小胞体ストレス応答に関与する新規膜貫通型リボヌクレアーゼ分子の機能解析

Functional analyses of a novel transmembrane-RNase concerning endoplasmic reticulum stress-response.

代表研究者 奈良先端科学技術大学院大学 河野憲二

Nara Institute of Science & Technology

(研究目的)

ウイルス感染、グルコース濃度の低下、薬剤摂取等により、動物細胞の小胞体内に変性蛋白質が蓄積すると、細胞は小胞体シャペロン遺伝子群の転写レベルでの誘導・蛋白質合成の抑制・変性蛋白質の分解という3つの手段でこの環境ストレスに対抗する。この応答は小胞体ストレス応答と呼ばれ、酵母からヒトに至るまで保存されている細胞のホメオスタシスに関わる重要な応答機構である。小胞体膜上のIRE1は、アミノ末端側を小胞体内腔にカルボキシル末端側を細胞質に向けたI型膜貫通蛋白質で、内腔側領域で変性蛋白質の蓄積を感知し、キナーゼ/リボヌクレアーゼ活性をもつ細胞質側領域でその情報を細胞質や核へ伝える興味深い分子である。私達が独自に単離したヒトhIRE1 β は、小胞体ストレスに呼応し28S ribosomal RNA(rRNA)を特異的に切断し蛋白質合成を抑制することを見出したが、構造の類似したhIRE1 α はシャペロン遺伝子群の誘導を起こすことが知られている。本研究は、(1) hIRE1 α とhIRE1 β 両者の作用の違いがどのドメインに依存しているのか、また(2) IRE1の小胞体内腔側のドメインはどのようにして構造異常の蛋白質を感知しているのか、について明らかにすることを目的とした。

(研究経過と考察)

1 IRE1のサイトゾル側領域の機能解析

小胞体ストレスセンサーであるIRE1は、N末側半分を小胞体内腔にC末側半分をサイトゾル側に向けたI型の膜貫通型蛋白質である。C末側にはキナーゼ領域とRNase領域をもち、N末側は構造異常蛋白質を感知していると考えられる。酵母では1種類しかないが、哺乳動物では α と β の2種類がクローニングされており、C末側はキナーゼ領域が80%、RNase領域が60%同一アミノ酸という非常に高い相同性を示す。興味深

いことに IRE1 α はユビキタスに発現されているが、IRE1 β は消化器系の器官特異的に高発現している。C 末側の相同性が高いにも関わらず、動物細胞に過剰発現させると IRE1 α は Unfolded Protein Response (UPR: 小胞体シャペロン遺伝子群の転写レベルでの誘導) を誘起するが、IRE1 β では 28S rRNA の特異的な切断が観察され、また細胞死が引き起こされる。この作用の違いを IRE1 のどの領域がになっているかを明らかにするために、C 末側領域で α と β のキメラ蛋白質を作製してその生理活性を調べた。IRE1 α の RNase 領域を β と入れ換えたもの (α/β と表記)、IRE1 β の RNase 領域を α と入れ換えたもの (β/α と表記) の cDNA を動物細胞発現用ベクターに組み入れたものを作製し、培養 HeLa 細胞に発現させ、UPR と 28S rRNA の切断活性をそれぞれ測定した。 α/β は 28S rRNA 切断活性を示したが UPR 活性は示さず、逆に β/α は UPR 活性を示したが 28S rRNA 切断活性は示さなかった。この結果から、両者の活性の相違はそれぞれの RNase 領域の相違により起こることが明らかとなった。今後は、この活性の相違を *in vitro* で実証し、またその活性の違いが *in vivo* でどのような生理的意味をもつかを明らかにしたい。

2 IRE1 による構造異常タンパク質蓄積の感知機構

酵母の UPR は小胞体膜貫通タンパク質 IRE1 が、小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積してきたことを感知して活性化されることにより起こる。この活性化がどのようにして起きるかを解析していた時に、非ストレス時には IRE1 と BiP が結合しており、小胞体ストレス時には IRE1 と BiP との結合がはずれるという結果を得た。このことは、「非ストレス時には IRE1 の 2 量体化が BiP との結合により抑えられているが、ストレス時には BiP が構造異常タンパク質に結合することにより IRE1 から遊離し、BiP の遊離により IRE1 が 2 量体化し活性化する」という小胞体ストレスの BiP による負の制御説を支持した。この実験事実を、我々は酵母の系で、米国の D. Ron らは動物細胞の系で確認した。しかしその結果は小胞体ストレスの活性化と、IRE1 と BiP との結合解離が協調して起こることを観察しただけであり、あくまでも間接的な結果を示したものであった。今回我々は、BiP の温度感受性変異株を用いることにより、この仮説が正しいことをより直接的に示すことに成功した。BiP は機能的領域が大きく 2 つに分けられ、N 末側が ATP 結合水解活性、C 末側が基質結合認識領域となっている。酵母 BiP の変異株は大きく 2 つに分けられ、1 つは ATP 結合領域の変異型 (タイプ A) であり、もう 1 つは基質

結合領域の変異型（タイプS）である。タイプAでは、許容温度でツニカマイシン処理をして小胞体ストレスをかけるとUPRは起こるが、非許容温度ではどちらの条件下でもUPRは起こらなかった。この時、抗IRE1抗体により免疫沈降をすると、非許容温度下では小胞体ストレスの有無にかかわらず、IRE1とBiPとは結合したままであることが明らかとなった。一方、タイプSの非許容温度下では、小胞体ストレスをかけても、またかけなくても、どちらの条件下でもUPRは誘導され、免疫共沈降実験でもIRE1とBiPとの結合は認められなかった。以上の結果は、IRE1の活性化は小胞体ストレスの有無ではなく、BiPとIRE1との結合状態に依存していることを示しており、我々の仮説が正しいことを示している。今後は、さらにこの事実を検証するために、*in vitro*の系でIRE1とBiPとの結合解離の制御機構を明らかにすること、またIRE1のN末側の機能領域を詳細に解析していき、小胞体ストレスをIRE1がどのように感知しているのか分子レベルで明らかにしていきたい。

発表

(1) 口頭発表

1. K. Kohno; Various ER-stress responses by ER transmembrane proteins. Gordon Research Conferences; Stress-induced Gene Expression. New London (USA) July, (2001)
2. 河野憲二; 小胞体ストレス応答の分子機構、平成13年度生理学研究所研究会「細胞死の分子機構と病態生理」 2001年8月、岡崎
3. 河野憲二、岩脇隆夫、細田章、都留秋雄、木俣行雄; 小胞体ストレス応答に関する膜kinase/RNase IRE1の機能解析、第74回日本生化学会大会シンポジウム「シグナル伝達分子と分子シャペロン」、2001年10月、京都
4. 岩脇隆夫、細田章、都留秋雄、木俣行雄、河野憲二; 小胞体ストレス応答における膜貫通型RNase IRE1による転写・翻訳制御、第24回日本分子生物学会年会ワークショップ「RNA分解のダイナミクスと遺伝子制御」、2001年12月、横浜
5. 河野憲二; 小胞体ストレス応答に関する膜キナーゼの役割、千里ライフサイエンスセミナー プレインサイエンスシリーズ 第14回 「小胞体ストレスと神経細胞死」、2001年12月、大阪
6. 木俣行雄、岡村勝友、木俣有紀、安部浩史、清水祐介、河原崎純、河野憲二; 小胞

体内での構造異常タンパク質蓄積の感知機構、第75回日本生化学会大会シンポジウム「構造異常タンパク質の細胞内感知機構と細胞応答」、2002年10月、京都

誌上発表

1. Higashio, H. and Kohno, K. A genetic link between the unfolded protein response and vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 568-574 (2002)
2. Hosoda, A., Kimata, Y, Tsuru, A. and Kohno, K. JPDI, a novel endoplasmic reticulum-resident protein containing both a BiP-interacting J domain and thioredoxin-like motif. *J. Biol. Chem.* 278, 2669-2676 (2003)
3. Kimata, Y., Kimata, I.Y., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I. C., Takeuchi, M., and Kohno K. Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol. Biol. Cell* in press (2003)

NAIST Kenji Kohno

Abstract

When the cells are exposed to endoplasmic reticulum (ER) stress, incorrectly folded proteins accumulate in the ER lumen. To maintain cellular homeostasis, cells cause unfolded protein response (UPR), which induces transcriptional activation of genes encoding ER-resident molecular chaperones, including BiP. The ER transmembrane protein IRE1 containing both kinase and ribonuclease activities, plays important roles in sensing the ER stress and transducing the signals from ER to cytosol/nucleus. Here we report both the activation mechanism and the role of ribonuclease domain of IRE1. First we present more direct evidence of the BiP-dependent IRE1 regulation model using yeast BiP mutants: mutations stabilizing BiP association with IRE1 impaired UPR signaling even under condition of ER stress, while mutations disrupting this association constitutively activate UPR pathway. This result suggests that the dissociation and association of BiP to IRE1 directly regulates the degree of IRE1 activation. Second, chimeric protein analyses of RNase region between IRE1 α and IRE1 β showed that RNase domain of IRE1 β carries the activities of the cleavage of 28S rRNA and cytotoxicity, whereas RNase domain of IRE1 α has the activity of UPR induction. These results suggest that the different function between IRE1 α and IRE1 β depends on the different activity of RNase region.