

博士論文

出芽酵母における高温ストレス下の Unfolded Protein
Response 制御

畑 竜也

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス領域 ストレス微生物科学研究室

(木俣 行雄 准教授)

令和4年9月10日

要旨

所属 (主指導教員)	バイオサイエンス領域 ストレス微生物科学研究室 (木俣行雄 准教授)		
氏名	畑 竜也	提出	令和4年9月10日
題名	出芽酵母における高温ストレス下の Unfolded Protein Response 制御		
<p>真核生物細胞の小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質の折り畳みが行われる細胞内小器官である。小胞体が機能不全となり、変性状態のタンパク質が小胞体に蓄積する状態を一般に小胞体ストレスと呼び、小胞体ストレスに対する防衛応答として、細胞は小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) を引き起こす。全ての真核生物において UPR は認められるが、UPR シグナル伝達の研究は、出芽酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) をモデル細胞としたものが先行してきた。出芽酵母では、UPR シグナルの起点となる小胞体ストレスセンサーとして、小胞体局在 I 型膜貫通タンパク質の Ire1 が中心的な役割を担う。小胞体ストレスとして小胞体内の変性タンパク質量が増加すると、それを引き金に Ire1 の小胞体内腔ドメインはホモ会合し、サイトゾル側ドメインの Ser/Thr キナーゼ活性を介して、分子間で自己リン酸化する (一方の Ire1 がホモ会合する他方の Ire1 をリン酸化する)。その結果、サイトゾル側の RNase ドメインが活性化し、標的 mRNA である <i>HAC1</i> mRNA をスプライシングする。<i>HAC1</i> mRNA は通常時には一つのイントロンを有しており、タンパク質に翻訳されない (前駆体型 <i>HAC1</i> mRNA)。一方、スプライシングされた <i>HAC1</i> mRNA (成熟型 <i>HAC1</i> mRNA) は転写因子である Hac1 タンパク質へと翻訳され、小胞体内在性分子シャペロンなどのコードする遺伝子の転写誘導を行う。</p> <p>小胞体ストレス応答の研究は、これまで多くの場合、ジチオトレイトール (DTT) やツニカマイシンを用い、人為的かつ強力に小胞体ストレスを誘導することにより進められてきた。一方で、実験室以外でも起こりえるどのような局面で小胞体ストレス応答が必要とされるかについては不明な点が多い。そこで、本研究では、高温ストレスに着目し、それらの問いにアプローチすることを目指した。</p> <p>Ire1 の活性化を評価する最も鋭敏な方法は、<i>HAC1</i> mRNA のスプライシングをモニターすることであるが、DTT やツニカマイシンなどの強力な小胞体ストレス誘導剤と異なり、他のストレスによる UPR は弱く、引き起こされるスプライシングも微弱である。そのため、<i>HAC1</i> mRNA スプライシングの評価に汎用されているノザンプロット法や前駆体型と成熟型 <i>HAC1</i> mRNA の競合 RT-PCR 法では検出が困難な場合もあった。そこで本研究ではまず、<i>HAC1</i> mRNA のエクソン接合部に特</p>			

異的に認識する qPCR プライマーを設計し、成熟型 *HAC1* mRNA のみが検出されるリアルタイム RT-PCR 法を開発した。それにより、成熟型 *HAC1* mRNA が少量でも、それを定量的に検出できた。本手法では、競合 RT-PCR 法では検出できない、非ストレス時のようなわずかな *HAC1* mRNA スプライシングも検出できた。さらに、強いストレス時の *HAC1* mRNA スプライシングは、競合 RT-PCR 法と同様の値を示したことから、本手法は、広範囲の *HAC1* mRNA スプライシングの検出に活用できることが示された。次いで我々は、この手法を用い、出芽酵母を増殖上限温度近く (39°C) で培養したとき、弱いながらも *HAC1* mRNA スプライシングが引き起こされることを見いだした。また、*IRE1* 遺伝子の破壊により、39°Cにおける出芽酵母の増殖が遅延した。したがって、高温により引き起こされる、タンパク質折り畳み不全に対する防衛応答としても、*Ire1* を軸とした小胞体ストレス応答機構が寄与することを示唆し、小胞体ストレス応答の生理的意義の一端を示すものであると考えた。

また、本研究では、高温ストレス下における *Ire1* のホモ会合状態を明らかにした。*Ire1* はホモ多量体を形成することにより強い RNase 活性を引き起こし、また、多量体形成が阻害されるように変異を導入した *Ire1* では、UPR が減弱することから、*Ire1* の多量体形成は正常な UPR シグナルに重要であると考えられている。一方、*Ire1* が二量体状態で弱く UPR を惹起するという報告もあり、多量体化 *Ire1* と二量体化 *Ire1* では、RNase としての活性化状態が本質的に異なると推察されるが、高温ストレス下の会合状態を始め、詳細は不明である。蛍光標識した *Ire1* (*Ire1*-GFP) の細胞内局在を観察した結果、39°C培養では、DTT 処理時に認められる点状の蛍光が観察されなかったことから、*Ire1* は多量体を形成せずに活性化していることが示唆された。本研究では、*Ire1* の C 末端にヘマグルチニンエピドープ (HA) を付加すると、二量体化 *Ire1* では全く活性を発揮せず、多量体化 *Ire1* でのみ *HAC1* mRNA スプライシングが起こることを明らかにし、HA 標識が *Ire1* の二量体状態と多量体状態を検出できる新たな手法になり得ることを明らかにした。本手法を用いて、高温ストレス下における *HAC1* mRNA スプライシングを評価したところ、非標識 *Ire1* では 39°C培養によりスプライシングの増加が認められたものの、*Ire1*-HA では高温ストレスによるスプライシング活性が消失した。したがって、高温ストレス下の *Ire1* は二量体状態で活性化することが示唆され、*Ire1*-GFP を用いた細胞内局在観察と一致する結果が得られた。本結果は、出芽酵母 *Ire1* が小胞体ストレスの種類に応じて、自身の活性を会合状態依存的に調節するという、出芽酵母における UPR 制御の新たな一面を見出したと考えられた。

緒言

真核生物細胞の細胞内小器官のひとつである小胞体では、新生分泌タンパク質や膜タンパク質の折り畳みが進められている。そして、これらタンパク質は小胞体にてジスルフィド結合や糖鎖付加を受けて成熟する。また、小胞体では膜脂質の生合成も進められる。小胞体機能不全は小胞体ストレスと呼ばれ、折り畳み不全な構造異常タンパク質の蓄積を伴うことが多い。小胞体ストレスは細胞の恒常性を破綻させ、時には様々な疾患の発症要因になるとされている。例えば、アルツハイマー病や糖尿病、脂質異常症と小胞体ストレスの関連が報告されており (Katayama et al., 2004; Cnop et al., 2012)、これら疾患の発症メカニズム解明や治療法開発において、小胞体ストレスの制御に関する研究は大きな意義を持つと期待されている。小胞体ストレスに対する防御応答として、真核生物は総じて大規模な遺伝子発現変動を引き起こす。これは小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) と呼ばれ、小胞体膜上に存在するストレスセンサータンパク質が制御する。構造異常タンパク質の再折り畳みや小胞体外への逆行性排出に関わるタンパク質をコードする遺伝子の発現が UPR によって誘導され、それにより、小胞体内の構造異常タンパク質が処理され、小胞体ストレスが低減する。また、これ以外の UPR 標的遺伝子として、出芽酵母で (*Saccharomyces cerevisiae*) では膜脂質生合成酵素群が知られており、UPR に伴う小胞体の伸展も小胞体ストレスの減弱に寄与することが知られている (Schuck et al., 2009)。

酵母から高等動植物に至る全ての真核生物において UPR は認められるが、UPR のシグナル伝達機構の研究は、出芽酵母をモデル生物としたものが先行してきた (Mori et al., 1993; Cox et al., 1993)。出芽酵母では、小胞体膜上に局在する I 型膜貫通タンパク質の Ire1 が小胞体ストレスに対するストレスセンサーとして中心的な役割を担っている。Ire1 は真核生物全般に保存されており、サイトゾル側ドメインに Ser/Thr キナーゼ活性と RNase 活性を司る領域を持つ (Shamu and Walter, 1996; Sidrauski and Walter, 1997)。Ire1 が小胞体ストレスにより活性化し、UPR 標的遺伝子が転写誘導されるまでの分子メカニズムを図 1 に示す。

小胞体内腔に構造異常タンパク質が蓄積すると、構造異常タンパク質が Ire1 の小胞体内腔ドメインに捕捉され、それを引き金に Ire1 はホモ会合する。そして、分子間で自己リン酸化が起き (ひとつの Ire1 分子が、ホモ会合している他の Ire1 分子をリン酸化する)、Ire1 は RNase としての活性を発揮する。一方、構造異常タンパク質の小胞体内蓄積だけでなく、膜脂質生合成の異常も小胞体ストレスになる。すなわち、膜脂質の構成成分であるイノシトールの欠乏、そして膜脂質代謝に関与する遺伝子の欠損により Ire1 は活性化するのである。これら脂質異常の検知には、Ire1 の膜貫通ドメインが寄与するとされ、興味深いことに、構造異常タンパク質の小胞体内蓄積に依存しないことが分かっている (Cox et al., 1997; Promlek et al., 2011; Halbleib et al., 2017)。

出芽酵母では、*HAC1* mRNA が Ire1 の RNase 活性依存的にスプライシングされる。

HAC1 mRNA は、1つのイントロンを挟む2つのエクソンからなり、Ire1によりスプライシングされることにより、前駆体型 *HAC1* mRNA (*HAC1^u* mRNA、“*u*”は uninduced を意味する)から翻訳可能な成熟型(スプライシング型) *HAC1* mRNA (*HAC1ⁱ* mRNA、“*i*”は induced を意味する)に変換される。*HAC1ⁱ* mRNA の翻訳産物である Hac1 タンパク質は転写因子として機能し、前述のような UPR 標的遺伝子の発現を誘導する (Cox and Walter, 1996; Travers et al., 2000; Kimata et al., 2006)。なお、UPR 標的遺伝子にはプロモーター上に UPR 応答領域 (UPR element (UPRE)) が見いだされることが多く、Hac1 タンパク質は UPRE に直接的に結合すると報告されている (Mori et al., 1992; Mori et al., 1996; Fordyce et al., 2012)。

出芽酵母はモデル生物として UPR のメカニズム解析に広く用いられ、上述のように、UPR 制御メカニズムについての理解が進んでいる。一方で、実験室以外でも想定されるどのような環境で UPR が働くのかについては、まだ解明途上である。実験室で出芽酵母の UPR を惹起する際には、主としてジスルフィド結合還元剤であるジチオトレイトール (DTT) や、小胞体でのタンパク質への糖鎖修飾を阻害する抗生物質であるツニカマイシンが用いられてきた。これらは小胞体ストレスを強く引き起こすため、Ire1 のホモ会合や自己リン酸化、そして *HAC1* mRNA スプライシングや UPR 標的遺伝子の発現変動を明確に捉えることができるが、生理的な環境下では起こり得ない過酷な条件であろう。近年、DTT やツニカマイシン以外の様々なストレスによっても UPR が引き起こされることが報告されている。例えば、生体機能に必要不可欠である亜鉛イオンを含まない培地にて培養した場合、出芽酵母は UPR を引き起こす (Nguyen et al., 2013)。また、環境汚染物質として知られるカドミウムも小胞体ストレスを惹起し、出芽酵母において Ire1 を活性化する (Le et al., 2016)。さらに、出芽酵母の培養過程で産生しうるエタノールも小胞体ストレスとなり、UPR が正常に起こることで生育が維持される (Miyagawa et al., 2014)。このように、自然界でも様々な環境に応答するために UPR が引き起こされると考えられるが、これらの他にどのような条件で UPR が生理的な寄与を示すのか全容は明らかになっていない。

そこで本研究では、実験室以外の状況でも起こりうるストレスとして高温環境に着目し、高温培養下における出芽酵母の UPR 制御について解析を行った。詳細は後述するが、本研究により、出芽酵母の増殖上限温度とされる 39°Cにおいて、Ire1 は活性化し、微弱ながらも生理的に意義のある UPR を引き起こすという、UPR 制御の新たな一面を明らかにした。また高温ストレス下では、Ire1 は二量体化状態で活性化し、DTT やツニカマイシンなどの強力な小胞体ストレス時で認められる多量体とは異なる会合状態で活性化することが示され、すなわち、小胞体ストレスの種類によって、Ire1 は自身の活性を会合状態依存的に調節しうるということが示唆された。本稿では、これら結果を2部構成でまとめ、第1章では高温培養時の UPR 制御について、第2章では高温ストレス下における Ire1 のホモ会合状態について報告する。

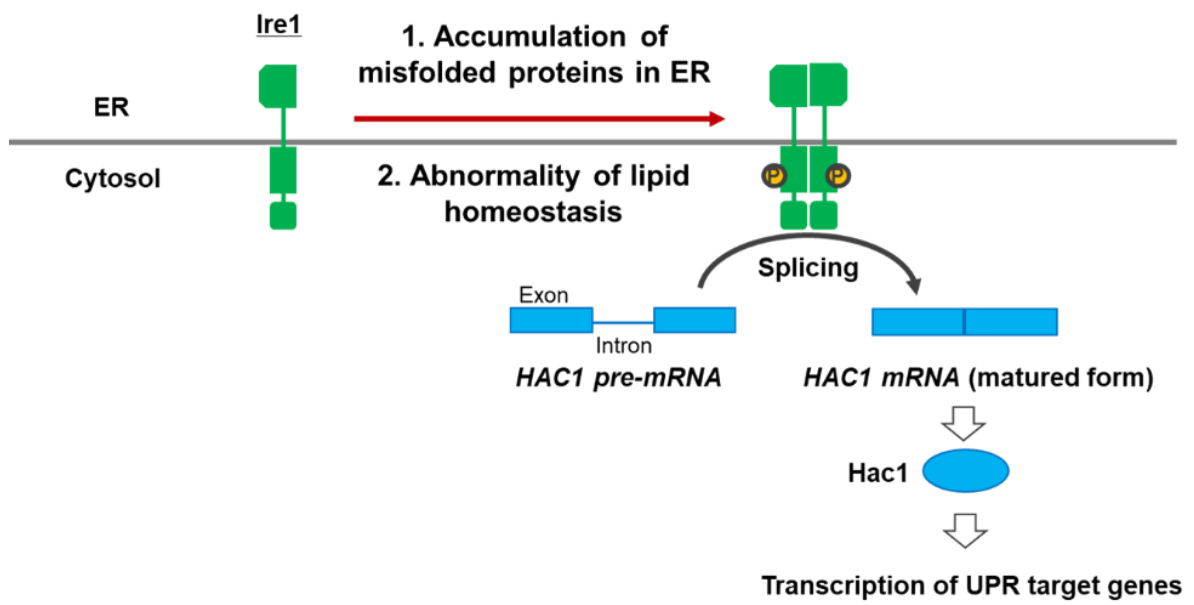


图 1. 出芽酵母 Ire1 の UPR 活性化機構

第 1 章

高温培養下における出芽酵母 UPR の寄与の解明

序論

細胞が高温に曝されると、内部のタンパク質の立体構造が変化し、本来の機能を失った変性タンパク質が生じる。変性タンパク質の蓄積は細胞にとって有害であり、分子シャペロンとして機能する熱ショックタンパク質の発現誘導など、細胞には高温ストレスに応じて働く防御機構が存在する。前述したように、UPRは小胞体への変性タンパク質蓄積に応じて引き起こされる現象であり、よって、小胞体でのタンパク質折り畳み状態が高温のため悪化すれば、UPRが惹起する可能性がある。シロイヌナズナでは高温ストレスにより Ire1 が活性化して UPR が引き起こされることが報告されているものの (Deng et al., 2011)、動物細胞や出芽酵母においては、高温での培養により UPR が惹起するという報告は無い。そこで本研究では、高温環境下における UPR の寄与を明らかにするために、本研究室でも用いられている出芽酵母実験室標準株の増殖上限温度である 39°Cでの培養時における UPR について検討した。

前ページで記したように、出芽酵母では様々なストレスにより UPR が引き起こされることが明らかとなっている。DTT やツニカマイシンで強力に小胞体ストレスを与えた場合に比べ、他のストレスによる UPR は概して弱く、検出が困難な場合もあった。そこで本研究ではまず、微弱な UPR でも感度良く定量的に評価できる実験手法の開発を試みた。出芽酵母の UPR では Ire1 による *HAC1* mRNA のスプライシングが最初のステップであるため、*HAC1* mRNA のスプライシング量をモニターすることが、UPR シグナルの評価において最も直接的かつ鋭敏な方法であると考えられる。本研究では、スプライシング型 *HAC1* mRNA (*HAC1^s* mRNA) のみを感度良く検出できる定量的 RT-PCR 法を確立した。そして、その手法を用いて、高温培養下における *HAC1* mRNA スプライシングを評価し、高温ストレスに応じた出芽酵母の UPR 制御を明らかにした。

材料と方法

出芽酵母菌株

実験に使用した出芽酵母菌株を表 1 に示す。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) *IRE1* 遺伝子破壊株 Y11907 (*MAT α ura3- Δ 0, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, lys2- Δ 0, ire1::kanMX4*) は European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional analysis (EUROSCARF, <http://www.euroscarf.de>) から入手した。*HIS3* 選択マーカーを持つ centromeric プラスミドである pRS313 に *IRE1* 遺伝子が導入されたプラスミド pRS313-*IRE1* にて Y11907 株を形質転換することより得た株を、野生型 *IRE1* 遺伝子株 (*IRE1+*) とした (Y11907[pRS313-*IRE1*])。 *IRE1* 遺伝子欠損株 (*ire1 Δ*) については、空ベクター pRS313 にて Y11907 株を形質転換することにより取得した (Y11907[pRS313])。また、Kimata 等および Tran 等 (Kimata et al., 2004; Tran et al., 2019) の方法に従い、in vivo gap repair 法を用い、変異導入された pRS313-*IRE1* を有する Y11907 株を作出し、Ire1 部分欠損体株 (Δ III) および点変異体株 (V535R) とした (Y11907[pRS313-*IRE1*(Δ III)]、Y11907[pRS313-*IRE1*(V535R)])。なお、 Δ III 変異 Ire はアミノ残基 253-272 を欠く。

ゲノム上の *HAC1* 遺伝子 (前駆体型 *HAC1* mRNA (*HAC1^u*) をコード) に対してイントロン配列を欠損させる変異を導入した恒常的 *HAC1ⁱ* 発現株 (YKY1002) は、先行研究 (Kimata et al., 2006) で作製されたものを使用した。

また、本研究では、*IRE1* 遺伝子破壊株として、KMY1015 (*MAT α leu2-3,112 ura3-52 his3- Δ 200 trp1-901 lys2-801 ire1::TRP1*) (Mori et al., 1996) も使用した。野生型 *IRE1* 遺伝子株 (*IRE1+*) および *IRE1* 遺伝子欠損株 (*ire1 Δ*) は、pRS313-*IRE1* もしくは pRS313 にて KMY1015 株を形質転換することにより作製した (KMY1015[pRS313-*IRE1*]、KMY1015[pRS313])。

表 1. 実験に用いた出芽酵母菌株一覧

出芽酵母株名	遺伝子型または株の概要
Y11907	<i>MATα ura3-Δ0, leu2-Δ0, his3-Δ1, lys2-Δ0, ire1::kanMX4</i> (http://www.euroscarf.de)
Y11907[pRS313- <i>IRE1</i>]	pRS313- <i>IRE1</i> にて Y11907 株を形質転換することより得た株。野生型 <i>IRE1</i> 遺伝子株 (<i>IRE1+</i>) として使用
Y11907[pRS313]	pRS313 にて Y11907 株を形質転換することより得た株。 <i>IRE1</i> 遺伝子欠損株 (<i>ire1Δ</i>) として使用
Y11907[pRS313- <i>IRE1</i> (Δ III)]	In vivo gap repair 法により、Y11907[pRS313- <i>IRE1</i>]に変異導入した株。Ire1 アミノ残基 253-272 を欠く
Y11907[pRS313- <i>IRE1</i> (V535R)]	In vivo gap repair 法により、Y11907[pRS313- <i>IRE1</i>]に変異導入した株。Ire1 アミノ残基 535 のバリンをアルギ

	ニンヘ置換
YKY1002	ゲノム上の <i>HAC1</i> 遺伝子に対してイントロン配列を欠損させる変異を導入した株 (Kimata et al., 2006)
KMY1015	<i>MAT α leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 ire1::TRP1</i> (Mori et al., 1996)
KMY1015[pRS313-IRE1]	pRS313-IRE1 にて KMY1015 株を形質転換することにより得た株。野生型 <i>IRE1</i> 遺伝子株 (<i>IRE1+</i>) として使用
KMY1015[pRS313]	pRS313 にて KMY1015 株を形質転換することにより得た株。 <i>IRE1</i> 遺伝子欠損株 (<i>ire1Δ</i>) として使用

菌体の培養およびストレス処理

特記無き場合、本研究では、菌株の栄養要求性に基づきアミノ酸やウラシルを添加した最小 (SD) 培地 (2% glucose、0.67% Difco yeast nitrogen base without amino acids (YNB w/o AA)) を用い、30°C で通気攪拌 (約 164 rpm) することにより出芽酵母細胞を培養した。

「結果」の項で示した実験においては、前培養として、増殖が定常期 (培地菌体濁度 (OD₆₀₀) として > 2.0 以上) になるまで、30°C で菌体を培養した。その培養液を新たな SD 培地で希釈し (OD₆₀₀ として約 0.2 へ希釈)、さらに培養を続けた (本培養)。高温培養実験では、前培養は 30°C で行い、SD 培地で希釈後の本培養から、39°C のウォーターバスシェーカーにて培養した。DTT 処置実験では、本培養にて対数増殖期になるまで 30°C で培養した後 (約 4 時間)、DTT ストック溶液を最終濃度 0.5、1 および 3 mM となるように添加し、さらに 30 分間培養した。DTT ストック溶液は DTT (ナカライテスク) を 1 M となるように水に溶解させたものを使用した。

培地中の細胞量は、600 nm における培地菌体濁度 (OD₆₀₀) を spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu) を用いて測定することにより評価した。

形質転換

出芽酵母を YPD 培地 (1% Yeast extract、2% Peptone、2% Glucose) にて 30°C 一晩培養後、培養液 1 mL を新たな YPD 培地 20 mL で希釈し、さらに 4 時間攪拌培養した。その後、3000 rpm、1 分間遠心分離することにより集菌し、5 mL の 0.1 M 酢酸リチウム/Tris-EDTA (TE) (pH 8.0) 溶液で懸濁させた。再度の遠心分離 (3000 rpm、1 分間) による集菌後、1 mL の 0.1 M 酢酸リチウム/TE 溶液に再懸濁させ、30°C、60 rpm で 60 分間振とうした。次いで、その細胞懸濁液 100 μL、Salmon sperm DNA 溶液 5 μL、形質転換に用いる DNA 溶液 (計約 1 μg) を混合し、30°C、30 分間静置した。続いて、40% PEG4000/0.1 M 酢酸リチウム/TE 溶液を 0.8 mL 添加し、30°C で 1 時間静置

した。その後、菌体懸濁液約 0.1 mL を、形質転換体選択用に栄養を加えた SD 寒天培地に塗布し、30°C で 2-3 日間培養した。

RNA 抽出および RT-PCR 反応

Hot phenol 法 (Collart and Oliviero, 1993) により、酵母細胞から総 RNA を精製・回収した。逆転写反応は、1 µg の RNA を基質として、PrimeScript™ II Reverse Transcriptase kit (Takara) および oligo (dT)₁₈ primers を用いて、65°C、5 分間の加温後、①30°C、10 分、②42°C、30 分、③99°C、5 分で行い、cDNA 溶液を得た。次いで、リアルタイム PCR 以外の PCR においては、2 µL の cDNA 溶液を鋳型とし、10 µM プライマーセット (表 2) 各 1 µL、10x PCR buffer 2.5 µL、2.5 mM dNTP 溶液 2 µL、KAPA Taq DNA polymerase (Kapa Biosystem) 0.13 µL および水 16.37 µL を混和し、95°C、5 分間の加温後、①94°C、30 秒、②54°C、30 秒、③72°C、60 秒のステップを 25 サイクル行った。PCR 産物を臭化エチジウム含有 2% アガロースゲルで電気泳動し、Gel documentation system- E-Box CX5 (Vilber) または ChemiDoc™ imaging system (BioRad) を用いて撮影した。

競合 PCR では、電気泳動ゲルの画像イメージにおける前駆体型 *HAC1* mRNA (*HAC1^u*) および *HAC1ⁱ* の PCR バンド強度を ImageJ ソフトウェアにより定量し、以下の式に従い、*HAC1* mRNA スプライシング効率 (*HAC1* mRNA splicing efficiency) を算出した。

$$HAC1 \text{ mRNA スプライシング効率 (\%)} = \frac{HAC1^i \text{ バンド強度} \times 100}{HAC1^u \text{ バンド強度} + HAC1^i \text{ バンド強度}}$$

表 2. プライマー配列

プライマー	配列 (5' -> 3')	使用目的
Forward-1	ACCTGCCGTAGACAACAACA	<i>HAC1ⁱ</i> 特異的 RT-PCR
Reverse-1	GACTGCGCTTCTGGATTACG	同上
Reverse-2	CTGCGCTTCTGGATTACGCC	同上
Reverse-3	GCGCTTCTGGATTACGCCAA	同上
Reverse-4	CTGACTGCGCTTCTGGATTA	同上
Reverse-5	ACCTGACTGCGCTTCTGGAT	同上
Reverse-6	AAACCTGACTGCGCTTCTGG	同上
Forward-2	TACAGGGATTCCAGAGCACG	競合 PCR
Reverse-7	TGAAGTGATGAAGAAATCATTCAATTC	同上

リアルタイム RT-PCR (RT-qPCR)

cDNA 溶液 1 μ L、表 3 に示すプライマーセット (10 μ M) 各 0.8 μ L、2x TB Green[®] Premix Ex Taq II (Takara) 10 μ L および水 7.4 μ L を混和し、LightCycler 96 (Roche) を用いて、以下の条件にて PCR を行った。

- Pre-incubation : 95°C、5 分
- Amplification :
 - ◇ 95°C、10 秒
 - ◇ 60°C、10 秒
 - ◇ 72°C、20 秒
- Melting : 95°C、5 分

HAC1 mRNA スプライシング量の指標として、総 *HAC1* 量に対する *HAC1ⁱ* 量を、以下の式により算出した。*HAC1* mRNA スプライシング量は、ストレス無処置の野生型株の値を 1 とした相対値で表示した。

$$\text{Relative } HAC1 \text{ mRNA splicing efficiency} = 2^{(\text{Ct for total } HAC1) - (\text{Ct for } HAC1^i)}$$

表 3. プライマー配列

プライマー	配列 (5' -> 3')	使用目的
Forward-1	ACCTGCCGTAGACAACAACA	<i>HAC1ⁱ</i> の RT-PCR
Reverse-5	ACCTGACTGCGCTTCTGGAT	同上
Forward-3	GCGTCGGACCAAGAGACTT	Total <i>HAC1</i> (<i>HAC1ⁱ</i> および <i>HAC1ⁱ</i>) の RT-PCR
Reverse-8	TCGTCGACTCTGGTACATTTTC	同上

統計解析

Y11907 株の形質転換においては、同じプラスミドが導入された形質転換体を 3 クローンずつ得ており、図 9、図 10、図 11 で示した実験データは、それら 3 クローンから得られた数値の平均値および標準偏差を示している (Biological triplicate)。有意差検定は、Microsoft Excel 2016 を用いて、two-tailed unpaired Student's *t*-test により行った。

結果

1. *HAC1* mRNA スプライシング評価系の構築

1.1. *HAC1ⁱ* mRNA 特異的 RT-PCR に向けたプライマー設計

スプライシング型 *HAC1* mRNA (*HAC1ⁱ*) のみを感度良く検出できる定量的 RT-PCR 法の確立を目指し、まず、*HAC1ⁱ* 特異的な PCR が可能と予想されるプライマー、すなわち *HAC1* mRNA の第1エクソンと第2エクソンの接合部にハイブリダイズする種々のプライマーを設計した (図2)。次いで、これらプライマーを用いて、RT-PCR により *HAC1ⁱ* 特異的な PCR 増幅を確認した。DTT 処理した *IRE1+* 株および恒常的に *HAC1ⁱ* mRNA を発現している *HAC1ⁱ* 株 (Kimata et al., 2006) は、いずれも *HAC1ⁱ* mRNA が存在しているため、そこから調製した RNA サンプルを用いると、設計したプライマーセットで PCR 増幅が起こると期待される。一方、*ire1Δ* 株では *HAC1* のスプライシングが起こらないため、設計したプライマーにより RT-PCR が起こらないはずである。RT-PCR および電気泳動の結果、Reverse プライマーとして No. 1、4 あるいは 5 を用いたとき、*IRE1+* 株および *HAC1ⁱ* 株から調製した RNA を鋳型とした場合は PCR バンドが認められ、*ire1Δ* 株の RNA では認められなかった (図3)。また、そのサイズも予想通りであった。一方、Reverse プライマーとして No. 2、3 あるいは 6 を用いたときには、*IRE1+* 株、*HAC1ⁱ* 株に加えて、*ire1Δ* 株から調製した RNA においても PCR 増幅が認められたことから、これらは *HAC1ⁱ* 特異的なプライマーにはならないと考えられた (図3)。これら結果より、Reverse プライマー No. 1、4 および 5 により *HAC1ⁱ* 特異的な RT-PCR が可能であると考えられた。

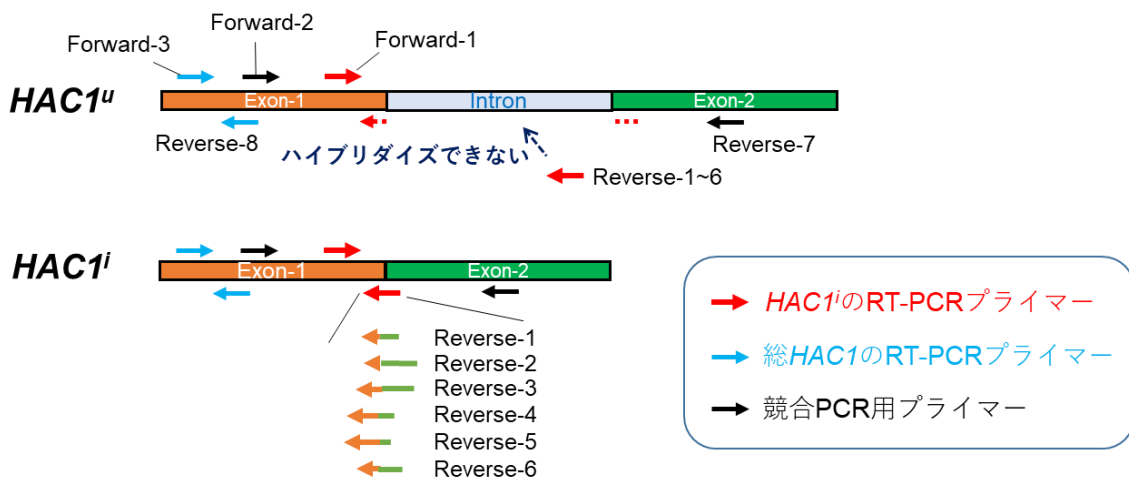


図2. 今回の研究で用いたプライマーセット

HAC1ⁱ 特異的な PCR 増幅用に設計されたプライマーを赤矢印で示す。Forward プライマー (Forward-1) はエクソン-1、すなわち *HAC1^u* と *HAC1ⁱ* の両方にハイブリダイズする。Reverse プライマー (Reverse-1~6) はエクソン-1 とエクソン-2 の接合部にハイブリダイズするため、*HAC1ⁱ* 専用のプライマーになると想定される。青色矢印は *HAC1^u* と *HAC1ⁱ* を同様に増幅し、総 *HAC1* 量の測定に使用

できるプライマーセットである(Forward-3 および Reverse-8)。黒色矢印のプライマーセット(Forward-2 および Reverse-7)でも $HAC1^i$ と $HAC1^f$ の両方を増幅できるが、産物 DNA のサイズが異なるため、 $HAC1^i$ と $HAC1^f$ の競合 PCR となる。

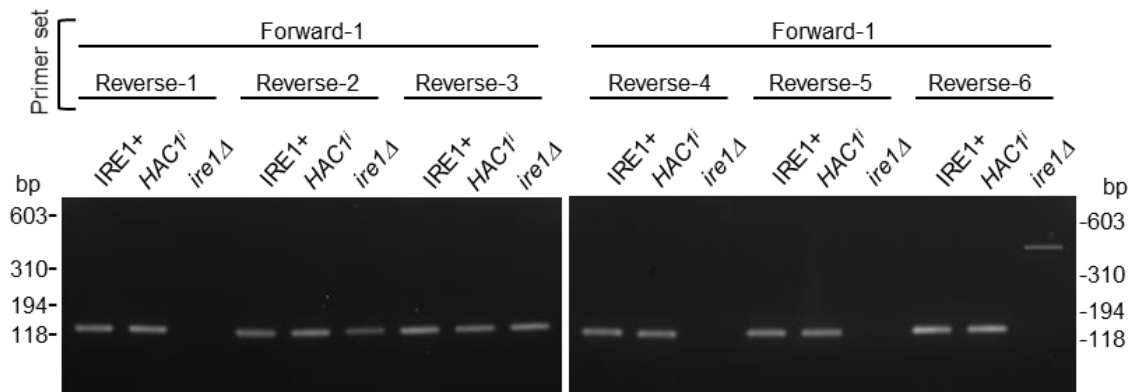


図 3. $HAC1^i$ mRNA 特異的な RT-PCR の検証

3 mM DTT 処理した $IRE1^+$ 株(KMY1015[pRS313-IRE1])から得られた RNA ($IRE1^+$)、 $HAC1^i$ 株 (YKY1002)から得られた RNA ($HAC1^i$)、および $ire1\Delta$ 株(KMY1015[pRS313])から得られた RNA ($ire1\Delta$)をそれぞれ鋳型とし、設計した Forward プライマー(1 種)、Reverse プライマー(6 種)を用いて RT-PCR を行った。その後、2%アガロースゲル電気泳動に供した。

1.2. リアルタイム RT-PCR の直線性の確認

続いて、設計したプライマーセット (Forward-1/Reverse-5) を用いてリアルタイム RT-qPCR を行い、定量的な PCR が可能かどうかを検証した。また、総 $HAC1$ mRNA 測定のため、第 1 エクソン上の配列にハイブリダイズする Forward および Reverse プライマーセット (Forward-3/Reverse-8) を設計し (図 2)、その定量性も検証することとした。 $HAC1^i$ 株および $IRE1^+$ 株から得られた RNA をそれぞれ鋳型として poly(dT) オリゴヌクレオチドプライマーを用いて cDNA を合成し、各 cDNA を 4 倍ずつ段階的に希釈後、設計したプライマーセットを用いたリアルタイム PCR を行った。その結果、 $HAC1^i$ mRNA および総 $HAC1$ mRNA のいずれにおいても、cDNA 量と Ct 値に良好な直線性が認められ ($R^2 > 0.99$)、広範囲な量の鋳型において定量的 PCR が可能であると考えられた (図 4)。なお、以降の実験では、各サンプルにおける総 $HAC1$ 量にて $HAC1^i$ 量を補正し、それによって得られた相対的 $HAC1^i$ mRNA 量を、相対的 $HAC1$ mRNA スプライシング効率(Relative $HAC1$ mRNA splicing efficiency)とした。その算出は、リアルタイム RT-PCR により得られた Ct 値を用いて、以下の式により行うことができる。

$$\text{Relative } HAC1 \text{ mRNA splicing efficiency} = 2^{(Ct \text{ for total } HAC1) - (Ct \text{ for } HAC1^i)}$$

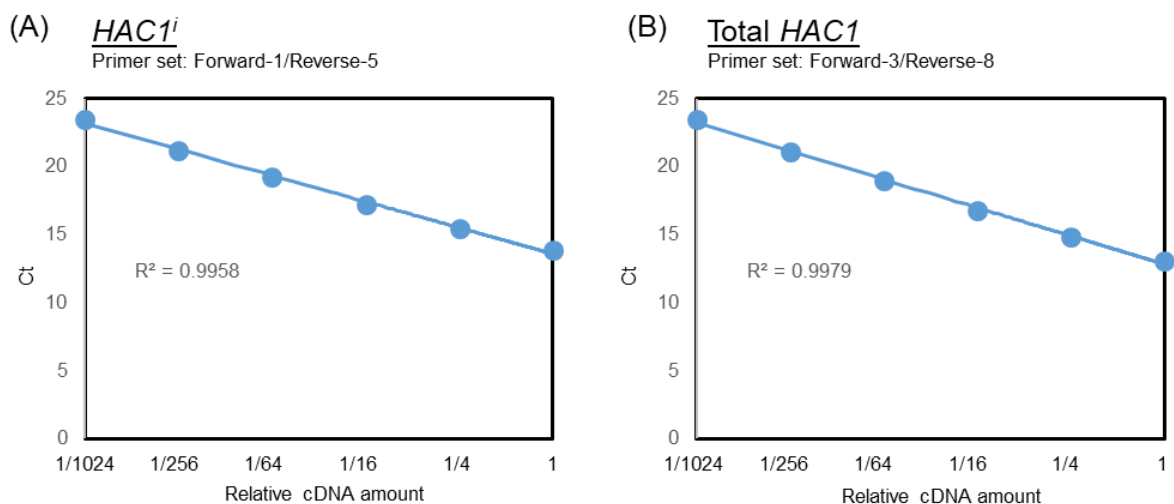


図 4. リアルタイム RT-PCR 法の直線性

*HAC1ⁱ*株(YKY1002)から得られた RNA(A)および 3 mM DTT 処理した *IRE1+*株(KMY1015[pRS313-*IRE1*])から得られた RNA(B)を逆転写反応(poly(dT)プライマー)に供して得られた cDNA サンプルを 4 倍ずつ段階的に希釈して鋳型とし、図に示したプライマーセットを用いてリアルタイム PCR を行った。

1.3. 検出感度の評価

今回開発したリアルタイム RT-PCR 法では、*HAC1ⁱ* mRNA のみを定量できる。よって、その検出感度が高ければ、微弱な *HAC1* mRNA スプライシングも検知できることとなる。そのことを実証するため、非ストレス条件下で培養、あるいは DTT ストレス (3mM で 30 分間処理) を与えた *IRE1+*株、そして非ストレス条件で培養した *ire1Δ* 株から得られた総 RNA サンプルについて、競合 RT-PCR 解析とリアルタイム RT-PCR 解析でのデータを比較した。なお、競合 RT-PCR 法は *HAC1* mRNA スプライシングを評価するにあたって、最も汎用されている手法である。競合 RT-PCR 法では、RNA サンプルを poly(dT)プライマーにより cDNA 化した後、*HAC1* mRNA の第 1 エクソンにハイブリダイズする forward プライマーおよび第 2 エクソンにハイブリダイズする reverse プライマーを用いることにより (図 2, Forward-2/Reverse-7)、*HAC1^u* および *HAC1ⁱ* をともに増幅し、長さが異なる 2 種類の PCR 産物が得られる。図 5 で示すように、競合 RT-PCR 解析においては、*ire1Δ* 株だけでなく、非ストレス条件で培養された *IRE1+*株からも、*HAC1ⁱ* に相当するシグナルは観察されなかった。一方、図 6 で示したリアルタイム PCR では、*HAC1ⁱ* のみを増幅する PCR プライマーセット、および、総 *HAC1* 定量用の PCR プライマーセットを用いており、それらの有用性は上述のとおり検証されている。総 *HAC1* 定量用の PCR プライマーセットを用いた場合は、期待通り、すべてのサンプルにおいて、ほぼ同等の増幅曲線となった。一方、*HAC1ⁱ* 特異的 PCR プライマーセットを用いた場合は、*ire1Δ* 株 RNA からは、増幅曲線の立ち上がりが全く認められず、この PCR プライマーセットの特異性をリアルタイム PCR

においても実証することが出来た。また、DTT 処理 *IRE1+*株から得た RNA では、早い PCR サイクルで増幅曲線は立ち上がり、非ストレス *IRE1+*株から得た RNA においても、さらに PCR サイクルを経ることにより、増幅曲線の立ち上がりが認められた。すなわち、非ストレス条件で培養された *IRE1+*株においても、わずかながら *HAC1* mRNA はスプライシングされており、リアルタイム RT-PCR 法ではそれを捉えることが出来るのである。

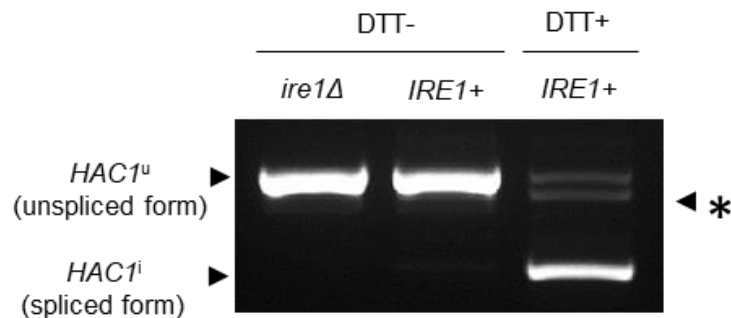


図 5. 競合 RT-PCR 法による *HAC1* スプライシング評価

DTT 無処理(DTT-)または 3 mM DTT (30 分間) 処理(DTT+)した *IRE1+*株(KMY1015[pRS313-*IRE1*])、および無処理の *ire1Δ* 株(KMY1015[pRS313])から RNA を抽出し、RT-PCR に供した。* *HAC1ⁱ* PCR 増幅の際に出現するPCR副反応物。

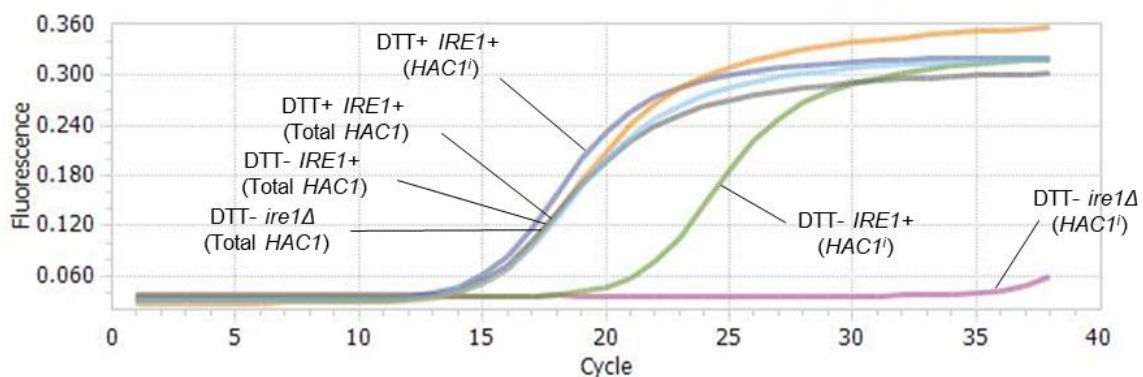


図 6. リアルタイム RT-PCR 法による *HAC1* スプライシング評価

図 5 で用いたものと同じ RNA サンプルを対象に、リアルタイム RT-PCR 解析を行い、増幅曲線を示した。*HAC1ⁱ* 特異的 PCR には、プライマーセット Forward-1/Reverse-5、総 *HAC1* PCR にはプライマーセット Forward-3/Reverse-8 を用いている。

1.4. 競合 PCR 法との比較

競合 RT-PCR 法では、 $HAC1^u$ および $HAC1^i$ の各バンドの強度から $HAC1$ mRNA スプライシング効率 ($HAC1$ mRNA splicing efficiency (%)) を計算する ($HAC1^i$ バンド強度 $\times 100 / [HAC1^u$ バンド強度 + $HAC1^i$ バンド強度])。続いて私は、競合 RT-PCR 法と本研究で確立したリアルタイム RT-PCR 法から算出される $HAC1$ mRNA スプライシングレベルを比較することにした。そして、0~3 mM の DTT にて 30 分間処理された $IRE1+$ 株から得た RNA サンプルを用いて、競合 RT-PCR 解析およびリアルタイム RT-PCR 解析を行った。図 7 に示すように、過去の報告と同様、DTT 濃度依存的な $HAC1^u$ 量の低下および $HAC1^i$ 量の増加、すなわち $HAC1$ mRNA スプライシングレベルの上昇が認められた。そして、競合 RT-PCR 法でのバンド強度から算出された $HAC1$ mRNA スプライシング効率 (%) を縦軸、リアルタイム RT-PCR によって得られた相対的 $HAC1$ mRNA スプライシング効率を横軸としてプロットしたところ、0.5~3 mM の範囲において両値は高い相関を示した ($R^2 = 0.988$) (図 8)。

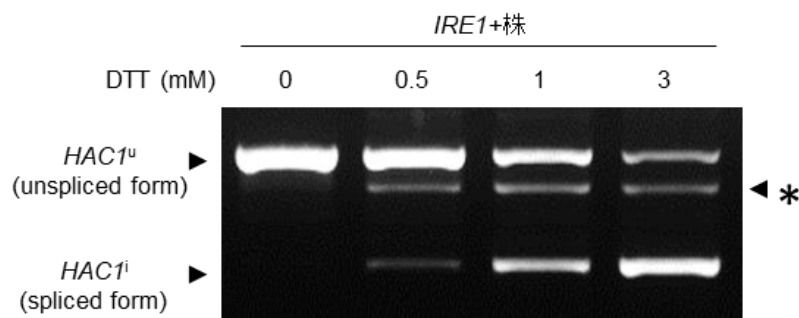


図 7. 競合 RT-PCR 法による DTT 処理細胞の $HAC1$ mRNA スプライシング効率の評価

$IRE1+$ 株(KMY1015[pRS313-IRE1])を DTT 無処理または 0.5、1 および 3 mM DTT にて 30 分間処理後、総 RNA を回収し、競合的 RT-PCR 解析を行った。* $HAC1^i$ PCR 増幅の際に出現する PCR 副反応物。

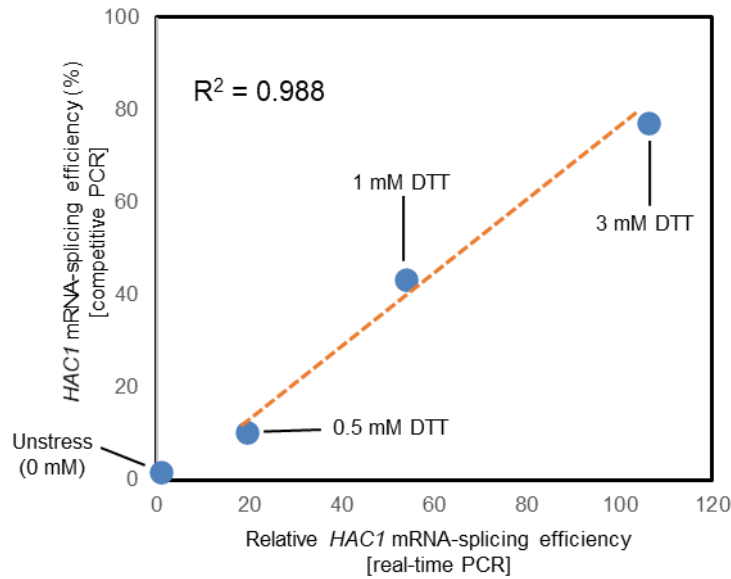


図 8. 競合 RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法による *HAC1* mRNA スプライシングレベルの比

図 7 の解析にて調製した RNA サンプルについて、競合的 RT-PCR 解析に加え、リアルタイム RT-PCR を行い、それぞれの手法により得られた *HAC1* mRNA スプライシング効率を同一グラフ上にプロットした。なお、リアルタイム RT-PCR は、DTT 無処理株の値を 1 とした相対値で示した。近似線および決定係数 (R^2) は 0.5~3 mM の値を用いて算出した。

2. 高温ストレスに応じた出芽酵母 UPR の制御

2.1. 高温培養下における *HAC1* mRNA スプライシング

本研究で確立したリアルタイム RT-PCR 法を用いて、高温培養下における *HAC1* mRNA スプライシングを検討した。*IRE1+*株を 30°C で前培養後、30°C で継続培養、または 39°C に培養温度を上昇し、その後の *HAC1* mRNA スプライシングをリアルタイム RT-PCR 法により検出した (39°C 培養サンプルにおいては、温度上昇後 12 時間までの経時変化を追っている)。その結果、30°C 培養時と比較して、39°C 培養時において *HAC1* mRNA スプライシングが 2 倍程度に増加し、UPR が誘導されていることが示された (図 9)。なお、同一サンプルを用いて競合 RT-PCR 法により *HAC1* スプライシングを評価したところ、30°C および 39°C いずれのサンプルにおいても、*HAC1ⁱ* のバンドが観察されず、高温培養下のスプライシングの検出には、本研究で確立したリアルタイム RT-PCR のような高感度な実験手法が必要であると考えられた (図 10)。

次に私は、39°C 高温培養下における微弱なスプライシングが生理的意義を有するかどうかを調べるため、増殖に着目した。そのため、*IRE1+*株および *ire1 Δ*株をそれぞれ 30°C で前培養後、30°C もしくは 39°C に培養温度を上昇させ、経時的に培地の光学密度 (OD₆₀₀) を測定した。その結果、30°C 培養下では、*IRE1* の有無に関わらず同程度の増殖速度であった一方、39°C 培養下では、*IRE1+*株と比較して *ire1 Δ*株の増殖の

遅延が認められた (図 11)。すなわち、39°C培養下で引き起こされる UPR は、微弱ではあるものの、高温ストレスに曝された出芽酵母の増殖機能維持に寄与するのである。

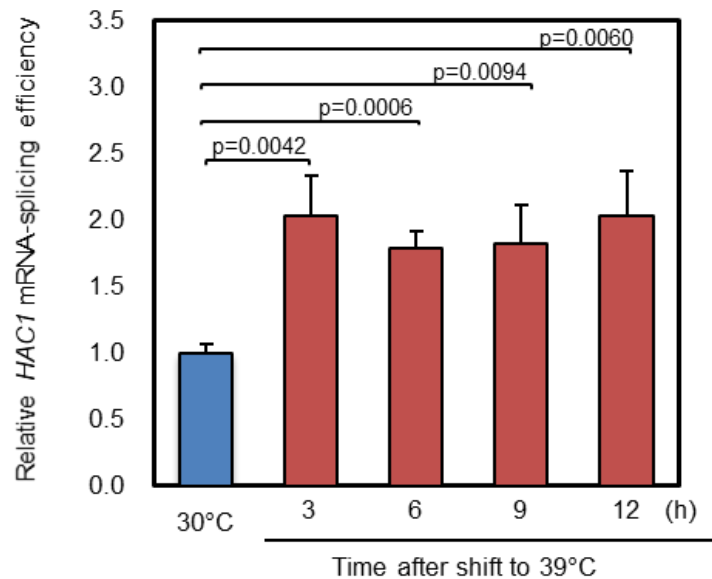


図 9. 39°C培養下の *HAC1* mRNA スプライシング

*IRE1+*株(Y11907[pRS313-*IRE1*])を 30°Cで前培養後、30°C(3 時間)または 39°C(3~12 時間)で培養し、総 RNA サンプルをリアルタイム RT-PCR 解析に供した。なお、相対 *HAC1* mRNA スプライシング効率については、30°C培養時のものを 1.0 とした(平均値±標準偏差、n=3)。

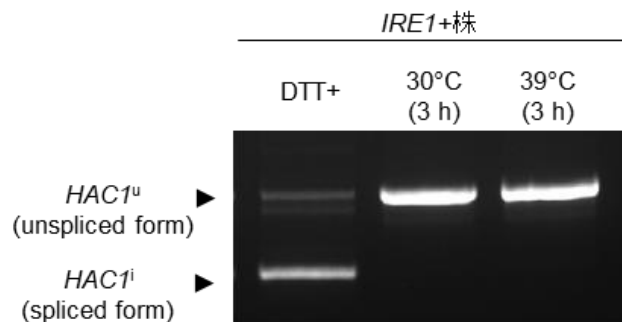


図 10. 競合 PCR による 39°C培養下の *HAC1* mRNA スプライシング評価

図 9 にて解析したのと同じ総 RNA サンプルおよび 3 mM DTT(30 分間)処理(DTT+)した *IRE1+*株(Y11907[pRS313-*IRE1*])から得られた総 RNA サンプルを、競合 RT-PCR 解析に供した。

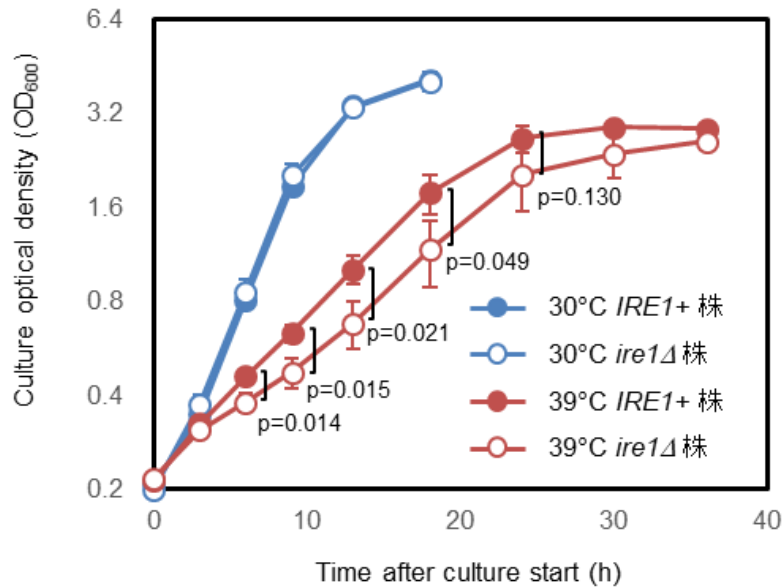


図 11. *IRE1* 遺伝子欠損による 39°C 培養下での増殖遅延

IRE1+ 株(Y11907[pRS313-*IRE1*])と *ire1Δ* 株(Y11907[pRS313])をそれぞれ 30°Cにて前培養後、30°C および 39°Cで培養し、培地濁度を経時的に測定した。値は各時点での平均値±標準偏差(n=3)とし、縦軸は対数で表示した。

2.2 高温培養下の Ire1 活性化メカニズム

緒言に記したように、構造異常タンパク質の小胞体内蓄積(経路①)および膜脂質のホメオスタシス異常(経路②)により Ire1 は活性化され、これら二つの経路においては、Ire1 がストレスを感知するメカニズムが異なることが分かっている。そこで、39°C培養下で認められた *HAC1* mRNA スプライシングの上昇が、どちらの経路を介したものであるか、調べることにした。小胞体内腔ドメインの部分欠失変異(Δ III 変異)を有する Ire1 変異体は、経路①による活性化に不全を来とし、一方、経路②は正常に動く。一方、Ire1 膜貫通ドメインの点変異 V535R は、経路②のみ妨害する(Tran et al. 2019)。そこで本研究では、野生型 *IRE1* 遺伝子を有する *IRE1+* 株に加え、*IRE1* 遺伝子変異体株 (Δ III、V535R) を用い、39°C培養時の *HAC1* mRNA スプライシングをリアルタイム RT-PCR 法にて評価した。その結果、V535R *IRE1* 株での *HAC1* mRNA スプライシングは、30°C培養下においては野生型と比較して低く、そして、39°C培養により増加した。一方、 Δ III *IRE1* 株では 39°C培養により *HAC1* スプライシングの増加が認められず、むしろ低下した(図 12)。本結果から、高温ストレスは小胞体内の構造異常タンパク質の蓄積を引き起こし、それが Ire1 の活性化に繋がると考えられた。

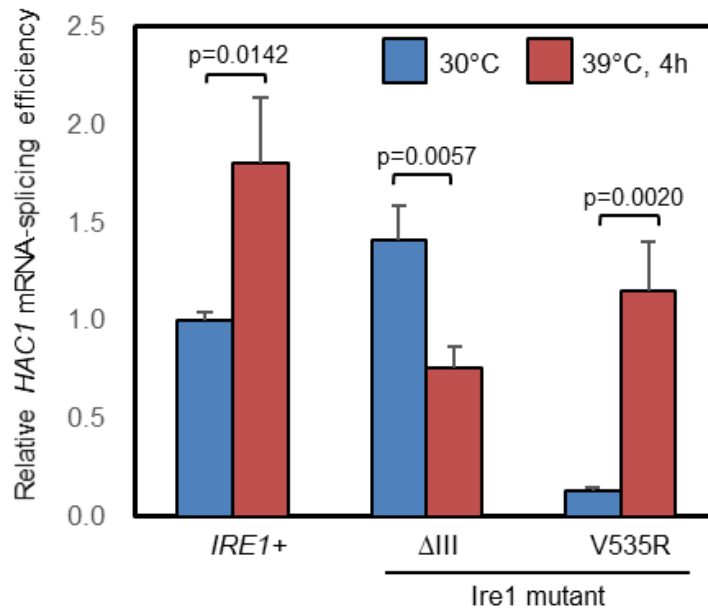


図 12. Ire1 変異体における 39°C 培養下の HAC1 mRNA スプライシング

IRE1+ 株 (Y11907 [pRS313-IRE1]) (*IRE1+*) およびその Δ III 変異体 (Δ III) と V535R 変異体 (V535R) を 30°C で前培養後、30°C または 39°C で 4 時間培養した。その後、総 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 解析に供した。なお、相対 HAC1 mRNA スプライシング効率については、*IRE1+* 株 30°C の値を 1.0 とした (平均値 \pm 標準偏差, n=3)。

考察

本研究では、出芽酵母において微弱な UPR を評価するために、リアルタイム RT-PCR 法により *HAC1*ⁱ mRNA を特異的かつ高感度に定量できる実験手法を開発した。小胞体ストレスに応じて Ire1 が活性化すると、*HAC1* mRNA がスプライシングされ、その下流の事象として、Hac1 タンパク質が生じ、多くの UPR 標的遺伝子の発現が誘導される。UPR の惹起を調べる手法としては旧来から、UPR 標的遺伝子の発現量のモニターが行われてきた。例えば、最も良く知られた UPR 標的遺伝子 *KAR2* がコードする小胞体分子シャペロン BiP は、そもそもの発現量が高く、タンパク質レベルでも mRNA レベルでも検出が容易であり、UPR のマーカーとして汎用されてきた。しかし、*KAR2* はプロモーター領域に UPRE だけでなく熱ショック応答エレメントも有しており (Kohno et al., 1993)、BiP の発現量増大が UPR を反映しない場合がある。また、*HAC1* mRNA の翻訳効率が低い場合、Ire1 が活性化して *HAC1* mRNA スプライシングが起きているにも関わらず、UPR 標的遺伝子の発現は抑えられている (Uppala et al., 2021)。したがって、Ire1 活性化の直下の反応である *HAC1* mRNA スプライシングが、UPR を評価するうえで最も直接的かつ鋭敏な指標であろう。

しかし、そのための手法として最も頻用されている競合 RT-PCR 法では、非ストレス下や高温ストレス下の微弱な *HAC1* mRNA スプライシングを検知できなかった (図 5 および図 10)。また、*HAC1* mRNA スプライシングをモニターするために、過去には総 RNA サンプルの Northern blot 解析が行われていたが、その場合も、*HAC1*ⁱ mRNA の存在量が低い場合、それを定量的に検出するのは困難であった。すなわち、従来の競合 RT-PCR 法や Northern blot 法では、非ストレス下や弱い小胞体ストレス時の UPR が正しく評価されていなかった可能性が高い。一方、本研究において開発したリアルタイム RT-PCR 法では、非ストレス時のような微弱な *HAC1* mRNA スプライシングを十分検出することが可能であった (図 6)。なお、競合 RT-PCR 法の代替法として本手法が高い定量性を示すことは、図 4 および図 8 に示されている。また、競合 RT-PCR 法では、PCR 後にアガロースゲル電気泳動および PCR バンド強度の定量が必要であることから、リアルタイム RT-PCR 法に比して、高スループット性やバンド強度定量の再現性に欠けるといふ欠点が挙げられる。

哺乳動物細胞では、酵母 Ire1 のオルソログである IRE1 α が、小胞体ストレスに応じて *XBPI* mRNA をスプライシングする。その検出においても、非スプライシング型 *XBPI* とスプライシング型 *XBPI* の競合 RT-PCR が行われてきたが、一方、スプライシング型 *XBPI* mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により定量した事例も報告されている (Schadewijk et al., 2012; Yoon et al., 2019)。したがって、本研究で確立した手法を含め、スプライシング型 mRNA (*HAC1* や *XBPI*) を特異的かつ定量的に検出するリアルタイム RT-PCR 法は、今後の UPR 研究において標準的な手法になる可能性があるだろう。

本研究において、増殖上限温度付近の高温において、出芽酵母では弱いながらも

HAC1 mRNA スプライシングは亢進し、UPR が引き起こされることが示された(図 9)。また、その条件では *IRE1* 遺伝子欠損により増殖が遅れたことから(図 11)、低レベルの UPR が高温培養下における出芽酵母の増殖機能維持に寄与するという、UPR の新たな生理機能が明らかとなった。酵母に限らずあらゆる生物種において、高温ストレスによりタンパク質の変性が引き起こされるが、一方、高温により膜の流動性も高まり、生体膜の恒常性も損なわれると想定される。本研究で見出された高温条件での *HAC1* mRNA スプライシング亢進、すなわち *Ire1* 活性化においては、図 12 で示した結果から、小胞体への変性タンパク質蓄積が主たる事由であると考えられる。

なお、本研究では非ストレス条件(30°C培養)時の微弱な *HAC1* mRNA スプライシングも定量的に検出できたが、そのレベルは、膜脂質ストレスに応じた UPR 惹起が不全となる *IRE1 V535R* 株において大きく減弱した(図 12)。よって、膜脂質ストレスが、基底状態の *Ire1* 活性に寄与していると考えられる。しかし、本研究においては、非ストレス条件(30°C培養)では *IRE1* 遺伝子欠損による増殖遅延は認められなかった(図 11)。すなわち、この条件での UPR 惹起の必要性や有用性は見出せなかったのである。一方、Bicknell 等は UPR が非ストレス条件でも出芽酵母細胞のタンパク質分泌経路維持に寄与していると報告しており(Bicknell et al., 2017)、さらなる検討が必要だと考えられる。

真核生物に限らず多くの生物種において、高温ストレスにより熱ショック応答が起こる。出芽酵母においては、熱ショック応答により転写誘導される遺伝子として、サイトゾルで機能する種々の分子シャペロンをコードするものが挙げられ、熱ショック応答が高温ストレスに対する防御機構として機能している(Vergheese et al., 2012)。すなわち、高温によりサイトゾルに生じた変性タンパク質の処理に、熱ショック応答が寄与していると言えよう。一方、UPR は小胞体の異常を感知して活性化し、小胞体内のタンパク質品質を保つ因子をコードする遺伝子の発現を誘導する。そのため、高温ストレス下における UPR と熱ショック応答は、それぞれ細胞内膜系およびサイトゾルにおける防御機構として異なる役割を担っていると考えられる。今後 UPR および熱ショック応答の相互作用などを明らかにすることにより、高温ストレス下の防御応答の全体像が明らかになると考えている。

本研究では、出芽酵母において微弱な *HAC1* mRNA スプライシングを定量的に検出する実験手法を開発し、次いで、それを用いて、高温培養条件下で UPR が弱く惹起されることを見出した。そして、酵母細胞の高温での増殖に UPR が寄与することも確かめた。これらの知見は、低レベルでしか惹起されない場合でも、UPR は生理的な意義を有する可能性があることを示している。そこで、本研究で開発されたリアルタイム RT-PCR 法を用いて、従来は UPR の惹起が認められなかったさまざまなストレス条件下において、微弱な *HAC1* mRNA スプライシングが誘導されるかどうか検討することは、今度の課題として有意義であると考えられる。例えば、Le 等はいくつかの有害

重金属イオンによる出芽酵母での UPR 惹起を調べており、その中でカドミウムのみが *HAC1* mRNA スプライシングを引き起こし、クロム酸や水銀、鉛ではスプライシングが認められなかったことを報告している(Le et al. 2016)。動物細胞において水銀やクロムなどの重金属イオンにより小胞体ストレスが誘導されることが示唆されていることから (Rana, 2020)、当該報告において認められた現象は、微弱なスプライシングを競合 RT-PCR 法で検出できなかったことに起因する可能性が考えられる。したがって、リアルタイム RT-PCR 法を用いて評価することにより、出芽酵母における重金属イオンによる UPR 惹起について新たな知見が得られるかもしれない。

第2章

高温培養下における Ire1 のホモ会合状態の解析

序論

小胞体ストレスを感知した出芽酵母 Ire1 は、小胞体内腔ドメインの中央部 (core luminal domain: cLD、図 13) を介して二量体化し、トランスな自己リン酸化 (ひとつの Ire1 分子がホモ会合した他の Ire1 分子をリン酸化する) を経て RNase 活性を発揮すると考えられていた (Shamu and Walter 1996; Bertolotti et al., 2000; Oikawa et al., 2007; Lee et al., 2008)。しかし、cLD は二量体状態からさらに鎖状に会合し、巨大なオリゴマーを形成しうることも、構造生物学的な解析から明らかになっている (Credle et al., 2005)。また、GFP 標識法などにて酵母細胞内での局在を調べた研究により、Ire1 は非ストレス時には小胞体全体に分散しているが、DTT 等により強力に小胞体ストレスを引き起こした場合、その局在パターンは変化し、小胞体上に点状に集合して分布することが明らかとなっている (補足図 1 ; Kimata et al., 2007; Aragon et al., 2009)。これが Ire1 のクラスター形成である。

二量体状態の cLD がさらに多量体化するための接触面に位置するトリプトファン残基 (図 13) をアラニン残基に置換した Ire1 変異体 (W426A) は、小胞体ストレスにより二量体を形成するものの、クラスター化は出来ない (補足図 1 ; Kimata et al., 2007; Gardner and Walter 2011)。W426A Ire1 の HAC1 スプライシング活性および UPR 惹起能は野生型 Ire1 と比較して弱いことから、Ire1 のクラスター形成は正常な UPR にとって重要であると考えられる (図 14)。なお、RNase ドメインを含む Ire1 サイトゾル側領域の構造生物学的および生化学的解析から、二量体状態に比してクラスターを形成している場合の方が Ire1 は強い RNase 活性を発揮することを示唆する知見が報告されている (Korenykh et al., 2009)。

一方、細胞が置かれた状況によっては、Ire1 はクラスター化せず、二量体状態で弱く UPR を惹起しているかもしれない。例えば、イノシトール欠乏や DTT にて長時間の小胞体ストレスを与えられ続けた出芽酵母細胞は、そのような状態にあると考えられ、Ire1 クラスターは認められず、また、野生型 Ire1 株と W426A Ire1 株で同程度に UPR が引き起こされた (Ishiwata-Kimata et al., 2013^a)。すなわち、Ire1 のホモ会合状態 (二量体かクラスターか) によって、UPR の強度が制御されているかもしれないのである。

Ire1 のホモ会合状態を評価する際に難点となるのが、クラスターを形成している Ire1 二量体の間でのアフィニティーが弱いことである。よって、強い小胞体ストレスを与えた細胞を破碎し、密度勾配遠心法などにて Ire1 の会合状態を評価しても、おそらくは細胞抽出液中にて Ire1 クラスターが解離して二量体となるため、高分子量の Ire1 複合体が見いだされない (Bertolotti et al., 2000; Oikawa et al., 2007)。また、蛍光顕微鏡にて GFP 標識 Ire1 のクラスターを観察するという手法にも限界がある。例えば、小胞体ストレスの強度が弱く、細胞内の一部の Ire1 分子のみが小さなサイズのクラスターを形成した場合、それを明確に可視化することには困難が伴うであろう (例：低

濃度 (1 mM) DTT (補足図 1))。

クラスター化を抑制する W426A 変異によって Ire1 の活性がどの程度に低下するの
かに関しては、当研究室の先行研究によって得られた知見が必ずしも一致していない。
ツニカマイシンや DTT にて短時間の小胞体ストレスを与えた場合、野生型 Ire1 株よ
りも弱いながらも、W426A Ire1 株でも *HAC1* mRNA スプライシングが認められた
(Ishiwata-Kimata et al., 2013^a)。一方、C 末に HA エピトープを付加した場合(Ire1-HA、
図 13)、W426A 変異によって UPR は全く起きなくなることも分かっている (Kimata
et al., 2007)。これらの知見のもと私は研究を進め、Ire1-HA は二量体状態では全く活
性を発揮せず、クラスター状態でのみ *HAC1* mRNA スプライシングを引き起こすと考
えられる結果を得た。そこで、Ire1-HA による UPR 惹起は、Ire1 のホモ会合状態を評
価するための指標になると期待される。そして私は、Ire-HA 株の解析などにより、前
章で述べた高温状態では、Ire1 は二量体として活性化していることを明らかにした。

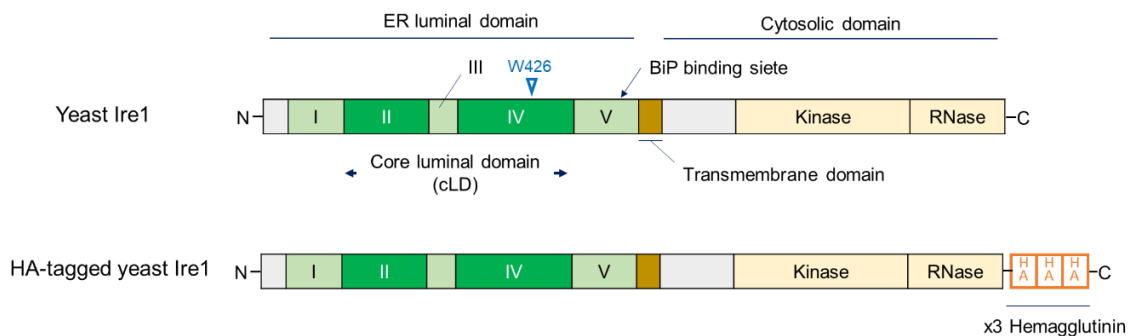


図 13. 出芽酵母 Ire1 及び HA 付加型出芽酵母 Ire1 の模式図

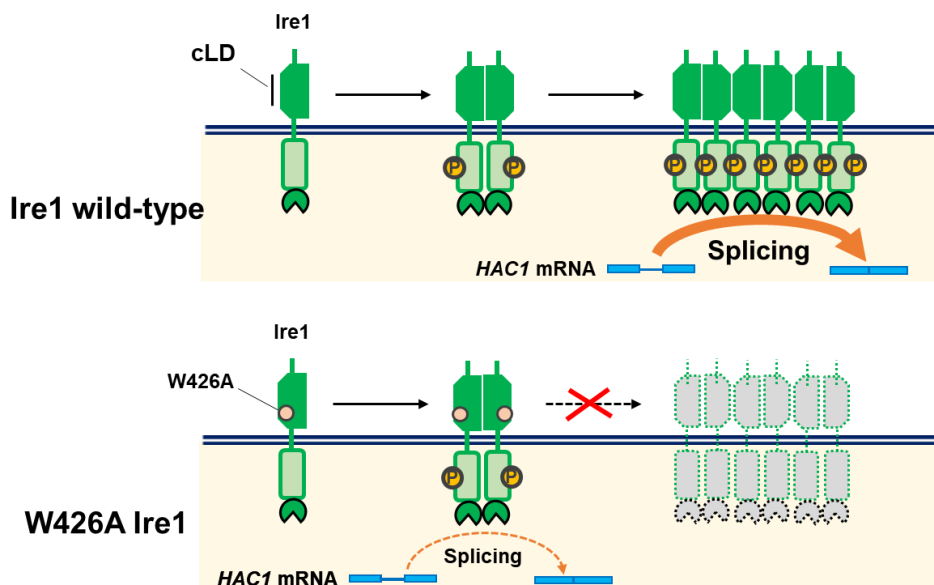


図 14. 野生型 Ire1 および W426A 変異体のホモ会合

材料と方法

出芽酵母菌株

実験に使用した出芽酵母菌株を表 4 に示す。本章では、*IRE1* 遺伝子破壊株 KMY1015 (*MAT α leu2-3,112 ura3-52 his3- Δ 200 trp1-901 lys2-801 ire1::TRP1*) を UPRE-LacZ レポータープラスミドである pCZY1 (*URA3* 選択マーカーを有する) にて形質転換した株 (Mori et al., 1992) を用いた。

LEU2 選択マーカーを持つ centromeric プラスミドである pRS315 に *IRE1* 遺伝子が導入されたプラスミド pRS315-*IRE1* は、pRS313-*IRE1* (第 1 章で作製) 上の *IRE1* 遺伝子を制限酵素 PvuII で切り出した後、pRS315 に組み込むことにより作製した。*IRE1* 遺伝子の C 末端側に、3 つの連続したヘマグルチニンエピドープ配列を導入した pRS315-*IRE1*-HA は、Kimata 等が作製したものを使用した (Kimata et al., 2004)。これら pRS315-*IRE1* もしくは pRS315-*IRE1*-HA にて、上記の KMY1015-pCZY1 株を形質転換することにより得た株を、非 HA 付加型野生型 *IRE1* 遺伝子株 (*IRE1*+) または HA 付加型野生型 *IRE1* 遺伝子株 (*IRE1*+ -HA) とした (KMY1015-pCZY1[pRS315-*IRE1*] または KMY1015-pCZY1 [pRS315-*IRE1*-HA])。 *IRE1* 遺伝子欠損株 (*ire1 Δ*) については、空ベクター-pRS315 にて KMY101-pCZY15 株を形質転換することにより取得した (KMY1015-pCZY1 [pRS315])。また、Kimata 等および Promlek 等 (Kimata et al., 2004; Promlek et al., 2011) の方法に従い、in vivo gap repair 法を用い、変異導入された pRS315-*IRE1* もしくは pRS315-*IRE1*-HA を有する KMY1015-pCZY1 株を作出し、点変異体株 (W426A、W426A -HA または D828A -HA) および Ire1 の小胞体内腔ドメインを転写因子 Gcn4 のロイシンジッパードメインに置き換えた株 (bZIP または bZIP -HA) とした (KMY1015-pCZY1[pRS315-*IRE1*(W426A)], KMY1015-pCZY1[pRS315-*IRE1*(W426A)-HA]、KMY1015-pCZY1[pRS315-*IRE1*(D828A)-HA]、KMY1015-pCZY1[pRS315-*IRE1*(bZIP)], KMY1015-pCZY1[pRS315-*IRE1*(bZIP)-HA])。

高温培養実験 (図 20) では、*IRE1* 遺伝子破壊株として Y11907 株も用いた。pRS313-*IRE1* もしくは pRS313-*IRE1*-HA (pRS315-*IRE1*-HA 上の *IRE1*-HA 遺伝子を制限酵素 PvuII で切り出した後、pRS313 に組み込むことにより作製もの) にて、Y11907 株を形質転換することにより得た株を、非 HA 付加型野生型 *IRE1* 遺伝子株 (*IRE1*+) または HA 付加型野生型 *IRE1* 遺伝子株 (*IRE1*+ -HA) とした (Y11907[pRS313-*IRE1*] または Y11907[pRS313-*IRE1*-HA])。

GFP 標識した Ire1 発現出芽酵母株 (Ire1-GFP) は、Ishiwata 等が作製したものを用いた (Ishiwata-Kimata et al., 2013^b)。Ire1-GFP は、内在性 *IRE1* プロモーターを *TEF1* プロモーターに置き換えた、pRS313-TEP1p-*IRE1* を有する。

表 4. 実験に用いた出芽酵母菌株一覧

出芽酵母株名	遺伝子型または株の概要
--------	-------------

KMY1015-pCZY1	KMY1015 (<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 ire1::TRP1</i>) を UPRE-LacZ レポータープラスミドである pCZY1 にて形質転換した株 (Mori et al., 1992)
KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1]	pRS315-IRE1 にて KMY1015-pCZY1 株を形質転換することにより得た株。非 HA 付加型野生型 <i>IRE1</i> 遺伝子株 (<i>IRE1+</i>) として使用
KMY1015-pCZY1 [pRS315-IRE1-HA]	pRS315-IRE1-HA にて KMY1015-pCZY1 株を形質転換することにより得た株。HA 付加型野生型 <i>IRE1</i> 遺伝子株 (<i>IRE1+ -HA</i>) として使用
KMY1015-pCZY1 [pRS315]	pRS315 にて KMY1015-pCZY1 株を形質転換することにより得た株。 <i>IRE1</i> 遺伝子欠損株 (<i>ire1Δ</i>) として使用
KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1(W426A)]	In vivo gap repair 法により、KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1]に変異導入した株。Ire1 アミノ残基 426 のトリプトファンをアラニンへ置換
KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1(W426A)-HA]	In vivo gap repair 法により、KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1-HA]に変異導入した株。Ire1 アミノ残基 426 のトリプトファンをアラニンへ置換
KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1(D828A)-HA]	In vivo gap repair 法により、KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1-HA]に変異導入した株。Ire1 アミノ残基 828 のアスパラギン酸をアラニンへ置換
KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1(bZIP)]	In vivo gap repair 法により、KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1]に変異導入した株。小胞体内腔ドメインを転写因子 Gcn4 のロイシンジッパードメインに置換
KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1(bZIP)-HA]	In vivo gap repair 法により、KMY1015-pCZY1[pRS315-IRE1-HA]に変異導入した株。小胞体内腔ドメインを転写因子 Gcn4 のロイシンジッパードメインに置換
Y11907[pRS313-IRE1]	pRS313-IRE1 にて Y11907 株 (<i>MATα ura3-Δ0, leu2-Δ0, his3-Δ1, lys2-Δ0, ire1::kanMX4</i>) を形質転換することにより得た株。非 HA 付加型野生型 <i>IRE1</i> 遺伝子株 (<i>IRE1+</i>) として使用
Y11907[pRS313-IRE1-HA]	pRS313-IRE1-HA にて Y11907 株を形質転換することにより得た株。HA 付加型野生型 <i>IRE1</i> 遺伝子株 (<i>IRE1+ -HA</i>) として使用
Ire1-GFP	GFP 標識した Ire1 発現出芽酵母株 (Ishiwata-Kimata et al., 2013 ^b)

菌体の培養およびストレス処理

第1章に記載した方法で菌体の培養および DTT 処置実験を行った。ツニカマイシン処置については、「 β -galactosidase レポーターアッセイ」に記載した。ツニカマイシンストック溶液はツニカマイシン (Wako) を 0.2 mg/mL となるようにジメチルスルホキシドに溶解させたものを使用した。

形質転換

第1章に記載した方法で行った。

蛍光顕微鏡を用いた Ire1 細胞内局在の観察

GFP 標識した Ire1 発現出芽酵母株を所定の条件で培養後、培養液を任意に希釈し、顕微鏡による観察に供した。観察には、HC PL APO 100x/1.40 Oil STED White 対物レンズ付きレーザー走査顕微鏡 SP8 FALCON (Leica) を用いた。細胞に 489 nm 白色レーザーを照射し、500~600 nm の蛍光を検出した。

RNA 抽出、競合 RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR

第1章に記載した方法で行った。

β -galactosidase レポーターアッセイ

本培養後の培養液に、ツニカマイシン (最終濃度 2 μ g/mL) を添加し、30°C で 4 時間培養した。その後、10,000 rpm、2 分間遠心分離することにより集菌し、0.8 mL の Z buffer 溶液 (60 mM Na₂HPO₄、40 mM NaH₂PO₄、10 mM KCl、1 mM MgSO₄、0.27% 2-メルカプトエタノール、pH 7.0) で懸濁させた。懸濁液の一部を培地濁度 (OD₆₀₀) 測定に供した後、残りの懸濁液に 20 μ L の 0.1% SDS 溶液、50 μ L のクロロホルムを添加し、20 秒間激しく混和した。次いで、28°C で 5 分間加温した後、0.2 mL の 4 mg/mL o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside/Z buffer 溶液を添加し、28°C で反応させた。反応液が黄色を呈した後、0.5 mL の 1 M NaCO₃ を加えることにより反応を停止させた。420 nm の吸光度 (A₄₂₀) を測定し、以下の式に従い UPRE-lacZ レポーター活性を算出した。

$$\text{UPRE-lacZ レポーター活性} = \frac{A_{420} \times 375}{\text{OD}_{600} \times \text{反応時間}}$$

タンパク抽出溶液の調製および SDS-PAGE-ウェスタンブロットティング

30°C 培養後もしくは DTT 処理 30 分後の培養液を集菌し、100 μ L の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.9)、5 mM EDTA、1% Triton X-100) で懸濁させた。なお、プロテア

ーゼ阻害剤（100 mM phenylmethanesulfonyl fluoride、20 mg/mL pepstatin、20 mg/mL leupeptine、20 mg/mL aprotinin）および 1/100 量の protease inhibitor cocktail を Lysis buffer に添加した。0.5 mm ガラスビーズを用いて、4°Cで 30 秒間激しく混和すること（6 回繰り返し）により細胞を破碎後、破碎液を 3000 rpm、4°C、30 秒間で遠心して上清を回収し、その上清をさらに 10,000 rpm、4°C、10 分間遠心した。得られた上清に等量の loading buffer（125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、20% glycerol、4% SDS、20 mM DTT、および 0.02% bromophenol blue）を加えることにより、タンパク抽出液を得た。タンパク抽出液は、95°Cで 5 分間加温後、-80°Cで保管した。

タンパク抽出液を 8%アクリルアミド SDS-PAGE ゲルで泳動後、1 mM EDTA、25 mM Tris base、40 mM glycine および 10%メタノールを含むバッファーにゲルを 10 分間浸漬し、転写に用いた。転写は、Immobilon-P メンブレン (Millipore) を用いて、Semi-Dry Western blot System により、1 mA/cm²、90 分間の反応で行った。その後、メンブレンを 5%スキムミルク含有 0.2% TBST 溶液(0.2% Tween 20/TBS バッファー(pH7.4)) で 1 時間ブロッキングし、次いで、抗体溶液による反応を行った。1 次反応として、5%スキムミルク含有 0.2% TBST 溶液で 1000 倍希釈したマウス抗 HA エピドープ抗体 (Roche) を 4°Cで 1 時間反応させた。その後、2 次反応として、5000 倍希釈した HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (DAKO) を 4°Cで 1 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare, UK) を用いて発光させ、LAS 4000 CCD camera system (Fuji)により検出した。なお、ブロッキングから検出までの操作間において、0.2% TBST 溶液により少なくともメンブレンを 3 回洗浄した。

Ire1 のリン酸化は、Ishiwata-Kimata 等の方法に従い (Ishiwata-Kimata et al., 2013^a)、Phos-tag SDS-PAGE 法により泳動度の違いを観察することにより検出した。上記操作に加えて、Lysis buffer へ PhosSTOP 溶液 (Roche) を、SDS-PAGE ゲルに 25 μM Phos-tag (Wako) および 50 μM MnCl₂を添加した。

統計解析

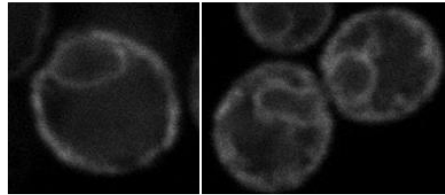
KMY1015 株または Y11907 株の形質転換においては、同じプラスミドが導入された形質転換体を 3 クローンずつ得ており、図 15、図 16、図 17、図 18 で示した実験データは、それら 3 クローンから得られた数値の平均値および標準偏差を示している。図 20 で示した実験データは、2 クローンから得られた数値の平均値を示している。有意差検定は、Microsoft Excel 2016 を用いて、two-tailed unpaired Student's *t*-test により行った。

結果

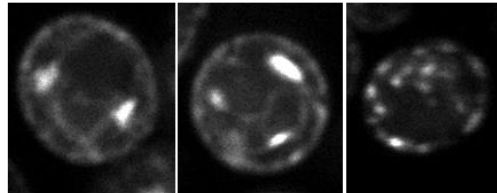
1. 高温ストレス下における Ire1 局在の観察

本研究ではまず、Ire1 クラスタ化評価のため、GFP 標識した野生型 Ire1 (Ire1-GFP; Ire1 の膜貫通ドメイン近傍に GFP が挿入されている) 発現株を蛍光顕微鏡にて観察した。過去の知見と同様、非ストレス時 (30°C) においては、Ire1 は二重のリング状の分布を示した (図 15A、Aragon et al., 2009; Ishiwata-Kimata et al., 2013^b)。なお、二重リング状形態は、細胞表層近傍に存在する一層の小胞体と、小胞体の一種である核膜を反映しており、すなわち、この状況では Ire1-GFP は小胞体全体に広がって存在していると考えられる。一方、DTT (10 mM)にて 30 分間処理され強く小胞体ストレスを引き起こした細胞では、これまでの報告と同じく Ire1-GFP は点状の分布となり、明確にクラスターが形成されたことが分かる (図 15B)。本研究ではさらに、39°Cで 4 時間培養した後に細胞を観察した。この条件では、非ストレス時と同じく Ire1-GFP は二重リング状の分布であり、すなわち、明確なクラスターを形成していないことが示された (図 15C)。

(A) 30°C



(B) 10 mM DTT, 30min



(C) 39°C, 4h

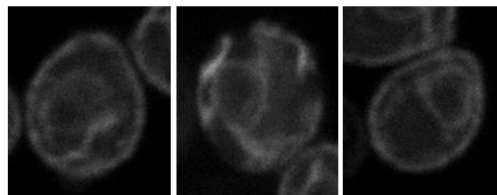


図 15. 39°C培養下および DTT 処理時の Ire1-GFP の局在

Ire1-GFP 株を 30°Cで前培養後、30°Cまたは 39°Cで 4 時間培養、もしくは、10 mM DTT で 30 分間処理し、共焦点顕微鏡を用いて GFP 蛍光を観察した。

2. C 末端 HA タグ標識による二量体状態 Ire1 の不活性化

序論に記したように、W426A 変異が Ire1 の活性に及ぼす影響については、過去に食い違う知見が得られている。Ishiwata-Kimata 等によると、W426A 変異により、Ire1 の UPR 惹起能は低下するが、完全には消失しない (Ishiwata-Kimata et al., 2013^a)。し

かし、Kimata 等によると、Ire1-HA (Ire1 の C 末端側に 3 つの連続した HA エピドープ配列が挿入されている; 図 13) は、W426A 変異によりほぼ完全に失活する (Kimata et al., 2007)。そこで本研究では、UPRE-lacZ レポーターアッセイ (Mori et al., 1993) にて、非標識 Ire1 と Ire1-HA の UPR 惹起能を比較した。UPRE を含む遺伝子発現プロモーターの下流に lacZ 遺伝子 (大腸菌 β -galactosidase をコード) を接続した DNA コンストラクトを有する酵母株は、UPR の惹起に伴い β -galactosidase が産生され、その酵素活性を測定することにより、細胞内での Ire1 の活性を評価できる。図 16 に示すように、ツニカマイシン処理により、非標識 Ire1 株においてレポーター活性が顕著に上昇し、その程度は Ire1-HA 株においても同程度であった。すなわち、HA 標識だけでは、強力な小胞体ストレスに応じた Ire1 の活性化には影響を及ぼさないのである。一方、過去の知見と同じく、W426A 変異を非標識 Ire1 に導入すると、UPR は低減したが、完全には抑えられなかった。しかし、Ire1-HA に W426A 変異が導入された場合は、全く UPR は惹起されなかった。なお、DTT にて細胞に小胞体ストレスを与え、Ire1 の活性化を *HAC1* mRNA スプライシングにより評価した場合でも、同様の知見が得られている (図 17)。すなわち、非標識 Ire1 株と Ire1-HA 株では、DTT ストレスにより同程度に *HAC1* mRNA スプライシングが引き起こされた。そして、W426A 変異が *HAC1* mRNA スプライシングを抑える効果は、非標識 Ire1 よりも Ire1-HA の方が強く認められた。図 18 で示した実験では、Ire1-HA 株や W426A Ire1-HA 株から細胞抽出液を調製し、抗 HA 抗体ウェスタンブロット解析に供した。Ire1-HA と W426A-Ire1-HA の細胞内存在量はほぼ同じであり、よって、W426A-Ire1-HA の UPR 惹起能が著しく抑えられているのは、分解などによって W426A-Ire1-HA が量的に低くなっているためではないと考えられる。

bZIP-Ire1 は、小胞体内腔ドメイン全体が核内転写因子 Gcn4 由来の leucine zipper 配列に置換された Ire1 変異体である。leucine zipper 配列はホモ二量体化能を有するため、bZIP-Ire1 は恒常的に二量体化し、非ストレス条件でも UPR を惹起できる (Promlek et al., 2011)。図 16 で示すように、bZIP-Ire1 による UPR の惹起は UPR-LacZ レポーターアッセイでも認められたが、HA 標識を付加することにより、bZIP-Ire1 はほぼ完全に活性を失った。これらの知見より私は、HA 標識により、クラスター化状態の Ire1 は活性に影響を受けないが、二量体状態の Ire1 は活性を発揮できなくなると考えた。

phos-tag はリン酸基にキレート結合する物質であり、phos-tag 付加アクリルアミドを含むアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE (phos-tag SDS-PAGE) での泳動度は、タンパク質のリン酸化により遅延する。Ire1 の活性化は自己リン酸化を伴うが、その程度は phos-tag SDS-PAGE にて評価できることが、当研究室の先行研究により示されている (Ishiwata-Kimata et al., 2013^a)。図 19 で示した実験では、Ire1-HA やその変異体を発現する細胞から得た抽出液を phos-tag SDS-PAGE に供し、抗 HA ウェスタンブロット解析により Ire1-HA を検出した。キナーゼ活性中心に変異を有し、自己リン酸化

が出来ない D828A Ire1-HA1 は、シャープな 1 本のバンドとして検出されたのに対し、野生型 Ire1-HA や W426A-Ire1-HA はバンドに広がりが見られ、また、細胞を DTT 処理することにより、泳動度は遅延した。野生型 Ire1-HA と W426A-Ire1-HA の間に電気泳動パターンにほとんど差が無かったことから、W426A-Ire1-HA は *HAC1* mRNA をスプライシングできないにも関わらず、小胞体ストレスに応じた自己リン酸化は正常に受けていると考えられる。

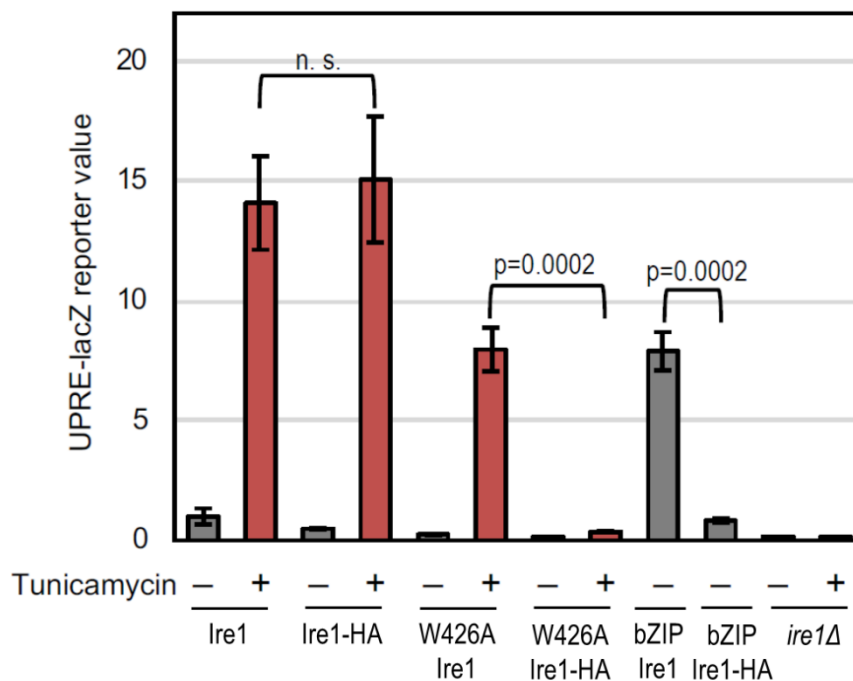


図 16. Ire1 およびその変異体が有する UPRE-lacZ レポーター誘導活性へのHA標識の影響

非標識 Ire1 株(KMY1015[pCZY1, pRS315-IRE1])および Ire1-HA 株(KMY1015[pCZY1, pRS315-IRE1-HA])について、表記の変異を Ire1 遺伝子に導入し、UPRE-lacZ レポーターアッセイに供した。*ire1*Δ株では、Ire1 遺伝子プラスミドの代わりに空ベクターpRS315 が導入されている。また、ツニカマイシン(Tunicamycin)にて細胞を処理する際には、終濃度 2 μg/mL になるように培地にツニカマイシンを加え、さらに 4 時間培養した。UPRE-lacZ reporter 値は、ストレス非処置の非標識 Ire1 株の値を 1 とした相対値で示した(平均値±標準偏差、n=3)。

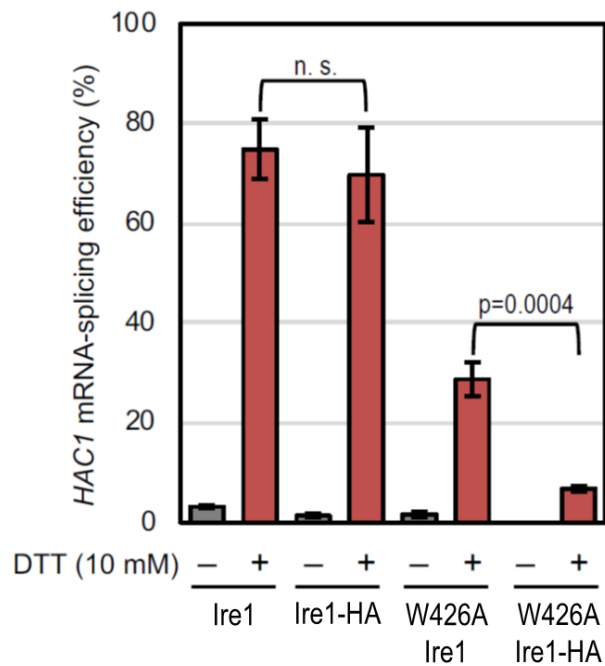


図 17. 二量体 Ire1 における HA 付加による *HAC1* mRNA スプライシング能の低下

非標識 Ire1 株(KMY1015[pCZY1, pRS315-IRE1])および Ire1-HA 株(KMY1015[pCZY1, pRS315-IRE1-HA])について(図中に表記された場合、Ire1 には W426A 変異が導入されている)、非ストレス条件下で培養、あるいは 10 mM DTT にて 30 分間処理後、総 RNA を抽出し、RT-競合 PCR 解析にて *HAC1* mRNA スプライシング効率を測定した(平均値±標準偏差、n=3)。

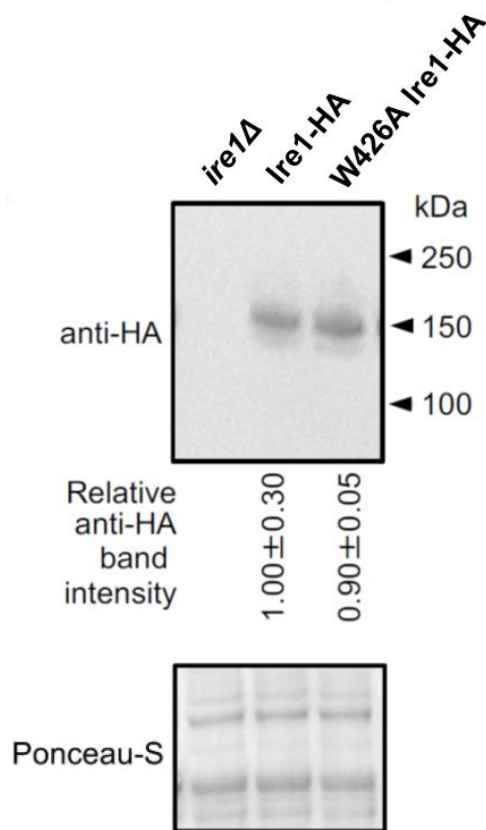


図 18. HA 付加型 Ire1 株 (*IRE1+*および W426A)における Ire1 タンパク発現量

Ire1-HA 株(KMY1015[pCZY1, pRS315-IRE1-HA])およびその W426A 変異体株(W426A)ならびに *ire1*Δ株(KMY1015[pCZY1, pRS315])の細胞抽出液を 8%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE と抗 HA 抗体ウェスタンブロッティングに供した。

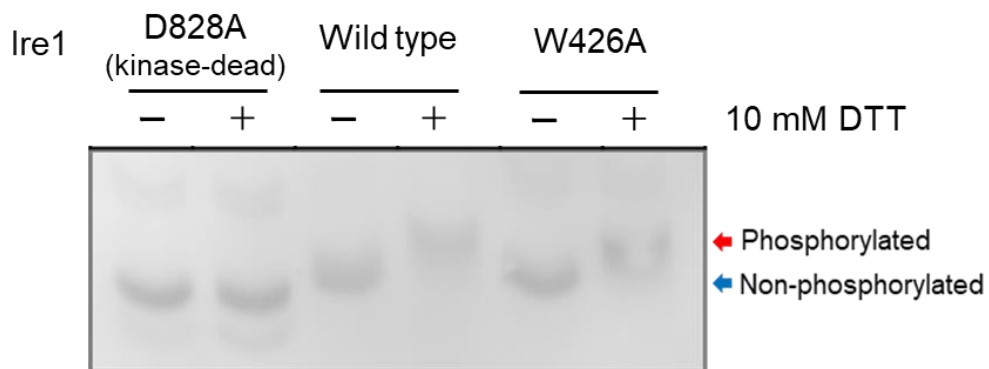


図 19. HA 付加型 Ire1 株 (*IRE1+*および W426A)における自己リン酸化

Ire1-HA 株(KMY1015[pCZY1, pRS315-IRE1-HA])について、表記の変異を Ire1 遺伝子に導入し、非ストレス条件下で培養、あるいは 10 mM DTT にて 30 分間処理後、phos-tag 含有 5%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE と抗 HA 抗体ウェスタンブロッティングに供した。

3. 高温ストレス下での Ire1 の会合状態

Ire1 の C 末端への HA 付加は、二量体状態特異的に Ire1 を失活させることから、この現象を利用することにより、Ire1 のホモ会合状態にアプローチできると考えた。そこで本研究では、高温ストレス時の Ire1 の活性化状態の評価に、この解析手法を適用することにした。図 20 にて示した実験では、非標識 Ire1 株および Ire1-HA 株を 30°C で前培養した後、前章で行ったのと同様に、30°C または 39°C で 4 時間培養し、微弱な *HAC1* mRNA スプライシングを検知すべく、総 RNA サンプルを RT-リアルタイム PCR 解析に供した。前章で示したデータと同じく、非標識 Ire1 株では、39°C での培養により、30°C での培養時に比べて *HAC1* mRNA スプライシング効率が 2 倍程度に上昇した。一方、Ire1-HA 株では、30°C 培養時においても非標識 Ire1 株に比して *HAC1* mRNA スプライシング効率が低く、また、39°C での培養による *HAC1* mRNA スプライシング効率の上昇は認められなかった。この結果から私は、非ストレス状態での基底レベルでの Ire1 の活性、および高温ストレスでの Ire1 の弱い活性化においては、Ire1 はクラスター状態ではなく二量体状態で機能していると考えた。

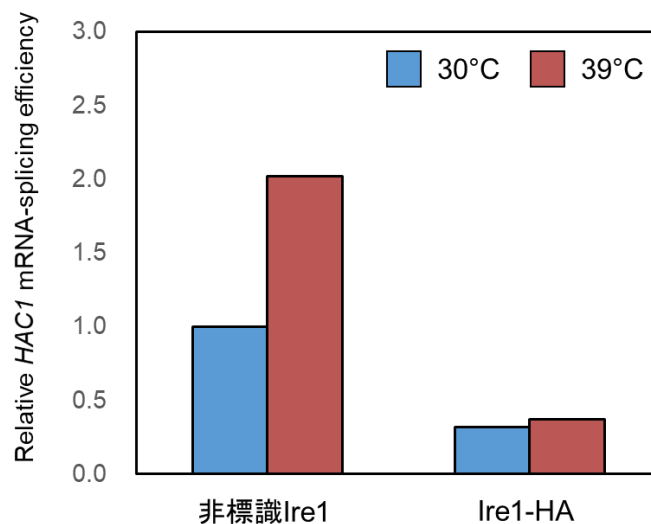


図 20. Ire1 への HA 標識付加による非ストレス条件および 39°C 培養下での *HAC1* mRNA スプライシング効率の低下

非標識 Ire1 株 (Y11907[pRS313-IRE1]) および Ire1-HA 株 (Y11907[pRS313-IRE1-HA]) を 30°C で前培養した後、30°C または 39°C で 4 時間培養し、総 RNA サンプルを RT-リアルタイム PCR 解析に供し、*HAC1* mRNA スプライシング効率を見積もった。なお、相対 *HAC1* mRNA スプライシング効率については、非標識 Ire1 株の 30°C 培養時のものを 1.0 として示した (平均値、n=2)。

考察

本章で得られた第一の知見は、C末端へのHAタグ付加により、W426A Ire1 や bZIP Ire1 がほぼ完全に失活することである。W426A や bZIP は小胞体内腔側領域の変異であり、一方、C末端HAタグ付加はサイトゾル側ドメインでの変異であり、それらの組み合わせにより Ire1 が失活に導かれるという事象は興味深い。一般的に、HAタグ標識はタンパク質の生理活性や生体内分布に影響を及ぼさないとされており、タンパク質の検出、精製の際に汎用されている。本研究で見出されたHAタグ付加によるW426A Ire1 や bZIP Ire1 の不活性化についても、何らかの特別な機能をHAタグが発揮しているからではなく、他のペプチド配列も Ire1 のC末端に付加した場合も同様の効果が認められる可能性が高い。HA エピトープ配列以外のペプチド配列を W426A Ire1 や bZIP Ire1 に付加した場合の効果については、今後の検討課題である。

野生型 Ire1 とは違って、W426A Ire1 や bZIP Ire1 はクラスター状態ではなく、二量体状態で活性化するとされている (Credle et al., 2005; Kimata et al., 2007; Promlek et al., 2011; Gardner and Walter, 2011)。よって私は、クラスター状態の Ire1 はC末にHAタグ標識を有していても正常に機能を発揮できるが、一方、二量体状態の Ire1 はC末HAタグ標識によってRNase活性として機能できないと考えている。

Ire1 は二量体化することにより、自己リン酸化する (Shamu and Walter, 1996; Le et al., 2021.)。そして、自己リン酸化による構造変化は、Ire1 のRNaseとしての活性化に結び付く (Lee et al., 2008)。図 19 で示したデータによると、W426A Ire1-HA も野生型 Ire1-HA と同様に、強い小胞体ストレス状況下では明確に自己リン酸化されている。すなわち、W426A Ire1-HA はタンパク質全体としての構造や機能が大きく毀損しているわけではないと考えられる。RNase領域は Ire1 のC末端に位置しており、そこにHAタグ配列が隣接することにより、局所的に構造上の不具合が生じるのであろう。

Ire1 のクラスター化は小胞体内腔ドメインのオリゴマー化により引き起こされるが、その結果として、サイトゾル側も密に整然と集合する (Korennykh et al., 2009; Anken et al., 2014)。よって、Ire1 は二量体状態では、RNaseドメインがHAタグ付加により立体的な障害を受け活性が低下するが、多量体形成により、RNaseドメインが密になり、その結果、HAタグを付加してもRNase活性が維持されると推測した (図 21)。この知見は、二量体状態と Ire1 とクラスター状態の Ire1 において、RNaseドメインの構造や活性が本質的に異なることを示す。このことが、二量体状態よりもクラスター状態の Ire1 の方が強くUPRを惹起できる分子基盤となっているのであろう。出芽酵母 Ire1 と同様、哺乳動物細胞の Ire1 α も小胞体ストレスに応じてクラスター化することが報告されている (Li et al., 2010; Belyy et al., 2020)。哺乳動物細胞の Ire1 α においても、密度勾配遠心法などの生化学的手法では出芽酵母 Ire1 と同様に多量体化状態を捉えることができないとされているため (Bertolotti et al., 2000)、本研究で得られた Ire1

C 末端へのペプチド修飾による *in vivo* の評価手法は、哺乳動物細胞 Ire1 α についても二量体状態とクラスター状態を区別して解析する方法として有用かもしれない。

Ire1-HA は二量体状態では活性化できず、クラスター状態でのみ活性化できることから、様々なストレスに応じた Ire1 のホモ会合状態を調べるためのツールとして利用できると考えた。序章で記したように、Ire1 のクラスター化を評価するためには、Ire1-GFP 発現細胞を蛍光顕微鏡にて観察することが最も一般的な手法であるが、クラスターのサイズが微小な場合、あるいは一部の Ire1-GFP 分子のみがクラスター化している場合、それを蛍光顕微鏡にて見つけるのは困難であろう。よって、非標識 Ire1 と Ire1-HA の活性の比較は、Ire1-GFP の蛍光顕微鏡観察を補完できる手法であると考えられる。近年、透過型電子顕微鏡などによりナノメートルスケールで分子観察が可能となってきた。標識を伴わない Ire1 を観察することにより、本研究で確立した手法の妥当性を確認するとともに、定量的（二量体、四量体など）な Ire1 の会合状態を解明できることが期待される。

図 16、図 17 で示されたように、DTT やツニカマイシンにて強く小胞体ストレスを与えた場合、非標識 Ire1 株と Ire1-HA 株で同程度に UPR が惹起された。なお、この状態では Ire1 はクラスター化していることは、Ire1-GFP 株などの蛍光顕微鏡観察でも示されている（図 15、Ishiwata-Kimata et al., 2013^b）。一方、非ストレス状態では、あるいは 39°C にて高温ストレスを与えた場合は、Ire1-GFP はクラスター像を呈せず、また、Ire1-HA 株における *HAC1* mRNA スプライシングは、非標識 Ire1 株のものよりも顕著に低かった（図 15、図 20）。よって、非ストレス条件下での基底レベルの UPR、および高温ストレス下での UPR 惹起においては、Ire1 は二量体として機能していると考えられる。DTT 処置では一過的に強力な UPR が引き起こされる（Ishiwata-Kimata et al., 2013^a）。他方、高温ストレスでは弱いスプライシングが少なくとも 12 時間継続した（図 9）。また、Ishiwata-Kimata 等は、イノシトール欠乏培地による長時間培養により Ire1 の二量体状態を示唆する知見を報告している（Ishiwata-Kimata et al., 2013^a）。これら知見は、クラスター状態の Ire1 は速やかに強いスプライシングを引き起こし、二量体状態の Ire1 は弱いスプライシングを持続的に引き起こすことを示唆している。したがって、クラスター化 Ire1 と二量体化 Ire1 では、UPR 標的遺伝子の誘導において、時間的な差異を示す可能性が考えられる。このような視点を含め、今後の解析では UPR 標的遺伝子レベルに着目し、Ire1 がクラスター状態と二量体状態を区別する生理的意義の解明につなげたい。

UPR は小胞体ストレスから細胞を保護するために重要な現象であるが、一方、哺乳動物細胞では Ire1 α の活性化がアポトーシスに繋がることも知られている（Hetz and Papa, 2018）。また、出芽酵母においても、不適切に強い UPR が細胞の増殖を阻害することが報告されている（Lee et al., 2021）。Ire1 の活性および UPR の強度を適切なレベルに制御する手段のひとつとして、ストレスの種類に応じて、Ire1 は二量体状態とク

ラスタ状態を切り替えているのかもしれない。なお、その切り替えのメカニズムは現在のところ不明である。Ishiwata-Kimata 等は、二量体状態で活性を呈している Ire1 に BiP が会合していることを示唆する知見を報告している (Ishiwata-Kimata et al., 2013^a)。BiP による制御も含め、さらなる研究を進めていきたい。

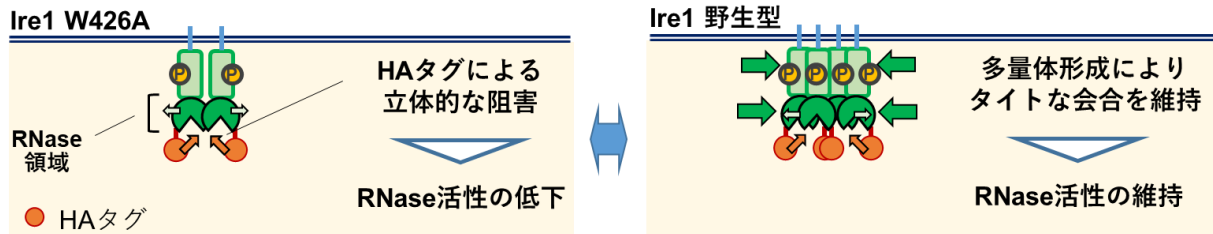


図 21. HA タグが Ire1 の RNase 活性に及ぼす影響

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご援助をくださり、また、常にご指導とご鞭撻をくださいました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 ストレス微生物学研究室 木俣行雄准教授に深く感謝いたします。

また、本研究のアドバイザーである岡村勝友教授および吉田昭介特任准教授には、数多くの有益なアドバイスをいただき、この場を借りて御礼申し上げます。

ストレス微生物学研究室 石渡有紀博士をはじめとする木俣チームのメンバーの皆さまには、日頃から有意義なディスカッションと温かいご支援をいただき誠にありがとうございました。

さらに、高木博史教授をはじめとするストレス微生物学研究室の皆さま、ならびに河野憲二特任教授には、実験スペースの提供から始まり、多くのご支援を誠にありがとうございました。

参考文献

Anken E, Pincus D, Coyle S, Aragon T, Osman C, Lari F, Gomez PS, Korennykh AV, Walter P. Specificity in endoplasmic reticulum-stress signaling in yeast entails a step-wise engagement of HAC1 mRNA to clusters of the stress sensor Ire1. *Elife*. 2014. 3:e05031.

Aragon T, van Anken E, Pincus D, Serafimova IM, Korennykh AV, Rubio CA, Walter P. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signaling sites. *Nature*. 2009. 457:736-740.

Belyy V, Tran NH, Walter P. Quantitative microscopy reveals dynamics and fate of clustered IRE1 α . *Proc Natl Acad Sci USA* 2020. 117:1533-1542.

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2000. 2:326-332.

Bicknell AA, Babour A, Federovitch CM, Niwa M. A novel role in cytokinesis reveals a housekeeping function for the unfolded protein response. *J Cell Biol*. 2017. 177(6):1017-1027.

Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*. 2012. 18(1):59-68.

Cox JS, Shamu CE, Walter P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*. 1993. 73:1197-1206.

Cox JS and Walter P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*. 1996. 87:391-404.

Cox JS, Chapman RE, Walter P. The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell*. 1997. 8:1805-1814.

Credle JJ, Finer-Moore JS, Papa FR, Strioud RM, Walter P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. 102:18773-18784.

Collart MA and Oliviero S. Preparation of Yeast RNA. *Curr Protoc Mol Biol*. 1993. 23:13.12.1-13.12.5.

Deng Y, Humbert S, Liu JX, Srivastava R, Rothstein SJ, Howell SH. Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011. 108(17):7247-7252.

Fordyce PM, Pincus D, Kimmig Philipp, Nelson CS, El-Samad H, Walter P, DeRisi JL. Basic leucine zipper transcription factor Hac1 binds DNA in two distinct modes as revealed by microfluidic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012. 109(45):E3084-3093.

Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*. 2011. 333:1891-94.

Halbleib K, Pesek K, Covino R, Hänelt I, Hummer Gerhard, Ernst R. Activation of the Unfolded Protein Response by Lipid Bilayer Stress. *Mol. Cell*. 2017. 67:673–684 e678.

Hetz C, Papa FR. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell*. 2018. 69(2):169-181.

a) Ishiwata-Kimata Y, Promlek T, Kohno K, Kimata Y. BiP-bound and nonclustered mode of Ire1 evokes a weak but sustained unfolded protein response. *Genes Cells*. 2013. 18:288-301.

b) Ishiwata-Kimata Y, Yamamoto YH, Takizawa K, Kohno K, Kimata Y. F-actin and a type-II myosin are required for efficient clustering of the ER stress sensor Ire1. *Cell Struct Funct* 2013. 38:135-43.

Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, Hitomi J, Kudo T, Tohyama M. Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat*. 2004. 1-2:67-78.

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

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

Kimata Y, Ishiwata-Kimata Y, Ito T, Hirata A, Suzuki T, Oikawa D, Takeuchi M, Kohno K.

Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *J. Cell Biol.* 2007. 179:75-86.

Kohno K, Normington K, Sambrook J, Gething MJ, Mori K. The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol.* 1993. 13(2):877-890.

Korennykh AV, Egea PF, Korostelev AA, Finer-Moore J, Zhang C, Shokat KM, Stroud RM, Walter P. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature.* 2009. 457:687-693.

Nguyen TSL, Kohno K, Kimata Y. Zinc depletion activates the endoplasmic reticulum-stress sensor Ire1 via pleiotropic mechanisms. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013. 77(6):1337-1339.

Le QG, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K, Kimata Y. Cadmium impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and induces the unfolded protein response. *FEMS Yeast Res.* 2016. 16(5):fow49.

Le QG, Ishiwata-Kimata Y, Phuong TH, Fukunaka S, Kohno K, Kimata Y. The ADP-binding kinase region of Ire1 directly contributes to its responsiveness to endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep.* 2021. 11(1):4506.

Lee KP, Dey M, Neculai D, Cao C, Dever TE, Sicheri F. Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell* 2008. 132:89-100.

Li H, Korennykh AV, Behrman SL, Walter P. Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010. 107:16113-161138.

Miyagawa K, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K, Kimata Y. Ethanol stress impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and activates Ire1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014. 78(8):1389-1391.

Mori K, Sant A, Kohno K, Normington K, Gething MJ, Sambrook JF. A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J.* 1992. 11(7):2583-2593.

Mori K, Ma W, Gething MJ, Sambrook J. A transmembrane protein with a *cdc2⁺/CDC28-*

related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*. 1993. 74:743-756.

Mori K, Kawahara T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T. Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Cenes Cells*. 1996. 1(9):803-817.

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

Promlek, T, Ishiwata-Kimata Y, Shido M, Sakuramoto M, Kohno K, Kimata Y. Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. *Mol Biol Cell*. 2011. 22:3520-3532.

Rana SVS. Endoplasmic reticulum stress induced by toxic elements-a review of recent developments. *Biol Trace Elem Res*. 2020. 196(1):10-19.

Schadewijk A, Wout EF, Stolk J, Hiemstra PS. A quantitative method for detection of spliced X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA as a measure of endoplasmic reticulum (ER) stress. *Cell Stress Chaperones*. 2012. 17(2):275-279.

Schuck S, Prinz WA, Thorn KS, Voss C, Walter P. Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol*. 2009. 187(4):525-536.

Shamu CE and Walter P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J*. 1996. 15:3028-3039.

Sidrauski C and Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*. 1997. 90:1031-1039.

Tran DM, Takagi H, Kimata Y. Categorization of endoplasmic reticulum stress as accumulation of unfolded proteins or membrane lipid aberrancy using yeast Ire1 mutants. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019. 83(2):326-329.

Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and

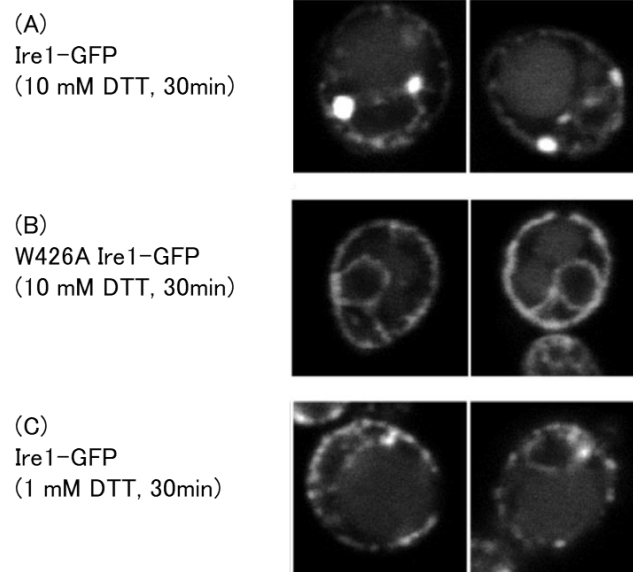
ER-associated degradation. *Cell*. 2000. 101:249-258.

Uppala JK, Bhattacharjee S, Dey M. Vps34 and TOR Kinases Coordinate *HAC1* mRNA Translation in the Presence or Absence of Ire1-Dependent Splicing. *Mol Cell Biol*. 2021. 41(7):e0066220.

Verghese J, Abrams J, Wang Y, Morano KA. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharmyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012. 76(2):115-158.

Yoon SB, Park YH, Choi SA, Yang HJ, Jeong PS, Cha JJ. Real-time PCR quantification of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) using a universal primer method. *PLoS One*. 2019. 14(7):e0219978.

補足図表



補足図 1. 小胞体ストレス処理時の Ire1-GFP の局在

Ire1-GFP 株または W426A Ire1-GFP 株を 30°C で前培養後、10 mM DTT (A: Ire1-GFP、B: W426A Ire1-GFP) または 1 mM DTT (C) で 30 分間処理し、共焦点顕微鏡を用いて GFP 蛍光を観察した。