

研究課題別評価

1 研究課題名: センサー型転写因子とセンサー型 RNase による生体防御ネットワークの解明

2 研究者氏名: 吉田 秀郎

3 研究の狙い:

分泌蛋白質や膜蛋白質の合成が行われる小胞体では、合成された蛋白質の厳しい品質管理が行われている。合成の途上で異常蛋白質が生じると、小胞体膜上に存在する2つのセンサー分子: 膜貫通型転写因子 ATF6 と膜貫通型 RNase IRE1 が活性化され、その結果小胞体シャペロン遺伝子(異常蛋白質の構造を修正する)や ERAD 遺伝子(異常蛋白質の分解を促進する)の発現が誘導されて異常蛋白質が処理される。老化によってこの品質管理機能(小胞体ストレス応答)が低下すると、異常蛋白質が蓄積し、アルツハイマー病やパーキンソン病などの脳神経系疾患を引き起こす。

私は2つのセンサー分子がいかにして活性化されて小胞体シャペロンや ERAD 遺伝子の転写誘導を行うのか、その分子機構を明らかにすることを目指して研究を開始した。

4 研究成果:

さきがけ研究を開始するまでに小胞体ストレス応答の重要な因子を複数同定し、ATF6 経路と IRE1 経路の存在を明らかにしていたが、小胞体ストレス応答の分子機構をまだ不完全な形でしか明らかにできていなかった。特に、(1) 異常タンパク質の分解に関与する ERAD 関連遺伝子の転写誘導がどのような機構によって制御されているのか、(2) ATF6 経路と IRE1 経路は互いにどのような関係にあるのか、(3) ATF6 経路と IRE1 経路は小胞体ストレス応答の主要な経路であるのか、については全くわかっていなかった。さきがけ研究の結果、これらの問題を解決することに成功し、高等動物の小胞体ストレス応答の基本構造をついに明らかにすることができた(図参照)。

(1) ERAD 関連遺伝子の転写誘導の制御機構

IRE1 ノックアウト細胞及び XBP1 ノックアウト細胞を用いた実験から、これらの細胞では小胞体シャペロン遺伝子の転写誘導は正常であるが、ERAD 関連遺伝子の転写誘導が特異的に失われていることを見出した。更に、IRE1 ノックアウト細胞では異常タンパク質の分解能力が低下しており、この細胞に IRE1 遺伝子や ERAD 関連遺伝子を強制発現すれば分解能力を復活させることができることもわかった。これらのことから、ERAD 関連遺伝子の転写誘導は IRE1-XBP1-UPRE 経路によって制御されていることを明らかにした。

(2) 高等動物の小胞体ストレス応答は多段階の応答機構から成っている

ATF6 経路と IRE1 経路の関係を調べた結果、ATF6 経路の方(小胞体シャペロンの誘導)が IRE1 経路(小胞体シャペロンと ERAD 関連因子の誘導)よりも早くから働き始めることを見出した。ATF6 経路が特異的に欠損している変異細胞 M19 を用いた結果から、IRE1 経路が作動するためには ATF6 経路によって XBP1 pre-mRNA の転写が誘導されることが必須であり、この経路間のクロストークが両経路の活性化の時間的差異を生み出す分子機構であることを見出した。私の結果と他のグループの結果をあわせて考えると、高等動物の小胞体ストレスは、まず最初に PERK 経路(翻訳抑制)、次に ATF6 経路(シャペロンによる構造修正)、更に IRE1 経路(構造修正と分解処理)、それでもだめな場合はアポトーシスを誘導して細胞丸ごと処理し、個体としての生存を図るといった多段階の応答機構が時間依存的に次々と作動することによって緻密かつ柔軟な対応をしていることが明らかとなった。

(3) ATF6 経路・IRE1 経路は小胞体ストレス応答の主要な経路である

ATF6 経路と IRE1 経路の両方が欠損した細胞では、小胞体ストレスによる細胞死が著しく増大した。この細胞に小胞体シャペロン遺伝子を強制発現させた場合には細胞死はかなり抑制された。

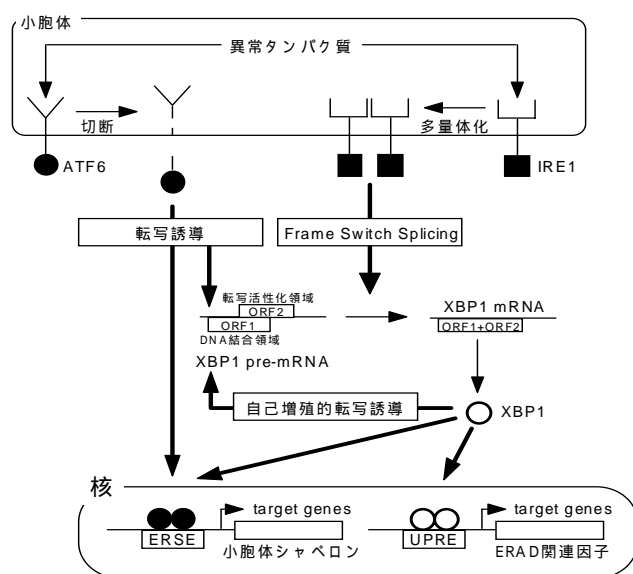
が、ERAD 関連遺伝子を強制発現してもあまり効果はみられなかった。IRE1 遺伝子を強制発現させて IRE1 経路を復活させると、細胞死が顕著に抑制された。以上の結果から、ATF6 経路及び IRE1 経路は高等動物の小胞体ストレス応答の主要な応答経路であることを明らかにした。

(4) 今後の展望

以上のように、小胞体ストレス応答の分子機構の基本的な部分を明らかにすることができたが、この研究の過程で2つの大きな問題と新たに遭遇することとなった。たいへんありがたいことに、さきがけ研究を更に2年間継続させていただけることとなったので、今後はこれらの問題に注力していく所存である。

第一の問題は、研究の過程で発見したフレームスイッチスプライシングである。これは従来知られている mRNA スプライシングとは全く異なる新規のスプライシング機構であり、その分子機構について解析する。これまでRNAスプライシングは核で起こると考えられてきたが、フレームスイッチスプライシングは細胞質で起こるのではないかと考えている。このことを明らかにすることによって、「細胞質スプライシング」という新しい概念を確立しようと考えている。

第二の問題として、小胞体の下流に位置するゴルジ体にも、小胞体ストレス応答と相似の生体防御機構が存在することを明らかにしようと考えている。小胞体ストレス応答によって大量の分泌蛋白質がゴルジ体にやってきた場合、ゴルジ体も相応の応答をする必要があると考えられる。このゴルジ体に蓄積した異常タンパク質の処理システムの存在を明らかにすることによって、「ゴルジ体ストレス応答」という新しい研究分野を開拓するとともに、その分子機構を解析することによって、分泌経路で機能している生体防御機構の全体像を明らかにしようと考えている。



高等動物の小胞体ストレス応答の分子機構

5 自己評価:

さきがけ研究開始時には、「それぞれのセンサーがいかにして異常タンパク質を検知しているか」「小胞体ストレス応答以外の生体防御機構にも同様の感知機構が存在するか」に重点を置いて小胞体ストレス応答の分子機構の解析を進めようと考えていたが、偶然の積み重なりによって意外な展開となり、結果として小胞体ストレス応答の分子機構の基本構造を明らかにすることができた。そして、この成果から生じた、また新たな難問「細胞質スプライシング」「ゴルジ体ストレス応答」。今度はどのような展開になるのか、今からわくわくしている。

6 研究総括の見解:

小胞体に生じた異常蛋白質によるストレス応答における、構造修復に向かう小胞体シャペロン誘導のATF6経路と、小胞体シャペロンの誘導ならびに異常蛋白質の分解に向かうERAD関連因子誘導のIRE1経路の、お互いの関連の糸を解きほぐしたことは生態防御機構の謎の一つを明らかにしたユニークな成果として高く評価できる。また、その鍵となるRNA切断酵素として働くIRE1が、これまでに知られていないまったく新しい機構で前駆体RNAのスプライシングに関与していることを発見している。これら一連の発見は、これまでの概念をやぶり、教科書の記述を変える優れた成果である。さきがけ研究としての本領域の趣旨を具現化した独創的な成果と考える。

7 主な論文等:

論文

1. Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata K. and Mori, K.: A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell.* **4**, 265-271.(2003)
2. Kumar, R., Krause, G. S., Yoshida, H., Mori, K., and DeGracia, D. J.: Dysfunction of the unfolded protein response during global brain ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 462-471. (2003)
3. Okada, T., Haze, K., Nadanaka, S., Yoshida, H., Seidah, N. G., Hirano, Y., Sato, R., Negishi, M., and Mori, K.: 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)
4. Nadanaka, S., Yoshida, H., Kano, F., Murata and M., 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. Nozaki, J., Kubota, H., Yoshida, H., Naitoh, M., Goji, J., Yoshinaga T., Mori, K., Koizumi, A. and Nagata, K.: The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic beta cells. *Genes Cells* **9**, 261-270. (2004)
6. Khan, M., M., Nomura, T., Chiba, T., Tanaka, K., Yoshida, H., Mori and K., Ishii, S. (2004). The fusion oncoprotein PML-RARalpha induces endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of N-CoR and ER stress. *J. Biol. Chem.* **279**, 11814-11824.
7. Romero-Ramirez, L., Cao, H., Nelson, D., Hammond, E., Lee, A. H., Yoshida, H., Mori, K., Glimcher, L., H., Denko, N., C. and Giaccia, A. (2004) XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res.* **64**, 5943-5947.
8. Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R. J. and Mori, K. (2004) Differential contributions of ATF6 and XBP1 in activating endoplasmic reticulum stress-responsive *cis*-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem.* (in press)

総説

1. 吉田秀郎・森和俊: unfolded protein response を制御する遺伝子群。; 遺伝子医学 第 6 巻 (2002) 130-134.
2. 吉田秀郎・森和俊: スプライソソーム非依存型 mRNA スプライシングシステムの高等動物基質の発見。; 細胞工学 第 2 巻 (2002) 302-303.
3. 森和俊・吉田秀郎: フレームスイッチ型スプライシング 新しいタンパク質の活性制御。; 実験医学 第 20 巻 (2002) 1000-1004.
4. 吉田秀郎: 小胞体ストレスに対する多段階の防御戦略。; タンパク質核酸酵素 第 48 巻 (2003) 1248-1255.
5. 吉田秀郎: 小胞体ストレス応答の分子生物学。; 生化学 第 76 巻 (2004) 617-630.

招待講演

1. H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori: XBP1 is a UPR-specific transcription factor which is activated by tripartite signals from ER membrane-bound transcription factor ATF6, RNase TRE1 and kinase PERK. FASEB Summer Research Conference (2002, Snowmass, USA)
2. 吉田秀郎: 高等動物の小胞体ストレス応答の分子機構の解析。; 2002 年度長期派遣研究者研究交歓会 (大阪、2002 年)
3. 吉田秀郎、松居利江、細川暢子、永田和宏、森和俊: 小胞体ストレスに対する多段階的防御戦略。日本細胞生物学会 (第 56 回; 大津、2003 年)
4. 吉田秀郎: 高等動物の小胞体ストレス応答の分子機構。; 日本生化学会大会 (第 76 回; 横浜、2003 年)
5. 吉田秀郎: 膜貫通型転写因子と膜貫通型 RNase による転写制御ネットワーク。; 細胞性粘菌研究会 (第 6 回; 東京、2004 年)

国際会議

1. 吉田秀郎、松居利江、和田匡史、細川暢子、永田和宏、Randal J. Kaufman、森和俊: Multiphase defense system in mammalian ER stress response.; Gordon Research Conference (2003, Oxford, UK)
2. 吉田秀郎、森和俊: TRANSCRIPTIONAL INDUCTION OF XBP1 pre-mRNA BY THE ATF6 PATHWAY IS CRUCIAL FOR ACTIVATION OF THE IRE1-XBP1 PATHWAY IN MAMMALIAN ER STRESS RESPONSE.; Cold Spring Harbor Laboratory meeting (2004, Cold Spring Harbor, USA)

受賞

平成 15 年度日本生化学会奨励賞