

博士論文番号：1481007

翻訳停止の共役による SRP 経路を介した *XBP1u* mRNA の
小胞体膜局在化機構の解析

荻田 聡

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)

平成29年1月23日提出

目次

1. 序論	4
小胞体におけるタンパク質合成.....	4
翻訳共役型膜透過機構：SRP 経路	4
翻訳後型膜透過機構.....	5
小胞体ストレス応答(Unfolded Protein Response, UPR)	6
XBP1 活性化機構.....	8
研究目的.....	8
2. 材料と方法	10
プラスミド.....	10
抗体.....	11
細胞培養、トランスフェクション	12
蛍光免疫染色.....	12
ウェスタングロブリング	13
無細胞翻訳.....	13
免疫沈降法.....	14
<i>XBP1</i> mRNA スプライシングアッセイ	15
ミクロソーム分画.....	15
翻訳共役型膜局在化アッセイ	16
翻訳後型膜局在化アッセイ	16
mRNA 膜局在化効率解析	17
3. 結果	19
XBP1u は核と小胞体に特異的に局在化する	19
SRP 経路構成因子は XBP1u-RNC と相互作用する	19
SRP は HR2 を認識して、XBP1u に結合する。	21
SRP は翻訳停止状態の XBP1u を小胞体膜上へと輸送する。	22
SRP 経路は <i>XBP1u</i> mRNA を小胞体膜に輸送する.....	22
翻訳停止は XBP1u が SRP 経路によって認識されるために必要である.....	23
SRP による XBP1u の輸送は従来の SRP 経路と異なる特徴をもつ.....	24
翻訳停止は疎水性度に依らず HR2 の認識に必要である	25

HR2 と翻訳停止配列の位置関係が効率的な mRNA 小胞体膜局在化を可能にする	27
4. 考察	29
<i>XBPlu</i> mRNA は SRP 経路を介して小胞体膜上のトランスロコンへと輸送される	29
翻訳停止配列は SRP 経路を介した <i>XBPlu</i> mRNA の局在化に必要である	30
HR2 は <i>XBPlu</i> の小胞体と核への局在化に寄与する	32
SRP 経路と小胞体恒常性維持機構の関係	33
更なる <i>XBPlu</i> mRNA と IRE1 α を接近させる分子機構の存在	33
結論	34
5. 図表	34
6. 参考文献	71
7. 謝辞	82

略語表

ER : Endoplasmic Reticulum
XBP1 : X-Box Binding Protein 1
IRE1 α : Inositol Requiring Enzyme 1 α
PERK : PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase
ATF6 : cAMP-dependent transcription factor 6
ATF4 : cAMP-dependent transcription factor 4
CHOP : C/EBP-homologous protein
UPR : Unfolded Protein Response
CRE : cAMP responsive element
ERSE : ER stress element
UPRE : Unfolded protein response element
BiP : Immunoglobulin heavy-chain Binding Protein
SRP : Signal Recognition Particle
CNX : Calnexin
RNC : mRNA-Ribosome-Nascent chain Complex
HR2 : Hydrophobic region 2

1. 序論

小胞体におけるタンパク質合成

DNA から mRNA に転写された情報を元にタンパク質は合成される。ポリペプチド鎖合成酵素であるリボソームが mRNA 上の開始コドン(AUG)を認識し、3塩基ごとの読み枠(ORF)に沿って終止コドンまで翻訳を行う。これによって、新生ポリペプチド鎖が合成される。そして、シャペロンタンパク質が正確なフォールディングを行うことでポリペプチド鎖から固有の機能を持つタンパク質となる。

細胞が合成するタンパク質の内、分泌タンパク質や膜タンパク質は、細胞質で翻訳が開始された後に小胞体内へと送り込まれる。このタンパク質を細胞質から小胞体内へと送り込む現象を膜透過といい、この膜透過には翻訳と同時に行われる機構(翻訳共役型膜透過、Co-translational translocation)と、翻訳後に行われる機構(翻訳後型膜透過、Post-translational translocation)がある(Shao and Hegde, 2011)。膜透過したタンパク質は小胞体内でフォールディングを受けた後、分泌経路にのせてそのタンパク質が機能する場へと輸送される(Fig. intro 1)。

翻訳共役型膜透過機構：SRP 経路

SRP 経路は、翻訳共役型の膜透過機構であり、細胞質で翻訳が開始されたタンパク質を翻訳と同時に小胞体内へと送り込む機構である(Fig. Intro 2A)(Walter and Johnson, 1994)。この経路は、主に基質を細胞質で認識するシグナル認識粒子(Signal Recognition Particle, SRP)と、小胞体膜上にタンパク質が通る孔を形成するトランスロコンによって構成される。分泌タンパク質や膜タンパク質は N 末端に疎水性の α ヘリックスによるシグナルペプチドを有しており、SRP はシグナルペプチドをリボソーム上で認識すると翻訳伸長の遅延を引き起こし、mRNA-リボソーム-新生ペプチド鎖の複合体(RNC)を維持する。そして、小胞体膜上の SRP 受容体を介して、SRP は RNC の状態で基質タンパク質を小胞体膜上へと輸送する。SRP はトランスロコンに基質タンパク質を受け渡すと、リボソームはトランスロコンと結合し、SRP はリボソームから解離する。それによって、SRP による翻訳伸長の抑制が解除され、翻訳と同時にトランスロコンを通して小胞体内腔へとタンパク質が送り込まれることで、タンパク質は膜透過し、

分泌タンパク質や膜貫通タンパク質が合成される。

SRP は SRP54, SRP72, SRP68, SRP19, SRP14, SRP9 と 7S RNA からなる RNA とタンパク質の複合体である(Walter and Blobel, 1982; Akopian, et al, 2013)(Fig. intro 2B)。この内、基質認識サブユニットである SRP54 はリボソームと相互作用し、リボソーム上でシグナルペプチドを認識する(Halic, et al, 2004)。そして、SRP54 が GTP 結合型となり、SRP 受容体と結合する。SRP 受容体は遊離タンパク質の SRP Receptor α (SR α)、膜タンパク質の SR β からなり、SR α が SRP-RNC と結合すると GTP 結合型となって SR β と結合し、SRP が SR α , SR β と複合体を形成することで基質タンパク質の RNC は小胞体膜上にリクルートされる(Gilmore, et al, 1982)。その後、トランスロコンと結合すると、SRP54 の GTP が GDP へと加水分解されることで SRP54 の構造が変化し、基質タンパク質がトランスロコンへと受け渡される(Miller, et al, 1993)。この間、SRP14/9 の複合体は EF2 によるリボソームの翻訳伸長反応を競合的に阻害することで、RNC の状態を維持しており、効率的な膜透過に寄与している。(Wolin, et al, 1989; Halic, et al, 2004; Lakkaraju, et al, 2008)(Fig. intro 2B)。

基質タンパク質はトランスロコンへと受け渡された後、リボソームとトランスロコンの強固な相互作用によって、翻訳伸長と同時にトランスロコンを通して小胞体内へとタンパク質は輸送される(Görlich, et al, 1993)。この間に、シグナルペプチドはシグナルペプチダーゼによって切断され、翻訳終了とともに小胞体内へと遊離タンパク質がリリースされる。膜貫通タンパク質の場合は、シグナルペプチドとは別に疎水性のヘリックスを形成する膜貫通ドメインを持っており、トランスロコンによって小胞体膜中に膜貫通ドメインがリリースされることで、膜貫通タンパク質や複数回膜貫通タンパク質が合成される(Rapoport, 2007)。

翻訳後型膜透過機構

翻訳後型膜透過は、中間部位や C 末端側に膜貫通ドメインを持つタンパク質、もしくは小さな分泌タンパク質を翻訳が終了した後に小胞体内へと膜透過する機構である(Hegde and Keenan, 2011)。この機構は複数知られており、トランスロコンのサブユニットである Sec62-Sec63 が介在する経路、C 末端に膜貫通ドメインを持つタンパク質を小胞体膜に挿入するテイルアンカー経路、またカルモジュリンが介在して、トランスロコンを通して分子量の小さい分泌タンパク質を

膜透過する経路が知られている。

小胞体におけるタンパク質品質管理機構

小胞体に送り込まれたタンパク質は BiP を始めとするシャペロンタンパク質やジスルフィド結合形成酵素(PDI)、N 型糖鎖付加酵素などによって正しいフォールディングを受ける(Gething, et al, 1992)。しかし、フォールディングを受けられなかったタンパク質やフォールディングが崩れてしまったタンパク質は環境要因や過剰量のタンパク質合成によって生じてしまう。このフォールディングの崩れた異常タンパク質が蓄積すると細胞毒性を示す凝集体を形成する。これを防ぐために、小胞体にはタンパク質のフォールディング状態の管理と異常タンパク質の分解を備える品質管理機構が存在する(Buchberger, et al, 2010; Vembar, et al, 2008)。フォールディング状態の管理は BiP などのシャペロン、PDI、糖鎖結合タンパク質であるカルネキシンやカルレティキュリンによって行われる。一方、異常タンパク質の分解機構は小胞体関連分解(ERAD)と呼ばれ、小胞体内腔から細胞質へとタンパク質を排出し、細胞質のプロテアソームによって分解する機構である。これらの機構は小胞体がタンパク質のフォールディングを行う処理容量を決めており、品質管理機構が不足すると異常タンパク質が蓄積してしまうため、品質管理機構に関わる遺伝子の転写を誘導し、品質管理機構を強化することで小胞体の恒常性を維持する仕組みを細胞は備えている。それを小胞体ストレス応答という。

小胞体ストレス応答(Unfolded Protein Response, UPR)

過剰なタンパク質合成や環境ストレスによって小胞体内に異常タンパク質を始めとするストレスが蓄積する。このストレスの蓄積に応答し、小胞体へのタンパク質流入の抑制や品質管理機構の因子を増やす細胞内応答を小胞体ストレス応答(UPR)という(Ron and Walter, 2007; Walter and Ron, 2011)。小胞体ストレス応答は、小胞体ストレスを感知するセンサーによって制御されており、そのセンサーとして膜貫通タンパク質である PERK、ATF6、IRE1 α が知られている(Fig. intro 3)。

PERK は、翻訳開始因子の一つである eIF2 α のキナーゼであり、リボソームによる開始コドンの認識を抑制することで、タンパク質合成を負に制御し、小胞体へのタンパク質流入を抑制する(Harding, et al, 1999)。さらに、ATF4 や CHOP

を正に制御することで、タンパク質合成や酸化ストレス関連の遺伝子の転写を誘導する(Harding, et al, 2004)。

ATF6は内腔側にストレス感知ドメイン、細胞質側にロイシンジッパー型の転写因子ドメインをもつ膜貫通タンパク質である。小胞体ストレスを感知するとATF6はゴルジ体へと輸送され、S1P、S2Pと呼ばれるプロテアーゼによって膜貫通ドメインが切断される。これにより、細胞質側の転写因子が核内へと輸送され、ATF6がERSEと呼ばれるプロモーター配列に結合し、シャペロンなどのタンパク質のフォールディングに関わる遺伝子の転写を誘導する(Yoshida, et al, 1998)。

IRE1 α は細胞質側にセリン・トレオニンキナーゼドメインとエンドヌクレアーゼドメインを持ち、二量体化、自己リン酸化、多量体化を経て活性化し、エンドヌクレアーゼ活性によって下流の転写因子XBP1を活性化する(Yoshida, et al, 2002; Calton, et al, 2002; Bertolotti, et al, 2000, Kimata, et al; 2007)。IRE1 α はXBP1 mRNAを切断することで細胞質スプライシングと呼ばれる機構を開始させ、XBP1 mRNAを前駆体型(XBP1u mRNA)から成熟型(XBP1s mRNA)へと成熟させる。この結果、XBP1 mRNAからbZIPドメインは共通であるがC末端側の領域が変化した不活性化型XBP1(XBP1u)と活性化型XBP1(XBP1s)の2つのタンパク質が翻訳される。XBP1sはC末端領域に転写活性化ドメインを有しており、ERSEやUPREと呼ばれるプロモーター配列に結合し、脂質合成やタンパク質の品質管理に関わる遺伝子の転写を誘導することで小胞体の恒常性維持と状況に合わせた小胞体機能の拡張を行っている(Yamamoto, et al 2007; Lee, et al, 2003)。さらに、ATF6(Newman and Keeting, 2003)やHIF1 α (Chen, et al, 2014)などの他のロイシンジッパー型転写因子と二量体を形成することで低酸素ストレスや自然免疫応答など幅広い遺伝子の転写を誘導することができ、細胞のストレス耐性や細胞種特異的な機能を促進することが報告されている。その一方で、XBP1uはC末端に転写活性化ドメインを持たず、代わりに分解を施す分解配列をC末端に有している。XBP1uは核内へと移行し、XBP1s(Yoshida, et al, 2006)やATF6(Yoshida, et al, 2009)、FOXO1(Zhao, et al, 2013)といった転写因子の負の制御因子として報告されており、小胞体ストレス緩和後のUPRの終了を施す因子として働いている。

IRE1 α のエンドヌクレアーゼはXBP1の活性化だけでなく、Regulated IRE1-Dependent Decay(RIDD)と呼ばれるmRNAやmiRNAの分解機構が報告され

ている(Hollien, et al, 2006; Upton, et al, 2012)。これによって、小胞体へのタンパク質流入の抑制やアポトーシスの制御を行っている。また、IRE1 α のリン酸化を認識してリン酸化部位結合タンパク質である TRAF2 が IRE1 α と結合し、ASK1 経路を活性化することで小胞体ストレスを起因とする細胞死を誘導する(Urano, et al, 2000; Nishitoh, et al, 2002)。

XBP1 は B 細胞から抗体産生を行うプラズマ細胞への分化における主要制御因子として同定された転写因子である(Liou, et al, 1990)。近年では、XBP1 の過剰な活性化はがん内の樹状細胞における恒常性の破綻(Cubillos, et al, 2015)や、乳がんの進行を促進するということが(Chen, et al, 2014)が明らかとなっており、さらに、神経変性疾患、自己免疫疾患、代謝系疾患、がんといった様々な疾患との関わりが報告されている(Yoshida, 2007; Hetz, et al, 2009; Todd, et al, 2008)。XBP1 の制御機構の理解は分子生物学的観点からも興味深く、生物学においてインパクトのある研究に繋がる事が期待される。

XBP1 活性化機構

前項で述べた通り、IRE1 α は細胞質側のエンドリボヌクレアーゼドメインによって XBP1 を活性化する。XBP1 は哺乳動物で唯一の細胞質スプライシングを受ける遺伝子であり、このスプライシング反応は IRE1 α のエンドリボヌクレアーゼ活性による XBP1 の前駆体型 mRNA である *XBP1u* mRNA(u:Un-spliced)の2つのステムループにおける切断によって開始される(Yoshida, et al, 2002; Calfon, et al, 2002)(Fig. intro 4A)。*XBP1u* mRNA のステムループには CxGxxGx という IRE1 α のターゲットとなるコンセンサス配列があり、この3番目と4番目の間で切断が起きる。IRE1 α による切断後、tRNA リガーゼである RtcB-Archase 複合体によって、*XBP1u* mRNA の3'側と5'側のフラグメントがライゲーションされる(Shinya, et al, 2011; Lu, et al, 2014, Jurkin, et al, 2014)(Fig. intro 4B)。その結果、ORF 中の26塩基がスプライシングされた成熟型 mRNA である *XBP1s* mRNA(s:Spliced)となる。26塩基脱落によって、ORF の途中で読み枠がずれ、翻訳されるタンパク質が *XBP1u* から C 末端の転写活性化部位をもつ *XBP1s* となる(Fig. intro 4C)。

研究目的

XBP1u mRNA のスプライシングは IRE1 α の局在する小胞体膜上で起こると考

えられている。出芽酵母において、IRE1 α のホモログである Ire1p は HAC1 mRNA をスプライシングすることで、転写因子 HAC1 の翻訳を開始させ、小胞体の品質管理機構に関わる遺伝子の転写を誘導する(Sidrauski and Walter, 1997)。その HAC1 mRNA は 3'UTR にステムループを形成しており、そのステムループが Ire1p と結合することで HAC1 mRNA が Ire1p にリクルートされる(Fig. intro 5A) (Aragón, et al, 2008)。しかし、哺乳動物では、どのような仕組みによって IRE1 α へと *XBPlu* mRNA がリクルートされるのかは未解明である。

当研究室の先行研究によって、*XBPlu* mRNA は小胞体膜上へと局在化することで IRE1 α による細胞質スプライシングを促進することが明らかとなっている(Yanagitani, et al, 2009; Yanagitani, et al, 2011)。この *XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化はコードしている *XBPlu* タンパク質の翻訳と共役しており、*XBPlu* の C 末端側にある疎水性に富んだ領域 Hydrophobic Region 2 (HR2)と、翻訳の一時停止を引き起こすペプチド配列である翻訳停止配列が必要である(Fig. intro 5B)。

翻訳停止とは、翻訳中のリボソームが翻訳を一時的に停止し、mRNA 上に留まる現象である。翻訳停止は mRNA の二次構造や、レアコドンのクラスター、ペプチド配列によって誘導される。この内、翻訳停止を引き起こすペプチド配列を翻訳停止配列といい、多くのタンパク質が翻訳停止配列を持つ事が報告されている(Ingolia, et al, 2011)。

XBPlu の場合、翻訳停止配列によって RNC の状態が維持され、*XBPlu* の新生ペプチド鎖がもつ HR2 が生体膜に結合することで、*XBPlu* mRNA は RNC の状態で小胞体膜上へと局在化すると考えられていた(Fig. intro 5C)。しかし、このモデルでは、IRE1 α の局在する小胞体膜上へと特異的に局在化出来ないと考えられ、効率的なスプライシングを実現するための仕組みが説明出来ない。更なる解析によって、*XBPlu* は翻訳停止に依存して小胞体膜へと特異的に局在化すること、さらに、*XBPlu*-RNC のマイクロソーム結合能にはマイクロソーム表面のタンパク質因子が必要であることが明らかとなったことから、*XBPlu*-RNC を小胞体膜上へと局在化させる局在化因子の存在が示唆された(Fig. intro 5C)。

そこで、私はその未知の局在化因子を同定することで、*XBPlu* mRNA が小胞体膜上へと特異的に局在化する仕組みを明らかにすることを目標に解析を行った。その結果、SRP 経路の構成因子を *XBPlu* mRNA の小胞体膜特異的な局在化因子として同定した。更に、翻訳停止配列と SRP 経路が共役することによって、*XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化がなされる事を明らかにした。

2. 材料と方法

プラスミド

pcDNA3.1(+) (invitrogen)に組み込まれた XBP1u-G519C 変異体、及び XBP1u の下流に識別配列を付加した XBP1u-ps、それらのコンストラクトに dHR2, S255A, W256A の変異を入れた XBP1u 変異体の作成法については以前の報告で述べた (Yanagitani et al)。3xHA タグ、及び 3xFLAG と 8xHis を繋げた FH タグを XBP1u の N 末端に繋げたものを PCR によって作成した。XBP1u の NLS に変異を入れた mNLS を 59 及び 90 番目のリジンをアルギニンに置き換えることで作成した。3L 変異は XBP1u の Q199、S200 及び S203 をロイシンに置換することで作成した。XBP1u の下流に XBP1s の C 末端を付加した XBP1u+s は、XBP1s の ORF を含む XBP1u の ORF の終止コドンに 1 塩基挿入(TAA→TAcA)することで+1 フレームシフトを起こし、XBP1u と XBP1s の C 末端領域を繋げることで作成した。XBP1u+s の S255A、W256A、dHR2 変異体は上記と同様に作成した。XBP1uins 変異体は XBP1u+s で XBP1u の下流に繋いだ XBP1s の C 末端領域を XBP1u の HR2 の下流(208aa と 209aa の間)に挿入した。Sec61 β -HA は Sec61 β の C 末端に HA タグを PCR によって付加した。FRAP 解析に用いた Venus-XBP1u は XBP1u の N 末端に Venus を PCR で付加した。そして、mCherry-Sec61 β は Sec61 β の N 末端の ATG を除いて PCR で増幅し、mCherry-N1(Clontech)に挿入した。pMXs-FH-XBP1u-puro、pMXs-XBP1u-ps-puro は pcDNA3.1-FH-XBP1u、pcDNA3.1-XBP1u-ps を鋳型にインサートを PCR で増やし、ClaI と BamHI で pMXs に挿入した。

No.	Constructs	Vector	Information	5'RE site	3'RE site
1	XBP1u-ps	pcDNA3.1(+)	Primer annealing site at 3'UTR	KpnI	BamHI
2	XBP1u-G519C	pcDNA3.1(+)	Non-splicable	KpnI	BamHI
3	HAX3-XBP1u	pcDNA3.1(+)	3xHA fused at N-term, Based on 2	KpnI	BamHI
4	HAX3-XBP1u-mNLS1/2	pcDNA3.1(+)	K59R, K90R, Based on 3	KpnI	BamHI
5	HAX3-XBP1u-S255A	pcDNA3.1(+)	Based on 3	KpnI	BamHI
6	HAX3-XBP1u-W256A	pcDNA3.1(+)	Based on 3	KpnI	BamHI
7	FH-XBP1u	pcDNA3.1(+)	Based on 2, FH=3xFlag-8xHis	KpnI	BamHI
8	FH-XBP1u-S255A	pcDNA3.1(+)	Based on 7	KpnI	BamHI
9	FH-XBP1u-W256A	pcDNA3.1(+)	Based on 7	KpnI	BamHI
10	FH-XBP1u-dHR2	pcDNA3.1(+)	186-208 deletion, Based on 7	KpnI	BamHI
11	FH-XBP1u-3L	pcDNA3.1(+)	Based on 7	KpnI	BamHI
12	FH-XBP1u-3L-W256A	pcDNA3.1(+)	Based on 12	KpnI	BamHI
13	FH-XBP1u+s-HA	pcDNA3.1(+)	Extended C-terminus with XBP1s C-term	KpnI	BamHI
14	FH-XBP1u+s-S255A-HA	pcDNA3.1(+)	Based on 13	KpnI	BamHI
15	FH-XBP1u+s-W256A-HA	pcDNA3.1(+)	Based on 13	KpnI	BamHI
16	FH-XBP1u-ins	pcDNA3.1(+)	Insert into 208^209, based on 7	KpnI	BamHI
17	FH-XBP1u-ins-W256A	pcDNA3.1(+)	Based on 16	KpnI	BamHI
18	FH-XBP1u-ins-dHR2	pcDNA3.1(+)	Based on 16	KpnI	BamHI
19	F-XBP1u-H	pcDNA3.1(+)	Based on 2	KpnI	BamHI
20	F-XBP1u-3L-H	pcDNA3.1(+)	Based on 19	KpnI	BamHI
21	Sec61 β -HA	pcDNA3.1(+)	HA fused at C-term of Sec61 β	Clal	EcoRI
22	XBP1u-ps	pMXs-puro	insert with Clal and BamHI	Clal or KpnI	BamHI
23	FH-XBP1u	pMXs-puro	insert with Clal and BamHI	Clal or KpnI	BamHI
24	Venus-XBP1u	pcDNA3.1(+)		KpnI	BamHI
25	mCherry-Sec61 β	pmCherry-N1		KpnI	BamHI

抗体

この研究で使用した抗体を以下に記した。マウス抗 FLAG 抗体(M2, Sigma)、マウス抗 HA 抗体(12CA5, Roche)、マウス抗 HA 抗体(16B12, Covance, MMS-101P)、ウサギ抗 Giantin (9B6, Abcam, ab37266)、ウサギ抗 COX IV 抗体(K. 473. 4, Thermo Scientific, MA5-15078)、マウス抗 SRP54 抗体(CD Biosciences, 610940)、ウサギ抗 SRP72 抗体(Atlas Antibodies, HPA034621)、ウサギ抗 Sec61 α 抗体(Millipore, 07-204)、ウサギ抗 Sec61 β 抗体(Millipore, 07-205)、マウス抗 Rpl9 抗体(Abnova, H00006133-M01)、ウサギ抗 GAPDH 抗体(14C10, CST, 2118)、ウサギ抗 IRE1 α 抗体(14C10, CST, 3294)、ウサギ抗 PERK 抗体(D11A8, CST, 5683)、ウサギ抗 Calnexin(N 末端)抗体(Enzo Life Sciences, SPA-865)、ウサギ Calnexin(C 末端)(Enzo Life Sciences, SPA-860)、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(MBL, 458)、HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体(Jackson ImmunoResearch, 115-035-003)、Alexa488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体(Molecular Probes, A-11001)、Alexa647 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(Molecular Probes, A-11034)

細胞培養、トランスフェクション

HeLa、HEK293T、Cos-7、Plat-GP を DMEM(4.5g/L グルコース、ピルビン酸、グルタミン酸)(ナカライ)、10%(vol/vol)FBS(Sigma)、5% CO₂、37°Cで培養した。プラスミドは PEI-Max(Polyscience)、Lipofectamine 2000(Invitrogen)、Lipofectamine LTX(Invitrogen)でトランスフェクションし、トランスフェクションから 4h 後に培地交換をした後、24h 後にアッセイに使用した。siRNA は Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)を用いて、終濃度 10nM siRNA となるようにリバーストランスフェクション法を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後、2 day に細胞を蒔き直し、トランスフェクションから 4 day にアッセイを行った。Control siRNA として siLuc (S20C-0200, Cosmo Bio)を使用した。siSRP54 は stealth siRNA(Invitrogen)を使用した。

siSRP54 no. 1 sense (5'-GCUUCUGAAGGAGUAGAGAAAUUUA-3') and antisense (5'-UAAAUUUCUCUACUCCUUCAGAAGC-3'),

siSRP54 no. 2 sense (5'-UGCGAGACAUGUAUGAGCAAUUUCA-3') and antisense (5'-UGAAAUUGCUCACAUACAUGUCUCGCA-3'), and

siSRP54 no. 3 sense (5'-CGCUUUGUUGGAAGCAGAUGUAAU-3') and antisense (5'-AUUAAACAUUCUGCUUCCAACAAAGCG-3').

Fh-XBP1u 及び XBP1u-ps を安定発現する HeLa 細胞を樹立するために、Plat-GP 細胞に pMXs-FH-XBP1u-puro もしくは pMXs-XBP1u-ps-puro を pCMV-VSVG と 1:1 でトランスフェクションし、4h 後に培地交換を行った。トランスフェクションから 24h 後、ウイルスを含む培地を回収し、Plat-GP 細胞のコンタミを防ぐために 0.20µm Minisalt syringe filter (Sartrius)を通した。回収したウイルス液を新鮮な培地と当量で混ぜ、終濃度 4µg/ml Polybrene となるように Polybrene を加えることでウイルスミックスを作成した。HeLa 細胞にウイルスミックスを加え、37°C、24h で感染を行った。その後、培地を 1µg/ml Puromycin を含む培地と交換し、48h 培養することで薬剤選択を行い、安定発現株を樹立した。

蛍光免疫染色

カバースリップは 1M HCl 中で 50°C、4h 浸透して洗浄した。HeLa、及び Cos7 細胞にトランスフェクションした後、4h 後にカバースリップに細胞を蒔き、トランスフェクションから 24h 後にアッセイに用いた。細胞は 4% PFA、4°C、15min

固定し、0.1% TritonX-100 で室温, 30sec 透過処理を行った。ブロッキングは Blocking Buffer (5% BSA, PBS)で室温, 1h もしくは4℃, オーバーナイトで行った。一次抗体反応、及び二次抗体反応は Blocking buffer 中で室温, 1h 行った。その後、PBS で 500 倍希釈した Hoechst33362(同人化学)を、室温, 5min で核を染色し、PBS で洗浄後、Prolong Gold(Invitrogen)でマウントした。観察は、FV1000 共焦点レーザー顕微鏡システム(Olympus)、対物レンズ UPLSAPO 60xO 1.35、もしくは LSM700 共焦点レーザー顕微鏡システム(Zeiss)、対物レンズ Plan-Apochromat 63x oil 1.40 M27 で観察を行った。画像処理は Image J で行った。

ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE は Laemmli 法と Nu-PAGE の二種類の方法で行った。Laemmli 法は Running gel buffer(375mM Tris-HCl pH8.8)、Stacking gel buffer(125mM Tris-HCl pH6.8)、30:0.8 Acrylamide:Bis-Acrylamide Solution(Wako)を用いてゲルを作成し、Running Buffer(25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS)で電気泳動を行った。Nu-PAGE は Gel buffer (350mM Bis-Tris pH6.5)を用いてゲルを作成し、MES Running buffer(50mM MES, 50mM Tris, 1mM EDTA, 0.1%SDS)を用いて電気泳動を行った。ブロッティングは Blotting buffer(25mM Tris, 40mM 6-amino-n-caproate, 20% Methanol)を用いて、Immobilon-P(Millipore)に転写した。ブロッキングは 5%(w/vol)スキムミルク(ナカライ)を含む TBT-T で室温, 1h もしくは4℃, オーバーナイトでブロッキングを行った。その後、1 次抗体反応を室温, 1 h 以上、もしくは4℃, オーバーナイトで行い、2 次抗体反応を室温, 1 h 行った。検出は Clarity ECL Western Blotting Substrate(Bio-Rad)を用いて発光させ、LAS4000(GE Healthcare)で検出し、Image J を用いて画像処理を行った。オートラジオグラフィの検出では、SDS-PAGE 後、Fixation buffer(50% methanol、10% Acetate)で固定後、ゲル乾燥を行い、BAS1000(FUJIFILM)を用いて検出した。

無細胞翻訳

試験管内で mRNA を作成するために、pcDNA3.1(+)に入った鋳型を forward primer [5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGaccaagtgctagc-3'] (大文字は SP6 プロモーターを示し、小文字は pcDNA3.1(+)の MCS の上流とアニールする配列を示している。)と reverse primer [5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTcacctactcagacaatgcatgc-3'], (大文字

は polyA 配列、小文字は pcDNA3.1(+) の MCS の下流とアニールする配列を示している)を用いて、PCRによって増幅した。PCR産物を鋳型に SP6 RNA Polymerase (Promega)を用いて、5'キャップ化 mRNA を作成した。反応終了後、DNase I(TaKaRa)を 37°C, 20min 反応させて鋳型を消化し、Isogen LS (Nippon Gene)を用いて mRNA を精製した。mRNA は定量後、0.1µg/µl となるよう DEPC 処理水で調整し、液体窒素で凍らせ、-80°C に一時的に保存した。

無細胞翻訳系として、ウサギ網状赤血球抽出液由来 Rabbit reticulocyte lysate system, RRL(Promega) とコムギ胚芽抽出液由来 Wheat germ extract system, WGE (Promega)を用いた。

免疫沈降法

トランスフェクションから 24h 後に HEK293T を Lysis buffer(20mM HEPES KOH pH7.4, 150mM KOAc, 2.5mM Mg(OAc)₂, 1% NP40, Protease inhibitor(10 µg/mL leupeptin, 1 mM benzamidine, 10 µg/mL pepstatin A, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)), 4°C、30min で溶解した。その後、不溶画分を 17,000xg, 20min, 4°C で遠心して沈殿として分離し、上清を新しい試験管に移し、マウス抗 FLAG 抗体、マウス抗 HA 抗体、ウサギ抗 Sec61β 抗体を加え、4°C, 30min 反応させた。そこに、Protein A Sepharose Gel(GE Healthcare)を 50% Slurry で 20µl 加え、4°C, 1h で反応させた。その後、lysis buffer で 3 回洗浄し、ビーズを 2xSample buffer(125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, and 15% sucrose, 50mM DTT)で変性させ、ウェスタンブロッティングによって解析した。

無細胞翻訳系の翻訳産物を用いた免疫沈降法の場合は、反応系の 1/10 量の EXPRESS Protein Labeling Mix(PerkinElmer)存在下で 10µl の RRL を用いて翻訳反応を 30°C, 10min で行い、500µl Lysis buffer に懸濁した後、上記と同様に免疫沈降を行った。Fig. 3C, 8A では、FH-XBP1u は Nu-PAGE によって分離後、オートラジオグラフィーで検出し、その他のタンパク質は Laemmli SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングによって検出した。

XBP1u 結合タンパク質の同定

10 枚の 10cm dish に蒔いた HEK293T に FH-XBP1u をリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションし、24h 後に回収した。細胞は免疫沈降法の項と同様に溶解し、抗体反応を行った。Protein A sepharose を 50% slurry で 80µl 加え、4°C,

1h 反応させ、5 回 Lysis buffer で洗浄した後、500 μ l の 250 μ g/ml 3x FLAG peptide を含む Lysis buffer で溶出反応を行った。そして、50%slurry で 40 μ l の Ni-NTA(QIAGEN)を加え、4 $^{\circ}$ C,1h 反応させ、His タグプルダウンを行った。20mM imidazole を含む lysis buffer で 3 回洗浄し、500 μ l His elution buffer(300mM imidazole, 50mM Tris-HCl PH8.0, 300mM NaCl)で 4 $^{\circ}$ C,20min 溶出し、上清 450 μ l を Microcon YM-3(millipore)を用いて、限外濾過によって 50 μ l まで濃縮後、終濃度 1xSB, 50mM DTT になるように加え、37 $^{\circ}$ C, 30min 静置した。サンプルは Nu-PAGE によって分離後、トリプシンでゲル内消化を行い、Paradigm MS4(Michrom)を用いて液体クロマトグラフィーによって分離し、LTQ-Orbitrap(Thermo Scientific)を用いて質量分析を行った。データベースとして NCBI nr 20121013 と Mascot を用いてペプチド同定を行った。

***XBPI mRNA* スプライシングアッセイ**

RNA を RNAiso Plus(TaKaRa)を用いて精製し、DNase I(TaKaRa)を 37 $^{\circ}$ C, 20min 反応させて混入 DNA を分解し、Isogen-LS (Nippon Gene)を用いて再び RNA を精製した。RNA を定量後、RNA 500ng を M-MLV RNase H-point Mutation (Promega) と Random Hexamer(Promega)を用いて cDNA を 10 μ l の系で作成した。cDNA を鋳型に Forward Primer [5'-GGTCTGCTGAGTCCGCAGC -3']、Reverse Primer [5'-ATCCCGTGAACAGCTCCTCG-3'](ps(XBP1u-ps 上の識別配列)とアニールする)で PCR 反応を行い、安定発現させた XBP1u-ps の断片を増幅した。その後、6% Acrylamide gel, 1xTBE でゲルを作成し、0.5xTBE を用いて電気泳動を行った。EtBr で染色後、Gel-Doc XR(Bio-Rad)を用いて検出し、Image J で定量を行った。

ミクロソーム画

10cm ディッシュに蒔いた HEK293T にトランスフェクションし、トランスフェクションから 24h 後に細胞を回収した。回収した細胞を Hypotonic Buffer (10mM HEPES-KOH, 2.5mM Mg(OAc)₂, Protease Inhibitors)中で、27 ゲージ針をつけたシリンジでストロークし、細胞を破碎した。破碎後、8,000 x g, 4 $^{\circ}$ C, 10min で遠心を行い、上清をポストミトコンドリア画分として回収した。ポストミトコンドリア画分を TLA100.3 ローターを用いて 140,000 x g, 4 $^{\circ}$ C, 1h で超遠心し、上清を細胞質画分、沈殿をミクロソーム画分として回収した。Fig. 7B では、ポストミトコンドリア画分を 25mM EDTA, 500mM KOAc で氷上、30min 処理し、

上記と同様に細胞質画分とミクロソーム画分を分画した。Fig. 7C では、ポストミトコンドリア画分を 200mM Na₂CO₃ で氷上、30min 処理し、上記と同様に分画した。それぞれの画分は TCA 沈殿法によって濃縮後、ウェスタンブロッティングによって解析した。

翻訳共役型膜局在化アッセイ

膜局在化アッセイに用いる EDTA-High Salt treated Rough microsomal membrane (EKRM)を調整するために、Canine rough microsomal membrane(CMM, Promega) を EDTA-High Salt buffer (50mM EDTA, 500mM KOAc, 250mM Sucrose, 50mM HEPES-KOH pH7.4, 5mM Mg(OAc)₂)で氷上、15min 処理した。処理したミクロソーム膜は 500mM sucrose を含む HKM Buffer(20mM HEPES-KOH, 120mM KOAc, 5mM Mg(OAc)₂)の上に上層し、TLA100.3 ローターを用いて、140,000 x g, 4°C, 30min の条件で超遠心し、沈殿を回収した。沈殿は、250mM Sucrose を含む HKM buffer で懸濁後、再び上記と同条件で超遠心を行った後、沈殿を初期の CMM と当量の 250mM Sucrose を含む HKM buffer で懸濁した。調整した EKRM は液体窒素で凍結し、-80°Cで一時的に保存した。

翻訳共役型膜局在化アッセイは RRL と WGE で行った。RRL では、10μl の系に 0.02μg mRNA、及び 1μl EKRM を用い、30°C,10min で反応を行った。WGE の場合は 10μl の系に 0.1μg mRNA, 1μl EKRM, 5nM purified SRP(tRNA Probes)を加え、25°C, 10min 反応を行った。翻訳後、サンプルを 40μl の 250mM Sucrose, 1mM Cycloheximide を含む HKM Buffer で懸濁し、その後、500μl の 2.5M Sucrose を含む HKM Buffer で懸濁した。それを Polycarbonate ultracentrifuge tube (349622, Beckman)に移し、1ml の 1.9M Sucrose, 1ml の 250mM Sucrose を含む HKM Buffer を上層した。そして、SW55Ti ローターを用いて、55,000rpm, 4°C, 4h で超遠心を行い、膜を浮揚させた。遠心後、250mM Sucrose と 1.9M Sucrose の界面から 600μl を浮揚画分(Floated)として回収し、底の 600μl を遊離画分(Bottom)として回収し、それぞれを TCA 沈殿法によって濃縮後、ウェスタンブロッティングによって解析した。

翻訳後型膜局在化アッセイ

10μl の RRL 中で、0.02μg mRNA を 30°C, 10min 翻訳反応を行った後、終濃度 1mM puromycin で 30°C, 10min 処理を行うことで翻訳を終了させた。そして、1μl

EKRM を加え、30°C, 20min 反応させた。分画は膜浮揚法を用いて分画した。回収したサンプルは TCA 沈殿法によって濃縮した後、ウェスタンブロッティングによって解析した。

mRNA 膜局在化効率解析

膜結合 mRNA と遊離 mRNA を分画するためにジギトニン分画法を用いた。12multi-well plate に蒔いた HEK293T 細胞を回収後、200µl Buffer A(50mM HEPES-KOH pH7.4, 150mM KOAc, 2.5mM Mg(OAc)₂, 0.02µg/ml Digitonin(Sigma, D1407), Protease inhibitor, 2U RNAsin)で懸濁し、氷上, 5min 静置した後、3,000 x g, 4°C, 3min で遠心し、上清を細胞質画分として回収した。沈殿は、200µl Buffer B(50mM HEPES-KOH pH7.4, 150mM KOAc, 2.5mM Mg(OAc)₂, Protease inhibitor, 2U RNAsin)で洗浄した後、200µl Buffer C(50mM HEPES-KOH pH7.4, 150mM KOAc, 2.5mM Mg(OAc)₂, 1% TritonX-100, Protease inhibitor, 2U RNAsin)で沈殿を懸濁し、氷上, 5min 静置した。そして、8,000 x g, 4°C, 3min で遠心を行い、上清を膜画分として回収した。細胞質画分、膜画分から Isogen-LS を用いて RNA を精製し、DNase I(TaKaRa)で 37°C, 20min 処理した後、Isogen-LS で RNA を精製し、DEPC 処理水に溶解した。RNA 定量を行い、細胞質画分で得られた RNA を 250ng、そして、それと等量の膜画分の RNA を M-MLV RNase H-point mutation (Promega), Random Hexamer (PRomega)を用いて 10µl の系で逆転写した。cDNA の定量には、10 倍希釈した 1µl の cDNA を Thunderbird SYBR qPCR Mix(Toyobo)を用いた 10µl の反応系に加え、LightCycler 480 (Roche)で反応、検出を行った。得られた Cp(Crossing Point)を下記の数式に当てはめ、mRNA の局在化効率を計算した。

Ratio of membrane bound mRNA to Cytosolic mRNA

$$= 2^{-(Cp(membrane-bound)-Cp(Cytosolic))}$$

Real time PCR に用いた primer は以下のとおりである。:

BiP, forward primer (5'-CATCAAGTTCTTGCCGTTCA-3'), reverse primer (5'-TTCAGGAGCAAATGTCTTTGTTT-3');

β-actin, forward primer (5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'), reverse primer (5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'); and

exogenous XBP1u, forward primer (5'-GTTCCCTTACCAGCCTCCCTT-3'), reverse primer (5'-ATCCCGTGAACAGCTCCTCG-3').

3. 結果

XBP1u は核と小胞体に特異的に局在化する

先行研究において、XBP1u、及び *XBP1u* mRNA が生体膜に結合することが明らかとなっているが、細胞内の局在については言及されていない(Yanagitani, et al, 2009; Yanagitani, et al, 2011)。そこで、サル腎臓由来 COS-7 細胞に一過的にスプライシングを受けない変異を入れた 3xHA-XBP1u[non-splicing]を発現させ、免疫染色法によって XBP1u の細胞内局在の解析を行った。その結果、細胞質と核に XBP1u のシグナルが確認された(Fig. 1A)。XBP1u は N 末端側の領域に核局在化シグナル(NLS)を持っており、その NLS を働かなくした XBP1u-mNLS 変異体は小胞体への局在化は見られたが、核局在が見られなかった(Fig. 1A 下)。さらに、小胞体マーカータンパク質 Sec61 β と細胞質において XBP1u との共局在が見られた。一方でミトコンドリアマーカータンパク質 COX IV、及びゴルジ体マーカータンパク質 Giantin と XBP1u の共局在は見られなかった(Fig. 1B)。これらの結果から、XBP1u は小胞体と核に局在化すると考えられた。次に、新規合成された XBP1u の局在を解析するために FRAP を用いて解析を行った(Fig. 1C)。XBP1u の N 末端に Venus を付加した Venus-XBP1u[non-splicing]を COS-7 細胞に一過的に発現させ、UV による蛍光退色を行った後、Venus の蛍光回復を追った(Fig. 1C 上)。その結果、退色後 5 分から Venus の蛍光回復が核膜近傍と細胞質に見られ、その染色像は小胞体マーカーとして共発現させた mCherry-Sec61 β の染色像と一致した(Fig. 1C 下)。この蛍光回復はタンパク質翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)の存在下では見られないことから、新規合成された Venus-XBP1u に依るものであると考えられる(Fig. 1C 上の下段)。これらの結果から、新規合成された XBP1u は、先ず小胞体に局在化し、その後 NLS を用いて核内へと局在化すると考えられた。

SRP 経路構成因子は XBP1u-RNC と相互作用する

XBP1u は小胞体へと特異的に輸送されることから、何らかの小胞体への局在化因子の関与が考えられた。先行研究から、XBP1u は自身の翻訳停止配列に依存して生体膜に結合する事(Yanagitani, et al, 2011)、また、これまでの解析によっ

て、Proteinase K でタンパク質を消化したミクロソーム膜には XBP1u は結合できない事(Fig. 2A)が明らかとなっている。以上から XBP1u の小胞体膜結合には小胞体膜上のタンパク質性の因子が必要であると考えられたため、翻訳停止状態の XBP1u 及び XBP1u mRNA が小胞体膜に結合するために必要とされる局在化因子の同定を試みた。ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞に 3xFLAG-8xHis タグを付加した XBP1u(FH-XBP1u[non-splicing])を一過的に発現させ、XBP1u-RNC に結合するタンパク質を FLAG 抗体による免疫沈降法と Ni-NTA を用いた His タグプルダウンによる二段階精製をおこなった。その後、LC/MS/MS によって XBP1u と共沈するタンパク質を同定した(Fig. 2B, Table. 1)。XBP1u の結合タンパク質として、リボソームのサブユニット(40S: 22 タンパク質、60S: 27 タンパク質)、及び結合タンパク質が 49 種類同定されていた。また、その中には翻訳伸長に関わる eEF2 も同定されていた。このことは、翻訳停止状態、もしくは翻訳中の XBP1u が RNC の状態で精製されていることを示している。同定されたタンパク質の中には、分泌タンパク質の小胞体局在化を担う SRP 経路の構成因子の一部(SRP72, Sec61 α , Sec61 β , Sec61 γ)が XBP1u に結合する因子として同定された。SRP72 は SRP のサブユニットであり、Sec61 α , Sec61 β , Sec61 γ は複合体としてトランスロコンのコアとなる孔を形成するタンパク質である。FH-XBP1u を HEK293T に発現させ、Flag 抗体を用いて免疫沈降し、MS で得られた候補タンパク質が XBP1u と相互作用するかをウェスタンブロッティングによって確認した。FLAG 抗体で免疫沈降した時、FH-XBP1u を発現させたときのみ SRP のサブユニットである SRP54、及びトランスロコンのサブユニットである Sec61 α , Sec61 β が検出されたことから、SRP とトランスロコンが XBP1u と結合する事が確認された(Fig. 2C)。中性の環境下で電気泳動した時、翻訳が終了した全長の XBP1u に加えて、翻訳停止状態の XBP1u が Peptidyl-tRNA として検出される。XBP1u の翻訳停止配列は C 末端にあるため、全長の XBP1u のバンドから tRNA の 16kDa ほどシフトアップした位置に翻訳停止状態の XBP1u(XBP1u-tRNA)が検出される(Fig. 2C レーン 2,4)。また、一過的に発現させた Sec61 β -HA、及び内在性 Sec61 β からも抗 HA 抗体(Fig. 2D レーン 9-12)、及び抗 Sec61 β 抗体(Fig. 2E レーン 3-4)を用いて免疫沈降を行い、FH-XBP1u との結合を確認した(Fig. 2D,E)。以上から、XBP1u は SRP、及びトランスロコンと相互作用する事が示された。SRP 経路においてトランスロコンは SRP の下流に位置するため、以上の結果は、XBP1u は SRP によって認識され、小胞体膜上のトランスロコンへと輸送されることを示唆している。

SRP は HR2 を認識して、XBP1u に結合する。

先行研究において、*XBP1u* mRNA の生体膜への局在化には XBP1u の疎水性領域 HR2 が必要であることが明らかとなっている(Yanagitani, et al, 2009)。そこで、野生型と HR2 欠損 XBP1u 変異体(Δ HR2)における *XBP1* mRNA スプライシング効率及び、mRNA 局在化効率を検討した(Fig. 3A,B)。スプライシング効率を検討するために、XBP1u の 3'UTR に内在性と区別するための配列を付加した XBP1u-ps を発現させ、小胞体 Ca^{2+} ポンプ SERCA 阻害剤タプシガルジン(Thapsigargin, Tg)によって小胞体ストレスを誘導し、RT-PCR によってスプライシングを解析した(Fig. 3A)。その結果、60 分の時点で野生型は 41.4% スプライシングされているのに対し、 Δ HR2 変異体は 8.7% のスプライシング効率を示し、HR2 欠損によって小胞体ストレス誘導時におけるスプライシング効率が大きく低下した。次に、mRNA 局在化効率を検討するために、FH-XBP1u とその Δ HR2 変異体を発現させ、ジギトニン分画法によって分画した後、qRT-PCR によって mRNA の局在化効率を測定した(Fig. 3B, C)。低濃度のジギトニンはコレステロールと選択的に結合し、細胞膜に孔を開けるため、低濃度ジギトニン処理によって細胞質と小胞体などの膜画分に分画することができる(Lerner, et al, 2003)。FH-XBP1u とその Δ HR2 変異体を発現させ、ジギトニン分画法によって分画した後、qRT-PCR によって mRNA を測定し、膜画分における細胞質画分に対する mRNA の存在比を局在化効率として計算した(Fig. 3C)。野生型は細胞質に対して、5 倍ほどの局在化効率を示すのに対し、 Δ HR2 変異体は細胞質タンパク質である β -Actin と同程度の mRNA 局在化効率を示した。このことは、 Δ HR2 変異によって、*XBP1u* mRNA は小胞体膜へ局在化できないことを示しており、HR2 が *XBP1u* mRNA の小胞体膜局在化に必要な事がある事がある。次に SRP と HR2 の関係性について調べた。SRP はシグナルペプチドを認識すると、GTP 型となり基質タンパク質及びリボソームとの相互作用が安定化される(Walter and Johnson, 1994; Bacher, et al, 1996; Holtkamp, et al, 2012)。しかし、SRP は翻訳中のリボソーム単独とも相互作用するため、SRP と翻訳停止状態の XBP1u の相互作用が SRP の基質認識によるものか、リボソームとの相互作用によるものかが不明瞭であった(Holtkamp, et al, 2012; Voorhees, et al, 2015)。そこで、 Δ HR2 変異体が SRP と相互作用するのかを調べるためにウサギ網状赤血球抽出液(RRL)を用いた無細胞翻訳系で FH-XBP1u を翻訳し、免疫沈降法によって RRL 中の SRP との相互作用を調べた(Fig. 3D)。XBP1u はほぼ等量合成されており、翻訳停止状態の XBP1u の

バンドは野生型、 Δ HR2 とともに同程度のシグナル強度であることから、翻訳停止は野生型と Δ HR2 で同程度起こっていると考えられる。そこで、SRP54 を検出した結果、 Δ HR2 変異体では相互作用が見られなかった(Fig. 3D レーン 4)。HR2 を N 末端に付加した Firefly luciferase を細胞に発現させた時、糖鎖付加されたバンドが検出される。このことから、HR2 は単独でも SRP によって認識されると考えられる(補足図 1)。このことから、XBP1u と SRP の相互作用はリボソームに依存した SRP は HR2 を認識することで、翻訳停止状態の XBP1u と安定に結合すると考えられる。

SRP は翻訳停止状態の XBP1u を小胞体膜上へと輸送する。

これまでの解析によって、SRP と XBP1u の相互作用は明らかとなったが、SRP が XBP1u を小胞体膜上へと輸送するかについては不明であった。そこで、無細胞翻訳系とイヌ臍臓由来ミクロソーム膜を用いた *in vitro* 再構成系を用いて、XBP1u の小胞体膜への結合は SRP に依存するかを調べた(Fig. 4)。コムギ胚芽抽出液(WGE)を用いた無細胞翻訳系は内在性の SRP の活性がほとんど無いことが報告されている(Walter and Blobel, 1980)。その WGE 中でミクロソーム膜標的化アッセイを行い SRP に依存したミクロソーム膜への結合能を解析した。遊離リボソームと膜結合リボソームを分離するために、密度の差を利用して分画する膜浮揚法を用いてミクロソーム膜画分を分画した(Potter, et al, 2002)(Fig. 4A)。浮揚画分(Floated)において、ミクロソーム膜のタンパク質である Sec61a が検出されており、ミクロソーム膜が含まれている事がわかる(Fig. 4B レーン 2, 3)。その浮揚画分において、SRP に依存して翻訳停止状態の XBP1u が浮揚画分に検出された(Fig. 4B レーン 2, 3)。このことは、翻訳停止状態の XBP1u は SRP に依存してミクロソーム膜に結合することを示している。SRP はシグナルペプチドを認識した後、GTP 結合型となることで、小胞体膜上の SRP レセプターと結合する(Bacher, et al, 1996)。このことをふまえると、この結果は、SRP が翻訳停止状態の XBP1u を基質として認識して小胞体膜上へと輸送することを示している。

SRP 経路は XBP1u mRNA を小胞体膜に輸送する

無細胞翻訳系による再構成系の結果から、SRP が XBP1u を小胞体膜上へと輸送することが分かった。次に、培養細胞内における SRP の XBP1 の活性化への寄与を SRP54 のノックダウンを用いて調べた。SRP のサブユニットの中で SRP54

はシグナルペプチドの認識と SRP レセプターとの結合を担っている(Shao and Hegde, 2011; Akopian, et al, 2013)。ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞において XBP1u-ps 及び FH-XBP1u の安定発現株を樹立し、SRP54 のノックダウンによる SRP の阻害が XBP1u mRNA のスプライシング効率、及び小胞体膜局在化効率に影響を与えるかを検討した(Fig. 5)。SRP54 ノックダウン条件下において、安定発現させた FH-XBP1u、細胞質タンパク質 β -Actin、小胞体シャペロンタンパク質 BiP の mRNA 小胞体局在化効率をジギトニン分画法によって測定した(Fig. 5A)。SRP54 ノックダウン条件下では BiP の mRNA の局在化効率の低下が見られたが、 β -Actin において変化は見られなかった。BiP は SRP 経路の基質タンパク質であるため、SRP54 ノックダウンによって BiP mRNA の小胞体輸送が低下したと考えられる。FH-XBP1u においては、mRNA 局在化効率がコントロールの 40%程度まで低下した。この結果は、培養細胞内においても SRP は XBP1u mRNA の小胞体膜局在化に寄与することを示唆している。さらに、SRP54 ノックダウン条件下において、1mM DTT を用いて小胞体ストレスを誘導し、XBP1u-ps の mRNA スプライシング効率を比較した(Fig. 5B,C)。その結果、1mM DTT で 120 分処理した時点において、コントロールと比べ 10%ほどの XBP1u-ps のスプライズ型の割合の低下が見られ、コントロールとの相対比で表すと約 70%までスプライシング効率の低下した(Fig. 5C)。XBP1 の上流である IRE1 α の存在量、及びリン酸化を指標として IRE1 α の活性化をウェスタンブロッティングによって確認したところ、コントロールと比べて IRE1 α の存在量の増加が見られ、かつ、コントロールと同程度のリン酸化が確認された(Fig. 5B)。これらの結果から、SRP54 ノックダウン条件下における XBP1u mRNA スプライシング効率の低下は XBP1u mRNA の局在化効率の低下によるものと考えられた。In vitro の再構成系で見られた SRP による XBP1u の小胞体膜輸送は、培養細胞内においても XBP1u mRNA の小胞体膜局在化に寄与していることが示された。そして、SRP 経路は XBP1u mRNA の小胞体膜局在化を通して、XBP1 の活性化を促進している事が明らかとなった。

翻訳停止配列は XBP1u が SRP 経路によって認識されるために必要である

XBP1u は翻訳停止配列を持っており、翻訳停止を引き起こすことで RNC として小胞体膜に結合する(Yanagitani, et al, 2011)。しかし、この翻訳停止配列が SRP 経路による XBP1u-RNC の小胞体膜局在化における役割については不明である。

そこで、XBP1u の翻訳停止配列に変異を入れ、SRP 経路の因子との相互作用を確認した。翻訳停止配列は XBP1u の C 末端に位置し、S255 及び W256 をアラニンに置換することで翻訳停止が強化(S255A)、及び弱化(W256A)される(Fig. 6A)。FH-XBP1u の S255A 及び、W256A 変異体を用いて、免疫沈降を行った(Fig. 6B)。興味深いことに S255A 変異体においては、SRP 経路の構成因子である SRP(SRP54, SRP72)、トランスロコン(Sec61 α , Sec61 β)と野生型よりも強く結合していた(Fig. 6B レーン 7)。その一方で、W256A 変異体においては、これらの因子との安定な結合は見られなかった(Fig. 6B レーン 8)。次に、S255A 変異体、及び W256A 変異体の細胞内局在、及び mRNA n 局在化効率を比較した(Fig. 6C, D)。野生型及び S255A 変異体は小胞体局在を示したのに対し、W256A 変異体は小胞体局在を示さず、強い核局在を示した(Fig. 6C)。mRNA の局在化効率においては、野生型よりも高い局在化効率を S255A 変異体は示したのに対し、W256A 変異体は野生型の 40%程度まで低下した。以上の結果で見られた XBP1u mRNA の局在化効率、SRP 経路の因子との結合は翻訳停止の強度と相関的である。このことから、翻訳停止の強度が SRP 経路との安定な結合に必要であり、それによって、XBP1u-RNC の小胞体膜局在化を可能にしていると考えられる。

SRP による XBP1u の輸送は従来の SRP 経路と異なる特徴をもつ

SRP 経路の基質となるタンパク質は小胞体膜を透過し、小胞体内腔を遊離するタンパク質や小胞体膜を貫通するタンパク質である。しかし、XBP1u は XBP1s を負に制御し、小胞体ストレス状態から定常状態への移行を促進することが報告されており(Yoshida, et al, 2006)、その際に、XBP1u は核内へと移行するため、XBP1u は細胞質を遊離するタンパク質であると考えられる。SRP 経路では SRP だけでなく、トランスロコンもシグナルペプチドを認識し、小胞体膜を透過するタンパク質を選別することが報告されている(Jungnickel, et al, 1992; Kim, et al, 2002)。よって、XBP1u は SRP によって HR2 が認識され、小胞体膜上へと輸送されるが、トランスロコンによる認識を通過しない可能性が考えられた。そこで、XBP1u の HR2 と、従来の SRP 経路の基質であるカルネキシン(CNX)のシグナルペプチドと膜貫通ドメインを Helical-Wheel plot (HeliQuest: Gautier, et al, 2008)によって α ヘリックス上のアミノ酸配置を解析した(Fig. 7A)。その結果、XBP1u の HR2 はカルネキシンのシグナルペプチドと異なり、疎水性度に偏りのある両親媒性のヘリックスを形成すると予測された(Fig. 7A)。次に、細胞内で

XBP1u が膜透過した膜貫通タンパク質でないことを確認するために、XBP1u と小胞体膜の結合状態を解析した(Fig. 7B)。小胞体膜上のタンパク質は EDTA と高塩濃度(500mM KOAc)のバッファーで処理すると小胞体膜に付着しているタンパク質は抽出され、膜タンパク質と内腔タンパク質は膜画分に残るため、タンパク質の膜への結合状態を解析できる。細胞質タンパク質である GAPDH は一部が膜に結合するが、EDTA+KOAc 処理で膜画分から抽出された。一方で、膜タンパク質であるカルネキシン(CNX)は抽出されなかった。この時、XBP1u においては、全長の XBP1u は上清に見られ、翻訳停止状態の XBP1u-tRNA は膜画分に見られた。しかし、膜画分に見られた XBP1u は EDTA+KOAc 処理によって、GAPDH と同様に抽出されたため、XBP1u は膜表面に付着した状態であると考えられる(Fig. 7B レーン 3,4)。XBP1u が SRP によって輸送されながらも小胞体膜を膜透過しない理由として、HR2 の両親媒性が一つの原因だと考え、XBP1u の HR2 の親水性面に位置するアミノ酸をロイシンに置換した 3L 変異体を作成した(Fig. 7A)。この 3L 変異体は Calnexin のシグナルペプチドと同様に疎水性の偏りを持たない(Fig. 7A)。次に、この変異体の膜への結合状態を炭酸ナトリウム処理によって解析した(Fig. 7C)。炭酸ナトリウム溶液は pH11 のアルカリ性を示し、このアルカリ性のバッファーでマイクロソームを処理すると、膜の構造を維持するタンパク質が変性することでマイクロソーム膜が壊れる。これによって、内腔タンパク質と膜結合タンパク質は抽出されるが、膜貫通タンパク質は抽出されないため、膜貫通タンパク質のみを精製できる(Fujiki, et al, 1982)。この方法を用いて、XBP1u の膜透過を解析したところ、野生型の HR2 を持つ FH-XBP1u はほとんどが抽出されたのに対し、3L 変異体は抽出されずに膜画分に残った(Fig. 7C レーン 2-3、及び 5-6)。このことから、3L 変異体はトランスロコンによる膜透過をうけ、膜貫通タンパク質となっていると考えられる。よって、XBP1u は SRP によって小胞体膜上のトランスロコンへと輸送されるが、HR2 の両親媒性によってトランスロコンによる膜透過を受けない事が示唆された。

翻訳停止配列は疎水性度に依らず HR2 の認識に必要である

以上の結果より、HR2 は従来の SRP 経路によって認識される疎水性ドメインと異なることが分かった。このことから、HR2 が低い疎水性度、もしくは両親媒性のヘリックスであるためにトランスロコンによる認識だけでなく、SRP による認識も不十分である可能性が考えられた。SRP はシグナルペプチドを認識

すると翻訳の遅延を引き起こすことで RNC の状態を維持し、小胞体膜上のトランスロコンへと輸送する。しかし、認識が不十分である場合、SRP による翻訳の遅延が弱く、RNC の状態で小胞体膜上に輸送できない可能性がある。そこで、翻訳停止配列が RNC を維持し、SRP による HR2 の認識を促進することで小胞体膜上への局在化を可能にしている、という可能性の検討を行った。まず、野生型と 3L 変異体の SRP との相互作用を免疫沈降法によって確認したところ、顕著な変化は見られなかった(Fig. 8A)。しかし、W256A 変異と HR2 上の 3L 変異を組み合わせた WA-3L 変異体を作成し、細胞内局在を免疫染色によって確認したところ、3L 変異体では翻訳停止の起こらない W256A 変異が入っているにも関わらず小胞体局在を示した(Fig. 8B)。このことから、翻訳停止の起こらない条件(W256A 変異体)でも 3L 変異によって SRP 経路を介した小胞体局在化が可能になると考え、WA-3L 変異体における SRP 経路の構成因子との相互作用、及び、*XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化効率、スプライシング効率を検討した(Fig. 8C, D, E)。培養細胞に FH-*XBPlu* とその変異体を発現させ、免疫沈降を行ったところ、野生型と 3L 変異体は SRP 及びトランスロコンと同等の結合を示したが、W256A 変異体と W256A-3L 変異体は SRP とトランスロコンとの結合を示さなかった(Fig. 8C レーン 6-10)。また、mRNA の小胞体膜局在化効率、及びスプライシング効率においては、翻訳停止の起こる条件下では、野生型と比べて 3L 変異体は優位な効率の上昇を示したが、翻訳停止の起こらない W256A 変異の入った条件では W256A 変異体と W256A-3L 変異体で優位な差は見られなかった(Fig. 8D, E)。このことから、W256A-3L 変異体は翻訳後型膜透過機構によって小胞体に局在化する事が示唆されたため、無細胞翻訳系を用いた翻訳後膜透過アッセイを行った。その結果、W256A 変異体と比べ、W256A-3L 変異体は効率よく膜への結合が見られたことから、W256A-3L 変異体は翻訳後型膜透過機構によって小胞体膜に局在化することが判った(Fig. 8F)。これら結果は、3L 変異では W256A 変異体で見られる *XBPlu* mRNA の局在化効率の低下をレスキュー出来ないことを示している。以上をまとめると、まず SRP との相互作用解析から SRP による認識においては十分な疎水性度であることが示唆された。つぎに、SRP 経路による *XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化において、SRP が HR2 を認識するためには HR2 の疎水性度よりも翻訳停止が重要な因子であると考えられた。従来知られている SRP 経路では、SRP によるシグナルペプチドの認識の後に翻訳の遅延が起こることが効率的な小胞体局在化に必要なものである(Wolin, et al, 1989; Lakkaraju, et al,

2008)。一方で、*XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化においては、*XBPlu* がもつ翻訳停止配列による新生ペプチドの自発的な翻訳停止が SRP による翻訳遅延よりも重要であることをこれらのデータは示唆している。

HR2 と翻訳停止配列の位置関係が効率的な mRNA 小胞体膜局在化を可能にする

SRP 経路による *XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化における翻訳停止配列の重要性が示唆されたが、*XBPlu* 自身の翻訳停止配列がなぜ必要かについては不明瞭である。考えられる可能性として、翻訳停止が起こることで RNC の状態を維持している事が考えられる。通常の SRP 経路の基質は N 末端にシグナルペプチドが位置しており、更に C 末端への翻訳領域が続いている。しかし、*XBPlu* は HR2 の C 末端側には 53aa しかなく、リボソームトンネルの長さが 40aa であるため、リボソームの翻訳速度(3-4aa/sec)から考えるとすぐに翻訳が終了し、RNC が解離すると考えられる(Kowarik, et al, 2002; Braakman, et al, 1991; Yanagitani, et al, 2009)。そこで、*XBPlu* の C 末端を伸ばすことで翻訳停止への依存性が低下すると考え、*XBPls* の C 末端 100aa を付加したコンストラクト *XBPlu+s* を作成し、さらに W256A 変異を導入することで *XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化における翻訳停止の必要性を解析した(Fig. 9A, B)。その結果、翻訳停止配列が野生型の *XBPlu* と *XBPlu+s* においては優位な差は見られず、共に mRNA の小胞体膜局在化を示した。一方で、W256A 変異を導入した変異体では、*XBPlu+s* 変異体で W256A 変異による *XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化効率の低下をレスキューすることはできなかった(Fig. 9B)。この結果から、RNC を維持するのは十分条件でなく、翻訳停止が HR2 の下流で起こることが重要であると考えた。そこで、HR2 と翻訳停止配列の位置関係に注目した。HR2 と翻訳停止配列の間の距離を伸ばすために *XBPls* の C 末端領域を HR2 の下流に挿入した *XBPluins* を作成した(Fig. 9A)。この変異体で *XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化効率を測定したところ、*XBPluins* において、*XBPlu* 及び *XBPlu+s* と比べて局在化効率の低下が見られた(Fig. 9C)。また、SRP 経路の構成因子との結合を免疫沈降によって確認したところ、*XBPluins* は SRP 及びトランスロコンとの結合が弱い事が分かった(Fig. 9D)。SRP 経路の一部の基質では、シグナルペプチドの下流にレアコドンのクラスターによる翻訳速度の低下を引き起こす領域があるという報告(Pechmann, et al, 2014)もある。これらのエビデンスから、SRP 経路による *XBPlu* mRNA の小

胞体膜への局在化において、HR2 と翻訳停止配列の位置関係が重要であることが示唆された。

4. 考察

***XBPlu* mRNA は SRP 経路を介して小胞体膜上のトランスロコンへと輸送される**

哺乳動物細胞では、小胞体ストレスシグナルは小胞体膜上の IRE1 α から *XBPlu* mRNA の細胞質スプライシングを介して XBP1 へと伝えられ、小胞体から核へと伝達される。HeLa 細胞内のタンパク質存在量を網羅的に調べた報告によると細胞内の IRE1 α は存在量が少なく (Kulak, et al, 2014)、*XBPlu* mRNA と IRE1 α の接触率を上げる何らかの戦略が効率的な *XBPlu* mRNA のスプライシングを実現していると考えられる。

今回の解析によって、XBP1u は翻訳停止に依存して小胞体膜上へと特異的に局在化する事が観察された (Fig. 1A, 1B, 6C)。また、新規合成された XBP1u は小胞体パターンを示した (Fig. 1C)。このことは、XBP1u は細胞質において翻訳停止に依存して小胞体に特異的に局在することを示している。また、*XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化効率は翻訳停止の強度に依存していた (Fig. 6D)。このことから、*XBPlu* mRNA は RNC の状態で小胞体膜上へと輸送されていると考えられる。

XBP1u-RNC の小胞体局在化因子の同定を目標に解析を行った結果、SRP 経路の構成因子である SRP とトランスロコンのサブユニットが翻訳停止状態の XBP1u に結合するタンパク質性因子として同定された (Fig. 2B, 2C, 6B)。このことから、XBP1u-RNC が SRP 経路を介して、トランスロコンまで輸送されることが示唆され、SRP と XBP1u の関係に着目して解析を行った所、SRP は HR2 に依存して XBP1u に結合すること (Fig. 3C)、SRP が小胞体膜上へと輸送することで XBP1u-RNC が小胞体膜と結合すること (Fig. 4B) が明らかとなった。これらのデータから、SRP は翻訳停止状態の XBP1u がもつ HR2 を認識して結合し、SRP 経路を介して小胞体膜上のトランスロコンへと XBP1u-RNC を輸送すると考えられる。近年の他の研究グループから IRE1 α とトランスロコンが結合すること (Plumb, et al, 2015)、また、IRE1 α は tRNA リガーゼである RtcB と結合すること (Lu, et al, 2014) が報告されており、トランスロコンが IRE1 α による細胞質スプライシングの中心であることが示唆されている。このことから、今回明らかになった SRP 経路による *XBPlu* mRNA の小胞体膜輸送は、*XBPlu* mRNA のスプライシング効率化を担う分子機構であると考えられる。実際に SRP54 ノックダウ

ン条件下において、安定発現させた *XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化効率、及びスプライシング効率が低下するというデータはこのことを支持している(Fig. 5)。

また、SRP 経路の構成因子である SRP54 は *XBPls* に依存して誘導される事が報告されており(Adachi, et al, 2008)、ポジティブフィードバックを形成することで小胞体ストレスに対する迅速な応答や小胞体のタンパク質合成における許容量の増加を可能にしているのかもしれない。

翻訳停止配列は SRP 経路を介した *XBPlu* mRNA の局在化に必要である

古くから知られる SRP 経路では、N 末端のシグナルペプチドを認識した後、SRP による翻訳伸長の遅延によって RNC が維持され、翻訳中の状態で基質タンパク質はトランスロコンへと輸送される(Walin and Walter, 1989; Lakkaraju, et al, 2008)。この従来の SRP 経路に関する知見から、*XBPlu* の HR2 は両親媒性の α ヘリックスを形成することから、SRP による認識が弱いために翻訳遅延が弱いと考えられた。しかし、HR2 が十分な疎水性度を持っていたとしても翻訳停止は依然として mRNA の局在化に必要であり(Fig. 8D)、また、C 末端を伸ばした *XBPlu+s* 変異体においても翻訳停止は効率的な *XBPlu* mRNA の局在化に必要であった(Fig. 9B)。これらのことは、*XBPlu* mRNA の小胞体膜局在化において、SRP の翻訳遅延による貢献度は低く、翻訳停止配列による翻訳停止が重要であることを示唆している。また、HR2 と翻訳停止配列の間を伸ばした *XBPluins* 変異体では mRNA の局在化効率の低下が見られ(Fig. 9C)、さらに、*XBPlu* とトランスロコン及び SRP の結合が弱くなった(Fig. 9D)。リボソームのペプチド伸長における活性中心(PTC)からリボソーム外部に繋がるトンネルの長さは 40aa 程度だと言われている(Kowarik, et al, 2002)。一方、*XBPlu* の HR2(186~208)から翻訳停止配列(238~261aa)における停止部位までの長さは 52aa ほどである(Unpublished data)(Fig. 9E)。実験的に、翻訳停止状態の *XBPlu* は HR2 を露出した状態で停止していることが示されており(Yanagitani, et al, 2011)、リボソームトンネルの出口付近に HR2 が位置した状態であると予想される。また、SRP はリボソームトンネルの出口でシグナルペプチドを認識すること(Halic, et al, 2004)から、本来の HR2 と翻訳停止配列の位置関係でなら SRP は HR2 を認識できると考えられる(Fig. 9F)。しかし、*XBPluins* 変異体の場合には、HR2 と翻訳停止配列の間が 100aa ほど延長されているために HR2 がリボソームから離れてしまい、SRP は HR2 を認識できないため、*XBPlu* mRNA の局在化効率が *XBPluins*

変異体では低下したと考えられる(Fig. 9C, 9D)。このことから、XBP1u が SRP によって認識されるためには HR2 の下流の適切な位置で翻訳停止が起こることが重要であることが考えられる。

他のグループの解析によって、SRP が結合しない RNC と SRP が結合する RNC を精製し、それぞれに濃縮された mRNA をリボソームプロファイリングによって解析した報告によると、SRP が強く結合する RNC はシグナルペプチドや膜貫通ドメインの 35~40aa 下流にレアコドンのクラスターが存在する mRNA が多く含まれる事が明らかとなっている(Pechmann, et al, 2014)。リボソームプロファイリングは mRNA 上でリボソームがどの位置に居るかを解析することができる。その結果によると、レアコドンクラスターの位置でリボソームが停滞することがわかっており、このことは適切な位置における翻訳速度の低下が SRP によるシグナルペプチドの認識を促進する事を示唆している。また、膜貫通ドメインを C 末端側に持つタンパク質において、未処理では翻訳後型の膜透過機構によって膜透過するが、シクロヘキシミド処理によって翻訳速度を低下させた場合に、一部のタンパク質は翻訳共役型の膜透過機構に変化する事が報告されている(Jan, et al, 2014)。このことは、C 末端領域に膜貫通ドメインをもつタンパク質においても翻訳速度の低下が SRP による膜貫通ドメインの認識を可能にするという可能性を支持している。

Nascent chain associate complex (NAC)と呼ばれるシャペロンタンパク質複合体はリボソーム上で新生ペプチド鎖に結合し、SRP と協働で働くことが報告されている(Zhang, et al, 2012)。NAC はシグナルペプチドがリボソームから出てきた時、NAC-RNC-SRP の三者複合体を形成するが、細胞質タンパク質の場合は SRP が離れ、NAC-RNC の二者複合体となる。そのため、中間に膜貫通ドメインがあるタンパク質の場合は SRP が再び結合しなければならない。そこで、翻訳停止がシグナルとして働き、再び SRP をリクルートすることで、中間に膜貫通ドメインを持つタンパク質においても、SRP 経路を通して膜透過している可能性が考えられる。これは、翻訳停止配列の生理的な役割を明らかにする上で重要な発見であり、今後の解析によって翻訳停止による mRNA 及びタンパク質の標的化機構の解明に繋がると考えられる。

以上から、XBP1u mRNA の小胞体膜局在化において翻訳停止配列が必要な理由として、HR2 の下流が短いために SRP と接触するチャンスが少ないという理由だけではなく、HR2 の下流 40~50aa で適切な位置関係で翻訳停止を引き起こ

すことで SRP による HR2 の認識を可能にするためであると考えられる。

HR2 は XBP1u の小胞体と核への局在化に寄与する

XBP1u がタンパク質の膜透過に関わる SRP 経路を利用するというモデルは小胞体膜上へと *XBP1u* mRNA を特異的に局在化させるとしては十分に考えられるモデルである。しかし、XBP1u が核内へと移行し、XBP1s や ATF6 の負の制御因子として機能するという機能を両立するためには XBP1u はトランスロコンによる膜透過を受けないという条件が必要である(Yoshida, et al, 2006)。Hegde らと Rapoport ら報告によると、SRP 経路には SRP によるシグナルペプチドの認識に加えて、トランスロコンによるシグナルペプチドの認識を行うという二重の認識機構が存在することを報告している(Jungnickel et al, 1995; Kim, et al, 2002)。これらの報告の中で、SRP はトランスロコンよりも幅広い疎水性度の α ヘリックスを認識することが示されており、SRP によって認識されながらもトランスロコンによる膜透過を受けない可能性を示唆している。XBP1u の HR2 は両親媒性のヘリックスを形成しており、その特徴によって、XBP1u の膜透過効率が低いことが示唆されている (Fig. 7A, C)。このことから、XBP1u は SRP 経路で輸送されながらもトランスロコンによる膜透過を受けにくいタンパク質であり、翻訳停止時には SRP 経路を介して *XBP1u* mRNA の小胞体膜局在化に寄与し、そして、翻訳終了後は核内へと移行し、転写因子の負の制御因子として機能する可能性が考えられる。

この SRP 経路による転写因子の調節機構は大腸菌においても報告されている(Lim, et al, 2013)。 $\sigma 32$ と呼ばれる大腸菌の転写制御因子は熱ストレスに対して応答し、シャペロン遺伝子の転写を誘導する。一方で、非ストレス時には、 $\sigma 32$ は SRP 経路によって細胞内膜へと輸送され、内膜上に局在するプロテアーゼによって分解されることで抑制されている。大腸菌では SRP 経路は $\sigma 32$ の負の制御機構として機能しており、哺乳動物細胞では SRP 経路は XBP1 の正の制御因子として機能する事が示唆されている。この SRP 経路によるストレス応答制御は、様式は違えども大腸菌から保存される制御機構であるといえる。面白いことに、この機構が XBP1 と類似する点として、 $\sigma 32$ 上の SRP によって認識される領域が XBP1u の HR2 と同様に、中程度の疎水性度を持ち、かつ疎水性度の偏りを持つ α ヘリックスであると予測されている点である(Miyazaki, et al, 2016)。また、SRP によって認識される領域を持ちながらも細胞質に遊離する点におい

ても、 $\sigma 32$ と **XBP1u** は類似している。このことは、SRP によって基質として認識される細胞質タンパク質の存在が大腸菌から哺乳動物まで保存されており、**XBP1u** 以外にもそのようなタンパク質が普遍的に存在する可能性を示唆している。

SRP 経路と小胞体恒常性維持機構の関係

SRP はタンパク質合成に関わるだけでなく、小胞体の恒常性維持においても寄与している。SRP の欠損は BiP と呼ばれる小胞体シャペロンタンパク質を始めとするシグナルペプチドを持つ一部のタンパク質の mRNA の分解を誘導することが報告されている(Karamyshev, et al, 2014)。これは、SRP 経路が不足したときに過剰な mRNA の分解を行うことで、細胞質におけるシグナルペプチドを持つタンパク質の蓄積を抑制する仕組みである。また、小胞体ストレス条件下において SRP 経路を通して輸送されるタンパク質を膜透過する直前にトランスロコン上で分解することで小胞体へのタンパク質流入を減らす機構(pre-emptive quality control, pre-QC)の存在が報告されている(Kadowaki, et al, 2015)。さらに、今回の成果によって、SRP 経路は転写因子 XBP1 の活性化を促進することが明らかとなった。このように、SRP 経路は小胞体の品質管理機構の一部として機能しており、今後の解析によって、小胞体ストレス条件下の SRP 経路の調節機構を解析することで、SRP 経路と共役したタンパク質品質管理機構による小胞体の許容量増加におけるメカニズムが明らかになることが期待される。

更なる **XBP1u** mRNA と **IRE1 α** を接近させる分子機構の存在

XBP1u mRNA の終着点と考えられるトランスロコンと **IRE1 α** の存在比から、更なる分子機構が必要である可能性がある。HeLa 細胞内のタンパク質の存在量(Copy Number)を網羅的に調査した報告によると **IRE1 α** は 416 分子に対し、トランスロコンのコアである **Sec61 α 1** は 88211 分子であり、**IRE1 α** は圧倒的に少ない(Kulak, et al, 2014)。このことから、もし **IRE1 α** が全てトランスロコンと結合していたとしても、**XBP1u** mRNA がトランスロコンに輸送されたときに **IRE1 α** と出会う確率は低いものであると予想される。よって、出芽酵母の **HAC1** mRNA と **Ire1p** に見られる両者の直接の相互作用と比べると非効率的な戦略であり、小胞体膜上で **XBP1u**-RNC を **IRE1 α** へと近づける更なる何らかの戦略があると考えられる。

その候補として、XBP1u の相互作用因子として RACK1 が同定されている (Table.1)。RACK1 はリボソームの 40S サブユニットに結合するタンパク質で、WD40 リピートを持ち、PKC の足場タンパク質として機能するタンパク質である (Ceci, et al, 2003)。また、出芽酵母を用いた解析によって、RACK1 はポリアルギニン配列による翻訳停止を引き起こすために必要な因子であり、かつ、翻訳を介した mRNA の品質管理機構に必要な因子であることが報告されている (Kuroha, et al, 2010; Ikeuchi, et al, 2016)。また、IRE1 α と RACK1 が小胞体ストレスに応じて結合する事が報告されている (Qiu, et al, 2010)。これらの事から、翻訳停止状態の XBP1u-RNC に RACK1 が結合しており、更に小胞体ストレス条件下において IRE1 α が RACK1 と結合する。それによって、小胞体膜状に局在化した後、XBP1u mRNA を IRE1 α へとリクルートし、効率的な XBP1u mRNA のスプライシングを可能にしているという可能性が考えられる。

結論

本研究の結論として、Fig. 10 に示したモデルを提唱したい。

XBP1u mRNA の小胞体膜局在化において、通常の SRP 経路とは異なり、新生ペプチド鎖の持つ翻訳停止配列に依存して SRP が HR2 を認識する。これによって、XBP1u mRNA は RNC の状態で小胞体膜上のトランスロコンへと局在化する。小胞体ストレス時には IRE1 α によるスプライシングを迅速にうけることで、素早く XBP1s となって小胞体の恒常性維持に関わる遺伝子群の転写を誘導する。これによって、小胞体ストレスを緩和に導いている。一方、非ストレス条件下では、XBP1u はトランスロコンによる膜透過を受けにくいため、核内へと遊離タンパク質として移行し、XBP1s を負に制御することでストレス応答状態の解除に働くと考えられる。

本研究では、翻訳停止の共役による従来とは異なる SRP 経路のタンパク質輸送様式を明らかにし、それによる XBP1u mRNA の小胞体膜上へのリクルート機構を明らかにした。

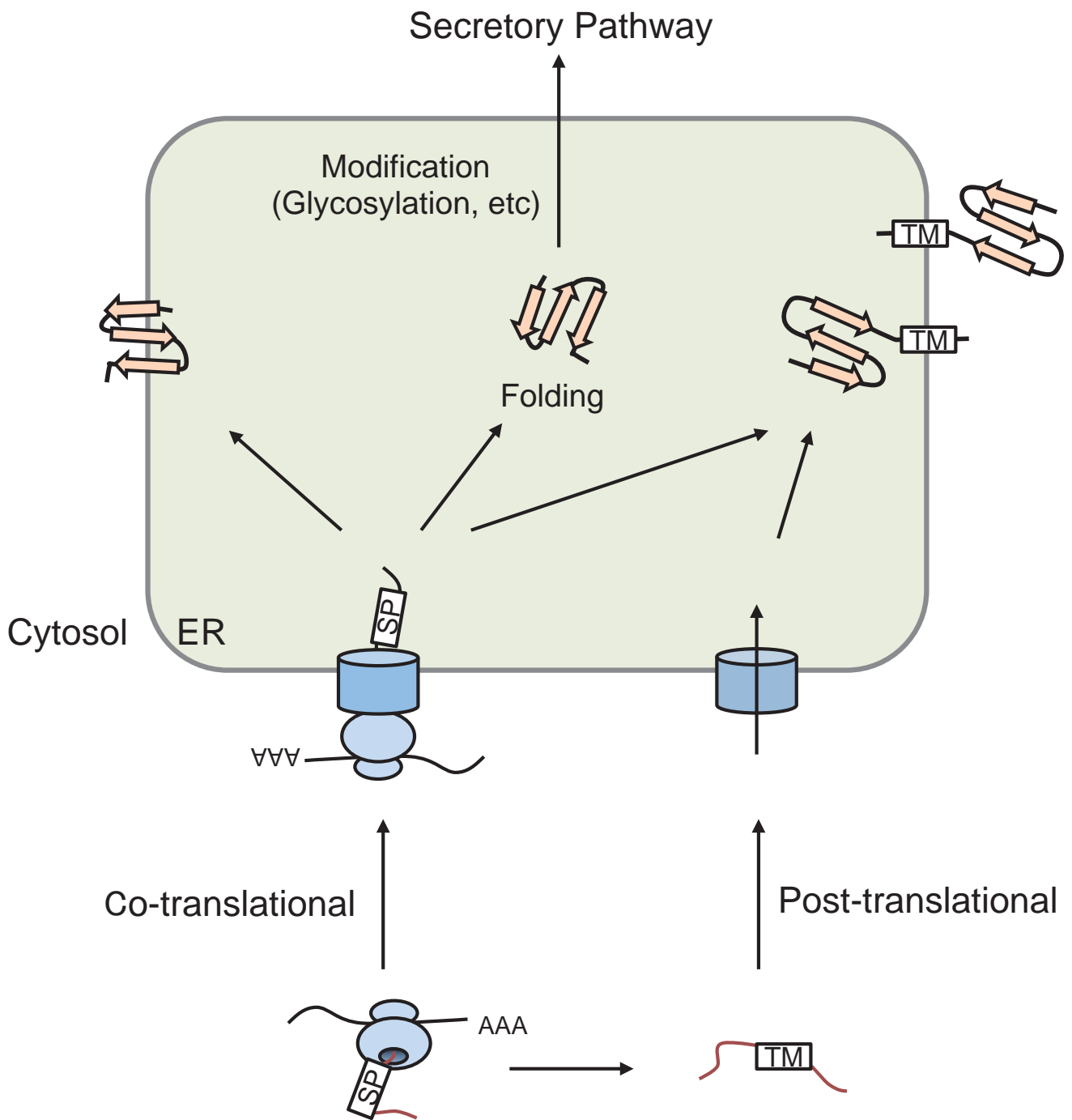


Fig. intro 1. 小胞体におけるタンパク質合成

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の合成を担う細胞内小器官であり、小胞体内でタンパク質のフォールディングを行い、目的の場へと輸送する。タンパク質は翻訳共役型 (Co-translational)、もしくは翻訳後型 (Post-translational) の膜透過機構によって、細胞質から小胞体内へと輸送される。これによって、タンパク質は内腔に遊離したり、小胞体膜に組み込まれる。SP:シグナルペプチド、TM:膜貫通ドメイン

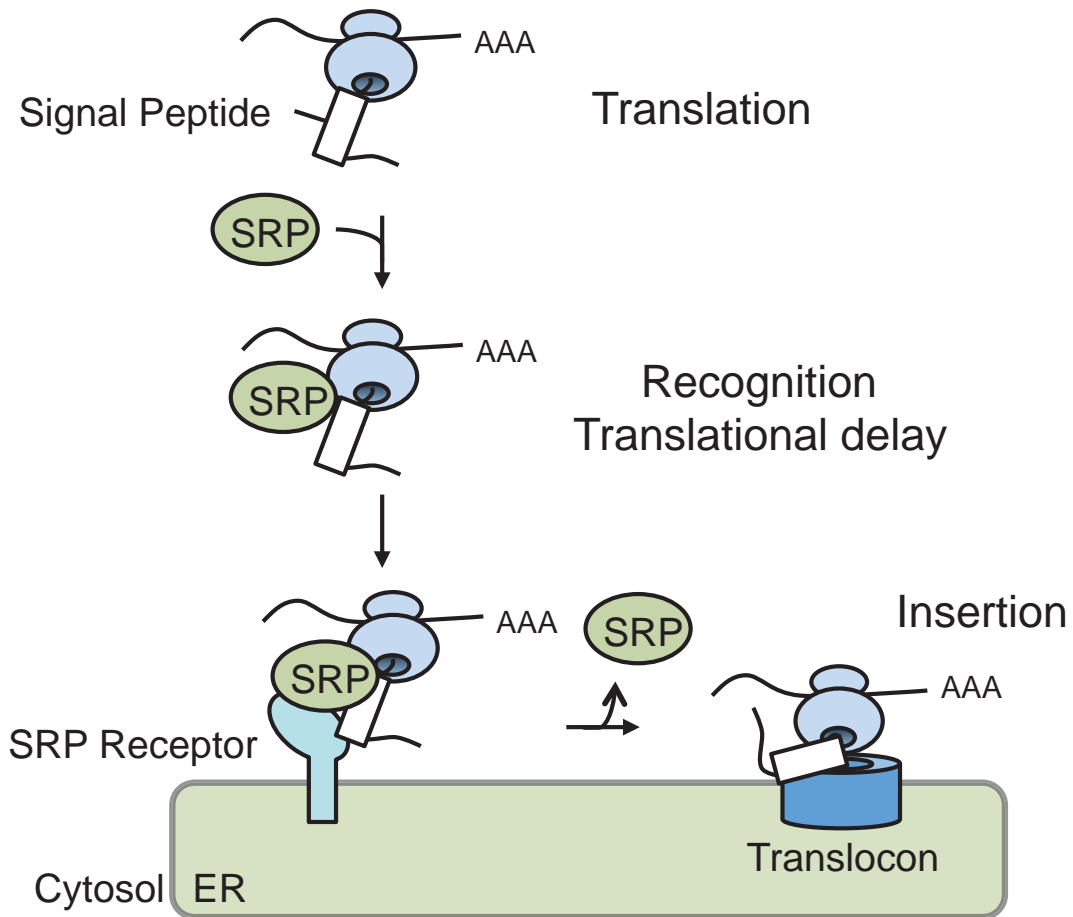
A

Fig. intro 2. SRP経路の模式図とSRPの構造

(A) SRP経路の模式図。SRP経路の基質タンパク質はN末端にシグナルペプチドを持っている。このシグナルペプチドがリボソームから出てきた時に、SRPがリボソーム上でシグナルペプチドを認識する。SRPは基質タンパク質と強く結合した後、翻訳伸長を阻害することで翻訳中の状態を維持する。SRPは小胞体膜上にSRP受容体と結合し、トランスロコンへと基質タンパク質を受け渡す。そして、トランスロコンが基質タンパク質を小胞体内腔へと膜透過する。

B

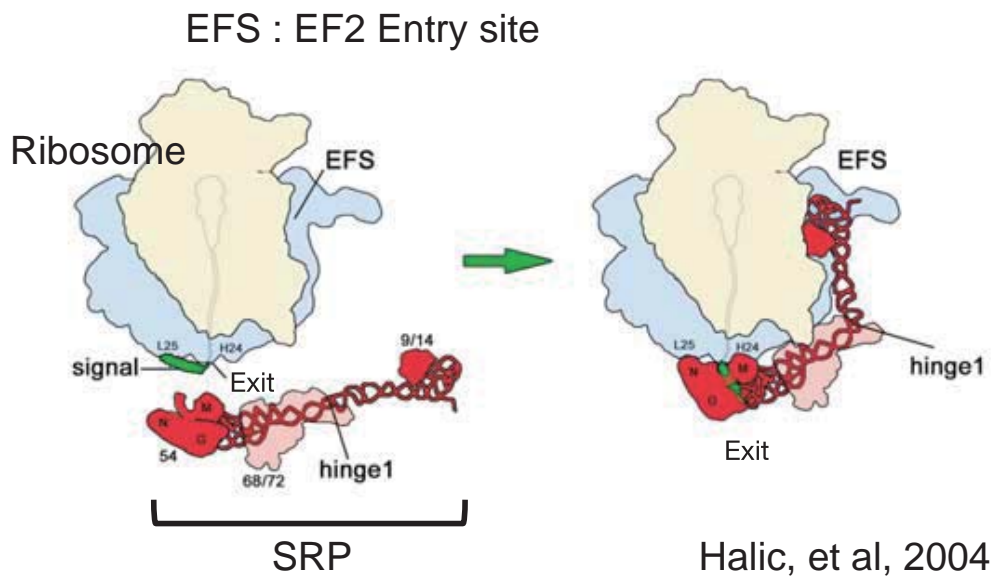
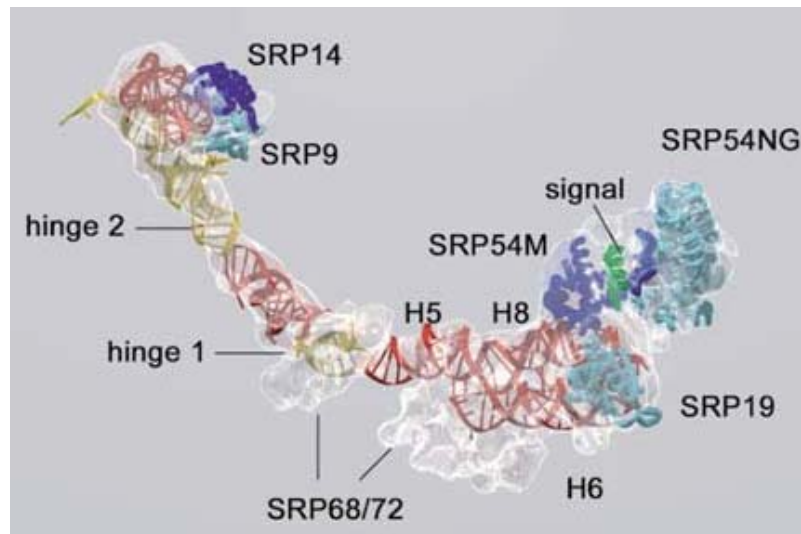


Fig. intro 2. SRP経路の模式図とSRPの構造

(B) SRPの構造を上図に示す。SRPは7S RNAとタンパク質の複合体であり、その内、SRP54は基質認識サブユニットとして機能する。SRP54はリボソームトンネルの出口付近のリボソームタンパク質と相互作用を形成し、リボソームトンネルの出口付近でシグナルペプチドを認識する。これによって、SRPとリボソームの構造が変化し、SRP9/14複合体が翻訳伸長因子であるEF2を競合阻害することで翻訳伸長を阻害する。

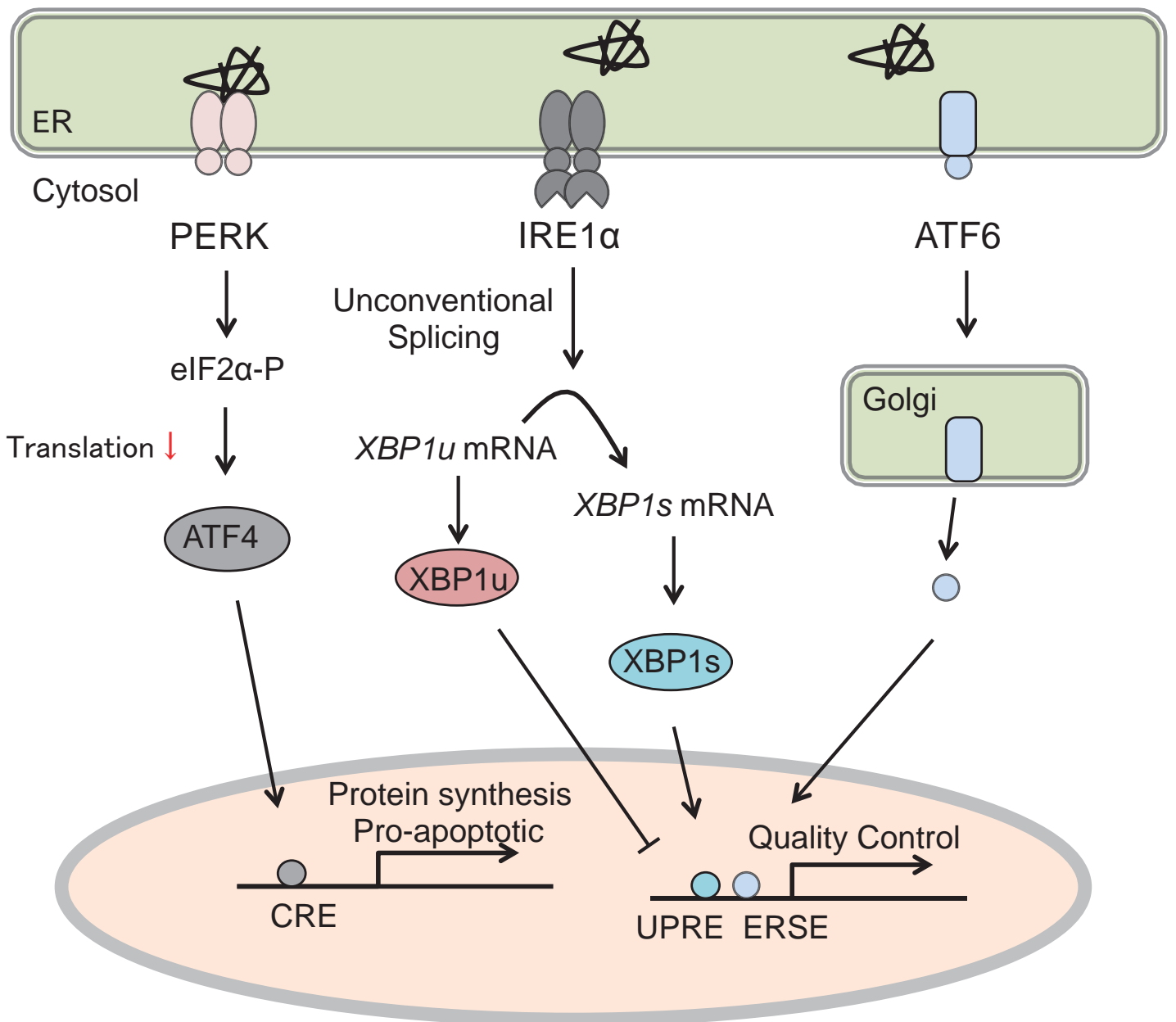


Fig. intro 3. 小胞体ストレス応答

小胞体ストレス応答のシグナル伝達経路を示した。PERK、ATF6、IRE1αは小胞体ストレスセンサーである。PERKはeIF2αのリン酸化を行うことで、タンパク質合成を抑制する。同時に、ATF4の翻訳を可能にし、遺伝子発現を制御する。ATF4の下流にはCHOPが制御されており、アポトーシスの制御に関わっている。ATF6は、ゴルジ体に輸送されて活性化する。ATF6の細胞質ドメインはERSEと呼ばれる配列に結合し、品質管理機構に関わる遺伝子の転写を制御する。IRE1αは細胞質で行われるスプライシング反応を介して、XBP1を活性化する。XBP1sはホモ二量体だけでなく、ATF6とのヘテロ二量体を形成し、UPRE、ERSEと結合することで品質管理機構の遺伝子を制御する。一方で、XBP1uはXBP1sやATF6を負に制御する。

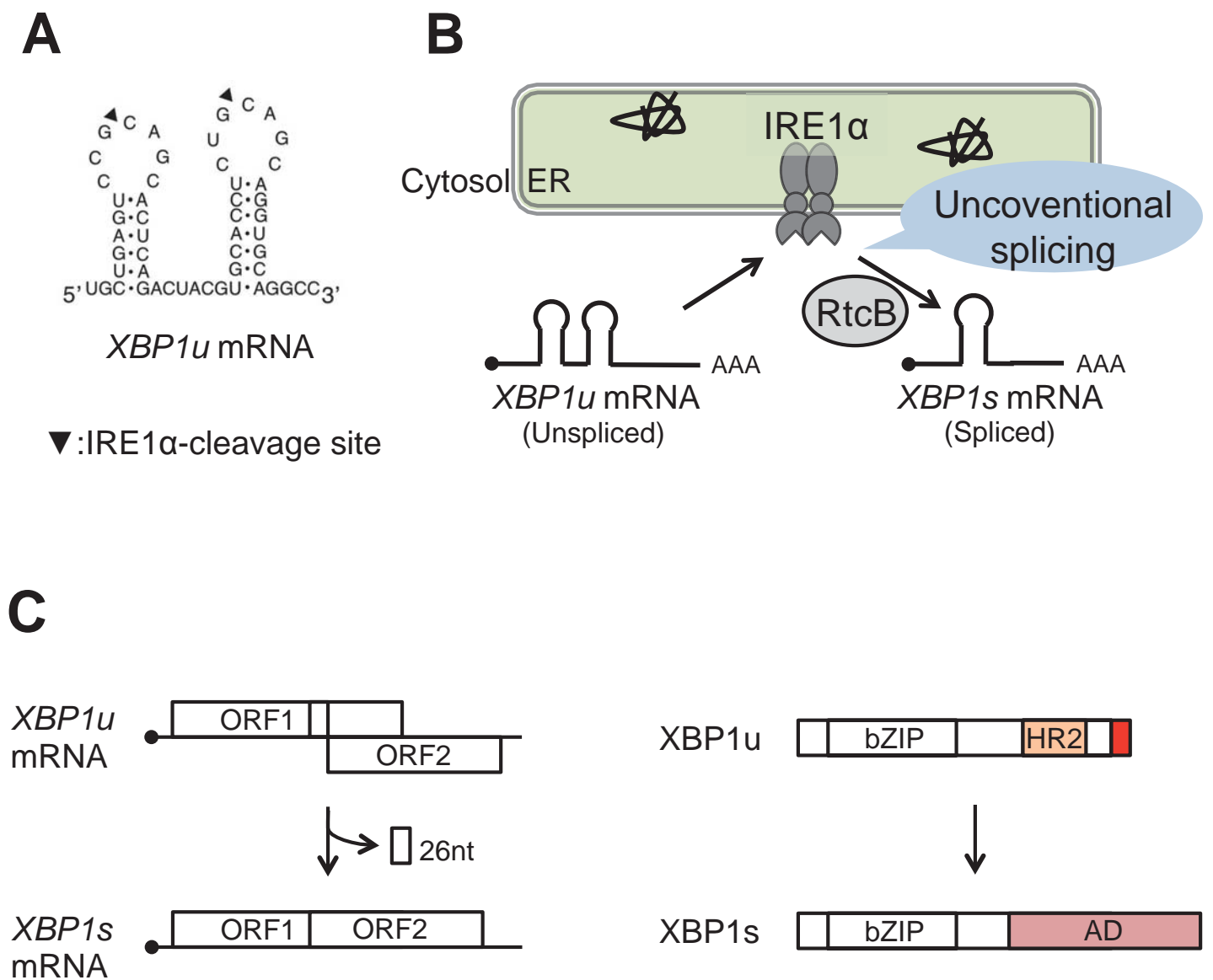


Fig. intro 4. *XBP1u* mRNAのスプライシング機構

(A) *XBP1u* mRNA上のステムループ。IRE1αの切断部位を示した。

(B) スプライシング反応はIRE1αによる切断によって開始され、tRNAリガーゼRtcBによってライゲーションされる。

(C) *XBP1u* mRNAは細胞質スプライシングを介して26塩基脱落した*XBP1s* mRNAとなる。これにより、翻訳産物である*XBP1u*のC末端側が変化し、転写活性化ドメインをもつ*XBP1s*となる。

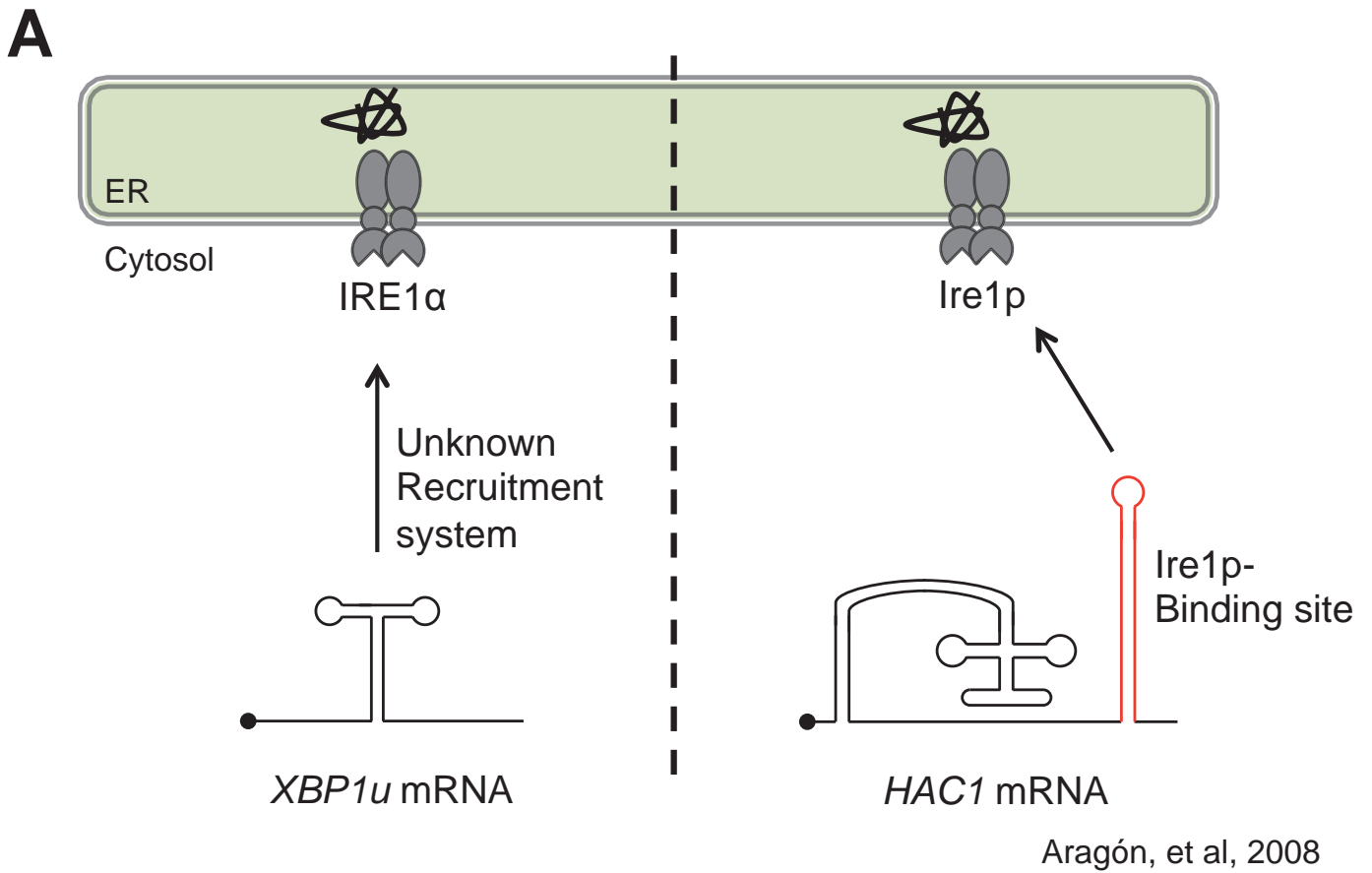
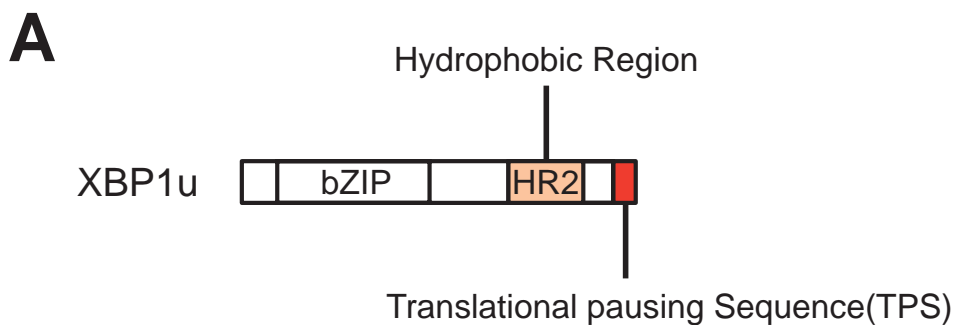


Fig. intro 5. *XBP1u* mRNAの小胞体膜局在化機構

(A) IRE1 α への標的mRNAのリクルート機構。*HAC1* mRNAは5'UTRにIre1pと結合するステムループを持っており、この結合によって*HAC1* mRNAはIre1pにリクルートされる。一方、*XBP1u* mRNAはIRE1 α へのリクルート機構は未解明である。しかし、小胞体膜へのリクルートにおける分子機構の一部が明らかとなっている。



K. Yanagitani, *et al.* 2009
K. Yanagitani, *et al.* 2011

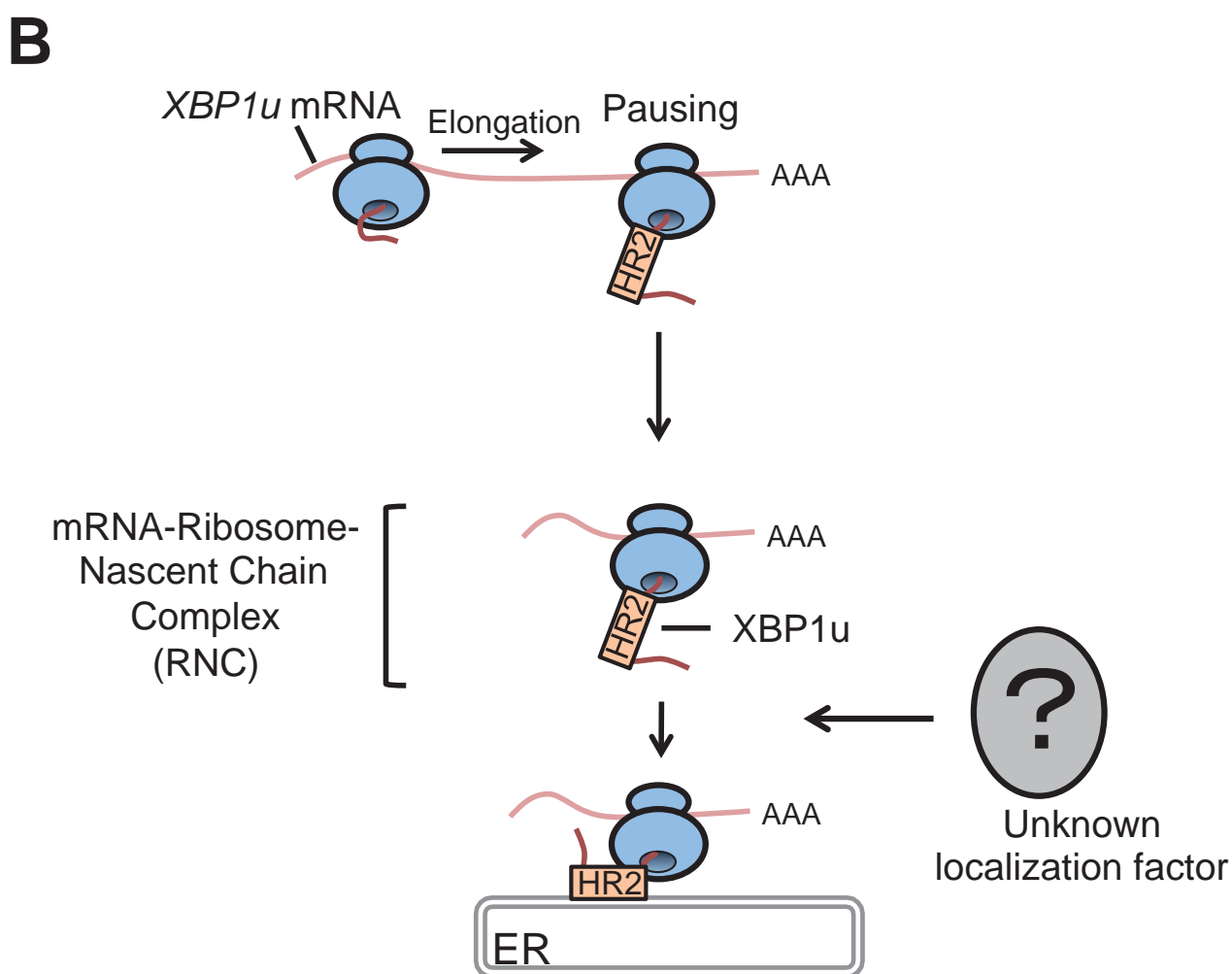


Fig. intro 5. XBP1u mRNAの小胞体膜局在化機構

(B) XBP1uはC末端領域に疎水性領域(HR2)と翻訳停止配列(TPS)をもつ。

(C) 従来のXBP1u mRNA小胞体膜局在化モデル。XBP1u mRNAが翻訳される中で翻訳停止配列によって翻訳が一時的に停止する。これによって、mRNA-リボソーム-新生ペプチド鎖の複合体(RNC)が維持される。そして、HR2の脂質膜への親和性を利用してXBP1u-RNCが小胞体膜に結合することで、XBP1u mRNAは小胞体膜上に局在化する。しかし、小胞体特異的な局在化機構が未解明であり、未知の局在化因子の存在が示唆されていた。

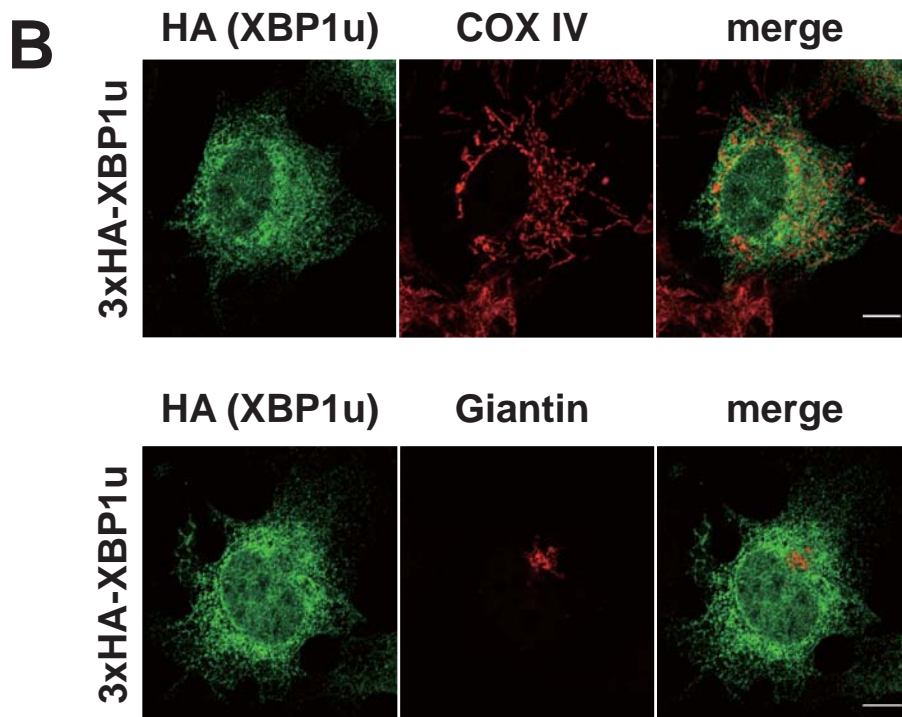
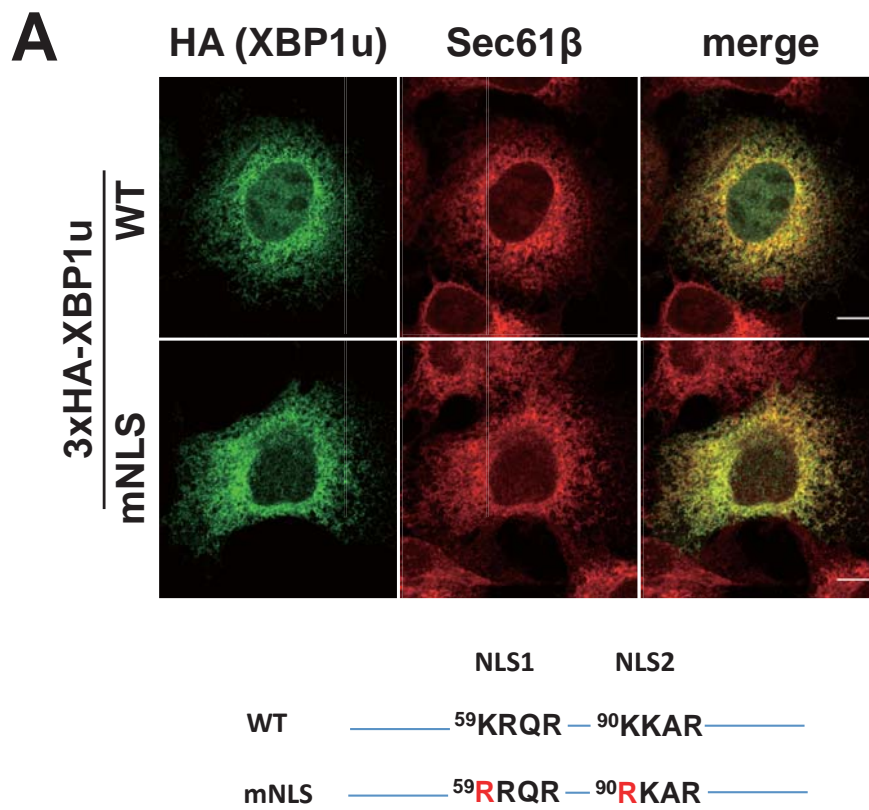
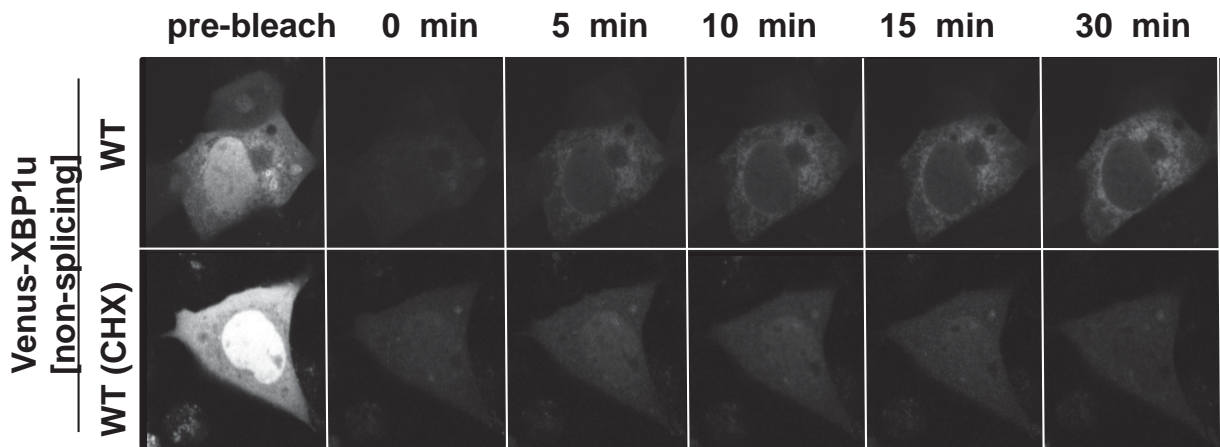


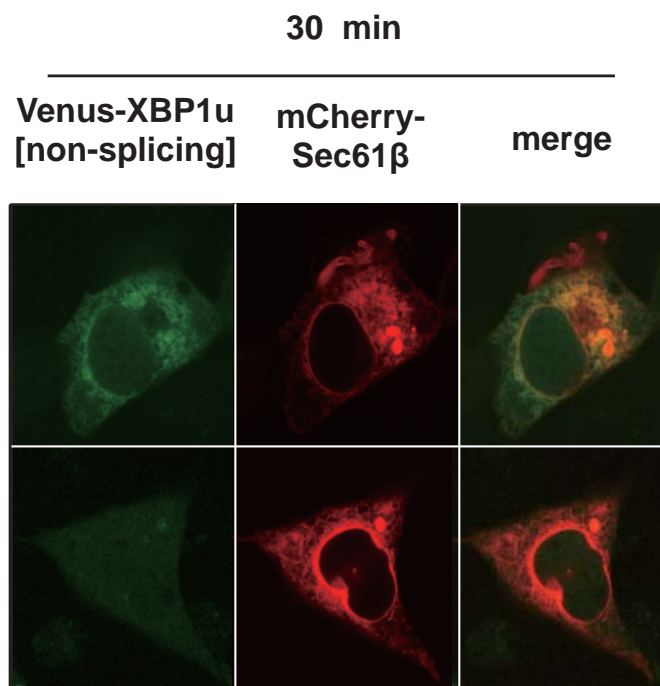
Fig. 1. XBP1uは初めに小胞体に局在化する

(A, B)COS7細胞にスプライシングを受けない3xHA-XBP1u[non-splicing]とNLS欠損変異体(mNLS)を一過的に発現させ、免疫染色を行った。Sec61 β : 小胞体マーカー、COX IV : ミトコンドリアマーカー、Giantin : ゴルジ体マーカー、スケールバー: 10 μ m

C



柳谷耕太 博士



柳谷耕太 博士

Fig. 1. XBP1uは初めに小胞体に局在化する

(C) COS-7細胞にVenus-XBP1u[non-splicing]と小胞体マーカールとしてmcherry-Sec61 β を一過的に共発現させ、蛍光退色後、示した時点での蛍光回復を観察した。30minの時点でのVenusとmCherryの蛍光を下図に示した。スケールバー: 10 μ m

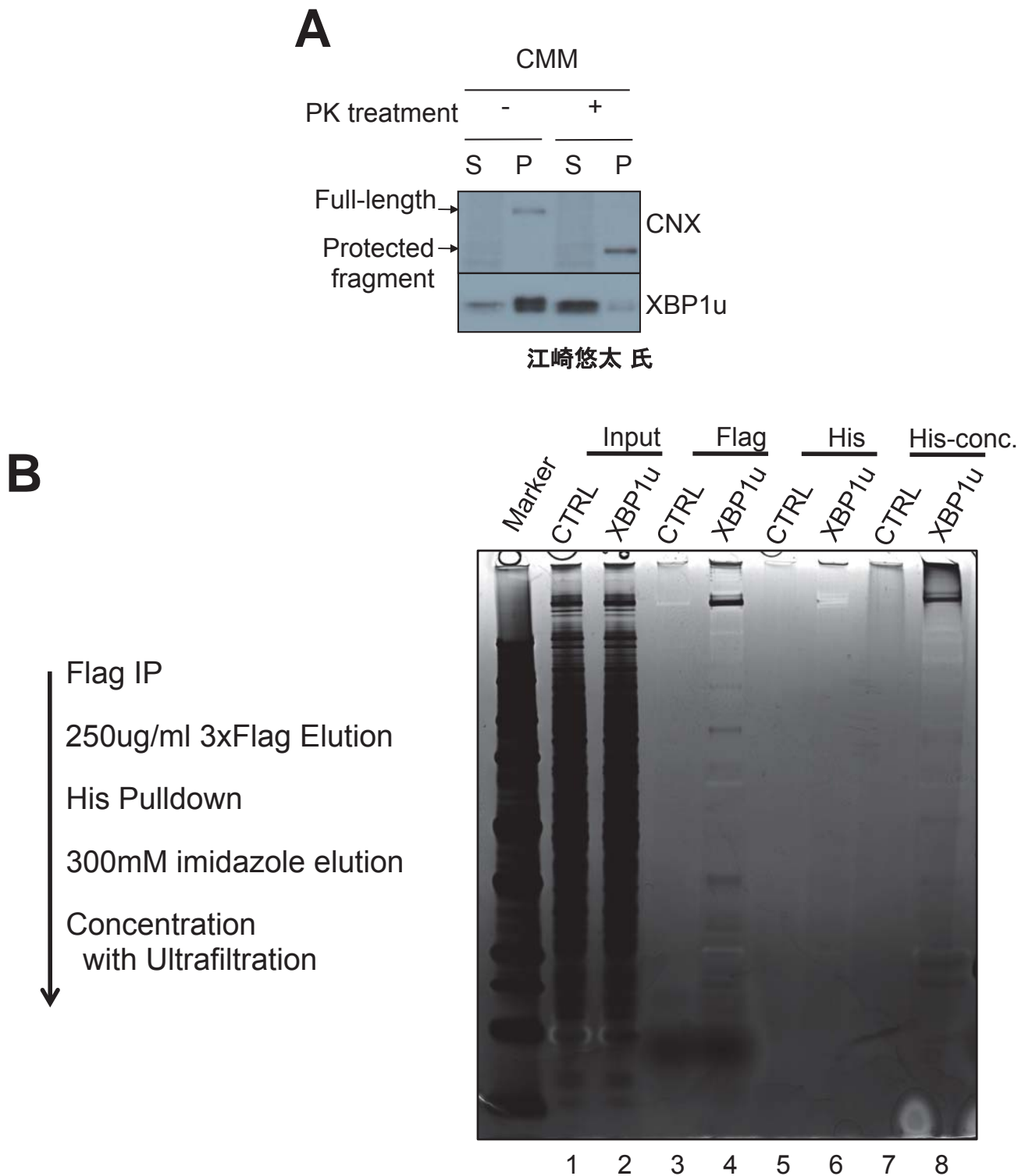


Fig. 2. SRP経路の構成因子はXBP1u-RNCと相互作用する

(A) イヌ睪臓マイクロソーム膜(CMM)を20 μ g/ml Proteinase K(PK)で処理し、RRLを用いてXBP1uの膜局在化アッセイを行った。CNXはPKにより消化され、Full Lengthから Protected fragmentの位置にシフトダウンする。S: 上清、P: 沈殿(膜画分)

(B) FH-XBP1uをHEK293T細胞にトランスフェクション後、24h後に2段階精製し、サンプルをNu-PAGE後、銀染色した。CTRL: Empty vector, Flag; 抗Flag免疫沈降(1段階目)、His; Hisタグプルダウン(2段階目)、His-conc.: Hisのサンプルを限外濾過によって濃縮。

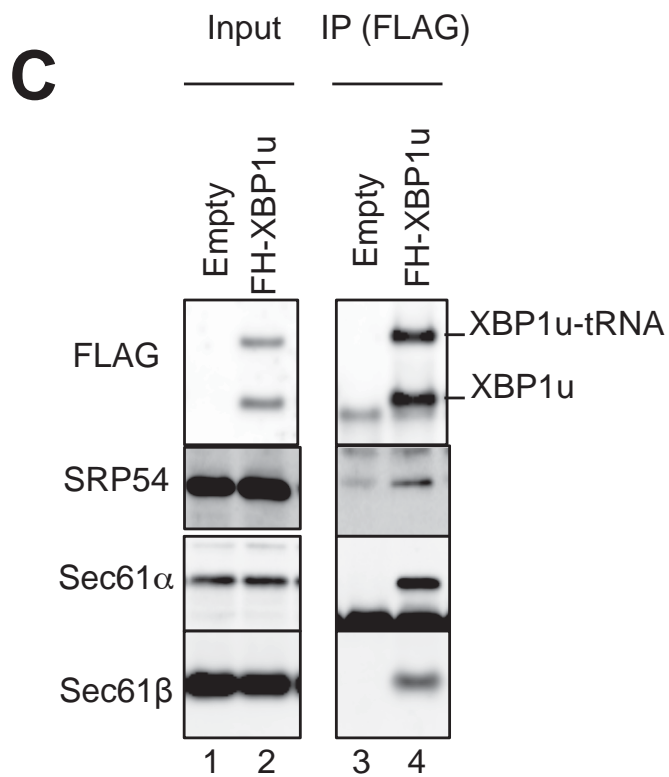


Fig. 2. SRP経路の構成因子はXBP1u-RNCと相互作用する
 (C) FH-XBP1uをHEK293T細胞にトランスフェクションし、24h後、抗Flag抗体によって免疫沈降したサンプルをウェスタンブロッティングによって解析した。Empty : Empty Vector、IP: 免疫沈降産物

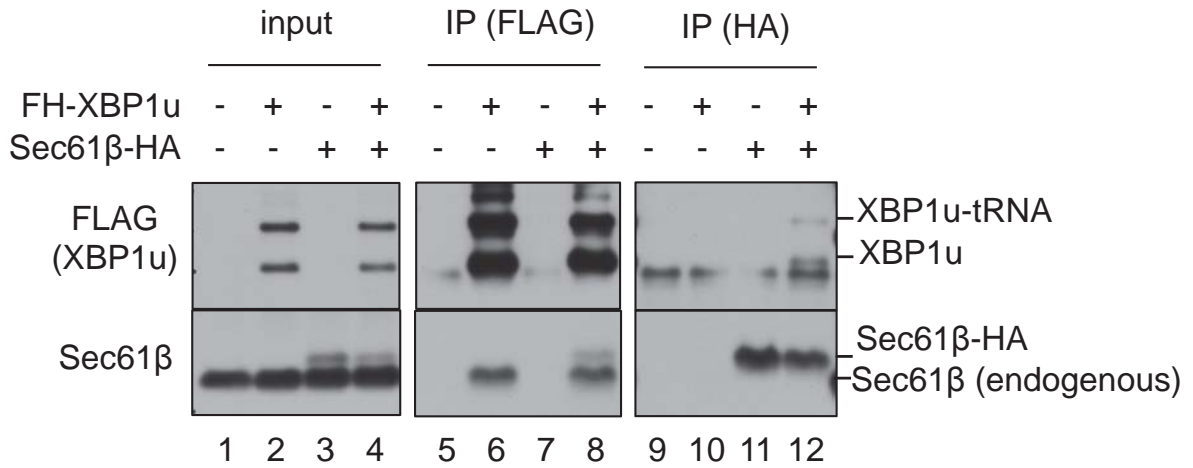
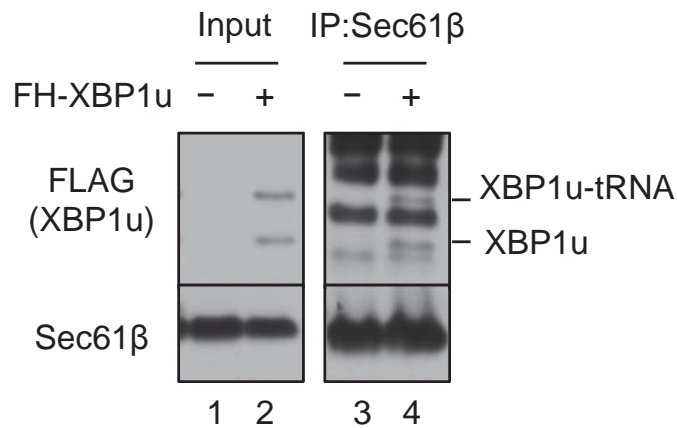
D**E**

Fig. 2. SRP経路の構成因子はXBP1u-RNCと相互作用する

(D) FH-XBP1u及びSec61 β -HAをHEK293T細胞にトランスフェクションし、24h後、抗Flag抗体及び抗HA抗体によって免疫沈降し、ウェスタンブロッティングによって解析した。IP: 免疫沈降産物、endogenous: 内在性

(E) FH-XBP1uをHEK293T細胞にトランスフェクションし、24h後、抗Sec61 β 抗体を用いて免疫沈降し、ウェスタンブロッティングによって解析した。

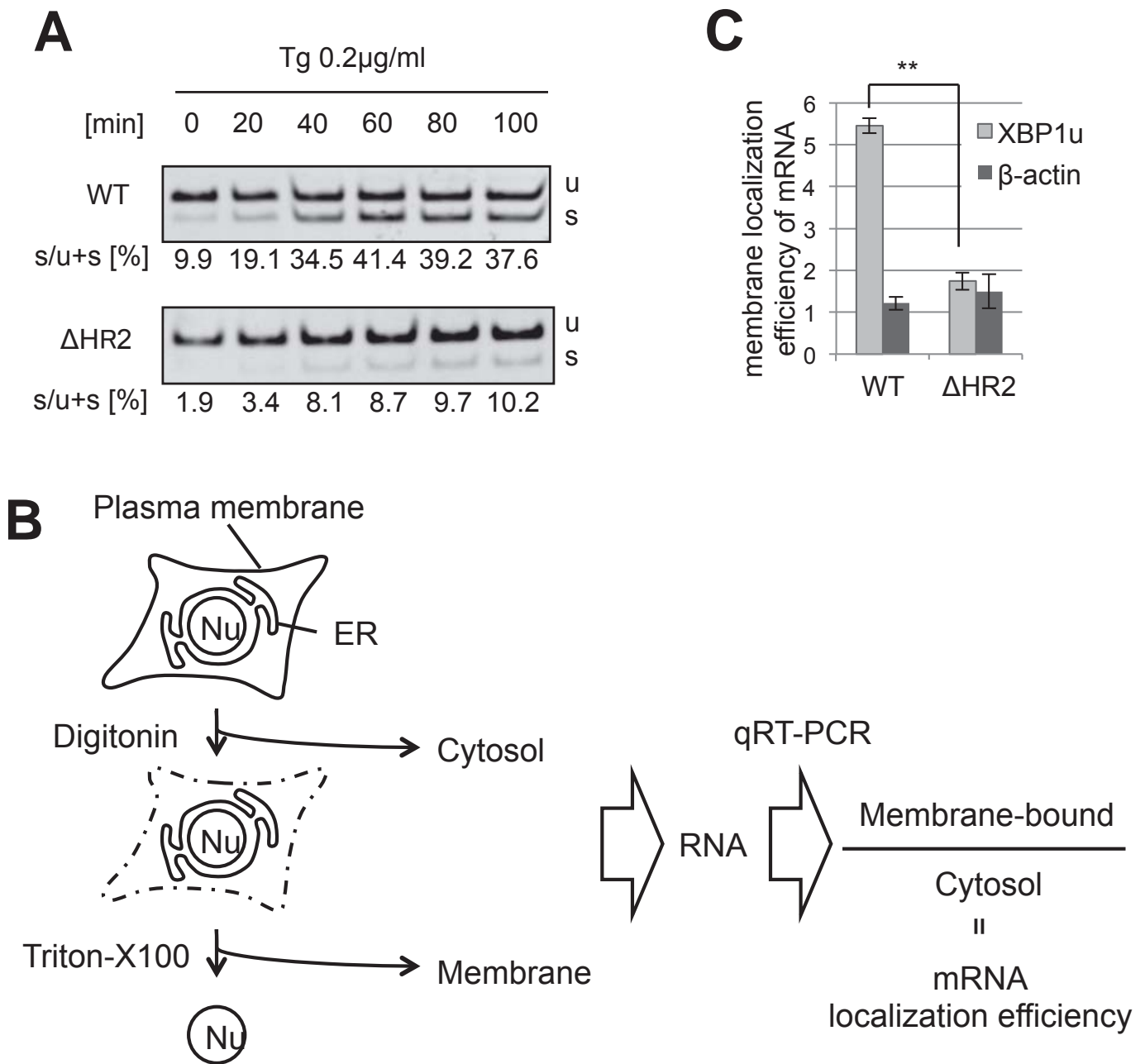


Fig. 3. SRPはHR2を認識する

(A) HEK293T細胞にXBP1u-ps及びΔHR2変異体を発現させ、24h後にThapsigargin (Tg)で記した時間処理し、RT-PCRによってXBP1 mRNAのスプライシングを解析した。u: 非スプライズド型、s: スプライズド型。下に両方のシグナル強度の内のスプライズド型の割合(%)を示した。

(B) ジギトニンを用いた分画法によるmRNA局在化効率の測定方法

(C) HEK293T細胞にFH-XBP1u及びΔHR2変異体を発現させ、24h後に分画し、qRT-PCRによってmRNAの局在化効率を測定した。*: student's t-test p<0.05 (n=3)

(D) RRLでFH-XBP1u及びΔHR2を翻訳し、抗Flag抗体による免疫沈降を行い、ラジオアイソトープ(RI)、及びウェスタンブロッティングによって解析した。

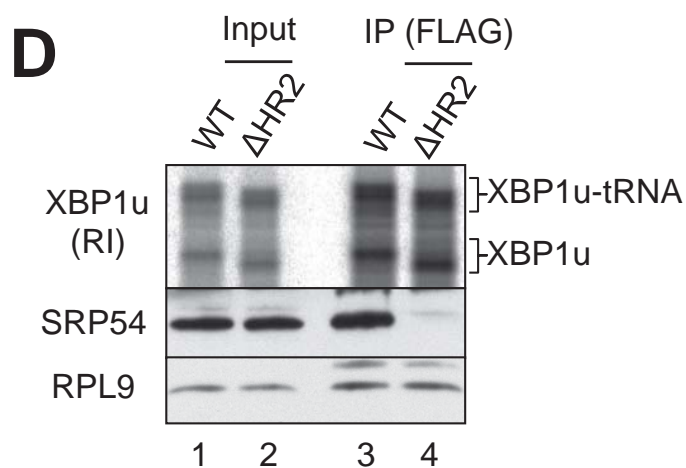


Fig. 3. SRPはHR2を認識する

(D) RRLでFH-XBP1u及び Δ HR2を翻訳し、抗Flag抗体による免疫沈降を行い、ラジオアイソトープ(RI)、及びウェスタンブロットティングによって解析した。SRPのサブユニットとしてSRP54、リボソームタンパク質としてRPL9を検出した。

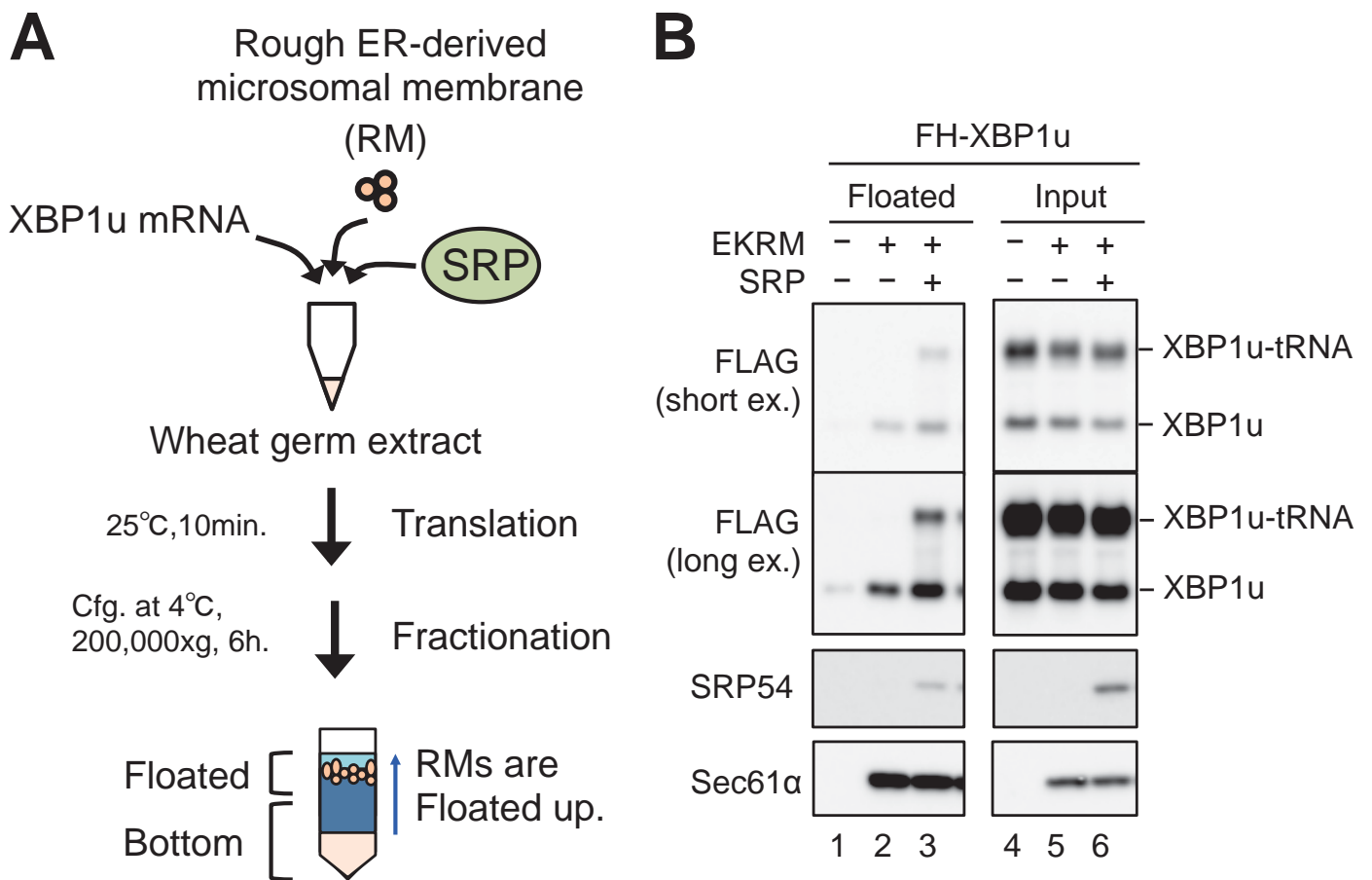
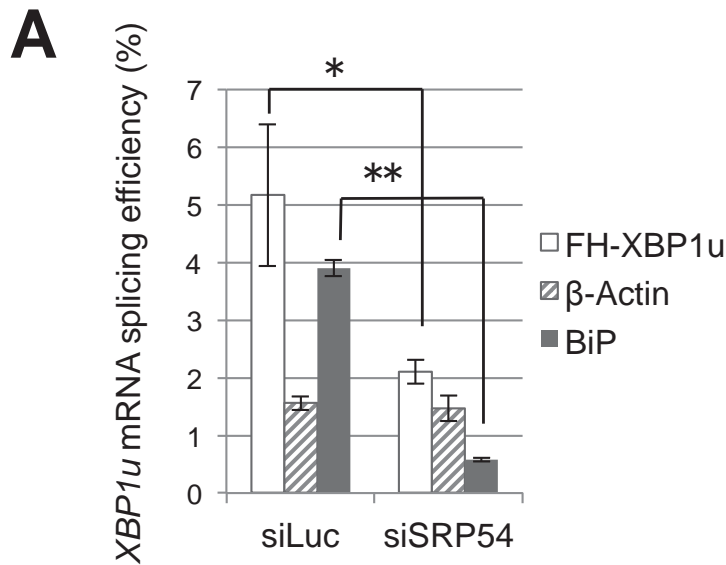


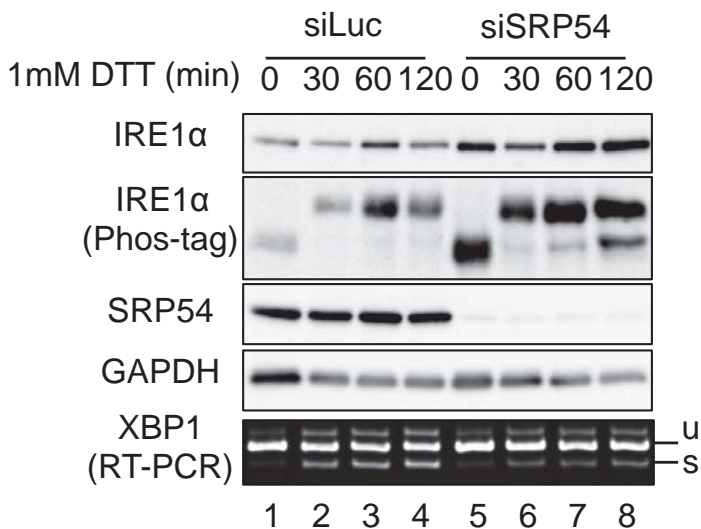
Fig. 4. SRPはXBP1u-RNCを小胞体膜上へと輸送する

(A) WGEを用いたXBP1uの膜標的化アッセイ、及び浮揚法によるミクロソーム膜の分画法

(B) (A)で記した操作を行った後、ウェスタンブロッティングによって解析した。Floated: 浮揚画分、Input: 分画前



B



C

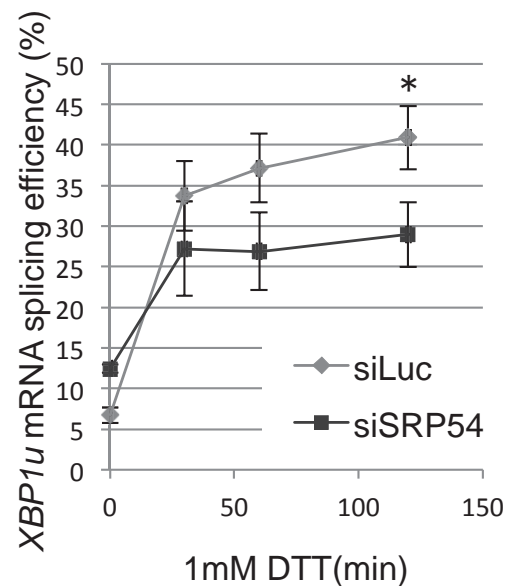


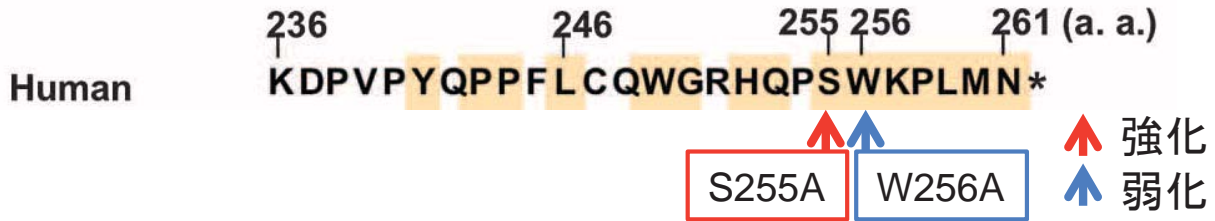
Fig. 5. SRP経路はXBP1u mRNAを小胞体膜に輸送する

(A) FH-XBP1uを安定発現するHeLa細胞において、SRP54を96h ノックダウンした後、ジギトニン分画法によってmRNAの局在化効率を測定した。標準偏差を記し、統計解析はStudent's t-test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ ($n=3$)で行った。

(B, C) XBP1u-psを安定発現するHeLa細胞において、SRP54を96h ノックダウンした後、1mM DTT処理を表示した時間行った。(B) ウェスタンブロッティング、及び、RT-PCRによってXBP1 mRNAスプライシングを解析した。u: 非スプライズド型、s: スプライズド型。

(C) (B)のRT-PCRの結果の定量結果をグラフに記した。黒線は標準偏差を示している。統計解析はStudent's t-test *: $p < 0.05$ ($n=3$)で行った。

A



Yanagitani et al, 2011

B

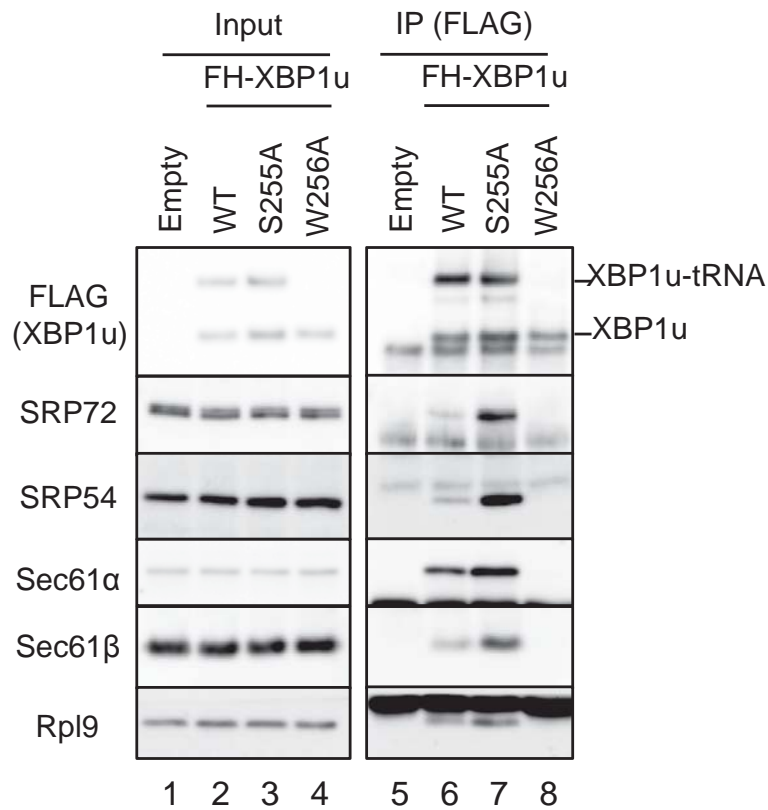


Fig. 6. 翻訳停止はSRP経路による認識に必要である

(A) XBP1uの翻訳停止配列。S255A、W256Aの変異部位を記した。

(B) FH-XBP1u、S255A、W256A変異体をHEK293Tにトランスフェクションし、24h後、抗Flag抗体による免疫沈降を行い、ウェスタンブロッティングによって解析した。

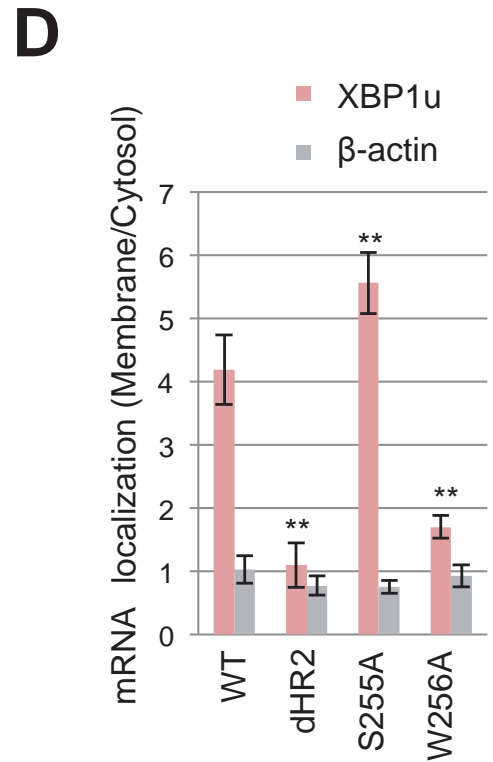
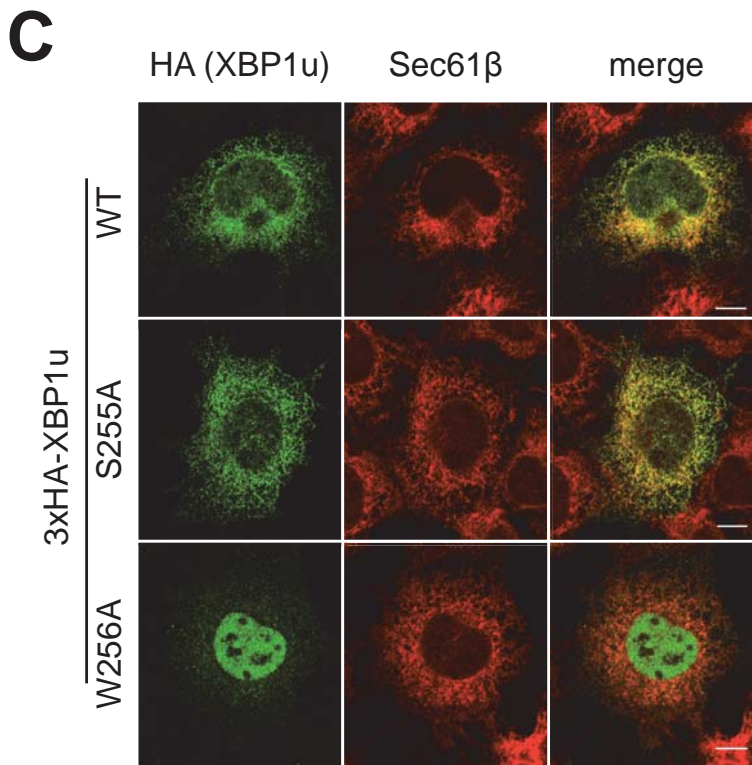
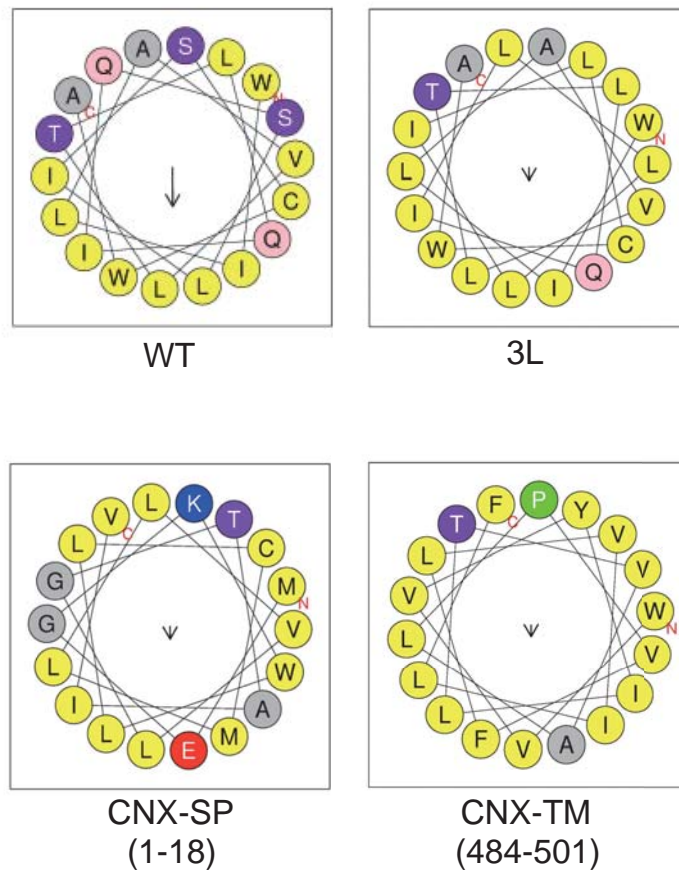


Fig. 6. 翻訳停止はSRP経路による認識に必要である

(C) 3xHA-XBP1uをCOS-7細胞にトランスフェクションし、24h後、固定、免疫染色によって細胞内局在を観察した。左に発現させた変異体を記した。

(D) HEK293T細胞にFH-XBP1uをトランスフェクションし、24h後にジグトニン分画を行い、mRNAの局在化効率を測定した。下に発現させた変異体を記した。黒線は標準偏差を表し、統計解析はANOVA, **: $p < 0.01$ vs WT ($n=3$)で行った。

A



WT ISPWILAVLTLQIQSLISCWAFW
 3L ISPWILAVLTLQILLLLILCWAFFW
 186 208

Fig. 7. SRPによるXBP1uの輸送は従来のSRP経路と異なる特徴を持つ (A) XBP1uのHR2、HR2(3L)、Calnexin (CNX)のシグナルペプチド(SP)、及び膜貫通ドメイン(TM)をHeliQuest(<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>)を用いてHelical Wheel plotによって解析した。HR2の内、黄色の背景で示した領域を上記した。

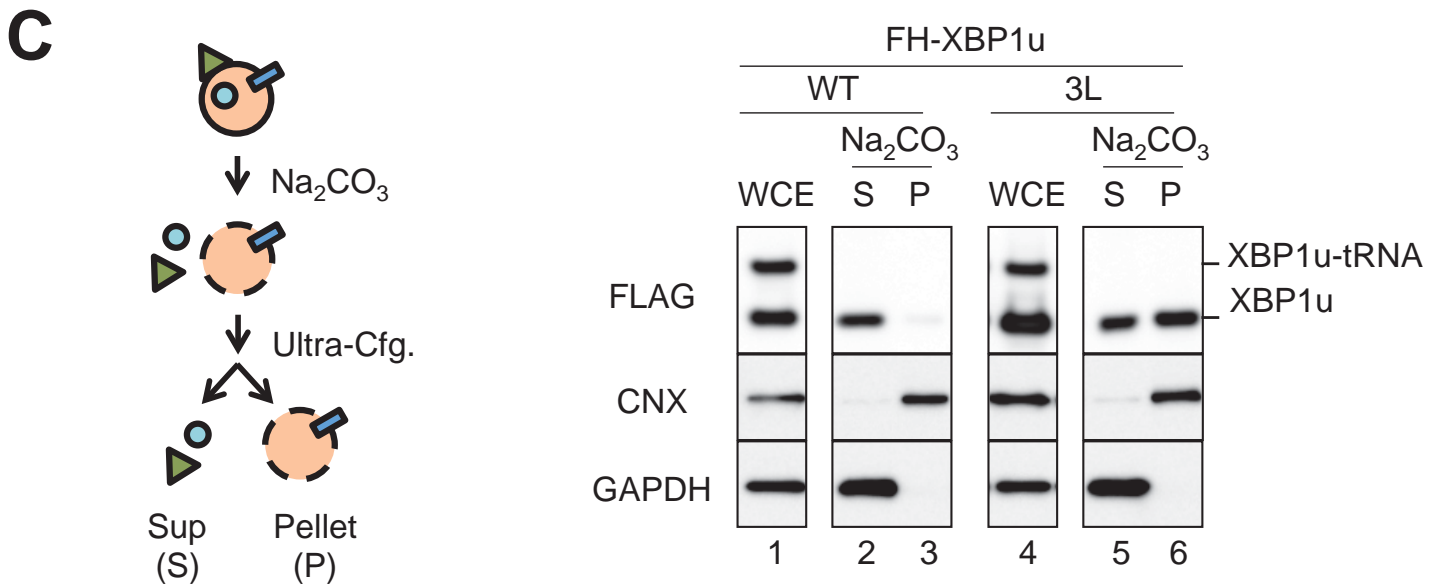
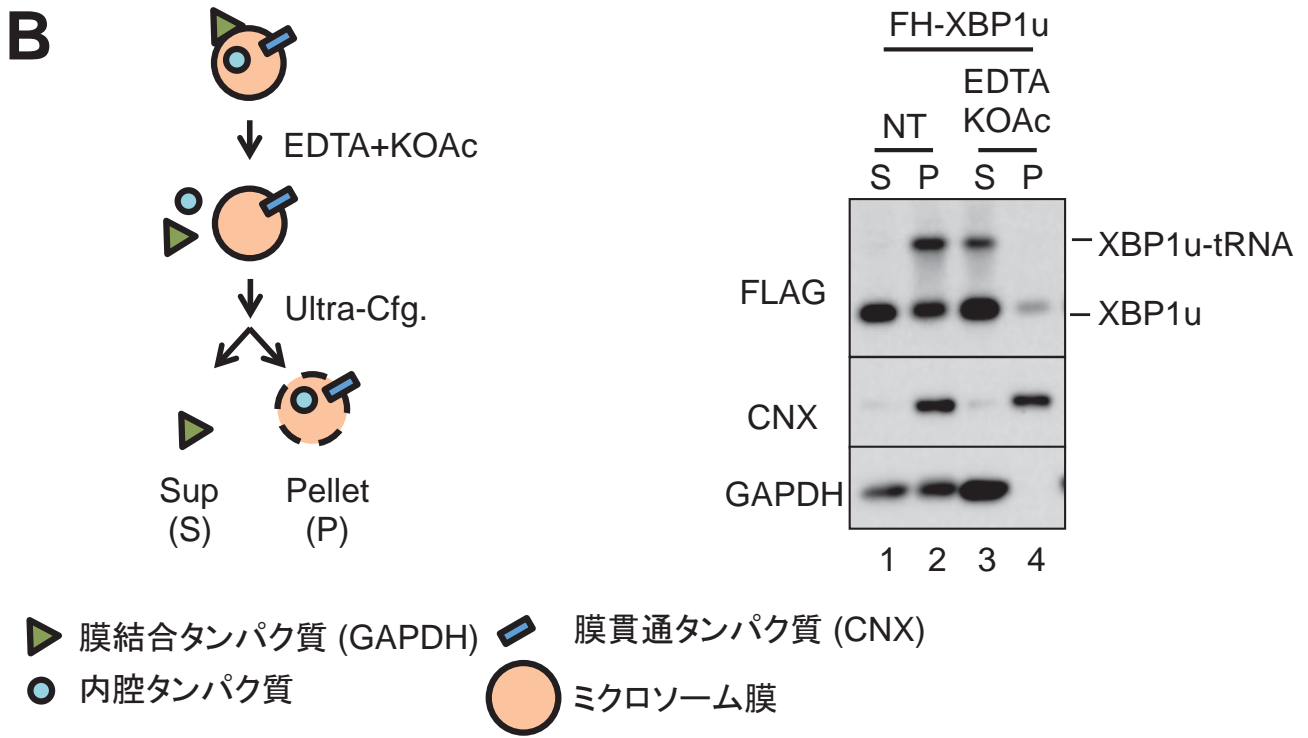


Fig. 7. SRPによるXBP1uの輸送は従来のSRP経路と異なる特徴を持つ
 (B) HEK293T細胞にFH-XBP1uをトランスフェクションし、24h後に細胞分画を行い、ポストミトコンドリア画分において上に記した処理を行った。左にEDTA+500mM KOAc処理のモデル図を記した。S: 上清、P: 沈殿(膜画分)。
 (C) HEK293T細胞にFH-XBP1uと3L変異体をトランスフェクションし、24h後に細胞分画を行い、ポストミトコンドリア画分を炭酸ナトリウムによるアルカリで処理し、超遠心によって分画後、ウェスタンブロッティングによって解析した。左に炭酸ナトリウム処理のモデル図を記した。

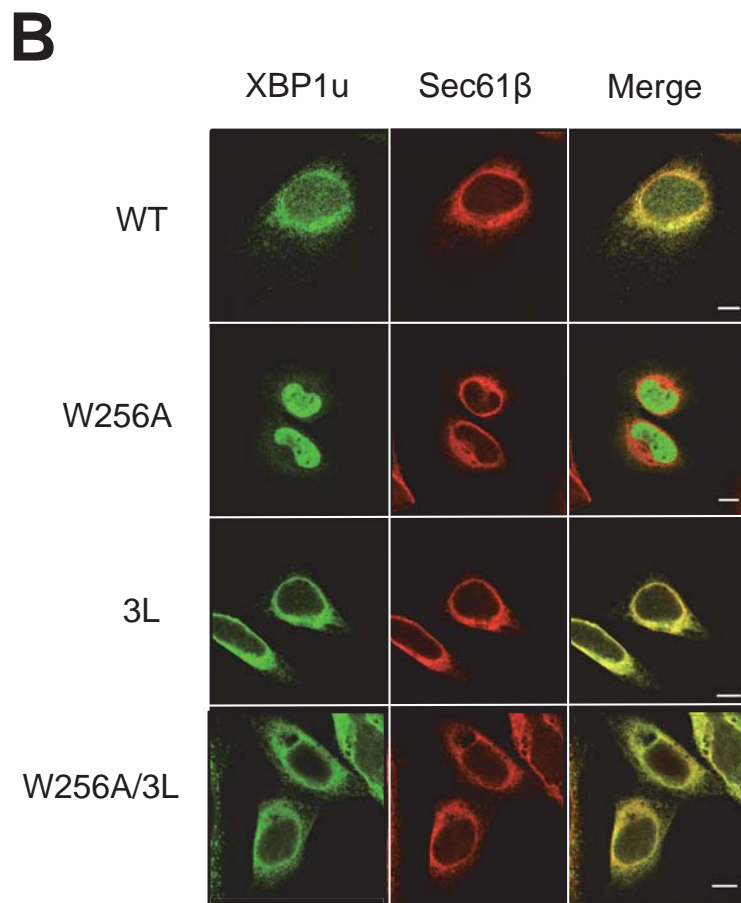
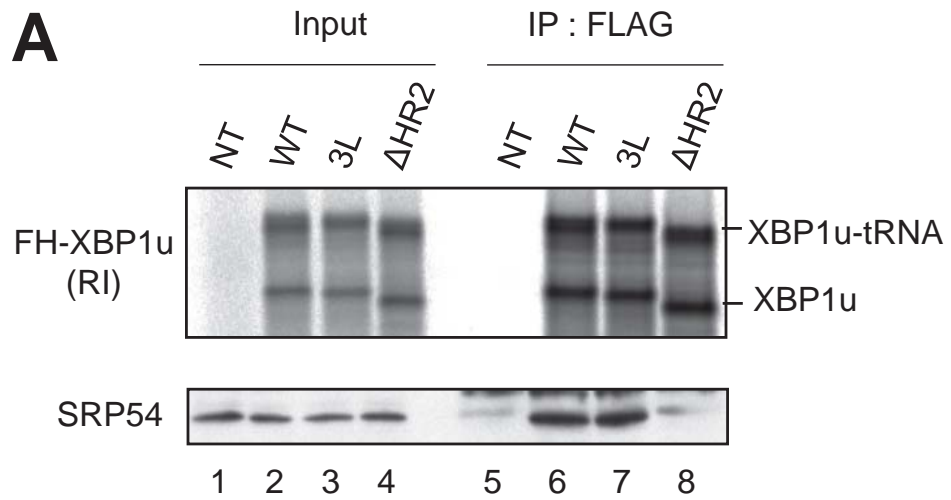


Fig. 8. 翻訳停止は疎水性に依らずHR2の認識に必要である

(A) RRLを用いてFH-XBP1uと上に記した変異体を翻訳し、抗Flag抗体を用いて免疫沈降を行った。FH-XBP1uはラジオアイソトープ、SRP54はウェスタンブロットティングによって解析した。

(B) HeLa細胞にFH-XBP1uと左に示した変異体をトランスフェクションし、24h後に固定、免疫染色を行った。Sec61 β :小胞体マーカー

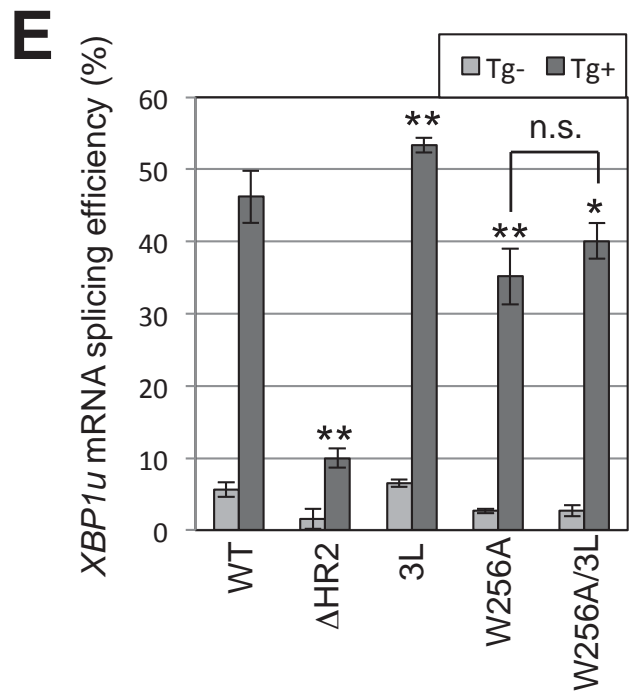
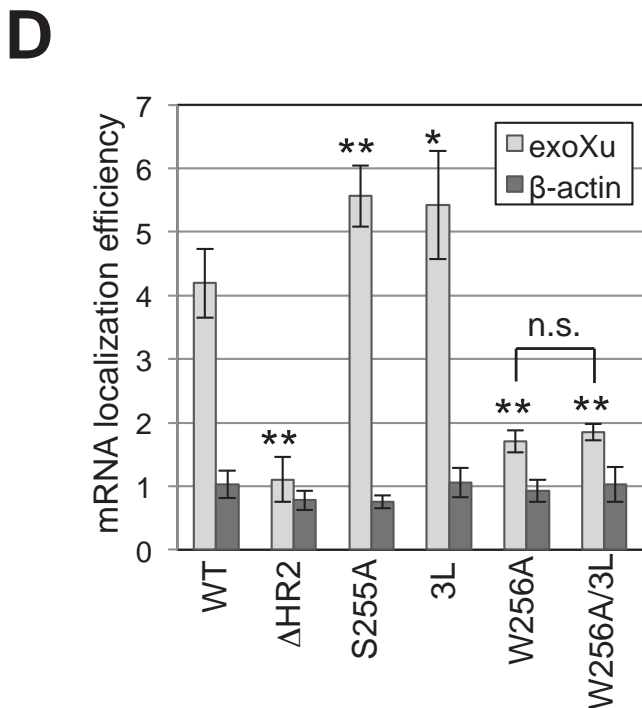
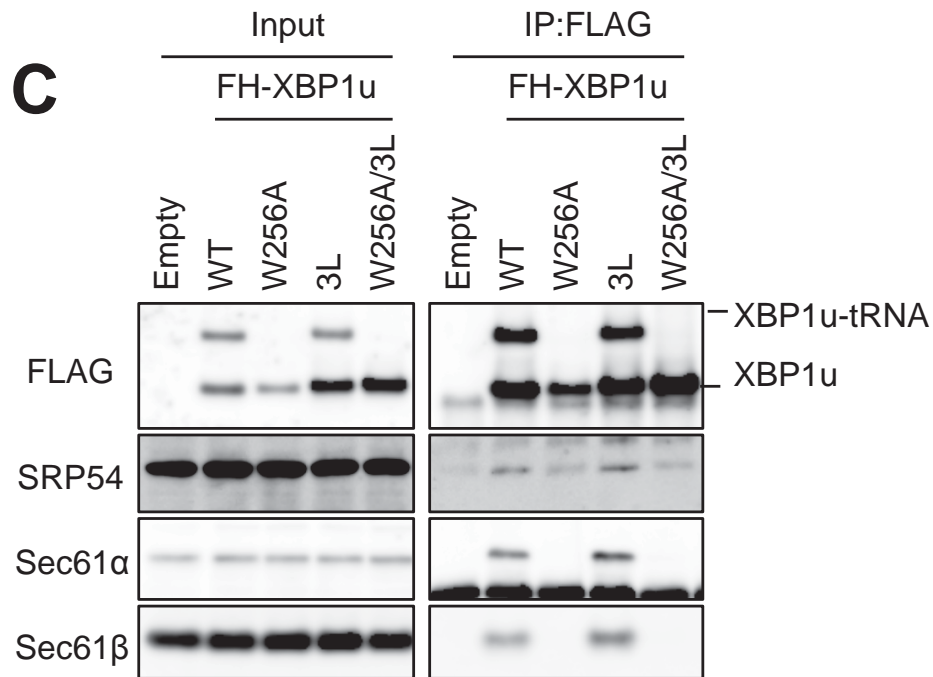


Fig. 8. 翻訳停止は疎水性に依らずHR2の認識に必要である

(C) HEK293T細胞にFH-XBP1uと上に記した変異体をトランスフェクションし、24h後、抗Flag抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロッティングによって解析した。

(D) HEK293T細胞にFH-XBP1uと下に記した変異体をトランスフェクションし、mRNA局在化効率を解析した。黒線は標準偏差を示しており、統計解析はANOVAで行った。* : $p < 0.05$ vs WT, ** : $p < 0.01$ vs WT, n.s. : non significance (n=3)

(E) HEK293T細胞にXBP1u-psと下に記した変異体をトランスフェクションし、24h後、0.2ug/ml Thapsigargin (Tg) によって小胞体ストレスを誘導し、XBP1u-ps mRNAのスプライシング効率をRT-PCRによって解析した。黒線は標準偏差を示しており、統計解析はANOVAで行った。* : $p < 0.05$ vs WT, ** : $p < 0.01$ vs WT, n.s. : non significance (n=4)

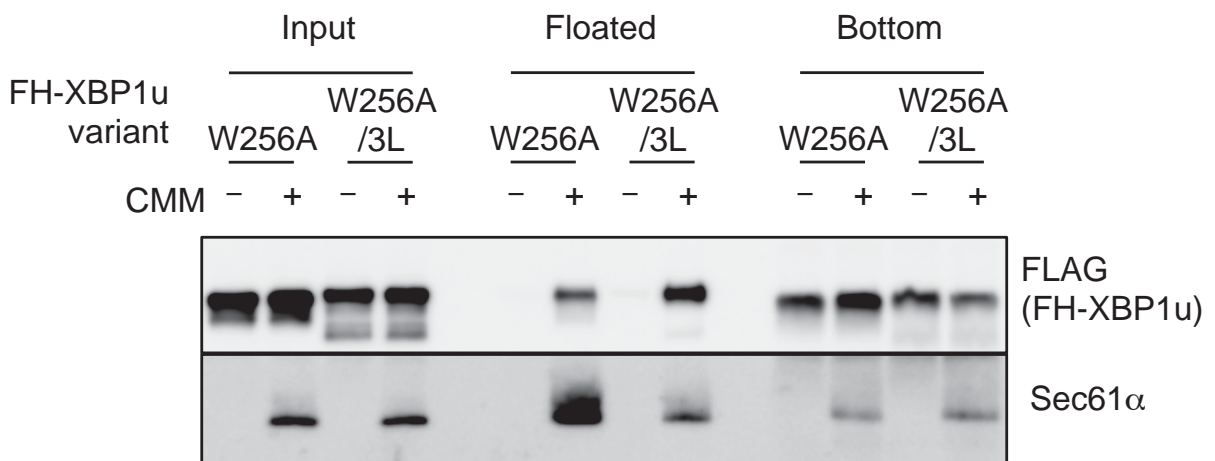
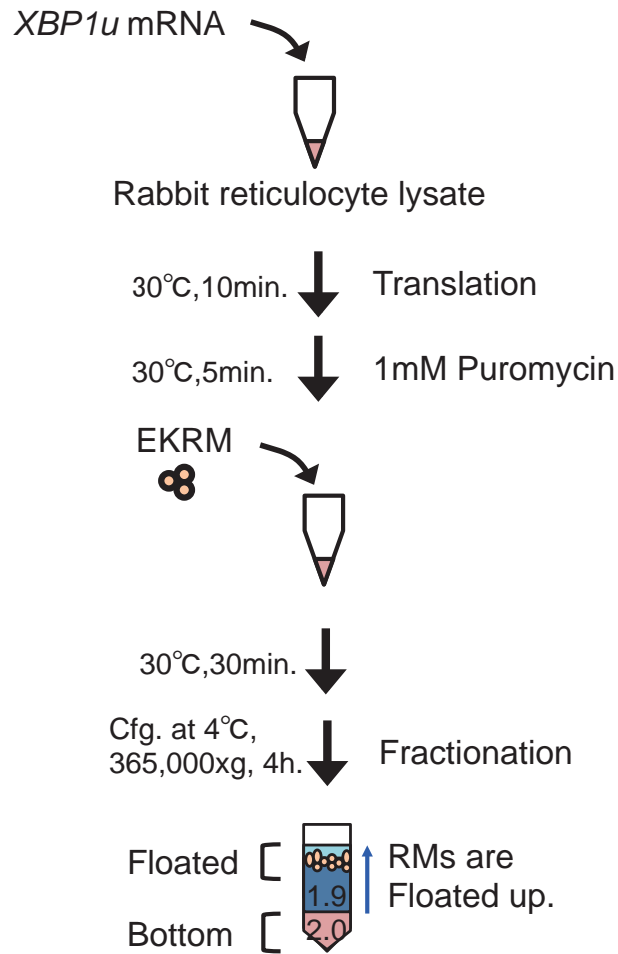
F

Fig. 8. SRPによるXBP1uの輸送は従来のSRP経路と異なる特徴を持つ (F) (上図) 無細胞翻訳系を用いた翻訳後型膜透過機構による小胞体膜標的化アッセイの手順。(下図) W256A変異体、及びW256A-3L変異体をRRL中で翻訳し、翻訳語型膜標的化アッセイを行った。そして、膜浮揚法によって分画し、ウェスタンブロッティングによって検出した。Sec61αはミクロソーム膜のタンパク質の指標として検出した。

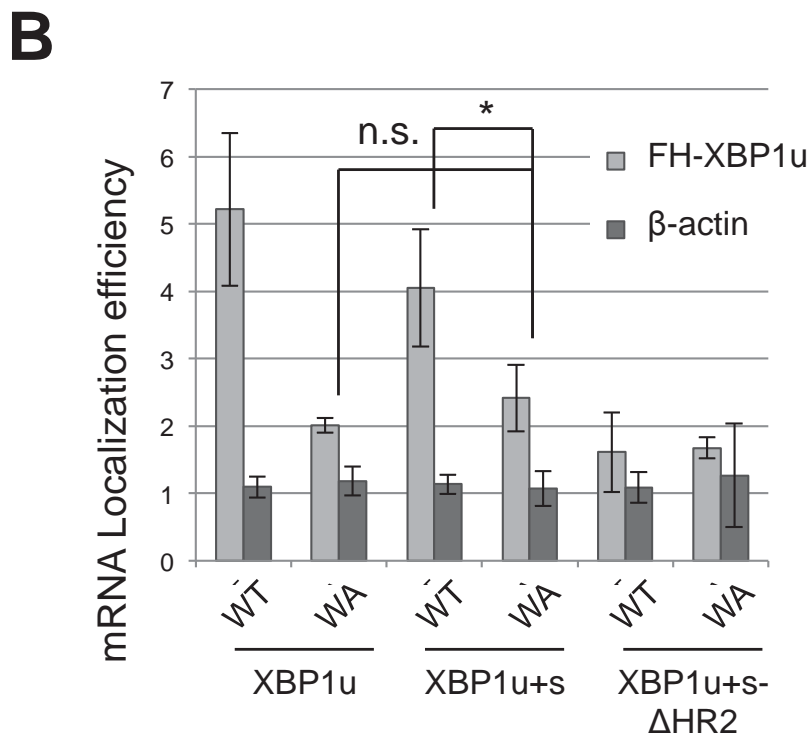
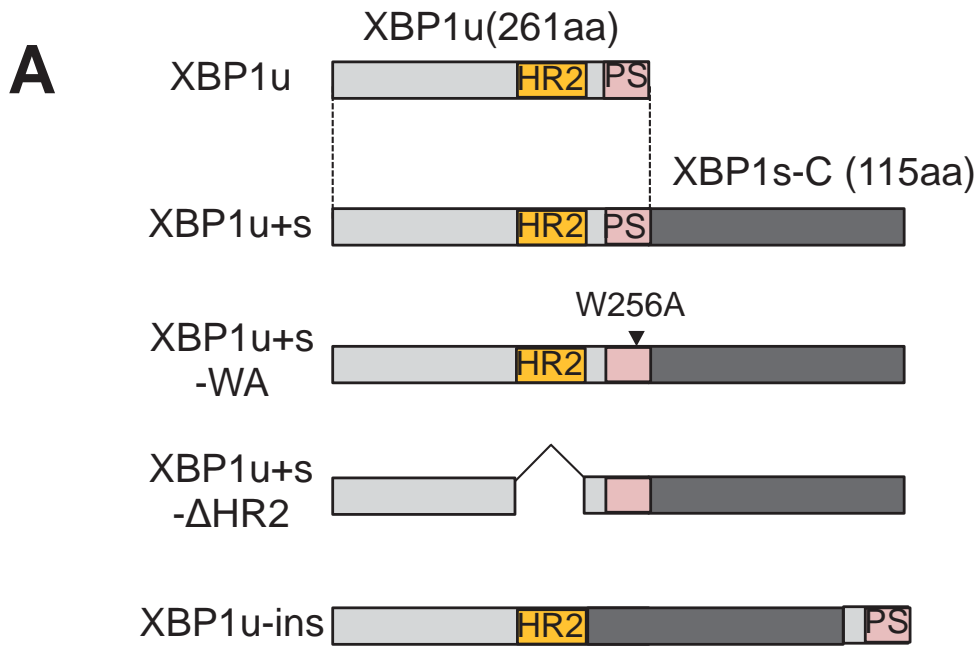


Fig. 9. HR2と翻訳停止配列の位置関係が効率的なmRNA小胞体膜局在化を可能にする

(A) コンストラクトのドメイン図

(B) HEK293T細胞にFH-XBP1uと下に記した変異体をトランスフェクションし、mRNA局在化効率を解析した。黒線は標準偏差を示しており、統計解析はANOVAで行った。* : $p < 0.05$ vs WT, n.s. : non significance (n=3)

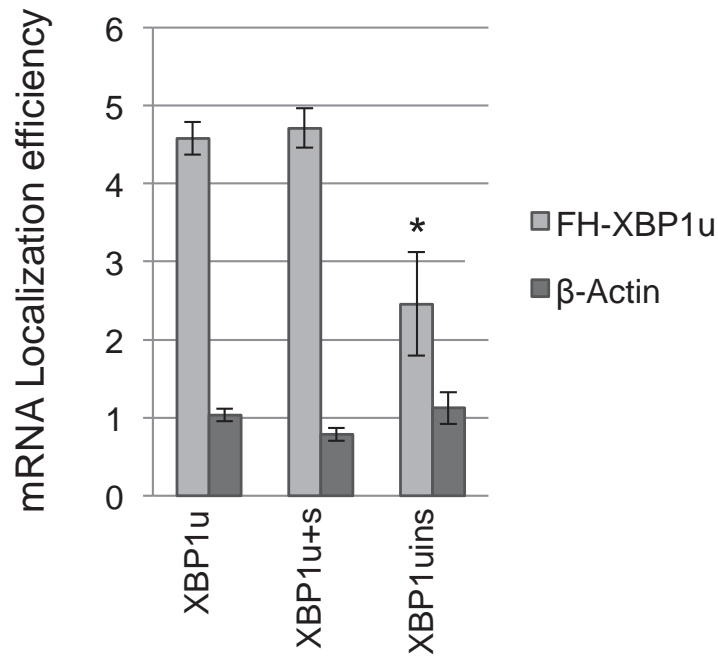
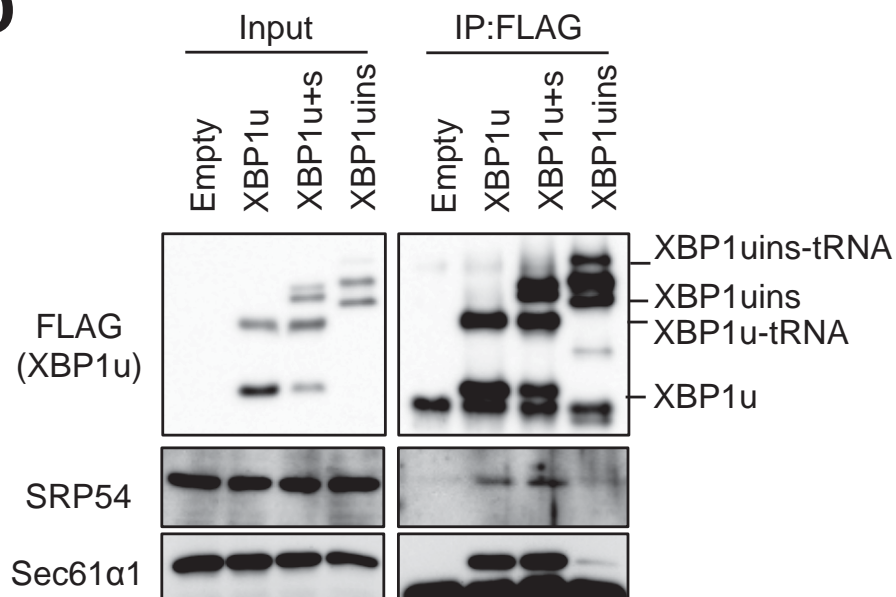
C**D**

Fig. 9. HR2と翻訳停止配列の位置関係が効率的なmRNA小胞体膜局在化を可能にする

(C) HEK293T細胞にFH-XBP1uと下に記した変異体をトランスフェクションし、mRNA局在化効率を解析した。黒線は標準偏差を示しており、統計解析はANOVAで行った。* : $p < 0.05$ vs WT, n.s. : non significance (n=3) (D) HEK293T細胞にFH-XBP1uと上に記した変異体をトランスフェクションし、24時間後に抗Flag抗体を用いて免疫沈降し、ウェスタンブロッティングによって解析した。

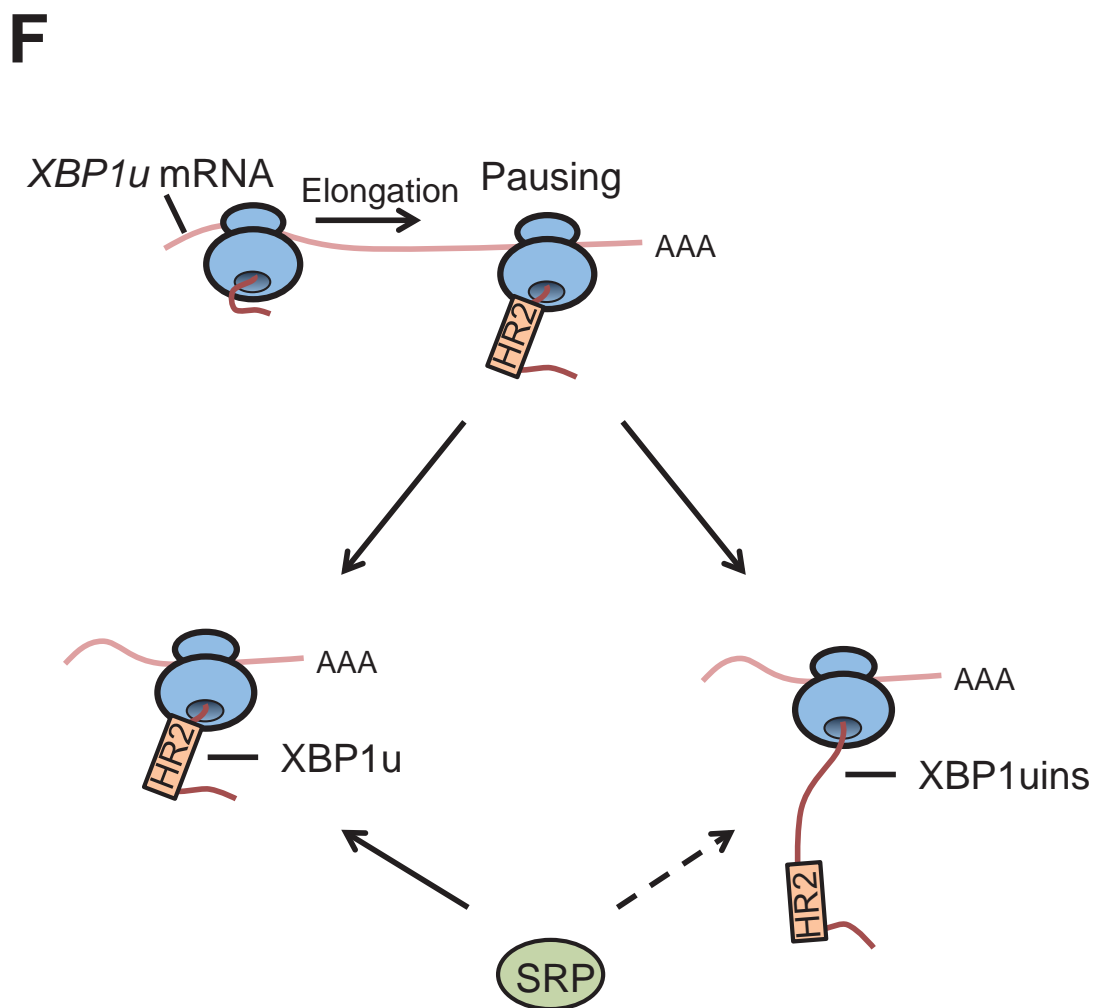
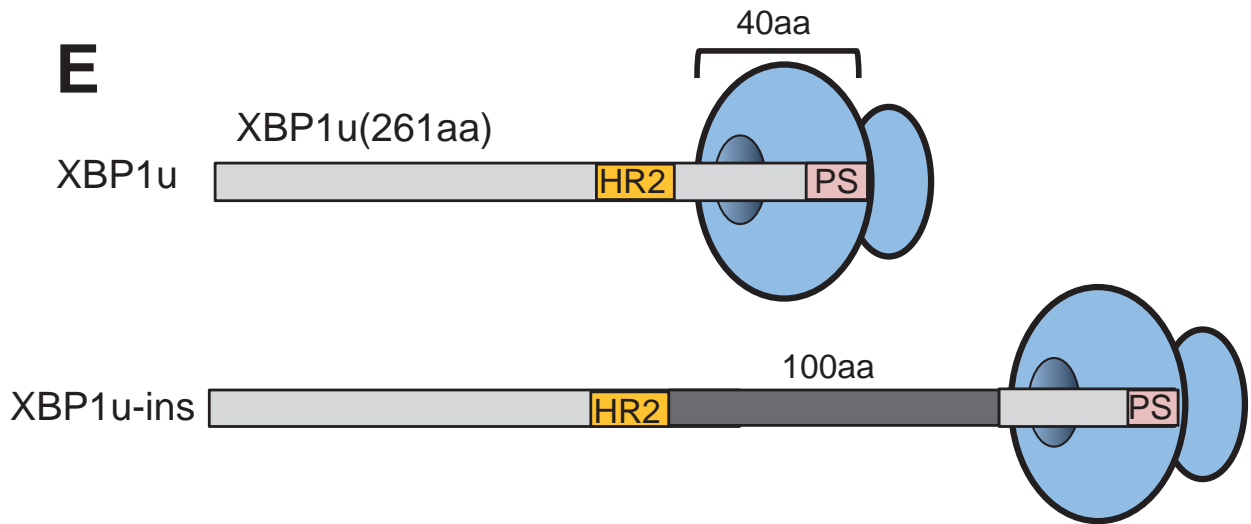


Fig. 9. HR2と翻訳停止配列の位置関係が効率的なmRNA小胞体膜局在化を可能にする

(E) 翻訳停止状態のHR2とリボソームトンネルの距離の模式図。HR2から翻訳停止配列(PS)の末端までの距離は53aa。停止部位では52aa。リボソームトンネルの長さが40aa。

(F) C,Dで見られたことから考えられるモデル。HR2と翻訳停止配列の位置関係がSRPによる認識を可能にする。

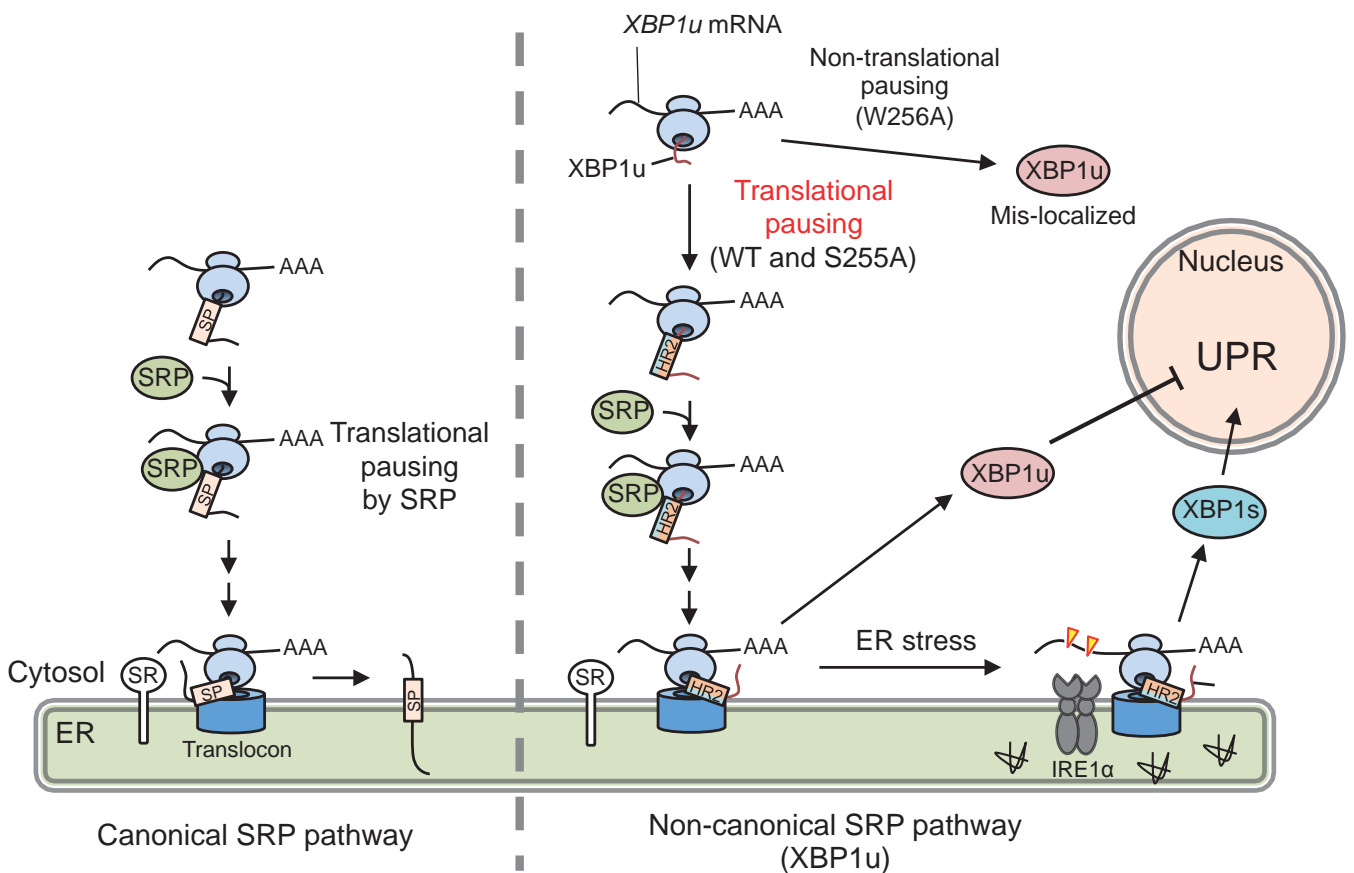
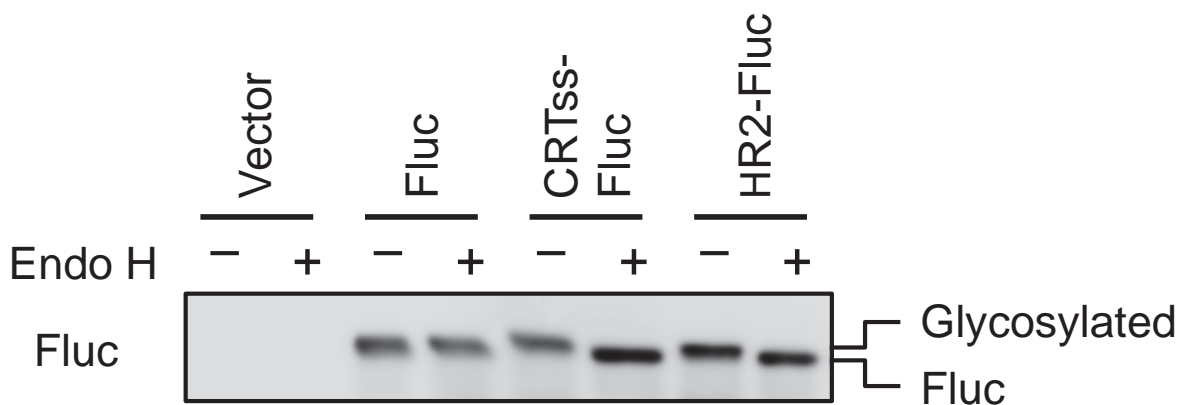


Fig. 10. 翻訳停止とSRP経路の共役によるXBP1u mRNAの小胞体膜局在化機構

SRP経路によるXBP1u mRNAの小胞体膜局在化機構のモデル図。従来のSRP経路とは異なり、翻訳の一時停止がSRPによる認識を可能にし、SRP経路を介してXBP1u-RNCを小胞体膜上へと輸送する。これにより、小胞体ストレス時のXBP1u mRNAスプライシングを促進し、XBP1を迅速に活性化する。小胞体ストレス解消時には、XBP1uが核内へと移行し、XBP1sの分解を促進することで、小胞体ストレス応答(UPR)を終了させる。



CRTss : Signal sequence in Calreticulin

補足図1. SRP経路によるHR2の認識

HEK293T細胞にFirefly luciferase (Fluc) とその変異体をトランスフェクションし、24h後にEndo H処理によってN方糖鎖を消化した後、ウェスタンブロットングによって解析した。Glycosylated : 糖鎖付加型、CRTss-Fluc : カルレティキュリン(CRT)のシグナルペプチドをN末端に付加したFluc、HR2-Fluc : HR2をN末端に付加したFluc

6. 参考文献

- Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., & Mori, K. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Structure and Function*, 33(1), 75-89.
- Akopian, D., Shen, K., Zhang, X., & Shan, S. (2013). Signal recognition particle: An essential protein-targeting machine. *Biochemistry*, 82(1), 693-721.
- Aragón, T., Anken, E. v., Pincus, D., Serafimova, I. M., Korennykh, A. V., Rubio, C. A., et al. (2008). Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature*, 457(7230), 736-740.
- Bacher, G., Lütcke, H., Jungnickel, B., Rapoport, T. A., & Dobberstein, B. (1996). Regulation by the ribosome of the GTPase of the signal-recognition particle during protein targeting. *Nature*, 381(6579), 248-251.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, 2(6), 326-332.
- Bornemann, T., Jöckel, J., Rodnina, M. V., & Wintermeyer, W. (2008). Signal sequence-independent membrane targeting of ribosomes containing short nascent

peptides within the exit tunnel. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(5), 494-499.

Braakman, I., Hoover-Litty, H., Wagner, K. R., & Helenius, A. (1991). Folding of influenza hemagglutinin in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 114(3), 401-411.

Braig, D., Mircheva, M., Sachelaru, I., Sluis, E. O. v. d., Sturm, L., Beckmann, R., et al. (2011). Signal sequence-independent SRP-SR complex formation at the membrane suggests an alternative targeting pathway within the SRP cycle. *Molecular Biology of the Cell*, 22(13), 2309-2323.

Buchberger, A., Bukau, B., & Sommer, T. (2010). Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: Brothers in arms. *Molecular Cell*, 40(2)

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., et al. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92-96.

Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L. A., Offenhäuser, N., Marchisio, P. C., et al. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature*, 426(6966), 579-584.

Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M. B., Hatziapostolou, M., et al. (2014). XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature*, 508(7494), 103-107.

Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., & Lazarow, P. B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: Application to endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 93(1), 97-102.

Görlich, D., & Rapoport, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 75(4), 615-630.

Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008). HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific α helical properties. *Bioinformatics*, 24(18), 2101-2102.

Gething, M. J., & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355(6355), 33-45.

Halic, M., Becker, T., Pool, M. R., Spahn, C. M., Grassucci, R. A., Frank, J., et al. (2004). Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature*, 427(6977), 808-814.

- Halic, M., Gartmann, M., Schlenker, O., Mielke, T., Pool, M. R., Sinning, I., et al. (2006). Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. *Science*, *312*(5774), 745-747.
- Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, *397*(6716), 271-274.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., et al. (2004). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*, *11*(3)
- Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2011). Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(12), 787-798.
- Hetz, C., Chevet, E., & Harding, H. P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(9), 703-719.
- Hetz, C., & Glimcher, L. H. (2009). Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1 α interactome. *Molecular Cell*, *35*(5)
- Hollien, J., & Weissman, J. S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)*, *313*(5783), 104-107.

- Holtkamp, W., Lee, S., Bornemann, T., Senyushkina, T., Rodnina, M. V., & Wintermeyer, W. (2012). Dynamic switch of the signal recognition particle from scanning to targeting. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(12), 1332-1337.
- Ikeuchi, K., & Inada, T. (2016). Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Scientific Reports*, , 28234.
- Ingolia, N. T., Lareau, L. F., & Weissman, J. S. (2011). Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, *147*(4)
- Jan, C. H., Williams, C. C., & Weissman, J. S. (2014). Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, *346*(6210), 1257521.
- Jungnickel, B., & Rapoport, T. A. (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, *82*(2)
- Jurkin, J., Henkel, T., Nielsen, A. F., Minnich, M., Popow, J., Kaufmann, T., et al. (2014). The mammalian tRNA ligase complex mediates splicing of XBP1 mRNA and controls antibody secretion in plasma cells. *The EMBO Journal*,
- Kanda, S., Yanagitani, K., Yokota, Y., Esaki, Y., & Kohno, K. (2016). Autonomous translational pausing is required for *XBP1u* mRNA recruitment to the ER via the

SRP pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), E5886-E5895.

Karamyshev, A. L., Patrick, A. E., Karamysheva, Z. N., Griesemer, D. S., Hudson, H., Tjon-Kon-Sang, S., et al. (2014). Inefficient SRP interaction with a nascent chain triggers a mRNA quality control pathway. *Cell*, 156(1-2), 146-157.

Kim, S. J., Mitra, D., Salerno, J. R., & Hegde, R. S. (2002). Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner. *Developmental Cell*, 2(2)

Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., et al. (2007). Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *The Journal of Cell Biology*, 179(1), 75-86.

Kowarik, M., Kiang, S., Martoglio, B., & Helenius, A. (2002). Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 10(4), 769-778.

Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., et al. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Reports*, 11(12), 956-961.

- Lakkaraju, A. K. K., Mary, C., Scherrer, A., Johnson, A. E., & Strub, K. (2008). SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to match limiting ER-targeting sites. *Cell*, *133*(3), 440-451.
- Lee, A., Iwakoshi, N. N., & Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(21), 7448-7459.
- LERNER, R. S., SEISER, R. M., ZHENG, T., LAGER, P. J., REEDY, M. C., KEENE, J. D., et al. (2003). Partitioning and translation of mRNAs encoding soluble proteins on membrane-bound ribosomes. *Rna*, *9*(9), 1123-1137.
- Lim, B., Miyazaki, R., Neher, S., Siegele, D. A., Ito, K., Walter, P., et al. (2013). Heat shock transcription factor σ 32 co-opts the signal recognition particle to regulate protein homeostasis in *E. coli*. *PLoS Biology*, *11*(12)
- Lu, Y., Liang, F., & Wang, X. (2014). A synthetic biology approach identifies the mammalian UPR RNA ligase RtcB. *Molecular Cell*, *55*(5), 758-770.
- Miller, J. D., Wilhelm, H., Gierasch, L., Gilmore, R., & Walter, P. (1993). GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation. *Nature*, *366*(6453), 351-354.

- Miyazaki, R., Yura, T., Suzuki, T., Dohmae, N., Mori, H., & Akiyama, Y. (2016). A novel SRP recognition sequence in the homeostatic control region of heat shock transcription factor Hsc70 . *Scientific Reports*, 6, 24147.
- Newman, J. R. S., & Keating, A. E. (2003). Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5628), 2097-2101.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., et al. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & Development*, 16(11), 1345-1355.
- Pechmann, S., Chartron, J. W., & Frydman, J. (2014). Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(12), 1100-1105.
- Plumb, R., Zhang, Z., Appathurai, S., & Mariappan, M. (2015). A functional link between the co-translational protein translocation pathway and the UPR. *Elife*, 4
- Potter, M. D., & Nicchitta, C. V. (2002). Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23314-23320.

- Qiu, Y., Mao, T., Zhang, Y., Shao, M., You, J., Ding, Q., et al. (2010). A crucial role for RACK1 in the regulation of glucose-stimulated IRE1alpha activation in pancreatic beta cells. *Science Signaling*, 3(106), ra7.
- Rapoport, T. A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450(7170), 663-669.
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519-529.
- Shao, S., & Hegde, R. S. (2011). Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Cell and Developmental Biology*, 27(1), 25-56.
- Shinya, S., Kadokura, H., Imagawa, Y., Inoue, M., Yanagitani, K., & Kohno, K. (2011). Reconstitution and characterization of the unconventional splicing of *XBPIu* mRNA in vitro. *Nucleic Acids Research*, 39(12), 5245-5254.
- Todd, D. J., Lee, A., & Glimcher, L. H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 663-674.
- Uemura, A., Oku, M., Mori, K., & Yoshida, H. (2009). Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *Journal of Cell Science*, 122(16), 2877-2886.

- Uemura, A., Taniguchi, M., Matsuo, Y., Oku, M., Wakabayashi, S., & Yoshida, H. (2013). UBC9 regulates the stability of XBP1, a key transcription factor controlling the ER stress response. *Cell Structure and Function*, 38(1), 6779.
- Upton, J., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., et al. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic caspase-2. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6108), 818-822.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., et al. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5453), 664-666.
- Vembar, S. S., & Brodsky, J. L. (2008). One step at a time: Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 944-957.
- Vidal, R. L., & Hetz, C. (2013). Unspliced XBP1 controls autophagy through FoxO1. *Cell Research*, 23(4), 463-464.
- Voorhees, R. M., & Hegde, R. S. (2015). Structures of the scanning and engaged states of the mammalian SRP-ribosome complex. *Elife*, 4
- Walter, P., & Blobel, G. (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 77(12),
7112-7116.

Walter, P., & Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annual Review of Cell Biology*, 10, 87-119.

Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6059), 1081-1086.

Wild, K., Halic, M., Sinning, I., & Beckmann, R. (2004). SRP meets the ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(11), 1049-1053.

Wolin, S. L., & Walter, P. (1989). Signal recognition particle mediates a transient elongation arrest of preprolactin in reticulocyte lysate. *The Journal of Cell Biology*, 109(6 Pt 1), 2617-2622.

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., et al. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Developmental Cell*, 13(3), 365-376.

Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., et al. (2009). Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Molecular Cell*, 34(2), 191-200.

- Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., & Kohno, K. (2011). Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of *XBPlu* mRNA. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6017), 586-589.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., & 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. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(50), 33741-33749.
- Yoshida, H. (2007). ER stress and diseases. *FEBS Journal*, *274*(3), 630-658.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2002). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, *107*(7)
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., & Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of Cell Biology*, *172*(4)
- Yoshida, H., Uemura, A., & Mori, K. (2009). pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. *Cell Structure and Function*, *34*(1), 1-10.

Zhang, X., & Shan, S. (2014). Fidelity of cotranslational protein targeting by the signal recognition particle. *Biophysics*, *43*(1), 381-408.

Zhang, Y., Berndt, U., Gölz, H., Tais, A., Oellerer, S., Wölfle, T., et al. (2012). NAC functions as a modulator of SRP during the early steps of protein targeting to the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(16), 3027-3040.

Zhou, Y., Lee, J., Reno, C. M., Sun, C., Park, S. W., Chung, J., et al. (2011). Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nature Medicine*, *17*(3), 356-365.

7. 謝辞

この研究を進めるにあたり、多くの方にお世話になりました。まず初めに、研究を進めるにあたりディスカッションをしていただいた河野憲二教授に深く感謝いたします。河野先生には、海外ラボインターンシップ・プログラムへの参加にあたり許可していただいた事、国際学会での発表の機会を与えて下さった事など大変貴重な機会を与えていただきました。この場を借りて感謝を申し上げます。また、1年間と Skype での直接指導及びディスカッションをしていただいた柳谷耕太博士には論文作成にあたり多大なるご迷惑をおかけしました。柳谷博士のお陰で研究成果を論文としてまとめ、発表することが出来ました。この場を借りて感謝申し上げます。深尾陽一郎博士、藤原正幸博士、倉田理恵さんには XBP1 α の結合因子の MS 解析の際にお世話になりました。そして、河野研のスタッフの木俣行雄准教授、都留秋雄助教、斉藤美知子准教授、小池雅昭助教、芝陽子准教授、木俣有紀博士、赤沼啓志博士、山本洋平博士、門倉広准教授、土屋雄一さんには研究や就活など様々な面でお世話になりました。保田裕貴さん、曾川愛守栄博士には、日々の実験を行う上でのコツや夜中のディスカッションなどいろいろとお世話になりました。また、技術補佐の和田明澄さんや飯田純子さん、喜多愛さん、前川和美さん、川上由美子さんには実験補助や学会参加の度にいろいろとお世話になりました。この5年間の中で、河野研に入り、テニスや卓球などと色々と経験することができました。今後は経験を活かして進んでいきたいと思えます。皆様の今後のご活躍をお祈りいたします。