

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 25 年 4 月 20 日現在

機関番号：14603

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19058010

研究課題名（和文） 異常タンパク質応答の生理的役割の解明

研究課題名（英文） Analyses of the physiological roles of unfolded protein response

研究代表者

河野 憲二 (KOHNO KENJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：50142005

研究成果の概要（和文）：進化的に保存されている小胞体ストレスセンサーIRE1分子が、小胞体に異常タンパク質が蓄積すると活性化する機構を明らかにした。センサーはまずクラスター化し、その後異常タンパク質と結合し活性化することを突き止めた。この活性化機構は酵母からヒトまで保存されているようだ。また、このセンサーがインスリンを産生する細胞で欠失すると、糖尿病を引き起こすことを見出した。さらに小胞体膜の異常タンパク質分解に関与する新しい小胞体分子シャペロンを発見した。

研究成果の概要（英文）：

Activation process of ER stress sensor IRE1, which is an evolutionary highly conserved protein, has been studied. When misfolded and unfolded proteins accumulated in the ER by some various stresses, IRE1 sensors formed clusters and directly interacted with unfolded protein, resulting in the full activation of IRE1. Activated IRE1 attenuated ER stress by the transcriptional induction of UPR target genes. This activation process has been evolutionarily conserved from yeasts to humans. Specific inactivation of IRE1 $\alpha$  gene in murine islet  $\beta$  cells caused diabetes in mice, whose mechanism has been unknown. Finally we found novel molecular chaperons located in the ER membrane stimulated the degradation of misfolded membrane proteins to attenuate ER stress.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費        | 間接経費 | 合計          |
|--------|-------------|------|-------------|
| 2007年度 | 28,100,000  | 0    | 28,100,000  |
| 2008年度 | 28,100,000  | 0    | 28,100,000  |
| 2009年度 | 28,100,000  | 0    | 28,100,000  |
| 2010年度 | 35,100,000  | 0    | 35,100,000  |
| 2011年度 | 28,100,000  | 0    | 28,100,000  |
| 総計     | 147,500,000 | 0    | 147,500,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス・タンパク質品質管理・シグナル伝達・転写翻訳調節・Hsp40

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体内に異常タンパク質がたまって来たことを小胞体ストレスセンサーがどのようにして感知し、活性化するのは大きな謎

であった。我々や他の研究者により、センサーIre1はBiPにより負に制御されていることが示されたが、実際にはそれだけでなくIre1自体が異常タンパク質を感知し活性化する

という新しいモデルを我々は初めて提唱した。また、ERAI マウス作製により動物個体での小胞体における異常タンパク質応答 (UPR) の活性化が可視化できるようになり、生理的条件下での UPR の活性化が生理的に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに Hsp40 に属する新規の小胞体シャペロンを見出したが、この機能に関しては今後の検討が必要とされている状況であった。

## 2. 研究の目的

上記の状況をふまえ、新しいモデルにおける小胞体内の異常タンパク質感知機構の解明、発生・分化や各種組織の機能維持における UPR 経路活性化の生理的役割の解明、細胞や動物個体における Hsp40 の生理機能、の3点に研究を集約して進めることにした。具体的には、小胞体センサーは異常タンパク質の何を認識しているのか、動物個体における UPR の生理的意味や役割は何なのか、また新規の Hsp40 の生理機能を細胞・動物個体で解析しその生理機能を明らかにする、ことを目指した。

## 3. 研究の方法

小胞体ストレスセンサー Ire1 による異常タンパク質感知機構は、酵母の利点をいかし遺伝学的手法を駆使する。特に BiP 非結合型の変異型 Ire1 を用い、BiP による影響を除去した形で進める。センサー Ire1 の活性化による局在変化を蛍光抗体法や免疫電子顕微鏡法を用いて解析する。UPR の生理的役割に関しては、マウス膵島の恒常的活性化をモデルとして解析する。特に IRE1 $\alpha$  の conditional KO マウスを利用することにより、膵臓特異的に IRE1-XBP1 経路を遮断し膵臓の機能変化を観察しランゲルハンス島  $\beta$  細胞における UPR 経路の恒常的活性化の生理的意義を検討する。また、小胞体やサイトゾルに局在する新規小胞体シャペロン JPDI, DNAJB12 の生理的役割を、特に小胞体関連分解との関係に注目して解析する。

## 4. 研究成果

研究目的にあげた3つの項目別に成果を述べる。

(1) センサーによる異常タンパク質の感知機構 小胞体ストレスセンサー Ire1 は、クラスター化 (図1) と小胞体内の構造異常タンパク質との結合という2つのステップに切り分けができること (JCB 2007)、またセンサーのコア領域と異常タンパク質とは直接相互作用してセンサーが活性化すること (JCB 2007, MBC 2011)、さらにセンサー Ire1 は小胞体膜の異常を感知することができること (MBC 2011) を明らかにした。クラスター化は、蛍光抗体法により顕微鏡

で観察できることから、センサーの活性化を見る良い指標の1つとなることが分かった。また異常タンパク質とセンサーが直接結合することを in vitro、in vivo 両方の系で示すことに成功した。さらにセンサーが膜の脂質異常も感知するという大きな発見をした。これらは、いずれも大きな反響を呼ぶ成果となった。

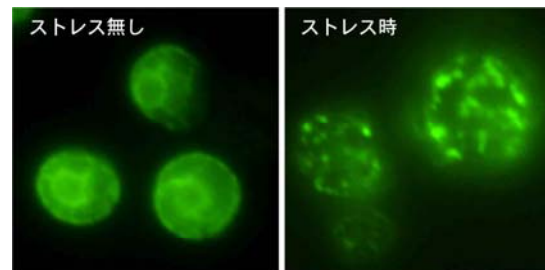


図1 酵母 Ire1 の細胞内局在の変化  
通常は左図のように小胞体全体に広がっているが、ストレス時にはドット状に局在するようになる。

## (2) UPR の生理的役割の解明

小胞体ストレスセンサーである IRE1 $\alpha$  遺伝子は、胎盤の発育に必須であること、胎盤で IRE1 $\alpha$  遺伝子を発現させると、全身でこの遺伝子を欠除したマウス [IRE1 $\alpha$  CKO (Conditional KnockOut) マウス] でも親マウスまで生育できること (PNAS 2009)、さらにこの IRE1 $\alpha$  CKO マウスは、インスリン、抗体産生細胞など外分泌に関与する機能に異常をきたしていること (PLoS ONE, 2010) を明らかにした。さらに膵島  $\beta$  細胞のみで IRE1 $\alpha$  を欠失したマウスを作製すると、このマウスは糖尿病を起こすことが明らかとなった (未発表)。今後は、何故糖尿病が起こるのかを解明していくつもりである。また、予想外の結果として、IRE1 $\alpha$  標的分子である XBP1u mRNA が、XBP1u タンパク質の HR2 領域を利用して XBP1u mRNA を小胞体膜上にリクルートし、XBP1u の C 末側 26 残基が翻訳の一時停止を起し、小胞体ストレス時に効率よく特殊スプライシングを行う、という画期的な新事実を見出した (図2. Mol Cell, 2009; Science 2011)。これは、翻訳停止による mRNA の局在化という新しいパラダイムを呈示しており、今後さらに詳細に検討する必要がある。またこの特殊スプライシング反応を、in vitro で再構成することに世界で初めて成功した

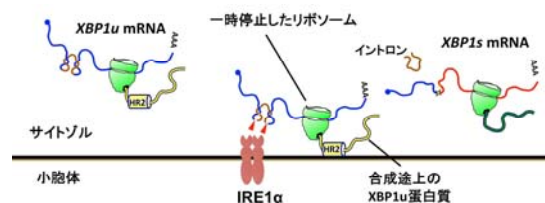


図2 XBP1uタンパク質の翻訳途上で一時停止機構  
XBP1u mRNAはこの停止機構により、XBP1uタンパク質の小胞体移行シグナル(HR2)を利用して小胞体膜上に局在化する。ストレス時に活性化したIRE1 $\alpha$ は、XBP1u mRNAの特異スプライシングを効率良く行うことができる。

(Nucleic Acids Res. 2011)。今後は、この系を利用し、未だ単離されていない mRNA 切断後に両者をつなぐリガーゼを明らかにしたい。

### (3) 新規 Hsp40 の生理機能解析

小胞体膜上の新規 Jタンパク質 DNAJB12 が、小胞体膜に局在する異常タンパク質を積極的に分解する機能があることを初めて報告した (CSF 2010)。さらに DNAJB12 のホモログ DNAJB14 を見出し、その機能解析も行った (CSF 2012)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 35 件) **すべて査読有**

1. Tsuru, A., Fujimoto, N., Takahashi, S., Saito, M., Nakamura, D., Iwano, M., Iwawaki, T., Kadokura, H., Ron, D., Kohno, K. Negative feedback by IRE1B optimizes mucin production in goblet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 2864-2869 (2013).
2. Ishiwata-Kimata, Y., Promlek, T., Kohno, K., Kimata, Y. A BiP-bound and non-clustered mode of Ire1 evokes a weak but sustained unfolded protein response. *Genes Cells* 18, 288-301 (2013)
3. Sopha, P., Kadokura, H., Yamamoto, Y. H., Takeuchi, M., Saito, M., Tsuru, A., Kohno, K., A novel mammalian ER-located J-protein, DNAJB14, can accelerate ERAD of misfolded membrane proteins. *Cell Struct. Funct.* 37, 177-187 (2012)
4. 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 by different manners. *Mol. Biol. Cell*, 22, 3520-3532 (2011)
5. Shinya, S., Kadokura, H., Imagawa, Y., Inoue, M., Yanagitani, K., and Kohno, K. Reconstitution and characterization of the unconventional slicing of XBP1u mRNA in vitro. *Nucleic Acids Res.* 39, 5245-5254 (2011)
6. Orthwein, A., Zahn, A., Methot, S.P., Godin, D., Conticello, S.G., Terada, K., Noia, J.M. Optimal functional levels of activation-induced deaminase specifically require the Hsp40 DnaJa1. *EMBO J.* 31, 679-691 (2011)
7. Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., Kohno, K. Translational pausing ensures membrane-targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA.

*Science*, 331, 586-589 (2011)

8. Kimata, Y., Kohno, K. ER stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 (2), 135-142, (2011)
9. Nakamura, D., Tsuru, A., Ikegami, K., Imagawa, Y., Fujimoto, N., Kohno, K. Mammalian ER stress sensor IRE1B specifically down-regulates the synthesis of secretory pathway proteins. *FEBS Lett.* 585, 133-138 (2011)
10. Yamamoto, Y., Kimura, T., Momohara, S., Takeuchi, M., Tani, T., Kimata, Y., Kadokura, H., Kohno, K. A novel ER J-protein DNAJB12 accelerates ER-associated degradation of membrane proteins including CFTR. *Cell Struct. Funct.* 35, 107-116 (2010)
11. Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K. IRE1 $\alpha$  disruption causes histological abnormality of exocrine tissues, increase of blood glucose level, and decrease of serum immunoglobulin level. *PLoS ONE*, 5 (9), e13052 1-11 (2010)
12. Tsukano, H., \*Gotoh, T., Endo, M., Miyata, K., Tazume, H., Kadomatsu, T., Yano, M., Iwawaki, T., Kohno, K., Araki, K., Mizuta, H., Oike, Y. The endoplasmic reticulum stress-CHOP pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1925-1932 (2010)
13. Terada, K., Oike, Y. Multiple molecules of Hsc70 and a dimer of DjA1 independently bind to an unfolded protein. *J. Biol. Chem.* 285, 16789-16797 (2010)
14. Kohno, K. Stress sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. *J. Biochem.* 147, 27-33 (2010)
15. Hosoda, A., Tokuda, M., Akai, R., Kohno, K., Iwawaki, T. Positive contribution of ERdj5/JPDI to endoplasmic reticulum protein quality control in the salivary gland. *Biochem. J.*, 425, 117-125 (2010)
16. Yoshiuchi, K., Kaneto, H., Matsuoka, TA, Kasami, R., Kohno, K., Iwawaki, T., Nakatani, Y., Yamasaki, Y., Shimomura, I., Matsuhisa, M. Pioglitazone reduces ER stress in the liver: Direct monitoring of in vivo ER stress using ER stress-activated indicator transgenic mice. *Endocr. J.* 56, 1103-1111 (2009)
17. Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S.,

- Kohno, K. Function of IRE1 $\alpha$  in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 16657-16662 (2009)
18. Oikawa, D., Kimata Y, Kohno, K., Iwawaki, T. Activation of mammalian IRE1 $\alpha$  upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp. Cell Res.* 315, 2496-2504 (2009)
19. Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., and Kohno, K. Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Mol. Cell*, 34, 191-200 (2009)
20. Suzuki, H., Kanekura, K., Levine, T., Kohno, K., Olkkonen, V.M., Aiso, S., Matsuoka M. ALS-linked P56S-VAPB, an aggregated loss-of-function mutant of VAPB, predisposes motor neurons to ER stress-induced death by inducing aggregation of co-expressed wild-type VAPB. *J. Neurochem.* 108, 973-985 (2009)
21. Takeuchi, M., Kimata Y., Kohno, K. *Saccharomyces cerevisiae* Rot1 functions as a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 19, 3514-3525 (2008)
22. Imagawa, Y., Hosoda, A., Sasaka, S., Tsuru, A., Kohno, K. RNase domains determine the functional difference between IRE1 $\alpha$  and IRE1 $\beta$ . *FEBS Lett.* 582, 656-660 (2008)
23. Yoshiuchi K, Kaneto H, Matsuoka TA, Kohno, K., Iwawaki T, Nakatani Y, Yamasaki Y, Hori M, Matsuhisa M. Direct monitoring of in vivo ER stress during the development of insulin resistance with ER stress-activated indicator transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 545-550 (2008)
24. Kohno, K. How transmembrane proteins sense endoplasmic reticulum stress. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 2295-2303 (2007)
25. Schroder, M., Kohno, K. Recent advances in understanding the unfolded protein response. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 2241-2244 (2007)
26. Kimata, Y., Ito, T., Ishiwata-Kimata, Y., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., Kohno, K. Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and binding to unfolded proteins. *J. Cell Biol.* 179, 75-86 (2007)
27. Kimura, Y., Saito, M., Kimata, Y. Kohno, K. Transgenic mice expressing a fully nontoxic diphtheria toxin mutant, not CRM197 mutant, acquire immune tolerance against diphtheria toxin. *J. Biochem.* 142, 105-112 (2007)
- [学会発表] (計 161 件)
1. 河野憲二, Physiological roles of mammalian ER stress sensors, IRE1 $\alpha$  and IRE1 $\beta$ . 第 85 回日本生化学会, 2012.12.16, 福岡
  2. 門倉広, 河野憲二, 哺乳動物細胞小胞体内におけるジスルフィド結合形成能力の低下を検出する為の鋭敏なアッセイ系の構築, 第 85 回日本生化学会, 2012.12.16, 福岡
  3. Yanagitani Kota, Kohno Kenji, “Ribosomal stalling promotes XBP1 $\alpha$  mRNA splicing upon ER stress.” EMBO conference “The Physiology of the endoplasmic reticulum (ER): Function & Dysfunction” Girona, 2012.10.17, Spain
  4. 河野憲二 「生物のストレス解消システムとその破綻による疾患」2012 年度日本農芸化学会関西支部大会, 2012.9.7 亀岡
  5. Kohno Kenji, “Ribosome pausing promotes XBP1 mRNA unconventional splicing upon ER stress” 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012.6.22, 名古屋
  6. Yuki Kimata-Ishiwata, Kenji Kohno, Yukio Kimata, “Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum-stress sensor Ire1 by different manners.” 第 45 回日本発生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012.5.30, 神戸
  7. Akio Tsuru, Michiko Saito, Megumi Iwano, Takao Iwawaki, David Ron, Kenji Kohno, “Negative feedback by IRE1 $\beta$  optimizes mucin production in goblet cells” Cold Spring Harbor Meeting: Molecular

Chaperones and Stress Response, 2012.5.4,  
Cold Spring Harbor, USA

8. Kenji Kohno, “IRE1 $\beta$ , not IRE1 $\alpha$ , is a key molecule for ER quality control in goblet cells” 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.15, 横浜
9. Kota Yanagitani, Yukiko Yokota, Yukio Kimata, Hiroshi Kadokura, Kenji Kohno “Ribosomal stalling promotes mRNA splicing on the endoplasmic reticulum” 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.15, 横浜
10. 河野憲二, 「小胞体ストレス応答の分子機構と生理的役割」第19回日本胎盤学会学術集会, 2011.9.30, 東京
11. Kota Yanagitani, Kenji Kohno, “A novel translational regulation in the unfolded protein response” 第84回日本生化学会大会, 2011.9.23, 京都
12. Kenji Kohno, “IRE1 $\beta$ , not IRE1 $\alpha$ , is a key molecule for ER quality control in goblet cells. Cold Spring Harbor Conferences Asia, 2011.9.21, Suzhou, China
13. Kenji Kohno, “A novel translational regulation in the unfolded protein response” “A novel translational regulation in the unfolded protein response” Gordon Research Conferences “Stress Proteins in Growth, Development & Disease” 2011.7.19, Lucca, Italy
14. Kenji Kohno, “Translational pausing in mammalian unfolded protein response” The 3<sup>rd</sup> International Symposium “Protein Community” 2010, 9,11, Nara
15. Kenji Kohno, “A novel function of XBP1u protein in the unfolded protein response: the role of XBP1u in tethering of mRNA to the

ER membrane” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Molecular Chaperones & Stress Response, 2010.5.5, Cold Spring Harbor, NY, USA

16. Kenji Kohno, “IRE1 $\beta$  is a key molecule for ER quality control in goblet cells” The 4<sup>th</sup> International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2009.10.7, Sapporo
17. Yukio Kimata, Masato Takeuchi, Kenji Kohno, “The role of IRE1 in unfolded protein response” IV International Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis, 2009.8.31, Warsaw, Poland
18. Kenji Kohno, “Dynamic regulation of XBP1 mRNA distribution in the ER stress response” Gordon Research Conferences: Stress Proteins in Growth, Development & Disease, 2009.7.1, Andover, USA
19. Kota Yanagitani, Kenji Kohno, “Dynamic regulation of XBP1 mRNA distribution in the ER stress response” 第61回日本細胞生物学会, 2009.5.27, 名古屋
20. Akio Tsuru, Kenji Kohno, “IRE1 $\beta$  is a key molecule for ER quality control in goblet cells” 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008.12.10, 神戸

〔図書〕(計14件)

1. 柳谷耕太, 河野憲二, 日本農芸化学会, 化学と生物 (2012) 50巻9号 633-640.
2. 柳谷耕太, 河野憲二, 日本生化学会, 生化学 (2012) 84巻4号 290-294.
3. 河野憲二, 南山堂, 「医学のための細胞生物学」(2009) 251-260.
4. 柳谷耕太, 河野憲二, 共立出版, 蛋白質核酸酵素 (2009) Vol.54 No16 2177-2183.
5. 河野憲二, シュプリンガー・ジャパン, 「酵母のすべて」(2007) 304-310.

[その他]

ホームページ

1. <http://bsw3.naist.jp/kouno/>

2. 河野研究室

<http://bsw3.naist.jp/courses/courses207.html>

3. 英語版

<http://bsw3.naist.jp/eng/courses/courses207.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 憲二 (KOHNO KENJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：50142005

### (2) 研究分担者

都留 秋雄 (TSURU AKIO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80273861

寺田 和豊 (TERADA KAZUTOYO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：00253724

### (3) 協力研究者

木俣 行雄 (KIMATA YUKIO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：60263448

柳谷 耕太 (YANAGITANI KOTA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任助教

研究者番号：70614775

斉藤 美知子 (SAITO MICHIKO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：40379558

門倉 広 (KADOKURA HIROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・博士研究員

研究者番号：70224558

山本 洋平 (YAMAMOTO YOHEI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・博士研究員