

論文の内容の要旨

論文題目： A novel IRE1 signaling triggered by membrane lipid saturation
(小胞体ストレス応答分子 IRE1 を介した膜脂肪酸ストレス応答機構の解明)

氏名 大場 陽介

【序】

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は、パルミチン酸のような飽和脂肪酸からアラキドン酸やドコサヘキサエン酸のような高度不飽和脂肪酸まで様々な脂肪酸が結合している。生体膜リン脂質の脂肪酸組成は膜タンパク質の適切な機能発現に重要であり、生体は内因性（生合成）および外因性（食餌等）の膜脂肪酸環境の変化に応答して、脂肪酸組成を変化させ適切な膜脂肪酸環境を維持していると考えられる。しかしながら、このような生体応答は、動物細胞においてほとんど明らかになっていない。小胞体ストレス応答（UPR）は、小胞体内腔における異常タンパク質の蓄積（小胞体ストレス）により活性化し、小胞体内のタンパク質恒常性維持に重要な生体応答である。UPRのセンサータンパク質である IRE1, PERK, ATF6 のうち、IRE1 は真核生物に高度に保存された分子であり、活性化状態では XBP1 の mRNA をスプライシングすることで活性化型転写因子 XBP1s を産生し、小胞体ストレスに対応する様々な遺伝子の発現を誘導する。近年、UPR は膜リン脂質中の飽和脂肪酸の増加（膜飽和化と呼ぶ）によっても誘導されることが明らかとなり、その活性化様式が異常タンパク質の蓄積と質的に異なることが示唆されている。しかし、UPR 活性化が膜脂肪酸環境変化に対する適応応答なのか、また UPR 活性化機構が異常タンパク質の蓄積時と異なるのかについては不明である。

そこで本研究では、哺乳動物細胞を用い、膜飽和化により誘導される UPR の意義とその分子機構の解明を目指した。

【方法と結果】

1. IRE1 の発現抑制により膜飽和化に対して感受性になる

まず、哺乳動物において UPR を介した膜飽和化に対する応答機構が存在するか調べる目的で、HeLa 細胞に対し IRE1 または PERK を発現抑制し、膜飽和化による表現型に変化が見られるか検証した。培地に飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (16:0) を添加することにより膜飽和化を引き起こしたところ、それにより誘導される細胞死が IRE1 を発現抑制すると顕著に亢進することを見いだした。一方、PERK を発現抑制した場合には細胞死の増強は見られなかった。次に、IRE の下流で活性化する転写因子 XBP1 を発現抑制したところ、興味深いことに、IRE1 の発現抑制により見られた細胞死の増強は XBP1 を発現抑制した場合には見られなかった。

2. 膜飽和化時に IRE1 依存的、XBP1 非依存的に発現変動する遺伝子の探索

前述の結果より、膜飽和化時には IRE1 依存的、XBP1 非依存的なストレス応答経路が活性化していることが考えられた。そこで、DNA マイクロアレイ解析により膜飽和化時に IRE1 依存的、XBP1 非依存的に発現変動する遺伝子を探索した。その結果、PRKAG2 (protein kinase, AMP-activated, gamma

2) 遺伝子（以降 AMPK γ 2 と表記）を同定した。この遺伝子は、小胞体内に異常タンパク質を蓄積させる薬剤であるツニカマイシンを処理した場合には、全く発現上昇しなかった。次に、AMPK γ 2 遺伝子の発現上昇が膜飽和化に対する応答に重要であるか検証する目的で、AMPK γ 2 を発現抑制した細胞に対してパルミチン酸を添加した。すると、IRE1 を発現抑制した場合と同様にパルミチン酸による細胞死が亢進した。このことから、AMPK γ 2 の発現が膜飽和化に対する適応に重要であることが示唆された。

3. 膜飽和化時に AMPK α はリン酸化する

AMPK γ 2 は AMPK (AMP-activated protein kinase) 複合体の構成因子の 1 つである。AMPK 複合体はキナーゼ活性を持つ触媒サブユニット α と、調節サブユニットである β 、 γ のヘテロ三量体からなり、 α サブユニットの Thr172 がリン酸化されることにより活性化状態となることが知られている。そこで AMPK 複合体に着目し解析を行った結果、膜飽和化により AMPK α のリン酸化が亢進することがわかり、さらにこの AMPK α のリン酸化は IRE1 の RNAi により抑制された。一方、XBP1 の RNAi は AMPK α のリン酸化に影響を与えなかった。次に、AMPK α のリン酸化に AMPK γ 2 の発現上昇が重要であるか検証した。AMPK γ 2 を発現抑制すると、IRE1 を発現抑制した場合と同様、膜飽和化時の AMPK α リン酸化亢進が抑制された。一方、AMPK γ 2 を細胞に過剰発現すると AMPK α のリン酸化は増加した。これらの結果から、膜飽和化時には、IRE1 を介して AMPK γ 2 が発現上昇した結果、AMPK α のリン酸化が亢進していることが示唆された。

4. IRE1-AMPK 経路の阻害により飽和脂肪酸の割合が増加する

次に、膜飽和化に対する IRE1、AMPK を介した細胞応答として細胞内の脂肪酸代謝に着目した。パルミチン酸を添加した細胞について細胞内の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の割合を GC-MS により測定したところ、パルミチン酸添加により飽和脂肪酸の割合が増加することがわかった。そして、IRE1 や AMPK γ 2、AMPK α をそれぞれ発現抑制すると、その割合がさらに増加することがわかった。一方、XBP1 の発現抑制は影響を与えなかった。このことから、パルミチン酸添加時には IRE1 依存的 XBP1 非依存的な AMPK 経路の活性化を介して飽和脂肪酸の蓄積を減らす応答が起こっていると考えられた。

5. IRE1-AMPK 経路の阻害により飽和脂肪酸の不飽和化が減弱する

飽和脂肪酸の蓄積を抑制する機構として、飽和脂肪酸の不飽和化が挙げられる。そこで、放射標識パルミチン酸を細胞に添加し、取り込まれたパルミチン酸の不飽和脂肪酸への変換を測定した。コントロール細胞では取り込まれたパルミチン酸の約 15%が不飽和化されたが、IRE1、AMPK γ 2、AMPK α をそれぞれ発現抑制した細胞ではパルミチン酸の不飽和化が有意に低下することがわかった。

6. 膜飽和化により IRE1、AMPK 依存的に SCD1 が発現上昇する

飽和脂肪酸を不飽和化する主要な酵素として高等動物では Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) が知られている。そこで、膜飽和化時における SCD1 の発現を調べた。その結果、細胞にパルミチン酸を加えると SCD1 の発現量が大きく増加することがわかった。そして、その増加は IRE1 の発現抑制によりみられなくなった一方、XBP1 の発現抑制はほとんど影響を与えなかった。また、IRE1 の発現

抑制と同様に AMPK サブユニットの発現抑制によっても SCD1 の発現上昇はみられなくなった。以上の結果から、膜飽和化時には IRE1、AMPK 依存的に SCD1 が発現上昇し、飽和脂肪酸の不飽和化を促進することで、飽和脂肪酸の蓄積を減らし、膜飽和化に対して適応しているものと考えられた。

7. 膜飽和化時に AMPK γ 2 mRNA の分解が抑制される

IRE1 は分子内にキナーゼドメインとヌクレアーゼドメインを持つ。小胞体ストレス時に IRE1 は二量体化し、キナーゼドメインにより自己リン酸化することで、ヌクレアーゼ活性が ON になる。そこで、膜飽和化時における AMPK γ 2 の発現上昇に IRE1 のどのような分子活性が必要であるか調べた。IRE1 のヌクレアーゼ阻害剤として知られる 4 μ 8C をパルミチン酸と同時に処理すると AMPK γ 2 の発現上昇は部分的に抑制された。このことから、AMPK γ 2 の発現上昇には IRE1 のヌクレアーゼ活性が関与する可能性が示唆された。また、AMPK γ 2 の発現上昇が転写を介するか調べる目的で、細胞に転写阻害剤であるアクチノマイシン D を処理し、膜飽和化時の AMPK γ 2 mRNA 安定性を調べた。その結果、パルミチン酸を前処理した細胞では AMPK γ 2 mRNA の分解速度がコントロールに比べて低下することがわかった。この効果は IRE1 依存的であり、また、ツニカマイシン処理時には AMPK γ 2 mRNA の安定性に変化は見られなかった。これまで、IRE1 による miRNA の分解を介した遺伝子発現上昇機構が知られている。このことから、膜飽和化時には IRE1 が AMPK γ 2 の発現を抑制する miRNA を分解している可能性が考えられた。

【まとめと考察】

本研究において私は、膜飽和化時に IRE1 依存的に発現上昇する遺伝子として AMPK γ 2 を同定した。また、IRE1 依存的な AMPK γ 2 の発現上昇は下流で AMPK 経路を活性化すること、さらに、AMPK 経路の下流では SCD1 の発現上昇を介して飽和脂肪酸の不飽和化を促進し、膜飽和化に対して適応していることを明らかにした。すなわち、本研究から哺乳動物細胞における膜脂肪酸の恒常性維持機構の 1 つが明らかとなった。

IRE1 依存的な AMPK γ 2 の発現上昇には転写因子 XBP1 を介さない。また、興味深いことに今回見出した一連の現象は異常タンパク質蓄積に起因する UPR の活性化時には起こっていない。このことは、細胞がストレスの違いに応じて UPR 活性化の下流で異なるシグナルを伝達し、各ストレスに対して適切な応答していることを示唆するものである。IRE1 を介した AMPK γ 2 の発現上昇の分子機構を解析することにより、IRE1 のコンテキスト依存的なシグナル伝達の分子基盤の解明につながると期待される。