

様式 C-7-1

平成29年度科学研究費助成事業(科学研究費補助金)実績報告書(研究実績報告書)

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学	機関番号	14603
研究代表者	部局	研究推進機構		
	職	特任教授		
	氏名	河野 憲二		

1. 研究種目名 基盤研究(A)(一般) 2. 課題番号 17H01468

3. 研究課題名 細胞や生体の恒常性維持に必要な生理的小胞体ストレス応答機構の解明

4. 研究期間 平成29年度～平成31年度 5. 領域番号・区分 -

6. 研究実績の概要

(1) 膵島細胞におけるIRE1及びATF6経路活性化の生理的役割

IRE1 を膵島細胞のみでKOしたマウスから調製樹立した膵島培養細胞(MIN6(Ire1 R/R, Atf6 +/+))を用いてインスリンのフォールディング、分泌におけるIre1の役割を検討したところ、小胞体内でのプロインスリンのPDI familyによるフォールディングが大きく影響を受けることが分かった。そこでPDI familyの中でプロインスリンのフォールディングに関わっていることが予想されたPDI, PDIR, P5, ERp44, ERp46遺伝子すべてをMIN6(Ire1 R/R, Atf6 +/+)に強制発現したところ、プロインスリンの分泌の回復が観察された。さらにIre1の標的分子であるXBP1sが、これらのPDI family遺伝子上流に結合することを、ChIP(chromatin IP)解析により確認した。これらの結果から、膵島細胞で生理的に小胞体ストレスが高いレベルで活性化しており、この活性化によりその下流の5つのPDIsが高レベルで産生され、プロインスリンのフォールディングを正常に行っていることが明らかとなった。

(2) 翻訳休止と連動した新規SRP経路の解析と小胞体ストレス応答

IRE1の標的因子であるXBP1u mRNAは、XBP1uの翻訳が翻訳休止配列(PS)により休止することにより、その上流にある疎水性領域HR2にSRPが結合し、XBP1u mRNAが小胞体膜のトランスロコンに運ばれることにより、IRE1による効率よい特殊スプライシングを受ける。翻訳休止がおきているときにPSはリボソームトンネル内にあり、リボソームタンパク質RPL3, RPL4, RPL7と相互作用していることが、免疫沈降-質量解析により明らかとなった。

7. キーワード

小胞体ストレス 糖尿病 プロインスリン 翻訳休止 特殊スプライシング

8. 現在までの進捗状況

区分 (2) おおむね順調に進展している。

理由

2種の膵島細胞MIN6(Ire1 R/R, Atf6 +/+), MIN6(Ire1 fl/fl, Atf6 -/-)細胞はすでに樹立しておりMIN6(Ire1 R/R)では、PDI familyの誘導阻害によりプロインスリンのフォールディングがうまくいかないことも明らかとなった。これからIRE1, ATF6の2重ノックアウトによる影響をみる予定だが、米国Peter Walterらのグループが取得したATF6の特異的阻害剤Ceapinを用いて両者を阻害する実験を共同研究として行っている。また、XBP1uの研究に関しては、リボソームタンパク質RPL3, RPL4, RPL7のノックダウンで、XBP1uの翻訳休止が弱くなることが観察され計画は順調に進んでいる。

2 版

9. 今後の研究の推進方策

(1) 藤島 細胞におけるIRE1及びATF6経路活性化の生理的役割
5つのPDI family (PDI, PDI_R, P5, ERp44, ERp46)のうち、どのPDIがプロインスリンのフォールディングに重要なかを明らかにする。今までに野生型の細胞に5種のPDIを同時に発現させると、インスリン分泌が15-20%程度増加することが明らかになっているので、そのアッセイ系を使う予定である。IRE1、ATF6の2重KOマウスではさらに顕著なインスリン分泌の抑制が見られる。それをATF6の特異的阻害剤Ceapinを用いて検討する。

(2) 翻訳ポーリングと連動した新規SRP経路の解析と小胞体ストレス応答
前年度得られた、相互作用していると考えられるRPL3, RPL4, RPL7のノックダウン実験の再現と、RPL4のリボソームトンネル部分に露出しているアミノ酸に変異を入れ、XBP1uの翻訳休止が解除されるかどうかについても検討を加える。

10. 研究発表(平成29年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計6件(うち査読付論文 6件/うち国際共著論文 2件/うちオープンアクセス 1件)

1. 著者名 Tsuchiya Yuichi, Saito Michiko, Kadokura Hiroshi, Miyazaki Jun-ichi, Tashiro Fumi, Imagawa Yusuke, Iwawaki Takao, Kohno Kenji	4. 巻 217
2. 論文標題 IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1287 ~ 1301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201707143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaoka Yasuyo, Choi Bae Young, Kim Hanul, Shin Seungjun, Kim Yeongho, Jang Sunghoon, Song Won-Yong, Cho Chung H., Yoon Hwan Su, Kohno Kenji, Lee Youngsook	4. 巻 94
2. 論文標題 Identification and functional study of the endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 91 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mai Chi Thanh, Le Quynh Giang, Ishiwata-Kimata Yuki, Takagi Hiroshi, Kohno Kenji, Kimata Yukio	4. 巻 18
2. 論文標題 4-Phenylbutyrate suppresses the unfolded protein response without restoring protein folding in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsyr/foy016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hitomi, Shiba Yoko, Tsuchiya Yuichi, Saito Michiko, Kohno Kenji	4. 巻 42
2. 論文標題 4 μ 8C inhibits insulin secretion independent of IRE1 RNase activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 61-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.17002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyai Masashi, Tsunekage Yukino, Saito Michiko, Kohno Kenji, Takahashi Kenzo, Kataoka Kohsuke	4. 巻 26
2. 論文標題 Ectopic expression of the transcription factor MafB in basal keratinocytes induces hyperproliferation and perturbs epidermal homeostasis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 1039 ~ 1045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.13364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tschurtschenthaler M., Adolph T. E., Ashcroft J. W., Niederreiter L., Bharti R., Saveljeva S., Bhattacharyya J., Flak M. B., Shih D. Q., Fuhler G. M., Parkes M., Kohno K., Iwawaki T., Janneke van der W. C., Harding H. P., Smith A. M., Peppelenbosch M. P., Targan S. R., Ron D., Rosenstiel P., Blumberg R. S., Kaser A.	4. 巻 214
2. 論文標題 Defective ATG16L1-mediated removal of IRE1 drives Crohn's disease-like ileitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 401 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20160791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件(うち招待講演 4件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Miku Ohfurudono, Ash-way Sogawa, Yukio Kimata, Kenji Kohno
2. 発表標題 Molecular mechanism of XBP1u translational pausing
3. 学会等名 EMBO Conference: Protein quality control (国際学会)
4. 発表年 2017年

2 版

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 Translational pausing in the ER stress signaling
3. 学会等名 International Symposium on Protein Quality Control (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 Translational pausing in the ER stress signaling
3. 学会等名 FASEB Science Research Conferences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaaki Koike, Satoshi Kanda, Kota Yanagitani, Kenji Kohno
2. 発表標題 The role of translational pausing in the delivery of XBP1u mRNA to the ER via the SRP pathway
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木俣行雄
2. 発表標題 Unfolded protein response-オルガネラ異常検知メカニズム-
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小池雅昭, 野坂祐, 河野憲二
2. 発表標題 XBP1sタンパク質における転写活性化ドメインの同定
3. 学会等名 第12回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 都留秋雄, 坪山恭之, 大澤祐介, 河野憲二
2. 発表標題 ムチン産生に関する小胞体ストレスセンサーIRE1 はIRE1 とは異なるリン酸化制御を受ける
3. 学会等名 第12回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 土屋雄一, 斉藤美知子, 門倉広, 宮崎純一, 田代文, 今川佑介, 岩脇隆夫, 河野憲二
2. 発表標題 膵島 細胞でのIRE1 -XBP1経路の生理的活性化の意義
3. 学会等名 第12回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tran Minh Duc, 木俣行雄
2. 発表標題 Activation of yeast Ire1 upon diauxic shift
3. 学会等名 第12回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2017年

2 版

1. 発表者名 小池雅昭, 額田知実, 山田麗奈, 赤沼啓志, 斉藤美知子, 伊川正人, 河野憲二
2. 発表標題 ペプチド鎖伸長因子2に形成されるジフタミドの生理的意義の解明
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 都留秋雄, 坪山恭之, 大澤祐介, 河野憲二
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーIRE1 の活性化においてリン酸化が果たす複数の役割
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大古殿美加, 曾川愛守榮, 木俣行雄, 河野憲二
2. 発表標題 哺乳動物細胞におけるXBP1u の機能性翻訳休止機構の解明
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

1 1. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件 (うち出願0件 / うち取得0件)

1 2. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

13. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
USA	University of California, San Francisco	Harvard Medical School	-	-
United Kingdom	University of Cambridge	-	-	-
Korea	Pohang Univ. of Science & Technology	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

14. 備考

河野特任研究プロジェクト
<http://www.naist.jp/iri/kouno/>
河野特任研究プロジェクト
<https://www.facebook.com/naist.kohnolab/>