

博士論文番号：

小胞体ストレス応答における *XBP1* mRNA の
細胞質スプライシング機構の解析

柳谷 耕太

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座

(河野 憲二 教授)

平成21年1月26日提出

所属 (主指導教員)	動物細胞工学講座 (河野 憲二)		
氏名	柳谷 耕太	提出	平成 20年 12月 22日
題目	小胞体ストレス応答における <i>XBPI</i> mRNA の細胞質スプライシング機構の解析		

要旨

動物細胞では、分泌・膜タンパク質は小胞体で合成され成熟し、目的地へ輸送される。これらのタンパク質は翻訳と共役して小胞体内へ送り込まれ、糖鎖修飾を受けると共に分子シャペロンやフォールディング酵素などによって正しい立体構造に折りたたまれることで成熟する。タンパク質フォールディング能力、即ちフォールディング容量を超える量のタンパク質の小胞体への流入は折りたたみ不全タンパク質の発生、蓄積を引き起こし、細胞に強い毒性を示す。小胞体へのタンパク質流入量は細胞分化や環境応答などによって急速に変化するため、細胞はこの様な動態に適切に対応するために、小胞体のフォールディング容量と流入タンパク質量の不均衡（小胞体ストレスと呼ばれる）を感知し、両者のバランスを調節するシグナル伝達経路を備えている。I型小胞体膜タンパク質 IRE1（動物細胞では IRE1 α は小胞体ストレス状態を感知し、シグナルを発する小胞体ストレスセンサータンパク質で、酵母から植物やヒトまでの真核生物すべてに幅広く保存されている唯一の分子である。IRE1は小胞体ストレス時に小胞体内腔の折りたたみ不全タンパク質の蓄積をその内腔領域で感知し、サイトゾル側のキナーゼ、リボヌクレアーゼ領域を活性化させる。活性化した IRE1はサイトゾル側で特定の mRNA を特異的に二ヶ所切断し、スプライソソーム非依存的なスプライシング反応(unconventional splicing)を開始する。動物細胞においては IRE1 α がこの機能をになっており、転写因子 *XBPI* の前駆体 mRNA (unspliced *XBPI* mRNA: *XBPIu* mRNA と表記)ORF 内の 26 塩基を切り出す反応を行い、その後未同定のリガーゼによりスプライシング型 *XBPI* mRNA (spliced *XBPI* mRNA: *XBPIs* mRNA と表記)が生成すると考えられている。スプライシング型の *XBPIs* mRNA からは機能的な転写因子が合成され、小胞体分子シャペロンや脂質合成酵素などの転写を誘導し、小胞体のフォールディング容量を増強することが明らかとなっている。しかし小胞体膜上の IRE1 α と転写因子をコードする *XBPI* mRNA が小胞体ストレス時にどのような機構で小胞体膜上で効率よく出会えるのかという、基本的な疑問については全く明らかにされていなかった。本論文は IRE1 による *XBPIu* mRNA のスプライシング機構の中でも特に *XBPIu* mRNA と IRE1 が出会うステップに着目して解析を行った。

IRE1 α は小胞体膜タンパク質であり、小胞体ストレス状態でも小胞体膜に局在することが知られているので、私は“*XBPIu* mRNA は小胞体膜上に局在化することで IRE1 α によ

るスプライシング反応を効率化している”という仮説を立て、その検証を行った。まず、はじめに、ジギトニンを利用した生化学的細胞分画法で HEK293T 細胞のサイトゾルに存在する mRNA と小胞体膜上に存在する mRNA を分画したところ、非ストレス時では *XBPlu* mRNA は膜画分に濃縮されることがわかった。興味深いことに、細胞を小胞体ストレス誘導剤で処理すると IRE1 α によってスプライシングを受けた *XBPls* mRNA がサイトゾル画分で顕著に検出されるようになった。この結果は *XBPlu* mRNA は IRE1 α によってスプライシングされると小胞体膜から放出されることを示唆している。*XBPlu* mRNA や *XBPls* mRNA を非ストレス条件下の HEK293T 細胞に一過的に発現させた場合でも *XBPlu* mRNA は膜画分に分画され、*XBPls* mRNA はサイトゾル画分に分画されことから、*XBPlu* mRNA には存在し *XBPls* mRNA にはない何かしらの特徴が *XBPlu* mRNA を膜ヘリクルートしていることが示された。候補となる特徴は (1) 26 塩基のイントロン配列、(2) スプライシング部位周辺に存在する特徴的なステムループ構造、(3) それぞれがコードするタンパク質の 3 つが考えられたが、変異体を用いた実験から(3)の特徴、即ち *XBPlu* mRNA にコードされるタンパク質が *XBPlu* mRNA の膜局在化に必要であることが明らかとなった。また、*XBPlu* mRNA の膜局在化は翻訳中のリボソームから新生鎖を遊離させる作用のある翻訳阻害剤 puromycin 処理で著しく減弱させられたが、リボソームと新生鎖の複合体を安定化させる cycloheximide では、影響が少なかったことから、*XBPlu* mRNA は自身を翻訳中のリボソームから伸長中の新生ポリペプチド鎖を介して膜に局在する可能性が示唆された。この可能性を支持するように、*XBPlu* mRNA がコードする XBP1u タンパク質は膜に結合することが *in vivo*、*in vitro* 両側面の実験から確認された。XBP1u タンパク質の hydrophathy profile を調べるとその C 末端側に種を超えて保存された高度に疎水的な領域(HR)が存在しており、この領域の欠失やアミノ酸置換による疎水性度の低下は変異体の mRNA、タンパク質どちらの膜結合能も減弱させた。逆に GFP に HR 領域を付加したタンパク質は、この mRNA を膜に局在化させることがわかった。以上の結果は *XBPlu* mRNA が自身を翻訳するリボソームから伸び出した新生鎖の HR を介して膜に局在することを示している。最後に *XBPlu* mRNA の膜局在化の生理的意義を検証するために、膜に局在化しない XBP1u 変異体である Int(+A)を作製し小胞体ストレス時の IRE1 α によるスプライシング効率を調べたところ、Int(+A) mRNA は野生型と比較して小胞体ストレス時にスプライシングされる効率がかなり低下していた。さらに、Int(+A)の N 末端に calreticulin の小胞体ターゲティング配列を付加し、強制的にその mRNA を小胞体膜に局在させたところ、野生型のスプライシング効率に回復したことから、*XBPlu* mRNA は膜に局在化することでスプライシングを効率化していることが明らかとなった。

本研究は *XBPlu* mRNA の IRE1 による細胞質スプライシングにおける未知のステップである *XBPlu* mRNA の膜局在化機構の存在とそのメカニズムを明らかにした。この機構の様に mRNA の成熟化のために自身がコードするタンパク質を利用する例は知られておらず、mRNA の細胞内局在化機構としても興味深い例であると思われる。

目次

1.	序論	6
2.	材料と方法	9
2.1	プラスミド	
2.2	抗体	
2.3	細胞とトランスフェクション	
2.4	初代肝細胞の調製	
2.5	細胞分画	
2.6	Membrane-localization value (ML-value)の計算方法	
2.7	RNA 抽出	
2.8	ノザンブロット解析と RT-PCR	
2.9	<i>In vitro</i> における XBP1 RNA の切断反応	
2.10	リボソームの調製	
2.11	<i>In vitro</i> における XBP1 タンパク質の発現	
3.	結果	14
3.1	<i>XBPlu</i> mRNA は膜上に分布している	
3.2	<i>XBPl</i> mRNA の局在場所は IRE1 α によるスプライシングで変化する	
3.3	<i>XBPlu</i> mRNA の膜上へのリクルートは 3'エクソンがコードするアミノ酸配列に依存する	
3.4	<i>XBPlu</i> mRNA は膜上に局在化することで効率的に IRE1a によってスプライシングされる	
3.5	<i>XBPlu</i> mRNA の翻訳産物は自身の mRNA を mRNA-リボソーム-新生鎖の一部として膜上へリクルートする	
3.6	<i>XBPlu</i> mRNA の膜局在化には XBP1u タンパク質中の疎水性領域が必要である	
3.7	IRE1 α は <i>XBPlu</i> mRNA の膜局在化に必須ではない	
3.8	内在性 <i>XBPlu</i> mRNA も R-RNC 複合体の一部として膜上に局在化している	
4.	考察	24
4.1	<i>XBPlu</i> mRNA が膜上に局在化する意義	
4.2	<i>XBPlu</i> mRNA が局在化する膜	
4.3	<i>XBPlu</i> mRNA が膜上に局在化する機構	
4.4	HR2 に続く C 末端領域の長さ	
4.5	XBP1u タンパク質の局在場所	

4.6	XBP1u タンパク質の機能	
4.7	HR2 と NES の関係	
4.8	<i>XBP1u</i> mRNA がスプライシング後に小胞体膜から離れる意義	
4.9	結論	
5.	図表	30
6.	謝辞	54
7.	参考文献	55

1. 序論

動物細胞では、分泌・膜タンパク質は小胞体で合成され成熟し、目的地へ輸送される。これらのタンパク質は翻訳と共役して小胞体内へ送り込まれ、糖鎖修飾を受けると共に分子シャペロンやフォールディング酵素などによって正しい立体構造に折りたたまれて成熟する。小胞体におけるタンパク質フォールディング能力、即ちフォールディング容量を超える量のタンパク質の流入は折りたたみ不全タンパク質の発生、蓄積を引き起こし、細胞に強い毒性を示す。小胞体へのタンパク質流入量は細胞の分化状態や環境への応答などによって急速に変化するため、細胞はこの様な動態に適切に対応する必要がある。細胞は小胞体のフォールディング容量と流入タンパク質量の不均衡（小胞体ストレスと呼ばれる）を感知し、両者のバランスを調節するためのシグナル伝達経路（unfolded protein response; UPR）を活性化させて、変性タンパク質の蓄積による毒性から自身を守っている(Ron and Walter, 2007; Travers et al., 2000)。

小胞体ストレスは小胞体ストレスセンサーと呼ばれる、小胞体一回膜貫通タンパク質群によって感知される。それらは小胞体ストレスを小胞体内腔ドメインで感知し、それぞれユニークなシグナルをサイトゾル側に発信する。哺乳動物細胞には主に3種類の小胞体ストレスセンサー分子 PERK、ATF6、IRE1 α が存在する(図 1A)。PERK は小胞体ストレスを感知するとサイトゾル側のキナーゼドメインが活性化し、翻訳開始因子 eIF2 α をリン酸化する(Harding et al., 1999)。この反応はタンパク質の翻訳開始反応を阻害するので、小胞体への新規タンパク質流入量が減少し、ストレス状態にある小胞体にこれ以上変性タンパク質が蓄積するのを防ぐ働きがある。ATF6 はサイトゾル側に bZIP 型転写因子ドメインをもつ膜貫通タンパク質で、小胞体ストレスを感知すると小胞体からゴルジ体へ輸送される。ゴルジ体においては、S1P プロテアーゼや S2P プロテアーゼによってその膜貫通ドメイン切断され、転写因子ドメインが膜から解放されて、核へ移行し、小胞体分子シャペロンやフォールディング酵素などの転写を促進させることで小胞体のフォールディング容量を増強する(Haza et al., 1999; Ye et al., 2000; Adachi et al., 2008)。IRE1 α は小胞体ストレスによって活性化されると、サイトゾル側のリボヌクレアーゼドメインが活性化し(Tirasophon et al., 1998)、細胞質で転写因子 *XBP1* の前駆体(*XBP1* unspliced form; *XBP1u*) mRNA を特異的ニヶ所で切断する。切断された 5'側と 3'側の mRNA 断片は未だ同定されていない RNA ligase によって繋ぎ合わせられ、スプライシング反応が完了する(Yoshida et al., 2001; Shen et al., 2001; Calton et al., 2002)。この反応によって *XBP1u* mRNA の ORF の中から 26 塩基のイントロンが切り出され、成熟型である *XBP1s* (*XBP1* spliced form) mRNA が作られ

る。*XBP1s* mRNA からは活性をもつ転写因子 XBP1s が合成され、小胞体に蓄積した変性タンパク質を分解する反応(ER associated degradation; ERAD)に関わる分子や脂質合成酵素の転写を誘導して、小胞体ストレスの原因となる変性タンパク質の除去や小胞体の物理的容量を増大させることで小胞体ストレスを緩和する(Yoshida et al., 2003; Sriburi et al., 2007)。これら小胞体ストレスセンサーの中で IRE1 α は唯一、酵母から植物やヒトまでの真核生物に幅広く保存されている。さらに、マウスにおいては IRE1 α の欠失のみが胎性致死となることから(Harding et al., 2001; Zhang et al., 2006; Yamamoto et al., 2007; Wu et al., 2006)、IRE1 α は小胞体ストレス応答の中心的役割を果たしていると考えられる。

IRE1 α を介したスプライシングで現れる *XBP1s* mRNA は図 1B で示したようなドメイン構造を持つ bZIP 型転写因子 XBP1s をコードしている。XBP1s は N 末端側に核局在化シグナル (NLS)、塩基性ロイシンジッパードメイン(bZIP)があり、C 末端側には転写活性化ドメイン(AD)を持ち、ERSE(ER stress response element) や UPRE (UPR element) と呼ばれる配列を介して標的遺伝子の転写を誘導する (Mori, 2003)。*XBP1s* mRNA に加え、スプライシング前駆体である *XBP1u* mRNA からも機能未知のタンパク質が合成されることが報告されている (Lee et al., 2003; Tirosh et al., 2006; Yoshida et al., 2006)。図 1B に示したように、XBP1u の ORF の読み枠は IRE1a にスプライシングされるイントロンまで XBP1s と同一であり、その共通配列の部分には核局在シグナル(NLS)や塩基性ロイシンジッパー(bZIP)がコードされている。しかしながら、XBP1u には転写活性化ドメインが存在しないので、XBP1u タンパク質には転写活性化能はない。そのため、XBP1u タンパク質の機能は長らく不明であった。最近、Yoshida et al. (2006) の報告によってその機能の一部が明らかとなった。彼らによると、XBP1u タンパク質は N 末端側に NLS を、C 末端側の XBP1u 特異的配列に核外排出シグナル (NES) を持つ核・細胞質シャトルタンパク質で、その N 末端側の bZIP で XBP1s 転写因子と結合し、C 末端側の NES を介して XBP1s を複合体として核外へ隔離し、分解へ導く (図 1B、1C)。XBP1u タンパク質は特に小胞体ストレスがストレス応答によって緩和するタイミングで細胞内に蓄積することから、彼らは XBP1u タンパク質には小胞体ストレスを脱した細胞において XBP1s 転写因子によるストレス応答を急峻に停止させる役割があるというモデルを提唱している。

IRE1 α を介する *XBP1u* mRNA のスプライシングはスプライソソームを介さず細胞質で起こるユニークな反応であり(Beck et al., 2006)、小胞体ストレスによる IRE1 α の活性化機構や IRE1 α が *XBP1u* mRNA を切断するステップについては詳細に解析されている (図 1D)。非ストレス条件下では IRE1 α は小胞体内

腔で小胞体シャペロンである BiP と結合しており不活性化状態に保たれているが、小胞体ストレス条件下においては IRE1 α に結合した BiP は変性タンパク質に競合的に奪われる。単量体となった IRE1 α はホモ二量体化し、細胞質側のキナーゼドメインで自己リン酸化することで、キナーゼドメインに続くリボヌクレアーゼドメインを活性化させ、*XBPlu* mRNA の切断反応を誘起する (Bertolotti et al., 2000)。 *XBPlu* mRNA 中の切断部位にはそれぞれ図 1E 示した特徴的なステムループ構造(CxGxxGx という配列の 7 塩基ループを持つステムループ ; x は任意の塩基)が存在し、3 番目と 4 番目の塩基の結合が IRE1 α によって切断される (Shen et al., 2001)。このループの 7 塩基のうち、1 番目の C、3 番目の G、6 番目の G はスプライシングに必須で、この塩基を置換した変異体はスプライシングされなくなる。この特徴的なループは酵母 Ire1p の基質である *HAC1* mRNA の切断部位にも存在しており (Kawahara et al., 1998)、一般的な IRE1 の標的配列 / 構造のようである。このように、*XBPlu* mRNA が活性化した IRE1 α に切断され、スプライシング反応が開始されることは明らかではあるが、そもそも IRE1 α が *XBPlu* mRNA とどのように出会うかについては全く明らかになっていなかった。本研究では *XBPlu* mRNA のスプライシング機構の中でも、この *XBPlu* mRNA が IRE1 α に効率的に遭遇するメカニズムに焦点を当てて解析を行った。

真核生物の細胞内では、サイトゾルや核、ミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする mRNA は主にサイトゾルに分布する遊離リボソームで、分泌タンパク質や膜タンパク質、小胞体タンパク質などの分泌経路を通過、構成するタンパク質をコードする mRNA は小胞体膜上に分布する膜結合リボソームによって翻訳される。*XBPlu* mRNA は核-細胞質シャトルタンパク質をコードすることから、この一般則に沿って考えると、*XBPlu* mRNA はサイトゾルに分布し、遊離リボソームで翻訳されるように思われる。しかし、実際にそうであるならば、IRE1 α は小胞体膜タンパク質であるので、両者は効率的に出会えない可能性が高い。そこで、本研究では“*XBPlu* mRNA は小胞体膜上に局在し、小胞体ストレス時に活性化した IRE1 α に効率よくスプライシングされる”という仮説を立て、その検証を行った。

- 1)小胞体ストレス状態では活性化した IRE1 α によって、*XBPlu* mRNA は *XBPls* mRNA に変換されてしまうが、ストレスが緩和し、IRE1 α が不活性化した後には細胞内に *XBPlu* mRNA が蓄積し始め、XBPlu タンパク質の発現量も上昇する。

2. 材料と方法

プラスミド

pcDNA3.1-XBP1u を作製するために、プライマー F1 5'-GGggtaccCCTGGAGCTATGGTGGTGGTGGCAGCCGCG -3' と R1 5'-CGggtaccCGCTTTCAGAAGCTACACTAGCAGG-3' (*XBP1* cDNA とアニールする配列を下線で、Kpn I と Bam HI sites を小文字で表した)を用いて、ヒト *XBP1u* cDNA(+1~+1720; 全長 ORF+ 3'UTR)を RT-PCR によって構築した。この PCR 断片を Kpn I と Bam HI で消化し、pcDNA3.1 (Invitrogen) にクローニングした。XBP1 変異体は、その内部に変異を含んだプライマーと F1、R1 を用いて、オーバーラップ PCR 法によって構築した。XBP1u-ps や Int(+A)-ps については R1 の代わりに R2 を用いた。R2 は以下の配列：5'-CGggtaccCGGTGAACAGCTCCTCGttaaattagttcattaatggcttcagc-3' (*XBP1* cDNA とアニールする配列を下線で、PS プライマーとアニールする配列を太字で、Kpn I と Bam HI 部位を小文字で表した)。pcDNA3.1-SS-Int(+A)-ps については、ウシ calreticulun の小胞体ターゲティングシグナル 5'-CTGCTCCCTGTGCCGCTGCTGCTCGGCCTGCTCGGCCTGGCCGCCGC C-3'を Int(+A)-ps の開始コドンの 3'側直下に挿入した。pcDNA3.1-F-XBP1s や pcDNA3.1-F-XBP1u は Flag タグをコードする塩基配列 5'-GACTACAAGGACGA CGATGACAAG-3'を *XBP1* の開始コドンの 3'側直下に挿入した。*In vitro* 転写反応に用いるプラスミドを構築するために、野生型もしくは変異型 *XBP1* cDNA (ORF 部分のみ) の KpnI / Bam HI 断片を pBluescript II SK(-)の Kpn I / Bam HI 部位 に挿入した。

抗体

本研究では以下の抗体が用いられた；抗 GAPDH 抗体 ab9484 (Abcam)、抗 actin 抗体(Affinity BioReagent)、抗 calnexin 抗体 SPA-860 (Stressgen)、マウスモノクローナル抗 FLAG 抗体 M2 (Sigma-Aldrich)、抗 Histone H1 抗体 ab7789 (Abcam)、抗 SRP54 IgG (BD Bioscience)、抗 HSP60 抗体 SPA-806 (Stressgen)。

細胞とトランスフェクション

マウス繊維芽細胞は IRE1 $\alpha^{+/+}$ or IRE1 $\alpha^{-/-}$ マウス(manuscript submitted by Iwawaki et al.)から採取し、SV40 ラージ T 抗原で不死化した。MEF 細胞や HEK293T 細胞はウシ血清 (終濃度 10%) と L グルタミン (終濃度 4 mM) を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma)中で、37°C、5% CO₂ 条件

下で培養した。培養細胞へのトランスフェクションはリン酸カルシウム法を用いて行った（詳しくは Iwawaki et al., 2001 を参照）。

初代肝細胞の調製

8 週齢のマウス (C57BL/6J、オス) の腹腔内に Avertin を注射して麻酔させ、腹部を切開して下大静脈を露出させ、下大静脈に 24G サーフロー留置針をカニューレションし糸で固定した。横隔膜を切開し横隔膜上で下大静脈を結紮、あらかじめ 37°C に温めておいた Hanks (HANKS' BALANCED SALTS (Sigma H-4891) 100mg, 10mM Hepes, 4mM NaHCO₃, 0.5mM GEDTA (Dojin 346-01312)) を用いて灌流を開始、直ちに門脈を切断し脱血を行った。肝臓の脱血が完全に行われた後、コラゲナーゼ溶液 (0.05% Collagenase Type2 (GIBCO 17101-015), 0.8% NaCl, 5.4mM KCl, 5mM CaCl₂, 5mM NaH₂PO₄, 0.42mM Na₂HPO₄, 10mM Hepes, 6µg/ml Phenol Red, 4.2mM NaHCO₃, 0.005% Trypsin inhibitor) で灌流を行った。約 10 分間 8~10ml/min. の速度で灌流し、肝皮膜下で肝実質が崩れていくことを確認して、肝臓を摘出した。DMEM (Sigma D6546) を加え、肝臓をはさみで mince した後、ガーゼでこして 100µm の篩を用いて filtration した (図 1-12 参照)。460rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を取り除いた。この操作を 2 回繰り返した。

細胞分画

(1) ジギトニン分画法

細胞を 0.2 mM cycloheximide で処理 (37°C、5 分) した後に (図 7C ではこの操作は除く)、トリプシン処理によって回収し、遠心分離 (500 x g、5 分) によって沈降した。この細胞ペレット (3x10⁷ cells/ml) は 0.008% ジギトニン (Sigma) を含む緩衝液 A [150 mM KOAc、20 mM HEPES/KOH (pH 7.5)、2.5 mM Mg(OAc)₂、2 mM DTT、10 µg/ml leupeptin、10 µg/ml pepstatin A、1 mM benzamidine、200 U/mL RNAsin (Promega)] で懸濁し、静置 (5 分、氷上)、その細胞膜を透過させた。次に、細胞懸濁液を遠心分離 (500 x g、5 min、4°C) し、上清は“サイトゾル画分”として回収した。続いて、沈殿を 2% ドデシルマルトシド (Sigma) を含む緩衝液 A で再懸濁し、氷上で 5 分間静置した。この懸濁液を遠心分離 (500 x g、5 min、4°C) し、得られた上清を“膜画分”とした。図 7C の実験においては、細胞を回収する前に図示した抗生物質で細胞を処理した。

(2) 膜浮揚法

膜浮揚法による肝細胞の細胞分画法は Lerner et al. (2003) の方法に改良を加えて行った (図 15A)。未処理、thapsigargin 処理 (0.5 µg/ml、4 時間)、また

は puromycin 処理 (0.5 mM、15 分) した肝細胞を遠心分離 (200 x g、5 分) して回収し、ホモジナイズ緩衝液 (HB) [10 mM KOAc、10 mM K-HEPES(pH 7.5)、1.5 mM Mg(OAc)₂、1 mM PMSF、200 U/ml RNAsin (Promega)] に懸濁し、氷上で 5 分間静置した。次に、その細胞懸濁液をポッター型ホモジナイザーに移し、90%以上の細胞が破砕されるまで氷上でホモジナイズした。小胞体膜を単離するために、このホモジネートを 2 倍容量の 2.5 M スクロースを含む HKM 緩衝液[2.5 M sucrose in 150 mM KOAc、50 mM K-HEPES (pH 7.5)、5 mM Mg(OAc)₂] と混合し、その混合液 2 ml の上に 0.75 ml の 1.3 M スクロース HKM、0.5 ml の 0.25 M スクロース HKM を積層し、超遠心分離 (500,000 x g、45 分、4°C、TLA-100.3 ローター (Beckman)) した。超遠心後、2.0 M/1.3 M スクロース境界にバンドとして現れる粗面小胞体膜画分を回収し、HKM 緩衝液を足して計 3 ml にして、良く混合した後に超遠心分離 (85,000 x g、20 分、4°C) した。その結果現れる膜ペレットを元の容量の 0.25 M スクロース HKM で再懸濁し膜画分とした。サイトゾル画分を得るために、ホモジネートを遠心分離し (1500 x g、5 分、4°C)、核、ミトコンドリアや未破砕細胞をペレットとして除いた。続いて、上清を超遠心分離し (65,000 x g、20 分、4°C、TLA-100.3 ローター)、膜をペレットとして除き、その上清をサイトゾル画分とした。

(3) 核・細胞質分画法

HEK293T 細胞 (8 x 10⁷) を 1 ml の緩衝液 B[PBS containing 5% NP-40、タンパク質分解阻害剤 (緩衝液 A に同じ)] で溶解し、遠心分離 (18,500 x g、1 分、4°C) した。その沈殿を 1 ml の緩衝液 B で再懸濁して“核画分”とし、遠心上清を“細胞質画分”として回収した。

(4) ミトコンドリア・ミクロソーム・サイトゾル分画法

HEK293T 細胞 (8 x 10⁷) を 1 ml の緩衝液 C[10 mM HEPES (pH 7.4)、1 mM EDTA、0.25 M sucrose、タンパク質分解阻害剤 (緩衝液 A に同じ)] で懸濁し、シリンジ (27G 注射針) でホモジナイズした (10 strokes)。ホモジネートに含まれる細胞小器官を段階的に遠心分離し (1 回目: 3,000 x g、10 分、4°C、二回目: 8,000 x g、10 分、4°C、三回目: 100,000 x g、60 分、4°C) 沈降させて、最終的に得られた上清を“サイトゾル画分”とした。二回目、三回目の遠心分離で得られた沈殿を元の容量の緩衝液 C で再懸濁し、それぞれミトコンドリア画分、ミクロソーム画分として回収した。図 7C の実験では、二回目の遠心上清を図示した試薬で 1 時間、氷上静置し、超遠心分離 (100,000 x g、60 分、4°C) によって分画した。

Membrane-localization value (ML-value) の計算方法

対象とする mRNA (Given mRNA) の ML-value はノザンプロットでの放射

線シグナル強度をもとに、以下の計算式から導き出された。ML-value = {Given mRNA [M] / Given mRNA [Cy]} / {GAPDH mRNA [M] / GAPDH mRNA [Cy]}

RNA 抽出

Total RNA は 6 x 10⁶ 細胞から ISOGEN(Nippon Gene)を用いて抽出精製した。細胞分画後の画分からの RNA 抽出では、ISOGEN-LS (Nippon Gene)をサイトゾル画分、または膜画分に 6:1 (v/v)の比率で加え、イソプロパノール沈殿法で RNA を精製し、80%エタノールで洗い、DEPC 処理水に溶解した。

ノザンブロット解析と RT-PCR

ノザンブロッティングは基本的には標準的なプロトコール (Sambrook et al. 1989) に従って行った。RNA 10 µg を 1%アガロース変性ゲルで分離し、Hybond-N ナイロン膜(Amersham Pharmacia Biotech)にブロッティングした。XBP1u (塩基配列 +412~+853), PDI (+1~+1527), BiP (+1~1959), GAPDH (+75~+1019) and GFP をコードする cDNA をランダムプライマー法で標識し、放射性プローブとして使用した。ハイブリダイゼーション後には、ナイロン膜を 2 x SSC、65 で 2 回洗い、BAS イメージングプレート (Fuji film) に感光させた。

RT-PCR 解析では、Superscript first-strand synthesis system (Invitrogen) を用いて 5 µg の total RNA を逆転写し、得られた cDNA を rTaq ポリメラーゼ (Takara) による PCR に供した。RT-PCR に使用したプライマーセットは以下の通り。ヒト内在性 XBP1 : 5'-CCGCTCGAGGGATCCGTCTGGGTAGACCTCTGGGAGCT-3'(RT)、5'-GAACCAGGAGTAAAGACAGC-3' (PCR, sense)、5'-AGTCAATACCGCCAGAATCC-3' (PCR, antisense)。マウス内在性 XBP1 : random deoxyribonucleotide hexamer (RT) 、 5'-GAGAACCAGGAGTAAAGAA CACG-3' (PCR 、 sense) 、 5'-GAAGATGTTCTGGGGAGGTGAC-3' (PCR 、 antisense)。XBP1u-ps と Int(+A)-ps : 5'- TAGAAGGCACAGTCGAGC -3' (RT; pcDNA3.1 由来の配列とハイブリダイズする)、5'- GGTCTGCTGAGTCCGC AGC-3' (PCR, sense)、5'- CCCCAGGTGAACAGCTCCTCG-3' (PCR, antisense; PS primer と名付けた)。

In vitroにおける *XBP1* RNA の切断反応

放射性標識した RNA は野生型、もしくは変異導入型ヒト *XBP1u* cDNA の部分配列 (+373~+499) に相当する部分を Riboprobe system T7 (Promega)と

$\alpha^{32}\text{P}$ -CTP を用いて *in vitro* で作製した。これらの RNA を SF9 細胞から精製した組み換え IRE1 α と 30°C で 60 分間インキュベートした (IRE1 α の精製法については Imagawa et al. (2008) を参照)。その結果生じた RNA 断片は 8M 尿素 6% ポリアクリルアミド変性ゲルで泳動し、オートラジオグラフィーで検出した。

リポソームの調製

200 μl の phospholipid mixture for HPLC (Supelco) を窒素ガスで乾燥させ、100 μl の緩衝液 (20 mM Tris pH7.5; 250 mM sucrose) で再懸濁し、50°C で 60 分間インキュベートして脂質を水和させた。続いて、脂質懸濁液を透明になるまで SONIFIER 250 (BRANSON) で超音波処理し、umilammelar vesicle を調製した。

In vitro における XBP1 タンパク質の発現

野生型、もしくは変異型 *XBP1* cDNA 配列を組み込んだ pBluescript II SK(-) を Bam HI で直線化し、Riboprobe system T7 を用いて 5' キャップ化 RNA を合成した。この合成 RNA を Rabbit reticulocyte lysate system (25 μl ; Promega) を用いて EasyTag EXPRE³⁵S³⁵S protein labeling mix (2 μl ; Perkinelmer) 存在下で *in vitro* 翻訳した。指示のあるところでは、2 μl (図 9A、11B、12B、13B、20B) もしくは図示した量 (図 9B、図 17) の canine pancreatic microsomal membrane (CMM; Promega) を加えて翻訳した。図 9E の実験においては、CMM の代わりに 2 μl のリポソームを加えた。続いて、翻訳反応液を超遠心分離し (17,500 x g、15 分)、“上清画分”と沈殿に分けた。この沈殿を 50 μl の PBS で洗い、50 μl の PBS で再懸濁して、50 μl の 0.5 M スクロース-PBS 溶液の上に積層し、再度超遠心分離した。リポソームを使用した実験では 0.25 M スクロース-PBS 溶液を用いた。得られた沈殿を翻訳反応液と等量の PBS で再懸濁し、沈殿画分とした。上清画分と沈殿画分は SDS-PAGE で解析し、オートラジオグラフィーにて検出した。

3. 結果

XBPIu mRNA は膜上に分布している

“*XBPIu* mRNA は小胞体膜上に局在し、小胞体ストレス時に活性化した IRE1 α により効率よくスプライシングされる”という仮説の検証を行うために、まず、*XBPIu* mRNA がサイトゾル、または小胞体膜上のどちらに分布しているのかをジギトニンを用いた細胞分画法（以下、ジギトニン分画法）で調べた。ジギトニンはベータステロールと結合する界面活性剤で、細胞に低濃度で処理すると細胞膜の透過性をあげることができ、細胞質の可溶性分子を選択的に溶出させることができる(Dunn, 1983)。Stephens et al.,(2005)はジギトニン分画法を用いて、細胞の mRNA をサイトゾルに分布するものと小胞体膜上のものに分画できることを報告している。そこで、著者はこの方法を用いて HEK293T 細胞(ヒト胎児の腎臓細胞から樹立された細胞株)のサイトゾルと小胞体を分画できるかどうかを確かめた。図 2A に示したように、HEK293T 細胞をジギトニンで処理し、細胞質の可溶性分子を抽出した。続いて、非イオン性界面活性剤ドデシルマルトシド(以下、DM)で膜成分を可溶化した。ウエスタンブロット解析の結果、サイトゾルの可溶性タンパク質である GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)はジギトニン抽出画分に、小胞体膜タンパク質である calnexin は DM 抽出画分にそれぞれ分画されていた(図 2B)。そのため、以下の文章ではジギトニン抽出画分、DM 抽出画分をそれぞれサイトゾル画分、膜画分と記すこととする。ノザンブロット解析の結果、膜結合型リボソームで翻訳されると考えられる、小胞体内腔タンパク質 PDI(protein disulfide isomerase)をコードする *PDI* mRNA は予測通り、そのほとんどが膜画分に検出された(図 2C レーン 3)。一方、遊離リボソームで翻訳されると考えられる *GAPDH* mRNA は、一部は膜画分に検出されたが、主にサイトゾル画分に濃縮されていた(図 2C レーン 2、3)。興味深いことに、*XBPI* mRNA は膜画分に濃縮されていた(ノザンブロット解析に用いた *XBPI* mRNA のプローブは *XBPIu* mRNA と *XBPIs* mRNA どちらも認識するため両者の総和を検出する)。

この分画法は簡便であり、多数のサンプルをこなすためには有用な方法であるが、サイトゾルタンパク質をコードする mRNA が膜画分に混入することを見出している(data not shown)。そこで、mRNA の膜局在化傾向を正確に評価するために、“材料と方法”で示した計算式を用いて、それぞれのデータをスタンダードとなる mRNA (この研究では *GAPDH* mRNA)の値で補正し、membrane-localization value (以下、ML-value)と名づけた値により算出することにした¹⁾。この ML-value を導入することにより、mRNA の膜局在化傾向を

定量的に表すことができる (図 2D)。この実験に用いた HEK293T 細胞は非ストレス条件下で培養したので、*XBPI* mRNA は非スプライシング型の *XBPIu* mRNA として存在したはずである (図 2E)。このことは *XBPIu* mRNA が膜上へリクルートされたことを示唆している。

1) この計算方法では *GAPDH* mRNA に対してどの程度、目的の mRNA が膜上に局在化する傾向をもつか分かる。図 2 の結果は *XBPI* mRNA は *GAPDH* mRNA に比べて約 5 倍の膜局在化能があることを示している。

***XBPI* mRNA の局在場所は IRE1 α を介したスプライシングにより変化する**

次に、小胞体ストレス条件下での *XBPI* mRNA の動態を調べた。HEK293T 細胞を小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン¹⁾ やタプシガルジン²⁾ で処理すると、*XBPI* mRNA の局在が膜からサイトゾルへと劇的に変化した (図 3A 最上段パネル、右グラフ)。RT-PCR 解析の結果、サイトゾル画分に放出された *XBPI* mRNA は主に *XBPIs* mRNA であった (図 3A 最下段パネル レーン 3-6)。この結果は IRE1 α によるスプライシングによって *XBPI* mRNA の局在場所が膜からサイトゾルに変化することを示唆している。この可能性を検証するために、*XBPIu* mRNA、*XBPIs* mRNA をそれぞれ一過的に HEK293T 細胞に発現させると、*XBPIu* mRNA のみが強い膜局在化傾向を示した (図 3B)。これらの結果は、膜に分布している *XBPIu* mRNA が IRE1 α によってスプライシングされて *XBPIs* mRNA となると、膜上から解放されてサイトゾルに分布するようになることを強く示唆している。

1) ツニカマイシンは小胞体で起こる新生タンパク質への N 型糖鎖付加反応を阻害し、構造異常タンパク質を蓄積させることで小胞体ストレスを誘起する。

2) タプシガルジンは小胞体膜に存在するカルシウムポンプの阻害剤で、小胞体のカルシウムイオン濃度を急激に低下させることで小胞体内に構造異常タンパク質を蓄積させ、小胞体ストレスを誘起する。

***XBPIu* mRNA の膜上へのリクルートは 3' エクソンがコードするアミノ酸配列に依存する**

図 3B の結果は *XBPIs* mRNA には無く、*XBPIu* mRNA にのみ存在する特徴が *XBPIu* mRNA の膜局在化に必要なことを示している。次に、この特徴を明らかにするために、*XBPIu* mRNA の変異解析を行った。*XBPIu* mRNA には特徴的な 2 つのステムループ構造があり、そのループ部分が IRE1 α によって

切断される (図 1E、図 4A)。この構造は *XBPls* mRNA には存在しないので、*XBPlu* mRNA 膜局在化の決定要因候補となり得る。しかしながら、塩基置換変異によってそれぞれのステムループを破壊した D-5'stem または D-3'stem 変異 (図 4A const. num. 2、3) は *XBPlu* mRNA の膜局在に影響を与えなかった (図 4B)。さらに、それぞれのループ部分から 6 塩基を欠失させた場合でも (D-5'loop または D-3'loop、図 4A const. num. 4 または 5) *XBPlu* mRNA の膜局在に全く影響を及ぼさなかった (図 4C)。したがって、これらのステムループは *XBPlu* mRNA の膜局在化に必要なではないことが明らかになった。

図 4A に示したように、*XBPlu* mRNA の ORF は 3 つの部分から成り立っており (本論文ではそれぞれを 5'エクソン、イントロン、3'エクソンと名付けた)、スプライシングを受ける以前にも翻訳されることが知られている。IRE1 α によるスプライシングはイントロンの消失に伴って 3'エクソンのフレームシフトを引き起こす (図 1B)。3'エクソンの特定の読み枠やイントロン配列は“*XBPls* mRNA には無く、*XBPlu* mRNA にのみ存在する特徴”であり、*XBPlu* mRNA 膜局在化の決定要因候補となり得る。これらどちらの特徴が *XBPlu* mRNA 膜局在化の決定要因となるか調べるために、図 4A、Sp(-1)、Sp(-2)、Sp(-3) (const. num. 7-9) に示した *XBPls* cDNA の塩基欠失変異体を作製した。これらの変異体は全てイントロン配列を持っておらず、3'エクソンの読み枠が変化させられている。これらの変異体をから合成される mRNA の局在場所を調べたところ (図 4C)、Sp(-1)型変異を導入した *XBPls* mRNA のみが、イントロン配列を全く持たないにも関わらず、*XBPlu* mRNA と同程度の強い膜局在化能を持っていた。注目すべきことは、3'エクソンの読み枠はこの変異体 mRNA と *XBPlu* mRNA で同一である。さらに、5'エクソンとイントロンの間に終止コドンを in-frame で挿入した場合には (TGA-int; 図 5A const. num. 11)、*XBPlu* mRNA の膜局在化能は著しく低下した (図 5B)。この結果は 3'エクソンが翻訳される必要があることを支持している。さらに興味深いことに、*GFP* mRNA に *XBPlu* mRNA の 3'エクソンを in-frame fusion した場合 (GFP-X(C); 図 5A const. num. 14)、融合型 *GFP* mRNA は、全長 *XBPlu* mRNA に比べるとその程度は幾分弱くなるが、膜局在を示すようになった (図 5C)。この結果は、*XBPlu* mRNA の 3'エクソンには自身の mRNA を膜上に局在化させるのに必要十分な能力があることを示している。

図 5A に示したように、*XBPlu* mRNA の 3'側非翻訳領域(3'-UTR)は *XBPls* mRNA に比べて 371 塩基長い (図 5A const. num. 1 と 6 を比較)。この特徴は *XBPlu* mRNA 膜局在化の決定要因候補となり得るが、3'-UTR を完全に欠失させる変異を導入しても (XBPlu-ORF、図 5A const. num. 12)、*XBPlu* mRNA は有意に膜上に局在化したことから、3'-UTR は *XBPlu* mRNA の膜局在化に必

須の要素ではないと考えられる (図 5B 左パネル、レーン 1、2 と 5、6 を比較、右グラフ)。ただし、全長 *XBPlu* mRNA に比べてその ML-value が若干低いことから、3'-UTR が何らかの役割を担っている可能性は否定できない。

***XBPlu* mRNA は膜上に局在化することで効率的に IRE1 α によってスプライシングされる**

これまでの結果から、*XBPlu* mRNA が膜上に局在することが明らかとなった。では、この *XBPlu* mRNA の膜局在化能と IRE1 α にスプライシングされる効率に関係はあるのだろうか？ この疑問に答えるためには、膜上に局在化しない *XBPlu* mRNA 変異体を作製し、野生型 *XBPlu* mRNA と比較したときにスプライシング効率に差があるかどうかを調べる必要がある。この検証実験を行うために、二種類の変異型 *XBPlu* mRNA を作製した。まず、XBPlu-ps (図 5A, const. num. 16) は *XBPlu* cDNA の 3'-UTR を RT-PCR 用のプライマー配列と置換したものである。Int(+A)-ps は XBPlu-ps のイントロン部分に一塩基挿入し、3'エクソンの読み枠が *XBPlu* mRNA から *XBPls* mRNA の読み枠に変化しているものである (図 4A const. num. 10、図 5A const. num. 17、図 6A)。図 4C の結果から考えると、3'エクソンの読み枠が *XBPlu* mRNA のものと異なる *Int(+A)* mRNA の場合には膜局在化能は弱いはずである。予想通り、*XBPlu-ps* mRNA の膜局在化は Int(+A)変異によって減弱していた (図 6B、C)。次に、*Int(+A)* mRNA が、野生型 *XBPlu* mRNA と同様に、IRE1 α の基質となりえるかどうかを調べた。IRE1 α は *XBPlu* mRNA の二ヶ所のステムループを切断することでスプライシング反応を開始する。Int(+A)変異を導入した部位はステムループを構成する領域から外れているため、IRE1 α の基質としての感受性は *XBPlu* mRNA、*Int(+A)* mRNA の両方で差が無いように考えられる (図 6A)。この推測を確かめるために、*in vitro* 転写で合成した *XBPlu* RNA と *Int(+A)* RNA を組み換え IRE1 α タンパク質で切断させたところ、*Int(+A)* RNA も *XBPlu* RNA と同様に IRE1 α によって二ヶ所が切断されていた¹⁾ (図 6D)。つまり、Int(+A) mRNA は IRE1 α に出会うことさえできれば、IRE1 α に切断され得るということである。これらの前提をもとに *in vivo* でのスプライシング反応を評価したところ、*XBPlu* mRNA のスプライシング効率は Int(+A)変異の導入によって大幅に減少していた (図 6E)。この結果は *XBPlu* mRNA の膜局在化が *in vivo*におけるスプライシング効率に必要なことを強く示唆している。しかしながら、Int(+A)変異が *in vivo*におけるスプライシング反応に必要な膜局在化以外のステップ²⁾に影響を与えた可能性は否定できない。そこで、著者はこの可能性を調べるために、強制的に *Int(+A)* mRNA を膜上に局在させるための変異体 SS-Int(+A)-ps を作製した (図 5A const. num. 18)。SS-Int(+A)-ps は

小胞体内腔タンパク質 calreticulin の N 末端にある小胞体ターゲティングシグナル (シグナルペプチド) をコードする配列を in-frame で Int(+A)-ps に挿入したものである³⁾。予想通り、SS-Int(+A)変異を導入した *XBPlu-ps* mRNA は翻訳と共役して膜上にリクルートされ (図 6B レーン 5、6、図 6C)、タップシガルジンによって活性化された IRE1 α によって効率的にスプライシングされた (図 6E レーン 6)。これらの結果は、*XBPlu* mRNA の膜局在化が *in vivo* における効率的なスプライシングに必要なことを示している。

1) 切断部位変異である 5'G(-1)C と 3'G(-1)C をそれぞれ導入した *XBPlu* RNA (図 4 const. num. 19、20) の切断が起こらなかったことから、IRE1 α による切断反応は *in vitro* で正確に再現できている。

2) 例えば、IRE1 α によって切り離された 5'エクソンと 3'エクソンのつなぎ合わせる反応など。

3) N 末端にシグナルペプチドを持つタンパク質は小胞体膜上に結合したリボソームによって翻訳と共役しながら、タンパク質チャンネル translocon を通って、小胞体内腔へ移行するので、このタンパク質をコードする mRNA は小胞体膜上に係留されることとなる。

***XBPlu* mRNA の翻訳産物は自身の mRNA を mRNA-リボソーム-新生鎖 (R-RNC)複合体の一部として膜上へリクルートする**

これまでの結果から、*XBPlu* mRNA の in-frame での翻訳が自身の膜局在化に必須であることが明らかとなった。それでは、in-frame での翻訳とは具体的に何を指すのであろうか？ ひとつの可能性として、*XBPlu* mRNA から合成されたタンパク質¹⁾を介した *XBPlu* mRNA の膜上へのリクルートが考えられる。この可能性を検証するために、膜局在化能を持たない *XBPls* cDNA (図 4A const. num. 6) と *XBPlu* タンパク質を合成する *XBPlu-ORF* を共発現させることを試みた²⁾。図 7A、7B に示したように、*XBPlu-ORF* mRNA と共発現させた場合でも *XBPls* mRNA の局在がサイトゾルから膜上へ変化することは無かった。この結果は *XBPlu* タンパク質が *in-trans* に働いて *XBPl* mRNA を膜上に局在化させるという説を否定している。

もう一つの可能性としては、ここでは *cis-acting* モデルと呼ぶが、合成途中の *XBPlu* タンパク質、つまり新生鎖ポリペプチドが膜と結合することで自身をコードする mRNA の膜局在化を促進する、即ち R-RNC 複合体の一部として mRNA を膜上へリクルートするというものである (図 16 参照)。この可能性を

検証するために、*XBP1u* mRNA を発現する細胞を二種類の翻訳阻害剤 puromycin または cycloheximide で処理することにした。Puromycin は新生鎖を翻訳中のリボソームから解離させること、cycloheximide はリボソームにおける translocation 反応を阻害し R-RNC 複合体を安定化させることが知られているからである。図 7C、7D に示した様に、puromycin は *XBP1u* mRNA の膜局在化能を大幅に減少させたが (ML-value で未処理の約 1/4)、cycloheximide はそれに比べて弱い影響しか与えなかった (ML-value で未処理の約 1/2)。この結果は *cis-acting* モデルを支持している。そこで、このモデルの更なる検証を行うために *XBP1u* タンパク質の膜結合能を調べることにした。この検証のために、N 末端に FLAG タグを付加した *XBP1s*、*XBP1u* cDNA を作製し、一過的に HEK293T 細胞に導入して、それぞれがコードする F-*XBP1s*、F-*XBP1u* タンパク質を合成させた (図 8)。はじめに行なった核と細胞質の細胞分画では、*XBP1s* タンパク質はその大部分が核に分画されたが、*XBP1u* タンパク質は核・細胞質どちらの画分からも有意な量が検出された (図 8A)。この結果は、*XBP1s* タンパク質は転写因子で核に局在し、*XBP1u* タンパク質は核・細胞質をシャトルするタンパク質であるという報告とも一致している (Yoshida et al., 2006)。核タンパク質である histone H1 は核画分に、サイトゾルタンパク質である GAPDH は細胞質画分に分画されていたことから、この細胞分画は成功している。もう一つの細胞分画法では多段階の遠心分離によって細胞質 (post-nuclear) 画分をさらにミトコンドリア画分、ミクロソーム画分、サイトゾル画分に分画した (図 8B)。この実験では、ミトコンドリアタンパク質である HSP60 の分画パターンは F-*XBP1s* や F-*XBP1u* のどちらとも異なっていた。F-*XBP1s* は GAPDH と同様にその大部分がサイトゾル画分に分画された。一方、F-*XBP1u* は小胞体タンパク質 calnexin とほぼ同様のパターンで分画されていた。図 8C に示したように F-*XBP1u* は SRP54³⁾ と同様に高塩濃度条件 (0.5 M NaCl) やアルカリ条件 (0.2 M Na₂CO₃) で効率よく不溶性画分 (ミクロソーム画分) から可溶性画分に抽出されたことから⁴⁾、著者は F-*XBP1u* は SRP54 同様に膜結合タンパク質であると結論した。

XBP1s タンパク質には無いが、*XBP1u* タンパク質には強い膜結合能があることは *in vitro* においても確認することができた。*In vitro* において、*XBP1u* タンパク質をイヌ膵臓マイクログソーム⁵⁾ (canine pancreatic microsomal membrane; CMM) 存在下で翻訳させ、超遠心分離によって CMM を沈降させた場合、*XBP1u* タンパク質は沈降画分に効率よく回収された (図 9A レーン 7、8)。CMM を加えなかった場合には、大部分の *XBP1u* タンパク質が上清画分に回収された (図 9A レーン 5、6)。一方、*XBP1s* タンパク質は CMM 存在下においても上清画分に留まっていた (図 9A レーン 1-4)。図 9B、9C に示すように、

in vitro 翻訳系に加える CMM の量を増やすと、沈降画分に回収される XBP1u タンパク質の割合が CMM 量に比例して高くなったが、XBP1s タンパク質の分布には CMM の存在量は全く影響しなかった。さらに、*in vitro* で合成された XBP1u タンパク質は前述の *in vivo* の結果と同様に高塩濃度で上清画分に抽出された (図 9D)。興味深いことに、XBP1u タンパク質は *in vitro* において合成リポソームに結合するが、XBP1s タンパク質はそのような性質を示さなかった (図 9E)。以上の結果は XBP1u タンパク質が膜を構成する脂質に直接結合する可能性を示唆している。

1)ここでは、翻訳が完了してリボソームから解放された翻訳産物のことを指す。

2)この仮説通りであるとしたら XBP1u タンパク質は直接、もしくは間接的に *XBP1u* mRNA 中の未知のエLEMENTに作用して膜局在化を引き起こすはずである。図 4C の実験から *XBP1s* mRNA より 1 塩基少ない *Sp(-1)* mRNA できさえ膜局在化能があったので、*XBP1s* mRNA 中にもこの推定上のELEMENTは存在するはずである。そのため、XBP1u タンパク質存在下では *XBP1s* mRNA も膜上にリクルートされるはずである。

3)SRP54 はシグナル認識粒子(signal recognition particle; SRP)のサブユニット。SRP は小胞体膜とサイトゾルをシャトルする複合体として知られており、小胞体膜上に局在する SRP は小胞体膜タンパク質である SRP レセプターに係留されている。

4)この条件で小胞体膜貫通タンパク質である calnexin は不溶性画分に留まっており、可溶性画分へは抽出されなかった。

5)CMM は *in vitro translation* における実験で小胞体膜として一般的に使用されている。

XBP1u mRNA の膜局在化には XBP1u タンパク質中の疎水性領域が必要である

図 10A、11A に示したように、疎水性プロットによる解析から、XBP1u タンパク質には二つの高度に疎水的な領域が存在することが明らかとなった (以下、HR1、HR2 と記す)。HR2 の欠失 (dHR2) (図 11A const. num. 22) は XBP1u タンパク質の膜結合能、*XBP1u* mRNA の膜局在化能のどちらも大幅に減弱させたが、HR1 の欠失 (dHR1) (図 11A const. num. 21) は影響を与えなかった (図 11B、11C)。HR2 は *XBP1u* mRNA の 3'エクソン中にコードされる配列であることから、この発見は XBP1u タンパク質または新生鎖が *XBP1u* mRNA

を膜上に係留しており、3'エクソンにコードされるタンパク質の配列がその係留に必要であるという著者の考えを支持するものである。図 10B に示したように、HR2 は疎水性に富んだヘリックス構造を取ることが二次構造予測プログラム PSIPRED(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) によって予測され (data not shown)、この特徴は種を超えて保存されていた (図 10B、10C)。この疎水的特徴を減少させる点変異 (HR2-mut1、HR2-mut2; 図 12A 参照) は XBP1u タンパク質の膜結合能を減少させ (図 12B)、*XBP1u* mRNA の膜局在化能もまた大幅に減弱させた (図 12C)。

次に、*XBP1u* cDNA に終止コドンを挿入した C 末端欠失シリーズを作製した (図 13A const. num. 23-25)。HR2 を持たない Term2、Term3 タンパク質は予想通り膜上への結合能は無かった (図 13B)。*XBP1u* mRNA の膜局在化能もこれらの変異で大幅に減少していた (図 13C)。注目すべきことに、HR2 をその C 末端に持つ Term1 タンパク質は高い膜結合能を有していたにも関わらず、Trem1 型 *XBP1u* mRNA はほとんど膜上に分布しなかった (図 13B、13C)。この発見は新生 XBP1u ポリペプチドが R-RNC 複合体の一部として *XBP1u* mRNA を膜上にリクルートするという *cis-acting* モデルを支持する結果と考えられるが、詳しくは“考察”の項で説明する。

IRE1 α は *XBP1u* mRNA の膜局在化に必須ではない

XBP1u mRNA は IRE1 α の酵素的標的分子であるが、*XBP1s* mRNA は標的分子でないことから、IRE1 α が *XBP1u* mRNA を膜上にリクルートする可能性が考えられる。このことを明らかにするために、IRE1 α KO マウス由来の胎児繊維芽細胞 (MEF) を利用した実験を試みた。図 14A で示したように、タプシガルジン処理によって *BIP* mRNA や *XBP1* mRNA は野生型、IRE1 α KO マウス由来のどちらの MEF でも発現が誘導される。この結果は *BIP* mRNA や *XBP1* mRNA の転写誘導が IRE1 α には依存せず、小胞体ストレスで活性化された ATF6 によって行われるという報告と一致する (Yoshida et al., 2003; Yamamoto et al., 2007; Wu et al., 2007)。予想通り *XBP1* mRNA のスプライシングは野生型 MEF においてのみ観察された (図 14A)。次に図 14B で示すように野生型もしくは IRE1 α KO MEF における *XBP1* mRNA の局在を調べた。非ストレス条件化における *XBP1* mRNA の発現量は少なすぎてその局在は決定できなかったが、小胞体ストレス下では、*XBP1* mRNA の局在は IRE1 α KO 細胞では野生型細胞と異なり十分に膜に局在化していることが明らかとなった (図 14B 最上段パネル レーン 3、4 とレーン 7、8 を比較)。この結果は、IRE1 α によるスプライシングは *XBP1* mRNA の局在を膜からサイトゾルへ変化させるというこれまでの結果を支持したが、IRE1 α が *XBP1u* mRNA の膜局在化に貢献するという

可能性を否定するものであった。

¹⁾IRE1 α KO MEF 細胞においては、小胞体ストレス条件下においても全ての *XBPI* mRNA は非スプライシング型である *XBPIu* mRNA として存在するため (図 14A 最下段パネルレーン 4、14B 最下段パネルレーン 7、8)、図 14B 最上段パネルレーン 7、8 における *XBPI* mRNA は *XBPIu* mRNA を表している。

内在性 *XBPIu* mRNA も R-RNC 複合体の一部として膜上に局在化している

これまでの実験結果は、*XBPIu* mRNA は自身の 3'エクソンがコードする新生鎖によって R-RNC 複合体の一部として膜上に係留されており、IRE1 α によってスプライシングされた後には 3'エクソンがフレームシフトし、膜から解放されるというモデルを支持している。ただし、この結果のほとんどはトランスフェクションによって一過的に発現された *XBPIu* mRNA の挙動から得られたものであり、分画方法もジギトニン分画法しか用いられていない。著者はこの方法で得られた結果が十分信頼できるものだと考えてはいるが、内在性 *XBPI* mRNA を対象にし異なる分画方法を用いた場合でも同様の結論が得られるかどうかを検証することは非常に重要である。分画方法としては図 15A に示した膜浮揚法を用いた。まず、ホモジナイザーを用いて細胞を破壊し、膜画分、サイトゾル画分をそれぞれ等密度遠心分離法、沈降速度遠心分離法により分画した。細胞は細胞質の体積が大きく、機械的破壊に適したマウスから調製した初代肝細胞を用いた。ウェスタンブロット解析の結果サイトゾルのタンパク質 beta-actin、小胞体膜タンパク質 calnexin はそれぞれサイトゾル画分、膜画分にのみ検出された (図 15C)。ノザンブロット解析の結果、*GAPDH* mRNA はジギトニン分画法と同様に、主にサイトゾル画分に分画された。これらの結果は膜浮揚法によって膜とサイトゾルが分離できたことを示している。RT-PCR の結果から非ストレス条件下では *XBPIu* mRNA は大部分が膜画分に分画されていた (図 15B レーン 1、2、5、6)。IRE1 α を介したスプライシングを誘導するために肝細胞をタプシガルジンで処理すると、*XBPIs* mRNA が現れ、その大部分はサイトゾル画分に分画された (図 15B 最上段パネルレーン 1-4)。このような小胞体ストレス状態においてさえ、*XBPIu* mRNA は膜画分に分画されていた。この結果は、*XBPIu* mRNA は膜上に局在化し、IRE1 α によってスプライシングを受けて *XBPIs* mRNA に変換されると膜から解放されるという結論が膜浮揚法を用いて内在性 *XBPI* mRNA を対象にした場合でも導かれたということになる。次に、肝細胞を puromycin で処理し、新生鎖を翻訳中のリボソームから解放させた場合には、*XBPIu* mRNA の分布が膜画分からサイトゾル画分へと変化した (図 15B 最上段パネルレーン 5、6 とレーン 7、8 を比較)。

この結果は、膜浮揚法を用いた場合でも内在性 *XBPIu* mRNA は R-RNC 複合体の一部として膜上にリクルートされることを示している。これらの結果を合わせて考えると、*XBPIu* mRNA は自身の 3'エクソンがコードする新生鎖によって R-RNC 複合体の一部として膜上に係留されており、IRE1 α によってスプライシングされた後には 3'エクソンがフレームシフトし、膜から解放されるというモデルは二種類の原理の異なる細胞分画法で支持され、内在性 *XBPI* mRNA においても当てはまることが明らかとなった。

4. 考察

XBP1u mRNA が膜上に局在化する意義

本研究から *XBP1u* mRNA は膜上に局在化することが明らかとなった (図 2C、2D)。図 6 に示した Int(+A)変異体を用いた実験から、*XBP1u* mRNA は膜上にリクルートされない限り、効率的にスプライシングされなかった (図 6B、6C、6E)。言い換えると、*XBP1u* mRNA は小胞体膜上に存在し、膜タンパク質である IRE1 α の基質となっている可能性が高い。最近、Hollien and Weissman (2006) は *Drosophila* の細胞において、分泌・膜タンパク質をコードし、小胞体膜上に分布する mRNA のいくつかのものは IRE1 の RNase 活性によって分解されることを報告している。この現象は小胞体へ移行するタンパク質の負荷を減少させる役割を持っていると考えることができる。酵母における IRE1 のスプライシング標的である *HAC1* mRNA も膜上に局在化することが報告されていることから (Diehn *et al.*, 2000)、膜上に局在化する能力は IRE1 の基質となるための共通の特徴と考えられる。

XBP1u mRNA が局在化する膜

ジギトニン分画法、膜浮揚法を用いた実験から *XBP1u* mRNA は膜上に局在することが明らかになった (図 2C、図 15B)。ただし、どの細胞小器官の膜に分布するかを決定することはできなかった。小胞体膜タンパク質である IRE1 α に効率よくスプライシングされること (図 2E、14A)、Int(+A)型 *XBP1u* mRNA を強制的に小胞体に局在化させたときに高効率で IRE1 α によってスプライシングされるようになったことの二点を考慮すると (図 6)、*XBP1u* mRNA は主に小胞体膜に局在化するように思われる。ただし、*XBP1u* mRNA を膜に係留する *XBP1u* タンパク質が人工リポソームにも結合することから (図 9E)、*XBP1u* mRNA は脂質二重膜であれば特異性無く分布するのかもしれない。過去に各々の細胞小器官が持つ膜の表面積を比較した報告があり、それによると小胞体膜はサイトゾルに接する膜総量の約 7 割の表面積を占めていた (Weibel *et al.*, 1969; Bolender, 1974)。この結果を考慮すると脂質二重膜に特異性無く結合した場合でも高い確率で小胞体膜に局在化でき、IRE1 α に効率良くスプライシングされ得るのかもしれない。この問題はより洗練された細胞分画法、もしくは *in situ* hybridization によって明らかにする必要がある。

XBP1u mRNA が膜に局在化する機構

本研究で行なった変異解析によって、*XBP1u* mRNA の膜局在化は自身の 3'

エクソン (HR2 をコードする) のアミノ酸配列により決定されていることが明らかとなった(図 4、11、12)。この結論を支持するように、*GFP*mRNA に *XBP1u* mRNA の 3'エクソン部分を in-frame で融合した場合、その融合型 mRNA (*GFP-X(C)* mRNA) の局在はサイトゾルから膜へ変化した(図 5C)。*GFP-X(C)* タンパク質が膜結合能を持つことも確認した(図 17)。注目すべきことに、HR2 の欠失は *XBP1u* タンパク質の膜結合能だけでなく、*XBP1u* mRNA の膜局在化能までも失わせた(図 11)。これらの結果によって、*XBP1u* タンパク質の HR2 依存的膜結合と *XBP1u* mRNA の膜へのリクルートが密接に関連することが示された。これらの観察結果を受け、著者は新生 *XBP1u* ポリペプチド鎖が翻訳と共役しながら自身をコードする mRNA を膜上へリクルートするというモデルを提案する(図 16)。図 7C、7D で示したように、細胞を puromycin で処理し、R-RNC 複合体から新生鎖を解放させると、*XBP1u* mRNA の膜局在化能は大幅に減少したが、異なる作用機序の翻訳阻害剤である cycloheximide 処理では弱い影響しか観察されなかった。重要なことに、HR2 をその C 末端に持つ Term1 変異型 *XBP1u* タンパク質は膜結合能を持つにも関わらず、自身をコードする mRNA を膜にリクルートすることができなかった(図 13)。この発見は著者の提案したモデルと以下の理由で一致する; Term1 変異体における HR2 はまさに新生鎖の C 末端に位置しているので、自身をコードする mRNA の翻訳が終了したときに HR2 はリボソームの中に埋まっており、膜と相互作用できないことが予想される。Kowarik et al. (2002) は、新生鎖がリボソームの外に出現するまでに通過するリボソームトンネルの長さは 39~40 アミノ酸長であることを報告している(図 18)。野生型 *XBP1u* タンパク質においては、HR2 の下流に 53 残基のアミノ酸配列が存在するので、自身をコードする mRNA の翻訳がまだ続いている間に HR2 がリボソームの外に現れるはずである。これらの結果は著者の提案したモデルを支持するものである。

細胞内の物質輸送には、微小管やアクチン線維に沿った輸送システムが用いられる場合が多々ある。*XBP1u* mRNA の膜局在化にもそのようなシステムが利用されている可能性がある。しかしながら、微小管重合阻害剤である nocodazole やアクチン繊維重合阻害剤である cytochalasin B で細胞を処理した場合でも、*XBP1u* mRNA のスプライシングにはほとんど影響が無かった(図 19)。考察“*XBP1u* mRNA が膜上に局在化する意義”の項で記したように、*XBP1u* mRNA が効率的にスプライシングされるためには自身の膜への局在化が必須であることを考慮すると、*XBP1u* mRNA は微小管やアクチン線維を介しては膜上にリクルートされてはいないように思われる。

HR2に続くC末端領域の長さ

XBP1u タンパク質の HR2 が完全にリボソームの外に露出された後、リボソームは 13~14 コドン¹⁾を翻訳して終止コドンに達する。真核生物のリボソームの翻訳スピードは秒当たり 3~4 アミノ酸であることを考えると (Braakman et al., 1991)、HR2 を露出したリボソームは 3~5 秒程度 R-RNC 複合体として *XBP1u* mRNA 上に留まることとなる。この時間は *XBP1u* mRNA を膜にリクルートさせるのに十分ではないように思われる。しかしながら、R-RNC 複合体をより長時間保持させる目的で XBP1u タンパク質の C 末端に 123 残基の配列を付加した変異体 XBP1u-FS (図 20A const. num. 26) でも、その mRNA の膜局在化能は野生型と差は無かった (図 20B)。XBP1u-FS タンパク質の膜結合能も野生型とほぼ同等であったことから (図 14C)、*XBP1u* mRNA の膜局在化に必要な HR2 に続く C 末端領域は 53 残基で十分であることが示唆された。興味深いことに、XBP1u-FS タンパク質を *in vitro* で合成させた場合、その推定分子量の約 54 kDa のバンドに加えて、野生型 XBP1u タンパク質 (約 35 kDa) とほぼ同じ大きさのバンドが検出された (図 20C レーン 4)。この結果は XBP1u mRNA の終止コドン周辺に翻訳休止配列が存在することを示唆している。さらに、このバンドは膜結合画分にのみに検出された (図 20C レーン 3、4)。この結果は、R-RNC 複合体に含まれた状態の新生 XBP1u ポリペプチドは単独の XBP1u タンパク質より安定に膜上に局在できることを強く示唆しており、新たな翻訳調節機構の発見につながる可能性が示された。

¹⁾HR2 に続く C 末端領域 (53 アミノ酸残基) からリボソームトンネル長 (39~40 残基) を差し引いた数

XBP1u タンパク質の局在場所

本研究から、*XBP1u* mRNA に加えて、XBP1u タンパク質もその一部は膜に分布することが明らかとなった (図 8、9)。図 10 に示すように、XBP1u タンパク質の疎水的領域 HR2 は、その膜結合に必須である。一般に、高度に疎水的な配列は分泌タンパク質や膜タンパク質の小胞体局在化シグナルとなる場合があるので (Hegde and Bernstein, 2006)、HR2 がそのようなシグナルとなっている可能性も考えられる。しかしながら、XBP1u タンパク質は塩処理で膜から抽出されるので (図 8C、9D)、小胞体内腔側、または膜貫通タンパク質ではなく、膜結合タンパク質であると思われる。XBP1u タンパク質は人工リボソームにも結合したので、HR2 を介して膜に直接結合していることが推測される。

Yoshida et al. (2006) は、序論でも記したように、XBP1u タンパク質は核と細胞質をシャトルすることを報告している。本研究においても、核と細胞質を分画した場合には、XBP1u タンパク質はどちらの画分にも同等に検出された

ことから彼らのモデルとの一貫性はある (図 8A)。本研究ではさらに、XBP1u は細胞質の中では主に膜上に局在することも見出している (図 8B)。*XBP1u* mRNA は膜上に分布することを考慮すると、*XBP1u* タンパク質はまず膜上で膜結合タンパク質として合成され、翻訳が完全に終了し、リボソームから解放された後はいずれ膜から解離し、核・細胞質シャトルタンパク質として働き始めるのかもしれない。

XBP1u タンパク質の機能

序論でも記したように、XBP1u タンパク質は小胞体ストレスが緩和したときに XBP1s 転写因子の分解を促し、XBP1s によるストレス応答を急峻に停止させる negative-feedback regulator としての機能があることが報告されている (Yoshida et al., 2006)。ただし、この機能は翻訳が完了した完成品のタンパク質の機能である。本研究では、リボソームによって合成されている最中の XBP1u タンパク質は自身をコードする mRNA を R-RNC 複合体の一部として膜上に局在化させるという機能を見出した。これは、XBP1u タンパク質が新生鎖の状態と翻訳が完了した状態で機能が変化することを示しており、非常に興味深い。大腸菌において、SecM は新生鎖の状態で機能を持つことが報告されている (Nakatogawa et al., 2001)。これまで、タンパク質の機能は翻訳が完了したもののばかりが解析されてきたが、新生鎖の状態に着目すれば、これまで見出されなかったタンパク質の新たな機能が次々と発見されるかもしれない。

HR2 と NES の関係

Yoshida et al. (2006) は XBP1u タンパク質の C 末端側には核排出シグナル NES があり、N 末端側の核内移行シグナル NLS と共同して核と細胞質をシャトルすることを報告している。本研究で明らかにした、XBP1u タンパク質の膜結合や *XBP1u* mRNA の膜局在化に必須の疎水性領域 HR2 はその NES と同一の領域である。これらを合わせて考えると、新生鎖の状態ではその領域は *XBP1u* mRNA を膜にリクルートするために利用され、翻訳が完了し、膜から解放された後には NES として機能する可能性が考えられる。

XBP1u mRNA がスプライシング後に小胞体膜から離れる意義

XBP1u mRNA は非ストレス状態では膜に局在化するが、小胞体ストレス条件下では、活性化した IRE1 α によってスプライシングされ、膜から解放されることが本研究から明らかになった (図 3)。考察“*XBP1u* mRNA が膜上に局在化する意義”の項で議論したように、*XBP1u* mRNA の膜局在化にはスプライシング反応を効率化する意義があると思われるが、*XBP1s* mRNA が膜から解離

される生理的意義はあるのだろうか？この項ではこの疑問に対する答えとなるかもしれない二つの可能性について議論したい。

一つ目は、*XBPIs* mRNA が IRE1 α の基質となるかもしれない可能性である。図 6D に示したように、*in vitro* 転写によって合成した *XBPIu* RNA は、組み換え IRE1 α によって二ヶ所のステムループが切断される。驚いたことに、*XBPIs* RNA を切断させた場合でも、丁度 5'-エクソンと 3'-エクソンの境界で切れたと思われる切断断片が現れていた (図 21)。切断効率は *XBPIu* RNA に比べると低かったが、有意な量が切断されていた。この結果から推測すると、もし *XBPIs* mRNA が膜から解放されず、膜局在し続けたとしたら、活性化した IRE1 α に切断されてしまうこととなり、エネルギーの無駄となる。*XBPIs* mRNA が膜から解放されることによってこのような非生産的な反応が回避されている可能性が考えられる。

二つ目は、*XBPIs* mRNA や *XBPIu* mRNA がコードするタンパク質の局在を考慮した可能性である。本研究から明らかになったように、*XBPIu* mRNA は膜上に、*XBPIs* mRNA はサイトゾルに局在するので、それぞれがコードするタンパク質は異なる場所で合成されると考えられる。序論にも記したように、*XBPIu* タンパク質は *XBPIs* 転写因子と結合し、その分解を促す働きがある。もし、*XBPIs* mRNA が *XBPIu* mRNA と同様に膜上に局在したとしたら、それぞれがコードするタンパク質は同じ場所で合成される。このような状況では、*XBPIs* 転写因子は *XBPIu* タンパク質によって過剰に分解されてしまい、小胞体ストレス時にもストレス応答を引き起こせない可能性がある。それ故、*XBPIs* mRNA が膜からの解放されることによって、*XBPIs* 転写因子が *XBPIu* タンパク質に過剰に分解されるのを回避し、小胞体ストレス時に核に効率良く輸送されているのかもしれない。

結論

本研究の結論として著者は、図 16 に示したように、*XBPIu* mRNA は自身がコードする新生鎖によって膜上へリクルートされるというモデルを提唱する。この現象は膜タンパク質 IRE1 α によってなされる *XBPIu* mRNA の効率良いスプライシングにとって、必須の条件であるように思われる。このモデルはジギトニン分画法を用いて導かれたものであるが、肝細胞を膜浮揚法によって分画し、内在性 *XBPI* mRNA を観察した場合でも同様の結果が得られている (図 15)。細胞内における mRNA の局在化は、分泌・膜タンパク質をコードする mRNA がシグナル認識粒子 (SRP) 依存的に膜上に局在化する現象に加えて、細胞分裂や胚発生、細胞運動、シナプス形成などの様々な場面で報告されている (Du et al., 2007; Palacios and Johnston, 2001)。これらの事例では、mRNA の局在化

が自身のコードするタンパク質を適切な場所に局在化させるために利用されているように考えられている。それとは対照的に、本研究で明らかになった **XBP1u mRNA** の膜局在化では、**mRNA** が適切な場所に局在化するために、自身がコードするタンパク質を利用している。このような例は、著者の知る限り、これまでに記述されておらず、全く新しい **mRNA** の局在様式を見出したものと考えている。

5. 図表

A

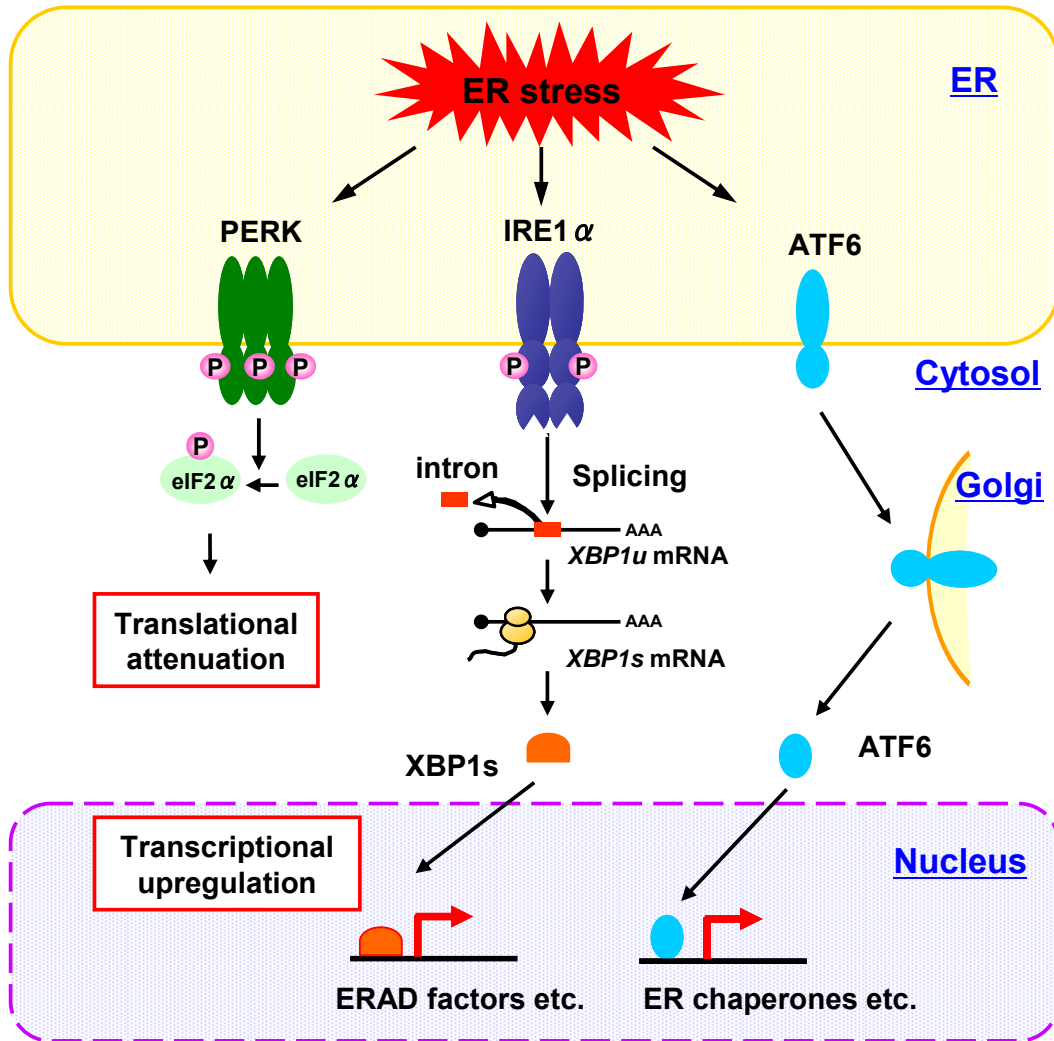
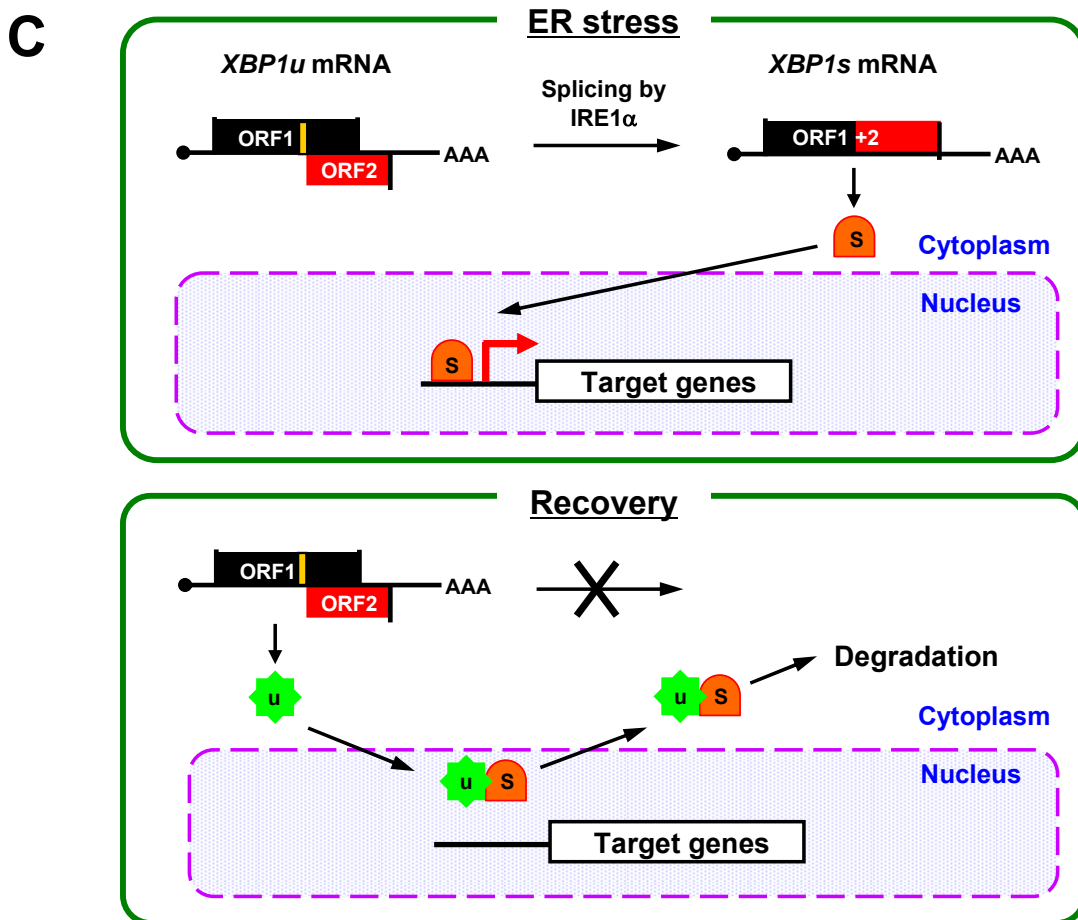
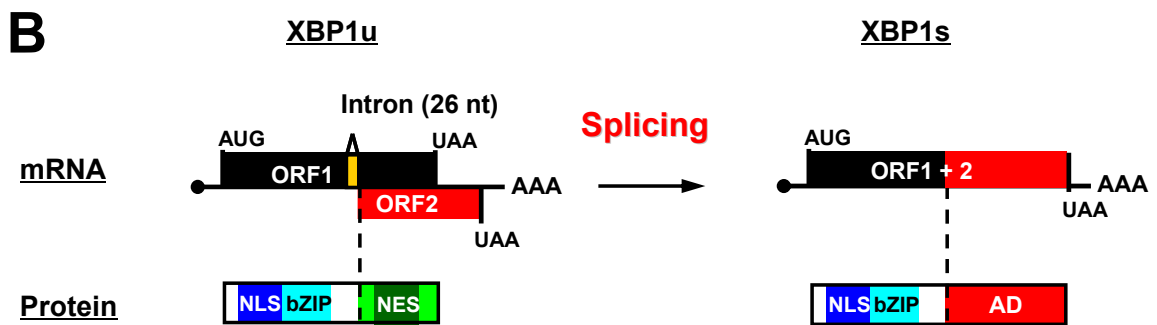


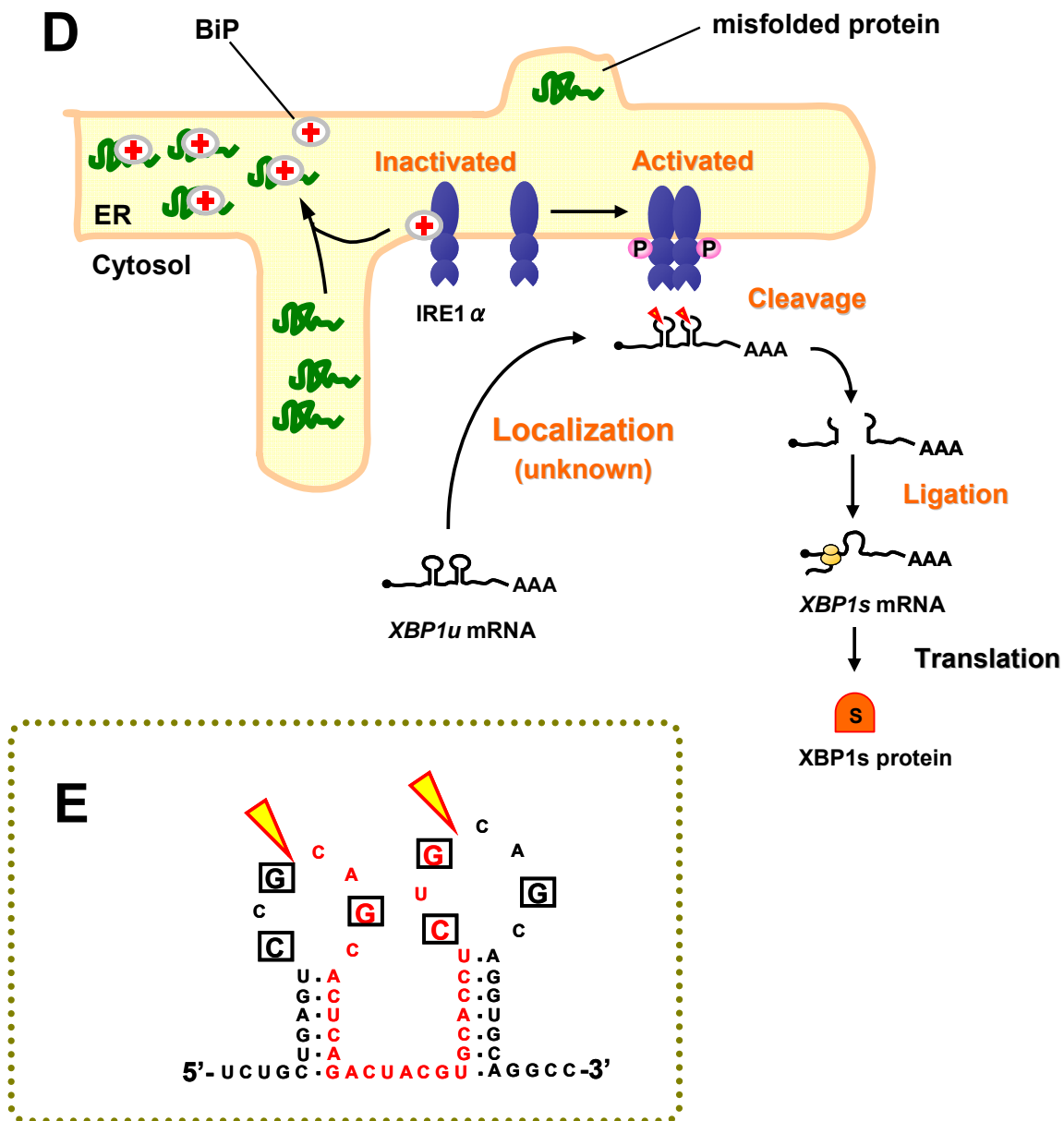
図1 序論補足図

(A) 哺乳類動物細胞における主要UPR経路 哺乳動物細胞には主に3種類の小胞体ストレスセンサー分子PERK、ATF6、IRE1αが存在する。PERKは小胞体ストレスを感知するとサイトゾル側のキナーゼドメインが活性化し、翻訳開始因子eIF2αをリン酸化して翻訳開始反応を阻害する。ATF6はサイトゾル側にbZIP型転写因子ドメインをもつ膜貫通タンパク質で、小胞体ストレスを感知すると小胞体からゴルジ体へ輸送され、ゴルジ体に局在するS1PプロテアーゼやS2Pプロテアーゼによってその膜貫通ドメイン切断され、転写因子ドメインが膜から解放されて、核へ移行し、小胞体分子シャペロンやフォールディング酵素などの転写を促進させる。IRE1αは小胞体ストレスでサイトゾル側のリボヌクレアーゼドメインが活性化し、細胞質で転写因子XBP1の前駆体(XBP1 unspliced form; XBP1u) mRNAをスプライシングする。スプライシングされたXBP1(XBP1s) mRNAからは活性をもつ転写因子XBP1sが合成され、小胞体に蓄積した変性タンパク質を分解する反応(ER associated degradation; ERAD)に関わる分子や脂質合成酵素などの転写を誘導する。



(B) XBP1u、XBP1sのORF構造とタンパク質のドメイン構造 *XBP1u* mRNAには二つの読み枠の異なるORF (ORF1、ORF2) があり、ORF1が翻訳されてXBP1uタンパク質が合成される。IRE1 α によるスプライシングによってイントロン (ORF1中のオレンジ四角) が除かれ、ORF1とORF2が融合して*XBP1s* mRNAとなり、そこから活性のある転写因子XBP1sが合成される。図中のNLSは核移行シグナル、bZIPは塩基性ロイシンジッパードメイン、NESは核外排出シグナル、ADは転写活性化ドメインを示す。

(C) XBP1uタンパク質による小胞体ストレス応答のnegative-feedback regulation (上パネル) 小胞体ストレス時には*XBP1u* mRNAは活性化したIRE1 α にスプライシングされ、そこからXBP1s転写因子 (オレンジ半円) が合成されて下流の遺伝子の転写を促進する。**(下パネル)** ストレスが緩和した後は、IRE1 α は不活性化し*XBP1u* mRNAのスプライシングは起こらないので、そこからXBP1uタンパク質 (緑色星形) が合成される。XBP1uはN末端側のNLSで核に移行し、bZIPで核内に残っているXBP1sと結合し、さらにC末端側のNESで複合体としてXBP1sを核外に連れ出してその分解を促す。



(D) XBP1u mRNAの細胞質スプライシング機構 IRE1 α は非ストレス時はBiPに結合され、不活性化状態を保っているが、小胞体内に変性タンパク質が現れるとそのBiPが競合的に変性タンパク質に奪われ、単量体となったIRE1 α はホモ二量体化し活性化する。活性化したIRE1 α はサイトゾル側でXBP1u mRNAの二ヶ所のステムループを切断する(図中“Cleavage”の反応)。この反応によって26塩基のイントロンが除かれ、5'側エクソンと3'側エクソンが未同定のligaseによってつなぎ合わせられ(図中“Ligation”の反応)、スプライシングが完了する。本研究以前には、XBP1u mRNAが膜上に局在化するステップ(図中“Localization”の反応)は記述されていない。

(E) XBP1u mRNAの細胞質スプライシング部位 XBP1u mRNAのIRE1 α に切断される部位には特徴的なステムループ構造(CxGxxGxという7塩基のループを持つステムループ;xは任意の塩基)が存在し、3番目と4番目の塩基の結合がIRE1 α によって切断される(黄色矢頭)。このループの7塩基のうち、1番目のC、3番目のG、6番目のG(黒四角で囲った塩基)はスプライシングに必須で、この塩基を置換した変異体はIRE1 α によって切断されなくなる(図6D レーン5、6をレーン2と比較)。

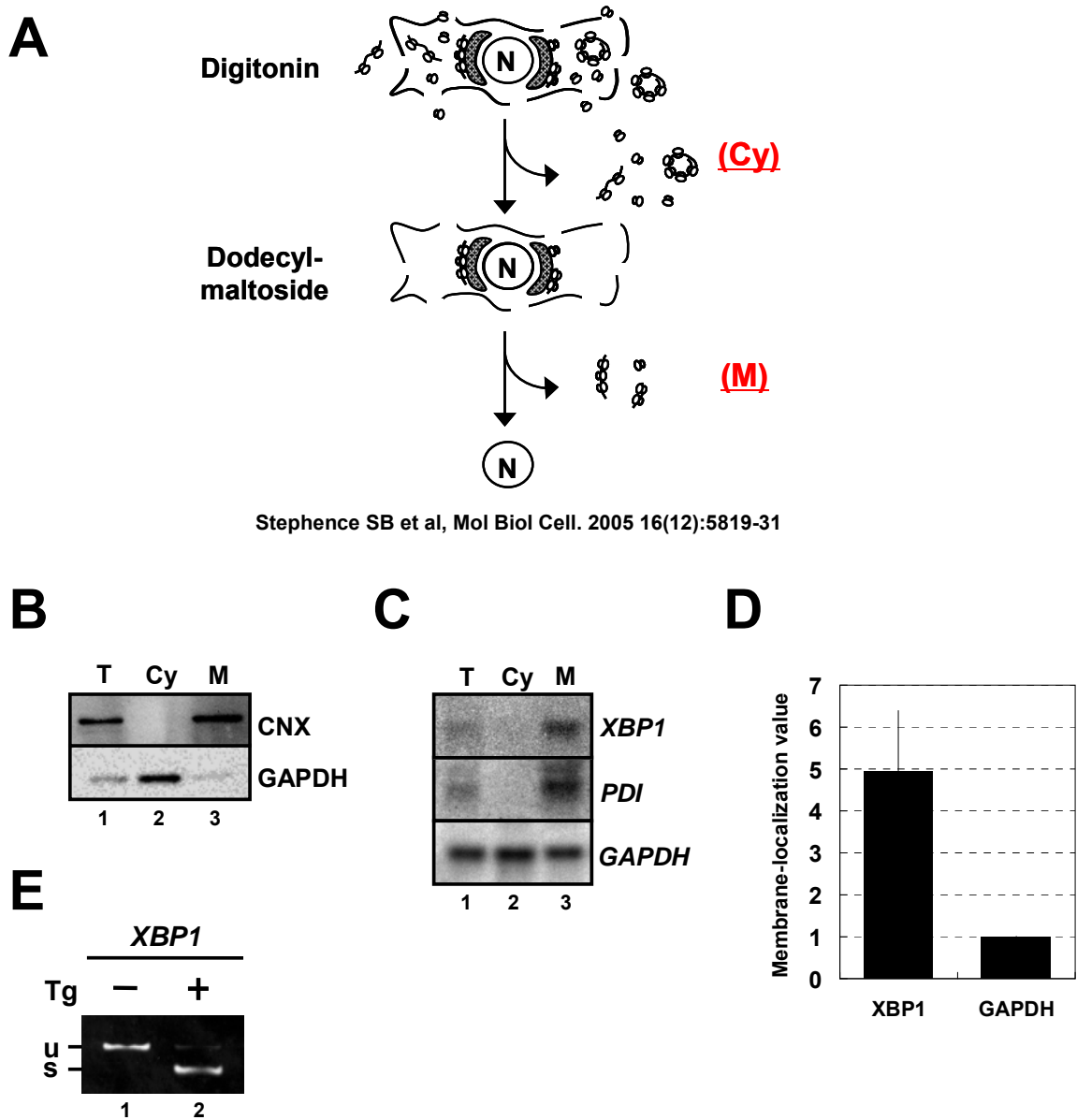


図2 非ストレス下では*XBP1* mRNAは膜上に分布する

(A)ジギトニン分画法の概略図。ジギトニン抽出（サイトゾル）画分を“Cy”、ドデシルマルトシド抽出（膜）画分を“M”と表した。

(B) HEK293T細胞のTotal (T)、ジギトニン抽出 (Cy)、dodecyl-maltoside抽出 (M) ライセート (10 μ g) を抗calnexin抗体、抗GAPDH抗体を用いてウエスタンブロッティングで解析した。

(C) Bで用いたライセートから調製したtotal RNA (10 μ g) をノーザンブロットで解析した。

(D) Cで示したそれぞれのmRNAのmembrane-localization valueを“材料と方法”で示した計算式で算出し、三回の実験からの平均と標準偏差で表した。

(E) Thapsigargin (Tg; 1 μ g/ml) で60分間処理、または未処理のHEK293T細胞からtotal RNAを調製し、RT-PCRでIRE1 α を介するスプライシング部位（イントロン）を含んだXBP1断片を増幅した。RT-PCR断片の位置は非スプライシング型を“u”として、スプライシング型を“s”として表した。

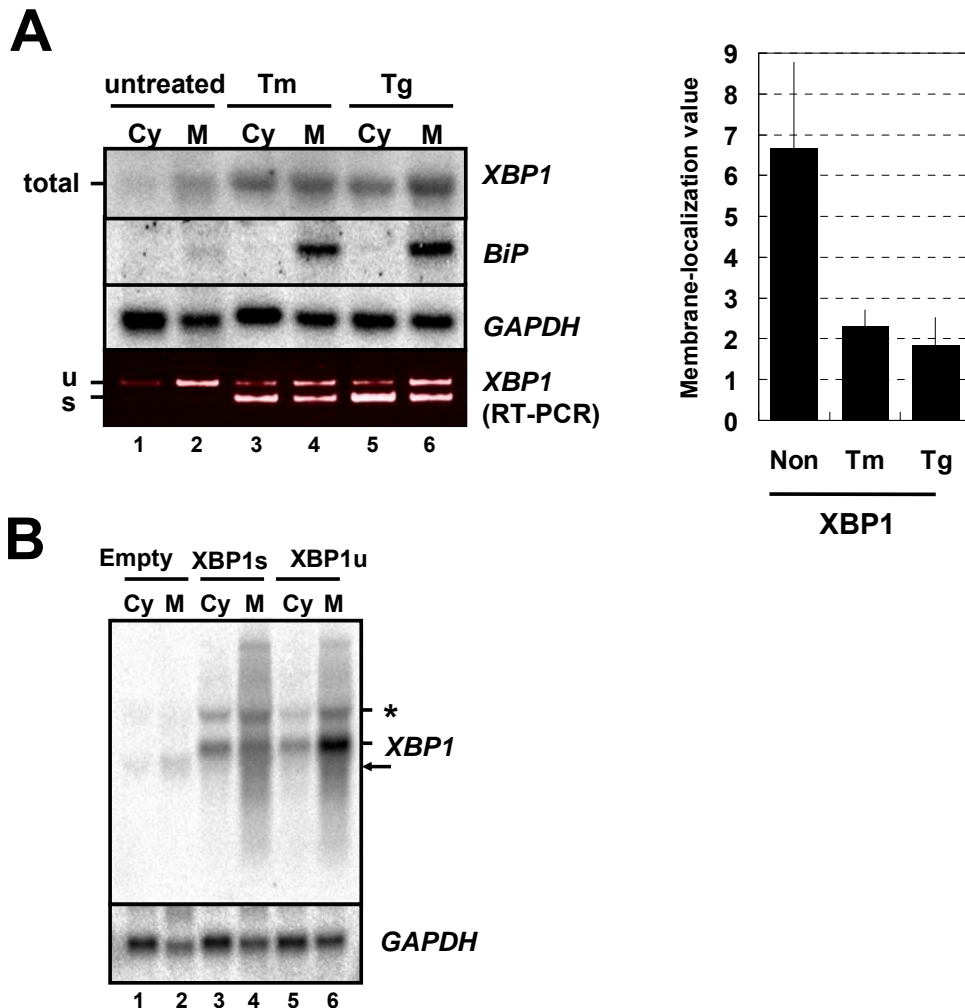


図3 *XBP1* mRNAはスプライシングされた後には膜から解放される

(A) (左パネル) 未処理(untreated)、tunicamycin処理(Tm; 2 μ g/ml 6時間、thapsigargin処理(Tg; 0.5 μ g/ml 6時間)したHEK293T細胞をジギトニン抽出(Cy)、またはDM-抽出(M)したライセートから抽出したtotal RNAをノーザンブロット(10 μ g)とRT-PCR(5 μ g)により解析した。RT-PCRのプライマーセットは図2Eと同じものを使用した。RT-PCR断片の位置は非スプライシング型を“u”として、スプライシング型を“s”として表した。(右パネル) membrane-localization valueを三回の実験からの平均と標準偏差で表した。

(B) XBP1u、XBP1s発現プラスミド (pcDNA3.1-XBP1u、pcDNA3.1-XBP1s) または空ベクター(pcDNA3.1)のトランスフェクション24時間後、HEK293T細胞を図2Cと同様の方法でRNA解析した。*XBP1* mRNA発現プラスミドに依存するマイナーバンド (アスタリスクで示した) が観察されるが、以下の実験では無視した。内在性*XBP1* mRNAの位置は矢印で示した。

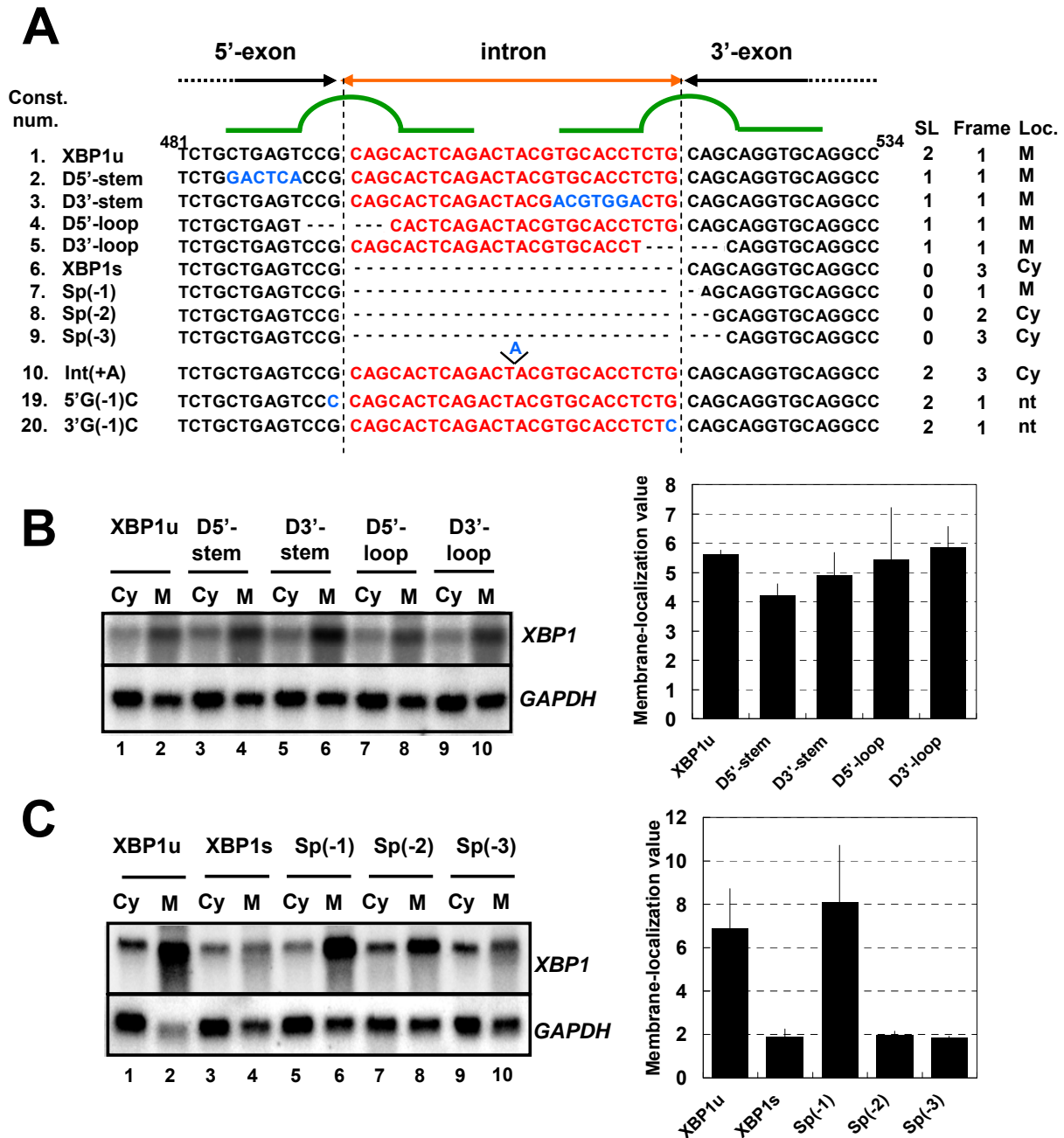


図4 *XBP1u* mRNAの膜上へのリクルートは3' エクソンの読み枠に依存する

(A) スプライシング部位に図示した変異を含むXBP1コンストラクトをpcDNA3.1ベクターに組み込み、HEK293T細胞に一過的に発現させた。*XBP1u* cDNAの481~534番目の塩基配列もしくはその領域に相当する部分を図示した (開始メチオニンコドンのAを“1”とする)。赤文字と青文字はそれぞれイントロン配列と変異塩基 (5' D-stem、3' D-stem、5' G(-1)C、3' G(-1)Cでは塩基置換、Int(+A)では塩基挿入) を示す。*XBP1u* mRNAは緑線で示した2ステムループ構造をとることが予測されており (図1E参照)、この構造はIRE1aによるスプライシングに必須である。“Const. num.”はコンストラクション番号を指す。ステムループの数(SL)と3'エクソンの読み枠(Frame)についても記した。図4B、4C、6Cの結果から、それぞれのmRNAの局在 (Loc.)をまとめた (膜: M、サイトゾル: Cy、not tested: nt)。

(B, C) プラスミド由来の変異体*XBP1* mRNAの細胞内局在を図2Cと同様の方法で解析した。左パネルには、3回の実験結果から算出されたそれぞれの変異体のML-valueを示した。

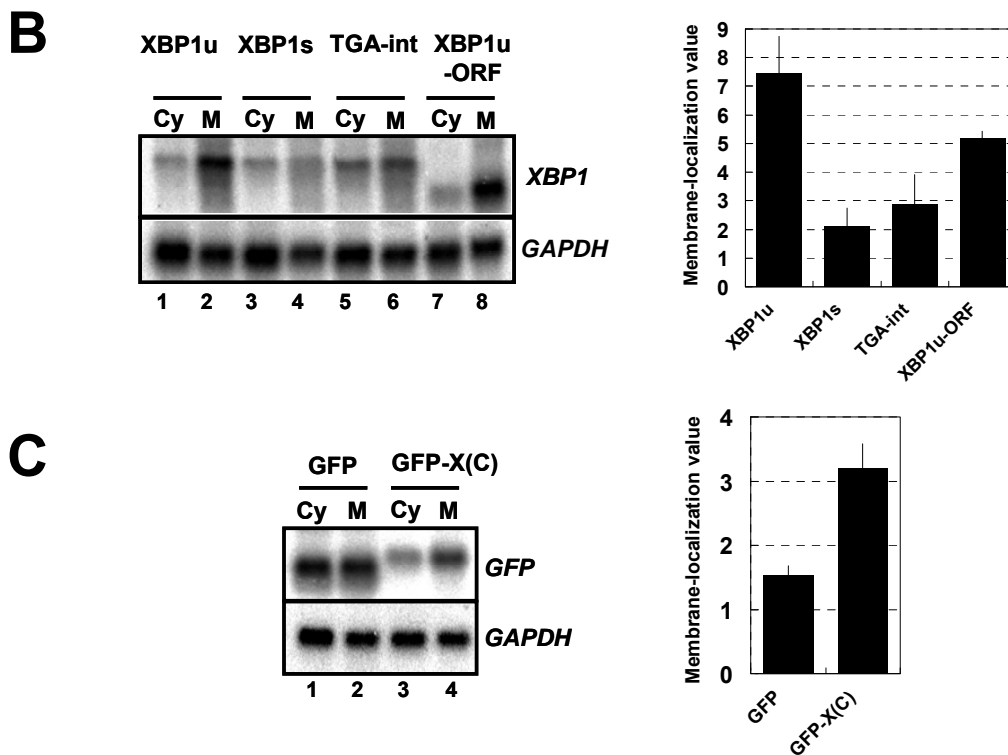
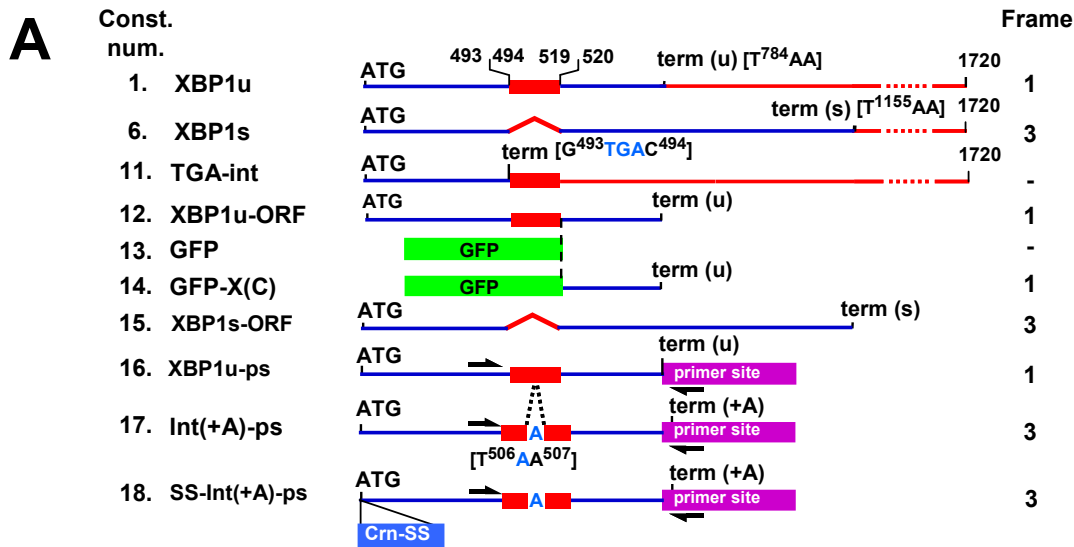


図5 *XBP1u* mRNAの膜上へのリクルートは3' エクソンがコードするアミノ酸配列に依存する

(A) 図示したコンストラクトをpcDNA3.1ベクターに組み込み、HEK293T細胞に一過的に発現させた。塩基の位置は*XBP1u* mRNAを元に番号を付けた(開始メチオニンコドンのAを“1”とする)。赤四角はイントロンを示す。オレンジ線は3'-UTRを、紫四角はRT-PCR増幅用の付加配列を示す(PCRプライマー部位は矢印で示す)。青四角はcalreticulinの小胞体ターゲティングシグナルを指す。右側の欄の“Frame”はそれぞれの変異体の3'エクソンの読み枠を示した(*XBP1u* mRNAの読み枠を1とする)。Const. num.1、12、14、16のタンパク質産物は“term(u)”で終止コドンを迎えるが、const. num.6、15は“term(s)”で終止コドンを迎える。

(B, C) プラスミド由来の変異体*XBP1* mRNAの細胞内局在を図2Cと同様の方法で解析した。左パネルには、3回の実験結果から算出されたそれぞれの変異体のML-valueを示した。

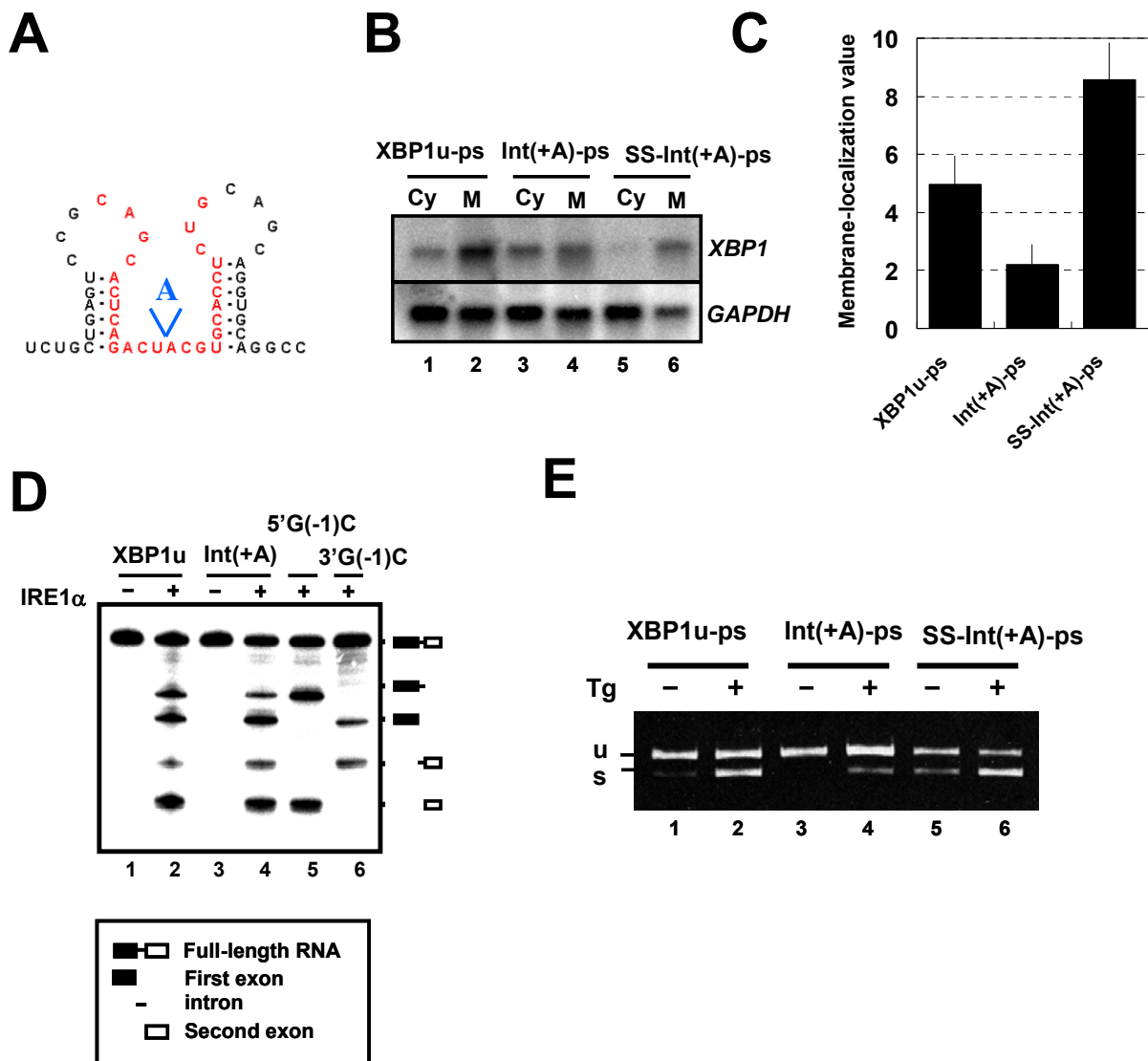


図6 *XBP1u* mRNAは膜上に局在化することで効率的にIRE1 α によってスプライシングされる

(A) *XBP1u* mRNAのスプライシング部位の推定二次構造。青文字はInt(+A)において挿入された塩基を示す。イントロンは赤字で表した。

(B, C) pcDNA3.1-*XBP1u*-ps (const. num. 16)、pcDNA3.1-Int(+A)-ps (const. num. 17)、pcDNA3.1-SS-Int(+A)-ps (const. num. 18)をHEK293T細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、それぞれのmRNA産物の細胞内局在を解析した。Cには3回の実験結果から算出されたそれぞれの変異体のML-valueを示した。

(D) *XBP1u*もしくは図示した変異体RNAを32P-dCTP存在下で、*in vitro*転写反応によって合成してIRE1 α による切断反応に供した。切断断片を尿素含有変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分離し、オートラジオグラフィで可視化した。図の右には切断断片の模式図を示した。

(E) pcDNA3.1-*XBP1u*-ps、pcDNA3.1-Int(+A)-psまたはpcDNA3.1-SS-Int(+A)-psをHEK293T細胞にトランスフェクションし、24時間後に0.5 μ g/ml Tgで4時間処理した後に(+),または未処理で(-)回収した。それらの細胞からtotal RNAを精製し、図5Aで示したプライマーセット(矢印)を用いてRT-PCRにて解析した。

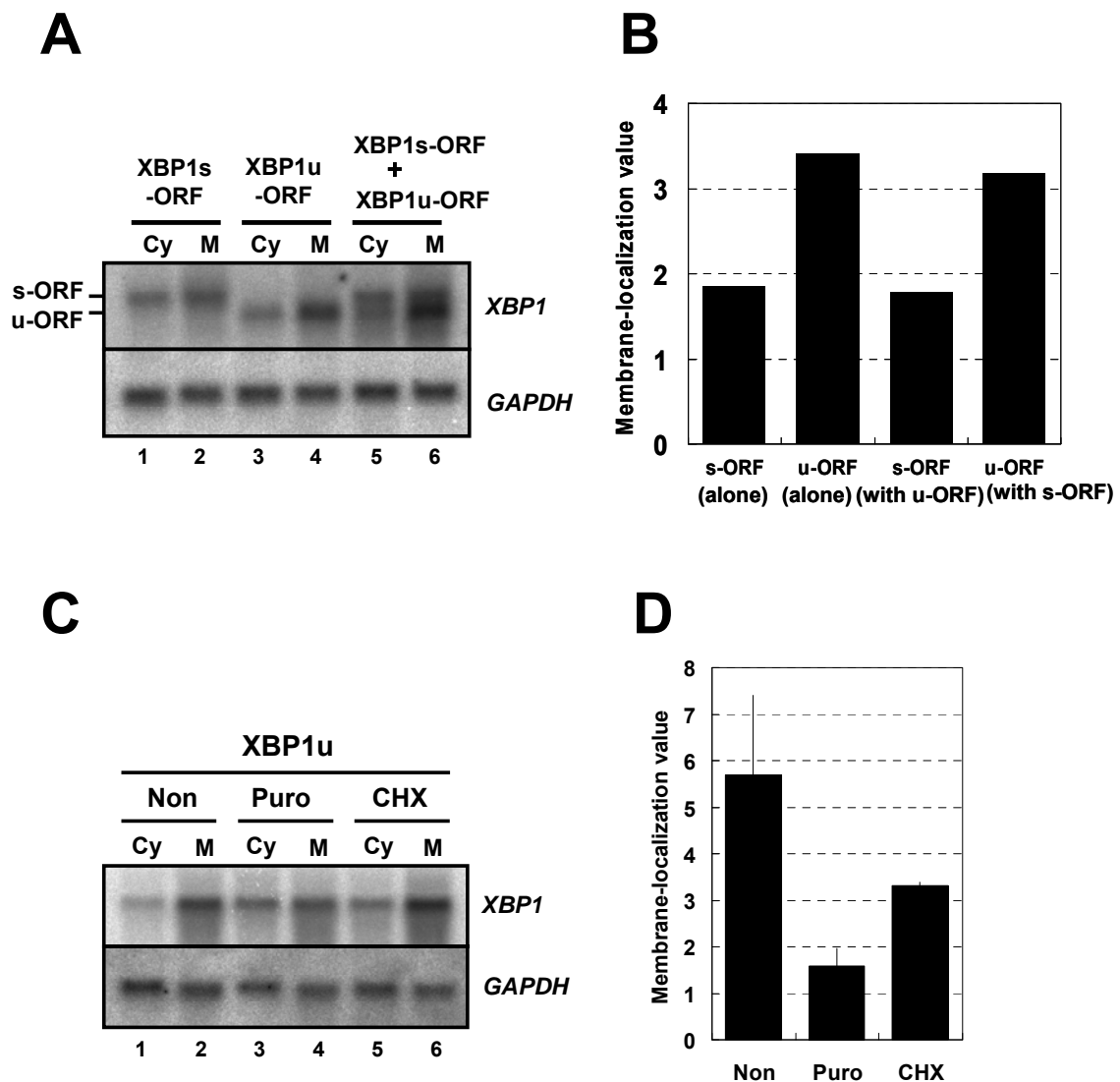


図7 *XBP1u* mRNAの翻訳産物は自身のmRNAをmRNA-リボソーム-新生鎖(R-RNC)複合体の一部として膜上へリクルートする

(A, B) HEK293T細胞にpcDNA3.1-XBP1s-ORF (const. num. 15; レーン1, 2)、pcDNA3.1-XBP1u-ORF (const. num. 12; レーン3, 4) またはこれらのプラスミドを等量ずつ共発現 (レーン5, 6) させ、それぞれのmRNAの細胞内局在を図2Cと同様の方法で解析した。BではそれぞれのML-valueを算出し、グラフとして表した。

(C, D) HEK293T細胞にpcDNA3.1-XBP1uをトランスフェクションし、24時間後に1 mM puromycin (Puro) または1 mM cycloheximide (CHX)で15分間処理し、それぞれの条件での*XBP1u* mRNAの細胞内局在を解析した。DではそれぞれのML-valueを算出し、グラフとして表した。

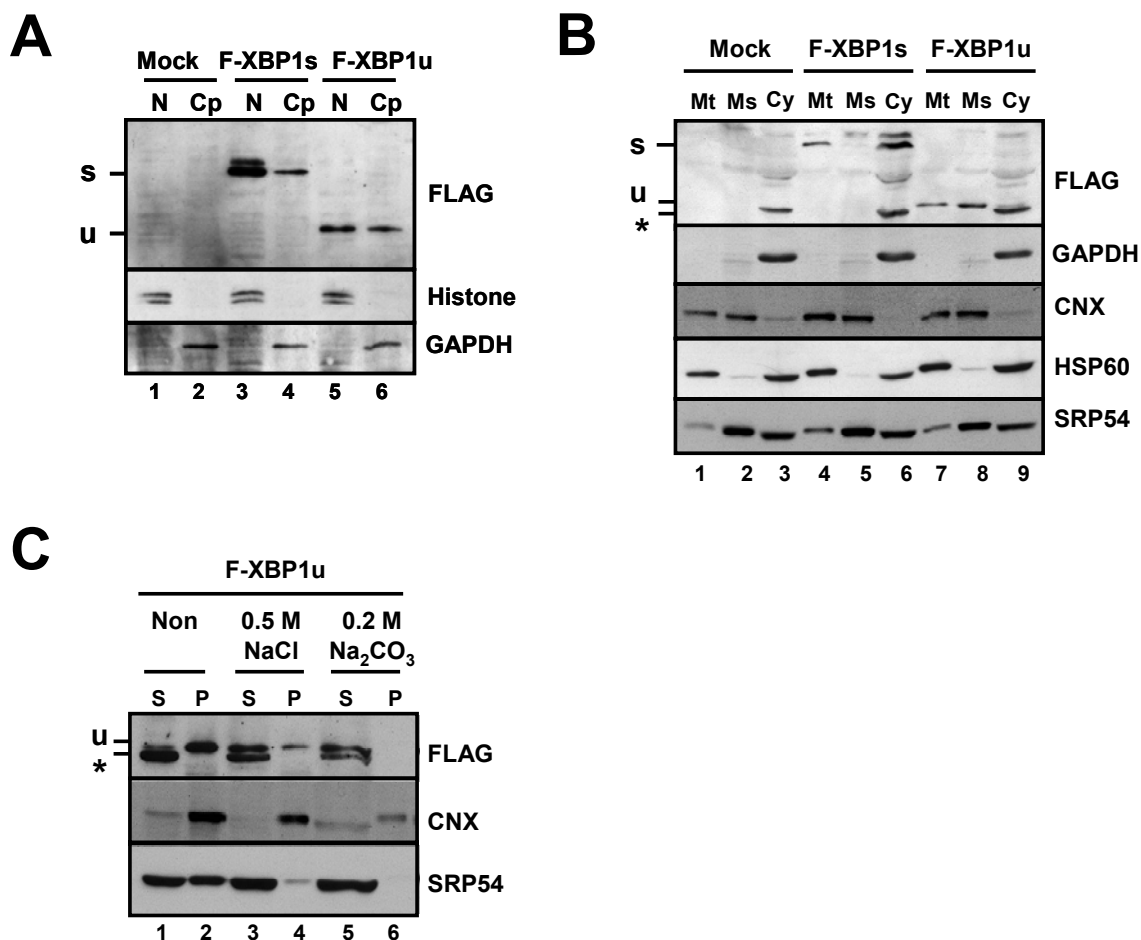


図8 XBP1タンパク質の細胞内局在

(A) HEK293T細胞にFLAGタグXBP1sまたはFLAGタグXBP1u発現プラスミド(pcDNA3.1-F-XBP1sまたはpcDNA3.1-F-XBP1u)をトランスフェクションし、24時間後に核画分(N)と細胞質画分(Cp)に分画し、等量のライセートをウェスタンブロッティングで解析した。“u”と“s”はそれぞれ、XBP1uタンパク質とXBP1sタンパク質の位置を示す。

(B) (A)と同様の細胞をミトコンドリア(Mt)、ミクロソーム(Ms)、サイトゾル画分(Cy)に分画し、ウェスタンブロッティングで解析した。アスタリスクは非特異的バンドの位置を表す。

(C) 実験Bから得られたポストミトコンドリア画分(ミクロソームとサイトゾルの成分を含んでいる)を図示した試薬の存在下で4℃、1時間静置し、その後、超遠心分離によって上清(S)と沈殿(P)に分け、ウェスタンブロッティングによって解析した。アスタリスクは非特異的バンドの位置を表す。

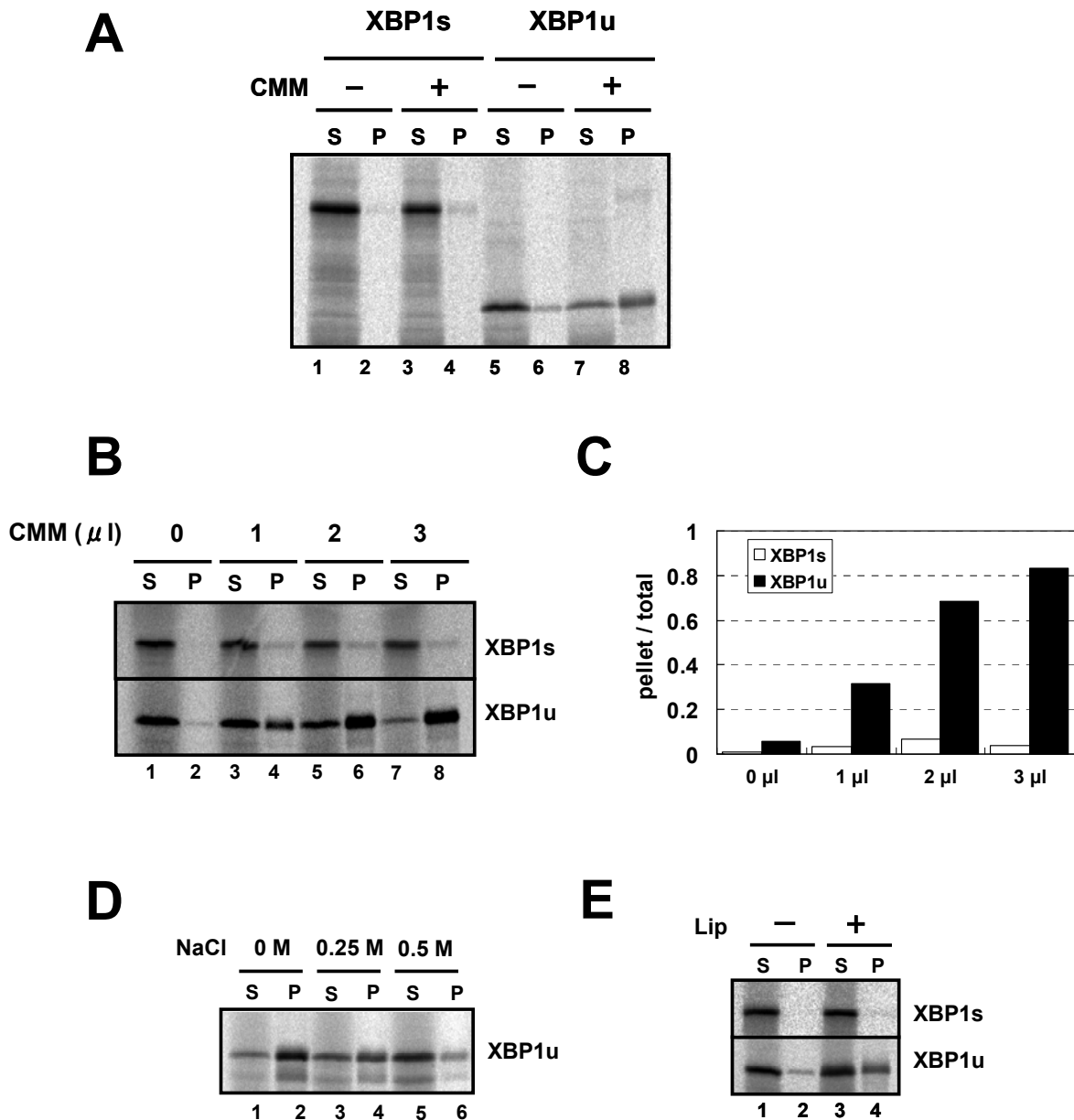


図9 XBP1uタンパク質には膜結合能がある

(A, B, C) 35 Sで標識したXBP1uタンパク質とXBP1sタンパク質をcanine pancreatic microsomal membrane (CMM)存在下、または非存在下でrabbit reticulocyte lysateを用いた*in vitro*翻訳系で合成した。この反応溶液を超遠心分離し、沈殿画分と上清画分に分け、SDS-PAGEで分離し、オートラジオグラフィーで検出した。Bの実験においては、図示した量のCMMを25 μ lの反応系に加え、放射活性のシグナル強度を定量し、Cに示した。

(D) 図Aで作製した*in vitro*翻訳溶液(+CMM)に図示した濃度のNaClを加え、4 $^{\circ}$ Cで1時間静置し、上清と沈殿に分けた。

(E) 図Aと同様の実験をCMMの代わりにリポソーム(Lip)を用いて行った。

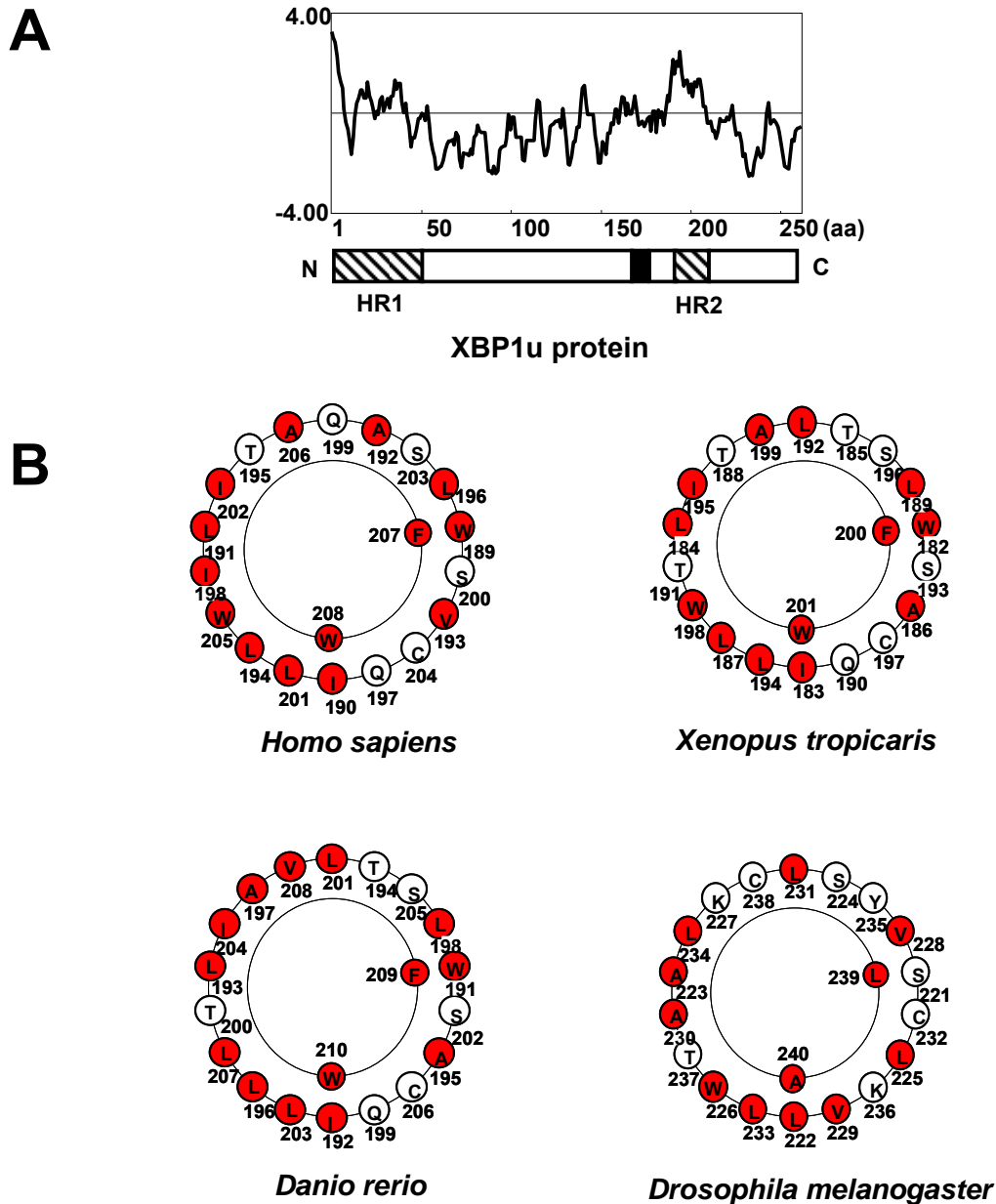


図10 XBP1uタンパク質には種を超えて保存された疎水性領域がある

(A) XBP1uタンパク質のKyte-Doolittle疎水性プロファイル (9-residue window ; Kyte and Doolittle, 1982)。疎水性領域 (HR1、HR2) とイントロンがコードする領域をそれぞれ、斜線と黒四角で示す。

(B) HR2のhelical-wheel diagram。疎水性残基を赤で表した。

(C) *Homo sapiens*、*Xenopus tropicaris*、*Danio rerio*、*Drosophila melanogaster*のXBP1uタンパク質のアミノ酸配列を示した。黒線で囲った部分はXBP1uタンパク質のみに存在する配列を、赤文字はHR2に相当する疎水性領域を示した。

C

<i>D.melanogaster</i>	1	MAPTANTVLI TVPRTAI TSNL PKLRPAPLTAALL KVSATPSASPTPSSSGYASSSNMDD	60
<i>D.ferio</i>	1	----- MVVVTAGTGGAHKVLLI SGKQASTGATQGGYSRSISVM PNQASDSD	49
<i>X.tropicalis</i>	1	----- MVVVGAPKVI FIPGNQCEQVDAL--- GSVMLPLSSPS- - - SPE	37
<i>H. sapiens</i>	1	----- MVVVAAPNPADGTPKVL LLSGQPSASAAGAP- - - AGQALPLMVAQRGASPE	49
<i>D.melanogaster</i>	61	DNMAASQPKAKRRL DHLTWE EKVQRKRL KNRVAAQTSRDRKKARMEEMDYEI KELTS DRT	120
<i>D.ferio</i>	50	STTS GPP- LRKRQRLT HLSPEEKALRRKL KNRVAAQTSRDRKKAKMGEL EQVLELELEN	108
<i>X.tropicalis</i>	38	SVSNELP- PRKRQRLT HLTPEEKALRRKL KNRVAAQTSRDRKKARMSLEEQVVDLEMEN	96
<i>H. sapiens</i>	50	AASGGLPQARKRQRLT HLSPEEKALRRKL KNRVAAQTSRDRKKARMSLEEQVVDLEEN	109
<i>D.melanogaster</i>	121	EILQNKCDLQAI NESLLAKNHKL DSELELLRQEL AELKQQQHNTRCISQSNASAGAEG	180
<i>D.ferio</i>	109	QKLHVENRLL RDKTSDLL SENEELRQRLGLDTL- - - ETKEQVQVLES AVSDLGLVTGSSE	165
<i>X.tropicalis</i>	97	EKLLEENQLL REKSHSLLTENQELRQRLGLSTLEV KKEEELQELNQRKDKVRPETGSAE	156
<i>H. sapiens</i>	110	QKLLEENQLL REKTHGLVVENQELRQRLGMDAL- - - - - VAE EEA EAKGNEVRPVAGSAE	163
<i>D.melanogaster</i>	181	CASTNLGSAASKADPLPQGIQQVDTQSSARLLAEQLKSSKSLASLWKVVALCLLYKTCLA	240
<i>D.ferio</i>	166	SAALRLRVPPQQVQAQQSPNLKTSPWILTALALQTLSLI SCLVFWTSLTPSSSRQTF LK	225
<i>X.tropicalis</i>	157	SAALRLCAPLQQEQAQMSPNLTVSTWILTALTLQTLSLI SQWAFWKAWTQTCCLPMKKHS	216
<i>H. sapiens</i>	164	SAALRLRAPLQQVQAQLSPLQNI SPWILAVLTLQIQSLI SQWAFWTTWTQSCSSNALPQS	223
<i>D.melanogaster</i>	241	STKSSTSSASKSWPKVCSQISQQTWKQALERAQLLPKMQATQSDCLDQWGWPPQSAWNP	300
<i>D.ferio</i>	226	HRSLSRSSCWGWQESKYLPPHLQLWGP HQLSWKPLMN- - - - -	263
<i>X.tropicalis</i>	217	LEA- - QMKRSTEKSLI PYPHPHLLLWGP HQPSWRPLMN- - - - -	252
<i>H. sapiens</i>	224	LP AWRSSQRSTQKDPVPYQPPFLCQWGRHQPSWKPLMN- - - - -	261
<i>D.melanogaster</i>	301	TGIELMA	307
<i>D.ferio</i>	263	-----	263
<i>X.tropicalis</i>	252	-----	252
<i>H. sapiens</i>	261	-----	261

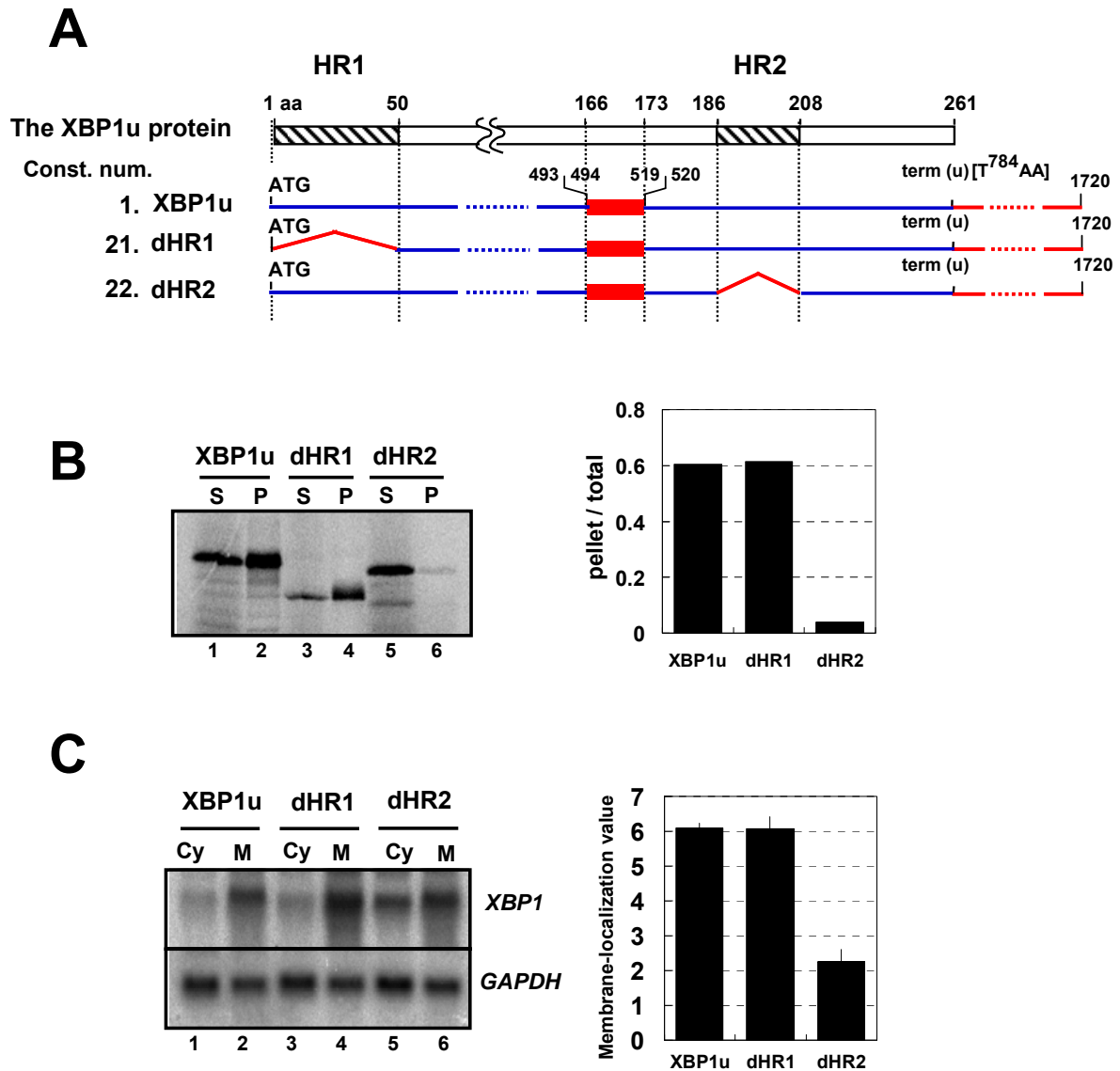


図11 XBP1uタンパク質と *XBP1u* mRNAが膜局在化にはXBP1uタンパク質中の疎水性領域が必要である

(A) 図示したコンストラクトから合成されるmRNAの細胞内分布を解析するために、それぞれをpcDNA3.1ベクターに組み込み、HEK293T細胞に一過的に発現させた (C)。または、*in vitro*翻訳実験のためにそれぞれのORF部分をpBS2-SK(-)に組み込んだ (B)。斜線部分は疎水性領域を示す。他の象徴については図5Aを参照。

(B) 図Aで示した変異がXBP1uタンパク質のCMMに結合する能力に与える影響を図9Aと同様の方法で調べた。

(C) 図Aで示した変異が *XBP1u* mRNAの膜局在化能に与える影響を図2Cと同様の方法で調べた。

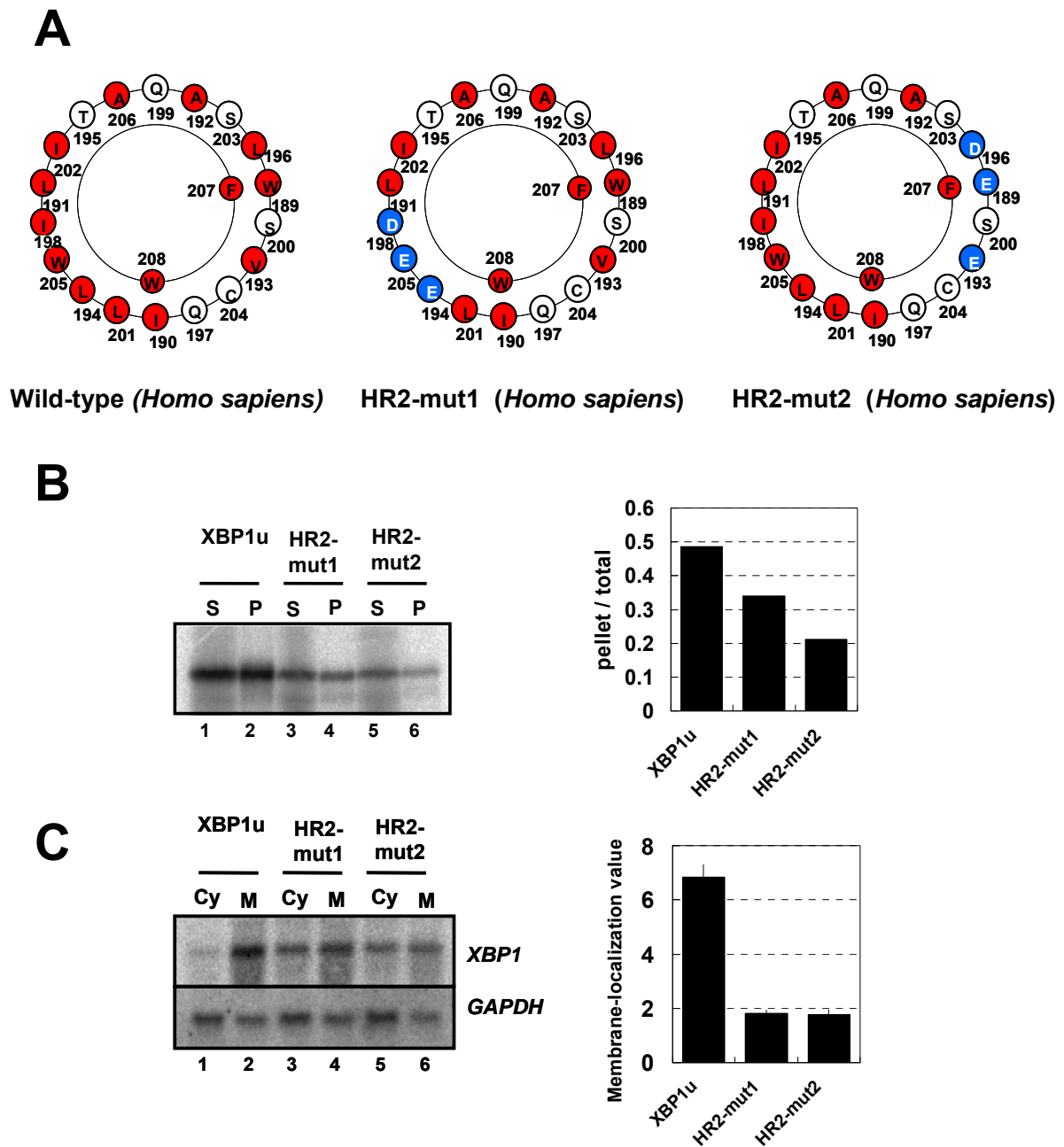


図12 XBP1uタンパク質とXBP1u mRNAが膜局在化にはHR2の疎水的特徴が必要である

(A) HR2-mut1とHR2-mut2に導入した変異部位をHR2のhelical-wheel diagramで示した。赤は疎水性残基を、白は極性残基を、青は置換した有電荷残基を示す。それぞれのコンストラクトをmRNAの細胞内局在を調べるためにpcDNA3.1ベクターに組み込み、*in vitro*翻訳実験のためにそれぞれのORF部分をpBS2-SK(-)に組み込んだ。

(B) 図Aで示した変異がXBP1uタンパク質のCMMに結合する能力に与える影響を図9Aと同様の方法で調べた。

(C) 図Aで示した変異がXBP1u mRNAの膜局在化能に与える影響を図2Cと同様の方法で調べた。

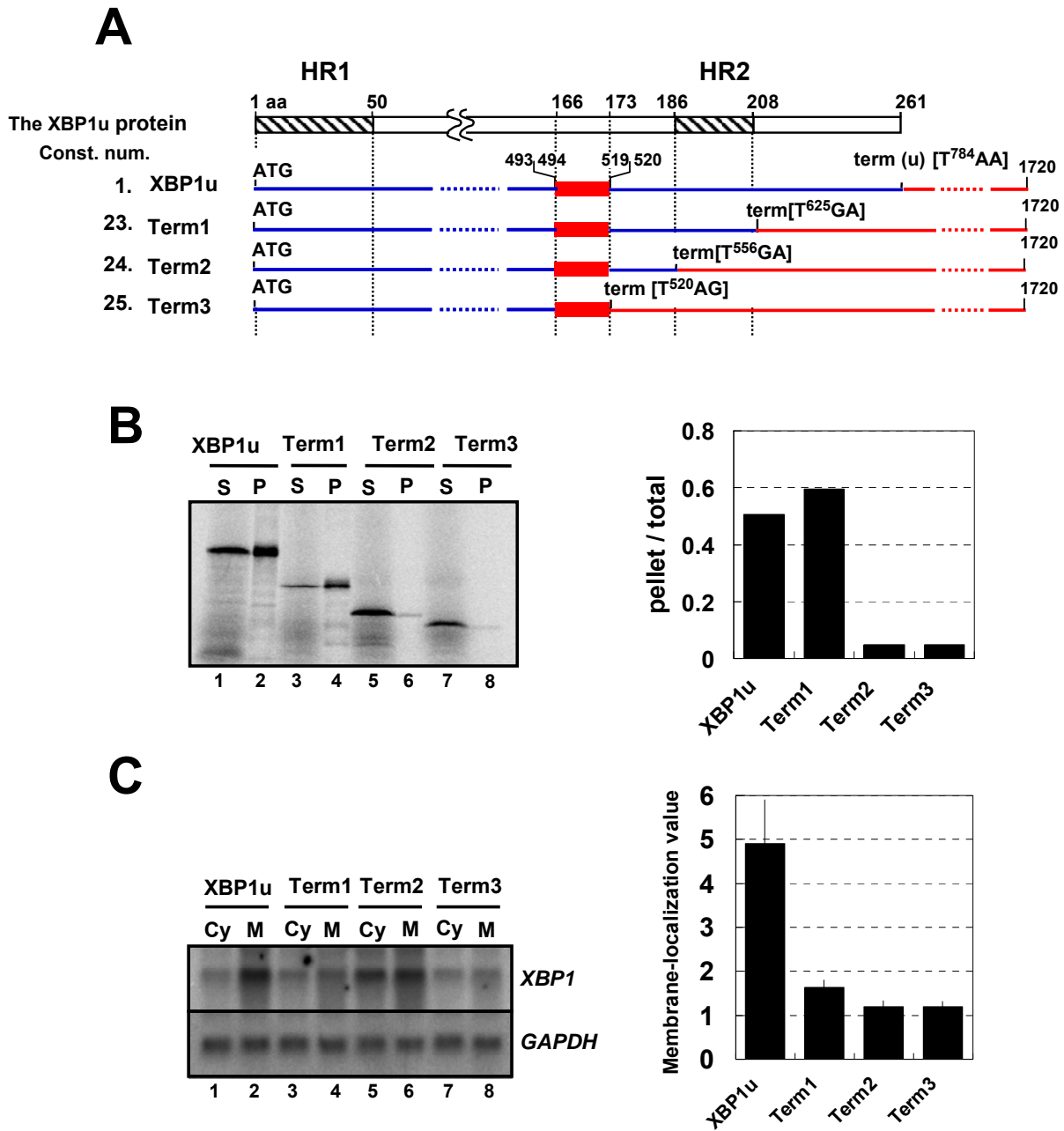


図13 XBP1uタンパク質の膜局在化にXBP1u mRNAの局在を共役させるためにはHR2下流のC末端領域が必要である

(A) 図示したコンストラクトから合成されるmRNAの細胞内分布を解析するために、それぞれをpcDNA3.1ベクターに組み込み、HEK293T細胞に一過的に発現させた (C)。または、*in vitro*翻訳実験のためにそれぞれのORF部分をpBS2-SK(-)に組み込んだ (B)。象徴については図5A、11Aを参照。

(B) 図Aで示した変異がXBP1uタンパク質のCMMに結合する能力に与える影響を図9Aと同様の方法で調べた。

(C) 図Aで示した変異がXBP1u mRNAの膜局在化能に与える影響を図2Cと同様の方法で調べた。

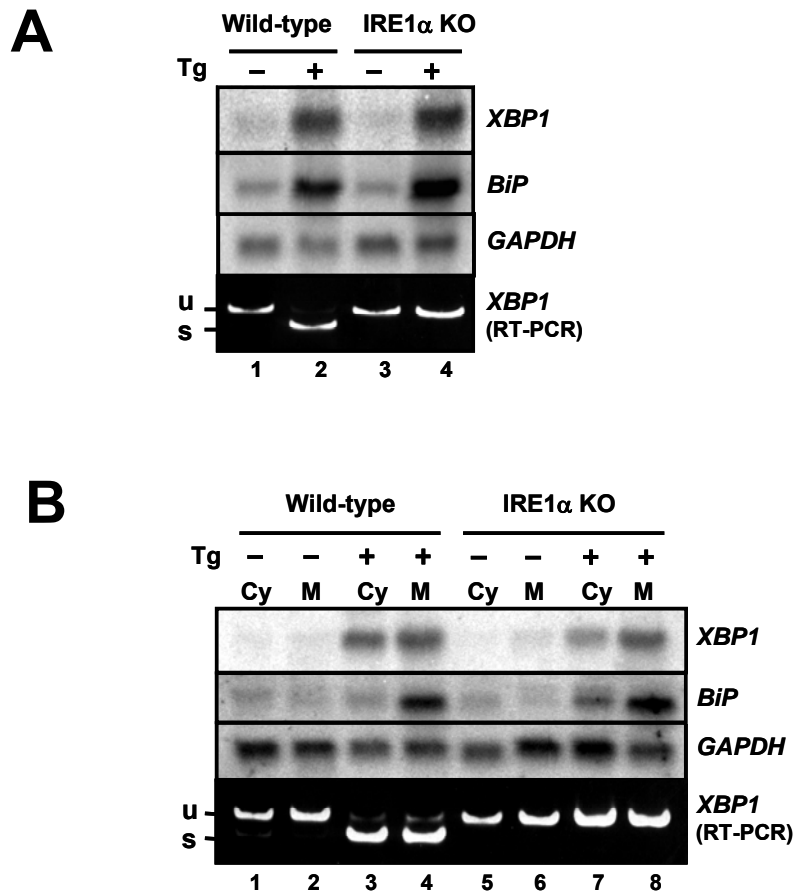


図14 *XBP1u* mRNAの膜へのリクルートにIRE1 α は必要でない

(A) 野生型 (wild-type) またはIRE1 α KO MEF細胞を0.5 μ g/ml Tgで4時間処理し (+) または未処理で(-)、それぞれのtotal RNAをノーザンブロットとRT-PCRで解析した。*XBP1u* mRNA、*XBP1s* mRNAからのRT-PCR産物の位置は“u”、“s”で示した。

(B) 図Aで用いた小胞体ストレスの有無で回収した細胞のmRNA局在を図2Cと同様の方法で解析した。

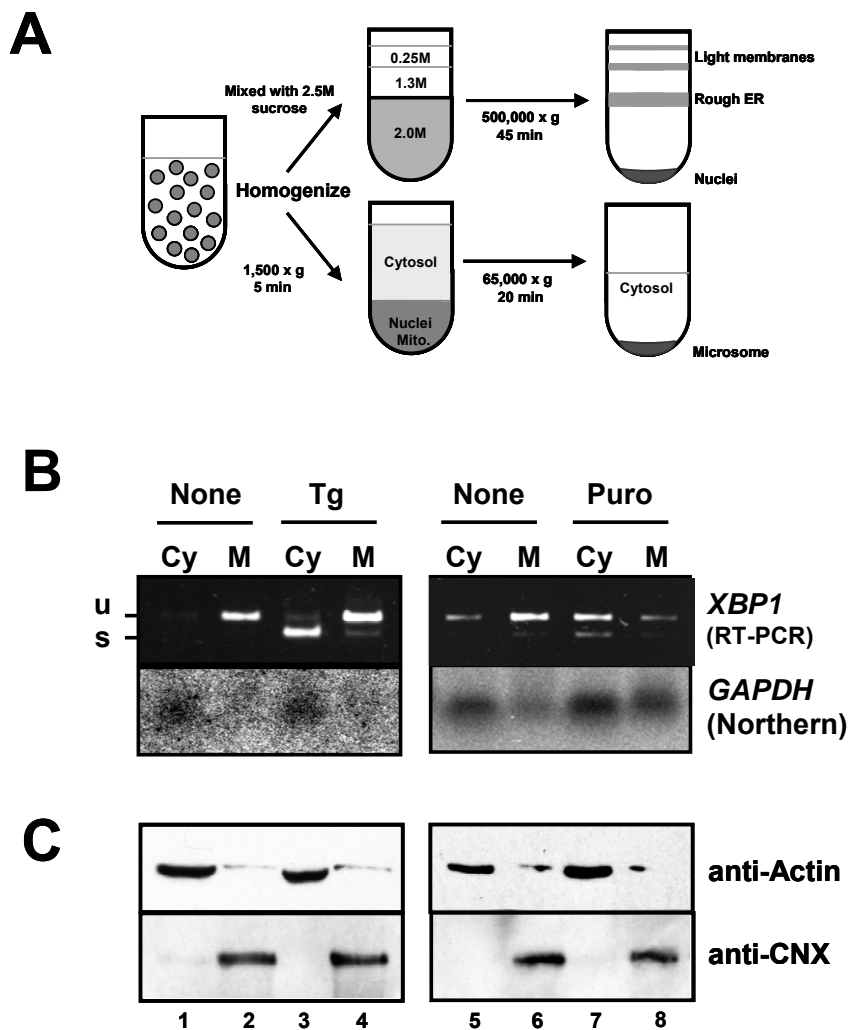


図15 肝細胞の内在性*XBP1u* mRNAも自身を翻訳するリボソームから伸長する新生鎖によって膜へリクルートされる

(A) 膜浮遊法による細胞分画法の概略図。詳細は“材料と方法”参照

(B) 未処理、Tg処理 (0.5 μ g/ml 4時間)、またはpuromycin処理 (Puro; 0.5 mM 15分) した肝細胞を図Aの方法で分画し、そのサイトゾル画分と膜画分から調整したtotal RNAをノーザンブロット(*GAPDH* mRNA)、もしくはRT-PCR (*XBP1* mRNA) で解析した。*XBP1u* mRNA、*XBP1s* mRNAからのRT-PCR産物の位置は“u”、“s”で示した。

(C) 図Bで用いたサイトゾル画分と膜画分を等量ずつを採取し、抗calnexin抗体と抗actin抗体を用いてウェスタンブロットで解析した。

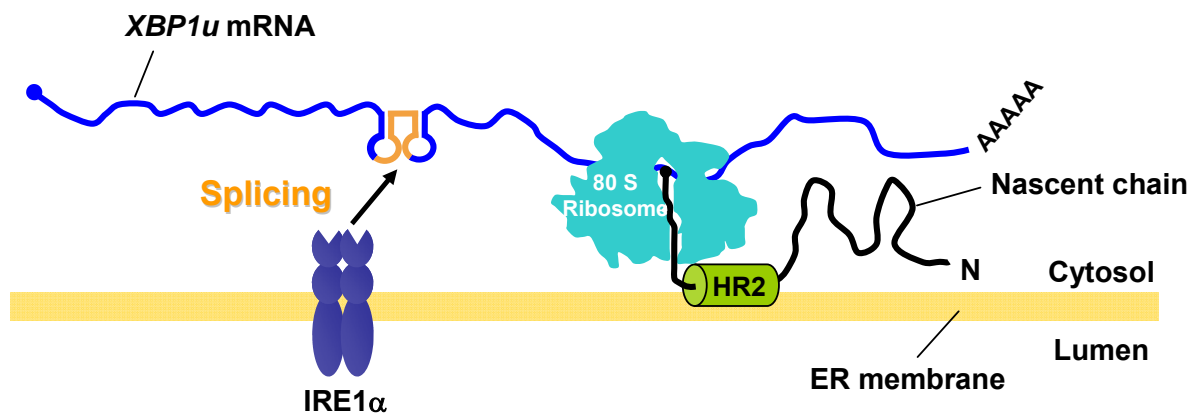


図16 本研究で見出された*XBP1u* mRNAの膜局在化機構のモデル図

XBP1u mRNAを翻訳中のリボソームから伸長する新生*XBP1u*ポリペプチドはHR2を介して膜に結合し、その結果*XBP1u* mRNAをR-RNC複合体の一部として膜上にリクルートする。小胞体ストレス時には活性化した小胞体膜タンパク質であるIRE1 α によって、膜に係留された*XBP1u* mRNAが効率的にスプライシングされる。

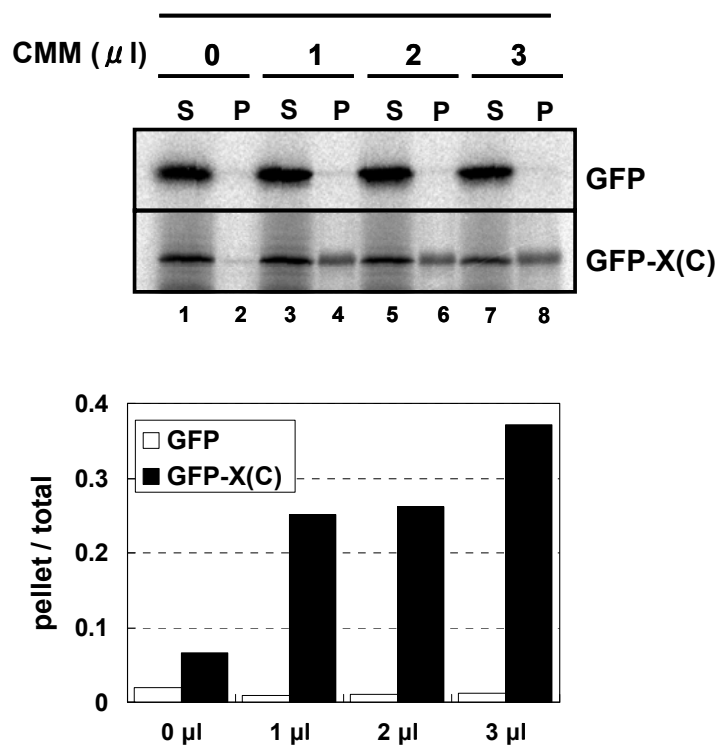
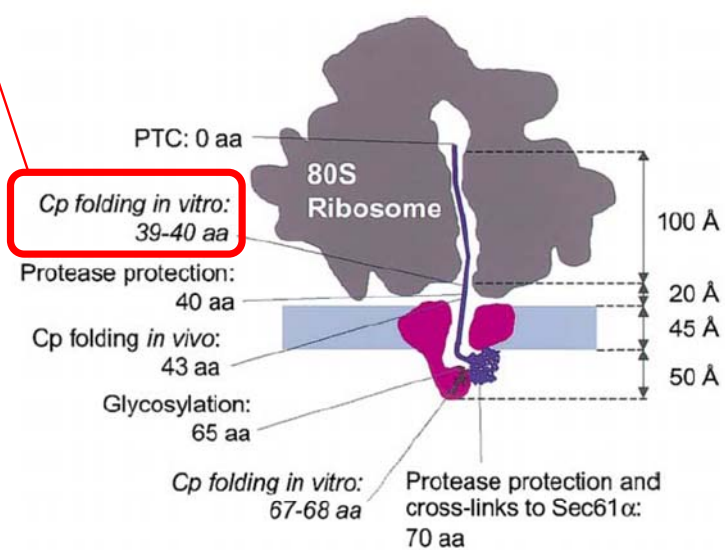


図17 *XBPlu* mRNAの3'エクソンはGFPに膜結合能を与える

図5A const. num. 13, 14で示したコンストラクト(GFP、GFP-X(C))をpBS2-SK(-)に組み込み、図9Bと同様の方法でそれぞれがコードするタンパク質のCMMへの結合能を評価した。下パネルでは放射活性のシグナル強度を定量し、グラフとして表した。

Estimated ribosomal tunnel length

A



Kowarik M et al., Mol Cell. 2002 10(4):769-78

B

XBP1u protein

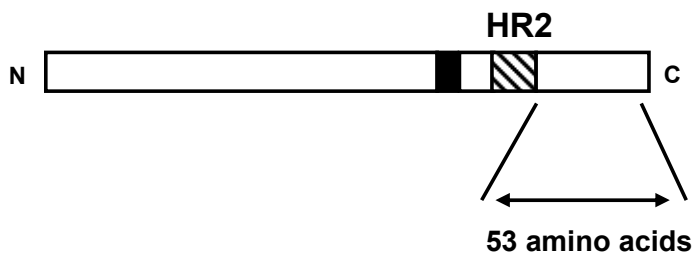


図18 リボソームトンネルの長さ と XBP1u タンパク質の C 末端領域

(A) Kowarik et al.(2002)に報告されているリボソームトンネル長。赤丸四角で囲った数字がトンネルの長さを示す。

(B) XBP1uタンパク質のHR2に続くC末端領域の長さ。

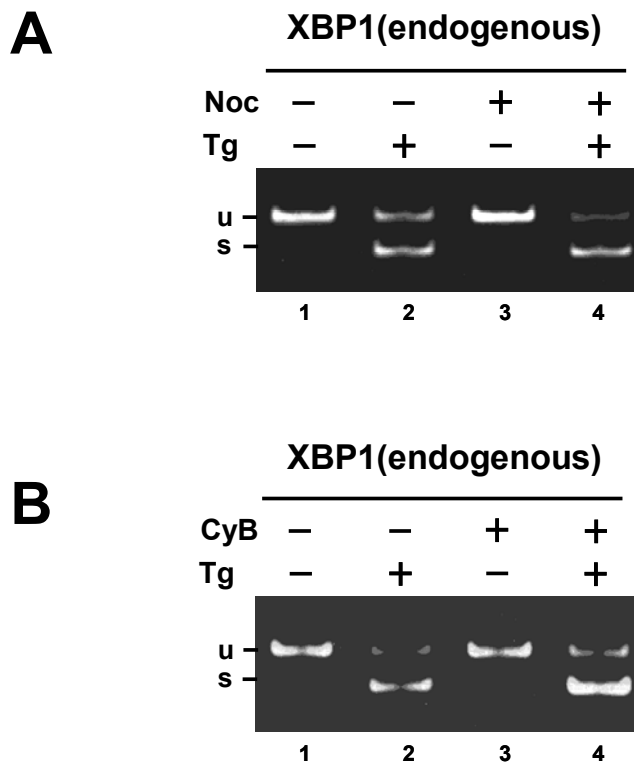
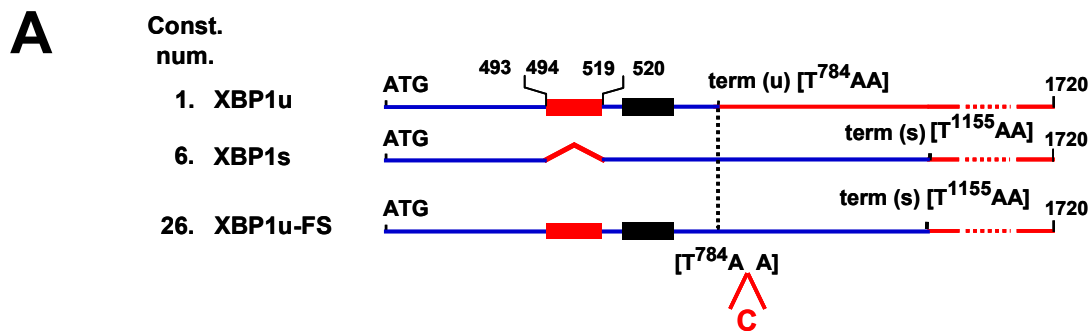


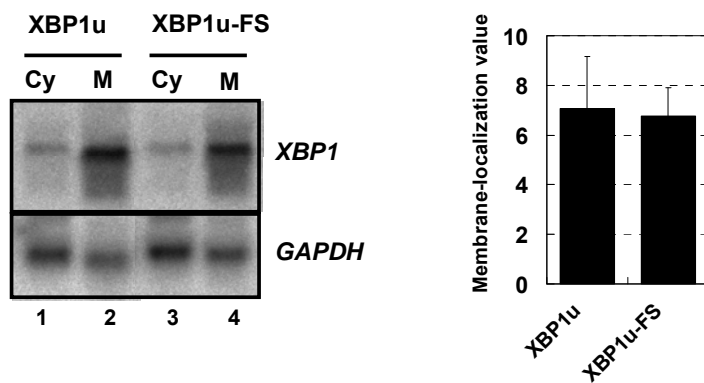
図19 *XBP1u* mRNAの細胞質スプライシングには微小管やアクチン線維を介した細胞内輸送システムは関与しない

(A) HeLa細胞を20 μ Mのnocodazole(Noc)で90分間処理し、続いて20 μ Mのnocodazole存在下で1 μ g/mlのthapsigargin (Tg) 処理を1時間、または未処理で回収した。それぞれのtotal RNAを図2Eと同様のプライマーセットで*XBP1* mRNAのスプライシングを解析した。

(B) HeLa細胞を20 μ Mのcytochalasin B (CyB)で45分間処理し、続いて20 μ Mのcytochalasin B存在下で1 μ g/mlのthapsigargin (Tg) 処理を90分間、または未処理で回収した。それぞれのtotal RNAを図2Eと同様のプライマーセットで*XBP1* mRNAのスプライシングを解析した。



B



C

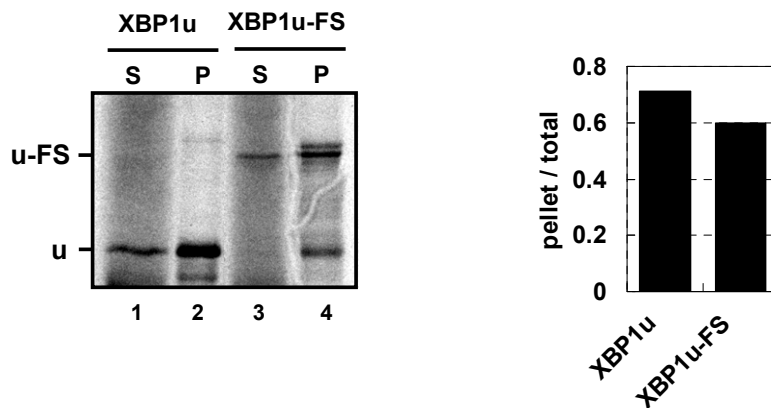


図20 XBP1uタンパク質の膜局在化にXBP1u mRNAの局在を共役させるためのC末端領域は53残基で十分である

(A) XBP1u-FSはXBP1u cDNAの終止コドンに1塩基の挿入変異を導入して作製された。この挿入によって、その終止コドンが無効化され、さらに挿入部位からの読み枠がXBP1uからXBP1sのものに変換される。その結果XBP1u-FSタンパク質にはXBP1uタンパク質のC末端に新たな123残基が付加されることになる。このコンストラクトから合成されるmRNAの細胞内分布を解析するために、それぞれをpcDNA3.1ベクターに組み込み、HEK293T細胞に一過的に発現させた (C)。または、*in vitro*翻訳実験のためにそれぞれのORF部分をpBS2-SK(-)に組み込んだ (B)。黒四角はHR2を示す。他の象徴については図5A、11Aを参照。

(B) 図Aで示した変異がXBP1u mRNAの膜局在化能に与える影響を図2Cと同様の方法で調べた。

(C) 図Aで示した変異がXBP1uタンパク質のCMMに結合する能力に与える影響を図9Aと同様の方法で調べた。XBP1uタンパク質、XBP1u-FSタンパク質の位置については、それぞれ“u”、“u-FS”として示した。

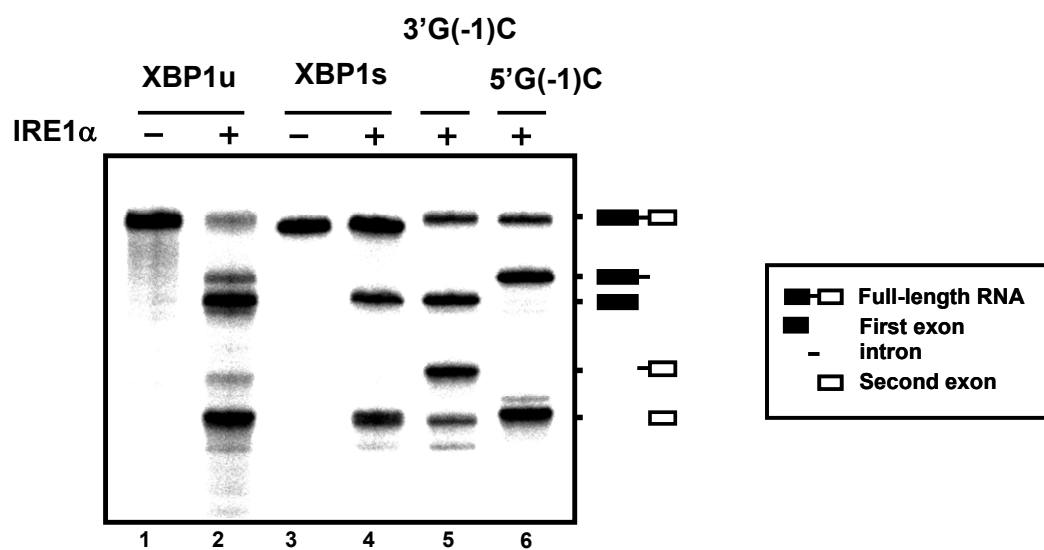


図21 *XBP1s* mRNAも*XBP1u* mRNAと同様に*in vitro*ではIRE1αに切断される

XBP1u、*XBP1s*、もしくは図示した変異体 RNAを³²P-dCTP存在下で、*in vitro*転写反応によって合成してIRE1αによる切断反応に供した。切断断片を尿素含有変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーで可視化した。図の右には切断断片の模式図を示した。

6. 謝辞

この研究を完成させるまでに、多くの人に支えて頂きました。まずはじめに、研究の機会を与えて頂いた河野憲二教授に深く感謝します。懐の広い河野先生が主宰されているだけあって、河野研は研究環境に加え人間関係も良好で余計なことに悩まされずに研究に没頭できました。修士課程、博士課程に一年の留年を加えた6年間に河野研で過ごさせて頂きましたが、大変心地よかったです。スタッフの木俣行雄准教授、都留秋雄助教、斉藤美知子助教には様々な面でお世話になりました。特に、木俣准教授には論文作成において手厚い指導を、斉藤助教にはマウスからの肝細胞の精製をして頂きました。ご二人の手助けが無ければ、本研究の完成は無かったと確信しております。

細田章博士には修士課程の間お世話になりました。不器用で夢見がちの私を忍耐強く、そして優しく指導して頂きました。今でも私の理想とする指導者像です。今川佑介博士には組み換え IRE1 α タンパク質を分与して頂きました。竹内雅人博士には *in vitro* の実験系についての重要なアドバイスをして頂きました。及川大輔博士、門倉広博士には有益なディスカッションをして頂き、刺激を受けました。この場を借りて御礼申し上げます。

河野研の構成員の方々には、研究のディスカッションだけでなく、日々の生活を楽しく過ごさせて頂いたことに深く感謝しています。私にとって、大学院での6年間は河野研でほとんどの時間を過ごしましたが、皆さんと共有した時間は私にとっての大切な財産です。感謝の言葉もありません。技術補佐の松村美樹さん、飯田純子さんには実験補助の面で大変お世話になりました。リポソームの調製法については、東京大学大学院総合文化研究科の佐藤健博士にアドバイスを頂きました。この場を借りて、深く感謝します。

7. 参考文献

Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct* *33*, 75-89.

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., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* *2*, 326-332.

Bolender, R. P. (1974). Stereological analysis of the guinea pig pancreas. I. Analytical model and quantitative description of nonstimulated pancreatic exocrine cells. *J Cell Biol* *61*, 269-287.

Braakman, I., Hoover-Litty, H., Wagner, K. R., and Helenius, A. (1991). Folding of influenza hemagglutinin in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* *114*, 401-411.

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.

Diehn, M., Eisen, M. B., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays. *Nat Genet* *25*, 58-62.

Du, T. G., Schmid, M., and Jansen, R. P. (2007). Why cells move messages: the biological functions of mRNA localization. *Semin Cell Dev Biol* *18*, 171-177.

Dunn, L. A., and Holz, R. W. (1983). Catecholamine secretion from

digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells. *J Biol Chem* *258*, 4989-4993.

Harding, H. P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D. D., and Ron, D. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* *7*, 1153-1163.

Harding, H. P., 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.

Hegde, R. S., and Bernstein, H. D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci* *31*, 563-571.

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

Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998). Unconventional splicing of HAC1/ERN4 mRNA required for the unfolded protein response. Sequence-specific and non-sequential cleavage of the splice sites. *J Biol Chem* *273*, 1802-1807.

Kowarik, M., Kung, S., Martoglio, B., and Helenius, A. (2002). Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* *10*, 769-778.

Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* *157*, 105-132.

- Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Anderson, K. C., and Glimcher, L. H. (2003). Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9946-9951.
- Lerner, R. S., Seiser, R. M., Zheng, T., Lager, P. J., Reedy, M. C., Keene, J. D., and Nicchitta, C. V. (2003). Partitioning and translation of mRNAs encoding soluble proteins on membrane-bound ribosomes. *RNA* *9*, 1123-1137.
- Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D. H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* *288*, 911-940.
- Moldeus, P., Hogberg, J., and Orrenius, S. (1978). Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol* *52*, 60-71.
- Mori, K. (2003). Frame switch splicing and regulated intramembrane proteolysis: key words to understand the unfolded protein response. *Traffic* *4*, 519-528.
- Nakatogawa, H., and Ito, K. (2001). Secretion monitor, SecM, undergoes self-translation arrest in the cytosol. *Mol Cell* *7*, 185-192.
- Palacios, I. M., and St Johnston, D. (2001). Getting the message across: the intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes. *Annu Rev Cell Dev Biol* *17*, 569-614.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 519-529.
- 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.
- Sriburi, R., Bommiasamy, H., Buldak, G. L., Robbins, G. R., Frank, M., Jackowski, S., and Brewer, J. W. (2007). Coordinate regulation of

phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis. *J Biol Chem* *282*, 7024-7034.

Stephens, S. B., Dodd, R. D., Brewer, J. W., Lager, P. J., Keene, J. D., and Nicchitta, C. V. (2005). Stable ribosome binding to the endoplasmic reticulum enables compartment-specific regulation of mRNA translation. *Mol Biol Cell* *16*, 5819-5831.

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.

Weibel, E. R., Staubli, W., Gnagi, H. R., and Hess, F. A. (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol* *42*, 68-91.

Wu, J., Rutkowski, D. T., Dubois, M., Swathirajan, J., Saunders, T., Wang, J., Song, B., Yau, G. D., and Kaufman, R. J. (2007). ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell* *13*, 351-364.

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and

XBP1. *Dev Cell* 13, 365-376.

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., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol* 172, 565-575.

Zhang, K., and Kaufman, R. J. (2006). The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66, S102-109.