

## 平成17年度科学研究費補助金（学術創成研究費）研究進捗状況報告書

ふりがな		もり かずとし					
①研究代表者氏名		森 和俊		②所属研究機関・部局・職		京都大学・大学院理学研究科・教授	
③研究課題名	和文	小胞体の機能と制御のダイナミクス					
	英文	Dynamics of the function and regulation of the endoplasmic reticulum.					
④研究経費（直接経費） 18年度以降は内約額 単位：千円	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計	
	86,900	92,300	78,300	78,000	78,300	413,800	
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職		現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
森 和俊	京都大学・大学院理学研究科・教授		分子生物学	小胞体の機能と制御の分子機構解析			
村田昌之	東京大学・大学院総合文化研究科・教授		細胞生物学	小胞体の機能と制御の可視化と再構成			
佐藤隆史	群馬大学・生体調節研究所・助手			小胞体の機能と制御の個体レベルでの解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>タンパク質がゲノム情報によって規定された機能を発揮するためには、それぞれに固有の立体構造を獲得・形成していることが必要不可欠である。分泌タンパク質や膜タンパク質の高次構造形成は、真核細胞では小胞体において行なわれる。これまで小胞体は、折り畳みに適した環境を提供する“静的な場”として位置付けられてきたが、最近の急速な研究の進展から、小胞体はその機能と制御がダイナミックに連動した“動的な場”として捉え直され、多方面から注目を集めるようになった。すなわち、小胞体における折り畳み過程に破綻が生じると小胞体ストレス応答という恒常性維持機構が活性化されるのである。小胞体ストレス応答の特徴として、これが小胞体からの情報発信であるため、膜結合性転写因子のプロテオリシスによる活性化など細胞膜表面からの情報伝達とは全く異なった機構が使われている点をあげることができる。また、細胞が異常タンパク質の蓄積をどのようにして認識しているかは、重要かつ興味深い課題である。本研究は、この応答の全容を解明し、小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積したときに細胞はどう対応するのか、その挙動を具体的な分子の動きとして示すことを目的とするものである。さらに小胞体ストレス応答には、小胞体とゴルジ装置の間のコミュニケーションが必要とされることがわかったので、そのためのネットワーク構築の分子機構も明らかにしたい。</p>							

⑦これまでの研究経過

I 本研究は、学術創成研究費の趣旨の3つの観点のうち、どの観点到に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。

創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

II 研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。

(京大・森) 小胞体膜結合性転写因子ATF6の解析

ATF6は、分泌系タンパク質の高次構造形成を介助・促進する小胞体シャペロンの発現を制御する転写因子として代表者が単離したものである。ATF6は小胞体膜に埋め込まれた膜貫通型タンパク質として合成されているが、小胞体ストレス下で小胞体の機能に異常が生じると、ゴルジ装置へと移行し、ゴルジに局在している2つのプロテアーゼによって段階的な切断を受ける。切断により膜から遊離したN末端には転写因子として必要な機能ドメインが全て揃っており、核へ移行して小胞体シャペロン遺伝子の転写を活性化する。このようにATF6は小胞体の機能を制御するために実にダイナミックな動きを示す。これまでに学術創成の成果として以下の重要な結果を得ており、現在論文投稿準備中である。

①小胞体ストレスの感知機構：小胞体内腔に位置するATF6のC末端領域には2つのシステイン残基が存在し、ATF6はこのジスルフィド結合を介して酸化型モノマー、ダイマー、およびオリゴマーとして小胞体に存在している。小胞体ストレスに反応してこのジスルフィド結合が還元されることが、感知の仕組みとして重要であることを示す結果を得ている。

②ゴルジ装置へのエスコート機構：小胞体内腔のほぼ連続する10アミノ酸をアラニンに置換すると、小胞体ストレス下でもATF6はゴルジ装置へ移行することができないことを見いだした。この結果からATF6をゴルジへとエスコートするタンパク質の存在が示唆され、またこのエスコートタンパク質を単離同定する手段を得たと考えている。

③ATF6ノックアウトマウスの解析：ATF6には $\alpha$ と $\beta$ の2種類存在するので、まず $\alpha$ のノックアウトマウスを作製し、それから採取した胎児性繊維芽細胞MEFでは、野生型MEFと比較して小胞体ストレスに反応した小胞体シャペロンの転写誘導能が顕著に低下していることを見だし、ATF6 $\alpha$ が小胞体シャペロンの主要な制御因子であると結論付けることができた。

(東大・村田) 小胞体 (ER) exit sites (ERES)のダイナミクスの細胞周期依存的な動態可視化とその制御機構の解明

今までに、セミインタクト細胞を利用した次の3つの可視化・再構成アッセイ系を構築した。①小胞体 $\leftrightarrow$ ゴルジ体間小胞輸送、②小胞体exit sites (以下、ERES)のM期依存的な分解、③小胞体ネットワークの細胞周期依存的な分解と再構築、である。これら3つの可視化・再構成アッセイ系を駆使して、小胞体-ゴルジ体間小胞輸送の細胞周期依存的な制御機構を明らかにした。ERESは、小胞体からゴルジ体へ向かう輸送小胞形成を担う小胞体ネットワーク上のマイクロドメインである。我々の先行実験（「⑩平成17年度及びそれ以降の研究計画・方法」で記述）より、このERES構造体は、小胞体の重要な機能である「新生膜タンパク質の選別輸送」と「品質管理」の両経路に密接に関係していることが予想される。先ず我々は、ERESに局在する膜タンパク質Yip1AのGFP融合タンパク質 (Yip1A-GFP) をプローブとして、世界で初めてERESの細胞周期依存的な動態可視化に成功した。ERESは細胞周期依存的に形成・分解を繰り返しており、間期では小胞体ネットワークに近接する点状の膜ドメインを形成しているが、M期には分解しYip1A-GFPもネットワーク中に拡散することがわかった。また、Yip1A-GFPを指標に、セミインタクト細胞アッセイ系を駆使して、ERESマイクロドメインの細胞周期依存的な形成・分解に関わる細胞質因子を探索した。その結果次のことを明らかにした。(i)ERES形態形成にはp97/p47/syntaxin5から成る細胞内膜融合装置のATP加水分解が必要不可欠であること、(ii)M期のマスターキナーゼであるcdc2 キナーゼが、M期においてp47をリン酸化し、p97/p47膜融合装置を不活化することで、ERESの分解や小胞体ネットワークの部分的切断が誘起されること、(iii)M期での小胞体-ゴルジ体間輸送を定量的に解析したところ、ERES分解がM期での小胞体 $\rightarrow$ ゴルジ体間順行小胞輸送を停止させるが、ゴルジ体 $\rightarrow$ 小胞体間逆行輸送には影響を与えないこと、等である。これらの結果を基に、M期における小胞体 $\rightarrow$ ゴルジ体間小胞輸送の制御モデルを提唱し2報の論文として発表し、現在1報投稿中である。

III その他

森・村田グループ共同で、ATF6が小胞体ストレスに反応して小胞体からゴルジへ移行する過程を、セミインタクト細胞を用いて可視化し再構成する実験を行なっている。これが成功すれば、ATF6の輸送を細胞質側から制御する仕組みを明らかにすることができ、小胞体とゴルジ間のネットワーク構築の分子基盤を解明することができる。

⑧特記事項

〔 これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。 〕

(京大・森)

本学術創成研究は順調且つ着実に成果を上げており、5年間の研究期間終了時には推薦者の期待に十分に答えることができると考えている。「これまでの研究経過」に記載した①小胞体ストレスの感知機構と②ゴルジ装置へのエスコート機構の解析が進めば、代表者が自身で開拓してきた独創的な小胞体ストレス応答機構の解析がさらに進展するだけでなく、小胞体ストレスの本質は何か、高次構造の異常なタンパク質が蓄積するとは具体的に何を意味するかが明らかになる。現在、小胞体ストレスという概念は多方面に波及しており、様々な疾患が小胞体ストレスに起因する可能性が示されつつある。従って本研究の進展は、疾患の原因の理解を含む多方面にインパクトを与えるものと考えられる。さらに③のノックアウトマウスの解析で、現時点でATF6 $\alpha$ ノックアウトマウスにフェノタイプはでていないが、このマウス由来のMEF細胞では小胞体ストレス応答能が顕著に低下していることから、ATF6 $\beta$ とのダブルノックアウトマウスを作製すると面白いフェノタイプが出、ATF6が直接疾患と関わる可能性も考えられる。

(東大・村田)

「セミインタクト細胞チップ」と「セミインタクト細胞アッセイ自動化装置」にプロトタイプ作成  
 セミインタクト細胞アッセイは、本プロジェクトにおける「小胞体ストレス応答」に関わる研究だけに止まらず、非常に汎用性の広いタンパク質・遺伝子機能解析技術である。この技術は単に細胞膜に穴をあけて物質を導入する技術でなく、むしろ、透過性を持った細胞(セミインタクト細胞)内で生起する様々な生命現象を再現性よく再構成し、関連する現象を生化学的に生物物理学的に解析する技術である。セミインタクト細胞を用いたアッセイは、世界的にも幾つかのグループがSL0法やジグトニン法を用いて単発的に研究を行っているが、その数は少なく2003-2004年でも十数報の論文が発表されているに過ぎない。その最大の理由として考えられるのが、この技術の再現性の難しさに有る。

本学術創成研究で我々が試作した「セミインタクト細胞チップ」(図1)と「セミインタクト細胞アッセイ自動化装置」(図2)は、再現性のあるセミインタクト細胞の調製とセミインタクト細胞を利用した多様なアッセイのハイスループット化に対応できるようにするために必要不可欠な装置である。本装置は、我々の研究室で蓄積したセミインタクト細胞作成技術のノウハウ及びそれを駆使した様々なアッセイプロトコルを全てプログラムとして入力し、新しい細胞株とそれを利用したアッセイを構築するたびにその最適化された条件をプログラムとして追加入力することによって、今後、多様な細胞系にそして多様なセミインタクト細胞アッセイに本装置に対応できる。また、「セミインタクト細胞チップ」としてだけではなく、当然「生細胞チップ」作成とそれを駆使したアッセイにも本装置は対応可能である。チップ形状は市販のDNAチップと同規格であり、そのまま各well毎の蛍光観察・蛍光測定・発光測定が可能である。本装置は未だプロトタイプ機であるためサンプル処理能力に限界があり、チップのサンプル計測・観察を自動化するためのロボットや検出機器側の開発が殆ど手つかずの状態であるが、本プロジェクトの目的の一つである「小胞体ストレス応答を制御するタンパク質因子-Chemical libraryのスクリーニング」を通して装置スペックに改良を加え、本プロジェクト期間内にできるだけ様々な生命現象解明へのセミインタクト細胞アッセイの応用に対応できるようにしたい。本装置及びチップは、日京テクノス(株)との共同開発であり、現在特許申請準備中である。

図1：セミインタクト細胞チップ

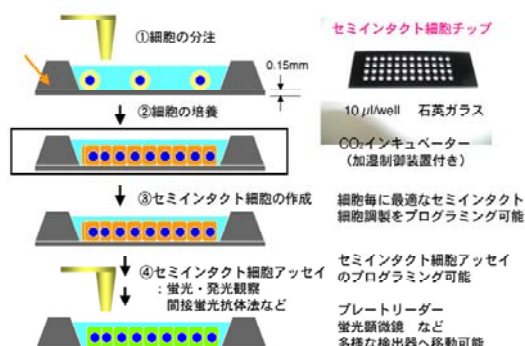
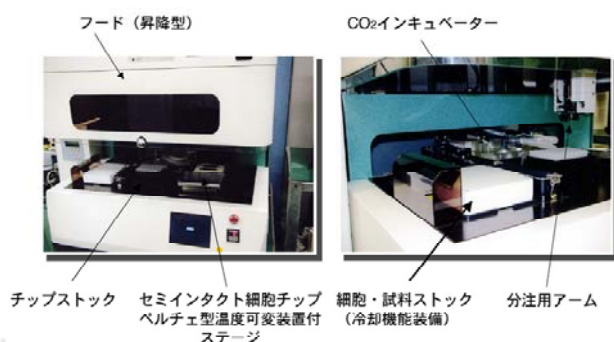


図2：セミインタクト細胞チップ自動作成及び自動アッセイ装置



## ⑨研究成果の発表状況

〔 この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。 〕

### 原著論文

- 1) Kano, F., Kondo, H., Yamamoto, A., Tanaka, A.R., Hosokawa, N., Nagata, K., and Murata, M., The maintenance of the ER network is regulated by p47, a cofactor of p97, through phosphorylation by cdc2 kinase. *Genes to Cells*, in press, 2005.
- 2) J. Ramos-Castaeda, Y.-N. Park, M. Liu, K. Hauser, H. Rudolph, G. E. Shull, M. F. Jonkman, K. Mori, S. Ikeda, H. Ogawa, and P. Arvan, Deficiency of ATP2C1, a Golgi ion pump, induces secretory pathway defects in ER-associated degradation and sensitivity to ER-stress. *J. Biol. Chem.*, in press, 2005.
- 3) Kano, F., Tanaka, A.R., Yamauchi, S., Kondo, H., and Murata, M., Cdc2 kinase-dependent disassembly of endoplasmic reticulum (ER) exit sites inhibits ER-to-Golgi vesicular transport during mitosis. *Mol. Biol. Cell*, 15, 4289-4298, 2004.
- 4) Nadanaka, S., Yoshida, H., Kano, F., Murata, M., and Mori, K., Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, 15, 2537-2548, 2004.
- 5) K. Yamamoto, H. Yoshida, K. Kokame, R. J. Kaufman, and K. Mori, Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive *cis*-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem.*, 136, 343-350, 2004.
- 6) R. Sriburi, S. Jackowski, K. Mori, and J. W. Brewer, XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, 167, 35-41, 2004.
- 7) K. E. Gunn, N. M. Gifford, K. Mori, and J. W. Brewer, A role for the unfolded protein response in optimizing antibody secretion. *Mol. Immunol.*, 41, 919-927, 2004.
- 8) L. Romero-Ramirez, H. Cao, D. Nelson, E. Hammond, A.-H. Lee, H. Yoshida, K. Mori, L. H. Glimcher, N. C. Denko, A. J. Giaccia, Q.-T. Le, and A. C. Koong, XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res.*, 64, 5943-5947, 2004.
- 9) L. Zeng, M. Lu, K. Mori, S. Luo, A.S. Lee, Y. Zhu, and J. Y.-J. Shyy, Activating transcription factor 6 modulates the sterol regulatory element binding protein-mediated lipogenesis. *EMBO J.*, 23, 950-958, 2004.
- 10) M. Flores-Diaz, J.-C. Higueta, I. Florin, T. Okada, P. Pollesello, T. Bergman, M. Thelestam, K. Mori, A. and Alape-Giron, A cellular UDP-glucose deficiency causes overexpression of glucose/oxygen regulated proteins independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *J. Biol. Chem.*, 279, 21724-21731, 2004.
- 11) T. Okada, K. Haze, S. Nadanaka, H. Yoshida, N. G. Seidah, Y. Hirano, R. Sato, M. Negishi, and K. Mori, A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J. Biol. Chem.*, 278, 31024-31032, 2003.
- 12) Uchiyama, K., Jokitalo, E., Lindman, M., Jackman, M., Kano, F., Murata, M., Zhang, X., and Kondo, H., The localization and phosphorylation of p47 are important for Golgi disassembly-assembly during the cell cycle. *J Cell Biol.*, 161,1067-1079, 2003.
- 13) Tanaka, A.R., Abe-Domae, S., Ohaashi, T., Aoki, R., Morinaga, G., Okuhira, K., Ikeda, Y., Kano F., Matuo, M., Kioka, N., Amachi, T., Murata, M., Yokoyama, S. and Ueda, A., Effects of mutations of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding/hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 278, 8815-8819, 2003.
- 14) M. M. Khan, T. Nomura, T. Chiba, K. Tanaka, H. Yoshida, K. Mori, and S. Ishii, The fusion oncoprotein PML-RAR $\alpha$  induces endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of N-CoR and ER stress. *J. Biol. Chem.*, 279, 11814-11824, 2003.

### 国際会議における招待講演

- (1) K. Mori Gordon Conference on "Stress-induced Gene Expression" on July 28<sup>th</sup>, 2003 at Oxford, UK. Title: Roles of transcriptional induction programs in the quality control system in the endoplasmic reticulum.
- (2) K. Mori Naito Conference on "Medicine and Biology of Innate Immunity (I)" on October 30<sup>th</sup>, 2003 at Kanagawa, Japan. Title: The Unfolded Protein Response: Signaling from the Endoplasmic Reticulum to the Nucleus.
- (3) K. Mori Cold Spring Harbor Meeting on "Molecular Chaperones and the Heat Shock Response" on May 7<sup>th</sup>, 2004 at Cold Spring Harbor, New York, USA. Title: Roles of the transcription factors ATF6 and XBP1 in the homeostasis of the ER.
- (4) K. Mori FASEB Summer Research Conference "Protein Folding in the Cell" on August 4<sup>th</sup>, 2004 at Saxtons River, Vermont, USA. Title: Role of transcriptional induction systems in the ER quality control.