

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 小胞体ストレスにより誘導される遺伝子 NUCB1 の機能解析

指導教員 鶴尾 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 築茂由則

#### 【序論】

##### 小胞体ストレスとは

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質、脂質の合成やカルシウムイオンの貯留などの機能を担っている重要な細胞内小器官である。分泌タンパクや膜タンパクは、ここで糖鎖付加、ジスルフィド結合などの修飾を受け、立体構造の形成が行われる。しかしながら成熟に失敗したタンパクは異常タンパク (Unfolded protein) として認識され小胞体ストレス (ER ストレス) として感知される。異常タンパクが生じる原因としては、低グルコース状態における糖鎖修飾の異常、遺伝的要因に伴ったシステイン残基の変異によるジスルフィド結合の異常、小胞体シャペロンの機能低下、許容を上回るタンパク合成など多岐にわたる。このような多くの原因によって生じた異常タンパクの蓄積は細胞にとって、さらには生体においても非常に有害である。細胞はこの状態から抜け出すため小胞体ストレス応答 (UPR:Unfolded Protein Response) を起こす。

##### ER ストレス応答機構

小胞体ストレス応答に重要な役割を果たすのが小胞体膜上に存在するセンサーの1つ ATF6 である。ATF6 は C 末端が小胞体内側に、N 末端が細胞質側へ配向した2型膜貫通タンパクであり、N 末側は転写因子として機能する。通常 ATF6 は小胞体内領域で分子シャペロン GRP78 と結合して不活性の状態に保たれているが、小胞体内に異常タンパクが発生するとそれらの構造の回復をはか

るため GRP78 が ATF6 から解離する。フリーになった ATF6 はゴルジ体へと移行する。そしてゴルジ局在プロテアーゼである site-1-protease(S1P)により膜貫通部位近傍で最初の切断を受け、さらに膜内部位で同様にゴルジ局在プロテアーゼである S2P によって2番目の切断を受け N 末端側がフリーになり、核へと移行して GRP78 をはじめとする小胞体シャペロンを誘導し異常タンパクの構造回復をはかる。

本研究ではこの ATF6 を制御する新たな因子として NUCB1 を見出しその制御機構を解析した。NUCB1 はもともと自己免疫疾患マウス由来の B 細胞株 KML1-7 の培養上清中に見いだされ B 細胞の分化、増殖活性を有することが報告されたが、その後は細胞内においてはゴルジ体内に局在するタンパクとして報告されている。NUCB1 は  $Ca^{2+}$ イオン結合タンパクに特徴的な EF-hand モチーフを有しており、このドメインを介してゴルジ体でのカルシウムイオン濃度の調節を行っていることが示唆されている。しかしながら NUCB1 の機能の詳細は明らかとなっていなかった。

## 【方法と結果】

### ER ストレスによる NUCB1 の発現誘導

小胞体ストレス応答の制御に関わる因子の多くが、小胞体ストレスにより発現誘導される。新たな制御因子を探るため、HT1080 細胞（ヒト線維肉腫）を用いてグルコース飢餓により発現誘導される遺伝子についてマイクロアレイ解析を行い、有意に発現誘導が認められた遺伝子群の中から NUCB1 に着目した。マイクロアレイの結果を確認するため NUCB1 の発現誘導について RT-PCR 法にて解析した。その結果、グルコース飢餓 (GS)、2DG (2-deoxyglucose)、Tunicamycin 処理（いずれも糖鎖付加を阻害し異常タンパクを発生させる代表的な ER ストレス誘導剤）により、コントロールである GRP78 同様に mRNA レベルでの発現上昇が確認された(Figure 1A)。

次に NUCB1 のタンパクレベルでの経時変化についてウェスタンブロット法にて検討した。その結果 2DG 処理後 12 時間から発現の上昇が確認された(Figure 1B)。

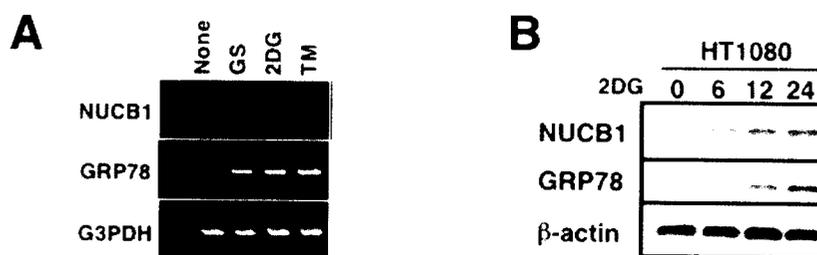


Figure 1 NUCB1のERストレスによる発現誘導

## NUCB1 は ER ストレス応答を抑制する

NUCB1 が ER ストレス応答の制御に関わっているかどうかを検討するために ER ストレスにより誘導される代表的な遺伝子である *GRP78* のプロモーター領域をルシフェラーゼベクターに組み込んだ pGRP78-Luc を用いてレポーターアッセイを行った。HT1080 細胞に pGRP78-Luc を遺伝子導入し、Tunicamycin 処理したところ、濃度依存的にルシフェラーゼ活性が有意に上昇した。一方で pGRP78-Luc とともに pNUCB1 を遺伝子導入した場合、GRP78 のルシフェラーゼ活性はいずれの濃度においても有意に抑制されることがわかった(Figure 2A)。

また、ER ストレス応答に重要な ATF6 の 90kDa の前駆体から活性型 p50ATF6 へ活性型へのプロセッシングのイベントに影響しているかどうかを検討した。Flag 標識した ATF6 を HT1080 細胞に遺伝子導入し、Thapsigargin 処理による p90ATF6 の活性型 p50ATF6 へのプロセッシングを抗 Flag 抗体を用いてウェスタンブロット法により検討した。p90ATF6 は Thapsigargin 処理時間に依存してプロセッシングされ、p50ATF6 のバンドが出現した。これに対して NUCB1 を共発現させると p50ATF6 が減少することが明らかになった(Figure 2B)。よって NUCB1 は ATF6 のプロセッシングを抑制していることが示唆された。

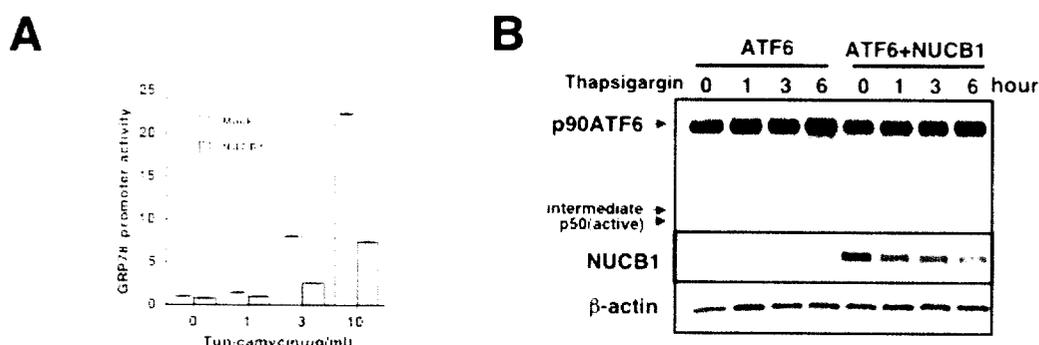


Figure 2 NUCB1はERストレス応答を抑制する

## NUCB1 は ER ストレス下での ATF6 と S1P の結合を抑制する

各種 ER ストレス誘導剤により、S1P と ATF6 の結合が増強されることを見出した (Figure 3A)。そして、NUCB1 を共発現させた場合に ATF6 と S1P の結合へ影響を及ぼすのかどうかについて検討した。Thapsigargin 処理後 1, 3 時間いずれにおいても S1P と ATF6 の結合が増強されたが、NUCB1 の共発現下においてはその結合が減少することが明らかとなった (Figure 3B IP 上段)。それと一致して ATF6 のプロセッシングも抑制されていた (Lysate 上段)。このことから NUCB1 は ATF6 の S1P との結合を抑制することによって活性型へのプロセッシングを阻害していることが強く示唆された。

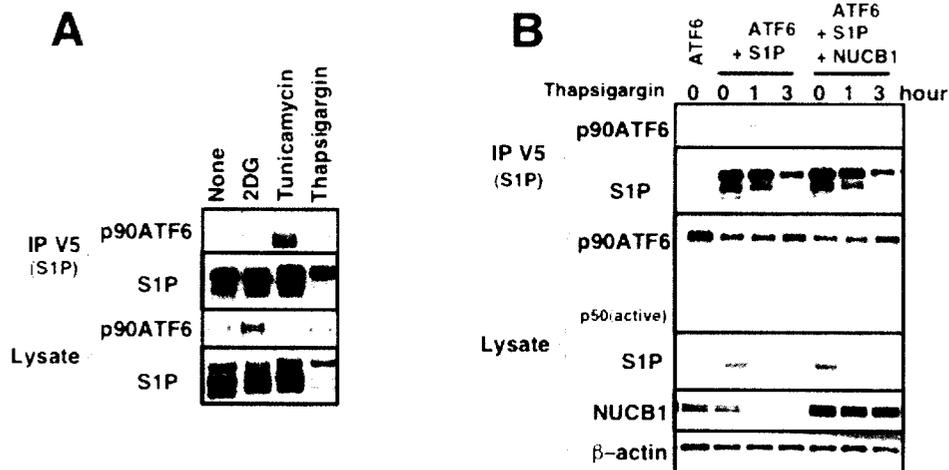


Figure 3 NUCB1によるATF6とS1Pの結合抑制

### NUCB1はATF6のゴルジ体から核への移行を抑制する

次に ATF6 の ER ストレス下での局在変化に対する NUCB1 の影響を免疫蛍光染色により検討した。ATF6 は DTT 処理後 20 分でゴルジ体へと移行し (矢印) さらに、40 分後では核局在も確認された (矢頭)。これに対して NUCB1 を遺伝子導入した場合には、DTT 処理後 20 分での ATF6 のゴルジ体移行は同様に観察されたが、40 分後での核移行は有意に抑制されていた (矢印)。このことから NUCB1 はゴルジ体で ATF6 の活性化を抑制していることが示唆された。

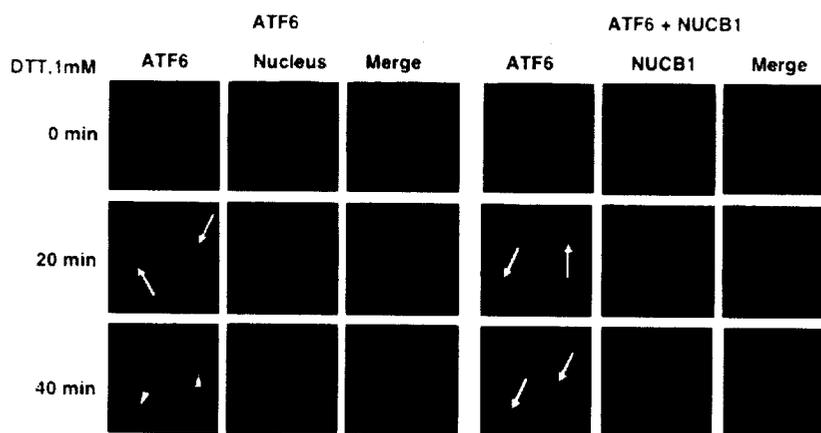


Figure 4 NUCB1はゴルジ体でのATF6活性化を阻害する

### NUCB1にはN末シグナルペプチドの切断型と非切断型が存在する

Figure 1B,2B で見られるように NUCB1 は内在性のもの、遺伝子導入したもの、いずれにおいても分子量のわずかに異なる2つのバンドが確認された。この分子量の差が N 末端のシグナルペプチドの切断の有無によるものであるかどうかを検討するため、シグナルペプチド切断部位周辺に



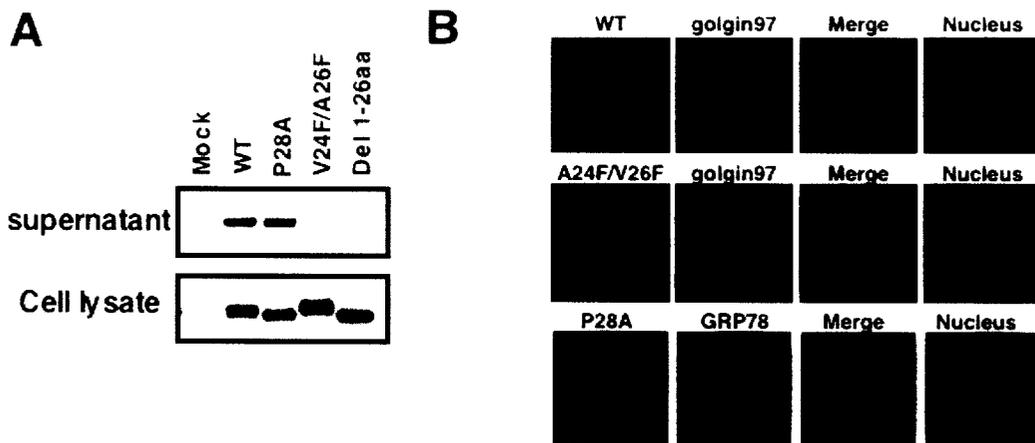


Figure 6 N末シグナルペプチド切断による分泌、局在の変化

### N末シグナルペプチド切断による ATF6 抑制への影響

NUCB1-WT と P28A の ATF6 のプロセッシングの阻害効果について比較検討した。HT1080 細胞に Flag-標識した ATF6 と NUCB1-WT または P28A を遺伝子導入し、Thapsigargin で3時間刺激後の ATF6 プロセッシングをウェスタンブロット法にて解析した。WT を遺伝子導入した場合には活性型 ATF6 の検出量は有意に減少したのに対して、P28A の場合では Mock に近いレベルで検出された (Figure 7A)。

さらに NUCB1-WT、P28A の ATF6 による GRP78 のプロモーター活性への影響についてもルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。その結果、WT は遺伝子導入量に比例して顕著な抑制効果が認められたのに対して、P28A はほとんど抑制効果がみられなかった。

ほとんどが切断型となる P28A では ATF6 のプロセッシング抑制活性が有意に減少したことから、非切断型 NUCB1 (ゴルジ体局在) が ATF6 の制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

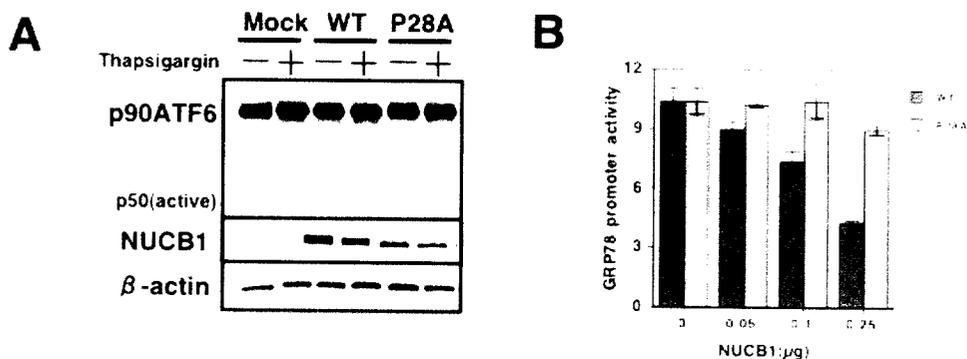


Figure 7 切断型NUCB1のATF6抑制活性の低下

## NUCB1 regulates processing of ATF6 in the Golgi

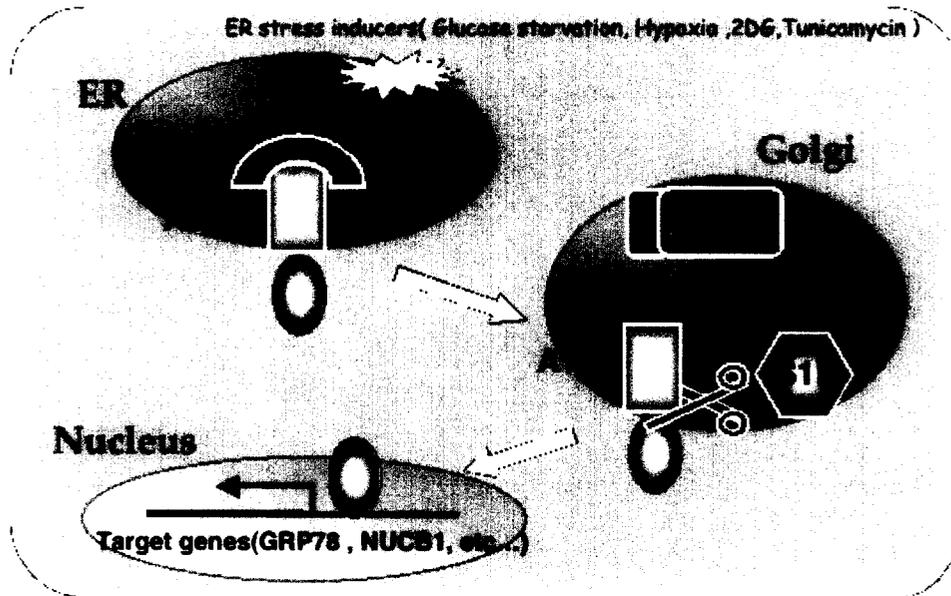


Figure 8 NUCB1はゴルジ体におけるATF6活性化イベントを抑制する

### 【まとめ】

本研究により ER ストレスによって誘導されるゴルジ体局在タンパク・NUCB1 が ER ストレス応答に重要な因子 ATF6 の活性化をゴルジ体で抑制するという新規な制御メカニズムが明らかになった。さらに NUCB1 の N 末シグナルペプチドが、ゴルジ体局在に重要であることを明らかにした。本研究は非常に複雑な小胞体ストレス応答の解明につながりものであり、ER ストレスが関与するとされるガン、糖尿病、神経変成疾患など多くの疾患の分子レベルでの理解、さらには治療法の開発に貢献するものであると考えられる。