

## 小胞体ストレス応答の分子機構とその破綻による疾患機序の解明

The molecular mechanism of ER stress response and the pathophysiology of ER stress disorders

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

課題番号：24228002

河野 憲二 (KOHNO KENJI)



### 研究の概要

哺乳動物には小胞体ストレス応答経路を活性化させて機能を維持している膵島β細胞や大腸杯細胞などの分泌細胞がある。これらの細胞に着目し、生理的に起きている小胞体ストレス応答の意義や、それらが破綻したときに起こる疾患との関係を明らかにし、哺乳動物における小胞体ストレス応答の分子機構と生理的意義を明らかにする。

研究分野：応用生物科学

キーワード：細胞応答・情報伝達

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレス応答の研究は、tunicamycin, thapsigargin, dithiothreitol などの薬剤処理による研究が主流であった。それら薬剤を使うことにより、強度の小胞体ストレスを誘導し細胞レベルでの応答を調べることは、小胞体ストレス応答の大筋を理解するのに大きく貢献した。しかし近年、哺乳動物組織での生理的レベルの小胞体ストレス応答の解析にも目が向けられるようになり、発生や細胞の分化にとっても重要な役割をしていることがわかり始めている。

### 2. 研究の目的

哺乳動物個体は何故多様化した小胞体ストレス応答経路を進化的に発達させてきたのか、インスリンやムチン産生における小胞体ストレスセンサーの生理的役割を個体・細胞・分子レベルで明らかにし、糖尿病、大腸炎、寄生虫感染など小胞体ストレス応答が体の維持や防御に重要であることを示す。

### 3. 研究の方法

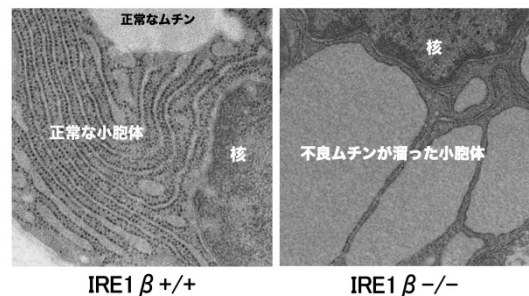
(1) IRE1β KO マウスを用い、大腸杯細胞のムチン合成・分泌や寄生線虫を感染させたときの小腸杯細胞の過形成、ムチン産生、排虫との関係を明らかにする。(2) 小胞体ストレスセンサーIRE1αを膵島β細胞でのみ欠失したマウスを用いて、インスリン産生におけるIRE1αの役割を個体レベル、細胞レベルで詳細に解析し、糖尿病との関連を調べる。同様のことをIRE1α/ATF6αとのDKOマウスについても解析する。(3) XBP1u

mRNA の小胞体膜へのリクルート機構を、cell free の翻訳系、培養細胞の両レベルで詳細に解析する。

### 4. これまでの成果

#### (1) IRE1β は杯(さかずき)細胞のムチン産生に重要な役割を果たす

小胞体ストレスセンサーIRE1は、哺乳動物では2つのパラログIRE1αとIRE1βが存在する。IRE1αは多くの組織で発現しており、発生に必須の遺伝子であることがわかっているが、IRE1βに関しては詳細な解析はなされていなかった。IRE1βは大腸、胃、小腸で発現しており、特に大腸、小腸のムチンを産生する杯細胞で特異的に発現が高いことを明らかにした。IRE1β KO マウスと野生型マウス由来の大腸杯細胞を電子顕微鏡で観察するとIRE1β KO マウス由来の杯細胞では、粗面小胞体の著しい肥大が観察され、生化学



的な解析からムチン(MUC2)前駆体が小胞体内に多量に蓄積していることが明らかとなった(上図参照)。IRE1β mRNAの半減期を調べたところ、IRE1β KO 杯細胞では野生

型に比べ非常に遅いことが明らかとなった。これまでに当研究室で得たデータを合わせて考えると、杯細胞では多量のムチン合成が行われており、IRE1 $\beta$ が活性化することにより *MUC2* mRNA を切断、結果としてレベルを下げ小胞体の folding capacity を保っている、一方、 $\beta$  KO 杯細胞では IRE1 $\beta$  が機能しないので、その fine tuning ができないことにより、小胞体の folding capacity を超えた過剰のムチンが合成され、結果として凝集し小胞体内に蓄積するのではないかと考えている。

#### (2) 膵島 $\beta$ 細胞のインスリン産生に IRE1 $\alpha$ は必須である

膵島 $\beta$ 細胞では spliced form である *XBPIs* mRNA が恒常的に発現していることから、IRE1 $\alpha$  は常時活性化していることを見出した。一方、IRE1 $\alpha$  を膵島 $\beta$ 細胞でのみノックアウトしたマウスを作製すると、24週齢以降にインスリン産生の低下が認められ、糖尿病症状を示すようになった。膵島 $\beta$ 細胞での IRE1 $\alpha$  恒常的活性化とインスリン産生との関係を明らかにするために、IRE1 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> マウスから培養 $\beta$ 細胞を樹立 (MINS 細胞)、Cre を発現させることにより IRE1 $\alpha$  <sup>$\Delta R/\Delta R$</sup>  細胞 (IRE1 $\alpha$  の RNase 欠損型) を作出し、インスリン産生に及ぼす IRE1 $\alpha$  の影響を調べたところ、IRE1 $\alpha$  を欠損するとプロインスリン、インスリン両者の発現量が激減することを見出した。小胞体シャペロンのトランスクリプトームを行うと、PDI family に属する5種の遺伝子発現が有意に低下していた。この細胞に野生型の IRE1 $\alpha$  を導入発現させると、*XBPIu* mRNA のスプライシングが回復し、プロインスリン、インスリン産生量の回復が認められ同時に PDI 関連遺伝子の蛋白質レベルでの回復も認められた。このことから、インスリン産生細胞では常に IRE1 $\alpha$  が活性化しており、XBPIs が産生されその下流の遺伝子群、特に PDI family の5種の蛋白質を高発現することが、インスリン産生に重要であることが示唆された。

#### (3) XBPIu の翻訳休止を利用した小胞体膜への輸送から見えてきた新しい SRP 経路

哺乳動物で、非ストレス下でも発現している XBPIu 蛋白質は、C 末側に小胞体移行シグナル (HR2) と翻訳休止シグナルの2つをもち、この2つを利用し自身の mRNA を小胞体膜上に運ぶことを報告した。XBPIu の HR2 配列は通常はシグナル配列としては機能しないが、翻訳休止を起こすと SRP に認識され小胞体膜へと運ばれる。しかしこの配列では最終的にはトランスロコンを通過できないように XBPIu は小胞体膜表層蛋白質として局在化する。これは従来の SRP 経路とは異なる新しい SRP ルートと考え、現在検証中である。

#### 5. 今後の計画

現在進めている研究を着実に進め、生理的レベルでの小胞体ストレス応答経路の活性化が、生理機能の維持や生体防御機構に重要であることを実証する。特に寄生虫感染時の排虫や膵島 $\beta$ 細胞でのインスリン産生に、ストレスセンサーがどのように関わっているのかを分子レベルで明らかにする。

#### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Mathuranyanon, R, Kohno, K., Kimata, Y., et al. Tight regulation of the unfolded protein sensor Ire1 by its intramolecularly antagonizing subdomain. *J. Cell Sci.* in press (2015)
2. Miyagawa, K-I, Ishiwata-Kimata, Y., Kohno, K., and Kimata, Y. Ethanol stress impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and activates Ire1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1389-1391 (2014)
3. Kadokura H., Saito, M., Tsuru, A., Hosoda, A., Iwawaki, T., Inaba, K., and Kohno, K. Identification of the redox partners of ERdj5/JPDI, a PDI family member, from an animal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 245-250 (2013)
4. Adolph, T.E., Kohno, K., Iwawaki, T., Kaser, A., Blumberg, R.S. et al., Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature*, 503, 272-276 (2013)
5. Ishiwata-Kimata, Y., Kohno, K., Kimata Y., et al. Actin filaments are required for efficient clustering of endoplasmic stress sensor Ire1. *Cell Struct. Funct.*, 38, 135-143 (2013)
6. Tsuru, A., Saito, M., Kohno, K., et al. Negative feedback by IRE1 $\beta$  optimizes mucin production in goblet cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 2864-2869 (2013)
7. Sopha, P., Saito, M., Tsuru, A., Kohno, K. et al. A novel mammalian ER-located J-protein, DNAJB14, can accelerate ERAD of misfolded membrane proteins. *Cell Struct. Funct.* 37, 177-187 (2012)

#### 受賞

1. 文部科学大臣表彰科学技術賞 (研究部門) (平成 25 年 4 月)

ホームページ等

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