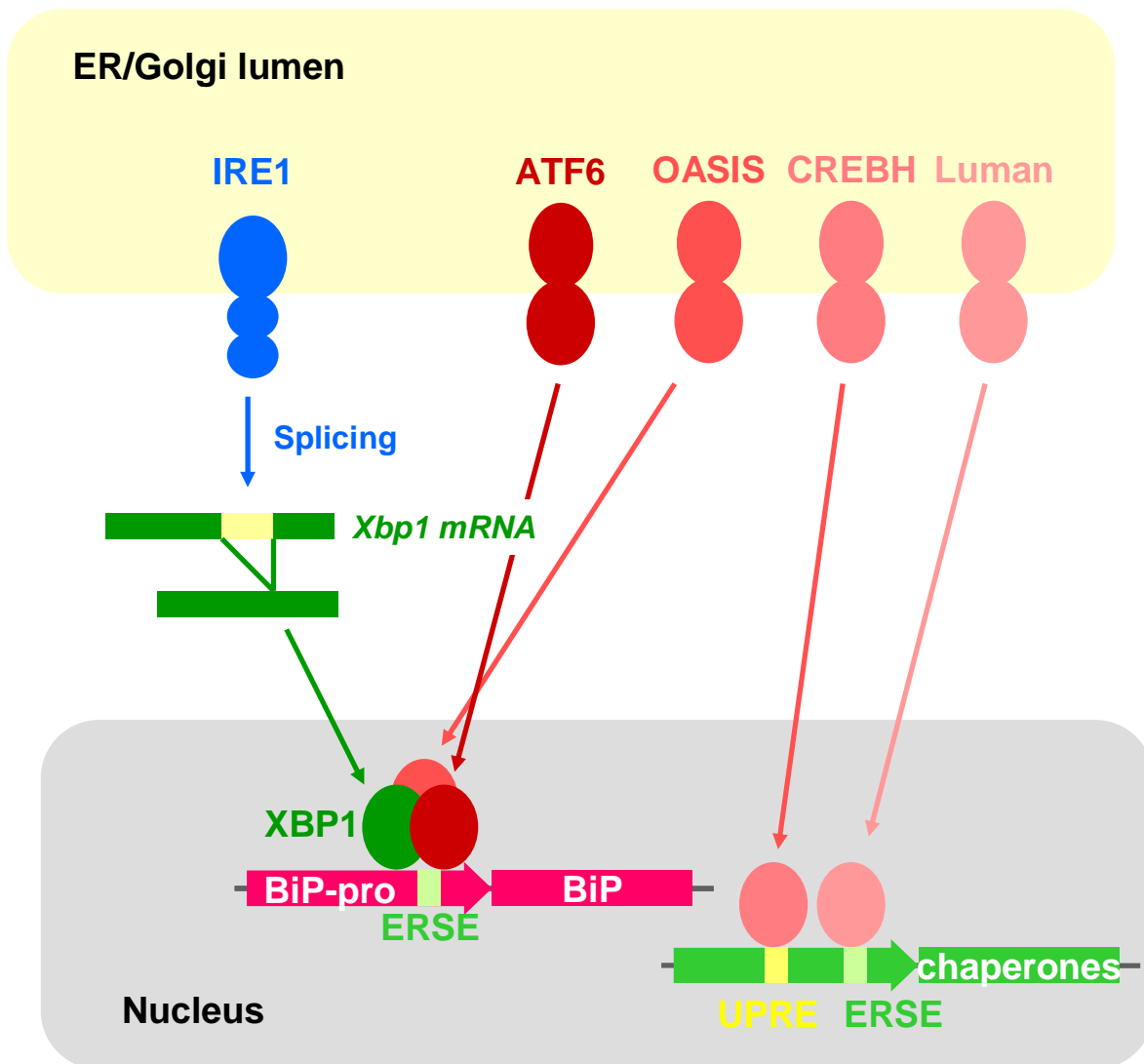


図5 動物におけるBiPの転写誘導機構

IRE1による経路とATF6による経路で主に制御されている。IRE1は転写因子XBP1をスプライシングをすることで転写誘導に関わっている。膜局在型転写因子ATF6は小胞体ストレスによって膜内切断を受け、bZIPドメインを含む細胞質ドメインが核へ移行し、BiPのプロモーターに結合する。OASIS、CREBH、LumanなどもATF6同様に膜内切断を受け、BiPやその他のシャペロンの転写に関わっている。

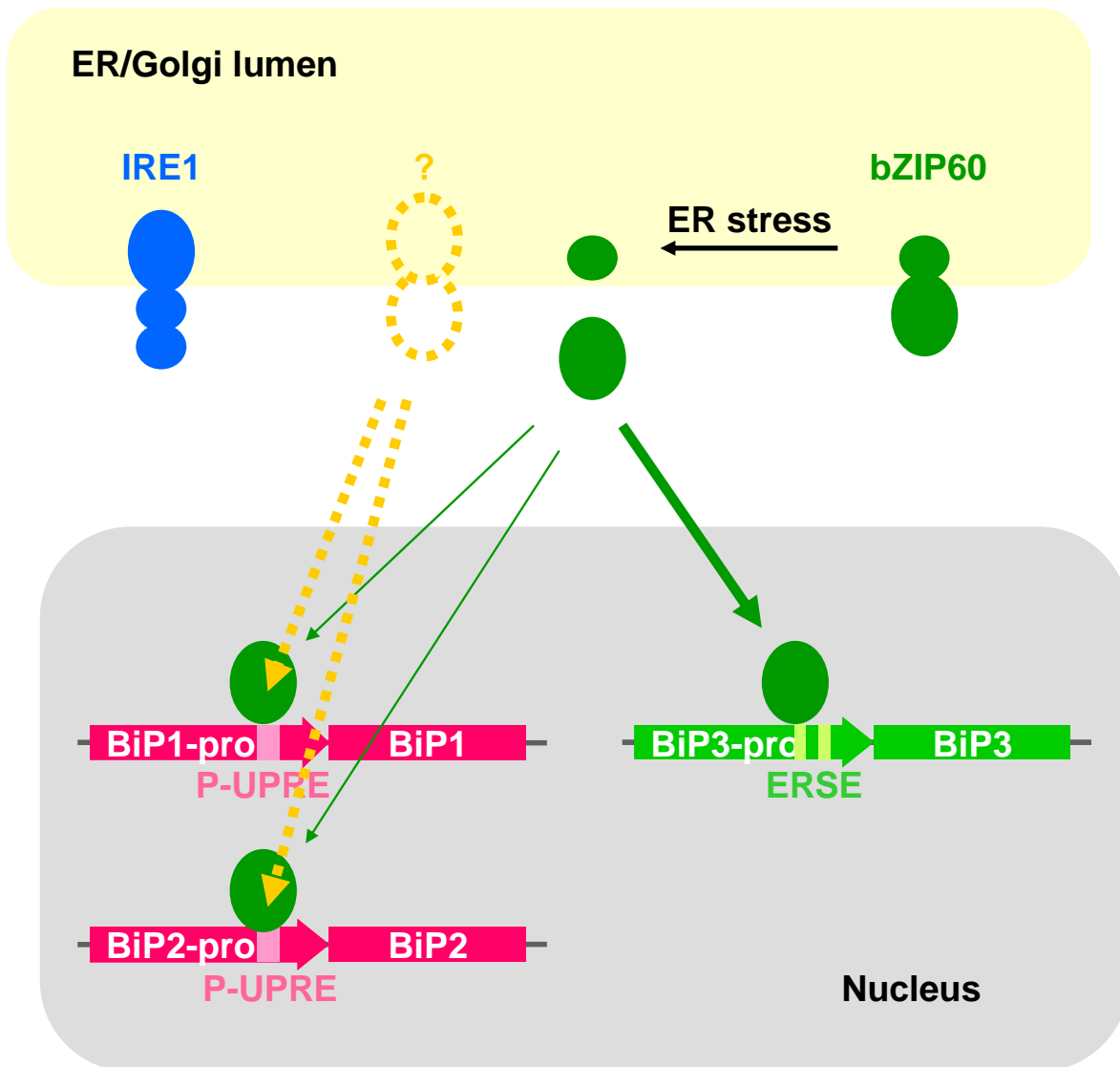
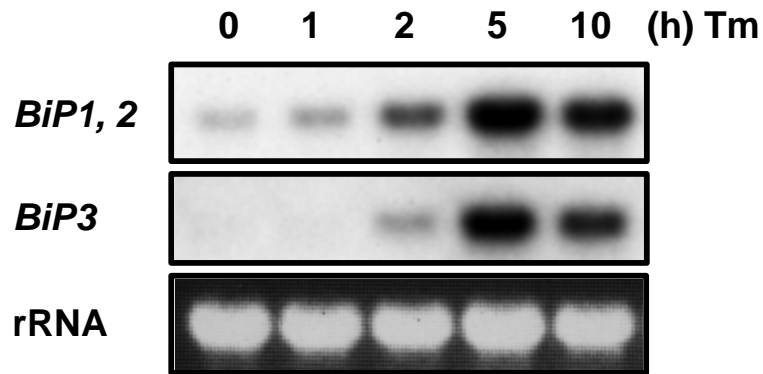
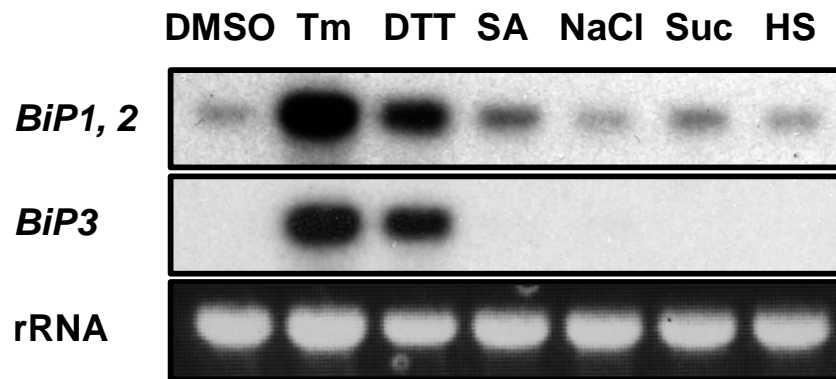
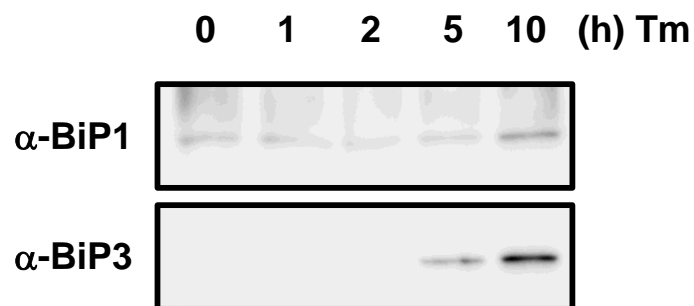


図6 植物におけるBiPの転写誘導機構

IRE1ホモログが単離されているが、BiPの転写誘導との関わりは明らかにされていない。膜局在型転写因子bZIP60は小胞体ストレスにより切断され、bZIPドメインを含む細胞質ドメインが核へ移行し、BiPのプロモーターを活性化する。しかし、bZIP60の破壊株においてBiP3の誘導は抑えられたが、BiP1, 2は野生型同様に誘導された。したがって、BiP1, 2の誘導には他の因子の存在が考えられた。

A**B****C****図7 BiP1, 2および BiP3の発現誘導**

(A) RNAプロットによる転写物の検出。播種後2週間目の芽生えを記載の時間ツニカマイシン処理し、RNAを抽出した。(B) RNAプロットによる転写物の検出。左からDMSO、5 μ g/mlツニカマイシン、2mM DTT、0.5mMサリチル酸、160mM塩化ナトリウム、90mMシヨ糖、37度熱ショックで5時間処理し、RNAを抽出した。(C) BiP1およびBiP3のペプチド抗体を用いたBiPタンパク質の検出。播種後2週間目の芽生えを記載の時間ツニカマイシン処理し、タンパク質を抽出した。Tm; ツニカマイシン。

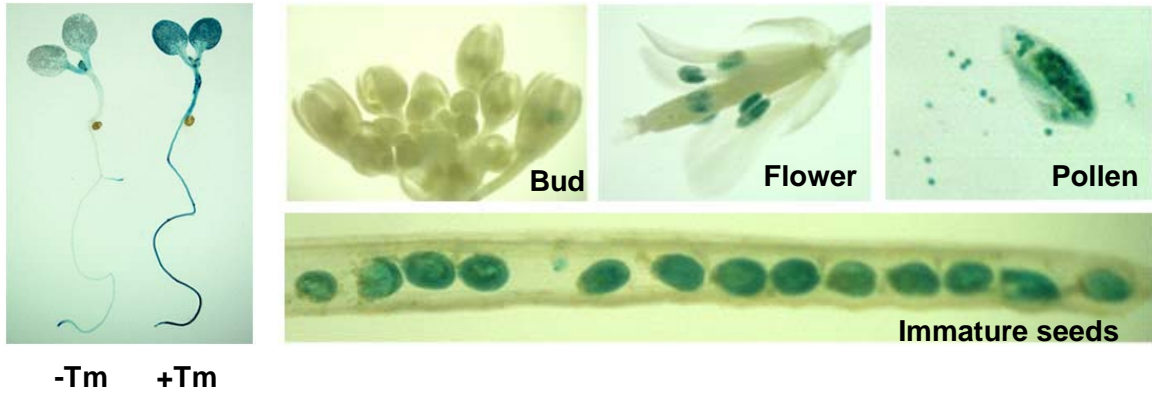


図8 GUS活性を指標にしたBiP2およびBiP3の発現解析

(A) BiP2プロモーターにGUS遺伝子を連結したコンストラクトを導入した植物 (BiP2-pro::GUS)。(B) BiP3プロモーターにGUS遺伝子を連結したコンストラクトを導入した植物 (BiP3-pro::GUS)。(A) (B) 上は実験に用いた植物体のコンストラクトの模式図。左は播種後1週間目の芽生えにおけるツニカマイシンによるGUS活性の誘導。5 μ g/mlツニカマイシンを一晩処理した。右は器官別の観察。Tm; ツニカマイシン。

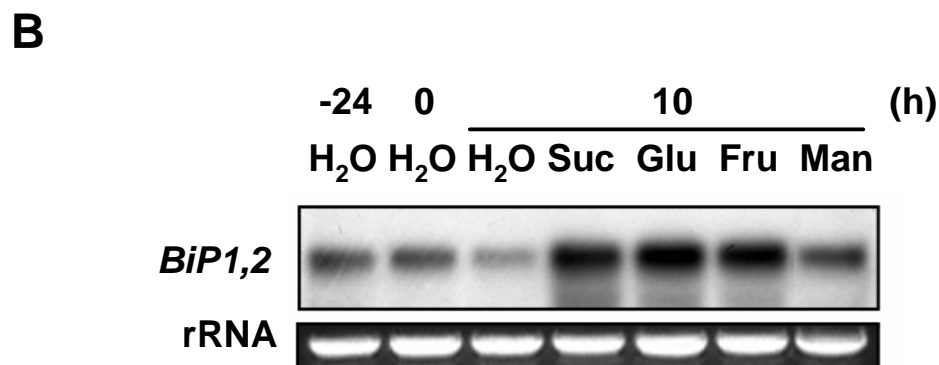
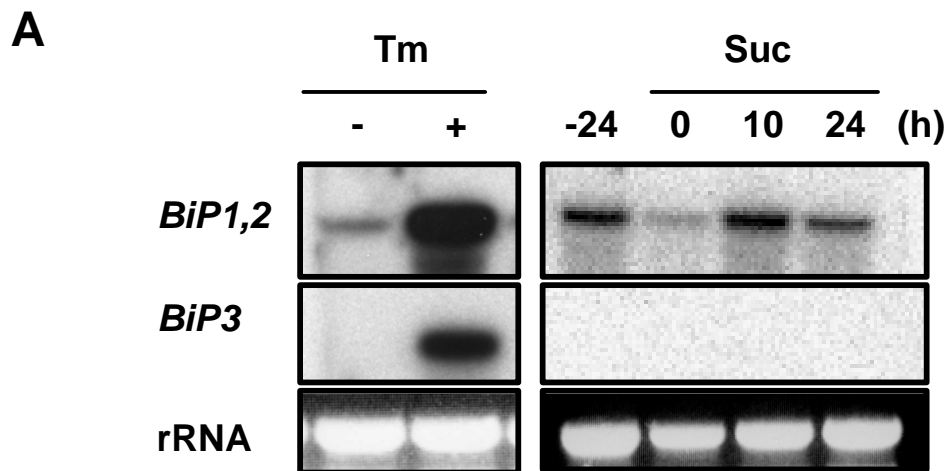


図9 糖がBiP2およびBiP3発現に及ぼす影響

(A) RNAプロットによるBiP2およびBiP3転写産物の検出。左は播種後4週間目のロゼット葉をDMSO (-) およびツニカマイシン (+) で5時間処理し、RNAを抽出した。右は播種後2週間の芽生えを飢餓処理し、記載の時間90mMのショ糖溶液で処理し、RNAを抽出した。(B) その他の糖によるBiP2発現誘導。播種後4週間目のロゼット葉を24時間飢餓処理し、90mMの糖溶液で10時間処理し、RNAを抽出した。-24は飢餓処理前、Sucはショ糖、Gluはグルコース、Fruはフルクトース、Manはマンニトール。

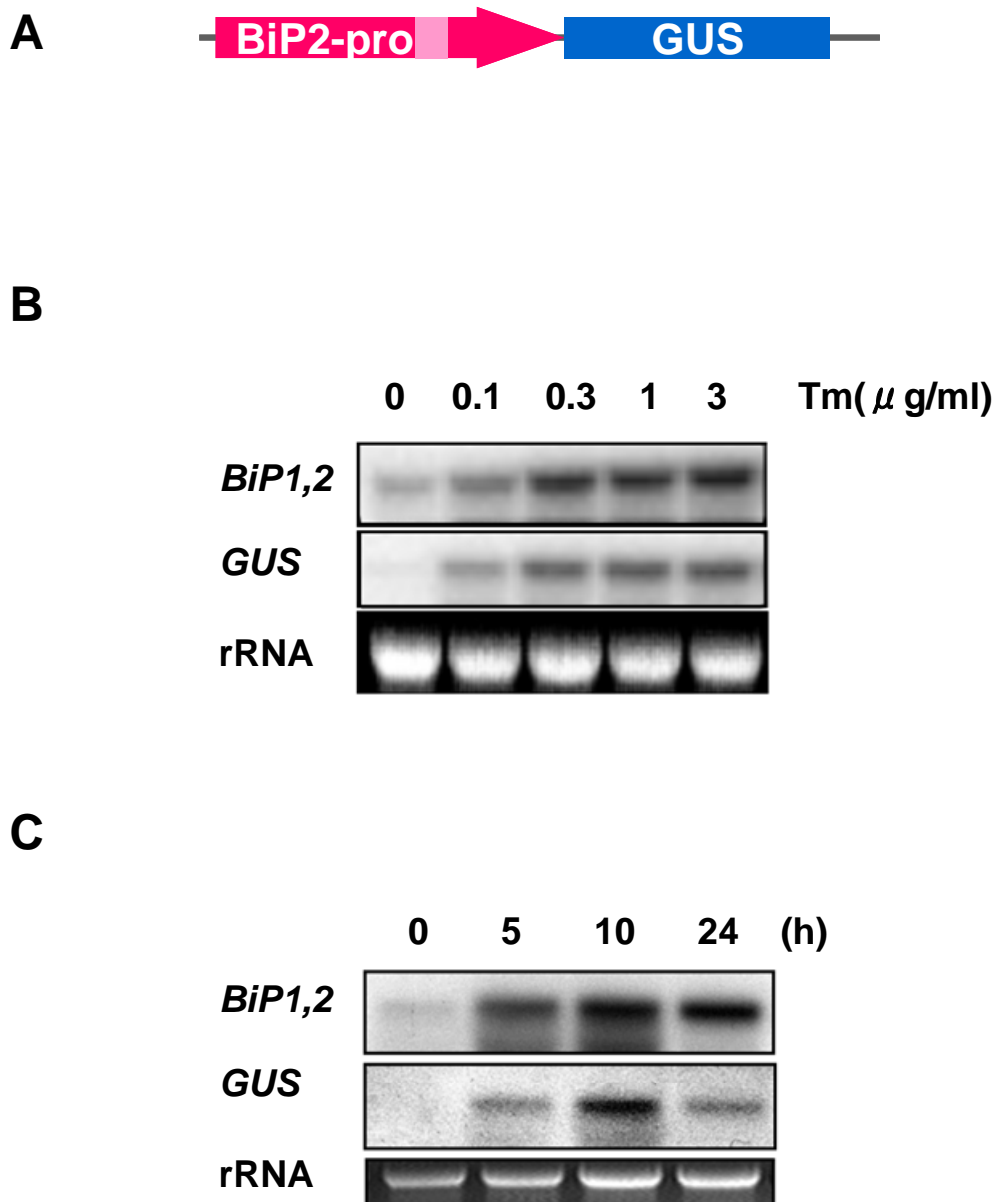


図10 BiP2-pro::GUS植物におけるBiPおよびGUSの転写産物の検出
 (A) 実験に用いた植物体のコンストラクトの模式図。(B) ツニカマイシン処理によるGUS発現の誘導。播種後2週間の芽生えをそれぞれ記載の濃度で16時間ツニカマイシン処理し、RNAを抽出した。(C) 糖処理によるGUS発現の誘導。播種後4週間目のロゼット葉を蒸留水にて24時間飢餓処理したものをそれぞれ記載の時間90mMショ糖溶液で処理し、RNAを抽出した。

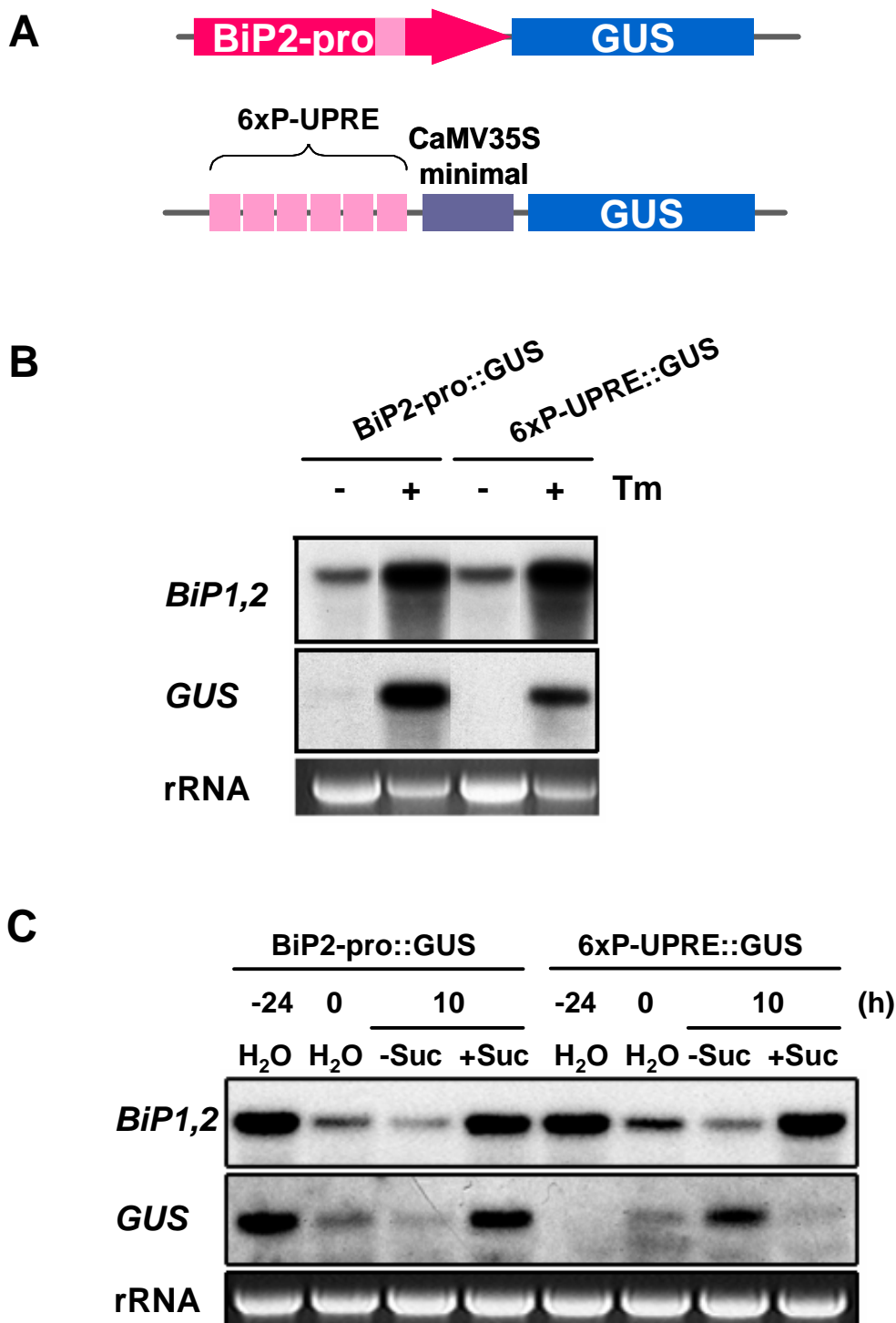


図11 6xP-UPRE::GUS植物におけるBiPおよびGUSの転写産物の検出

(A) 実験に用いた植物体のコンストラクトの模式図。(B) ツニカマイシン処理によるGUSの転写誘導。播種後4週間目のロゼット葉を5 μ g/mlツニカマイシン溶液および蒸留水によって24時間処理し、RNAを抽出した。(C) 糖飢餓および糖添加によるGUSの発現誘導。播種後2週間目の芽生えを蒸留水にて24時間飢餓処理をし、蒸留水および90mMショ糖溶液で10時間処理した。-24は飢餓処理前。

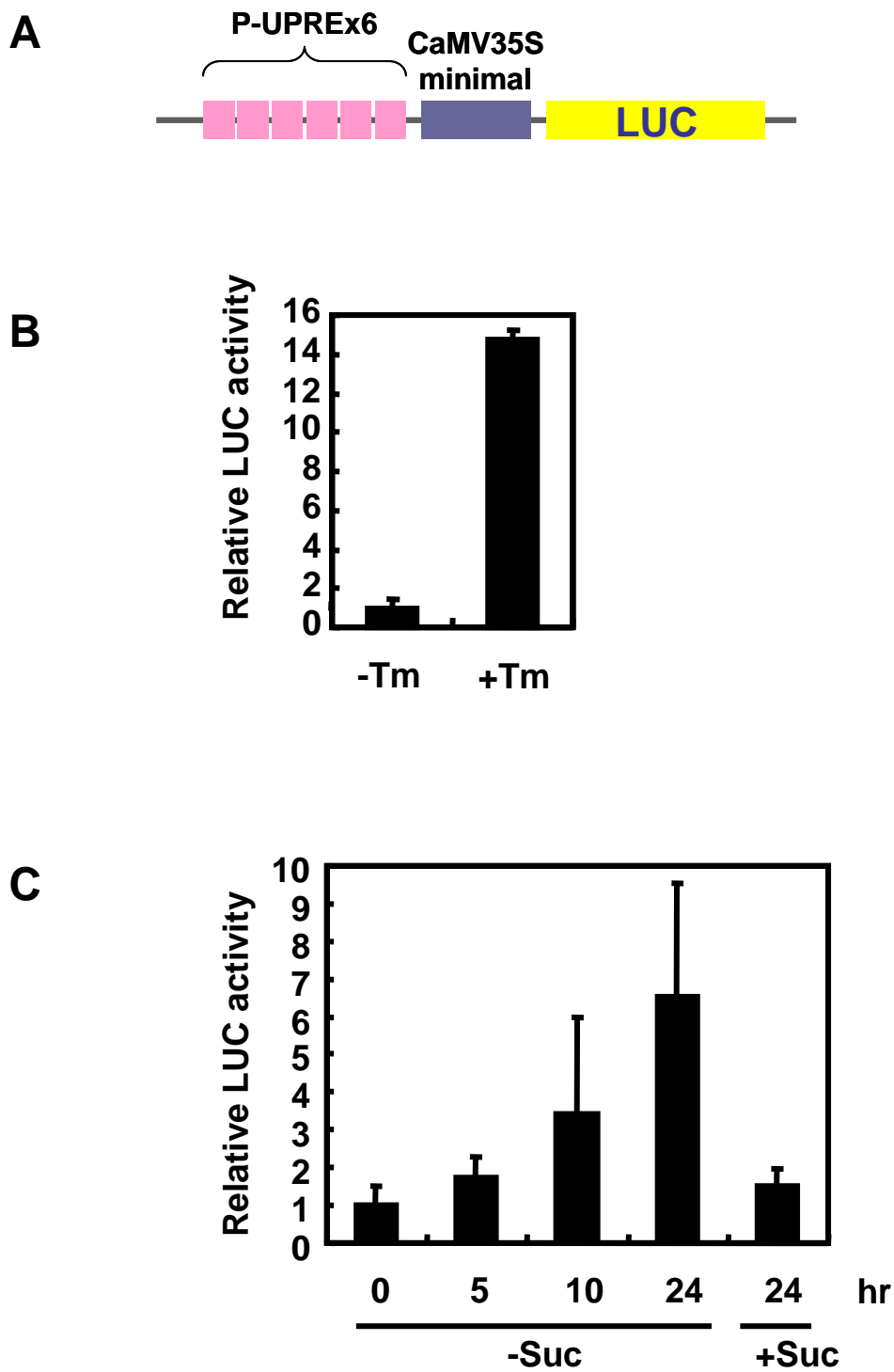


図12 6x P-UPRE::LUC植物における糖飢餓によるLUC活性

(A) 実験に用いた植物のコンストラクトの模式図。(B) ツニカマイシンによるルシフェラーゼの発現誘導。播種後2週間目の芽生えをツニカマイシン有無の蒸留水によって24時間処理した。(C) 糖飢餓によるルシフェラーゼの発現誘導。芽生えを記載の時間、蒸留水によって糖飢餓処理および90mMショ糖溶液で処理した。

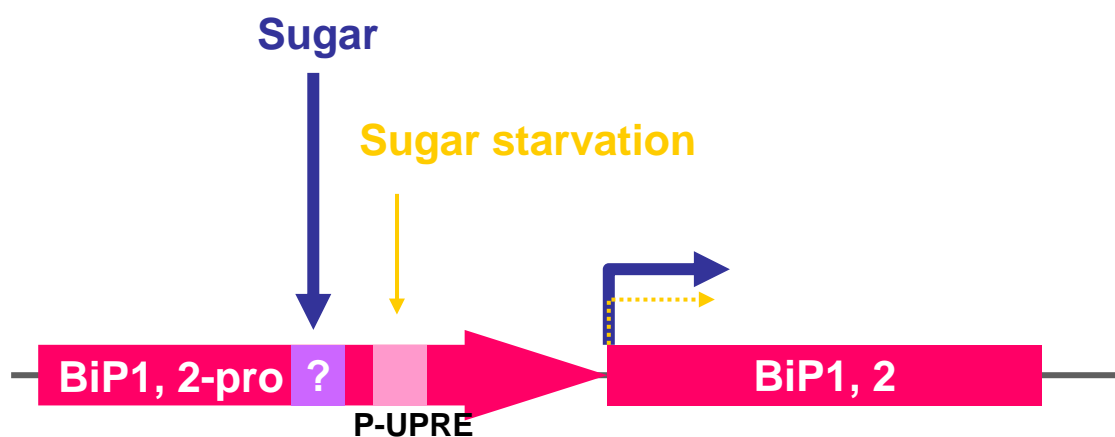


図13 糖によるBiP1, 2誘導のモデル

本研究においてシロイヌナズナのBiP1, 2は糖飢餓ではなく糖によって誘導されることが明らかとなった。通常、糖がある状態でBiP1, 2は発現しており、糖が不足するとBiP1, 2は発現しなくなる。一方で、糖飢餓はP-UPREを活性化していた。したがって、糖によるBiP1, 2の転写誘導は小胞体ストレス応答とは独立におこっていることが示唆された。

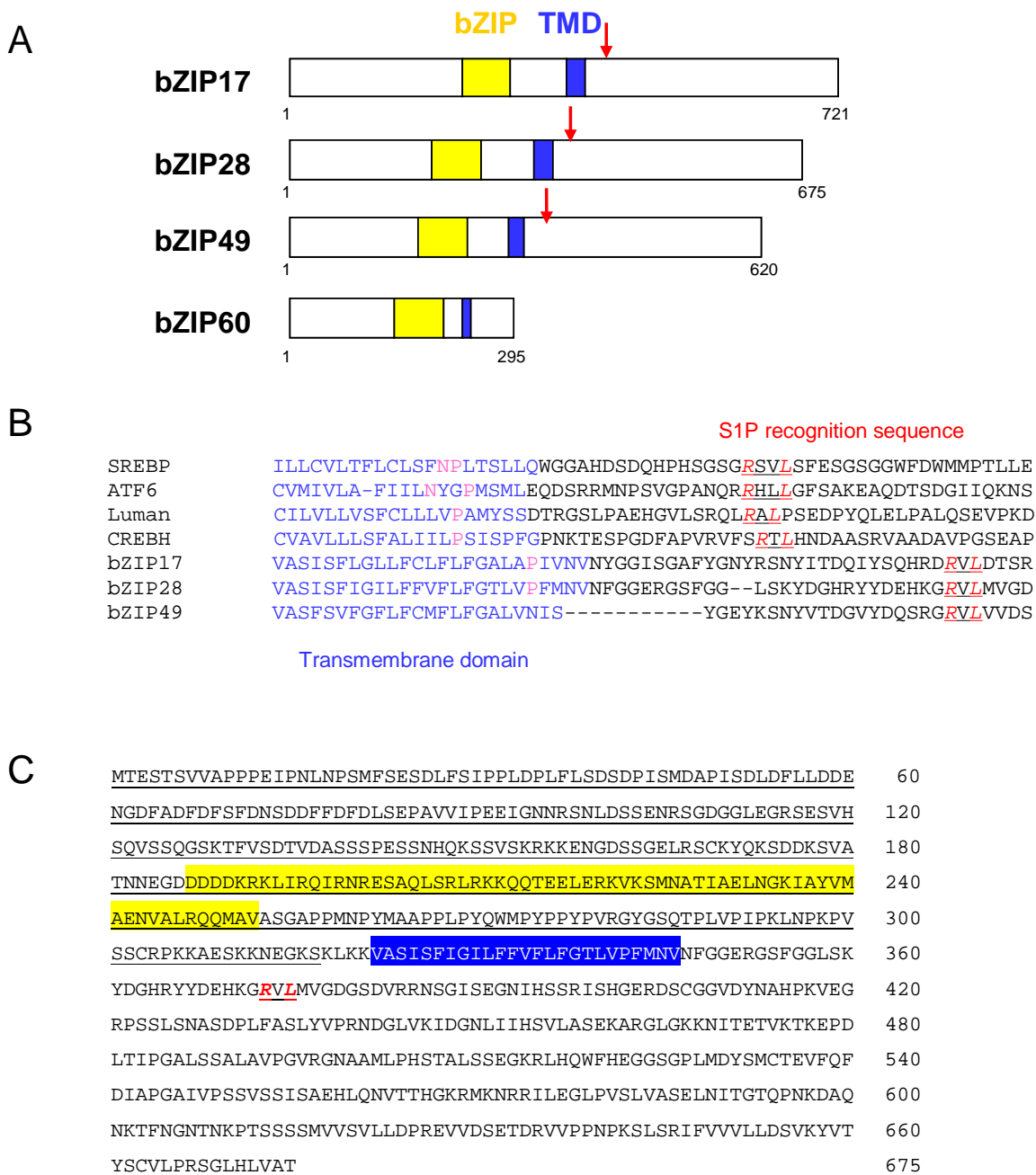
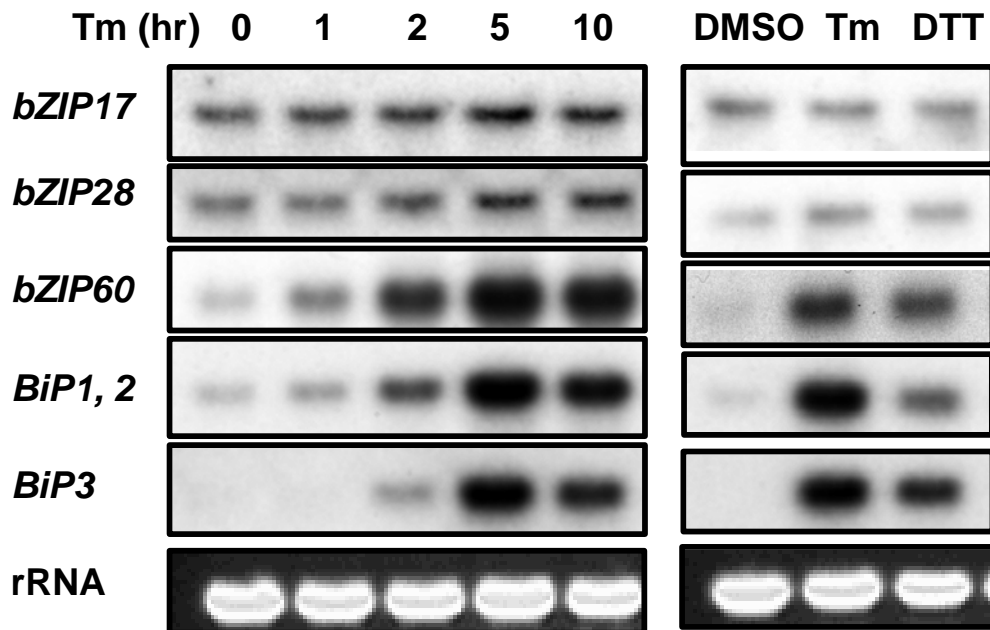


図14 シロイヌナズナの膜貫通型bZIP型転写因子

(A) bZIP17、bZIP28、bZIP49、bZIP60の模式図。TMD;膜貫通ドメイン (B) 膜貫通ドメイン付近のアミノ酸配列。SREBPおよびATF6においてS2Pの切断に必要なアスパラギンおよびプロリンはピンク字で表した。他の転写因子の膜貫通領域にもプロリンが存在する。(C) 全長AtbZIP28のアミノ酸配列。bZIPドメインは黄色、膜貫通ドメインは青色、S1P認識部位に保存されたアミノ酸配列であるRxxLおよびR**x**Lは赤色で表した。下線部分はbZIP28ΔC。

A



B

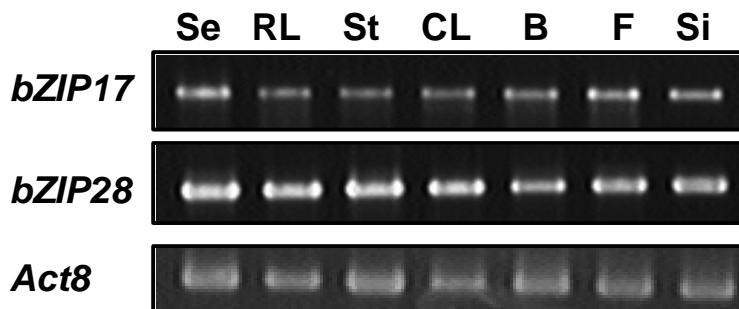


図15 bZIP17、bZIP28転写産物の検出

(A) RNAブロットによる転写物の検出。左は播種後2週間目の芽生えを記載の時間ツニカマイシン処理し、RNAを抽出した。右は播種後2週間目の芽生えをDMSO、ツニカマイシン、DTTで10時間処理し、RNAを抽出した。(B) RT-PCRによる転写物の検出。Seは芽生え、RLはロゼット葉、Stは茎、CLは茎生葉、Bはつぼみ、Fは花、Siは長角果。

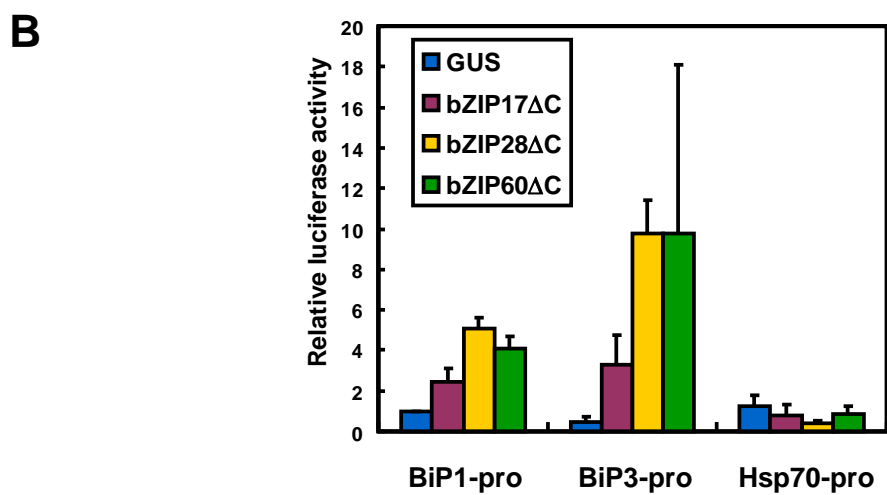
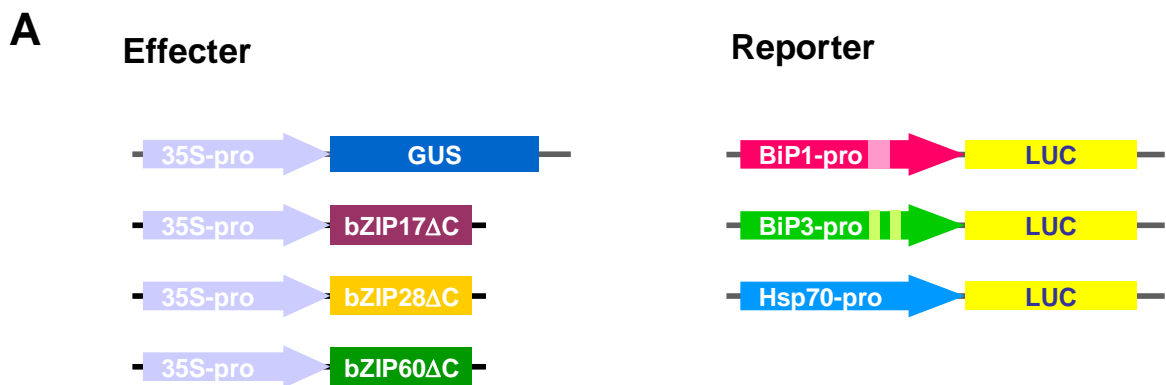
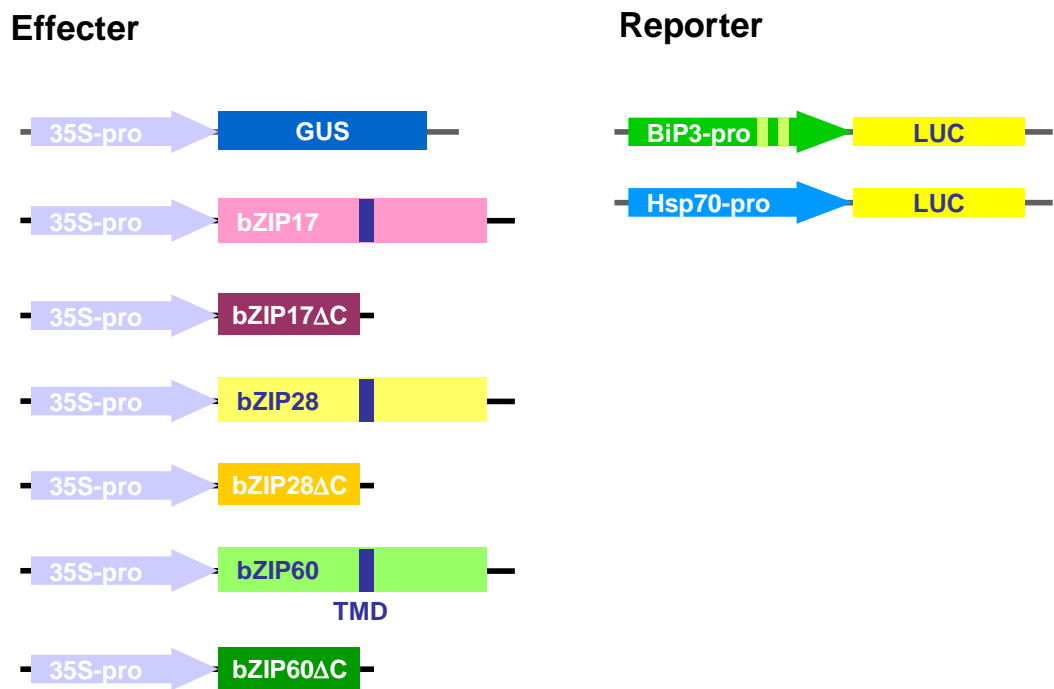


図16 BiPプロモーターに対するbZIP型転写因子の効果

(A) 実験に用いたコンストラクトの模式図。(B) ルシフェラーゼ活性はGUSをエフェクター、BiP1-pro::LUCをレポーターとしたときの値に対する相対値で表した。

A



B

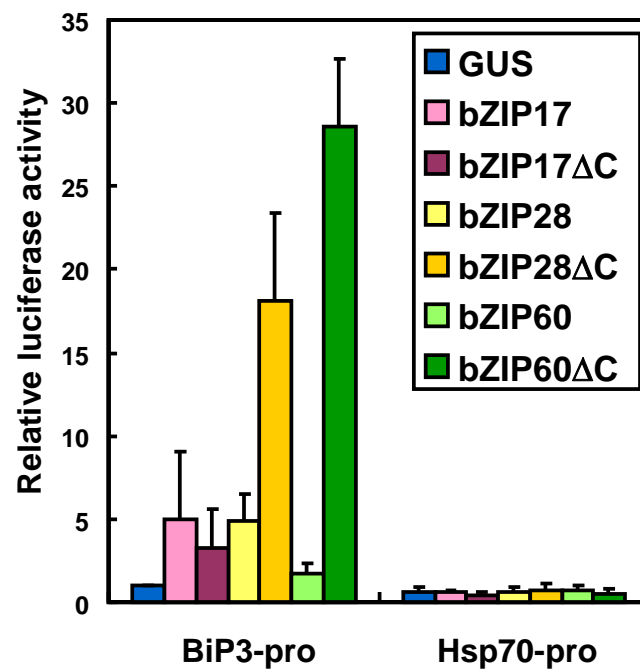


図17 全長と切断型のbZIP型転写因子のBiP3プロモーターに対する効果

(A) 実験で用いたコンストラクトの模式図。(B) ルシフェラーゼ活性はGUSをエフェクター、BiP3-pro::LUCをレポーターとしたときの値に対する相対値で表した。

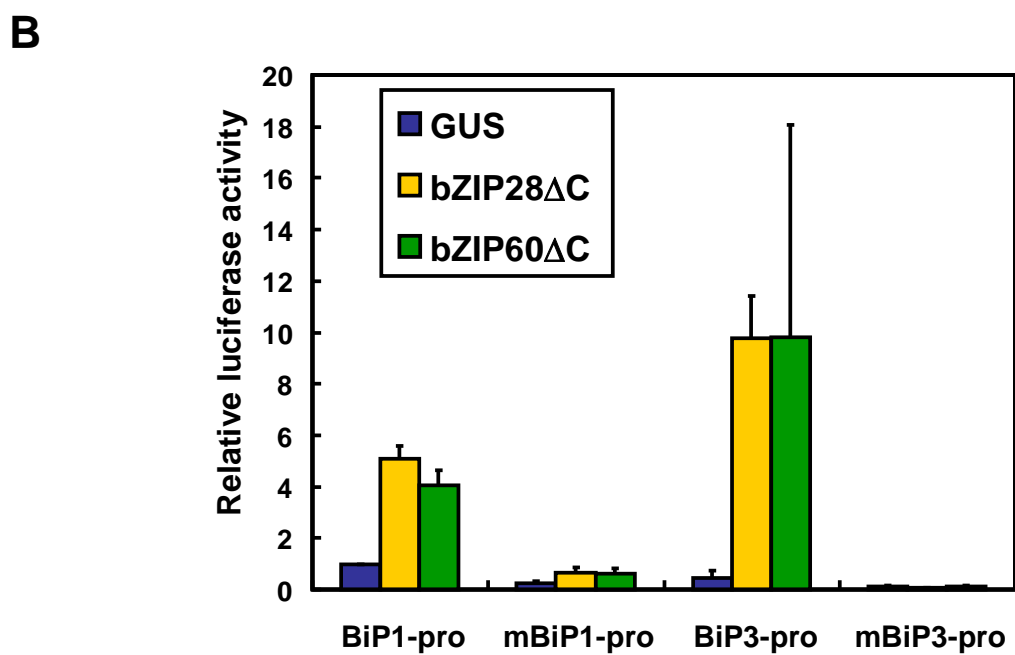
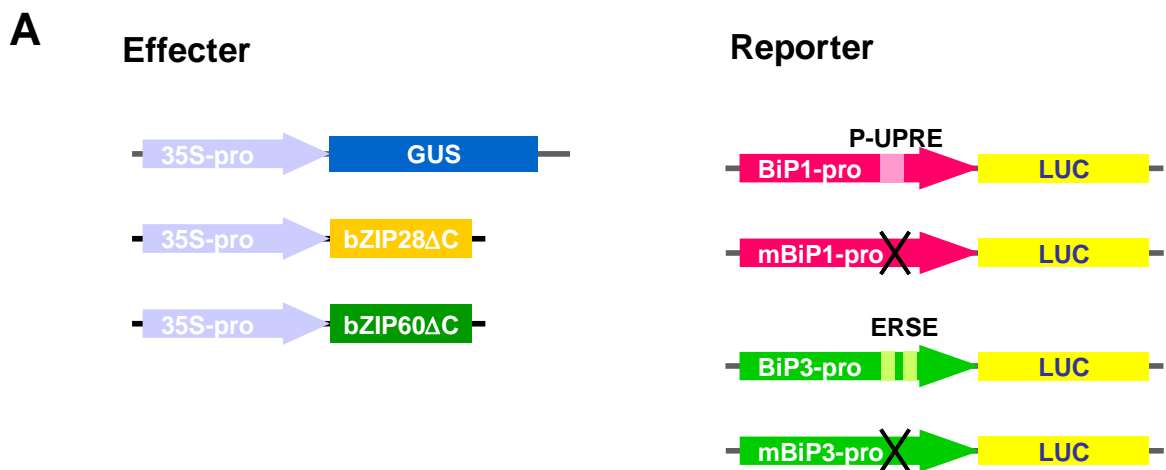


図18 BiPプロモーターへの変異の導入がプロモーター活性に及ぼす影響

(A) 実験に用いたコンストラクトの模式図。BiP1およびBiP3プロモーターに存在するシス配列P-UPREおよびERSEに変異を導入した。(B) ルシフェラーゼ活性はGUSをエフェクター、BiP1-pro::LUCをレポーターとしたときの値に対する相対値で表した。

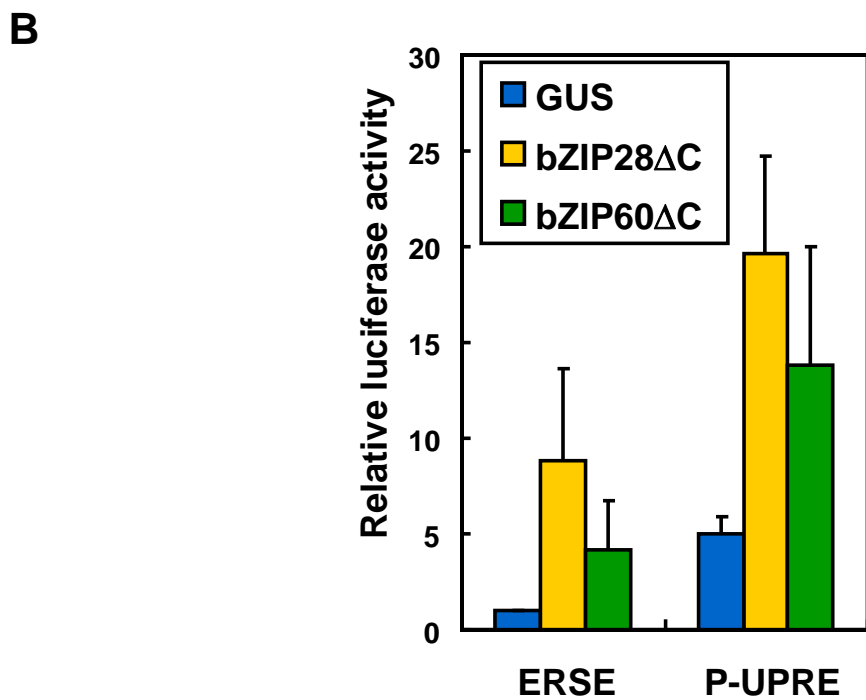
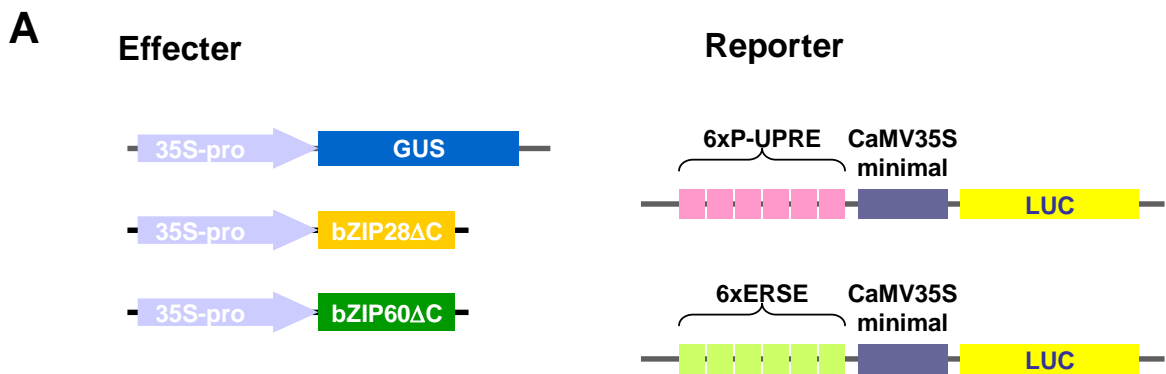


図19 bZIP28のP-UPREおよびERSEに対する効果

(A) 実験に用いたコンストラクトの模式図。P-UPREおよびERSEを6個つなげたものは、最小プロモーターとルシフェラーゼに連結した。(B) ルシフェラーゼ活性はGUSをエフェクター、6xERSE::LUCをレポーターとしたときの値に対する相対値で表した。

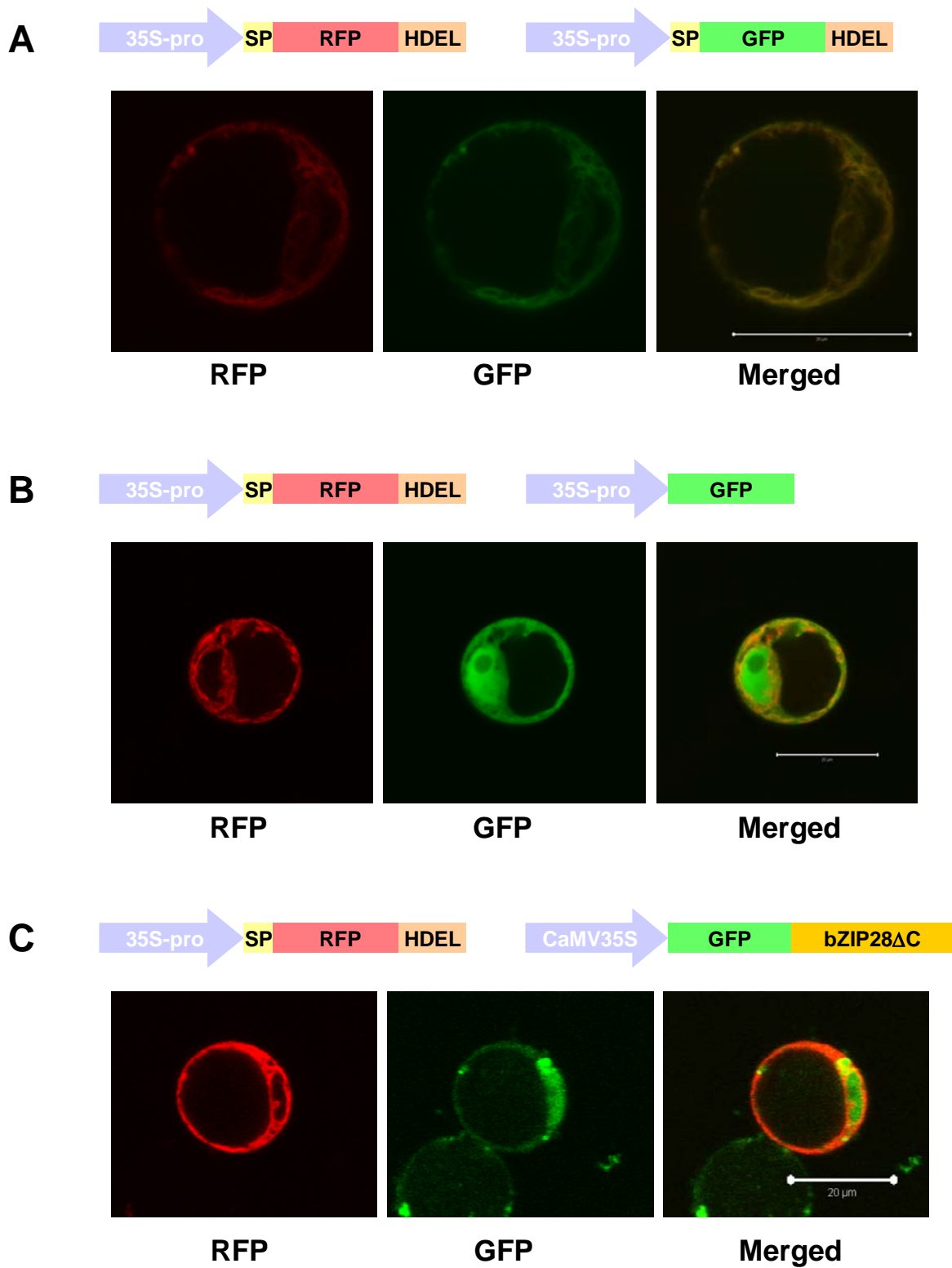


図20 一過的発現によるbZIP28ΔCの局在解析

(A) SP-RFP-HDELおよびSP-GFP-HDELを一過的に共発現。(B) SP-RFP-HDELおよびGFP単独を一過的に共発現。(C) SP-RFP-HDELおよびGFP-bZIP28ΔCを一過的に共発現。(A) から (C) は共焦点顕微鏡により観察した。Barは20μm。

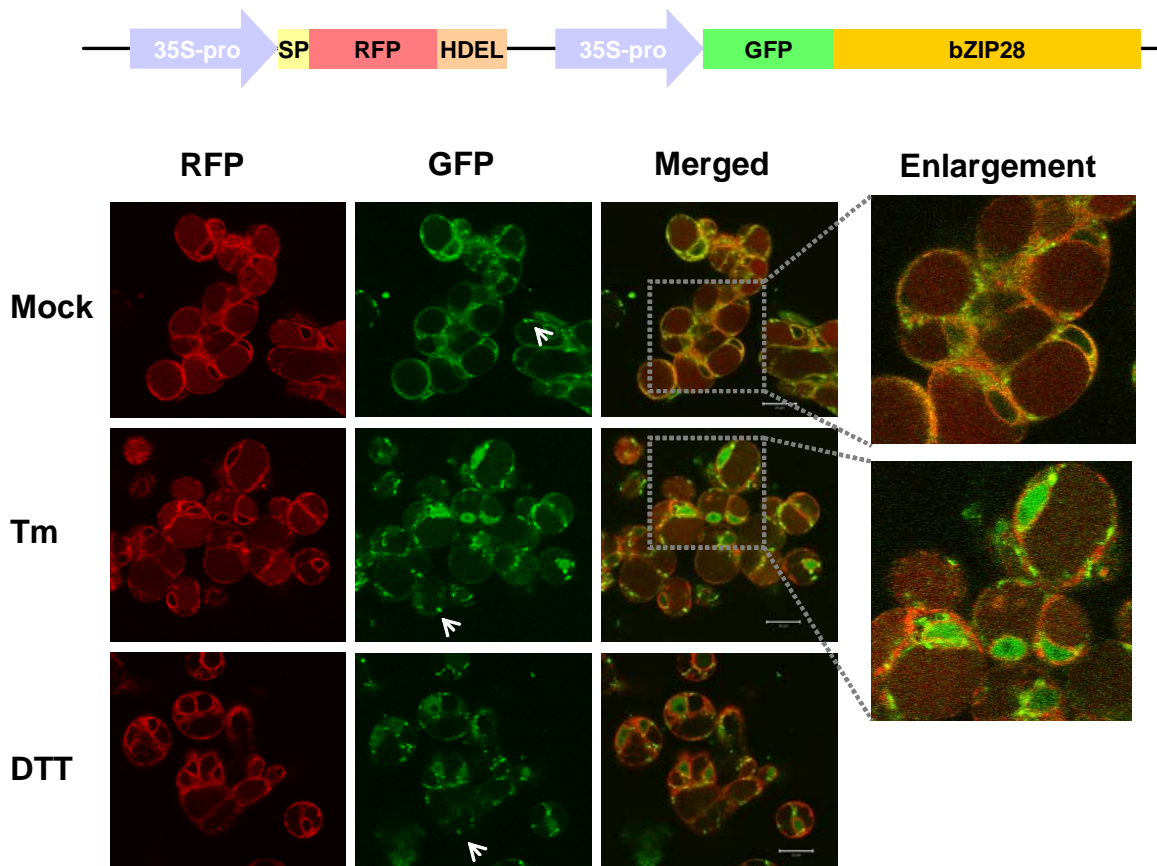


図21 GFP-bZIP28形質転換細胞における全長bZIP28の局在解析
 DMSO (Mock)、ツニカマイシン (Tm)、DTTを7時間処理した細胞を共焦点顕微鏡により観察した。右はDMSOおよびツニカマイシン処理細胞のMerge像の一部を拡大した。矢印はGFPの粒状構造を示している。Barは20 μ m。

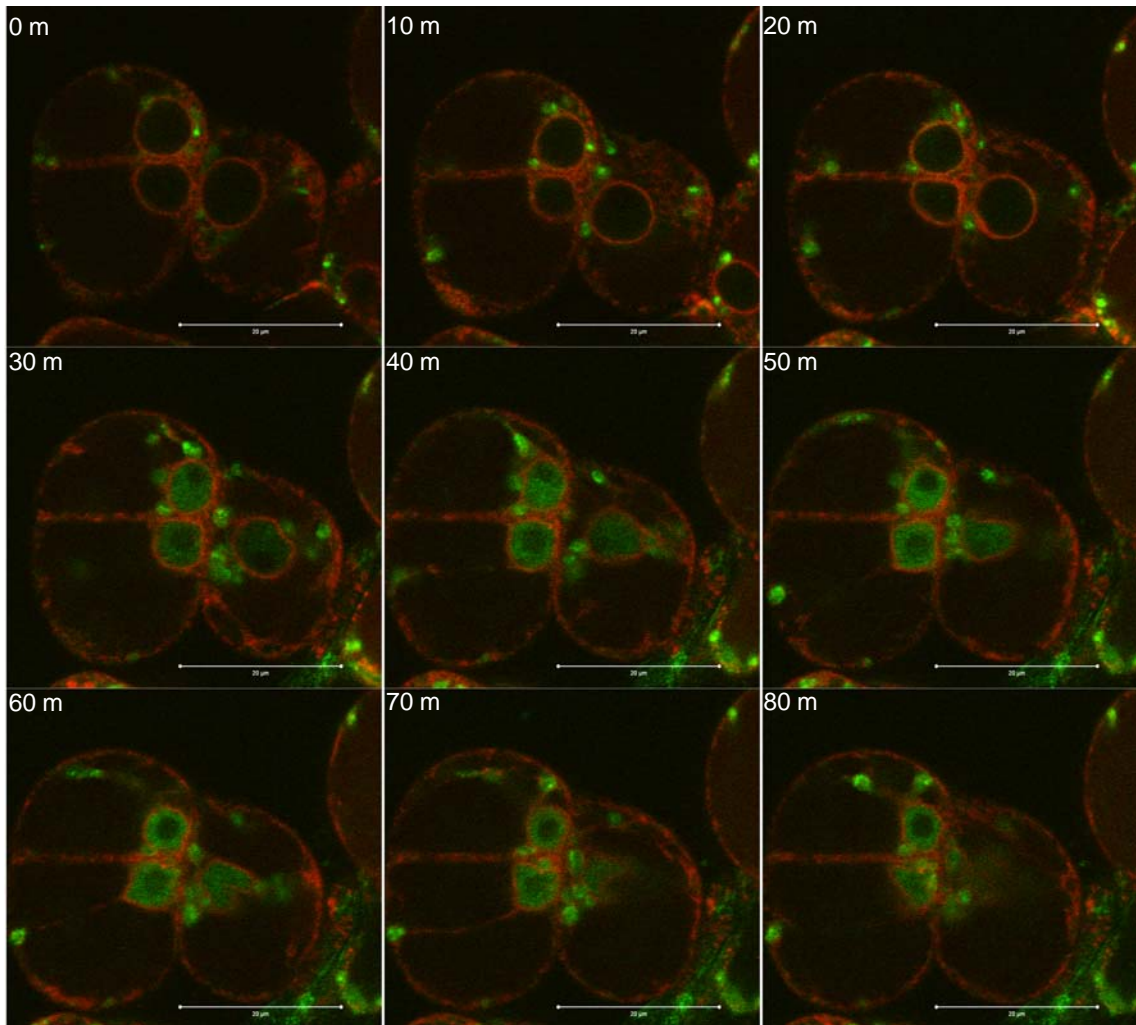


図22 ツニカマイシン処理による全長bZIP28の局在変化
GFP-bZIP28形質転換細胞をツニカマイシン処理し、共焦点顕微鏡により10分間隔で画像を取得した。 Barは20 μ m。

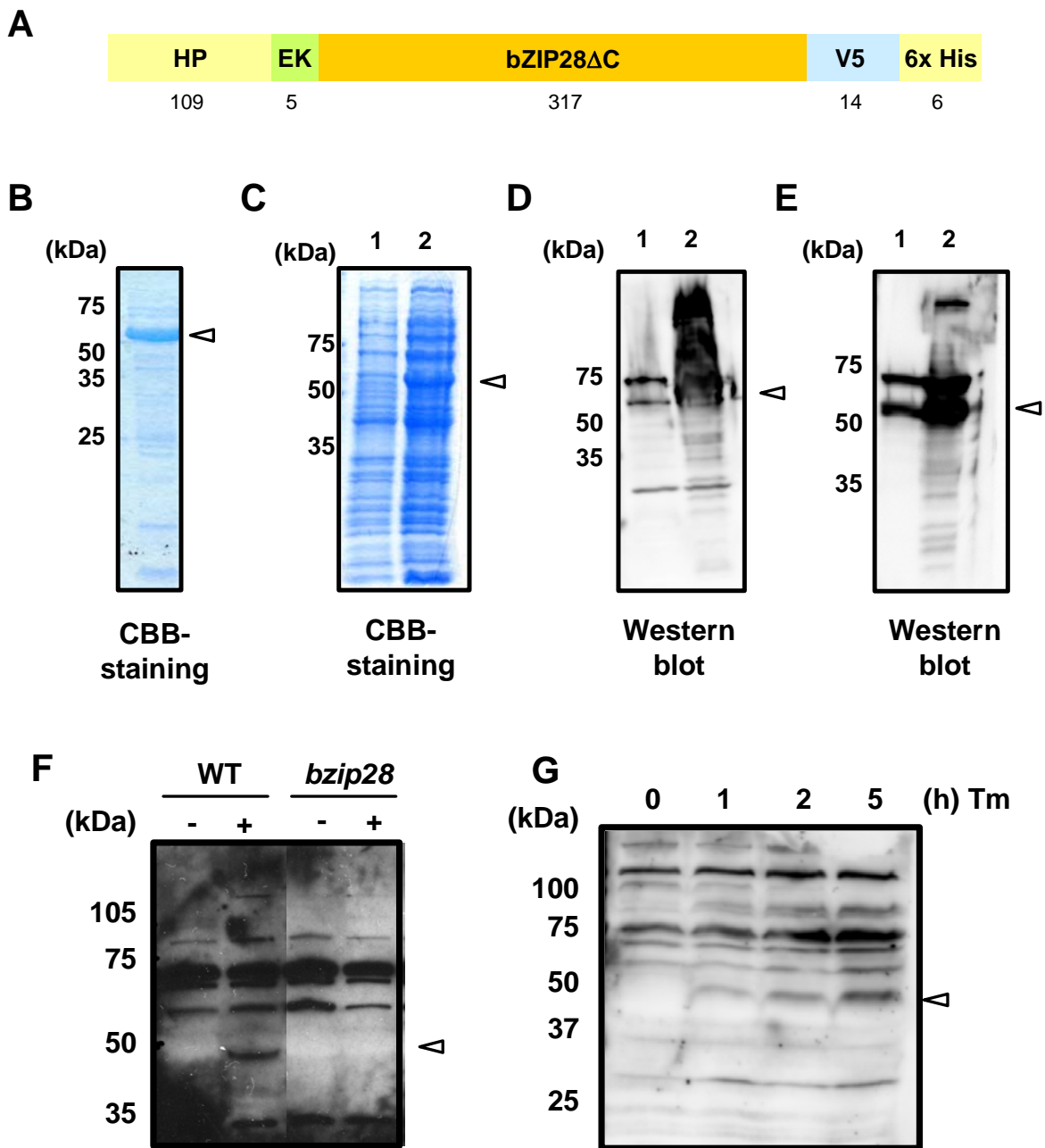


図23 抗bZIP28抗体の作成と精製

(A) 抗原に用いた組み換えタンパク質の構造。数字は各ドメインのアミノ酸数。HP, His-Patch Thioredoxin ORF; EK, Enterokinase recognition site; V5, V5 epitope; 6x His, Polyhistidine region。(B) 抗原に用いたbZIP28 C組み換えタンパク質。大腸菌で発現させ、Hisタグによって精製した。(C) 大腸菌で発現させた組み換えタンパク質。レーン1はアラビノース誘導前、レーン2はアラビノース誘導後。(D) 精製前の抗体による (C) のウエスタンブロット。(E) 精製後の抗体による (C) のウエスタンブロット。(F) 野生型およびbZIP28破壊株においてDMSOおよびツニカマイシンを6時間処理し、タンパク質抽出をおこない、抗bZIP28抗体で検出した。(G) 野生型植物において記載の時間ツニカマイシン処理し、タンパク質抽出をおこない、抗bZIP28抗体で検出した。目的のバンドの位置は矢頭で示した。

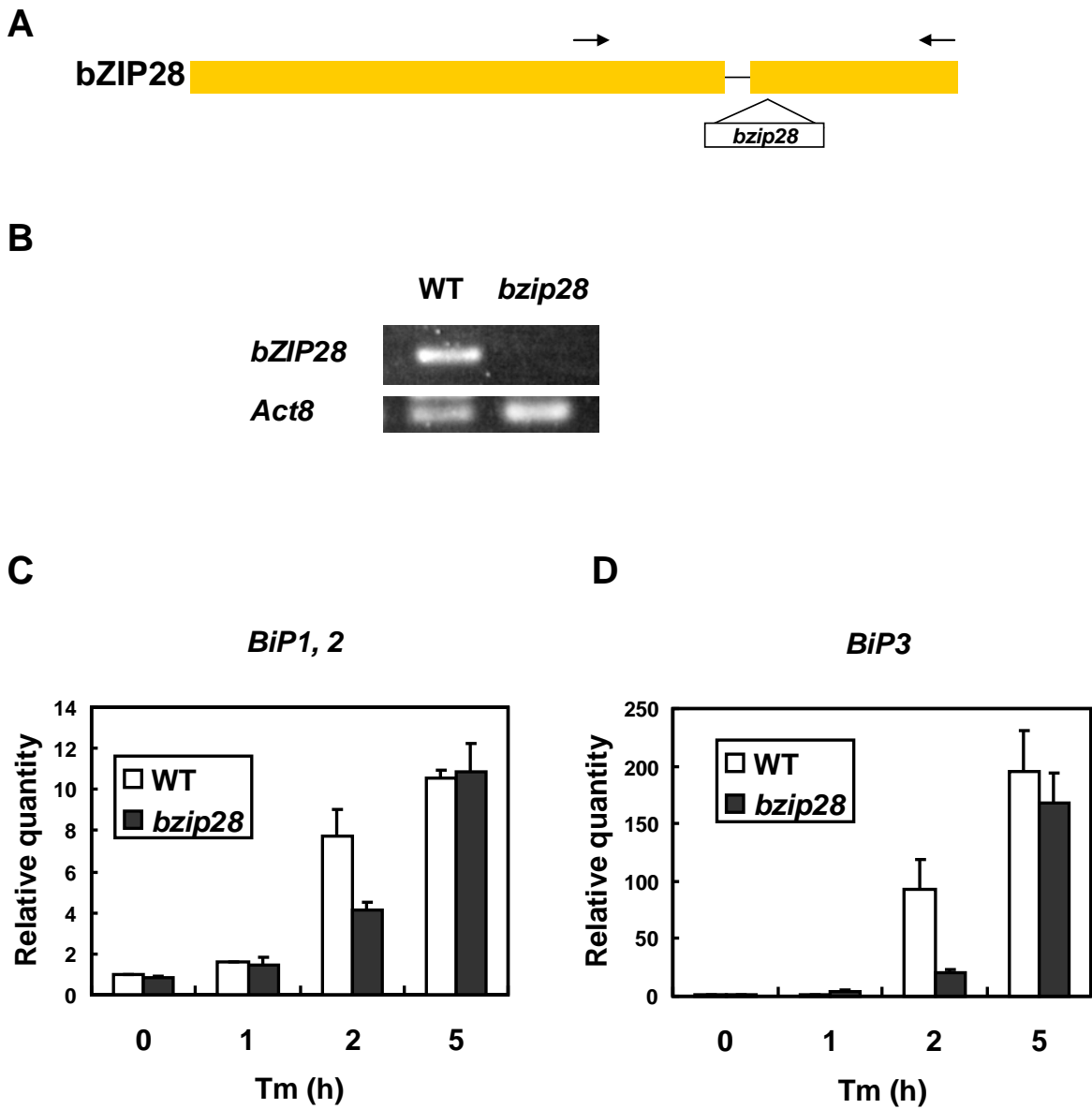


図24 *bZIP28*破壊株の解析

(A) T-DNA挿入位置。第2エクソンに挿入されている。矢印はRT-PCRに用いたプライマーの位置を示している。(B) RT-PCRによる*bZIP28*転写物の検出。(C) リアルタイムPCRによる*BiP1,2*および*BiP3*の転写誘導の検出。記載の時間ツニカマイシン処理し、RNAを抽出した。

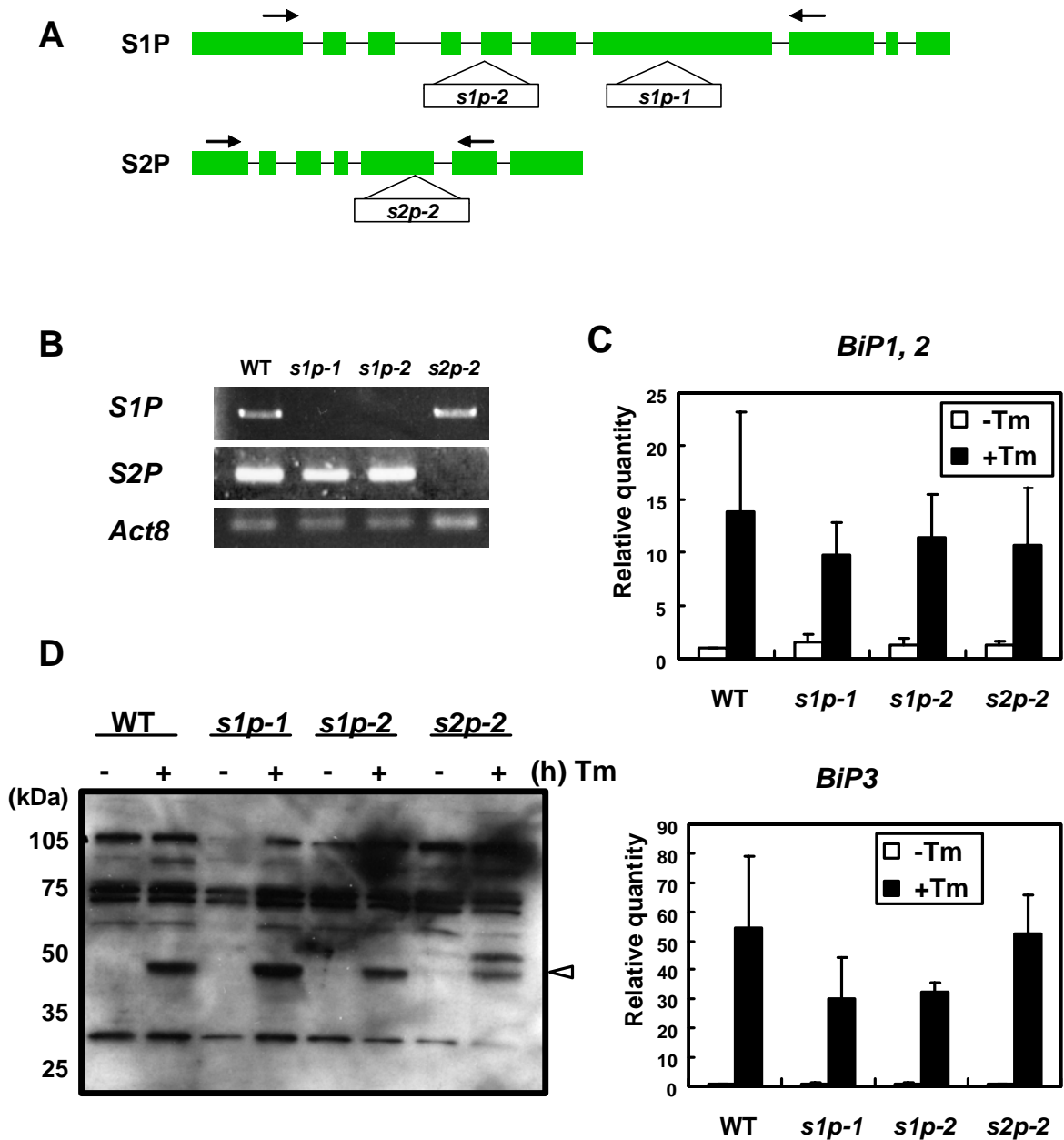


図25 S1PおよびS2P破壊株の解析

(A) T-DNA挿入位置。s1p-1は第7エクソンに、s1p-2は第5エクソンに、s2p-2は第5エクソンに挿入されている。矢印はRT-PCRに用いたプライマーの位置を示している。(B) RT-PCRによるS1PおよびS2P転写物の検出。(C) リアルタイムPCRによるBiP1,2およびBiP3の転写誘導の検出。播種後2週間目の芽生えをツニカマイシン有りおよび無しで5時間処理し、RNAを抽出した。転写量は野生型のツニカマイシン無処理の値に対する相対値で表した。

(D) bZIP28タンパク質の検出。ツニカマイシン有りおよび無しで5時間処理し、タンパク質を抽出した。

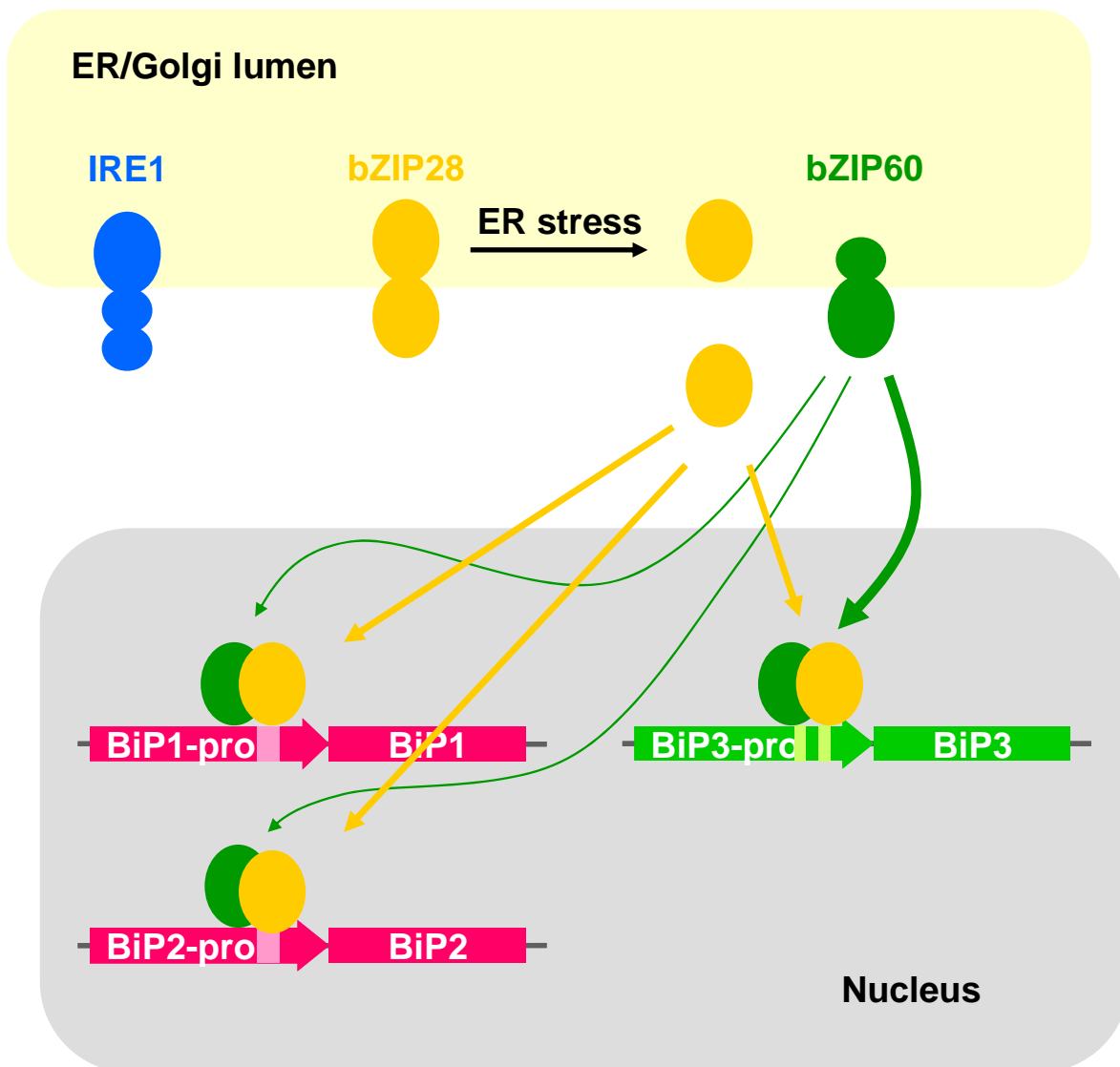


図26 シロイヌナズナにおけるBiP誘導機構のモデル

BiPの誘導に対するIRE1の顕著な効果は認められなかったため、BiPの誘導には他の因子の存在が考えられた。切断型のbZIP28はP-UPREおよびERSEを介してBiP1,2およびBiP3のプロモーターを活性化したため、これらの誘導に関わる因子であることが考えられた。bZIP28は通常小胞体膜に存在し、小胞体ストレス処理後の早い段階で膜貫通ドメインが切断される。bZIP28の転写因子ドメインは膜から遊離し、核へ移行し、BiPの誘導に関わる。これに対してZIP60は小胞体ストレス処理にともなって発現レベルが上昇する。bZIP28は早い応答に、bZIP60はシグナルの増幅にかかわっていることが考えられる。また、BiP1,2を主に制御する因子は単離されていなかったが、bZIP28破壊株においてBiP1,2誘導の減少が見られたことから、bZIP28はその因子の一つであることが考えられる。

総括

小胞体内において **BiP** はタンパク質の折りたたみを助けるのみならず、異常タンパク質の分解に関与するなど、小胞体タンパク質の品質管理においてきわめて重要な役割を果たす。植物においては特に発現様式の多様性が際立つことから、外部環境の変化の影響を受けやすい植物にとって **BiP** の発現制御は非常に重要であることが考えられた。また、植物には **BiP** が複数あることから、それぞれ独自の誘導機構が発達していることが考えられた。しかし、植物 **BiP** の発現様式や誘導機構については不明な点も多い。本研究は、植物における複数の **BiP** の発現様式について不明な点を明らかにすること、および **BiP** の誘導機構についてより多くの知見を得ることを目的とした。

シロイヌナズナには **BiP** 遺伝子が **BiP1**、**BiP2** および **BiP3** と 3 個存在するので、まずそれぞれの遺伝子について発現様式を比較した。**BiP1** と **BiP2** は最近重複した遺伝子であることが考えられ、プロモーター領域およびコード領域で高い相同性を示し、区別して検出するプローブやプライマーの作成が困難であったため検出においては区別せず、**BiP1, 2** と **BiP3** の間で発現様式を比較した。その結果、**BiP1, 2** は恒常的に発現しているのに対し、**BiP3** は小胞体ストレス特異的に発現が誘導されることを転写レベルのみならず、タンパク質レベルでも検出することに成功した。また、**BiP1, 2** はタンパク質合成がさかんになる組織や刺激において発現する一方、それらの組織や刺激において **BiP3** の発現は見られない、すなわち小胞体ストレス応答がおこっていないことがわかった。シロイヌナズナに **BiP3** が存在する意義は明らかではないが、**BiP1, 2** とは異なる発現様式をもつことから、**BiP3** 独自の役割があることが予想される。

動物において **BiP** はグルコース飢餓で誘導されるタンパク質として単離された。一方植物においては糖濃度の変化がさまざまな遺伝子発現を誘導し、大きな変化をもたらすものの、糖濃度の変化と **BiP** の発現誘導との関わりについては調べられていなかった。そこで、糖飢餓および糖添加によるシロイヌナズナの 3 個の **BiP** の発現誘導について調べた。その結果、**BiP3** は糖の過不足によって発現誘導はされず、**BiP1, 2** は糖飢餓ではなく、糖添加によって転写が上昇した。この糖による **BiP1, 2** の発現誘導は小胞体ストレス応答に関わるシス配列を介さずにおこることから、糖は小胞体ストレス応答とは独立に植物の **BiP1, 2** を誘導することが明らかになった。

これまでに酵母や動物では、**BiP** の発現は小胞体ストレス応答の指標とされて

きた。しかし、BiP3 が発現しない部位や刺激において、BiP1, 2 が発現すること、および BiP1, 2 が小胞体ストレス応答とは独立に糖で誘導されることから、シロイヌナズナにおいては BiP1, 2 の発現は必ずしも小胞体ストレス応答と同一のものではないことを本研究では明らかにした。一方、BiP3 は小胞体ストレス特異的に発現が誘導されることから、BiP3 の発現は小胞体ストレス応答の指標として、シロイヌナズナにおける小胞体ストレス応答の分子機構の解明に寄与することが期待される。

シロイヌナズナの BiP の誘導機構については BiP の誘導に重要な因子として bZIP60 が知られているが、BiP1, 2 の誘導には他にも必要な因子が存在すると考えられていた。そこで、本研究ではシロイヌナズナの BiP の転写誘導に関わる新たな因子の探索をおこなった。最近動物では ATF6 と同様に膜内切断を伴う機構で、BiP の転写誘導や小胞体ストレス応答に関わる転写因子がいくつか単離された。これらは膜貫通ドメインを持つ bZIP 型転写因子であることから膜内切断による制御について関わりが調べられた。そこでシロイヌナズナにおいて膜貫通ドメインを有する bZIP 型転写因子について BiP の誘導との関わりを調べたところ、bZIP28 が小胞体ストレス依存的に切断され、核へ移行し、BiP1, 2 および BiP3 の転写を誘導することを明らかにした。bZIP60 が小胞体ストレスによって転写レベルで誘導されるのに対し、bZIP28 は通常でもある程度発現しているため、小胞体ストレス応答の早い段階で BiP1, 2 および BiP3 の誘導に関わっていることが考えられた。実際、bZIP28 の切断および核移行が小胞体ストレス処理後 1 時間以内でおこなっていることを細胞生物学的、生化学的に示した。また、bZIP28 の破壊株において小胞体ストレス処理後 2 時間目の BiP1, 2 および BiP3 の転写は野生型と比較して抑えられていた。したがって、本研究は BiP1, 2 および BiP3 を小胞体ストレス依存的に誘導する機構において、早期の段階に関わっている因子 bZIP28 を単離することに成功した。bZIP28 を切断し、活性を制御する因子の解明はシロイヌナズナにおける小胞体ストレス応答の分子機構の研究のみならず、シロイヌナズナではいまだ乏しい膜内切断によるタンパク質の活性制御に関する研究にも道を拓くものとなるであろう。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物細胞工学講座 佐野浩教授（現ストックホルム大学教授）並びに、細胞間情報学講座 高山誠司教授のもと、行われました。

佐野浩教授にはご在学中のみならず、ストックホルム大学教授に就任されてからも数々のご助言をいただき、お世話になりました。心よりお礼申し上げます。

磯貝彰教授、高山誠司教授には、研究室へ受け入れてくださり、数々の有益なご指導とご助言をいただきました。すばらしい環境で本研究を進めることができましたことに心より感謝いたします。

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 小泉望准教授にはこの6年間研究のみならず、さまざまな面で数多くのご指導、ご助言をいただきました。熱心に私を教育してくださったことを深く感謝いたします。

本博士論文を審査していただき、本研究を遂行するにあたりご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 河野憲二教授、田坂昌生教授、橋本隆教授に心よりお礼申し上げます。

実験を進めるにあたり、多くの有益なご助言をいただいた同大学 岩野恵助教、Pennsylvania State 大学 岩田雄二博士に心よりお礼申し上げます。また、実験においてお世話になりました辰巳裕子氏、宮直子氏に深く感謝いたします。また、論文の推敲にあたり、英語を指導していただいた Ian Smith 博士に心より感謝いたします。

この6年間、さまざまな方々からご指導いただき、また影響を受け、本研究を進めることができました。植物細胞工学講座および細胞間情報学講座の皆様には心より感謝いたします。また、研究室を越えてご指導いただいた先生方、ご助言いただいた先輩、励ましあえた同期、刺激をいただいた後輩にこの場を借りて深くお礼申し上げます。

最後に、私のことに日々心を砕き、共に悩み、懸命にご支援いただいた両親に深い感謝の意を表します。

参考文献

- Alvim, F.C., Carolino, S.M., Cascardo, J.C., Nunes, C.C., Martinez, C.A., Otoni, W.C., and Fontes, E.P. (2001). Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.* 126, 1042-1054.
- Becker, J.D., Boavida, L.C., Carneiro, J., Haury, M., and Feijo, J.A. (2003). Transcriptional profiling of Arabidopsis tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiol.* 133, 713-725.
- Bernales, S., Papa, F.R., and Walter, P. (2006). Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 487-508.
- Boston, R.S., Fontes, E.B., Shank, B.B., and Wrobel, R.L. (1991). Increased expression of the maize immunoglobulin binding protein homolog b-70 in three zein regulatory mutants. *Plant Cell* 3, 497-505.
- Brandizzi, F., Hanton, S., DaSilva, L.L., Boevink, P., Evans, D., Oparka, K., Denecke, J., and Hawes, C. (2003). ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J.* 34, 269-281.
- Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-451.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7877-7882.
- Cascardo, J.C., Almeida, R.S., Buzeli, R.A., Carolino, S.M., Otoni, W.C., and Fontes, E.P. (2000). The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *J. Biol. Chem.* 275, 14494-14500.
- Chang, S.C., Wooden, S.K., Nakaki, T., Kim, Y.K., Lin, A.Y., Kung, L., Attenello, J.W.,

- and Lee, A.S. (1987). Rat gene encoding the 78-kDa glucose-regulated protein GRP78: its regulatory sequences and the effect of protein glycosylation on its expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 680-684.
- Chin, K.T., Zhou, H.J., Wong, C.M., Lee, J.M., Chan, C.P., Qiang, B.Q., Yuan, J.G., Ng, I.O., and Jin, D.Y. (2005). The liver-enriched transcription factor CREB-H is a growth suppressor protein underexpressed in hepatocellular carcinoma. *Nucleic Acids Res.* *33*, 1859-1873.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *16*, 735-743.
- Contento, A.L., Kim, S.J., and Bassham, D.C. (2004). Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. *Plant Physiol.* *135*, 2330-2347.
- 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.
- D'Amico, L., Valsasina, B., Daminati, M.G., Fabbrini, M.S., Nitti, G., Bollini, R., Ceriotti, A., and Vitale, A. (1992). Bean homologs of the mammalian glucose-regulated proteins: induction by tunicamycin and interaction with newly synthesized seed storage proteins in the endoplasmic reticulum. *Plant J.* *2*, 443-455.
- Daugaard, M., Rohde, M., and Jaattela, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* *581*, 3702-3710.
- DenBoer, L.M., Hardy-Smith, P.W., Hogan, M.R., Cockram, G.P., Audas, T.E., and Lu, R. (2005). Luman is capable of binding and activating transcription from the unfolded protein response element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *331*, 113-119.

- Denecke, J., Goldman, M.H., Demolder, J., Seurinck, J., and Botterman, J. (1991). The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. *Plant Cell* 3, 1025-1035.
- Deppmann, C.D., Acharya, A., Rishi, V., Wobbles, B., Smeekens, S., Taparowsky, E.J., and Vinson, C. (2004). Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in *Arabidopsis thaliana*: a comparison to *Homo sapiens* B-ZIP motifs. *Nucleic Acids Res.* 32, 3435-3445.
- Deppmann, C.D., Alvania, R.S., and Taparowsky, E.J. (2006). Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: Insight into the evolution of closed interaction networks. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1480-1492.
- Di Cola, A., Frigerio, L., Lord, J.M., Ceriotti, A., and Roberts, L.M. (2001). Ricin A chain without its partner B chain is degraded after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14726-14731.
- Di Cola, A., Frigerio, L., Lord, J.M., Roberts, L.M., and Ceriotti, A. (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation of ricin A chain has unique and plant-specific features. *Plant Physiol.* 137, 287-296.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 181-191.
- Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S., and Brodsky, J.L. (2001). The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu. Rev. Genet.* 35, 149-191.
- Fontes, E.B., Shank, B.B., Wrobel, R.L., Moose, S.P., OBrian, G.R., Wurtzel, E.T., and Boston, R.S. (1991). Characterization of an immunoglobulin binding protein homolog in the maize floury-2 endosperm mutant. *Plant Cell* 3, 483-496.
- Forward, B.S., Osusky, M., and Misra, S. (2002). The Douglas-fir BiP promoter is functional in *Arabidopsis* and responds to wounding. *Planta* 215, 569-576.

- Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 603-647.
- Fu, H., Kim, S.Y., and Park, W.D. (1995). High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell* 7, 1387-1394.
- Galante, E., Vitale, A., Manzocchi, L., Soave, C., and Salamini, F. (1983). Genetic Control of a Membrane Component and Zein Deposition in Maize Endosperm. *MOLECULAR & GENERAL GENETICS* 192, 316-321.
- Gibbon, B.C., and Larkins, B.A. (2005). Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends Genet.* 21, 227-233.
- Gonzalez, R.G., Haxo, R.S., and Schleich, T. (1980). Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein--nucleic acid interactions. *Biochemistry* 19, 4299-4303.
- Grlerson, C., Du, J.S., Zabela, M.T., Beggs, K., Smith, C., Holdsworth, M., and Bevan, M. (1994). Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J.* 5, 815-826.
- Gupta, A.K., and Kaur, N. (2005). Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30, 761-776.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., and Maliga, P. (1994). The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25, 989-994.
- Hatano, K., Shimada, T., Hiraiwa, N., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (1997). A rapid increase in the level of binding protein (BiP) is accompanied by synthesis and degradation of storage proteins in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 38, 344-351.

- Iwata, Y., and Koizumi, N. (2005). An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 5280-5285.
- Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., and Miura, M. (2004). A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* *10*, 98-102.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F., and bZIP Research Group. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* *7*, 106-111.
- Jelitto-Van Dooren, E.P., Vidal, S., and Denecke, J. (1999). Anticipating endoplasmic reticulum stress. A novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell* *11*, 1935-1944.
- Kabani, M., Kelley, S.S., Morrow, M.W., Montgomery, D.L., Sivendran, R., Rose, M.D., Gierasch, L.M., and Brodsky, J.L. (2003). Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Mol. Biol. Cell* *14*, 3437-3448.
- Kanaoka, M.M., Urban, S., Freeman, M., and Okada, K. (2005). An Arabidopsis Rhomboid homolog is an intramembrane protease in plants. *FEBS Lett.* *579*, 5723-5728.
- 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.
- Kaufman, R.J., Scheuner, D., Schroder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C.Y., and Arnold, S.M. (2002). The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 411-421.
- Kim, Y.S., Kim, S.G., Park, J.E., Park, H.Y., Lim, M.H., Chua, N.H., and Park, C.M. (2006). A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in

- Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 3132-3144.
- Kim, S.Y., Kim, S.G., Kim, Y.S., Seo, P.J., Bae, M., Yoon, H.K., and Park, C.M. (2007a). Exploring membrane-associated NAC transcription factors in Arabidopsis: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Res.* 35, 203-213.
- Kim, S.G., Kim, S.Y., and Park, C.M. (2007b). A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Planta* 226, 647-654.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., and Kohno, K. (2007). Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *J. Cell Biol.* 179, 75-86.
- Kleizen, B., and Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 343-349.
- 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, 877-890.
- Koiwa, H., Li, F., McCully, M.G., Mendoza, I., Koizumi, N., Manabe, Y., Nakagawa, Y., Zhu, J., Rus, A., Pardo, J.M., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (2003). The STT3a subunit isoform of the Arabidopsis oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *Plant Cell* 15, 2273-2284.
- Koizumi, N. (1996). Isolation and responses to stress of a gene that encodes a luminal binding protein in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 37, 862-865.
- Koizumi, N., Martinez, I.M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., and Chrispeels, M.J. (2001). Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiol.* 127, 949-962.

- Koizumi, N., Ujino, T., Sano, H., and Chrispeels, M.J. (1999). Overexpression of a gene that encodes the first enzyme in the biosynthesis of asparagine-linked glycans makes plants resistant to tunicamycin and obviates the tunicamycin-induced unfolded protein response. *Plant Physiol.* *121*, 353-361.
- Kokame, K., Kato, H., and Miyata, T. (2001). Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* *276*, 9199-9205.
- Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A., and Imaizumi, K. (2005). OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat. Cell Biol.* *7*, 186-194.
- Kondo, S., Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Nara, S., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Hara, H., and Imaizumi, K. (2007). BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1716-1729.
- 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.
- Leborgne-Castel, N., Jelitto-Van Dooren, E.P., Crofts, A.J., and Denecke, J. (1999). Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* *11*, 459-470.
- Lee, A.S. (1992). Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr. Opin. Cell Biol.* *4*, 267-273.
- Li, M., Baumeister, P., Roy, B., Phan, T., Foti, D., Luo, S., and Lee, A.S. (2000). ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5096-5106.

- Li, X., Wu, Y., Zhang, D.Z., Gillikin, J.W., Boston, R.S., Franceschi, V.R., and Okita, T.W. (1993). Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process. *Science* 262, 1054-1056.
- Liang, G., Audas, T.E., Li, Y., Cockram, G.P., Dean, J.D., Martyn, A.C., Kokame, K., and Lu, R. (2006). Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7999-8010.
- Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 318, 944-949.
- Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P., and Howell, S.H. (2007a). Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant J.* 51, 897-909.
- Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P., and Howell, S.H. (2007b). An Endoplasmic Reticulum Stress Response in *Arabidopsis* Is Mediated by Proteolytic Processing and Nuclear Relocation of a Membrane-Associated Transcription Factor, bZIP28. *Plant Cell* 19, 4111-4119.
- Martinez, I.M., and Chrispeels, M.J. (2003). Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell* 15, 561-576.
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, 553-564.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 670-684.
- Menges, M., and Murray, J.A. (2004). Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabidopsis* and tobacco cell suspension cultures. *Plant J.* 37, 635-644.

- Misselwitz, B., Staeck, O., Matlack, K.E., and Rapoport, T.A. (1999). Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J. Biol. Chem.* *274*, 20110-20115.
- Misselwitz, B., Staeck, O., and Rapoport, T.A. (1998). J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol. Cell* *2*, 593-603.
- Mitsubishi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2000). Characterization of organelles in the vacuolar-sorting pathway by visualization with GFP in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* *41*, 993-1001.
- Mori, K. (2000). Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* *101*, 451-454.
- 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., 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*, 2583-2593.
- Muench, D.G., Wu, Y., Zhang, Y., Li, X., Boston, R.S., and Okita, T.W. (1997). Molecular cloning, expression and subcellular localization of a BiP homolog from rice endosperm tissue. *Plant Cell Physiol.* *38*, 404-412.
- Nadanaka, S., Yoshida, H., Kano, F., Murata, M., and Mori, K. (2004). Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* *15*, 2537-2548.

- Nadanaka, S., Yoshida, H., and Mori, K. (2006). Reduction of disulfide bridges in the luminal domain of ATF6 in response to glucose starvation. *Cell Struct. Funct.* *31*, 127-134.
- Nagamori, I., Yabuta, N., Fujii, T., Tanaka, H., Yomogida, K., Nishimune, Y., and Nojima, H. (2005). Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway. *Genes Cells* *10*, 575-594.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* *104*, 34-41.
- Nishikawa, S.I., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L., and Endo, T. (2001). Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J. Cell Biol.* *153*, 1061-1070.
- Noh, S.J., Kwon, C.S., and Chung, W.I. (2002). Characterization of two homologs of Ire1p, a kinase/endoribonuclease in yeast, in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* *1575*, 130-134.
- Noh, S.J., Kwon, C.S., Oh, D.H., Moon, J.S., and Chung, W.I. (2003). Expression of an evolutionarily distinct novel BiP gene during the unfolded protein response in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* *311*, 81-91.
- Nuttall, J., Vitale, A., and Frigerio, L. (2003). C-terminal extension of phaseolin with a short methionine-rich sequence can inhibit trimerisation and result in high instability. *Plant Mol. Biol.* *51*, 885-894.
- Oh, D.H., Kwon, C.S., Sano, H., Chung, W.I., and Koizumi, N. (2003). Conservation between animals and plants of the cis-acting element involved in the unfolded protein response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *301*, 225-230.

- Okushima, Y., Koizumi, N., Yamaguchi, Y., Kimata, Y., Kohno, K., and Sano, H. (2002). Isolation and characterization of a putative transducer of endoplasmic reticulum stress in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* *43*, 532-539.
- Omori, Y., Imai, J., Watanabe, M., Komatsu, T., Suzuki, Y., Kataoka, K., Watanabe, S., Tanigami, A., and Sugano, S. (2001). CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res.* *29*, 2154-2162.
- Pedrazzini, E., Giovinazzo, G., Bollini, R., Ceriotti, A., and Vitale, A. (1994). Binding of BiP to an assembly-defective protein in plant cells. *Plant J.* *5*, 103-110.
- Pimpl, P., Taylor, J.P., Snowden, C., Hillmer, S., Robinson, D.G., and Denecke, J. (2006). Golgi-mediated vacuolar sorting of the endoplasmic reticulum chaperone BiP may play an active role in quality control within the secretory pathway. *Plant Cell* *18*, 198-211.
- Plempner, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., and Wolf, D.H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* *388*, 891-895.
- Rago, C., Rapin, N., Stirling, J., Gobeil, P., Smith-Windsor, E., O'Hare, P., and Misra, V. (2002). Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5639-5649.
- Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* *450*, 663-669.
- Romisch, K. (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 435-456.
- Sakai, J., Duncan, E.A., Rawson, R.B., Hua, X., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1996). Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* *85*, 1037-1046.

- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J. Biol. Chem.* *273*, 5785-5793.
- Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* *569*, 29-63.
- 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*, 3028-3039.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell.* *3*, 99-111.
- Shen, X., Ellis, R.E., Lee, K., Liu, C.Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D.M., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2001). Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* *107*, 893-903.
- Shiu, R.P., Pouyssegur, J., and Pastan, I. (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 3840-3844.
- Stirling, J., and O'hare, P. (2006). CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol. Biol. Cell* *17*, 413-426.
- Sung, D.Y., Vierling, E., and Guy, C.L. (2001). Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. *Plant Physiol.* *126*, 789-800.
- Tamura, K., Yamada, K., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. (2004). Endoplasmic reticulum-resident proteins are constitutively transported to vacuoles for

- degradation. *Plant J.* *39*, 393-402.
- 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.
- Trombetta, E.S., and Parodi, A.J. (2003). Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 649-676.
- Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., and Nakano, A. (2001). Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* *20*, 4730-4741.
- van Anken, E., Romijn, E.P., Maggioni, C., Mezghrani, A., Sitia, R., Braakman, I., and Heck, A.J. (2003). Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion. *Immunity* *18*, 243-253.
- Vitale, A., Bielli, A., and Ceriotti, A. (1995). The Binding Protein Associates with Monomeric Phaseolin. *Plant Physiol.* *107*, 1411-1418.
- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M., and Dong, X. (2005). Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* *308*, 1036-1040.
- Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J., and Prywes, R. (2000). Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* *275*, 27013-27020.
- Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003). Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol.* *13*, 71-78.
- 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.

- Wrobel, R.L., OBrian, G.R., and Boston, R.S. (1997). Comparative analysis of BiP gene expression in maize endosperm. *Gene* 204, 105-113.
- Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R.J., and Mori, K. (2004). Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem. (Tokyo)* 136, 343-350.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355-1364.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 33741-33749.
- Yoshida, H., Matsui, T., 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, 265-271.
- 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. (2001). Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1239-1248.
- Zelenski, N.G., Rawson, R.B., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 21973-21980.

Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D.T., Back, S.H., and Kaufman, R.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124, 587-599.

論文目録

Induction of BiP by sugar independent of a cis-element for the unfolded protein response in *Arabidopsis thaliana*. Tajima, H. and Koizumi, N. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346: 926–930

Endoplasmic reticulum stress response and regulated intramembrane proteolysis in plants. Tajima, H. Iwata, Y. and Koizumi, N. *Plant Biotech.* In press