

タンパク質の輸送と品質管理を制御する分子ネットワークの解明

著者	水野 智亮
著者別名	Mizuno Tomoaki
発行年	2013
その他のタイトル	Elucidation of a molecular network regulating transport and quality control of protein
URL	http://hdl.handle.net/2241/121079

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月25日現在

機関番号：12102
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770217
 研究課題名（和文） タンパク質の輸送と品質管理を制御する分子ネットワークの解明
 研究課題名（英文） Elucidation of a molecular network regulating transport and quality control of protein
 研究代表者
 水野 智亮（MIZUNO TOMOAKI）
 筑波大学・医学医療系・助教
 研究者番号：80529032

研究成果の概要（和文）：膜・分泌タンパク質の生合成において、小胞体へのタンパク質輸送と小胞体でのタンパク質品質管理の制御は重要である。本研究では、出芽酵母をモデル系として、Kin1・Kin2のタンパク質の輸送と品質管理における機能を解析した。その結果、Kin1・Kin2はIre1-Hac1経路とは別経路で機能していること、キナーゼ活性依存的に機能していることを明らかにした。また、遺伝学的スクリーニングによって、Kin1・Kin2の周辺で機能することが予想される11因子を同定した。

研究成果の概要（英文）： The regulation of protein transport into endoplasmic reticulum and protein quality control in endoplasmic reticulum is important for the biosynthesis of the membrane and secretory proteins. In this study, we analyzed the functions of Kin1 and Kin2 in protein transport and quality control using as a budding yeast as a model system. As a result, we demonstrated that Kin1 and Kin2 function in ER stress response in parallel with the Ire1-Hac1 pathway and in a manner dependent on their kinase activities. In addition, we identified 11 factors that it was expected to function around Kin1 and Kin2 by genetic screening.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞内情報伝達、キナーゼ、ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

小胞体は、膜タンパク質・分泌タンパク質の生合成において重要な役割を果たす細胞内小器官である。膜タンパク質・分泌タンパク質は、生合成の初期段階で小胞体に輸送され、ホールディングや糖鎖付加を受ける。ホールディングや糖鎖付加が正しくおこなわれたタンパク質は、その後、各細胞内小器官へ移動し、機能を発揮する。これに対して、高次構造に異常があるタンパク質は、小胞体におけるタンパク質品質管理機構によって

修復または除去される。また、未成熟なタンパク質や異常なタンパク質が小胞体内に過剰に蓄積した場合（小胞体ストレス）には、小胞体ストレス応答機構が機能し、未成熟タンパク質の成熟および異常タンパク質の修復と除去が効率的におこなわれる。したがって、膜タンパク質・分泌タンパク質が正常に機能する上で、小胞体の適切な機能は不可欠であり、小胞体に入るタンパク質の種類と量を決める段階（小胞体輸送機構）と小胞体から出るタンパク質の品質を確認する段階（品質管理機構）の機能は極めて重要であると考え

えられる。タンパク質の小胞体への輸送においては、輸送装置自体は同定されてきたが、輸送装置周辺で機能し、小胞体輸送を制御する因子についてはほとんど明らかになっていない。一方、小胞体ストレスに対する応答については、シャペロンやタンパク質修飾因子の発現上昇（未成熟タンパク質の成熟・異常タンパク質の修復）、翻訳効率の抑制（タンパク質合成量の全体的抑制）、異常タンパク質に対する分解機構の強化（異常タンパク質の除去）などの戦術がとられていることが知られている。小胞体ストレスから小胞体の機能を保護する戦術として、小胞体内へ輸送されるタンパク質の量を減少させることが効果的であると考えられるが、小胞体輸送と小胞体ストレス応答の関連性については明らかになっていない。

我々は、これまでに発芽酵母をモデル系として、小胞体輸送の選別および制御に関与する新規因子の探索をおこなってきた。その結果、輸送装置の構成因子をコードする *SEC63* の温度感受性変異による高温での増殖能の低下が、*KIN1*・*KIN2* それぞれの過剰発現によって抑圧されること、および破壊によって増強されることを見出してきた。さらに、*KIN1*・*KIN2* の破壊株が、小胞体ストレスに対して高い感受性を示すことを見出してきた（図1）。*Kin1* と *Kin2* はともに、高等真核生物において細胞極性を制御するセリン・スレオニンキナーゼ Par-1 の発芽酵母ホモログであるが、発芽酵母における機能は不明であった。また、他生物種において Par-1 ファミリーに属するキナーゼが小胞体輸送や小胞体ストレス応答に関与するという報告もなされていなかった。

2. 研究の目的

Kin1・*Kin2* には「タンパク質の小胞体への輸送」と「小胞体におけるタンパク質の品質管理」を制御する未知の機能が存在することが予想された。しかしながら、その機能の実体と分子機構は不明であった。そこで、*Kin1*・*Kin2* を含む分子群がどのような分子基盤で「タンパク質の小胞体への輸送」と「小胞体におけるタンパク質の品質管理」を制御しているか明らかにすることを本研究の目的とした。1) *Kin1*・*Kin2* によるタンパク質の小胞体輸送制御機構の解明、2) *Kin1*・*Kin2* による小胞体ストレス応答制御機構の解明、3) タンパク質の小胞体輸送機構と品質管理機構の統合的制御メカニズムの解明を最終目標として研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) *Kin1*・*Kin2* と既知の小胞体ストレス応

答制御機構との関連性の検討

①破壊株と過剰発現系を用いた各因子の遺伝学的上下関係の検討

②レポーター遺伝子・Hac1 発現量の測定による Ire-Hac1 経路に対する影響の検討

Kin1・*Kin2* およびその周辺で機能する因子について、破壊株と過剰発現株を構築し、小胞体ストレス応答における機能と関係を遺伝学的に明らかにする。小胞体ストレス応答においては、Ire-Hac1 経路が中心的な役割を果たしていることが知られている。そこで、Hac1 標的遺伝子のレポーターコンストラクトを用いた解析、および、Hac1 タンパク質発現量の解析をおこない、*Kin1*・*Kin2* と Ire-Hac1 経路の関係を調べる。

(2) *Kin1* および *Kin2* の周辺で機能する因子の探索

① *kin1kin2* 二重破壊との合成致死変異体の分離とその原因遺伝子の同定

② *kin1kin2* 二重破壊株の小胞体ストレス感受性に対するマルチコピーサプレッサーの分離・同定

これまでの解析から、*kin1kin2* 二重破壊株は小胞体ストレスに対して感受性を示すことが明らかになっている。また、*Kin1* および *Kin2* はタンパク質の小胞体輸送の促進に機能していると考えられるが、*kin1kin2* 二重破壊株は *sec63* 変異株と異なり、その増殖能に顕著な異常がみられない。そこで、上記の解析①・②によって、*Kin1* および *Kin2* の周辺で機能する因子を探索する。

(3) *Kin1*・*Kin2* の作用メカニズムの検討

Kin1・*Kin2* はともにセリン・スレオニンキナーゼである。そこで、まず *Kin1*・*Kin2* がキナーゼ活性依存的に機能しているかを確認する。続いて、前述の解析を通じ同定した *Kin1*・*Kin2* 周辺因子の中から *Kin1*・*Kin2* 標的因子の同定をおこなう。

4. 研究成果

(1) *Kin1*・*Kin2* は Ire1-Hac1 経路と独立して小胞体ストレス応答に機能する

発芽酵母小胞体ストレス応答においては、Ire-Hac1 経路が中心的な役割を担っている。小胞体ストレス非存在下では、ヌクレアーゼ Ire1 は活性化しておらず、転写因子 Hac1 の発現は抑えられている。小胞体ストレス存在下では、活性化した Ire1 によって *HAC1* mRNA のスプライシングが引き起こされ、Hac1 の発現と標的遺伝子の転写が誘導される。そこで、*Kin1*・*Kin2* が Ire1-Hac1 経路を介して小胞体ストレス応答に機能しているか調べるために、*kin1kin2* 二重破壊株における Hac1 の発現量と Hac1 標的遺伝子のレポーター活性を調べた。しかしながら、*kin1kin2* 二重破壊株における Hac1 の発現量および Hac1 標的遺伝

子のレポーター活性は野生株と同程度であった (図 2、図 3)。また、*kin1kin2* 二重破壊と *hac1* 破壊による小胞体ストレス感受性は相加的であった。これらの結果から、Kin1・Kin2 は Ire1-Hac1 経路と独立して小胞体ストレス応答に機能していると考えられる。

図 1 *kin1kin2* 二重破壊株は小胞体ストレス感受性を示す。野生株、*kin1*破壊株、*kin2*破壊株、*kin1kin2*二重破壊株それぞれについて、希釈系列を作製し、小胞体ストレスを誘導する tunicamycin、dithiothreitol を含む培地に添加し、増殖を観察した。

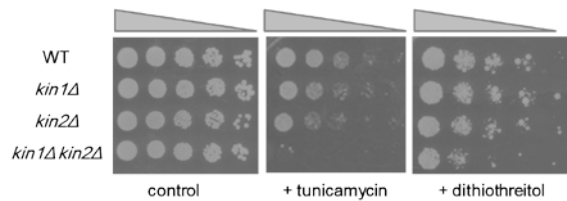


図 2 *kin1kin2* 二重破壊株では野生株と同様に Hac1 が発現する。野生株と *kin1kin2* 二重破壊株について tunicamycin 添加前後の Hac1 と Mcm2 (コントロール) の発現量をウエスタンブロットングによって測定した。

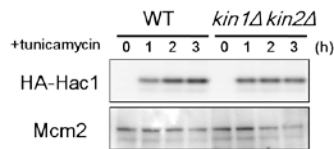
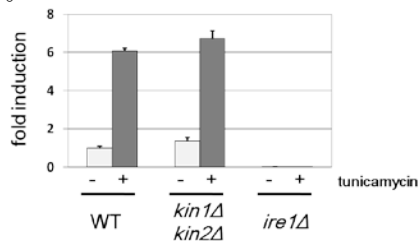


図 3 *kin1kin2* 二重破壊株では野生株と同様の Hac1 レポーター活性を示す。野生株、*kin1kin2* 二重破壊株、*ire1* 破壊株について tunicamycin 添加前後の Hac1 レポーター活性を測定した。

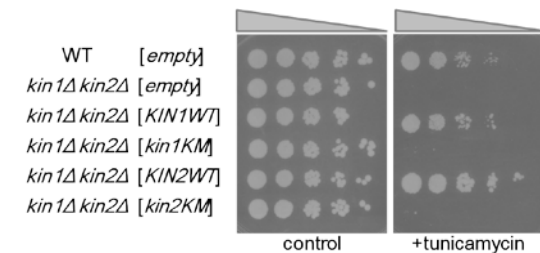


(2) Kin1・Kin2 はキナーゼ活性依存的に小胞体ストレス応答に機能する

Kin1・Kin2 はいずれも Par-1 ファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼである。そこで、Kin1・Kin2 の小胞体ストレス応答における機能にキナーゼ活性が必要であるかを検討した。*kin1kin2* 二重破壊株の小胞体ストレス感受性表現型は、野生型 Kin1・Kin2 を過剰発現することによって救済された。それに対して、キナーゼ不活性化型 Kin1・Kin2 を過剰発現しても *kin1kin2* 二重破壊株の小胞体ストレス感受性表現型は救済されな

った (図 4)。このことから、Kin1・Kin2 はキナーゼ活性依存的に小胞体ストレス応答に機能していると考えられる。

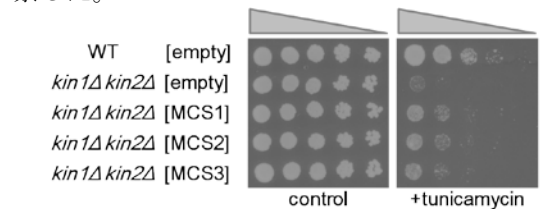
図 4 *kin1kin2* 二重破壊株の小胞体ストレス感受性はキナーゼ不活性化型 Kin1・Kin2 の発現によって救済されない。野生型 (WT) もしくはキナーゼ不活性化型 (KM) の Kin1 もしくは Kin2 を発現するプラスミドを導入した *kin1kin2* 二重破壊株について、希釈系列を作製し、tunicamycin を含む培地に添加し、増殖を観察した。



(3) *kin1kin2* 二重破壊株の小胞体ストレス感受性に対するマルチコピーサプレッサーの分離と同定

Kin1・Kin2 の小胞体ストレス応答における作用機序を明らかにするため、*kin1kin2* 二重破壊株の小胞体ストレス感受性表現型に対するマルチコピーサプレッサーを探索した。*kin1kin2* 二重破壊株に出芽酵母ゲノムライブラリーを導入した後、小胞体ストレス存在下において生育する株の選択、保持するプラスミドの回収、候補遺伝子のクローニング・再導入をおこない、*kin1kin2* 二重破壊株のマルチコピーサプレッサーとして 10 遺伝子を同定した (図 5)。次に、*kin1kin2* マルチコピーサプレッサー 10 遺伝子について、破壊株を作製し、小胞体ストレス感受性を調べた。しかしながら、いずれの遺伝子の単独破壊株も顕著な小胞体ストレス感受性を示さなかった。これらの結果から、Kin1・Kin2 の下流では複数の因子が重複して機能することが予想された。

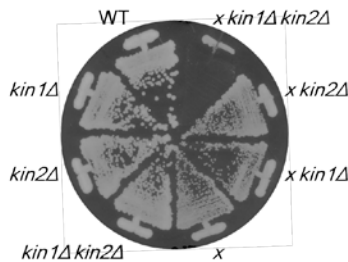
図 5 *kin1kin2* 小胞体ストレス感受性表現型マルチコピーサプレッサー マルチコピーサプレッサー遺伝子を含むプラスミド (MCS1, MCS2, MCS3) を導入した *kin1kin2* 二重破壊株について、希釈系列を作製し、tunicamycin を含む培地に添加し、増殖を観察した。



(4) *kin1kin2* 二重破壊との合成致死を示す変異の分離とその原因遺伝子の同定

Kin1・Kin2 の周辺で機能する因子を明らかにするための別のアプローチとして、*kin1kin2* 二重破壊と合成致死を示す変異の分離を試みた。野生型 *KIN2* 遺伝子を含むプラスミドを保持した *kin1kin2* 二重破壊株に対して、変異を誘発した後、プラスミド依存的に生育する株の選択をおこない、最終的に高温において *kin1kin2* 二重破壊と合成致死を示す変異体を 1 系統分離した (図 6)。続いて、*kin1kin2* 二重破壊と合成致死を示す変異の原因遺伝子を導入するため、合成致死変異株に出芽酵母ゲノムライブラリーを導入した後、高温において生育する株の選択、保持するプラスミドの回収、候補遺伝子のクローニング・再導入をおこない、合成致死表現型を抑圧する遺伝子として転写因子をコードする *DAL81* を同定した。これらの結果から、Kin1・Kin2 は *Dal81* の上流、もしくは *Dal81* と協調して遺伝子発現を制御していると考えられる。

図 6 *kin1kin2* 二重破壊との合成致死変異株 *kin1* 破壊、*kin2* 破壊、合成致死変異 (x)、各組み合わせの株について、高温での増殖を観察した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Hattori A, Mizuno T, Akamatsu M, Hisamoto N, Matsumoto K.
The *Caenorhabditis elegans* JNK signaling pathway activates expression of stress response genes by derepressing the Fos/HDAC repressor complex.
PLoS Genet. 9(2): e1003315, 2013
査読有

② Li C, Hisamoto N, Nix P, Kanao S, Mizuno T, Bastiani M, Matsumoto K.
The *C. elegans* growth factor-receptor tyrosine kinase signalling regulates axon regeneration.
Nature Neuroscience. 15(4):551-557, 2012
査読有

③ Ito W, Li X, Irie K, Mizuno T, Irie K.
RNA-binding protein *Khdl* and *Ccr4* deadenylase play an overlapping role in

the cell wall integrity pathway in yeast.
Eukaryotic Cell. 10(10):1340-1347, 2011
査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 服部鮎奈、水野智亮、赤松まゆ子、久本直毅、松本邦弘
重金属ストレス応答において線虫 JNK は転写因子 Fos を負に制御する
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 14 日 福岡

② 赤松まゆ子、服部鮎奈、水野智亮、久本直毅、松本邦弘
線虫 JNK 経路を介した遺伝子発現制御における HDAC の機能解析
第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月 16 日 横浜

③ 服部鮎奈、水野智亮、久本直毅、松本邦弘
重金属ストレス応答において線虫 JNK は転写因子 Fos を負に制御する
第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月 15 日 横浜

④ 李春、久本直毅、Nix Paola, 金尾朱夏、水野智亮, Bastiani Michael, 松本邦弘
線虫新規増殖因子 SVH-1 とその受容体チロシンキナーゼ SVH-2 は JNK 型 MAPK 経路を介して神経軸索再生を制御する
第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月 13 日 横浜

⑤ Ayuna Hattori, Tomoaki Mizuno, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto
The KGB-1 JNK signaling pathway negatively regulates FOS-1 transcription factor in stress response
第 18 回国際線虫学会
2011 年 6 月 24 日 アメリカ合衆国

[その他]

ホームページ等
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/molcellbiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 智亮 (MIZUNO TOMOAKI)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：80529032