

博士論文番号：0981008

小胞体ストレスセンサーIre1の活性化機構の多様性に関する研究

木俣 有紀

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25年 1月21日提出

所属 (主指導教員)	バイオサイエンス研究科 動物細胞工学研究室 (河野憲二教授)		
氏名	木俣 有紀	提出	平成 23 年 12 月 20 日
題目	小胞体ストレスセンサーIre1 の活性化機構の 多様性に関する研究		
<p>要旨 真核生物の小胞体は、分泌蛋白質の折り畳みや膜脂質の生合成が行われる細胞内小器官である。小胞体の機能不全は小胞体ストレスと総称され、細胞はこれを回避するため、Unfolded protein response (UPR)を引き起こす。UPR における細胞内シグナル伝達の起点となる小胞体ストレスセンサーとして、真核生物細胞全般に保存されているのが、小胞体局在 I 型膜貫通蛋白質 Ire1 である。Ire1 のサイトゾル側末端には RNase モチーフが存在し、下流への情報発信におけるエフェクターとして機能する。出芽酵母においては、小胞体ストレスに応じて活性化した Ire1 は、<i>HAC1</i> 遺伝子産物 mRNA を小胞体膜上でのスプライシング反応により成熟させる。成熟型 <i>HAC1</i> mRNA は核内転写因子へと翻訳され、小胞体内在性分子シャペロンや膜脂質生合成酵素など、小胞体の機能に関わる多くの蛋白質全般が転写レベルで発現誘導される。</p> <p>小胞体ストレスは従来、小胞体における分泌蛋白質の高次構造形成の不全と同一視されてきた。例えば、小胞体での分泌蛋白質折り畳みを阻害する薬剤(ジスルフィド結合還元剤ジチオスレイトール(DTT)、N 結合型糖鎖形成阻害剤ツニカマイシン)を細胞に曝露すると、Ire1 は強く活性化する。そして、主としてこの実験条件を用いた研究により、非ストレス時には小胞体内在性分子シャペロン BiP が Ire1 に会合していること、および、小胞体ストレスは Ire1 からの BiP の解離を促すことが明らかとなった。BiP の解離は、巨大な Ire1 ホモ多量体の形成へとつながる。しかし一方で、BiP の解離とホモ多量体化は Ire1 活性化の十分条件では無いことも分かってきた。すなわち、Ire1 の小胞体内腔ドメインは構造異常蛋白質との会合能を有し、Ire1 ホモ多量体に構造異常蛋白質が直接的に作用することにより、Ire1 は強い活性を発揮するのである。</p> <p>私は、出芽酵母を材料として、このシナリオの妥当性に関し、さまざまな観点から解析を進めてきた。本論文では、Ire1 活性制御および活性維持に関して、このシナリオだけでは説明できない事象が存在することを、以下の2点について論じたい。</p>			

第一に出芽酵母では、膜脂質の主要構成成分であるイノシトールを培地から枯渇させた場合、Ire1 が活性化することが知られている。本研究で私は、構造異常蛋白質との会合能を失った変異型 Ire1 (Δ III Ire1: 小胞体内腔ドメインに小規模な欠失がある) が、細胞への DTT あるいはツニカマイシン曝露では微弱にしか活性化しないにも関わらず、イノシトール枯渇では野生型 Ire1 と同程度に活性化することを明らかにした。また、構造異常蛋白質の蓄積と膜脂質の恒常性破綻は、それぞれ異なるメカニズムによって Ire1 を活性化することは、各種の遺伝子欠損実験によっても示された。すなわち、小胞体での蛋白質の成熟や折り畳みに関わると考えられる遺伝子の欠損では概して、野生型 Ire1 に比して、構造異常蛋白質認識能を欠く上述の変異型 Δ III Ire1 の活性化は微弱であった。ところが、膜脂質の恒常性維持に関わると考えられる遺伝子の欠損では概して、この変異型 Δ III Ire1 は野生型 Ire1 と同程度に活性化したのである。

構造異常蛋白質認識の場合と異なり、Ire1 は膜脂質の恒常性破綻を自身のサイトゾル側ドメインで認識する様である。すなわち、ホモ会合能を有する他のペプチド配列にて小胞体内腔ドメイン全体を置換した場合でも、あるいは、膜貫通ドメインを他の蛋白質由来のものに置換した場合でも、Ire1 はイノシトール欠乏に応じて活性化することが観察された。

第二に本論文では、細胞が長期間の小胞体ストレスに晒された場合、旧来から知られていたのとは異なる複合体様式をとり、Ire1 が活性を維持することを論じたい。前述のように BiP の解離は Ire1 のホモ多量体化を促し、この多量体化は Ire1 が強く活性化するための必要条件であると考えられている。しかし一方、DTT 曝露の場合もイノシトール欠乏の場合も、ストレスが与えられる期間が長びけば、Ire1 の活性はある程度に低下し、最大では無いが非ストレス時よりは高い活性を維持し続ける。この状態では、Ire1 ホモ多量体は認められなかった。また、点変異が導入されてホモ多量体形成能を失った変異型 Ire1 (ホモ 2 量体は形成できる) も、長期間ストレスを与えると野生型 Ire1 と同程度の活性を示した。よって、急性のストレスに対しては Ire1 はホモ多量体となり高い活性を発揮するが、ストレスが長期に渡るとホモ 2 量体となって弱い活性を維持すると考えられる。強すぎる UPR は細胞にとって有害であることが知られており、Ire1 の活性を適当なレベルに維持することが生理学的に重要となるのであろう。BiP が会合しないタイプの変異型 Ire1 の解析などから、Ire1 への BiP の再結合が Ire1 をホモ多量体からホモ 2 量体へと解離させる原因になっていると考えられる。

目次

略語表.....	6
----------	---

緒言.....	7
---------	---

第一章：膜脂質へのダメージと構造異常タンパク質蓄積は異なるメカニズムで小胞体ストレスセンサーIre1 を活性化化する

序論.....	10
---------	----

材料と方法.....	15
------------	----

結果

<u>イノシトール欠乏ではΔIII Ire1 は野生型 Ire1 と同程度に活性化する.....</u>	21
-------------------------------------------------------------------------	----

<u>イノシトール欠乏による Ire1 の活性化ステップ.....</u>	26
---------------------------------------	----

<u>遺伝子欠損による野生型 Ire1 と ΔIII Ire1 の活性化.....</u>	30
------------------------------------------------------------------	----

<u>Ire1 によるイノシトール欠乏の感知には小胞体内腔ドメインは関与しない.....</u>	34
--------------------------------------------------	----

考察.....	36
---------	----

第二章：長期的なストレスに対する UPR

序論.....	43
---------	----

材料と方法.....	45
------------	----

結果

<u>長時間のイノシトール欠乏における低レベルの Ire1 の活性維持.....</u>	47
----------------------------------------------	----

<u>長期間のイノシトール欠乏における Ire1 活性低下に対する BiP(再)会合の寄与.....</u>	53
--------------------------------------------------------	----

<u>長期間イノシトール欠乏条件下での Ire1 の複合体形成状態.....</u>	55
--------------------------------------------	----

<u>長時間の DTT 処理での Ire1 のクラスター化および活性化パターン.....</u>	60
--------------------------------------------------	----

考察.....	63
---------	----

謝辞.....67

参考文献.....68

略語表

UPR ; Unfolded protein response

DTT ; Dithiothreitol

CSSR ; Core stress sensing region

COP I & COPII ; Coat protein complex I & II

bZIP ; basic leucine zipper

FIT ; Fat storage- inducing transmembrane

GET ; Guided entry of tail-anchored proteins

5-FOA ; 5- Fluoroorotic Acid

緒言

小胞体は、酵母から動植物に至るあらゆる真核細胞において、普遍的に見いだされる細胞内小器官である。小胞体の役割としては、細胞外あるいは細胞表層に運ばれるタンパク質の高次構造形成を挙げることが出来る。また、小胞体は膜脂質生合成の場でもある。小胞体の機能障害、すなわち小胞体ストレスはこれまで、小胞体におけるタンパク質の高次構造形成不全と同一視されてきた。よって、小胞体ストレスに対する細胞の防衛応答は、**Unfolded Protein Response (UPR)** と呼ばれることもある。最も良く知られた UPR は、小胞体ストレスに応じて小胞体内在性分子シャペロンや変性タンパク質分解因子が発現誘導されることである。

Ire1 はあらゆる真核生物に進化的に保存された I 型膜貫通タンパク質であり、小胞体膜に局在する。**Ire1** の機能は、小胞体ストレスを感知して **UPR** を惹起する、すなわち、小胞体ストレスセンサーとして機能することである。小胞体ストレスに応じて **Ire1** が活性化するメカニズムについては、出芽酵母 **Ire1** を用いた研究が先行してきた。そしてこれまでに、小胞体ストレスに応じた巨大なホモ多量体形成が、**Ire1** の強い活性化に必要であることが明らかとなっている (Credle et al., 2005; Kimata et al., 2007; Korennykh et al., 2009)。また、**Ire1** は小胞体内に蓄積した構造異常タンパク質と直接的に相互作用し、これが **Ire1** のホモ多量体化、および、ホモ多量体状態の **Ire1** の完全な活性化につながることも報告されている (Credle et al., 2005; Kimata et al., 2007; Gardner and Walter, 2011)。この知見は、小胞体ストレスの実体は小胞体におけるタンパク質の高次構造形成不全であるとする旧来の概念を裏付け、また、この種のストレスが **Ire1** に感知されるメカニズムを明確にするものである。

しかし一方で、このシナリオとは必ずしも一致しない知見も報告されている。例えば、網羅的な遺伝子発現解析により、**Ire1** 依存的な **UPR** では、分泌タンパク質の品質管理に関わる因子だけではなく、膜脂質生合成酵素群など、小胞体の機能に関わるタンパク質全般が発現誘導されることが分かった (Travers et al., 2000; Kimata et al., 2006)。すなわち、**UPR** とは、小胞体の機能全般を回復させる生命現象であると言えよう。

本研究では、タンパク質の高次構造不全が **Ire1** を強く活性化する際の上述のシナリオ (**Ire1** のホモ多量体化、および、変性タンパク質と **Ire1** の直接的相

相互作用)には該当しない事例を見いだしたので、本論文で紹介したい。なお、本論文では2つの事象について触れるため、それぞれの事象に関して独立した章を設けたい。すなわち、本論文は以下の2章立ての論文となる。

第1章：膜脂質へのダメージと構造異常タンパク質蓄積は異なるメカニズムで小胞体ストレスセンサーIre1を活性化する

上述のように、Ire1 依存的な UPR では、構造異常タンパク質の処理だけではなく、膜脂質生合成酵素群なども発現誘導される。UPR が小胞体の機能全般の回復や亢進のための生命現象であるとする、その引き金となるストレスも、タンパク質の高次構造形成不全には限定されないかも知れない。本研究で私は、膜脂質の恒常性破綻が、構造異常タンパク質の蓄積とは異なるメカニズムにより Ire1 を活性化することを明らかにした。すなわち、UPR を惹起する小胞体ストレスとは、構造異常タンパク質の蓄積だけでなく、膜脂質関連の異常をもたらすものを含めた小胞体の機能低下全般を意味すると考えられる。

第2章：長期的なストレスに対する UPR

前述のように、Ire1 は巨大なホモ多量体を形成することにより、強い UPR を引き起こす。しかし、強すぎる UPR は細胞にとって有害であることも知られている。本研究にて私は、小胞体ストレスが継続的に与えられる場合は、Ire1 はホモ多量体から解離し、より活性が低い、しかし幾ばくかの活性を有するホモ2量体へと変換することを明らかにした。この解離は、Ire1 への BiP の再会合に起因すると考えられる。

第1章

膜脂質へのダメージと構造異常タンパク質蓄積は異なるメ

カニズムで小胞体ストレスセンサーIre1を活性化する

序論

Unfolded protein response(UPR)とは、一般的には、小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積したことに応じて、小胞体シャペロン遺伝子が転写誘導されてくる現象だと考えられてきた。UPRにおいて細胞内シグナルを仲介する小胞体膜タンパク質はいくつか同定されているが、その中で *Ire1* のみが進化的に真核生物内で保存されている(Mori et al., 2009)。 *Ire1* は I 型膜貫通タンパク質であり、サイトゾル側にエンドリボヌクラーゼ活性を有する。 *Ire1* の機能としては、出芽酵母では *HAC1* mRNA、動物では *XBP1* mRNA のスプライシングが最も良く知られており、それによって成熟した mRNA は転写因子へと翻訳される(Ron and Walter, 2007)。

UPR を引き起こすような細胞へのストレスは小胞体ストレスと呼ばれている。上述のようにこれまで一般的には、小胞体ストレスとは「小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積すること」を意味していると思われてきた。

当研究室や他のグループは、ストレスのない条件では小胞体シャペロン BiP が *Ire1* と会合し、 *Ire1* の活性を抑制していることを明らかにしてきた(Bertolotti et al., 2000; Okamura et al., 2000; Kimata et al., 2003)。小胞体ストレスがおこると、 *Ire1* から BiP が解離し、 *Ire1* は集合体(クラスター)を形成する(Kimata et al., 2007)。 *Ire1* はクラスターを形成することで、その標的である RNA を引き寄せ、効率的なスプライシングを行うことができると報告されている(Aragon et al., 2009)。また、 *Ire1* はクラスター化することにより、高い RNA 切断活性を呈することができることも知られている(Korenykh et al., 2009)。なお、BiP が *Ire1* から解離する機構は不明であり、小胞体内に蓄積した構造異常タンパク質が *Ire1* から BiP を奪うという単純なモデルでは説明できない事象も知られている(Kimata and Kohno, 2011)。よって、構造異常タンパク質が直接的に *Ire1* からの BiP 解離に関与しているか否かは、言及するのは困難である。

しかし、出芽酵母 *Ire1* 活性化における別のステップでは、構造異常タンパク質が直接的に関わっていることも、当研究室により明らかにされた(Kimata et al., 2007)。図 1 A に示す様に、BiP 会合部位は *Ire1* 内腔ドメインのサブ領域 V に位置している(Kimata et al., 2004)。野生型 *Ire1* と同様に、このサブ領域 V を削った変異型 *Ire1* (BiP とは結合できない変異体) も小胞体ストレスによって制御されていることから、BiP の会合と解離は *Ire1* 活性化における主要な決

定要因では無いようである(Kimata et al., 2004, Pincus et al., 2010)。Credle 等は、Ire1 小胞体内腔ドメイン内で固く折り畳まれた領域(Core Stress Sensing Region; CSSR; 図 1 B)の X 線結晶構造を発表しており、CSSR はダイマー状態で構造異常タンパク質を捉えることができる溝を形成すると予測している。Ire1 と構造異常タンパク質が実際に相互作用することについては、当研究室では、組換え CSSR タンパク質が *in vitro* でモデル変性タンパク質の凝集を抑えること、さらに、*in vivo* でもモデル構造異常タンパク質である CPY*が Ire1 と会合していることにより実証している (Kimata et al., 2007, Promlek et al., 2011)。そして、サブ領域IIIを削った変異体である Δ III Ire1 (図 1 C に変異の位置を示す) では、CSSR が変性タンパク質と相互作用できなくなることも見いだした。なお、チオール還元剤であるジチオスレイトール(DTT)または N 結合型糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシンで細胞を処理、あるいは CPY*の大量発現により UPR は惹起するが、それは Δ III 変異により不全を来した (Kimata et al., 2007 Promlek et al., 2011)。このことから当研究室では、Ire1 は 2 段階のステップで活性化するというモデルを提唱している。すなわち、第一のステップでは BiP の解離によって Ire1 はクラスター化し、第二のステップでは Ire1 クラスターに構造異常タンパク質が直接的に作用するというモデルである。

しかし一方、いくつかの知見から、UPR は小胞体内に蓄積した構造異常タンパク質に対応するためだけに活性化しているのではないとも考えられている。DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析では、Ire1-*HAC1* 経路による UPR によって、小胞体シャペロンやタンパク質分解因子だけでなく、小胞体トランスロコン構成因子、COP II 構成因子、小胞体膜生成酵素など様々なタンパク質が転写誘導されることが示されている(Travers et al., 2000; Kimata et al., 2006)。さらに、*IRE1* または *HAC1* 遺伝子欠損は、リン脂質の主要構成成分であるイノシトールの要求性という表現型を示す。そして、イノシトールを出芽酵母培養液から欠乏させると、Ire1 が活性化する(Cox et al., 1997)。また、ほ乳類では様々な生理学的あるいは病理学的状況下で UPR が惹起されるが、そのうちいくつかの局面は、小胞体内へのタンパク質の流入 (および小胞体でのタンパク質折り畳み) と深くは関係していないようである(Rutkowschi and Hegde, 2010)。

本研究では、様々なストレス条件下での出芽酵母 Ire1 の活性化ステップを検証した。そして、膜のホメオスタシスを乱すようなストレス刺激を細胞に与えると、小胞体内に変性タンパク質が蓄積した場合とは別の様式で、Ire1 は活性

化することを明らかにした。この知見から、UPRの役割とは、折り畳み不全タンパク質の蓄積への対応だけではないことが強く示唆される。

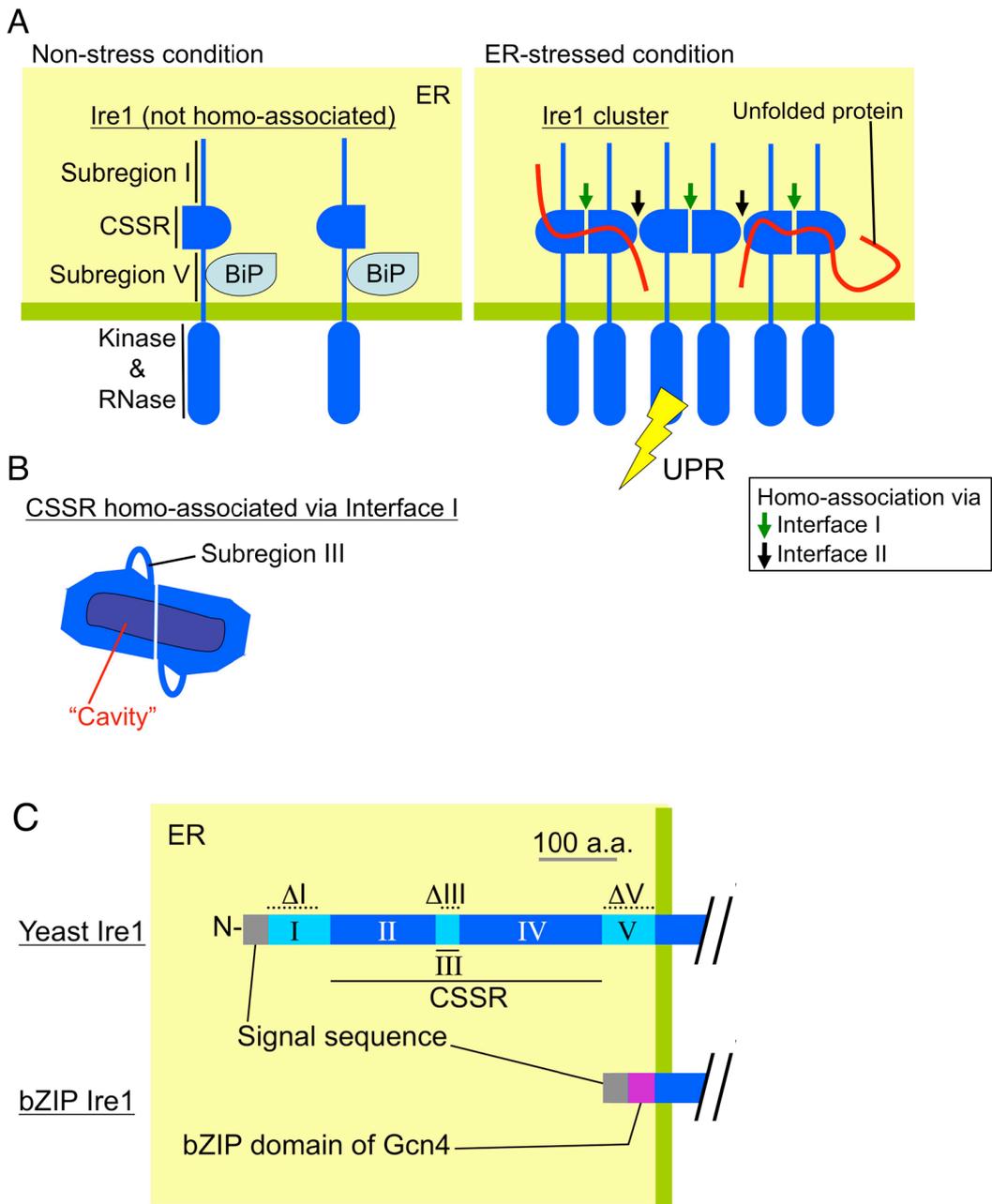


図1 出芽酵母 Ire1 小胞体内腔ドメインの構造と機能についての現在までのモデル

出芽酵母 Ire1 小胞体内腔ドメインは5つのサブ領域に分けることが出来る。サブ領域 I (aa 32-111)とサブ領域 V(aa 455-524)の折り畳みは緩いのに対し、サブ領域 II (aa 112-242)とサブ領域IV(aa 273-454)は一体として固く折り畳まれており、CSSR を形成している(Kimata et al., 2004; Oikawa et al., 2005, Credle et al., 2005)。なお、サブ領域III(aa 243-272)は CSSR 内で折り畳み状態の緩いループを構成している。

A : 非ストレス条件下では、BiP はサブ領域 V に結合している(Kimata et al., 2004)。小胞体ストレス条件下では、Ire1 から BiP が解離することで、Ire1 はクラスターを形成する(2つの異なる面(インターフェース I と II)で CSSR がホモ会合する; Credle et al., 2005; Kimata et al., 2007)。次いで、折り畳み不全タンパク質が直接的に Ire1 クラスターに作用することにより、Ire1 は完全に活性化する(Kimata et al., 2007)。

B : インターフェース I を介してホモ会合した CSSR は溝のような構造を形成し、この溝で折り畳み不全タンパク質をとらえると考えられる(Credle et al., 2005)。

C : Ire1 小胞体内腔ドメインの一次構造と、本研究で用いた変異体：点線で示した部分は Δ I (aa 32-91)、 Δ III(aa 253-272)、 Δ V(aa 463-524)変異により欠失した部分。bZIP 変異では、Ire1 の小胞体内腔ドメイン全体が出芽酵母 Gcn4 由来の bZIP ドメイン(aa 249-281)に置換されている。

材料と方法

プラスミド

出芽酵母 *IRE1* プラスミド pRS313-*IRE1* 及び C 末端 HA タグ付き *IRE1*(*Ire1*-HA)プラスミド pRS423-*IRE1*-HA はそれぞれ、出芽酵母シングルコピー(ARS+CEN)ベクターpRS313(Sikorski and Hieter, 1989)およびマルチコピー(2 μ)ベクターpRS423(Christianson et al, 1992)から作成した(Kimata et al., 2003; Kimata et al., 2004)。これらのプラスミドでは、*Ire1* (あるいは *Ire1*-HA) は *IRE1* 自身のプロモーターから発現される。また、これらのプラスミドへの変異導入では、Kimata 等(2004)で行われたのと同様に、Overlap PCR 法と *in vivo* Gap Repair 法が用いられた。*bZIP-Ire1* 遺伝子では、*IRE1* の部分配列(小胞体内腔ドメイン;アミノ酸配列 32 から 524 に相当)が出芽酵母 *GCN4* の部分配列 (*bZIP* モチーフ ;アミノ酸配列 249 から 281 に相当) に置換されている。

出芽酵母菌株

本研究では主として、出芽酵母 *ire1* Δ 株 KMY1516 (*MAT* α *ura3-52 LEU2::UPRE-CYC1 core promoter-GFP::leu2-3,112 his3- Δ 200 trp1- Δ 901 LYS2::(UPRE)5-CYC1 core promoter-lacZ::lys2-801 ire1 Δ ::TRP1*)を用いた。

遺伝子欠損解析の対象とする遺伝子 (欠損により UPR が惹起される遺伝子) を選ぶために、Jonikas 等の論文(2009)を参考にした。すなわち、彼らの論文において、遺伝子欠損により *UPRE-GFP* 蛍光値/*TEF2pr-RFP* 蛍光値 > 2.0 となる遺伝子を選んだのである。この際、機能未知の遺伝子(*CSF1*, *YBL083C*, *YML013C-A*, *FYV6*, *ILM1*, *YDL096C*, *YHR039C-B*)、私自身の実験では欠損による UPR が再現できなかった遺伝子(*OTS3*, *SEL1*, *GUP1*, *LHS1*, *PMT1*, *VAN1*)、遺伝子欠損に成功しなかった遺伝子 (*SPF1*,*PER1*, *GLO1*;欠損が著しい生育遅延を引き起こすことが分かっている ; <http://www.yeastgenome.org/>)、*ALG3* と同一の経路で働く遺伝子(*ALG6*, *ALG9*, *ALG12* ; *ALG3* のみを解析した)は除外した。また、脂質関連の遺伝子に関しては、その欠損による UPR がもっと弱い場合でも(Jonikas et al., 2009)、解析対象とした (*OPI3*, *SCS3*, *ISC1*)。 *SEC28* も解析対象としたのは、当研究室の研究により、その欠損により UPR が惹起されることが分かっていたからである(Kimata et al., 1999; Kimata et al., 2000)。

遺伝子欠損解析においては、まず、対象とする遺伝子の KanMX4 遺伝子欠損カセットを EUROSCARF 遺伝子欠損株から PCR により増幅した。なお、この PCR においては、欠損させるべき ORF よりも約 100bp 上流（センス）と下流（アンチセンス）にハイブリダイズする様、プライマーが設計されている。次いで、pRS313-IRE1 の URA3 型である pRS316-IRE1 を有する KMY1516 を、この遺伝子欠損カセットにより形質転換した。得られた遺伝子破壊株は、さらに pRS313-IRE1、もしくはその ΔIII 変異体により形質転換した。そして最後に、0.1% 5-フルオロオロチン酸 (URA3 を有する菌株はこの薬剤に感受性である) と 0.01% ウラシルを含む SD 寒天培地で生育させることにより、pRS316-IRE1 が脱落したクローンを選択した。

出芽酵母培地と培養条件

最小培地 (SD ; 2% glucose, 0.67% Difco yeast nitrogen base without amino acids (YNB w/o AA) ; 栄養要求マーカーとなる栄養を補充した) にて、30°C で出芽酵母細胞を培養した。また、イノシトール欠乏 SD 培地 (イノシトール欠乏培地) は、Difco™ & BBL™ Manual (<http://www.bd.com/>) に基づいて、市販の化学薬品の混合により作成した。SD 培地からイノシトール欠乏培地に細胞を移す際には、遠心法により細胞を回収し、イノシトール欠乏培地にて 6 回洗浄 (遠心による細胞の回収と再懸濁) を行った。

β ガラクトシダーゼ測定とデータ表記

対数増殖期にある培地 1ml から遠心法により菌体を回収し、0.9ml の Z buffer (60mM Na₂HPO₄, 10mM KCl, 40mM NaH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 2.7 μl/ml 2-Mercaptoethanol) に懸濁した。次いで、この懸濁液から 100 μl を分取し、OD600 による濁度測定に供した。残りの懸濁液については、20 μl の 0.1% SDS と 50 μl のクロロホルムを加え、10 秒間ボルテックスで攪拌することにより、細胞破碎を行った。そして、28°C で 3 分間放置した後、4mg/ml o-Nitrophenil- β -D-galactosidase (Z buffer 溶液) 200 μl を加え、ガラクトシダーゼ反応を 28°C で行わせた。反応の停止には 500 μl の 1M Na₂CO₃ を加え、10000rpm 2min 遠心後の上清の OD420 にて反応産物の量を見積もった。OD600=1 の菌体が 1 分間に 1nmol の基質を分解する活性が 1 unit と定義される。

図 7 B に示した数値とエラーバーは、それぞれ計算式 “ a/c ” と “ $(a/c)\sqrt{\{(b/a)^2+(d/c)^2\}}$ ” から算出した (a と b はそれぞれ図 7 A に示した ΔIII Ire1

の値と標準偏差を表し、c と d はそれぞれ野生型 Ire1 の値と標準偏差を表す)。

RNA 解析

出芽酵母細胞からの全 RNA サンプルの抽出には、ホットフェノール法を用いた(Kimata et al., 2003)。この RNA サンプル $2 \mu\text{g}$ を用い、Invitrogen 社の指示通り、 $10 \mu\text{l}$ スケールで Invitrogen SuperScript II 逆転写酵素による逆転写反応を行った。なお、プライマーには dT18 オリゴヌクレオチドを用いた。この反応産物 $2 \mu\text{l}$ に対して、*HAC1* 増幅用プライマー (各 $10 \mu\text{M}$; forward: 5'-TACAGGGATTTCCAGAGCACG-3'、reverse: 5'-TGAAGTGATGAAGAAATCATTCAATTC-3') を $1 \mu\text{l}$ 、 2.5mM dNTP mix を $2 \mu\text{l}$ 、TAKARA Taq DNA polymerase 付属 $10\times\text{PCR}$ バッファーを $2.5 \mu\text{l}$ 、水を $16.37 \mu\text{l}$ 、TAKARA Taq DNA polymerase ($5\text{U}/\mu\text{l}$) を $0.13 \mu\text{l}$ 混和し、 94°C 30 秒、 54°C 30 秒、 72°C 60 秒のサーマルサイクル反応を 25 サイクル行った。この PCR 産物を 2%アガロースゲルによる電気泳動に供し($0.5\times\text{TBE}$ バッファー ; ゲルは EtBr を含有)、Fujifilm LAS-4000 冷却カメラシステムでゲルの蛍光画像を取得した。そして、*HAC1^u* と *HAC1ⁱ* のバンドの蛍光強度を定量するため、画像データを Fujifilm ImageGauge ソフトウェアで解析した。*HAC1* mRNA スプライシング%は、以下の計算式により算出される。

$$100 \times [\textit{HAC1}^i \text{ のバンドの濃さ}] / ([\textit{HAC1}^u \text{ のバンドの濃さ}] + [\textit{HAC1}^i \text{ のバンドの濃さ}])$$

抗体

用いた抗体は表 1 に示した。

表 1 本研究で用いた抗体

Description	Working concentration	Purpose	Source
12CA5 mouse monoclonal IgG to the HA epitope	1 μ g/ml	Western blotting	Roche
	2 μ g/ml	Immunofluorescent staining	
	4 μ g/ml	Immunoprecipitation	
Rabbit anti-yeast BiP antiserum	1: 1000 dilution	Western blotting	Higashio et al. (2000) (a)
	1: 500 dilution	Immunofluorescent staining	
HRP-conjugated goat antibody to mouse Igs	1: 1000 dilution	Western blotting	Dako
HRP-conjugated donkey antibody to rabbit IgG	1: 1000 dilution	Western blotting	GE Healthcare
FITC-conjugated goat antibody to mouse Igs	1: 100 dilution	Immunofluorescent staining	Cappel
Cy5-conjugated donkey antibody to mouse IgG	1: 100 dilution	Immunofluorescent staining	Jackson ImmunoResearch Laboratories
FITC-conjugated goat antibody to rabbit IgG	1: 100 dilution	Immunofluorescent staining	Cappel

(a) Higashio, H., Y. Kimata, T. Kiriya, A. Hirata, and K. Kohno (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17900–17908.

細胞抽出液の調製

40ml の培養液 (OD600=0.7 程度) から遠心法にて菌体を回収し、200 μ l の lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH7.9), 5mM EDTA, 1% TritonX-100) に懸濁した。なお、その菌体懸濁液には、プロテアーゼ阻害剤(100mM PMSF, 20mg/ml Aprotinin, 20mg/ml Pepstatin, 20mg/ml Leupeptin) を各 2 μ l ずつ加えた。菌体破碎のためには、200 μ l の 0.5mm グラスビーズを加え、vortex にて最高速度で 5 分間攪拌した。次いで、3,000rpm 30 秒の遠心により、ビーズと細胞破碎物を分離し、さらに細胞破碎物の 10,000rpm 10min の遠心後、上清を回収した。

免疫沈降

細胞抽出液を IP buffer(6% Skim milk, 60mM Tris-HCl (pH7.9), 6mM EDTA, 180mM NaCl, 1% TritonX-100) にて 5 倍希釈後、細胞抽出液の液量に対して 8% の Protein Sepharose 4FF ビーズ (GE Healthcare ; あらかじめ等量の IP buffer に懸濁) を加え、4°C でローテーターにて 30 分間攪拌した。次いで、3,000rpm 30 秒の遠心による上清を回収した後、抗 HA 抗体を加え、4°C でローテーターにて 1 時間攪拌した。次いで、10,000rpm 10 分の遠心による上清を回収した後、液量に対して 2% の Protein Spharose 4FF (あらかじめ等量の IP buffer に懸濁)、4°C でローテーターにて 1 時間攪拌した。次いで、3,000rpm 30 秒の遠心により沈殿したビーズを回収し、wash buffer(50mM Tris-HCl (pH7.9), 5mM EDTA, 150mM NaCl, 1% TritonX-100) で 5 回洗浄した。上清を完全に除去した後、ビーズは等量の SDS-PAGE sampling buffer with DTT に懸濁し、95°C で 30 秒加熱した。そして、10,000rpm 1min の遠心にて得られた上清を免疫沈降産物とした。

タンパク質解析

細胞抽出液(OD600=1 相当)または免疫沈降産物 (OD600=10 相当) サンプルは標準的な SDS/DTT 変性 PAGE(8%アクリルアミド)に供した後、ウェスタンブロットを行い(Kimata et al., 2003)、LAS4000 システムにて HRP-ECL 化学発光シグナルを検出した。

細胞の蛍光抗体染色と顕微鏡観察

細胞の固定と蛍光抗体染色は、過去の文献(Kimata et al., 2007)に基づき行った。そして、Olympus DP70 CCD カメラ付き Carl Zeiss Axiophoto 蛍光顕微鏡 (100×/1.30 Plan-Neofluor 対物レンズ)、または Apotome deconvolution system 付き Carl Zeiss Axiovert 200M 蛍光顕微鏡 (100× 1.40 Plan-Apochromat 対物レンズ ; 図 9 B) を用いて細胞を観察した。画像の重ね合わせには、Adobe Photoshop ソフトウェアを用いた。

結果

イノシトール欠乏では ΔIII Ire1 は野生型 Ire1 と同程度に活性化する

細胞内での Ire1 の活性を評価するため、本研究では Ire1 の標的である *HAC1* mRNA のスプライシング効率を計測した。本研究では、総 RNA サンプルから *HAC1* 産物を RT-PCR にて増幅し、アガロースゲル電気泳動により非スプライシング型とスプライシング型に分けている (図 2)。Ire1 欠損株ではどのような条件下でも *HAC1* mRNA のスプライシングは見られなかったことも (図 3)、この手法による Ire1 の活性評価の妥当性を示している (図 3)。図 2 の生データは、「材料と方法」で書いた手法により定量化し、図 4 に表した。

図 4 A に示す様に、終濃度 3mM にて DTT を培地に加えると、野生型 Ire1 は素早く、かつ、強く活性化する。その活性は、ストレス刺激を受けてから約 30 分でピークに達し、徐々に減弱する。しかし、 ΔIII Ire1 の場合、そのような急速な活性化は見られなかった。すなわち、 ΔIII Ire1 は徐々に *HAC1* mRNA スプライシング活性を増大させ、ストレス刺激を受けてから 5 時間後には、野生型 Ire1 と同程度に活性化した。これと類似の結果は、0.6 μ g/ml ツニカマイシンで細胞を処理した場合でも得られた (図 4 B)。ところが、培地からイノシトールを欠乏させると、野生型 Ire1 と ΔIII Ire1 はほとんど同じ活性化パターンを示した。すなわち、両者とも、イノシトール欠乏後約 5 時間後に、同程度の強さでピークの活性を呈した (図 4 C)。なお、図 4 D に示す様に、 ΔIII 変異体はいかなる濃度の DTT でも、急速な活性化 (ストレス刺激後 30 分) には不全を来していた。

図 5 では、「イノシトール欠乏によって引き起こされた小胞体ストレス」は「DTT によって引き起こされたストレス」とは本質的に異なることを示唆している。この実験では、スフィンゴ脂質合成阻害剤であるミリオシンを、小胞体ストレス処理 5 時間前に培地に加えた。ミリオシン添加により、DTT 処理による Ire1 活性化はほとんど変化しなかったにも関わらず、イノシトール欠乏による Ire1 活性化は有意に減弱した。

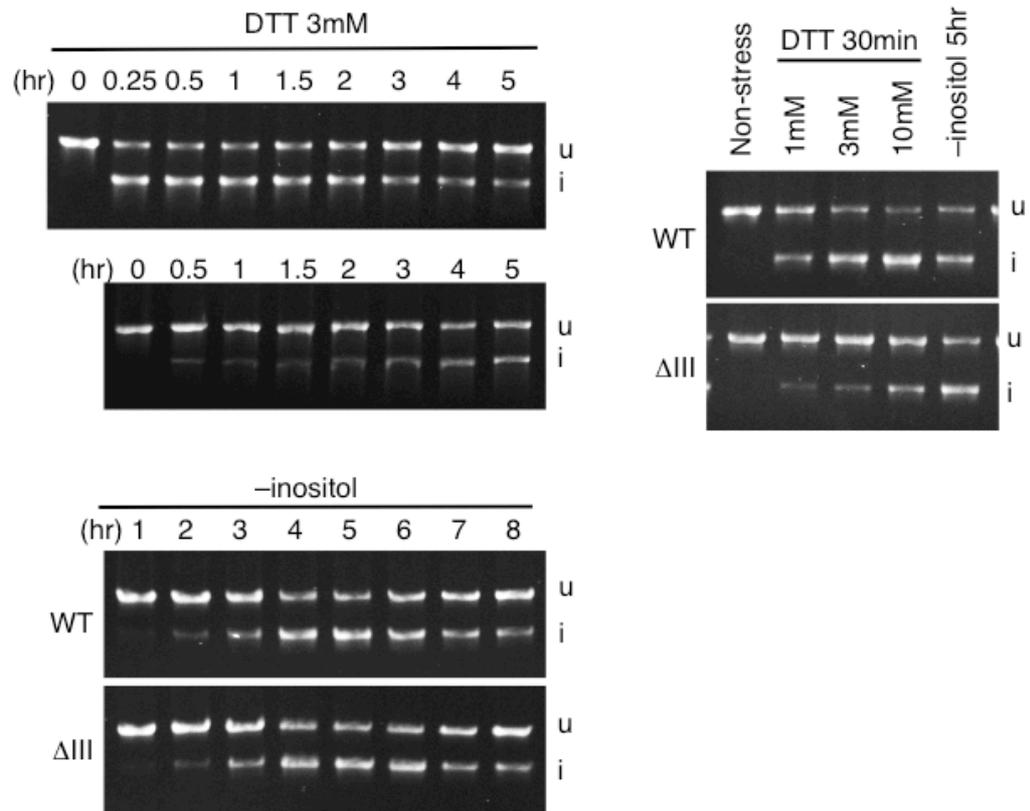


図2 *HAC1* mRNA スプライシングへの ΔIII 変異の影響

ire1 Δ 株 KMY1516 に *IRE1* 遺伝子(WT)または変異体(プラスミド pRS313-IRE1 またはその変異体)を導入した細胞に対して、図に示したストレスを与え、総 RNA サンプルを RT-PCR に供して *HAC1* 産物を増幅、2%アガロースゲル電気泳動にて分画後に EtBr 染色で可視化した (*HAC1^u*(u: 前駆体型)と *HAC1ⁱ*(i: スプライシング型) のバンドの位置を図中に示す)。

*ire1*Δ cells

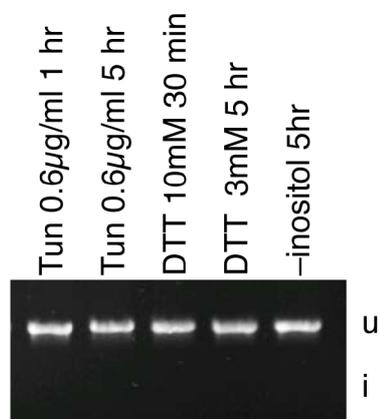


図3 *ire1*Δ細胞では *HAC1* mRNA スプライシングは認められない

*ire1*Δ株 KMY1516 に図に示したストレスを与え、総 RNA サンプルを RT-PCR に供して *HAC1* 産物を増幅、2%アガロースゲル電気泳動にて分画後に EtBr 染色で可視化した (*HAC1*^u(u : 前駆体型)と *HAC1*ⁱ(i : スプライシング型)のバンドの位置を図中に示す)。

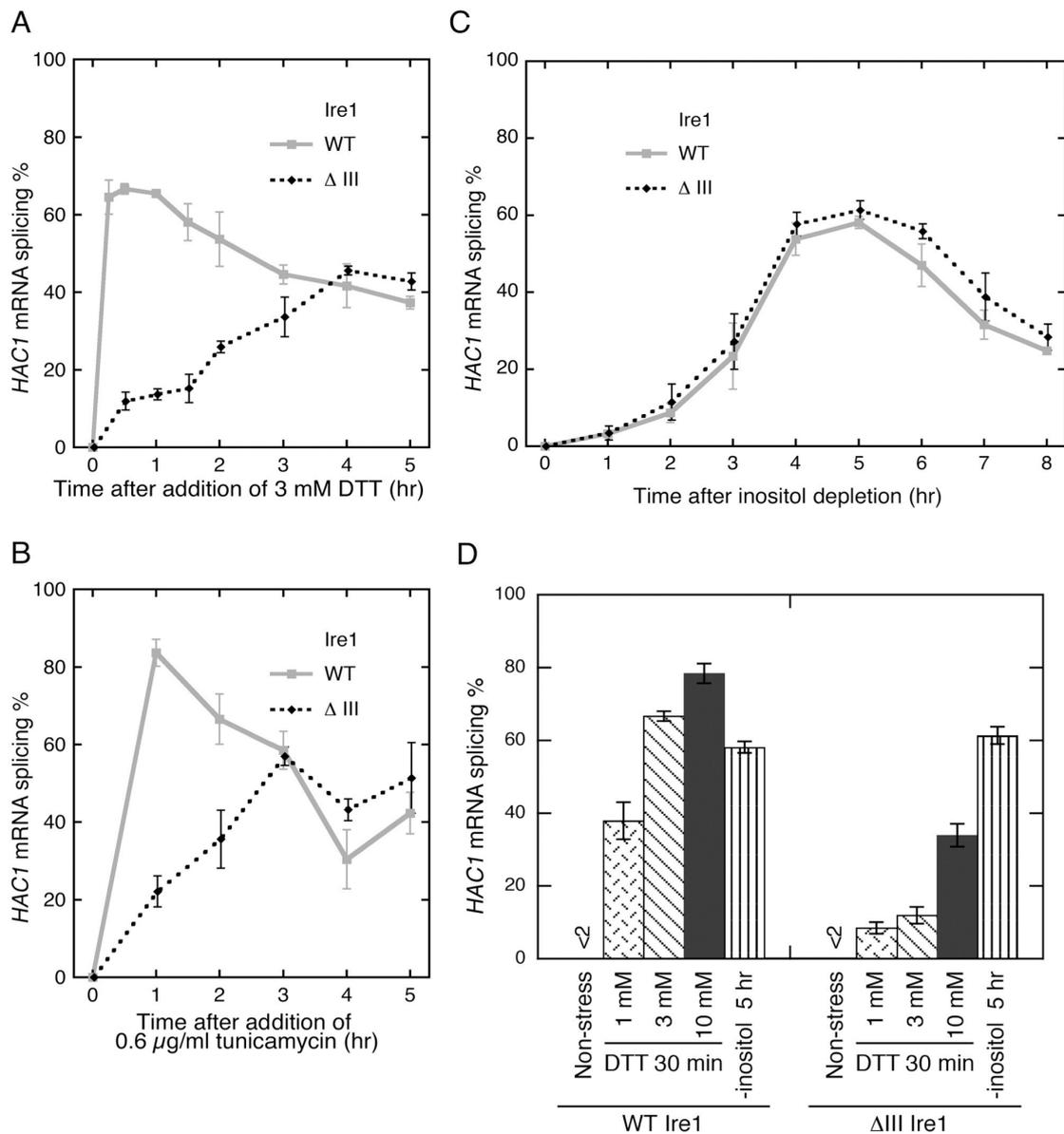


図4 さまざまなストレス刺激による Ire1 活性化に及ぼす Δ III 変異の効果

ire1 Δ 株 KMY1516 に野生型 *IRE1* プラスミド(pRS313-*IRE1*; WT)またはその Δ III 変異体を導入した細胞に対し、DTT(A と D)またはツニカマイシン(B)存在下にて、あるいは、イノシトール欠乏培地にて培養することにより(C と D)、ストレスを与えた。なお、ストレス開始(培地への薬剤投与、イノシトール欠乏培地への交換)を時間0とする。総 RNA サンプルを RT-PCR に供し、*HAC1* mRNA のスプライシング効率を評価した。エラーバーは3つの独立したクローンからのデータの標準偏差を示している。

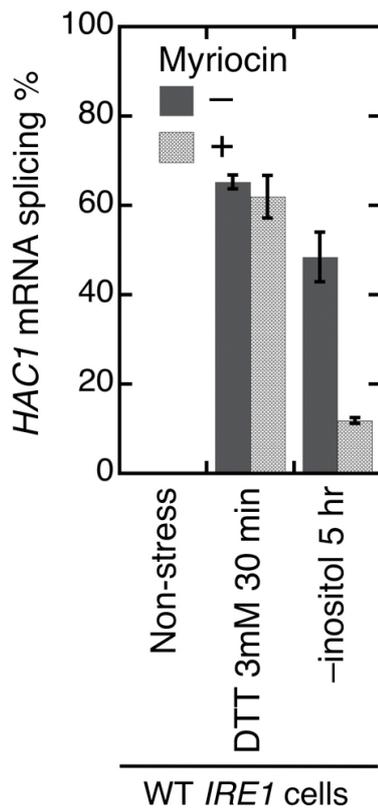


図5 DTT処理とイノシトール欠乏によるストレス刺激の相違

ire1 Δ株 KMY1516 に野生型 *IRE1* プラスミド(pRS316-IRE1)を導入した細胞に対して、0.5 μg/ml のミリオシン存在下(+)あるいは非存在下(-)にて、図に示したストレスを与えた。なお、ミリオシンは表記のストレスを与える5時間前に培地に加えている。総RNAサンプルをRT-PCRに供し、*HAC1* mRNA スプライシング効率を評価した。エラーバーは3つの独立したクローンからのデータの標準偏差を示す。

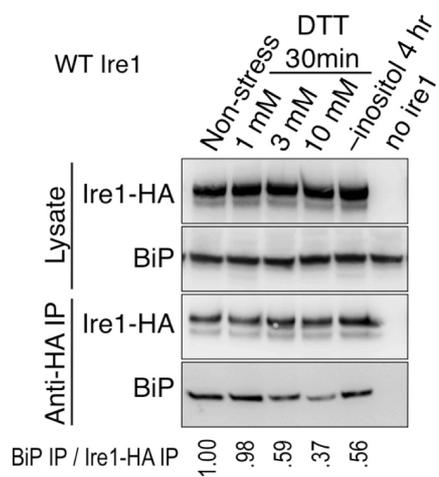
イノシトール欠乏による Ire1 の活性化ステップ

当研究室や他の研究グループは、汎用の小胞体ストレス剤処理（DTT やツニカマイシン投与）に応じて、BiP が Ire1 から解離し、クラスター化することを見いだしている（Kimata et al., 2007; Aragon et al., 2009; Li et al., 2010）。そこで私は、イノシトール欠乏による Ire1 活性化も同様の経緯をたどるのかを検証した。まずは、BiP と Ire1 の結合・解離に関してである。図 6 A に示す様に、C 末端に HA エピトープタグを付加した野生型 Ire1 と BiP との細胞内での結合を、抗 HA 抗体による免疫沈降により調べた。以前から知られている様に、DTT にて 30 分間処理した細胞では、DTT の濃度依存的に Ire1 から BiP が解離した。今回は、イノシトール欠乏 4 時間でも、BiP は Ire1 から解離することを見いだした。なお、3mM DTT にて 30 分間処理したサンプルでは、4 時間イノシトールを欠乏させたサンプルとほぼ同程度に BiP が解離していた。ちなみに、この 2 つの実験条件では、*HAC1* mRNA スプライシング効率も同程度である（図 4 A および C を参照）。同様の傾向は、Ire1 のクラスター形成でも認められた。すなわち、当研究室の以前の研究に基づき（Kimata et al., 2007）、図 6 B では、Ire1-HA の細胞内局在を抗 HA 免疫蛍光染色によって可視化し、Ire1 のクラスター化について検証した。非ストレス時では小胞体様のパターン（2 重の輪）であった Ire1-HA 局在は、DTT 処理の場合だけでなく、イノシトールの欠乏でも、ドット状のパターンへと変化した。私は、このドット状の染色パターンは Ire1 のクラスター化を示していると考えている。なぜなら、CSSR に点変異が導入されたクラスター化不能変異体である W426A Ire1（インターフェース II を介したホモ会合が出来ず、オリゴマーを形成できない）では、ドット状パターンは観察されないからである。

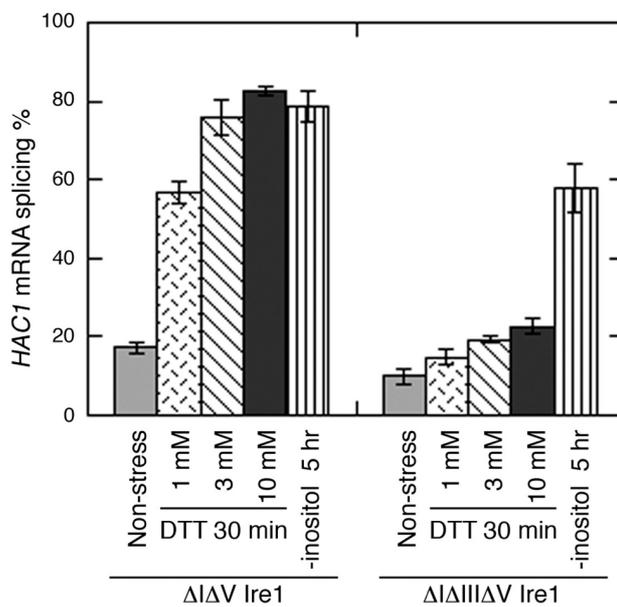
一方、クラスターを形成するだけでは Ire1 の *HAC1* mRNA スプライシング能は完全には活性化しないことが、これまでの当研究室の研究で明らかになっている（Kimata et al., 2007）。 $\Delta I \Delta V$ 欠損変異体（変異の位置は図 1C に示す）は Ire1 のクラスター形成が制御されず、恒常的にクラスターを形成する変異体である（Kimata et al., 2007 ; BiP 結合部位であるサブ領域 V に加えて、サブ領域 I も何らかのメカニズムにより Ire1 のクラスター形成を抑制している）。そして、 $\Delta I \Delta V$ Ire1 は DTT やツニカマイシンで強く活性化するのに対し、 $\Delta I \Delta III \Delta V$ 変異体は活性化しない（Oikawa et al., 2007; Kimata et al., 2007）。この知見から当研究室では、CSSR と折り畳み不全タンパク質との物理的相互作用

用が、クラスター化した Ire1 の完全な活性化を担うと考えている。そこで私は、イノシトール欠乏の場合での Ire1 の活性化パターンはどうなのかを検証した(図 6 C)。上述の通り、 $\Delta I \Delta V$ Ire1 は DTT 処理後、素早く(ストレスを与えてから 30 分後)活性化したが、 ΔIII 変異導入によってこの活性化は著しく弱まった。一方、イノシトール欠乏でも $\Delta I \Delta V$ Ire1 は大きく活性化したが、この場合は、 ΔIII 変異を導入してもほとんど活性は低下しないことが分かった。

A



C



B

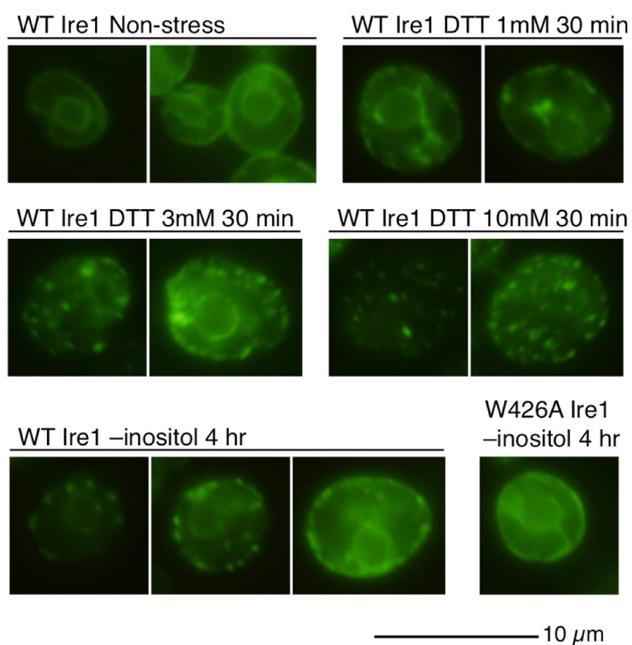


図6 DTT 処理やイノシトール欠乏による Ire1 の活性化ステップ

A: *ire1* Δ株 KMY1516 に HA タグ付き Ire1 プラスミド pRS423-IRE1-HA(または空ベクター-pRS423; no *ire1*)が導入された細胞に対して、図で示した条件でストレスを与え、細胞抽出液(Lysate)を抗 HA 抗体による免疫沈降(Anti-HA IP)に供した後、表記のタンパク質を抗 HA または抗 BiP 抗体ウェスタンブロッティングにより検出した。

B: A で用いた細胞(または pRS423-IRE1-HA の W426A 変異型)に対して、図に示した条件でストレスを与え、抗 HA 抗体にて蛍光抗体染色した (二次抗体は FITC ラベル)。

C: *ire1* Δ株に *IRE1* プラスミド(pRS313-IRE1)の様々な変異体バージョンが導入された細胞に対し、図に示した条件でストレスを与えた後、総 RNA サンプルを RT-PCR に供し、*HAC1* mRNA のスプライシング効率を評価した。エラーバーは3つの独立したクローンからのデータの標準偏差を示している。

遺伝子欠損による野生型 Ire1 と Δ III Ire1 の活性化

次に私は、イノシトール欠乏以外に、どのようなストレスが Δ III Ire1 と野生型 Ire1 を同程度に活性化させるのかを調べた。外界からのストレスに代わって、ここでは非必須遺伝子の破壊によりストレスを与えた。どのような遺伝子の破壊により UPR が引き起こされるかについては、Jonikas 等(2009)による出芽酵母遺伝子網羅的破壊のデータを参考にした。彼らが一掃した遺伝子破壊による UPR 惹起については、私の実験でも概ね再現でき、最終的には表 2 に示した 18 遺伝子を以下の解析に供した。

まず、図 7A では、細胞の UPR 活性は、染色体に組み込んだ UPR-lacZ レポーターの誘導によって調べた。また、Ire1 の活性は、*HAC1* mRNA スプライシングでも評価した(図 8)。どちらの解析でも、野生型 Ire1 株と Δ III Ire1 株の双方に遺伝子欠損が導入されている。なお、両解析とも、概ね一致する知見が得られた。

結果を見やすくするため、図 7A の値を用い、図 7B の値を算出した。図 7B では、 Δ III 変異によりどの程度、Ire1 の活性化が弱まっているかが示されている。*SCJ1*, *SPC2*, *STE24*, *ERV14*, *ERV25*, *ALG3*, *EOS1*, *PMT2* あるいは *ERD1* 欠損では、 Δ III Ire1 より野生型 Ire1 の方が有意に強く活性化していた。一方、*SEC28*, *BST1*, *LAS21*, *ARV1*, *GET1*, *OPI3*, *SCS3*, *ISC1* あるいは *MGA2* 遺伝子欠損では、野生型 Ire1 と Δ III Ire1 の活性化に有意な差は認められなかった。考察にて詳述するように、前者の遺伝子欠損は概して小胞体内腔への（構造異常）タンパク質蓄積へとつながり、後者の遺伝子欠損は膜や脂質関連の異常につながると考えられる。すなわち、Ire1 は膜や脂質関連の異常によっても活性化し、その際には構造異常タンパク質は必要とされないことが示唆されたのである。

表 2 出芽酵母において欠損によりUPRを惹起する遺伝子

<u>Processing or folding of secretory proteins</u>	
<i>SCJ1</i>	Co-chaperone of BiP
<i>SPC2</i>	Subunit of signal peptidase
<u>Glycosylation</u>	
<i>ALG3</i>	Synthesis of oligosaccharide donor for N-linked glycosylation of proteins
<i>EOS1</i>	N-linked glycosylation
<i>PMT2</i>	Protein O-mannosyltransferase
<u>Vesicle transport and related events</u>	
<i>ERV14</i>	Cargo receptor in ER-to-Golgi transport
<i>ERV25</i>	Cargo receptor in ER-to-Golgi transport
<i>SEC28</i>	Subunit of COPI vesicle coat
<u>GPI-anchor production</u>	
<i>BST1</i>	GPI inositol deacylase
<i>LAS21</i>	Synthesis of the GPI core structure
<u>Lipid metabolism and homeostasis</u>	
<i>ARV1</i>	Intracellular transport of lipidic components
<i>OPI3</i>	Phosphatidylcholine biosynthesis
<i>SCS3</i>	FIT family protein (triglyceride droplet biosynthesis)
<i>ISC1</i>	Phosphosphingolipid phospholipase C
<i>MGA2</i>	Transcriptional regulation of <i>OLE1</i> encoding delta 9 fatty acid desaturase
<u>Other function related to ER membrane</u>	
<i>GET1</i>	Insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane from cytosol
<u>Unknown function</u>	
<i>STE24</i>	Zinc metalloprotease
<i>ERD1</i>	Retention of BiP in the ER

Genes functions described here are based on *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>).

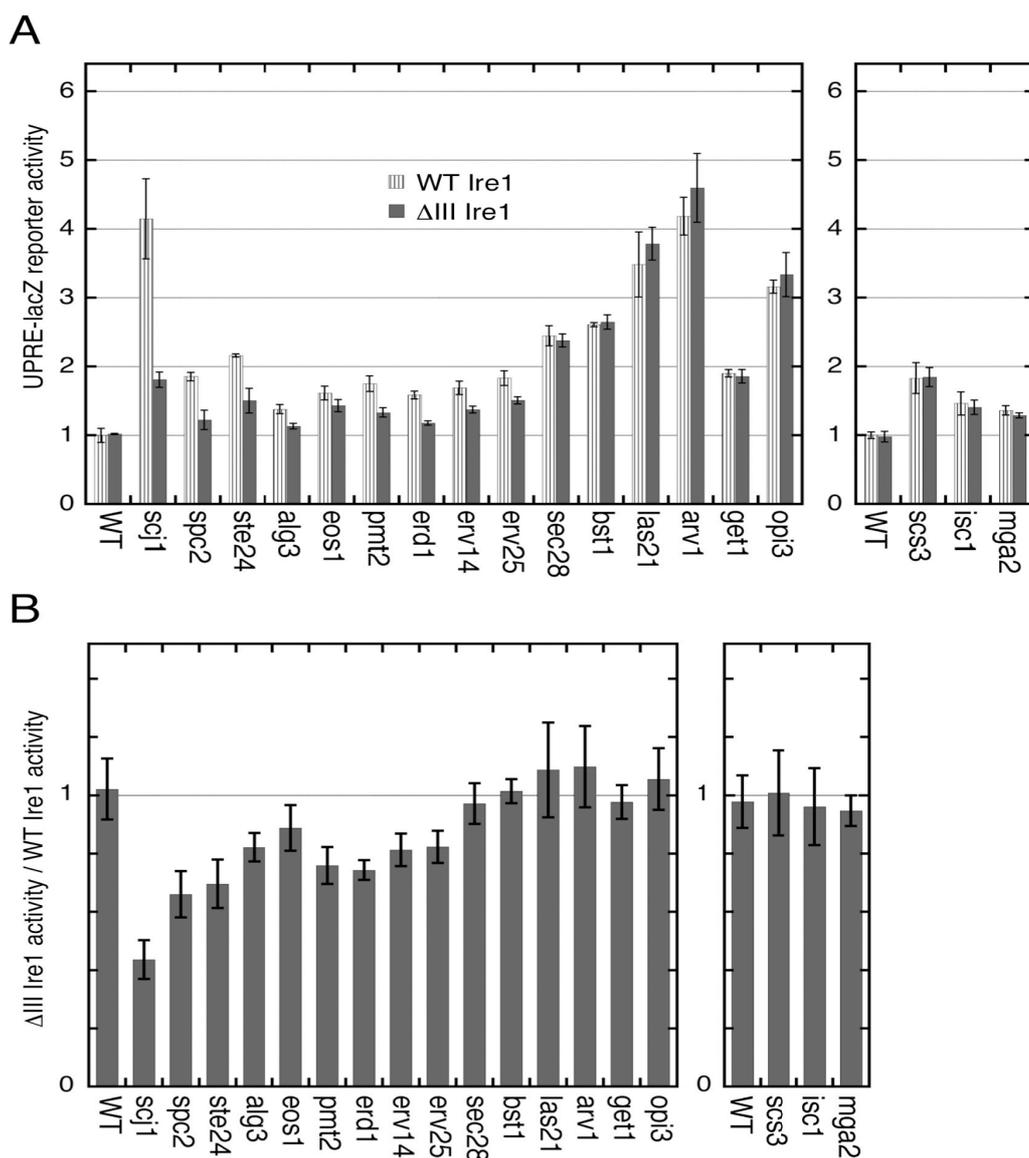


図7 遺伝子欠損による野生型 Ire1 と Δ III Ire1 の活性化プロファイル

A : 材料と方法に示した様に、*ire1* Δ株 KMY1516(染色体上に UPRE-lacZ レポーター遺伝子を有する)に野生型(WT)または Δ III *IRE1* 遺伝子(pRS313-Ire1 またはその変異体)を導入し、図に示した遺伝子を欠損させた。次いで、細胞の β ガラクトシダーゼ活性を測定し、その数値を野生型 *IRE1* WT 細胞(値を 1.00 とした)に対して標準化した。エラーバーは3つの独立したクローンからのデータの標準偏差を示す。スチューデントの t 値検定によると、*SCJ1*, *SPC2*, *STE24*, *ALG3*, *EOS1*, *PMT2*, *ERV14*, *ERV25* あるいは *ERD1* の欠損では、Δ III 変異より有意に β ガラクトシダーゼ活性が減少した(P<0.05)。しかし、野生型細胞あるいは他の遺伝子欠損では、野生型 Ire1 と Δ III Ire1 の間に有意な差は認められなかった。

B : A のデータから、野生型 Ire1 細胞の値に対する Δ III Ire1 の値の割合を算出した。

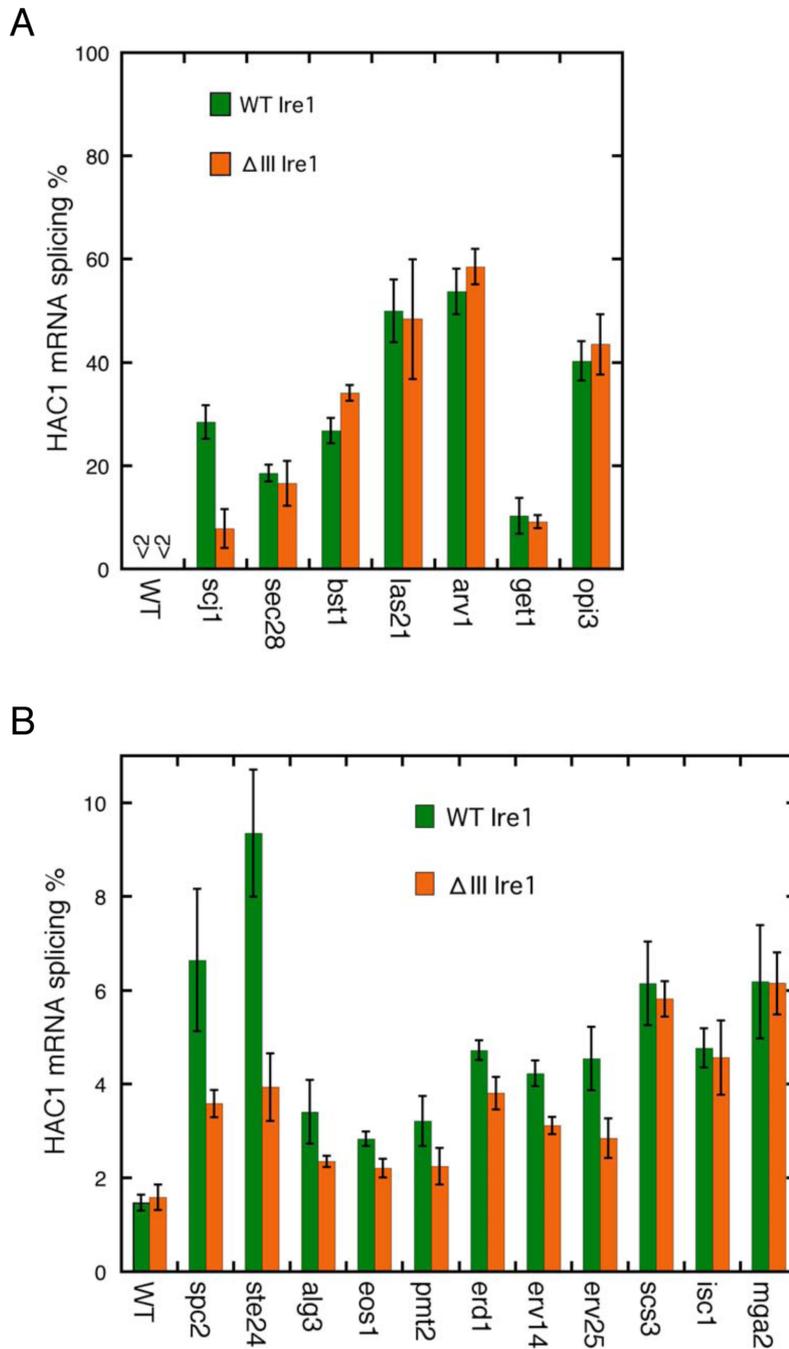


図8 遺伝子欠損による *HAC1* mRNA スプライシング

図7A で用いた細胞から総 RNA サンプルを抽出し、RT-PCR に供し、*HAC1* mRNA のスプライシング効率を評価した。A で示した遺伝子欠損に比べて、B で示した遺伝子欠損ではスプライシングの程度が弱く、Y 軸のスケールが A と B では異なっている。エラーバーは3つの独立したクローンからのデータの標準偏差を示す。

Ire1によるイノシトール欠乏の感知には小胞体内腔ドメインは関与しない

Liu 等(2000)は、核内転写因子タンパク質由来のベーシックロイシンジッパー (bZIP)モチーフにて小胞体内腔ドメインを置き換えたキメラ Ire1 株でも、程度は弱いながら、ツニカマイシン処理に応じて UPR が惹起されることを報告している。bZIP モチーフの機能は、それを有するタンパク質のホモ会合である。すなわち、折り畳み不全タンパク質の認識を司る CSSR が存在しない場合でも、別的手段によりホモ会合できれば (CSSR は Ire1 をホモ会合させる機能も有する)、Ire1 はストレスを感知できることが示唆されているのである。

本研究では、これと類似の Ire1 変異体として、bZIP-Ire1 遺伝子を作成し (図 1C)、*ire1* Δ株に発現させた。bZIP-Ire1 では、Ire1 小胞体内腔ドメイン全体が核内転写因子 Gcn4 の dZIP 配列に置き換わっている。HA 標識した bZIP-Ire1 の細胞内局在を抗 HA 抗体による蛍光抗体染色法にて調べると、bZIP-Ire1 は非ストレス条件下でもイノシトール欠乏条件下でもクラスター化しているのが観察された(図 9 A)。抗 BiP 抗体との 2 重染色実験(図 9 B)では、bZIP-Ire1 のクラスター像は BiP の局在とオーバーラップし、bZIP-Ire1 のクラスターは小胞体上に形成されていることが確認された。Ire1 はサイトゾル側ドメインにも幾ばくかのオリゴマー形成能が存在しており (Korenykh et al., 2009)、そのことが bZIP-Ire1 はダイマーでは無くクラスターとして存在することに寄与しているのかもしれない。

HAC1 mRNA スプライシングによる活性評価では、細胞を DTT またはツニカマイシンで処理することにより bZIP-Ire1 は活性化するが(図 9 C)、その程度は野生型 Ire1 よりも遅くかつ弱かった(図 3 A や B と比較)。一方、イノシトール欠乏による bZIP-Ire1 の活性化は、野生型 Ire1 と比較しても、顕著であることが分かった(図 4 C と図 9 C を比較)。図 9 D は、いかなる濃度の DTT であっても、b-ZIP Ire1 の迅速な(ストレス刺激をしてから 30 分後の)活性化は弱かったことを示している。

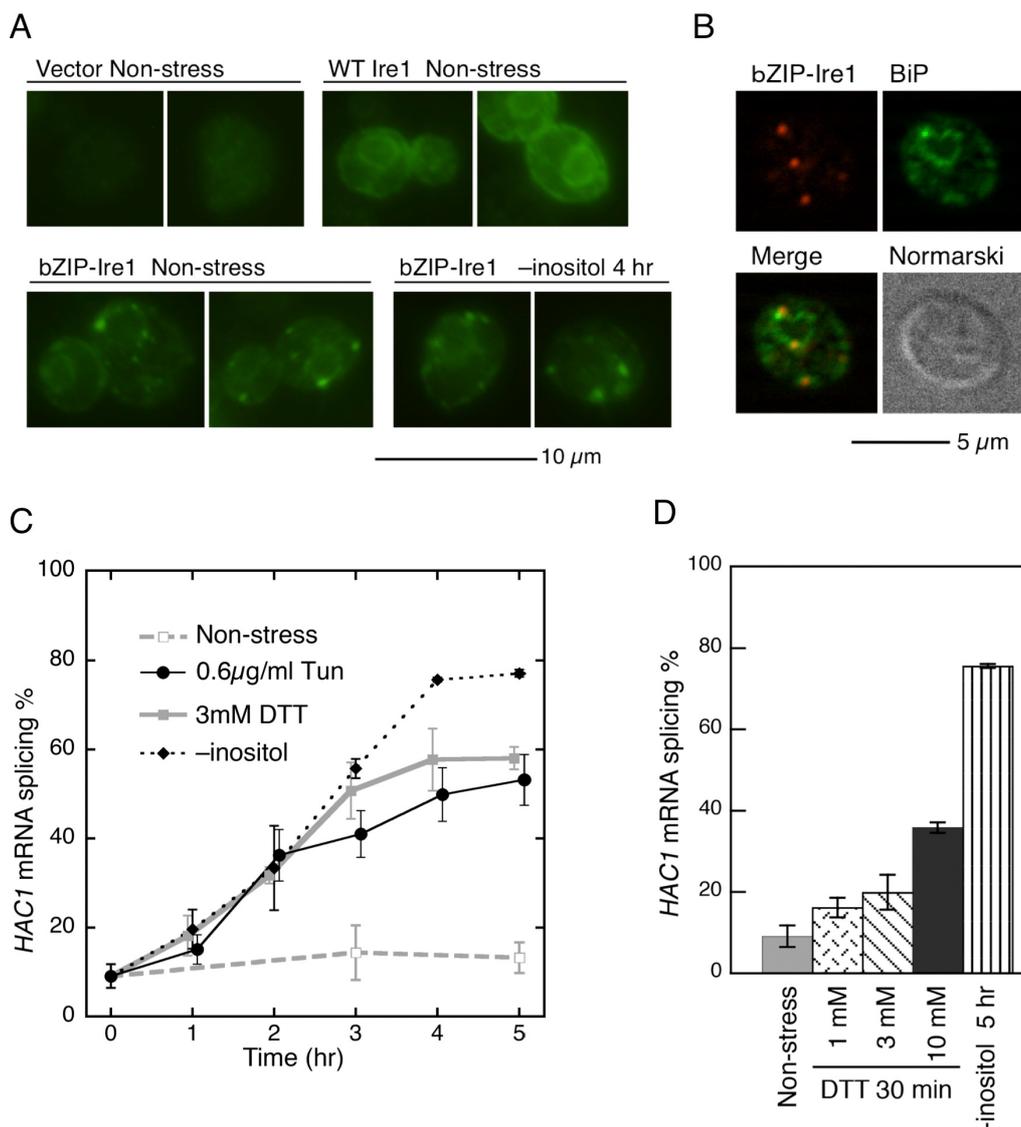


図9 bZIP-Ire1 の細胞内局在と活性

A : *ire1* Δ 株 KMY1516 に野生型(WT)pRS423-IRE1-HA またはその bZIP 変異体(または空ベクター pRS423(Vector))を導入し、図で示した条件で培養し、抗 HA 抗体による蛍光抗体染色に供した(2次抗体は FITC ラベル)。

B : A で用いた bZIP-Ire1-HA 細胞を非ストレス条件下で培養後、抗 HA 抗体(マウス; 2次抗体は Cy5 ラベル)と抗酵母 BiP 抗体(ウサギ; 2次抗体は FITC ラベル)で二重染色した。

C および D : *ire1* Δ 株 KMY1516 に bZIP 変異版 pRS313-IRE1 を導入し、図に示した条件でストレスを与えた後、総 RNA サンプルを RT-PCR に供し、*HAC1* mRNA のスプライシング効率を評価した。エラーバーは3つの独立したクローンからのデータの標準偏差を示している。

考察

上述のように、出芽酵母 Ire1 は構造異常タンパク質と会合するが、その能力は ΔIII 変異により損なわれる。そのことを示す根拠としては、第一に、組換え CSSR タンパク質は *in vivo* で変性タンパク質の凝集を阻止し、一方、CSSR に ΔIII 変異を導入した場合は、その能力は失われる(Kimata et al., 2007)。第二に、小胞体における折り畳みに不全を来すことが知られているモデル変異タンパク質 CPY* (Finger et al., 1993)を細胞内で発現させた場合、細胞抽出液の免疫沈降実験により CPY*と Ire1 は共沈降により示すことができ、これも ΔIII 変異により阻害される(Promlek et al., 2011)。よって、 ΔIII 変異を用いることにより、様々なストレスによる Ire1 の活性化が、構造異常タンパク質との会合によるのか否かにアプローチできるのである。

細胞を DTT やツニカマイシン存在下で培養することにより小胞体ストレスを与えた場合は、 ΔIII Ire1 の活性化は野生型 Ire1 と比べて著しく遅延し、また、活性化の程度も弱かった (図 4、Kimata et al., 2007)。また、CPY*の大量発現によっても UPR は惹起されるが、 ΔIII 変異はそれを阻害した(Promlek et al., 2011)。一方、本研究で私は、イノシトール欠乏による小胞体ストレスの場合は、野生型 Ire1 と ΔIII Ire1 は、ほぼ同じ時間経過と強さで活性化することを見いだした (図 4)。そこで私は、2つの異なるタイプのストレス刺激が、異なる様式で Ire1 を活性化すると考えている。

どのようなストレスが DTT やツニカマイシンと同じ様式で Ire1 を活性化するのだろうか？これまで考えられてきたように、私は、この場合の Ire1 活性化は、小胞体内腔に蓄積した構造異常タンパク質に起因すると考えている。この考えは、 ΔIII Ire1 が構造異常タンパク質との会合能を失っているという上述の知見と整合する。なお、この種のストレスは総じて、小胞体内腔への異常タンパク質の蓄積を引き起こすと思われる。例えば、液胞タンパク質 CPY の変異体である CPY*は、小胞輸送経路に乗ることができず、異常タンパク質として小胞体に蓄積することが知られている(Finger et al., 1993)。また、分泌経路に乗るタンパク質は小胞体にて糖鎖付加やジスルフィド結合形成を受けることが多く、それらをつニカマイシンや DTT で阻害することは、小胞体におけるタンパク質の折り畳みにとって、大きなダメージを与えるであろう。

本研究ではさらに、*SCJ1*, *SPC2*, *STE24*, *ALG3*, *EOS1*, *PMT2*, *ERD1*, *ERV24*, *ERV25* のいずれかを欠損した場合も、このカテゴリーのストレスとな

ることを見いだした。すなわち、これらの遺伝子欠損は、 ΔIII Ire1 よりも野生型 Ire1 を強く活性化したのである (図 7, 8)。表 2 で示すように、Scj1 と Spc2 はそれぞれ、BiP の補助因子やシグナルペプチダーゼ複合体のサブユニットとして機能しており、これらのタンパク質が欠損すると、小胞体内に異常なタンパク質が生じると考えられる。また、Pmt2 は最近 O-マンノシル転移酵素であり、小胞体内のタンパク質品質管理に関わると報告されている (Goder and Melero, 2011)。Alg3 や Eos1 も糖鎖付加に関わり、それらの欠損は分泌経路に乗るべきタンパク質の異常につながるであろう。ERD1 欠損によって UPR が惹起されたのは、BiP の小胞体残留に不全を来したためかもしれない (Hardwick et al., 1990)。Erv14 と Erv25 は、COP II 被覆小胞形成には必須ではないが (Matsuoka et al., 1998)、小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送では重要な役割を果たしている。すなわち、Erv14 や Erv25 は、小胞体において積み荷タンパク質と会合することによって、COP II 被覆小胞に積み荷タンパク質を詰め込んでいるのである (Muniz et al., 2000; Powers and Barlowe, 2002)。よって私は、Erv14 や Erv25 の欠損により、分泌経路に乗るべきタンパク質が小胞体内腔に蓄積し、それが構造異常タンパク質と同じ様式で Ire1 に感知されると考えている。なお、STE24 欠損が Ire1 を活性化する理由については、現在のところ不明である。

一方、別のいくつかの遺伝子 (*OPI3*, *ISC1*, *SCS3*, *ARV1*, *GET1*, *LAS21*, *BST1*, *SEC28*) の欠損では、イノシトール欠乏と同様、野生型 Ire1 と ΔIII Ire1 がほとんど同程度に活性化した (図 7, 8)。そこで私は、これらの条件では、膜あるいは脂質異常が引き起こされ、構造異常タンパク質とは無関係に Ire1 が活性化されると提案したい。表 2 で記すように、*OPI3* や *ISC1* はリン脂質代謝を行う酵素をコードしている。*Scs3* は小胞体局在 FIT ファミリーの 1 つであり、脂肪蓄積に関わっている (Kaderei et al., 2008)。また、*Arv1* については、いくつかの脂質化合物の細胞内輸送において、小胞輸送非依存的な細胞内トランスポーターとして機能している可能性が高い (Kajiwara et al., 2008; Tong et al., 2010)。*Get1* は GET 複合体の構成因子であり、C 末端に膜貫通ドメインを有するタンパク質をサイトゾルから小胞体膜へ挿入するのに寄与する (Schudiner et al., 2008)。よって、*GET1* の欠損についても、小胞体内腔にタンパク質を蓄積させること無しに、膜にダメージを与えることになるのであろう。なお、GPI アンカー生合成に関わる *LAS21* や *BST1* を欠損した場合も (表 2)、膜にダメージが与えられると考えられる。興味深いことに、*ERV14* や *ERV25* と同様、

*SEC28*も細胞内小胞輸送に関与するにもかかわらず、*SEC28*のみが野生型 *Ire1* と ΔIII *Ire1* を同程度に活性化した。*Erv14* や *Erv25* は小胞体からゴルジへの輸送に関わっているのに対し、*Sec28* はコートマーの構成因子であり、ゴルジ体から小胞体への逆行性小胞輸送を担っている (Duden et al., 1998; Kimata et al., 1999)。よって、*SEC28* 欠損では、小胞体に関しては、タンパク質の搬出よりもむしろ、膜の組成に異常を来すのであろうと考えている。

イノシトールはリン脂質の主要構成成分の一つであり、本研究での知見も合わせて私は、イノシトール欠乏による *UPR* の惹起は、膜へのダメージが原因であると結論づけたい。すなわち、イノシトール欠乏が小胞体内腔でのタンパク質折り畳み能力の低下につながるという報告もあるが (Merksamer et al., 2008)、これが *Ire1* 活性化の主因ではないのである。*Ire1* 本来の小胞体内腔ドメインを完全に欠く *bZIP-Ire1* がイノシトール欠乏により強く活性化するという知見は (図9)、この条件での *Ire1* 活性化には小胞体への構造異常タンパク質蓄積は無関係であることを強く裏付ける。なお、スフィンゴ脂質生合成阻害剤ミリオシンの培地への添加は、イノシトール欠乏による *UPR* を減弱させるのに対し、*DTT* による *UPR* にはほとんど影響しなかった (図5)。スフィンゴ脂質またはその生合成中間物と *UPR* とのつながりは不明だが、この知見は細胞内の脂質の状況がイノシトール欠乏による小胞体ストレスと強く関連することを示している。

DTT またはツニカマイシン処理により、どのようなステップで *Ire1* が活性化するかについては、すでに当研究室により報告されている (Kimata et al., 2007)。すなわち、第一に、*Ire1* からの *BiP* の解離により、*Ire1* はクラスターを形成する。第二に、構造異常タンパク質が *Ire1* クラスターに作用することにより、*Ire1* は完全に活性化する。構造異常タンパク質に因らない小胞体ストレス、すなわち、イノシトール欠乏の場合はどうであろうか？本研究ではまず、イノシトール欠乏でも *BiP* が *Ire1* から解離し、*Ire1* はクラスターを形成することが観察された (図6 A、B)。なお、*DTT* やツニカマイシン処理の場合も *BiP* が *Ire1* から解離するメカニズムは不明であり (構造異常タンパク質と *Ire1* が *BiP* との会合において競合するという単純なモデルは否定されている ; Kimata and Kohno, 2011)、イノシトール欠乏の場合にも *BiP* が *Ire1* から解離する仕組みについて、現時点では論じることができない。次いで、クラスター化した *Ire1* の活性化について述べたい。 $\Delta I \Delta V$ 変異型 *Ire1* は *BiP* と会合できず、恒常的にクラスターを形成している (Oikawa et al., 2007; Kimata et al., 2007)。よって、構造異

常タンパク質との相互作用さえ起きれば、 $\Delta I \Delta V$ 変異型 Ire1 は強く活性化すると考えられる。実際、 $\Delta I \Delta V$ Ire1 に ΔIII 変異を導入すれば、ツニカマイシンや DTT による活性化は著しく減弱する (図 6 C ; Kimata et al., 2007)。しかし、本研究で私は、イノシトール欠乏による小胞体ストレスでは、 $\Delta I \Delta III \Delta V$ Ire1 も強く活性化することを見いだした。すなわち、Ire1 クラスターと構造異常タンパク質との相互作用の代わりとなる事象が、イノシトール欠乏のときには惹起され、それが Ire1 クラスターを強い活性化状態へと導いているのである。

DTT やツニカマイシン処理による野生型 Ire1 の素早い応答(ストレス刺激後 30 分または 1 時間でピークに達する)に比して (図 4 A、B)、イノシトール欠乏による野生型 Ire1、 ΔIII Ire1 あるいは bZIP-Ire1 の活性化は時間を要する (図 4 C、9 C)。この原因としては、イノシトール欠乏によりストレスが惹起される場合は、細胞に蓄積したイノシトールが消費されるまでの時間が必要であろうことが考えられる。あるいは、膜関連のストレスに対応する応答は、そもそも迅速である必要が無いのかもしれない。一方、構造異常タンパク質の蓄積に対しては、Ire1 は素早く対応し、迅速な UPR により細胞は保護されていると考えられる。なお、DTT やツニカマイシン処理によっても、野生型 Ire1 と比して遅くて弱いながら、 ΔIII Ire1 や bZIP-Ire1 が活性化することも事実である (図 4 A、B、9 C)。すなわち、これらのストレスも何らかの原因で膜の恒常性を乱し、構造異常タンパク質との結合能を失った変異型 Ire1 もゆっくりと活性化するのであろう。小胞体内腔に異常タンパク質が蓄積することが、間接的に小胞体膜にダメージを与えるという可能性が考えられる。

ほ乳類には 2 種の Ire1 のパラログ、すなわち Ire1 α と Ire1 β が存在するが、Ire1 α の方が個体内での発現がユビキタスであり、主要なバージョンであるとされている。Zhou 等(2006)が報告した X 線結晶構造によると、Ire1 α の小胞体内腔ドメインも溝状の形態を形作っているが、出芽酵母 Ire1 の場合とは異なり、その溝は狭く、折り畳み不全タンパク質が入り込むことは困難であるように見える。また、Oikawa 等(2009)は、*in vitro* での変性タンパク質凝集阻止アッセイでは、Ire1 α 小胞体内腔ドメインと構造異常タンパク質との相互作用は認められなかったと報告している。Ire1 α が構造異常タンパク質を認識する能力を欠くとすると、Ire1 α の活性化メカニズムとしては、本研究にて提唱しているものが主要となっている可能性がある。

なお、本研究では残念ながら、Ire1 が膜関連のストレスを感知するメカニズ

ムを解明することは出来なかった。イノシトール欠乏により **bZIP-Ire1** が強く活性化するという知見は (図 9 C)、このストレス感知には **Ire1** の小胞体内腔ドメインが不必要であることを示している。今後は、**Ire1** の膜貫通あるいはサイトゾル側ドメインに着目した研究が必要となろう。なお、ほ乳類の場合は、**BiP** 以外のタンパク質の会合による **Ire1 α** の制御が報告されている (**Hetz et al., (2006); Luo et al., (2008); Lisbona et al., (2009); Qiu et al., (2010)**)。これらの知見も、今後の研究における重要なヒントになるであろう。

脂質や膜の恒常性破綻が小胞体ストレスとして **UPR** を惹起することに関しては、数多くの報告がある。**Pineau 等(2009)**や **Deguil 等(2011)**は脂肪酸組成の崩れによる出芽酵母 **UPR** を報告している。私が提示している概念とは異なり、**Pineau 等(2009)**は、この **UPR** がケミカルシャペロンの存在により減弱することから、折り畳み不全タンパク質の寄与を唱えている。ほ乳類では、肥満が小胞体ストレスを通じて II 型糖尿病を引き起こし (**Ozcan et al., 2004**)、この症状はケミカルシャペロンによって抑えられる (**Ozcan et al., 2006**)。また、**Chunha 等(2008)**や **Wei 等(2006)**は、脂質異常による小胞体ストレスが膵臓 β 細胞や肝臓細胞へのダメージにつながることを報告している。なお、出芽酵母の場合と同様、ほ乳類細胞でも **UPR** は脂質生成を促すことが知られている (**Zheng et al., 2010**)。 **Ire1 α** やその標的である **XBP1** が、抗体産生プラズマ細胞や膵臓 β 細胞や胎盤といった、分泌が盛んな細胞や組織の発生やホメオスタシス維持に関わっていることは、広く知られている (**Iwakoshi et al., 2003; Lipson et al., 2008; Iwawaki et al., 2009**)。この原因としては、小胞体への大量のタンパク質流入が **Ire1 α** を含む小胞体ストレスセンサーを活性化するということが挙げられる。しかし、抗体産生能力を失った変異型 **B** リンパ球もプラズマ細胞へ分化する際に **XBP1** が活性化するという知見は (**Hu et al., 2009**)、この考えと整合しない。以上より私は、脂質や膜関連の様々なストレス状態においては、そのストレスそのものと、副次的に生じる構造異常タンパク質が、重層的に **Ire1** を含む小胞体ストレスセンサーに認識されると考えている。

結論として私は、**UPR** を引き起こす小胞体ストレスとは、小胞体内への構造異常タンパク質蓄積のみに付随する事象では無いことを提唱したい。少なくとも出芽酵母 **Ire1** は、構造異常タンパク質を直接的に捉えて素早く活性化する一方で、脂質や膜関連の小胞体ストレスを異なる様式で感知しているのである。本研究で示した小胞体ストレスと細胞内応答に関する新しい概念は、様々な生理学的および病理学的条件下での小胞体ストレス応答への理解を深めるのに寄

与すると期待している。

第2章

長期的なストレスに対する UPR

序論

小胞体は分泌タンパク質の折りたたみや膜脂質の生合成を行う細胞内小器官である。小胞体にダメージを与えるようなストレス条件下では、真核生物は小胞体の機能を回復させるために、様々な遺伝子を転写レベルで誘導する。このような細胞内応答、すなわち **Unfolded Protein Response (UPR)** を引き起こすストレス刺激は小胞体ストレスと呼ばれている。小胞体ストレスとは、上述した様に小胞体にダメージを与えるストレスであるが、具体的には、小胞体での分泌タンパク質の折りたたみ不全のことであると考えられてきた。しかし一方、第一章で述べたように、膜あるいは脂質の恒常性破綻も小胞体ストレスとなる。

Ire1 は真核細胞全般の小胞体に存在する I 型膜貫通タンパク質であり、サイトゾル側ドメインはエンドリボヌクレアーゼとして機能する。ある種の転写因子タンパク質をコードする mRNA のイントロン-エキソン接合部を切断するという酵素活性を **Ire1** は持っており、この反応により、その mRNA はスプライシングされて成熟し、転写因子タンパク質が生じ、UPR が引き起こされる (**Ron and Walter 2007; Mori 2009**)。非ストレス条件下では **Ire1** のホモ会合状態はモノマーであるのに対し (**Bertolotti et al., 2000; Oikawa et al., 2007**)、強い小胞体ストレスにより活性化すると **Ire1** はクラスター (巨大なホモ集合体) を形成する (**Kimata et al., 2007; Aragon., et al 2009; Li et al., 2010**)。さらに、**Ire1** はクラスターを形成することによって、高い RNA 切断活性を発揮できることも明らかとなっている (**Korenykh et al., 2009**)。また、出芽酵母細胞では、**HAC1** 遺伝子がコードする標的 mRNA が **Ire1** クラスターへと集まり、効率的にスプライシングされることも報告されている (**Aragon et al., 2009**)。

Ire1 小胞体内腔ドメインの X 線結晶構造はすでに明らかになっており、**Ire1** 小胞体内腔ドメインの中心部、コアストレス感知領域 (**Core stress-sensing region; CSSR**) のみでも重合できると予測された (**Credle et al., 2005**)。そして、この **CSSR** の性質が、**Ire1** クラスター化の構造的基盤になっていると考えられている (**Kimata et al., 2007**)。なお、**Ire1** の小胞体内腔ドメインには、**CSSR** の他に、折り畳みが緩い領域も存在している。その一つがサブ領域 **V** であり、**CSSR** と **Ire1** 膜貫通ドメインの間に位置する。なお、非ストレス条件下ではサブ領域 **V** に、小胞体内在性分子シャペロン **BiP** が会合している (**Kimata et al., 2004; Oikawa et al., 2005; Oikawa et al., 2009**)。そして、小胞体ストレスに応じて、サブ領域 **V** から **BiP** が解離し、**Ire1** はクラスターを形成する (**Bertolotti et al.,**

2000; Kimata and Kohno, 2010)。

しかし、クラスターを形成だけでは、Ire1 は完全な活性を発揮できないことも、当研究室の研究によって明らかとなった(Kimata et al., 2007)。すなわち、CSSR は構造異常タンパク質と会合することができ(Credle et al., 2005; Kimata et al., 2007; Promlek et al., 2011; Gardner et al., 2011)、このことが Ire1 クラスターを完全に活性化し、UPR の強い惹起に寄与するのである。また、第一章で述べたように、膜の恒常性破綻でも Ire1 クラスターは強く活性化するが、この場合は CSSR と構造異常タンパク質の会合は不要である。膜の恒常性破綻による小胞体ストレスの事例は、出芽酵母においては、リン脂質の構成成分であるイノシトールを欠乏させることである。イノシトール欠乏培地で出芽酵母を培養すると Ire1 は活性化し、また、*IRE1* 遺伝子欠損株はイノシトール欠損培地では生存できないことが知られている(Cox et al., 1997)。

小胞体ストレスに応じて、Ire1 は一過的に強く活性化し、時間経過に伴いその活性は低下する。近年、Ire1 の活性が低下する際のメカニズムについても、研究が進められてきた。活性の低下に伴い BiP と Ire1 は再会合するであろうが、この再会合がどれほど重要なのかについては、議論の余地がある。すなわち、当研究室が以前に行った研究では、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンを培地から除去する実験において、野生型 Ire1 とサブ領域Vを欠く変異体 Ire1(Δ V Ire1)の活性低下の時間経過プロファイルに相違を認めることは出来なかった(Kimata et al., 2004)。これに対し、Pincus 等(2010)は、我々と同じくサブ領域Vを欠く Ire1 変異体を用いた実験を行い、別の強い小胞体ストレス誘導剤であるジチオスレイトール(DTT)を培地から除いたときには、野生型 Ire1 に比べ、この変異体の活性減衰が遅れることを示している。なお、小胞体ストレスが持続している場合も、Ire1 クラスターは消散し、それに伴い、Ire1 の活性は減衰する(Li et al., 2010; Rubio et al., 2011)。

本研究では、主としてイノシトール欠乏により小胞体ストレスを出芽酵母細胞に与え、継続した長期の小胞体ストレス条件下での UPR を調査した。この実験条件では、Ire1 は一過的に強く活性化した後、長時間のストレスに応じて、弱い活性を示し続ける。そして、この場合には、Ire1 はクラスターではなく、新規の活性化状態、すなわち、「BiP が会合したホモダイマー」であることが本研究により示された。

材料と方法

プラスミドと出芽酵母株

出芽酵母の *IRE1* 遺伝子、Ire1-HA 遺伝子(*IRE1-HA*)、Ire1-Flag 遺伝子(*IRE1-Flag*)を酵母単コピーベクター(pRS313 と pRS315; Sikorski and Hieter, 1989)または2 μ マルチコピーベクター(pRS423 と pRS426; Christianson et al., 1992)に挿入し、pRS313-*IRE1*、pRS315-*IRE1-HA*、pRS423-*IRE1-HA*、pRS426-*IRE1-Flag* プラスミドを得た(Kimata et al., 2003; Kimata et al., 2004)。これらの遺伝子は本来の *IRE1* プロモーター配列を持っているので、単コピープラスミドで発現させた Ire1 タンパク質の量はほとんど内在性のものと同程度である(Kimata et al., 2007)。*IRE1*、Ire1-HA、Ire1-Flag の変異体作成の際には、Overlap PCR 法を用いて変異を含む *IRE1* DNA 断片を増幅し、この断片と制限酵素により切断したプラスミドを *in vivo* Gap Repair 法を用いて酵母細胞内で融合させた(Kimata et al., 2004)。 ΔV 変異は Ire1 のアミノ酸残基 463-524 の欠失に相当する。Pvu II で切断した pRS313-*IRE1* と Not I で切断した pRS316(Sikorski and Hieter 1989)とを *in vivo* Gap Repair 法にて融合することにより *URA3 IRE1* プラスミドである pRS316-*IRE1* を得た。

本研究で用いた酵母菌株は全てバックグラウンドが同じである。すなわち、*ire1* Δ 株 KMY1516(*MAT α ura3 his3 trp1 ire1::TRP1 LEU2::UPRE-CYC1 core promoter-GFP::leu2 LYS2::(UPRE)5-CYC1 core promoter-lacZ::lys2*)、KMY1015(*MAT α ura3 his3 trp1 leu2 lys2 ire1::TRP1*)、KMY1520(*MAT α ura3 his3 trp1 leu2 lys2 ire1::TRP1*)である(Kimata et al., 2004)。図 15 と 16 で用いた二倍体を得るためには、pRS426 を元にしたプラスミドにて形質転換した KMY1520 と、pRS315 または pRS423 を元にしたプラスミドにて形質転換した KMY1015 を掛け合わせた。

培地と培養条件

酵母細胞は栄養要求性マーカーとなる栄養 (アミノ酸あるいはウラシル) を添加した SD 培地で培養した。また、Difco™&BBL™ マニュアル (<http://www.bd.com/>)に基づいて、イノシトール欠乏 SD 培地を作製した。ウラシルと 5 フルオロチン酸(5-FOA; *URA3* 遺伝子を有する細胞を殺す薬剤)と寒天(寒天培地用)の最終濃度はそれぞれ 0.01%、0.1%、2%である。SD 培地培養液の細胞をイノシトール欠乏培地に移す際には、細胞を遠心法により回収し、

イノシトール欠乏培地に再懸濁して洗浄するという操作を6回繰り返した。DTT で 30 分間処理する以外、ストレス開始直前の培養細胞の濃度は OD₆₀₀(Spectrophotometer SmartSpec 3000; Bio Rad)が 0.3 以下とした。長時間のイノシトール欠乏時には、12 時間ごとにイノシトール欠乏培地で培養液を 10 倍希釈した。

RNA 解析

第一章「材料と方法」を参照

タンパク質解析

第一章「材料と方法」を参照

免疫蛍光顕微鏡

第一章「材料と方法」を参照

抗体

第一章「材料と方法」表 1 および mouse anti-FLAG mAb M2 (Sigma-Aldrich) を 1000 倍希釈して用いた

結果

長時間のイノシトール欠乏における低レベルの Ire1 の活性維持

導入部で触れた様に、小胞体ストレスが継続しても、Ire1 は強い活性を持続しない。しかしながら、前章の図 4 は、このような場合でも、Ire1 の活性は完全には無くならないことを示している。そこで本研究では、長期間に及ぶ継続した小胞体ストレス条件下では、Ire1 はどのような様式でどの程度に活性化しているのかを検証した。本研究では細胞に小胞体ストレスを与えるための実験条件としては主に、汎用の小胞体ストレス誘起剤である DTT やツニカマイシンでは無く、イノシトール欠乏を用いた。これは、細胞の生存に与えるダメージが少ないからである。

長期間に渡ってイノシトール欠乏条件で培養するため、イノシトール欠乏培地での培養液は定期的に同じ組成の培地で希釈した（詳細は材料と方法を参照）。そして、前章と同じく、細胞内における Ire1 の活性を、*HAC1* mRNA のスプライシング効率により評価した。図 10A の実線は、長時間のイノシトール欠乏条件下で、野生型 Ire1 の活性がどのように変化していくのかを表している。イノシトール欠乏後 48 時間でも、*HAC1* mRNA は弱いながらもスプライシングを受けている。なお、図 10B に示す様に、C 末端をヘマグルチニン(HA)エピトープタグにて標識した Ire1 (Ire1-HA)を酵母細胞にて発現させ、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットにて検出したところ、長期間にわたるイノシトール欠乏によって、Ire1 の細胞内存在量はほとんど変化しなかった。

次に、Ire1 の細胞内局在の変化を調べることにした。当研究室では以前に、マルチコピープラスミド(2 μ)にて発現させることにより、Ire1-HA が抗 HA 免疫蛍光染色により検出できることを報告している(Kimata et al., 2007)。そこでまず、この条件で発現させた場合の Ire1-HA の活性を、*HAC1* mRNA のスプライシング効率によりモニターした(図 11)。そして期待通り、イノシトール欠乏における一過的な強い活性化と、その後の活性の減弱を認めることができた。前章の結果と同様に、野生型 Ire1-HA は非ストレス条件下では小胞体全体に拡散しており(図 12B a)、イノシトール欠乏後 4 時間後ではクラスターを形成した(図 12B b)。一方、長時間のイノシトール欠乏条件下では、明らかに *HAC1* mRNA がスプライシングを受けているにもかかわらず(図 11)、野生型 Ire1-HA は小胞体全体に拡散していた(図 12B c)。

長期間のイノシトール欠乏とほぼ同じ *HAC1* mRNA スプライシング活性を示している 1mM DTT (30 分間) 処理の場合では(図 11)、Ire1-HA は弱いながらも明らかにクラスターを形成していた(図 12B d)。細胞を 10mM DTT で 30 分間処理した場合には、Ire1-HA は強く活性化しており(図 11)、小胞体全体に広がった像も薄くは見えるものの、明確にクラスターを形成していることが分かる(図 12B e)。

これまでの結果から、長期間のイノシトール欠乏では、「微弱だが継続した UPR」が起きていると考えられる。UPR を司る Ire1 や Hac1 の欠損により細胞はイノシトール要求性を示すことは既に報告されている(Nikawa et al., 1996; Cox et al., 1997)が、本研究ではさらに、Ire1 はイノシトール欠乏に応じて、一過的だけではなく継続的に必要とされることを示す。すなわち図 13 では、*URA3* 遺伝子と *IRE1* 遺伝子の両方を有するプラスミドが導入された *ura3 ire1* Δ 株を、ウラシルを含むイノシトール欠乏培地あるいは正常な培地で約 24 世代培養した。この長期間培養ではウラシルが培地に含まれているため、プラスミドが脱落した細胞が増殖することが可能なはずである。しかし、イノシトール欠乏条件ではプラスミドが脱落した細胞はほとんど出現しなかった(増殖しなかった)。一方、*IRE1* 株では、イノシトールの有無に関わらず、ウラシル存在下でのプラスミドの脱落が認められた。

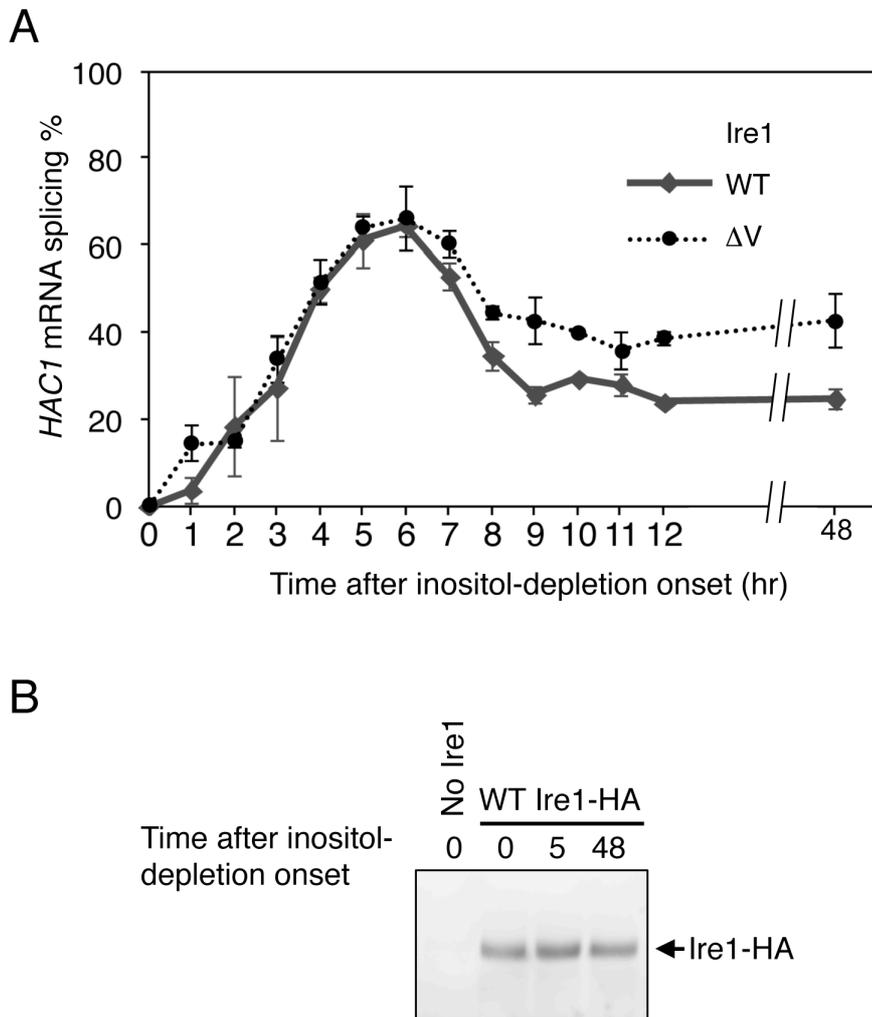


図 10 長時間のイノシトール欠乏条件下での Ire1 活性の低下

A: シングルコピー *IRE1* プラスミドである pRS313-*IRE1*(野生型; WT)または ΔV 変異体にて *ire1* Δ 株 KMY1516 を形質転換し、イノシトール欠乏培地で培養することによりストレスを与えた。総 RNA サンプルを RT-PCR に供し、*HAC1* mRNA のスプライシング効率を評価した。エラーバーは3つの独立したクローンからのデータの標準偏差を示している。

B: シングルコピー *Ire1*-HA プラスミドである pRS315-*IRE1*-HA(または空ベクター pRS315)にて *ire1* Δ 株 KMY1015 を形質転換し、イノシトール欠乏培地で培養することによりストレスを与えた。そして、OD₆₀₀=1 相当の細胞の抽出液を抗 HA 抗体ウエスタンブロットにて解析した。

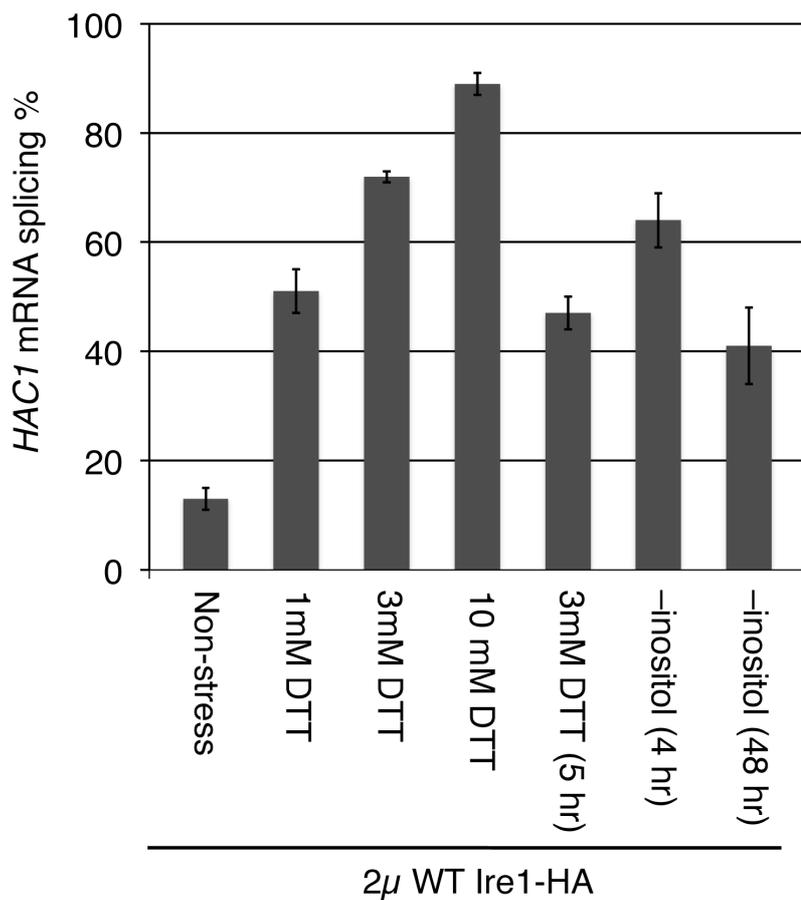


図 11 マルチコピープラスミドで発現させた野生型 Ire1-HA の活性

マルチコピーIre1-HA プラスミド pRS423-IRE1-HA にて *ire1* Δ株 KMY1516 を形質転換し、図に示した条件でストレスを与えた。無表記の DTT 処理はすべて 30 分間である。そして、総 RNA サンプルを RT-PCR に供し、*HAC1* mRNA のスプライシング効率を評価した。エラーバーは 3 つの独立したクローンからのデータの標準偏差を示している。

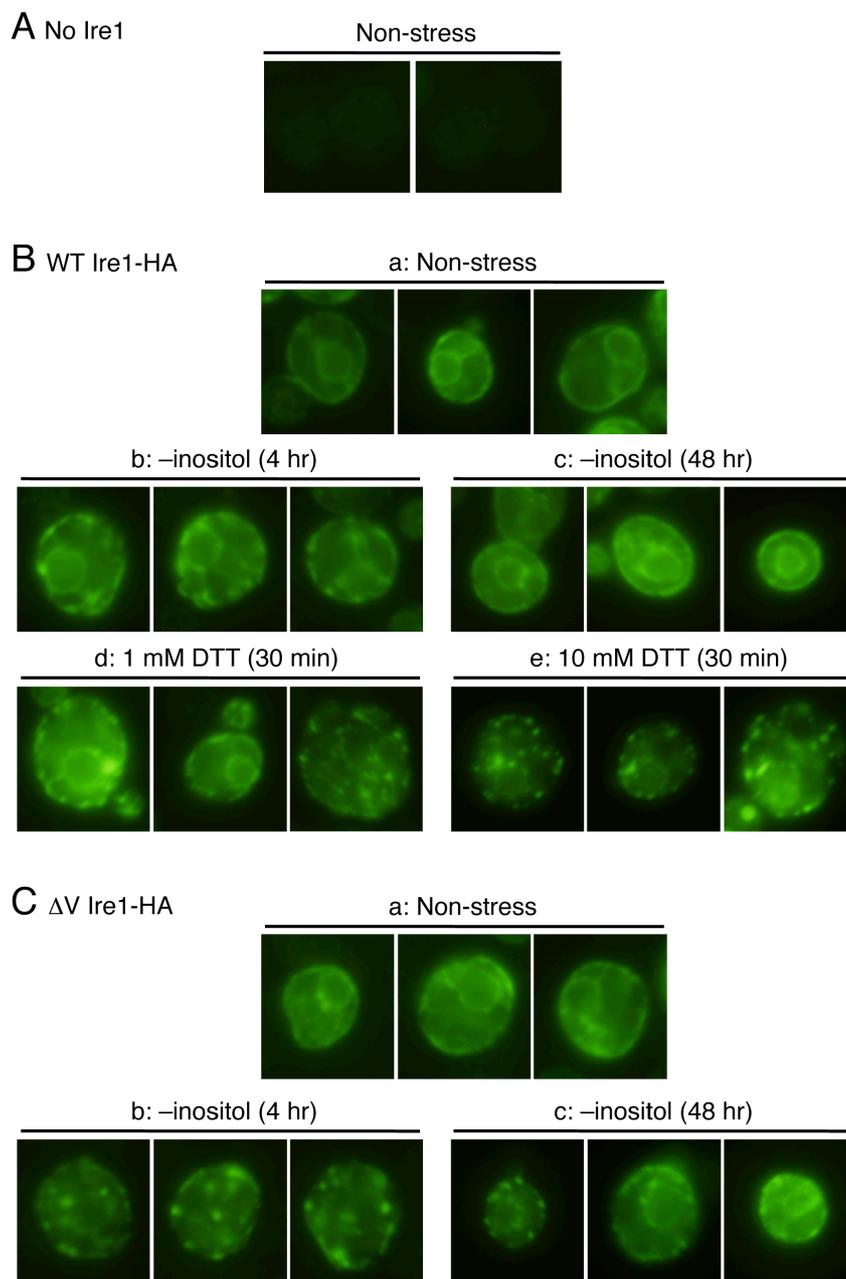


図 12 長時間のイノシトール欠乏条件下での Ire1 クラスターの消失

空ベクター pRS423(A)、マルチコピー Ire1-HA プラスミド pRS423-IRE1-HA(B; WT)、または ΔV 変異体(C)にて *ire1* Δ 株 KMY1516 を形質転換し、図に示した条件でストレスを与え、抗 HA 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

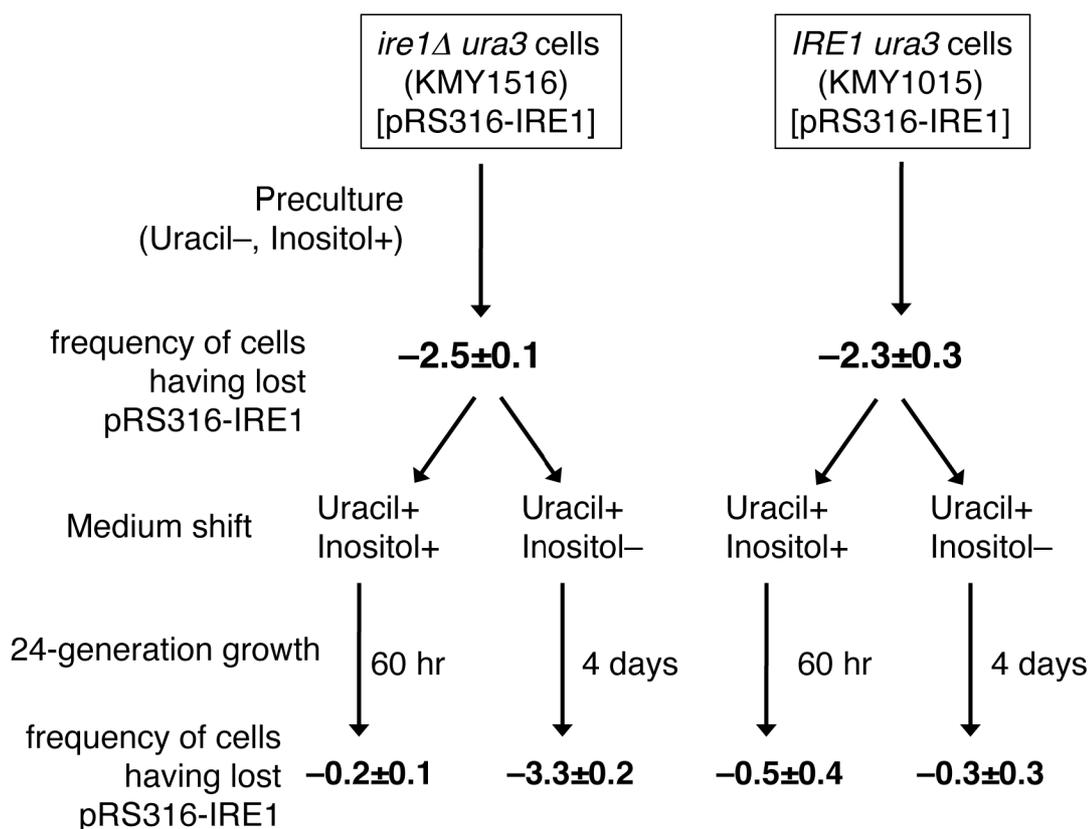


図 13 長時間のイノシトール欠乏条件下で生育する際には、細胞は *IRE1* 遺伝子を落とすことが出来ない

KMY1516 株(*ire1Δ ura3*)または *IRE1+*株 KMY1005(*ura3*)を *URA3 IRE1* プラスミド (pRS316-IRE1)にて形質転換し、通常培地(SD; Uracil-, Inositol+)にて前培養した後、ウラシルを含む通常の培地 (Uracil+, Inositol+) またはウラシルを含むイノシトール欠乏培地 (Uracil+, Inositol-) に移して、さらに長期間 (約 24 世代) 培養した。*URA3 IRE1* プラスミドが脱落した細胞の出現頻度を計るため、段階希釈した培養液を 5-FOA を含むあるいは含まない Uracil+ Inositol+ SD 寒天培地に塗布し、3 日間培養した。プラスミド脱落細胞の出現頻度は、計算式は $\text{Log}_{10}(\text{5-FOA 含有寒天培地のコロニー数}) - \text{Log}_{10}(\text{5-FOA 不含寒天培地のコロニー数})$ にて算出し、3つの独立した形質転換体から平均値と標準偏差にて表した。

長期間のイノシトール欠乏における Ire1 活性低下に対する BiP (再) 会合の寄与

次に、長期間のイノシトール欠乏時における Ire1 と BiP の会合、そして、そのことがどのように Ire1 の活性制御に寄与するのかを検討した。Ire1 は BiP の会合と解離によってのみ制御されているのではないので(Oikawa et al., 2007; Pincus et al., 2010; 第一章)、BiP 結合部位を欠く ΔV Ire1 も、野生型 Ire1 と同じく小胞体ストレスに応じた制御を受ける。すなわち、非ストレス条件下では、 ΔV Ire1 は野生型 Ire1 と同様にほとんど活性化しておらず(図 10A)、クラスターも形成していない(図 11C a)。そして、イノシトール欠乏条件下では、活性がピークに達する前は、 ΔV Ire1 は野生型 Ire1 と同じ挙動を示す(図 10A : ストレス開始後 1~6 時間)。しかし、その後の活性低下は、野生型 Ire1 に比べ ΔV Ire1 の方が緩やかであった(図 10A : ストレス開始 7 時間~48 時間後)。また、 ΔV Ire1 はイノシトール欠乏後 48 時間後でもクラスターを形成していた(図 11C c)。これらの結果は、継続した小胞体ストレス条件下での Ire1 の活性低下には、BiP 結合領域であるサブ領域 V が関与していることを強く示唆している。

次に、長期間のイノシトール欠乏における BiP と Ire1 との会合を検討した。図 14 では、抗 HA 抗体を用いて細胞抽出液から Ire1-HA を免疫沈降し、共沈降する BiP を抗 BiP ウェスタンブロットにて検出した。第一章と同様、イノシトール欠乏後 4 時間で、野生型 Ire1 からの BiP の解離が認められた(図 14 ; レーン 6 と 5 を比較)。一方、イノシトール欠乏が長期間になると、BiP の会合量は非ストレス時のレベルに戻るようである(図 14 ; レーン 7 と 5 を比較)。なお、 ΔV Ire1 には BiP がほとんど会合しておらず(図 14 レーン 2 ; Kimata et al., 2004)、また、当研究室では、この低レベルの会合には生物学的な意味はないと考えている。なぜなら、小胞体ストレスの有無にかかわらず、この会合の度合いは変化しないからである(図 14 レーン 2 から 4 ; Kimata et al., 2004; Pincus et al., 2011)。

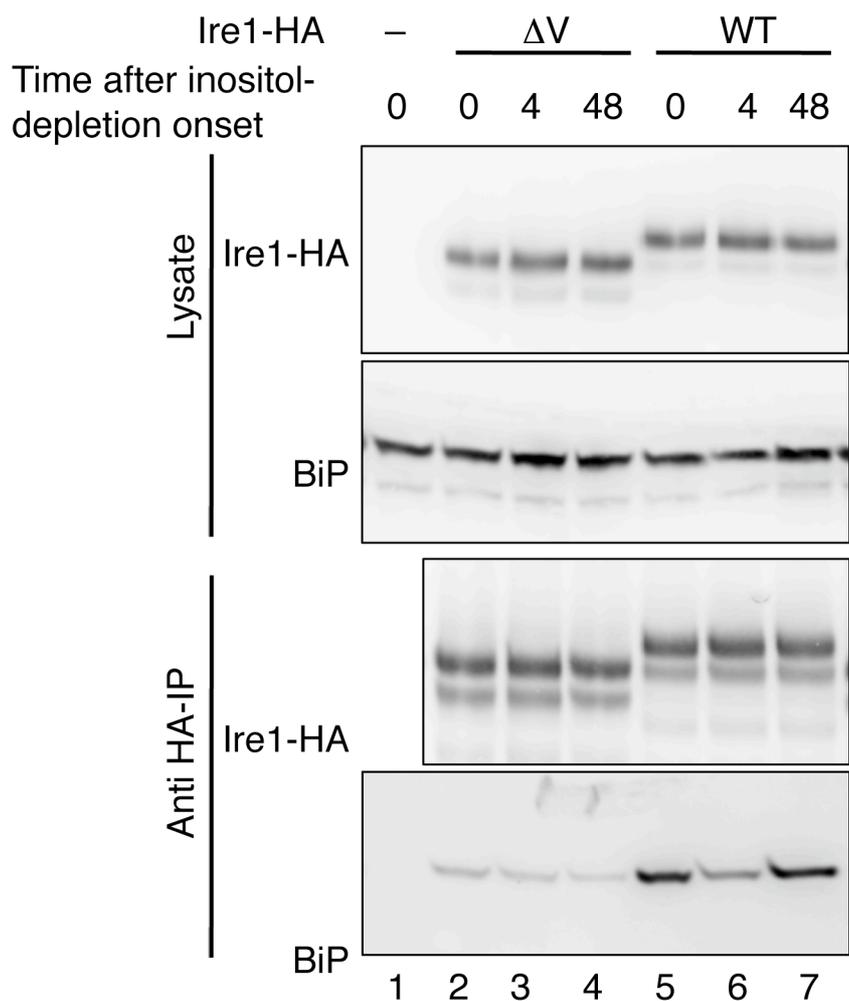


図 14 長時間のイノシトール欠乏条件下での野生型 Ire1 と BiP の結合と解離

空ベクターpRS423、マルチコピーIre1-HA プラスミド pRS423-IRE1-HA(WT)、または ΔV 変異体にて *ire1* Δ 株 KMY1516 を形質転換し、図に示した条件でストレスを与えた。そして、全タンパク質抽出液($OD_{600}=1$ に相当)と、抗 HA 抗体免疫沈降産物($OD_{600}=10$ に相当)を、それぞれ抗 HA 抗体と抗 BiP 抗体ウエスタンブロットにより検出した。

長期間イノシトール欠乏条件下での Ire1 の複合体形成状態

これまで述べたように、長期間のストレス時には、Ire1 の活性は低下しながらも持続し、UPR を引き起こし続けている。Ire1 が弱い活性を持続している際には、BiP が Ire1 に（再）会合し、それによりクラスター形成が阻害（あるいは、すでに出来ているクラスターが解消）されるのであろう。これは、ストレス開始直後にみられる Ire1 の急速な活性化とは対照的である。すなわち、急速に活性化するには、BiP が Ire1 から解離し、Ire1 はクラスターを形成し、強い活性を示す。そこで私は、「急速に活性化した Ire1」と「長期間のストレスにさらされて活性が低下した Ire1」との複合体形成の違いを調べた。急速な活性化のモデルとして 30 分間の DTT 処理を、長期間のストレスのモデルとしてイノシトール欠乏後 48 時間を用いた。

まず、Ire1 分子どうしの会合について調べた。図 15 では、野生型 Ire1-HA と C 末端に Flag タグをつけた野生型 Ire1(Ire1-Flag)両方を発現している細胞を抗 HA 抗体で免疫沈降し、免疫沈降産物を抗 Flag 抗体でのウエスタンブロットにより解析した。当研究室での以前の研究(Kimata et al., 2004)通り、30 分間の DTT 処理にて DTT の濃度依存的に、異なるタグを付けた Ire1 分子間の会合が認められた(図 15 ; レーン 1 と 3、または、レーン 1 と 4 を比較)。一方、長期間のイノシトール欠乏では、30 分間 10mM DTT 処理よりも、会合の度合いが多くなっていた(図 15 ; レーン 2 と 4 を比較)。この結果は、クラスター化(図 12B ; c と e を比較)や *HAC1* mRNA スプライシング効率 (図 11) のデータとは反対である。

そこで私は、長期間のイノシトール欠乏条件下では、Ire1 に BiP が再会合し、Ire1 クラスターは解消するが、ホモ会合（二量体化）した状態であると推測した。図 16 では、長期間のイノシトール欠乏により、BiP を含んだホモ会合型 Ire1 が生成することを示す。すなわち、図 16A では、Ire1-HA と Ire1-Flag(野生型または ΔV 変異体)を 2μ プラスミドで出芽酵母に発現させ、レーン 1 と 3 以外では、長時間のイノシトール欠乏により細胞にストレスをかけた。図 14 でも示した通り、Ire1-Flag は発現しておらず野生型 Ire1-HA のみを発現した細胞では、抗 HA 抗体での免疫沈降により、BiP が明瞭に共沈降した(図 16A ; レーン 6)。また、その状態で Ire1-HA に ΔV 変異が導入された場合は、共沈降してくる BiP の量はかなり少なくなっていた(図 16A ; レーン 5)。しかし、野生型 Ire1-Flag を共発現させた時には、 ΔV Ire1-HA と BiP が有意に共沈降した (図 16A ; レ

ーン 2 と 5 を比較)。そして、 ΔV Ire1-HA と ΔV Ire-Flag を共発現した細胞では、長期のイノシトール欠乏条件下で、かなり高い効率で両者がホモ会合しているのにも関わらず、有意な BiP の共沈降は見られなかった(図 16A ; レーン 4)。これらの結果から、 ΔV Ire1-HA と野生型 Ire-Flag と BiP から成る 3 者の複合体が形成されることが示唆され、その予想図を図 16B に示す。量的には長期のイノシトール欠乏の場合よりも少ないものの、この複合体は非ストレス条件下にも存在するようである(図 16A ; レーン 1)。一方、 ΔV Ire1-HA と野生型 Ire1-Flag を共発現する細胞を 10mM DTT で 30 分間処理した場合には、共沈降してくる BiP はほとんど検出されなかった(図 16A ; レーン 3)。

もし、Ire1 が長期間のイノシトール欠乏はでクラスター化せずに活性化しているとすれば、クラスター形成に不全を来す Ire1 変異体もこの条件で活性化するはずである。序論で触れた様に、Ire1 の CSSR には 2 つのホモ会合面があると報告されており、それぞれインターフェース I (頭部) とインターフェース II (尾部) と呼ばれている(Credle et al., 2005)。これは Ire1 クラスター形成の分子基盤となっており(Kimata et al., 2007; Aragon et al., 2009)、すなわち、頭部と頭部、尾部と尾部同士がホモ会合し、それらが整列して巨大なオリゴマーを形成するのである(Credle et al., 2005)。当研究室や他のグループの研究によると(Credle et al., 2005; Kimata et al., 2007)、Ire1 の点変異体 F247A は頭部同士のホモ会合に不全を来し、W426A 変異により尾部同士のホモ会合能が消失するようである。

図 17A では、クラスター形成に不全を来すこれら 2 つの Ire1 変異体について、長期間のイノシトール欠乏ストレスを与えた場合の、活性の変化を追った。ストレス開始直後では、野生型 Ire1 は一時的に強く活性化したが、F247A Ire1 や W426A Ire1 ではこのようなパターンはみられなかった。この結果は、Ire1 の活性化とクラスター形成が密接につながっているという考えを支持している。しかし、イノシトール欠乏後 48 時間では、W426A Ire1 は野生型 Ire1 に比べ、やや強い活性を示すのに対し、F247A Ire1 の活性は依然として微弱であった。いかなる条件においても W426A Ire1-HA のクラスター形成が認められないことを、図 17B に示す。これらの結果から、長期間のイノシトール欠乏条件下では、尾部同士のホモ会合は不要であることが示された。

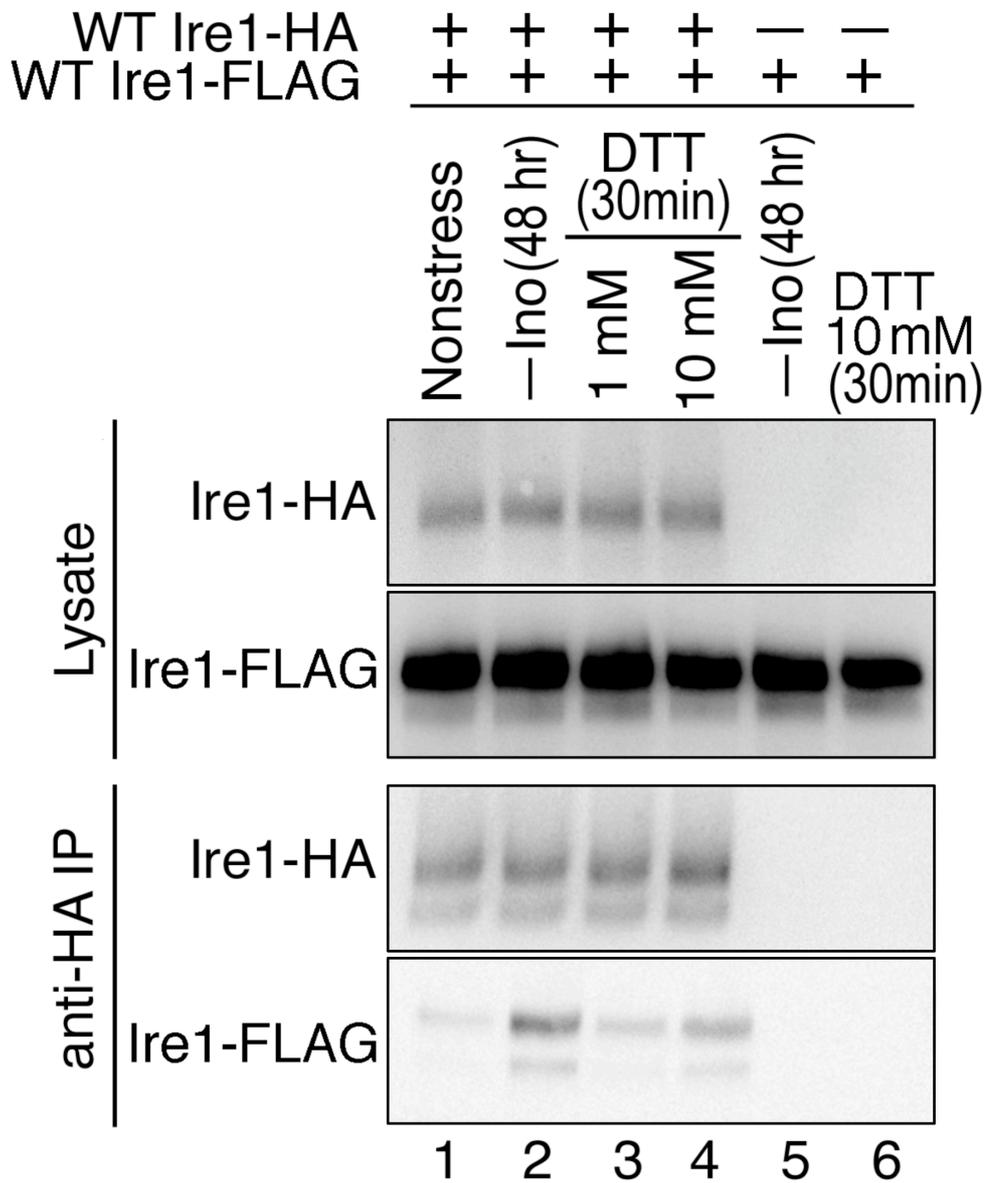


図 15 急性の強い活性を示す局面と長期継続した弱い活性を示す局面での、野生型 Ire1 分子のホモ会合状態の違い

マルチコピー野生型(WT) Ire1-Flag プラスミドである pRS426-IRE1-Flag と、シングルコピー野生型(WT) Ire1-HA プラスミドである pRS315-IRE1-HA(または空ベクター pRS315)の両方にて形質転換した二倍体 *ire1 Δ/ire1 Δ* 株 KMY1015×KMY1520 に、図に示した条件でストレスを与えた。全タンパク質抽出液(OD₆₀₀=1 に相当)と、抗 HA 抗体免疫沈降産物(OD₆₀₀=10 に相当)を、それぞれ抗 HA 抗体と抗 Flag 抗体を用いてウエスタンブロットにて解析した。

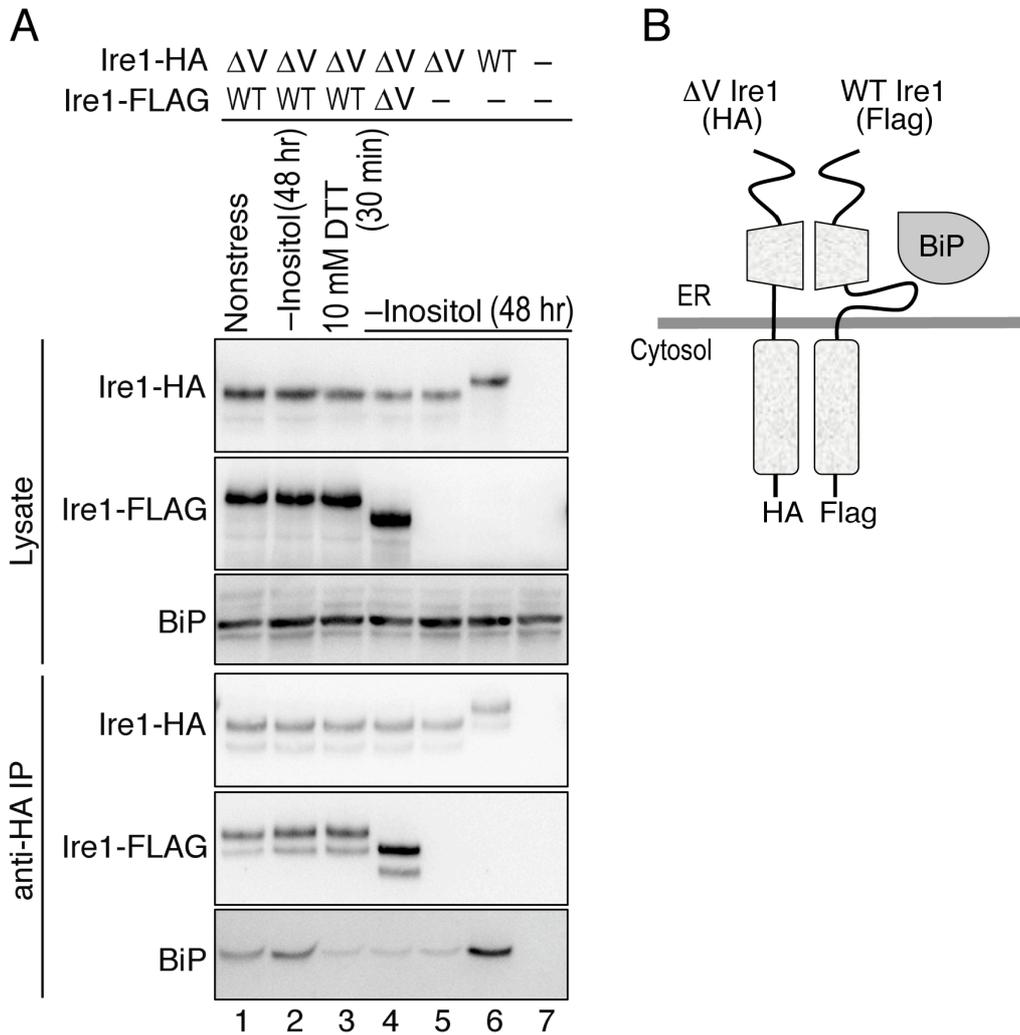
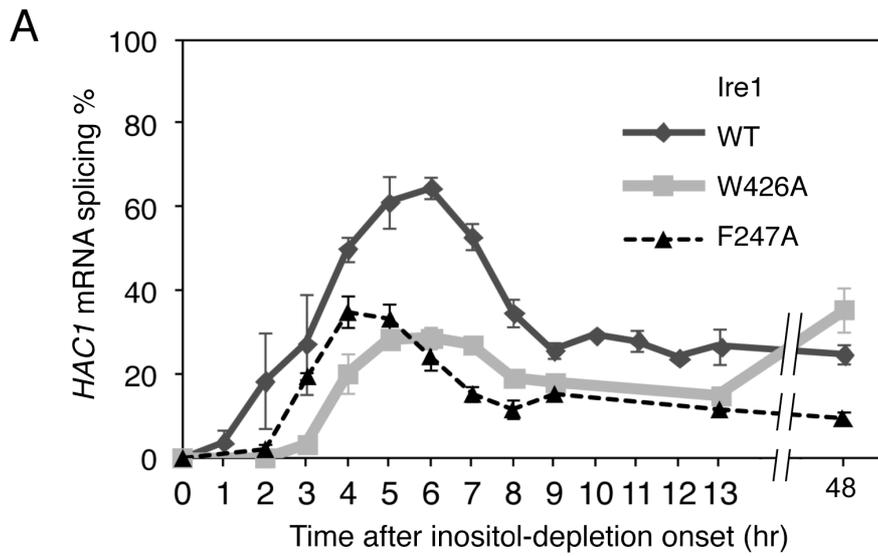


図 16 BiP を含むホモ会合した Ire1 複合体

A: マルチコピーIre1-Flag プラスミドである pRS426-IRE1-Flag(野生型(WT)または ΔV 変異体)あるいは空ベクターpRS426、およびマルチコピーIre1-HA プラスミド pRS423-IRE1-HA(野生型(WT)または ΔV 変異体)あるいはタグ無し *IRE1* プラスミド pRS313-IRE1 の両方にて形質転換した二倍体 *ire1* Δ /*ire1* Δ 株 KMY1015 \times KMY1520 に、図に示した条件でストレスを与えた。全タンパク質抽出液(OD₆₀₀=1 に相当)と、抗 HA 抗体による免疫沈降産物(OD₆₀₀=10 に相当)を、それぞれ抗 HA 抗体、抗 Flag 抗体あるいは抗 BiP 抗体を用いたウエスタンブロットにて解析した。

B: A の結果から考えられるタンパク質複合体の概略図



B W426A Ire1-HA

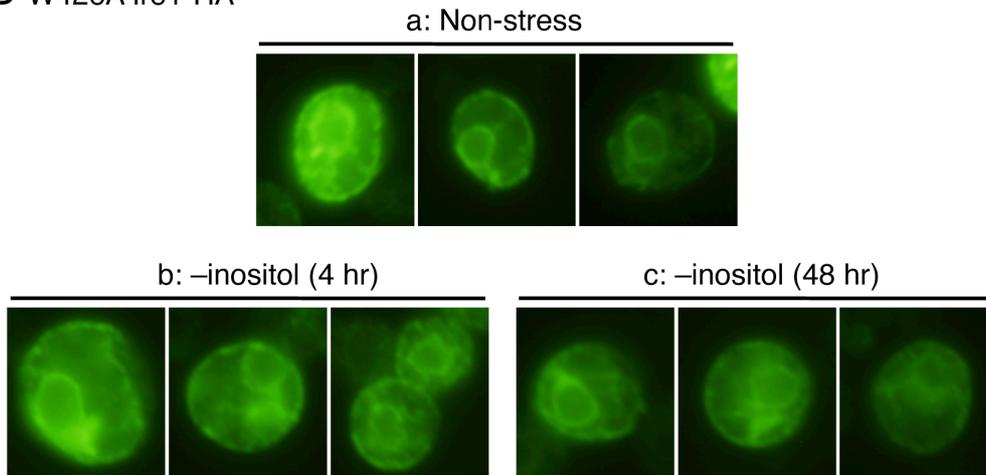


図 17 イノシトール欠乏条件下でのクラスター形成不全 Ire1 変異体の挙動

A : シングルコピー *IRE1* プラスミド pRS313-*IRE1*(野生型(WT)または W426A 変異体あるいは F247A 変異体)にて *ire1* Δ 株 KMY1516 を形質転換し、イノシトール欠乏培地で培養することによりストレスを与えた。そして、総 RNA サンプルを RT-PCR に供し、*HAC1* mRNA のスプライシング効率を評価した。エラーバーは 3 つの独立したクローンからのデータの標準偏差を示している。

B : W426A 変異が導入されたマルチコピー Ire1-HA プラスミド pRS423-*IRE1*-HA にて KMY1516 を形質転換し、図に示した条件でストレスを与え、抗 HA 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。

長時間の DTT 処理での Ire1 のクラスター化および活性化パターン

最後に、イノシトール欠乏以外の小胞体ストレスでも同様の現象がみられるのかを検討した。図 18A, B、図 11 および第一章に示す様に、3mM DTT で細胞を処理すると、野生型 Ire1 は一過的にクラスターを形成して活性化する。そして、長期のイノシトール欠乏の場合と同様に、DTT 処理時間が長期に及ぶ場合 (5 時間)、Ire1 クラスターは消散するが、*HAC1* mRNA スプライシング活性は弱いながらも持続している(図 18A, B)。図 18A (点線グラフ) と 18C に示す様に、長期間の DTT 処理においても、 ΔV Ire1 はドット状の局在を示し、強い活性を維持している。

図 18D に示す様に、W426A Ire1 や F247A Ire1 は、野生型 Ire1 で見られる一過的な強い活性は示さなかった(DTT ストレス開始後 30 分から 2 時間)。しかし、長時間の DTT 処理では、野生型 Ire1 よりも W426A Ire1 の方が強く活性化した(図 18D; DTT ストレス開始後 3 から 5 時間)。これらの結果から私は、長時間のイノシトール欠乏と同様に、長時間の DTT 処理では、尾部同士の間でホモ会合無しで Ire1 が活性化すると考えている。長期間の DTT ストレスで W426A Ire1 が野生型 Ire1 よりも強く活性化するのは(DTT ストレス後 3 から 5 時間)、ストレス開始直後の不十分な活性化を補うためであると推測している。なお、このような活性化パターンは F247A Ire1 では見られなかった。図 18E では、強い活性を呈する局面でも、W426A Ire1 はクラスターを形成していないことを示す。

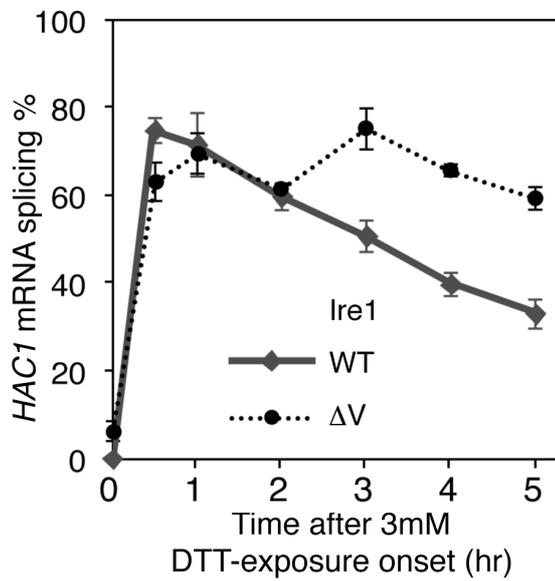
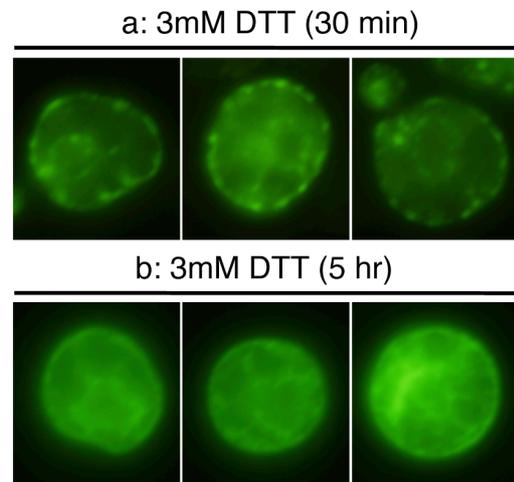
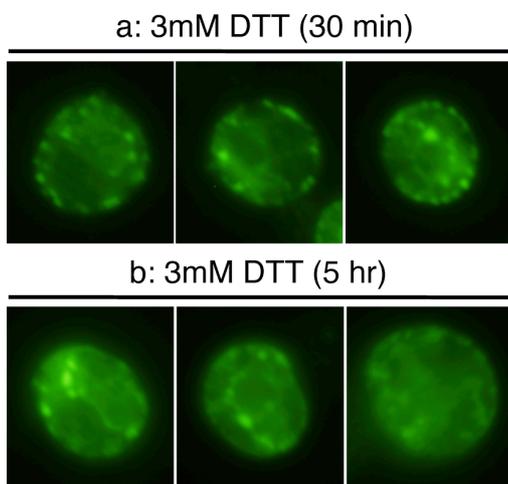
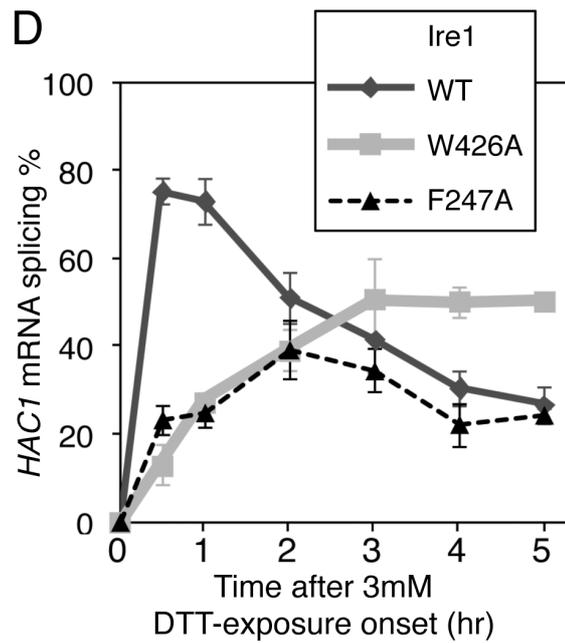
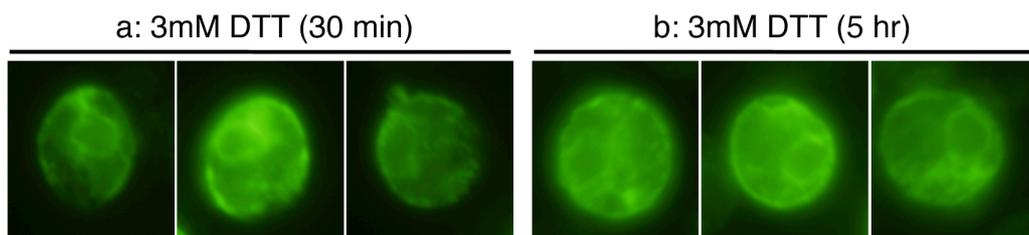
A**B** WT Ire1-HA**C** ΔV Ire1-HA**D****E** W426A Ire1-HA

図 18 長期間の DTT 処理によりストレスを与えた場合の、野生型(WT) Ire1 あるいはその変異体のクラスター形成と活性

A と D: 野生型(WT)あるいは図に示した変異が導入されたシングルコピー *IRE1* プラスミド pRS313-*IRE1* にて *ire1* Δ 株 KMY1516 を形質転換し、最終濃度 3mM の DTT を培地に加えてストレスを与えた。そして、総 RNA サンプルを RT-PCR に供し、*HAC1* mRNA のスプライシング効率を評価した。エラーバーは 3 つの独立したクローンからのデータの標準偏差を示している。

B、C および E: マルチコピー *Ire1*-HA プラスミド pRS423-*IRE1*-HA (B; 野生型(WT)、C; Δ V 変異体、E; W426A 変異体) を KMY1516 に形質転換し、図に示した条件でストレスを与え、抗 HA 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

考察

UPR によって転写が制御されている遺伝子が多数に及ぶことを考えると (Travers et al., 2000; Kimata et al., 2006)、正しく制御されずに不適切に強い UPR がおこると細胞にとって有害であろうことは想像に難くない。実際、Mori 等(2000)は、イントロンを除去した変異型 *HAC1* 遺伝子を酵母細胞に導入して恒常的に UPR を惹起すると、生育が遅れることを示した。このような知見は、*Ire1* が一過的に活性化した後、適切なタイミングでその活性が減弱することの重要性を示している。Rubio 等(2011)や Chawla 等(2011)は、活性の減弱に不全を来す *Ire1* 変異株が、長期間の小胞体ストレス条件下で、生存や生育に低下が見られることを報告している。

本論文では、長期間の小胞体ストレス条件下では、*Ire1* の活性は減弱するがある程度のレベルで持続し、このときには新規のタンパク質会合状態をとることを報告する。図 15 に示す様に、イノシトール欠乏後 48 時間での野生型 *Ire1* のホモ会合の割合は、DTT で 30 分間処理した場合よりも大きかった。この結果は、*Ire1* クラスター形成の程度とは反対であり(図 12B)、*Ire1* にはクラスター化していないがホモ会合している状態があることを示唆している。なお、CSSR の尾部同士でのホモ会合はアフィニティーが弱く (おそらく、細胞抽出液中で解離する)、細胞抽出液のタンパク質解析、すなわち、図 15 のような実験手法を用いた場合では、CSSR の頭部同士でのホモ会合しか検知できないと考えられている(Kimata et al., 2007)。よって私は、長期間のイノシトール欠乏における *Ire1* のホモ会合状態は、CSSR の頭部同士でホモ会合した二量体であると考えている。なお、ストレスがもっと弱い場合、あるいは持続していない場合は、*Ire1* は完全に解離し、全く活性を示さないであろう (Pincus et al., 2010)。

図 17A では、長期間のイノシトール欠乏条件下では、W426A *Ire1* が強く活性化することを示した。この結果は、長期間のストレス状態で *Ire1* が活性を呈するためには、CSSR の尾部同士でのホモ会合が必要ないことを示している。すなわち、*Ire1* はホモ二量体として活性化しているのである。*Ire1* がこの場合にはホモ二量体状態でも高い活性を持つメカニズムは不明であるが、生体膜の状態との関連が想定される。第一章で示した様に、膜脂質の重要な構成成分であるイノシトールの欠乏は、膜のホメオスタシスを乱すことで *Ire1* を活性化して UPR を引き起こす。また、長時間(5 時間)の 3mM DTT 処理でも、膜関連の異常が引き起こされ(第一章)、W426A *Ire1* が活性化する(図 18D)。さらに、膜脂

質の構成成分の細胞内輸送に関わる *ARV1* 遺伝子が欠損すると、野生型 *Ire1* よりも *W426A Ire1* の方が強く活性化することが報告されている (Shechtman et al., 2011)。これらのことから私は、小胞体膜の性状に何らかの変化が起きることにより、*Ire1* のサイトゾル側ドメインの構造が影響され、*Ire1* がホモ二量体化状態で活性を發揮できるようになると考えている。

図 14 に示す様に、長期間のイノシトール欠乏条件下では、非ストレス条件下と同程度に、*BiP* は *Ire1* と会合している。この条件での *Ire1* 活性低下に *BiP* の会合が関わっていることは、*IRE1* ΔV 変異体の解析からも支持される。すなわち、 ΔV *Ire1* は、イノシトール欠乏の時間が長びいても、依然としてクラスターを形成しており、また、活性の低下も野生型に比して緩やかであった (図 10A、12C)。また、図 16 では、この条件下で形成される *Ire1* 複合体には *BiP* が含まれていることが示された。

本研究で得られた知見がイノシトール欠乏以外の小胞体ストレスにも適用できることが、図 18 に示されている。これらの結果を合わせて、私は図 19 に示したようなモデルを提唱したい。不活性状態 (小胞体ストレスにより活性化する前) では、*Ire1* は *BiP* と会合しており、ホモ会合はしていない (Inactive)。細胞が小胞体ストレスに晒されると、*Ire1* は *BiP* から解離してクラスターを形成し、強い UPR が惹起される (Transiently activated)。この急速で強い応答は、急性のダメージへの対応にとって重要なのであろう。一方、小胞体ストレスが継続すると、*Ire1* は CSSR の頭部同士の会合によりホモ二量体を形成し、弱いながらも活性を持続した状態を保つ (Constitutively activated)。この局面では、*BiP* が *Ire1* に会合することが、*Ire1* クラスターを解離させ、また、*Ire1* クラスターの形成を妨げていると考えられる。

図 13 に示す様に、長期間に渡りイノシトール欠乏ストレスを与え続けると、*ire1* Δ 株は *IRE1* プラスミドを落とした状態で生育することが出来ない。この結果は、*Ire1* が活性を保ち続けることが、長期間の小胞体ストレスに対応するのに必要であるという考えを支持している。なお、前述のように、強すぎる UPR が継続すると、細胞にとって有害である。*Ire1* は、一過的な活性化とは異なる複合体様式をとることにより、継続的な弱い UPR も引き起こすことができるのであろう。

細胞のストレス応答全般を考えたときに、急性のストレスと慢性のストレスとで、応答の強さや持続期間が異なるというのは合理的であると言えよう。本研究で示した *Ire1* に関する知見は、急性のストレスへと慢性のストレスへの応

答において、シグナル伝達タンパク質（この場合は Ire1）が異なる複合体様式で応答するという、興味深い事例であると考えている。

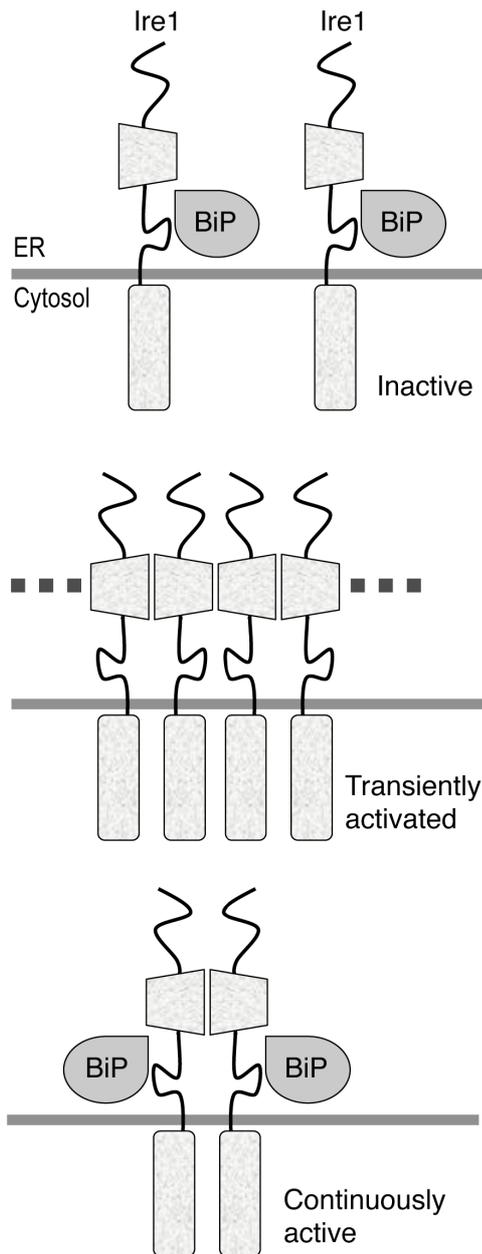


図 9 Ire1 の一時的な活性化状態と継続的な活性化状態

上：不活性化状態(小胞体ストレスにより活性化する前)では、Ire1 は BiP と会合し、ホモ会合はしていない。

中：小胞体ストレスにより、Ire1 は BiP から解離してクラスターを形成、一過的に強く活性化する。

下：小胞体ストレスが継続すると、BiP の会合により、Ire1 はホモ二量体となり、弱いながらも活性化した状態を保つ。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、物心ともに多大なご援助をくださり、また、常にご指導とご鞭撻を与えていただきました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科動物細胞工学研究室河野憲二教授と木俣行雄准教授に、深く感謝いたします。また、動物細胞工学研究室内のメンバーの皆様には、日頃から有意義なディスカッションと暖かいご支援をいただき、まことにありがとうございました。

また、アドバイザーの先生方（高木博史先生、箱嶋敏雄先生、塩崎一裕先生、佐藤匠徳先生）には、数多くの有益なアドバイスをいただき、この場を借りまして御礼申し上げます。高木先生には、出芽酵母の研究材料の供与などにつきましてもご協力いただけましたことを感謝いたしております。

参考文献

- Aragon, T., van Anken, E., Pincus, D., Serafimova, I. M., Korennykh, A. V., Rubio, C. A., and Walter, P. (2009). Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature* *457*, 736-740.
- 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.
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., and Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* *110*, 119-122.
- Cox, J. S., Chapman, R. E., and Walter, P. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell* *8*, 1805-1814.
- Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M., and Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 18773-18784.
- Cunha, D. A. *et al.* (2008). Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J. Cell Sci.* *121*, 2308-2318.
- Deguil, J., Pineau, L., Rowland Snyder, E. C., Dupont, S., Beney, L., Gil, A., Frapper, G., and Ferreira, T. (2011). Modulation of Lipid-Induced ER Stress by Fatty Acid Shape. *Traffic* *12*, 349-362.
- Duden, R., Kajikawa, L., Wuestehube, L., and Schekman, R. (1998). epsilon-COP is a structural component of coatamer that functions to stabilize alpha-COP. *EMBO J.* *17*, 985-995.

Finger, A., Knop, M., and Wolf, D. H. (1993). Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. *Eur. J. Biochem.* *218*, 565-574.

Gardner, B. M., and Walter, P. (2011). Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands that Directly Induce the Unfolded Protein Response. *Science* *333*, 1891-1894

Goder, V., and Melero A (2011). Protein O-mannosyltransferases participate in ER protein quality control. *J. Cell Sci.* *124*, 144-153.

Hardwick, K. G., Lewis, M. J., Semenza, J., Dean, N., and Pelham, H. R. (1990). ERD1, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *EMBO J.* *9*, 623-630.

Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A. H., Bassik, M. C., Antonsson, B., Brandt, G. S., Iwakoshi, N. N., Schinzel, A., Glimcher, L. H., and Korsmeyer, S. J. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* *312*, 572-576.

Hu, C. C., Dougan, S. K., McGehee, A. M., Love, J. C., and Ploegh, H. L. (2009). XBP-1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B cells. *EMBO J.* *28*, 1624-1636.

Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K. L., Rajewsky, K., and Glimcher, L. H. (2003). Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat. Immunol.* *4*, 321-329.

Iwawaki, T., Akai, R., and Kohno, K. (2010). IRE1alpha disruption causes histological abnormality of exocrine tissues, increase of blood glucose level, and decrease of serum immunoglobulin level. *PLoS One* *5*, e13052.

Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., and Kohno, K. (2009). Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *106*, 16657-16662.

Jonikas, M. C., Collins, S. R., Denic, V., Oh, E., Quan, E. M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J. S., and Schuldiner, M. (2009). Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* *323*, 1693-1697.

Kaderei, B., Kumar, P., Wang, W. J., Miranda, D., Snapp, E.L., Severina, N., Torregroza, I., Evans, T., and Silver, D. L. (2008). Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *105*, 94-99.

Kajiwara, K., Watanabe, R., Pichler, H., Ihara, K., Murakami, S., Riezman, H., Funato, K. (2008). Yeast ARV1 is required for efficient delivery of an early GPI intermediate to the first mannosyltransferase during GPI assembly and controls lipid flow from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*. *19*, 2069-2082.

Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1997). Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response. *Mol. Biol. Cell* *8*, 1845-1862.

Kimata, Y., Higashio, H., and Kohno, K. (2000). Impaired proteasome function rescues thermosensitivity of yeast cells lacking the coatomer subunit epsilon-COP. *J. Biol. Chem.* *275*, 10655-10660.

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.

Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Yamada, S., and Kohno, K. (2006). Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes Cells* *11*, 59-69.

Kimata, Y., Kimata, Y. I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I. C., Takeuchi, M., Rose, M. D., and Kohno, K. (2003). Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol. Biol. Cell* *14*, 2559-2569.

Kimata, Y., and Kohno, K. (2011). Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *23*, 135-142.

Kimata, Y., Lim, C. R., Kiriya, T., Nara, A., Hirata, A., and Kohno, K. (1999). Mutation of the yeast epsilon-COP gene ANU2 causes abnormal nuclear morphology and defects in intracellular vesicular transport. *Cell. Struct. Funct.* *24*, 197-208.

Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., and Kohno, K. (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J. Cell Biol.* *167*, 445-456.

Korennykh, A. V., Egea, P. F., Korostelev, A. A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K. M., Stroud, R. M., and Walter, P. (2009). The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* *457*, 687-693.

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.

Li, H., Korennykh, A. V., Behrman, S. L., Walter P. (2010). Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 16113-16118.

- Lipson, K. L., Ghosh, R., and Urano, F. (2008). The role of IRE1alpha in the degradation of insulin mRNA in pancreatic beta-cells. *PLoS One* *3*, e1648.
- Lisbona, F. *et al.* (2009). BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Mol. Cell* *33*, 679-691. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Liu, C. Y., Schroder, M., and Kaufman, R. J. (2000). Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *275*, 24881-24885.
- Luo, D., He, Y., Zhang, H., Yu, L., Chen, H., Xu, Z., Tang, S., Urano, F., and Min, W. (2008). AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* *283*, 11905-11912.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., and Yeung, T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* *93*, 263-275.
- Merksamer, P. I., Trusina, A., and Papa, F. R. (2008). Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions. *Cell* *28*, 933-947.
- Mori, K. (2009). Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J. Biochem.* *146*, 743-750.
- Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., and Yura, T. (2000). mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 4660-4665.

Muñiz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P., and Riezman, H. (2000). The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J. Cell Biol.* *148*, 925-930.

Nikawa, J., Akiyoshi, M., Hirata, S., and Fukuda, T. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression. *Nucleic Acids Res.* *24*, 4222-4226.

Oikawa, D., and Kimata, Y. (2011). Experimental approaches for elucidation of stress-sensing mechanisms of the IRE1 family proteins. *Methods Enzymol.* *490*, 195-216.

Oikawa, D., Kimata, Y., and Kohno, K. (2007). Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *J. Cell Sci.* *120*, 1681-1688.

Oikawa, D., Kimata, Y., Kohno, K., and Iwawaki, T. (2009). Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp. Cell Res.* *315*, 2496-2504.

Oikawa, D., Kimata, Y., Takeuchi, M., and Kohno, K. (2005). An essential dimer-forming subregion of the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1. *Biochem. J.* *391*, 135-142.

Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *279*, 445-450.

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

- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., Gorgun, C. Z., and Hotamisligil, G. S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* *313*, 1137-1140.
- Pincus, D., Chevalier, M. W., Aragon, T., van Anken, E., Vidal, S. E., El-Samad, H., and Walter, P. (2010). BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol* *8*, e1000415.
- Pineau, L., Colas, J., Dupont, S., Beney, L., Fleurat-Lessard, P., Berjeaud, J. M., Berges, T., and Ferreira, T. (2009). Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. *Traffic* *10*, 673-690.
- Powers, J., and Barlowe, C. (2002). Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol. Biol. Cell* *13*, 880-891.
- Promlek, T., Ishiwata-Kimata, Y., Shido, M., Sakuramoto, M., Kohno, K., and Kimata, Y. (2011). Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. *Mol. Biol. Cell* *22*, 3520-3532.
- Qiu, Y., Mao, T., Zhang, Y., Shao, M., You, J., Ding, Q., Chen, Y., Wu, D., Xie, D., Lin, X., Gao, X., Kaufman, R. J., Li, W., and Liu, Y. (2010). A crucial role for RACK1 in the regulation of glucose-stimulated IRE1alpha activation in pancreatic beta cells. *Sci. Signal* *3*, ra7.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 519-529.
- Rubio, C., Pincus, D., Korennykh, A., Schuck, S., El-Samad, H., and Walter, P. (2011). Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity. *J. Cell Biol.* *193*, 171-184.

Rutkowski, D. T., and Hegde, R. S. (2010). Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J. Cell Biol.* *189*, 783-794.

Schuldiner, M., Metz, J., Schmid, V., Denic, V., Rakwalska, M., Schmitt, H. D., Schwappach, B., and Weissman, J. S. (2008). The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* *134*, 634-645.

Shechtman, C. F., Henneberry, A. L., Seimon, T. A., Tinkelenberg, A. H., Wilcox, L. J., Lee, E., Fazlollahi, M., Munkacsi, A. B., Bussemaker, H. J., Tabas, I., and Sturley, S. L. (2011). Loss of subcellular lipid transport due to ARV1 deficiency disrupts organelle homeostasis and activates the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* *286*, 11951-11959.

Sheff, M. A., and Thorn, K. S. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *21*, 661-670.

Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *122*, 19-27.

Tong, F., Billheimer, J., Shechtman, C. F., Liu, Y., Crooke, R., Graham, M., Cohen, D. E., Sturley, S. L., and Rader, D. J. (2010). Decreased expression of ARV1 results in cholesterol retention in the endoplasmic reticulum and abnormal bile acid metabolism. *J. Biol. Chem.* *285*, 33632-33641.

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.

Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F., and Pagliassotti, M. J. (2006). Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *291*, E275-281.

Wiseman, R. L., Zhang, Y., Lee, K. P., Harding, H. P., Haynes, C. M., Price, J., Sicheri, F., and Ron, D. (2009). Flavonol activation defines an unanticipated ligand-binding site in the kinase-RNase domain of IRE1. *Mol. Cell* *38*, 291-304.

Zheng, Z., Zhang, C., and Zhang, K. (2010). Role of unfolded protein response in lipogenesis. *World J. Hepatol.* *2*, 203-207.

Zhou, J., Liu, C. Y., Back, S. H., Clark, R. L., Peisach, D., Xu, Z., and Kaufman, R. J. (2006). The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 14343-14348.