

博士学位論文

変異型アンチトロンビンによって形成される

Russell body の細胞内動態と

小胞体ストレス応答

富山大学大学院

生命融合科学教育部

分子細胞機能学研究室

木村 耕士

略語集

Arg	arginine
AT	antithrombin
ATZ	α_1 -antitrypsin
BiP	binding protein
CHO	Chinese hamster ovary
Cys	cysteine
EOR	ER Overloaded Response
ER	endoplasmic reticulum
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
D'MEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
Dox	doxycycline
DTT	dithiothreitol
ERAD	ER-associated degradation
FA	formaldehyde
FBS	fetal bovine serum
FLIP	fluorescence loss in photobleaching
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
G418	geneticin
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
4PI	4 protease inhibitors
RB	Russell body
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris-buffered saline
UPR	unfolded protein response

目次

緒言	1
第1章	
Russell body の形成と細胞内動態	6
1-1. 材料及び方法	7
1-2. 結果	11
1-3. 考察	25
第2章	
Russell body 形成における小胞体ストレスと変異型 AT(C95R)の分解機構	27
2-1. 材料及び方法	29
2-2. 結果	33
2-3. 考察	38
第3章 総括	41
参考文献	42
謝辞	46

緒言

小胞体上のリボソーム上で生合成された分泌タンパク質は、小胞体膜上のトランスロコンを介して小胞体内に輸送され、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) によるジスルフィド結合の形成と binding protein (BiP)、カルネキシン、カルレティキュリン などの分子シャペロンの介在により正しい三次元構造にフォールディングされる。またフォールディング中において、分泌タンパク質の多くは糖鎖修飾を受けることが知られている。糖鎖の修飾を受け正しくフォールディングされた分泌タンパク質はゴルジ装置へ輸送され、その後分泌小胞に取り込まれ、分泌小胞と細胞膜の融合を経て細胞外へ分泌される¹⁻²⁾。(Fig. 1)

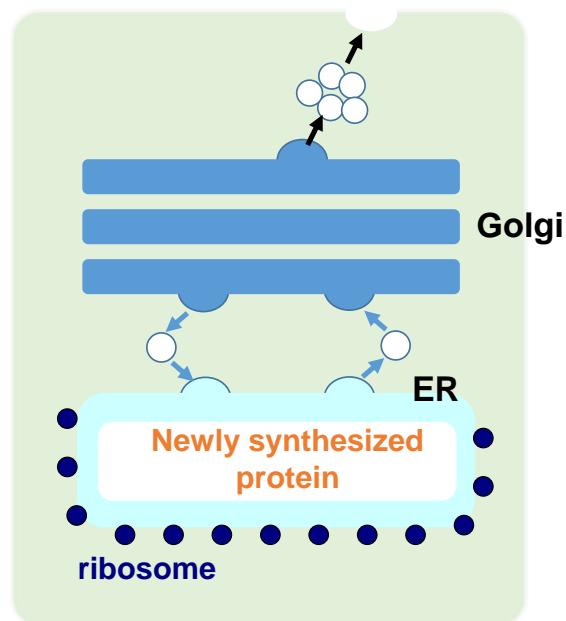


Fig. 1 新規合成されたタンパク質の分泌経路

小胞体内で生合成された分泌タンパク質は、ゴルジ装置へ輸送され、細胞外へ分泌される。

しかしながら、ミスセンス変異等により、アミノ酸残基が置換された分泌タンパク質では、小胞体内で正しくフォールディングされないことが知られている。アミノ酸変異などにより正しいフォールディングや糖鎖等の修飾が行われなかった場合、異常タンパク質として認識され、トランスロコンを通じて小胞体外へ出され、ユビキチン-プロテアソーム分解系によって分解される。異常タンパクが小胞体内に蓄積すると、アグリソームと呼ばれる構造体が形成される。このような状態において、神経変性疾患³⁾、糖尿病⁴⁾や大腸炎⁵⁾など、様々な疾患が起こると報告されている。

一方、ミスフォールディングし、小胞体内で多量体や凝集体を形成するタンパク

質は、小胞体内に蓄積し、多様な構造変化を起こすことが知られている (Fig. 2)。また小胞体膜タンパク質のフォールディング異常に置いても複雑な膜構造体が形成される。

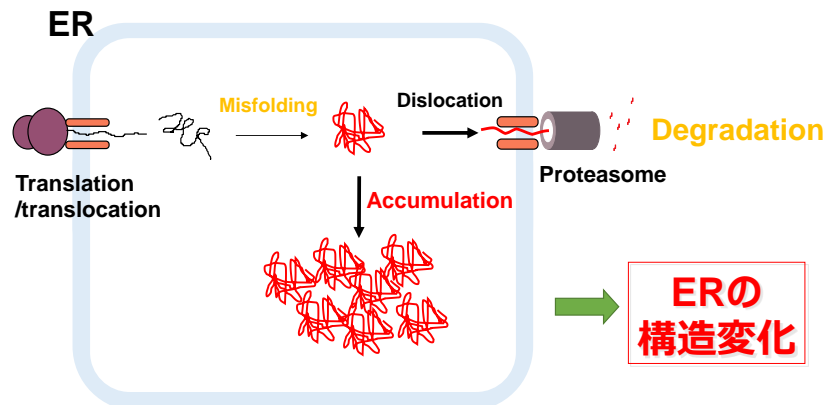


Fig. 2 ミスフォールディングタンパクの蓄積に伴う小胞体の構造変化

小胞体内に分解経路で処理できなかった変異タンパクが蓄積すると多様な構造変化を起こす。

因みに、HMG-CoA-reductase^{6,7)}、cytochrome b5^{8,9)}、aldehyde dehydrogenase¹⁰⁾などの異常蓄積により、網目状の小胞体がシート状に変化するカルメラエ (karmellae) と称される構造体が形成される。また、形質細胞において生合成された変異型 IgM が分泌されず小胞体に蓄積すると細胞質内に変異型 IgM を蓄積した巨大な顆粒が出現する¹¹⁾。Sitia らはこの顆粒を、1890年に Russell が発見した細胞内に生息する菌類により形成される構造体に因んで Russell body (RB) と命名した¹¹⁾。同様の構造体は、変異型 α 1-antitrypsin (ATZ) 発現する肝細胞やトランスジェニックマウス肝臓^{12,13)}、変異型プロテアーゼを発現している酵母でも観察されている¹⁴⁾。RB はミスフォールディングタンパク質が過剰に小胞体に蓄積することにより小胞体が拡張し形成されると推定されているが、RB の形成過程やその動態は不明である (Fig. 3)。

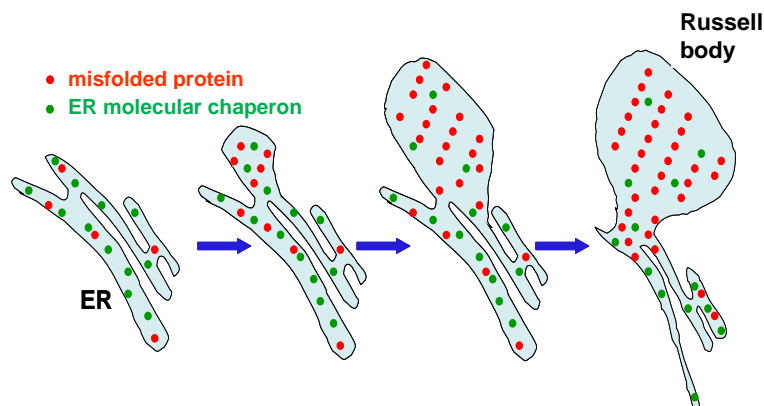


Fig. 3 Russell body (RB)形成モデル

ミスフォールディングタンパク質が過剰に小胞体に蓄積することにより、小胞体が拡張し形成されると推定されている。

一方、フォールディングが不完全なタンパク質やミスフォールドしたタンパク質が小胞体に出現し増加すると、小胞体の恒常性が崩れ不良タンパク質が蓄積するようになる。この状態を小胞体ストレスと呼び、長時間にわたるストレスは、細胞に障害を与える。ストレスが加わると細胞は直ちにストレスを回避し、小胞体の恒常性を維持するために防御システムを作動させる。これが小胞体ストレス応答、**Unfolded Protein Response (UPR)**と呼ばれ、①タンパク質翻訳の抑制、②小胞体分子シャペロン遺伝子の転写の促進、③ミスフォールディングタンパク質の分解促進のための機構が作動する(Fig. 4)¹⁵⁻¹⁷。

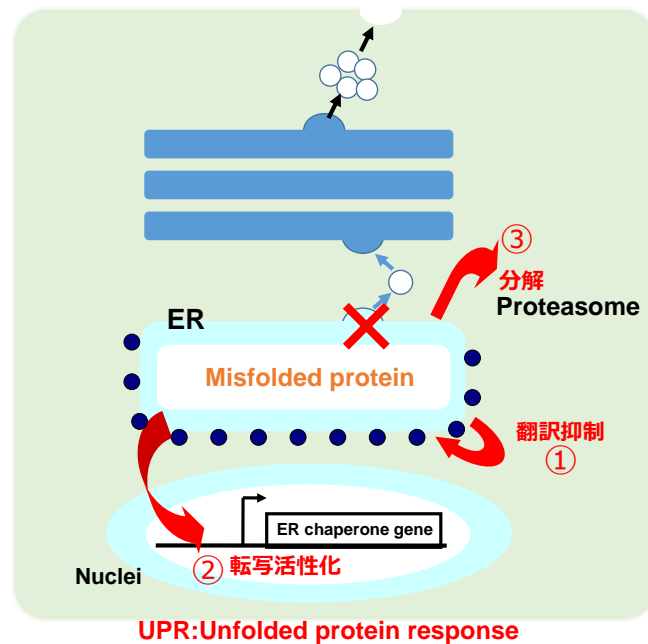


Fig. 4 小胞体ストレス応答 (UPR)

ミスフォールディングタンパクが蓄積するなどのストレスが加わると、細胞は直ちにストレスを回避し小胞体の恒常性を維持するために、防御システムを作動させる。

最近、異常タンパク質の小胞体内での異常蓄積により、UPRとは異なるストレス応答として、**ER-overload response (EOR)**と呼ばれる応答が明らかにされてきた¹⁸⁾。すなわち、小胞体内に変異型 $\alpha 1$ -antitrypsin や neuroserpin が凝集体として蓄積すると、小胞体内カルシウムが細胞質へ放出され、nuclear factor-kappa B (NF- κ B) が活性化され、細胞障害に関わる遺伝子の転写を促進する¹⁹⁾ (Fig. 5)。

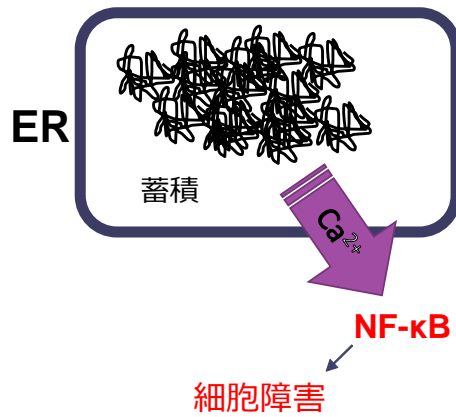
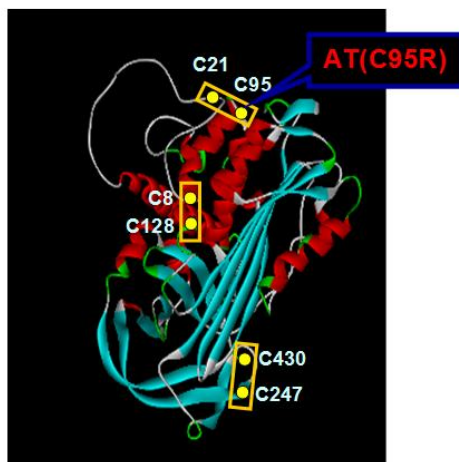


Fig. 5 ER overloaded response (EOR)

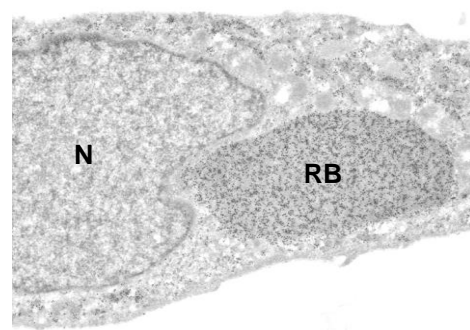
小胞体内に凝集タンパクが蓄積すると、小胞体内カルシウムが細胞質へ放出される。その後 nuclear factor-kappa B (NF-κB)が活性化され、細胞障害に関わる遺伝子の転写を促進する。

1997年、当大学医学部臨床検査医学講座の小澤哲夫博士らによって antithrombin (AT) 欠乏症患者が発見され、遺伝子解析により、AT のジスルフィド結合を担う、95 番目の Cys が Arg に置換したミスセンス変異であった²⁰⁾。患者はヘテロ接合体で、血中の AT が正常値の約 50%に低下していることより、変異体 AT(C95R)は、生合成後、細胞内で分解されているか蓄積していると予測された。AT(C95R)の細胞内における挙動を解析に関する共同研究を依頼された。そこで、AT(C95R)を安定発現する CHO 細胞を作製し、その細胞内動態を解析した。その結果、AT(C95R)の細胞外への分泌速は野生型 AT の 1/50 に低下し、プロテアソームでの分解を免れた AT(C95R)は小胞体に蓄積し、RB 様構造体を形成することを見出した (Fig. 6)^{21,22)}。

antithrombin



Immunoelectron micrograph



J. Biochem., 137, 273–285 (2005).

Fig. 6 アンチトロンビンの構造及びRBの電子顕微鏡写真

AT(C95R)はジスルフィド結合形成を担う 95 番目の Cys が Arg に置換しており、AT(C95R)を CHO 細胞に安定過剰発現させると、RB 様構造体を形成する。

さらに、ATのジスルフィド結合を担う各CysをArgに置換した変異型ATならばにペアーを形成する2つのCysをArgに置換した変異型ATを安定発現するCHO細胞を作製し、変異型ATの細胞内動態を解析した。その結果、ジスルフィド結合C28-C128の変異では、その分泌速度は野生型の1/2に低下したのみであったが、C247-C430はAT(C95R)と同様な分泌速度を示した。また、各変異ATはRB様構造体を形成したが、変異型ATの細胞内での存在状態は多様であった。ショ糖密度勾配遠心による解析により、野生型AT(分子量57 kDa)は単量体として存在することが示唆されたが、変異型AT(C95R)は分子サイズ200 kDaをピークとするoligomer構造を取っていることが示唆された。一方、変異型AT(C247R)やAT(C439R)は分子サイズ670 kDaを示し、一部は凝集体を形成している可能性が示唆された。また、変異型AT(C95R)について、その生合成をドキシサイクリン(Dox)の添加で制御できるTet-On CHO細胞を作製し、変異型AT(C95R)を発現させると、図1-6に示すように、Dox添加後72時間でRB様構造体が出現した。

そこで本研究では、変異型AT(C95R)により形成されるRBの詳細な構造と細胞内での動態と小胞体ネットワークとの関連性、RBの形成機構を明らかにするとともに、変異型AT(C95R)の蓄積による小胞体ストレスとAT(C95R)の分解機構を解析した。

第 1 章 Russell body の形成と細胞内動態

序文

小胞体 (ER) は、分泌タンパクの生合成及び成熟化の場である。新しく合成されたタンパクは、小胞体内腔において様々な修飾を受け、成熟化する。その後、ER exit sites (ERES) から coat protein complex II (COPII) に集荷され、Golgi 体でさらなる修飾を受ける。しかしながら、正しいコンフォーメーションに折りたたまれなかったタンパクは、ほとんどが小胞体に留まり、プロテアソームで分解される。このプロセスは小胞体関連分解 (ERAD, ER-associated degradation) と呼ばれ、細胞の恒常性維持のために重要なステップである²³⁾。

一方で、小胞体内にミスフォールディングタンパクが蓄積すると、小胞体恒常性維持を妨げ²⁴⁾、形態学的に異なる構造が小胞体近傍に出現する²⁵⁻²⁷⁾。3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase により形成される構造体をはじめ、タンパクの過剰発現によって小胞体に様々な形態変化が起こることが報告されている²⁸⁾。Russell body (RB) は変異 IgM の蓄積により形成されると報告されている^{26,29,30)}。α1-アンチトリプシンが、ヒト肝細胞³¹⁾及びトランスジェニックマウスの肝臓³²⁾に発現すると、同様な構造が形成されることが確認されている。RB 形成は、凝集タンパクを隔離するような小胞体の拡張が原因と考えられているが、その詳細は不明である。

小胞体は、とりわけ外縁部位に管状・網目構造が広がっている特徴がある。近年、特定のタンパクがこの特徴的な構造形成に重要な役割を果たすことが分かってきた。そのうちの 하나가 DP1 で、高い曲率を持った狭く分岐のない管状構造を形成している³³⁻³⁶⁾。小胞体シート構造の低い曲率には、別の膜タンパクである Climp63 が関わっている³⁷⁾。

以前当研究室では、アンチトロンビン (AT) Morilka (C95R)²⁰⁾が野生型に比べ分泌速度が 1/50 程度に減少し、小胞体近傍に構造体を形成することを見出し、これは RB と類似しており、Tet-On システムを利用することにより、RB の形成をコントロールできるようになった^{20,21)}。

そこで本章では、異常蓄積した変異型 AT(C95R)により形成される RB の細胞内動態を明らかにすることを目的として、GFP を融合させた変異型 AT(C95R)-GFP をドキシサイクリン添加により発現する Tet-on system CHO 細胞を用い、Live-cell imaging による RB の詳細な構造及び安定性を解析した。また、fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)及び fluorescence loss in photobleaching

(FLIP)を用いて、RB 形成時の RB 内部、隣接する RB 間及び RB-小胞体間における AT (C95R)-GFP 分子の動きについて解析した。さらに、DP1 発現によりコントロールされる管状構造を利用し、RB 形成メカニズムの解析を試みた。

1-1. 材料及び方法

1-1-1 材料

実験に用いた細胞ならびに試薬等は以下に示す会社より購入した。その他の試薬は生化学用もしくは特級を用いた。

CHO 細胞 : American Type Culture (Rockville, MD)

fetal bovine serum (FBS) : Filtron (Tokyo, Japan)

Geneticin (G418) : Sigma (St.Louis, MI)

Ham's F-12 medium : ICN Biomedicals. Inc. (Aurora, Ohio)

Trypsin : DIFCO Laboratories (Detroit, MI)

pEGFP-N1 : Clontech Laboratories (Franklin Lake, NJ)

platinum pfx DNA polymerase : Invitrogen (San Diego, CA)

dNTP mixture : Invitrogen (San Diego, CA)

primer DNA : Nippon Gene (Toyama, Japan)

XhoI : New England Bio Labs (Beverly, MA)

BamHI : New England Bio Labs (Beverly, MA)

Ligation kit : Takara Bio. Inc. (Otsu, Japan)

EffecteneTM Transfection Reagent : QIAGEN (Hilden, Germany)

Dye Reagent : Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)

PVDF Membrane : Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)

ECL Plus : Amersham Bioscience (Little Chalfont, UK)

minimum essential medium eagl (MEM) : ICN Biomedicals (Aurora, Ohio)

4PI (antipain, chymostatin, leupeptin, pepstatin A) : Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan)

Rabbit anti-human AT antibody : Athens Research and Technology (Athens, GA)

Mouse anti-KDEL antibody : Calbiochem Novabiochem. (San Diego, CA)

Mouse anti-rat GM130 antibody : Transduction Laboratories (San Diego, CA)

Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG : Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA)

Alexa Fluor[®] 546 goat anti-mouse IgG : Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA)

Donkey anti-rabbit Ig horseradish peroxidase linked whole antibody : GE Healthcare (Little Chalfont, UK)

FluoroGuard™ Antifade Reagent : Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)

CHO K1 Tet-On : Clontech Laboratories (Franklin Lake, NJ)

pTRE2hyg : Clontech Laboratories (Franklin Lake, NJ)

hygromycin : Clontech Laboratories (Franklin Lake, NJ)

Doxycycline (Dox) : Clontech Laboratories (Franklin Lake, NJ)

primer DNA : Nippon Gene (Toyama, Japan)

D'MEM : ICN Biomedicals. Inc. (Aurora, Ohio)

Block Ace : AbD Serotec (Oxford, UK)

Rabbit anti-GFP antibody : Molecular Probes (Eugene, OR)

Mouse anti-KDEL antibody : Calbiochem Novabiochem. (San Diego, CA)

Rabbit anti-Sec31p : 福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 初沢博士からの供与

Mouse monoclonal anti-β-Tubulin : Sigma (St. Louis, MO)

1-1-2 野生型 AT-GFP 及び変異型 AT(C95R)-GFP 発現ベクターの構築

野生型、変異型 (C95R) の AT cDNA をそれぞれ組み込んだ pcDNA3.1(+)/AT ならびに pcDNA3.1(+)/AT(C95R)²¹⁾ の AT をコードしている領域 (1489 bp) を以下のプライマーと Platinum® *pf*x DNA polymerase を用いて PCR 法により増幅させた。

AT kozak Xho I forward : 5'-attatattatctcgagccgcatgtattccaatgtgatagg-3'

AT BamHI reverse : 5'-attatattatggatccgcttaacacaaggggttggc-3'

PCR 産物はフェノール抽出、エタノール沈殿により精製した後 agarose gel 電気泳動により確認、定量した。精製 PCR 産物 1 μg を、*Xho*I、*Bam*HI で 37°C、4 時間 incubate し目的の PCR 産物を再度 agarose gel で精製した。また pEGFP-N1 (4700 bp) 1 μg を vector とし *Xho*I、*Bam*HI で 37°C、2 時間 incubate して切断し、目的の PCR 産物を gel purify した。Agarose gel 電気泳動により定量した後、エタノール沈殿し、DNA Ligation Kit ver.2.1 (Takara) を用いて ligation 反応を 16°C、overnight で行った。

プラスミドの塩基配列は、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Life Science) を用いてシークエンスすることにより確認した。

1-1-3 野生型 AT-GFP 及び変異型 AT(C95R)-GFP 発現プラスミドの CHO 細

胞への導入と、安定発現細胞の取得

pEGFP-N1/AT (wild or C95R) 1 μg を Effectene® Transfection Reagent を用いて CHO 細胞に導入した。一晚 培養 した後、10 cm dish に 20 個、1/100 の濃度、1/500 の濃度をそれぞれまいた。G418 耐性株について、かつ倒立顕微鏡 Axiovert 135M (ZEISS) を用いて観察し GFP の蛍光が強い株をステンレスカップで選択し継代した。この操作を安定して強い蛍光を発するコロニーが得られるまで数回繰り返した。

1-1-4 Tet-On system CHO 細胞の培養

Tet-On system CHO 細胞は 5%(v/v) Tet System Approved FBS、100 units/mL penicillin G、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycine、11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geneticin (G418) と、hygromycinB 耐性のもは 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycinB を含む Dulbecco's Modification of Eagles Medium (D'MEM/ 5%tetFBS/ G418/ hyg) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。また、継代は D'MEM/ 5% tetFBS/ G418/ hyg で行い、実験用に培養する時は細胞の増殖を抑えるため D'MEM/ 2% tetFBS/ G418/ hyg を用いた。

1-1-5 Immunoblot 法

24 well dish で培養した Tet-On System AT(C95R)-GFP 発現細胞を PBS(-)で洗淨した後、各々を 100 μL x1 sample buffer に溶解し回収した。その後 sonication を行い、70°C 10 分でタンパクを変性させ、10 μL を 15% mini gel で 80 mA、30 分 SDS-PAGE を行った。ゲルを切り出し、PVDF もしくはニトロセルロース膜 に 400 mA、1 hr タンパク転写し、PBS で 6-10 倍希釈した Block Ace (Blocking Buffer) で 4°C overnight でブロッキングした³⁸⁾。

次に、ブロッキングした膜を 0.1% Tween 20 入り Blocking Buffer で希釈した 1 次抗体に浸し、室温で 1 時間以上振とうした。膜を 0.05% Tween 20 入り PBS (PBS-T) で 10 分洗淨した後、2 次抗体に浸し、室温で 1 時間浸とうした。膜を PBS-T で 5 分、3 回洗淨し、western blotting detection reagent に 5 分浸し、暗室にて X 線フィルムに露光した。なお、一次抗体の希釈倍率は抗 AT 抗体 2,000 倍、抗 GFP 抗体は 400 倍、2 次抗体は全て 10,000 倍希釈で行った。

1-1-6 蛍光抗体法

カバーガラスを予め沈ませた D'MEM/ 5% tetFBS/ G418/ hyg 入りの dish に CHO 細胞を撒き、Tet-On にするものは細胞が付着した 3~12 hr 後 Dox を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した。一定時間の incubation 後、細胞は直ちに 4% formaldehyde (FA)

で 5 分、または -20°C メタノールで 5 分処理し固定した。FA 固定の場合は、次に 0.1% saponin 入りの Block Ace Buffer (0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 2mM MgCl_2 , 10 mM PIPES, pH 7.2 (IF 用 Buffer) / Block Ace (5 : 1, v/v)) で 1 分処理し膜を透過させた。次いで Block Ace Buffer で 5 分間 Blocking した。このとき PFA 固定の場合は 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加え、クエンチングを行った。細胞の付着したカバーガラスを Block Ace Buffer で希釈した 1 次抗体でパラフィルム上にて 20 ~ 60 分インキュベートし、Block Ace Buffer で 5 分洗い、更に Block Ace Buffer で希釈した 2 次抗体で 20 ~ 30 分インキュベートした。Block Ace Buffer で 5 分、3 回洗った後、共焦点レーザー顕微鏡 (Axiovert 200M, LSM510 meta microscopy, Zeiss) を用いて観察した²⁸⁾。観察の際には、C-Apochromatic 40x (NA 1.2) もしくは Plan-Apochromat 63x (NA 1.4) 対物レンズを用いた。mCherry-DP-1 及び ss-cfSGFP2 発現細胞の撮影は、A1si (Nikon, Tokyo)を用いた。

1-1-7 生細胞の観察、FRAP 及び FLIP

Tet-On 開始の約 3 ~ 12 hr 前に CHO 細胞を D'MEM/ 5% tetFBS/ G418/ hyg を含む glass bottom culture dish に撒き、発現誘導開始から一定時間後にただちに共焦点レーザー顕微鏡 (Axiovert 200M, LSM510, Zeiss) を用いて観察、測定した。観察中は常に CO_2 を供給し続け、またレンズおよびステージを、ヒーターを用いて 37°C に保った。蛍光波長 514 nm である GFP の蛍光観察は、argon ion laser の励起光を二色性の鏡 (HFT 514) で反射し、C-Apochromat x 40 で集束した。通常の観測は laser power 25 %、pinhole 1 で行った。

FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) による解析では、目的の範囲または直径 $2\ \mu\text{m}$ の正円を laser power 100 %の argon laser で消失させ、laser power 25 %で測定した。得られたデータは Prism version 3.0 software を用いて解析した⁴⁰⁻⁴²⁾。FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching) では、1 分間隔で 60 分まで照射した。

1-1-8 流体力学的半径 (hydrodynamical radius) の測定

AT(C95R)-GFP の流体力学的半径は、PicoHarp300 (PicoQuant, Berlin, Germany) を用いて単一光子測定により決定した⁴³⁾。試料からの蛍光は 50% ビームスプリッターにより 2 つに分割し、2 つのチャンネルにおけるアバランシェフォトダイオード (APD) により光子の発生時間を検出した。時間 t においてそれぞれのチャンネルでのシグナルを F_1 , F_2 とした場合、 τ 時間後のシグナルを $F(t+\tau)$ として、両チャンネルでの 2 次の相関係数 $G^{(2)}(\tau$: 相関時間) は下記のようになる。

$$G^{(2)}(\tau) = \frac{\langle F_1(t)F_2(t+\tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \langle F_2(t) \rangle}$$

$F_1(t)$ 、 $F_2(t)$ は時間 t における蛍光強度、かぎ括弧は時間平均を示す。

両チャンネルで同じ confocal volume を持つと仮定し、3D Gaussian プロファイルをとるとすると、相関を示す解析モデルはバックグラウンドシグナルを F_{bg} 、全シグナルを F_{1+2} として、下記のとおりとなる。

$$G^{(2)}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 - \frac{F_{bg1}}{F_{1+2}}\right) \left(1 - \frac{F_{bg2}}{F_{1+2}}\right) \left(1 + \frac{A \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{dif}}\right)}{1-A}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{dif}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{s^2 \tau_{dif}}\right)^{-0.5}$$

$\langle N \rangle$ は confocal volume の fluorophore の平均値を示し、 A は三重項状態 (triplet state) にある分子の割合、 τ_A は triplet time、 τ_{dif} は拡散時間、 s は structure parameter (focal volume の高さ と半径の比) を示す。n 個の拡散成分を考慮した場合、それぞれの成分を $G_n^{(2)}(\tau)$ として全体の相関関数は以下の通り表される。

$$G^{(2)}(\tau) = \sum_1^n G_n^{(2)}$$

データは Levenberg–Marquardt algorithm in OriginPro 9.0 J (OriginLab Corp., Northampton, MA, U.S.A.) を用いたモデルにフィットさせ、流体力学的半径はローダミン 6G を 0.6 nm として算出した⁴⁴⁾。

1-2. 結果

1-2-1 AT 野生型 (Wild Type) 及び変異型 (C95R) -GFP の発現

RB 形成の動態を可視化するため、doxycycline (Dox) 添加により AT-GFP 及び変異型 AT(C95R)-GFP を安定過剰発現する CHO Tet-On 細胞の構築を試みた。CHO K1 Tet-On 細胞に pTRE2hyg/AT-GFP 及び pTRE2hyg/AT(C95R)-GFP をトランスフェクションし、クローニング後得られた両方の細胞に Dox を 8 h 添加し、発現を確認した。その結果、AT-GFP 及び AT(C95R)-GFP と予想される分子量 (85kDa) にバンドを確認した。Dox を処置しない AT(C95R)-GFP を発現する細胞にはバンドは確認されなかった (Fig. 7)。また、AT(C95R)-GFP が GFP タグのない AT(C95R)と同様の挙動を示すことは、以前確認されている⁴⁵⁾。

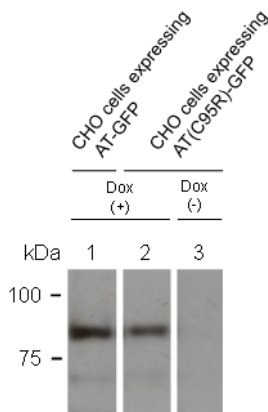


Fig. 7 Tet-On system における野生型及び変異型 (C95R) の発現

Wild type AT 及び AT C95R を発現する Tet-On system CHO 細胞に 1 mg/mL の Dox を添加し、8 h の細胞を回収し、抗 AT 抗体を用いた Immunoblotting を行った。レーン 1 は AT-GFP を、レーン 2 及び 3 は AT(C95R)-GFP を発現する CHO 細胞。レーン 3 は Dox を添加せず 8 h 培養した細胞を回収した。

1-2-2 AT(C95R)-GFP の蓄積による RB の形成

Tet-On system により AT(C95R)-GFP を発現させた CHO 細胞における RB 形成について観察した。本研究では、AT(C95R)-GFP の蓄積により形成される直径 1.0 μm 以上の球体構造体を RB と定義した。

Dox を添加した時間を 0 h とし、12、48 及び 72 h 後に AT(C95R)-GFP の蛍光を観察した。合成初期段階の 12 h では ER と推測されるネットワーク上に広がっていたのに対し、24 h では約 0.5-1.0 μm の球状の構造体が蓄積し始め、時間経過と共に蓄積の数、大きさともに増加した (Fig. 8A)。

次に、Dox 添加後の Tet-On time における RB の形成数を計測した。共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) を用いて約 0.8 μm 間隔でスライスした画像を再構築し、全細胞 (200 個) 中 RB が形成されている細胞をカウントした。独立した 3 試験の平均値を算出した。Tet-On 48 h では約 7 割の細胞に RB が形成されていた (Fig. 8B)。

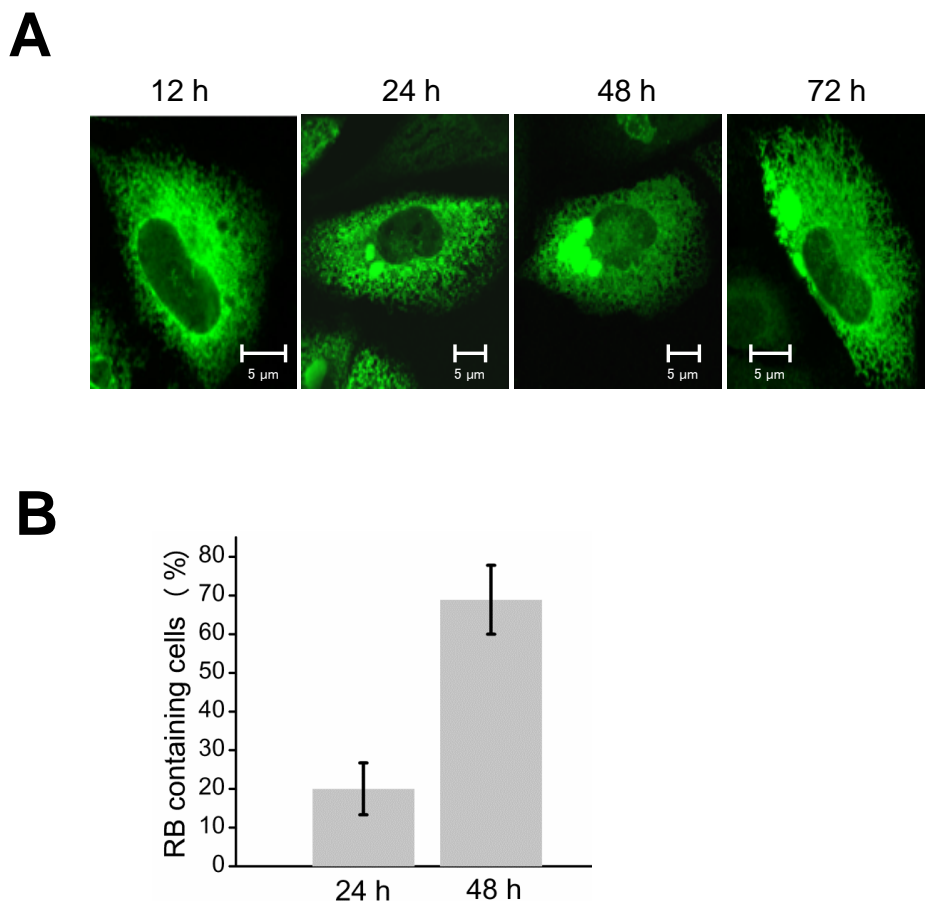


Fig. 8 Tet-On system における RB の形成過程

(A) Tet-On を開始させた時間を 0 h とし、変異型 AT(C95R)-GFP を 12、24、48 及び 72 h 発現誘導させた CHO 細胞における RB の形成過程を観察した。細胞はパラホルムアルデヒドで固定し、共焦点顕微鏡で観察した。(B) CHO 細胞を Dox 存在下で 24 もしくは 48 h 培養し、形成された RB 数を計測した。約 0.8 μm でスライスした画像を再構築した 200 の異なる細胞

をカウントし、mean 及び standard error は 3 回の計測から算出した。

1-2-3 AT(C95R)-GFP 及び RB の細胞内局在

RB がこれまでの報告通り確かに小胞体由来構造に存在するのか確認するため、蛍光抗体法を用いて細胞内局在を検討した。Tet-On を開始させた時間を 0 h とし、変異型 AT(C95R)を 48 h 発現誘導させた CHO 細胞をメタノール固定し、抗 GFP 抗体 (Alexa 488) または抗 KDEL、GM130 (ゴルジ体) 及び ERGIC-53 (ER-ゴルジ体中間体) 抗体で免疫染色し (それぞれ Alexa 546)、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) で観察した。

その結果、RB は GM130 と ERGIC-53 とともに共局在しておらず (Fig. 9A, B), RB は他のオルガネラと独立した小胞体由来の構造体であることが示唆された。次に ER exit site (ERES) が RB に含まれているか確認するため、抗 Sec31 抗体を用いて解析した (Sec31 は COPII の外皮構成成分の 1 つで、ERES のマーカーとして知られている)。その結果、RB に Sec31 positive spot が確認され、ERES は RB 上に存在することが確かめられた (Fig. 9C)。

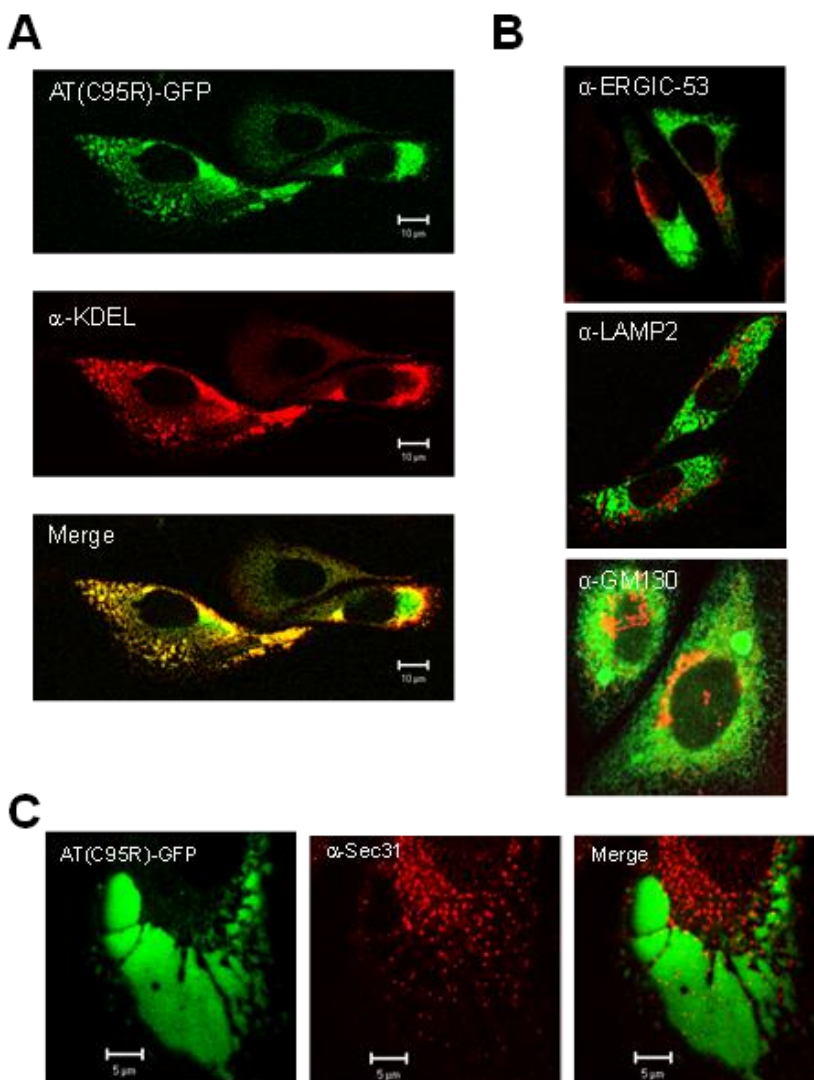


Fig. 9 AT(C95R)-GFP 及び RB の細胞内局在

AT(C95R)-GFP を発現する CHO 細胞を Dox 存在下で 48 h (A, B) または 72 h (C) 培養し、細胞内局在を観察した。小胞体 (A)、ER-Golgi 中間体 (ERGIC、B 上段)、リソソーム (B 中段)、ゴルジ体 (B 下段)、COPII 構成成分の Sec31 (C) 及び AT(C95R)-GFP の局在を確認した。小胞体、ERGIC、リソソーム、ゴルジ体及び COPII に対し、それぞれ抗 KDEL、ERGIC-53、LAMP2、GM130 及び Sec31 抗体を用いて蛍光抗体法を行い、共焦点顕微鏡を用いて観察した。B はマージ画像のみ示した。二次抗体に Alexa Fluor 546 goat-mouse IgG を用いた。AT(C95R)-GFP は GFP の蛍光で示した。

1-2-4 RBの詳細構造の解析

次に、RBは小胞体が膨れた構造と考えられているが、AT(C95R)-GFPにより形成されるRBはどうか確かめるため、RBの詳細構造の解析を試みた。

AT(C95R)-GFPをTet-On 48 h発現誘導させたCHO細胞をメタノール固定し、抗GFP抗体(Alexa 488)で免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その際、RBを画像取得限界の0.4 μm 間隔でスライスした連続画像を撮影した。細胞最下部がb、最上部がuとなるように示した。その結果、これまで考えられていたように小胞体が単に膨れたという構造ではなく、小胞体のネットワーク構造が密に集まることにより形成されていることが示唆された(Fig. 10A)。

さらなるRBの詳細な構造を解析するため、抗KDEL抗体を用いて同様に解析を行った。

AT(C95R)-GFPをTet-On 48 h発現誘導させたCHO細胞を抗KDEL抗体(Alexa 546)及び抗GFP抗体(Alexa 488)で免疫染色し、RBを0.5 μm 間隔でスライスした連続画像を撮影した。共焦点レーザー顕微鏡はZeissを用いた。aが細胞全体像、b-dが細胞上部より1 μm 間隔で撮影したものを示した。その結果、細胞の下部はネットワーク構造である一方、細胞の上部に向かうにつれてネットワークが密に集まる構造であることが観察された(Fig. 10B)。

さらにそのRBのスライス画像を3D projection処理すると、細胞の上部は巨大な膜構造体のように見えるが、細胞の下部はネットワーク構造が維持されていることが確認できた。さらにそのネットワーク構造はKDELと一致した(Fig. 10B、e-h)。

次に、免疫染色で見られた現象が生細胞でも見られるかどうか確認した。

球体に見える断面から約1 μm 細胞下部のスライス画像を撮影すると、小胞体のネットワーク構造が細胞上部に向かうに従い密に集まっていることが観察された(Fig. 10C、aはbより1 μm 上部)。よってAT(C95R)-GFPにより形成されるRBは、細胞内に極性を持つユニークな構造体であることが明らかとなった。

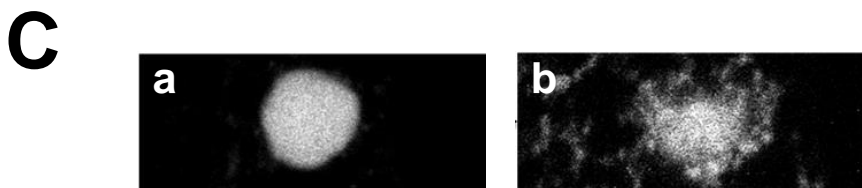
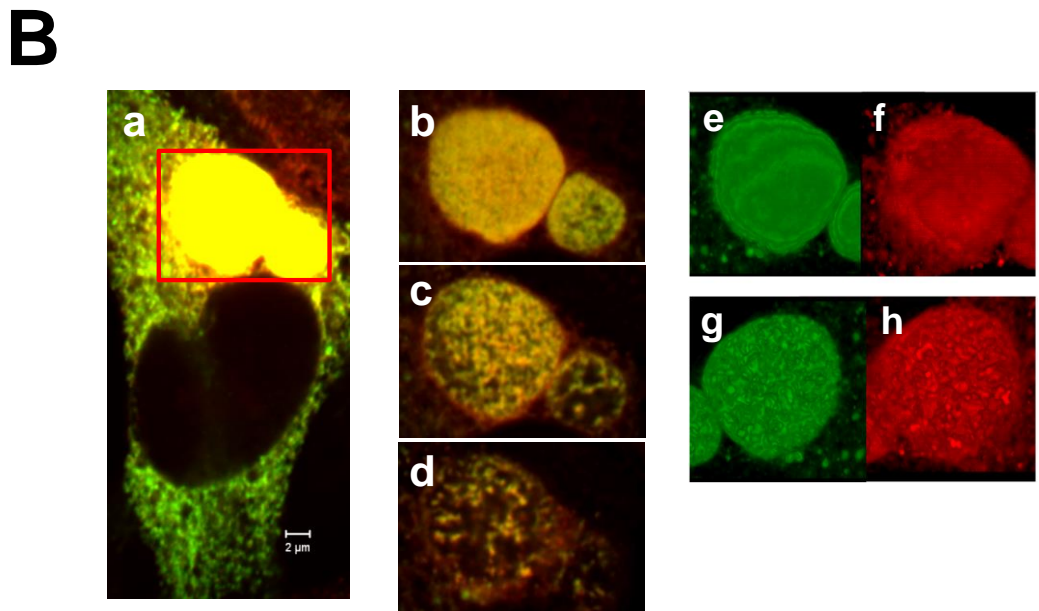
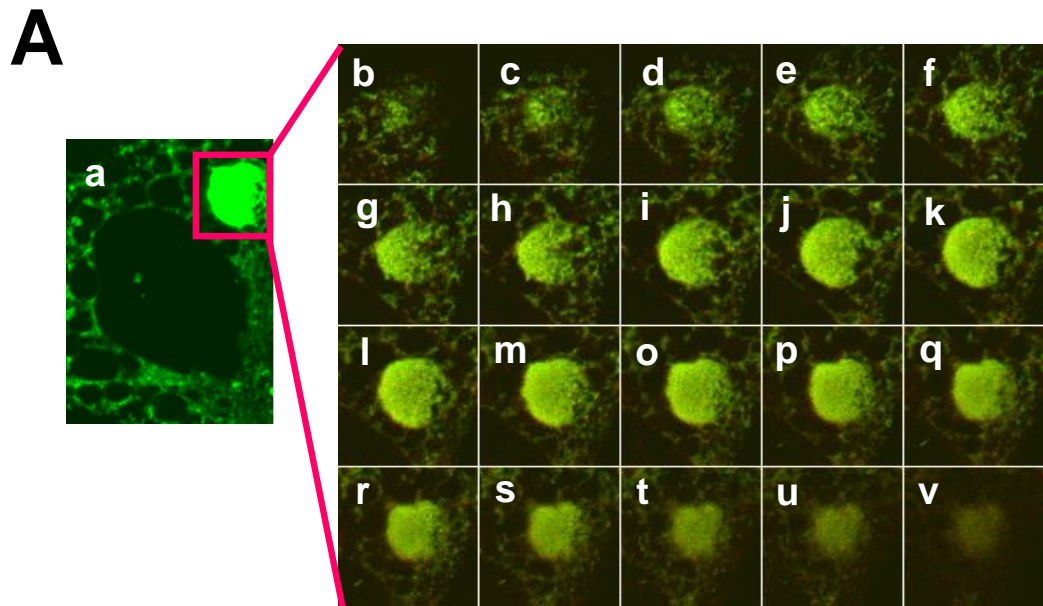


Fig. 10 RBの詳細な解析

(A) AT(C95R)-GFP を発現する CHO 細胞を Dox 存在下で 48 h 培養した。AT(C95R)-GFP は抗 GFP 抗体で処置後、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG で染色した。0.4 μm 間隔で最下部 (b, 細胞培養 dish に最も近い) から最上部 (v) までを示した。(B) 小胞体局在タンパクを抗 KDEL 抗体で処置後、Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG で染色した。0.5 μm 間隔で最下部 (d) から最上部 (b) までを示した。3D 画像化したものを e-f に示した (e 及び f は上部から眺めた図、g 及び h は下部から眺めた図) (C) 共焦点顕微鏡を用いて生細胞を観察し、形成される RB (a) 及び 1.0 μm 下部 (b) を撮影した。

1-2-5 Sec31 の分布

RB が小胞体のネットワーク構造の密な集合体であることを確認するため、小胞体膜タンパクである Sec31 と AT(C95R)-GFP の分布を比較した。

Tet-On で AT(C95R)-GFP を 48 h 発現誘導させた CHO 細胞をメタノール固定し、抗 Sec31 抗体 (Alexa 546) 及び抗 GFP 抗体 (Alexa 488) で免疫染色したものを LSM510 で観察した。RB を約 0.4 μm 間隔でスライスした連続画像を撮影した。

連続画像を重ね合わせて RB を横から見る図を構築すると (右下)、Sec31 は RB 内部に観察された (Fig. 11)。ER exit site が RB の内部にも存在することから、RB は小胞体膜構造が膨れた構造体ではなく、小胞体のネットワーク構造が集まったものであることが示唆された。

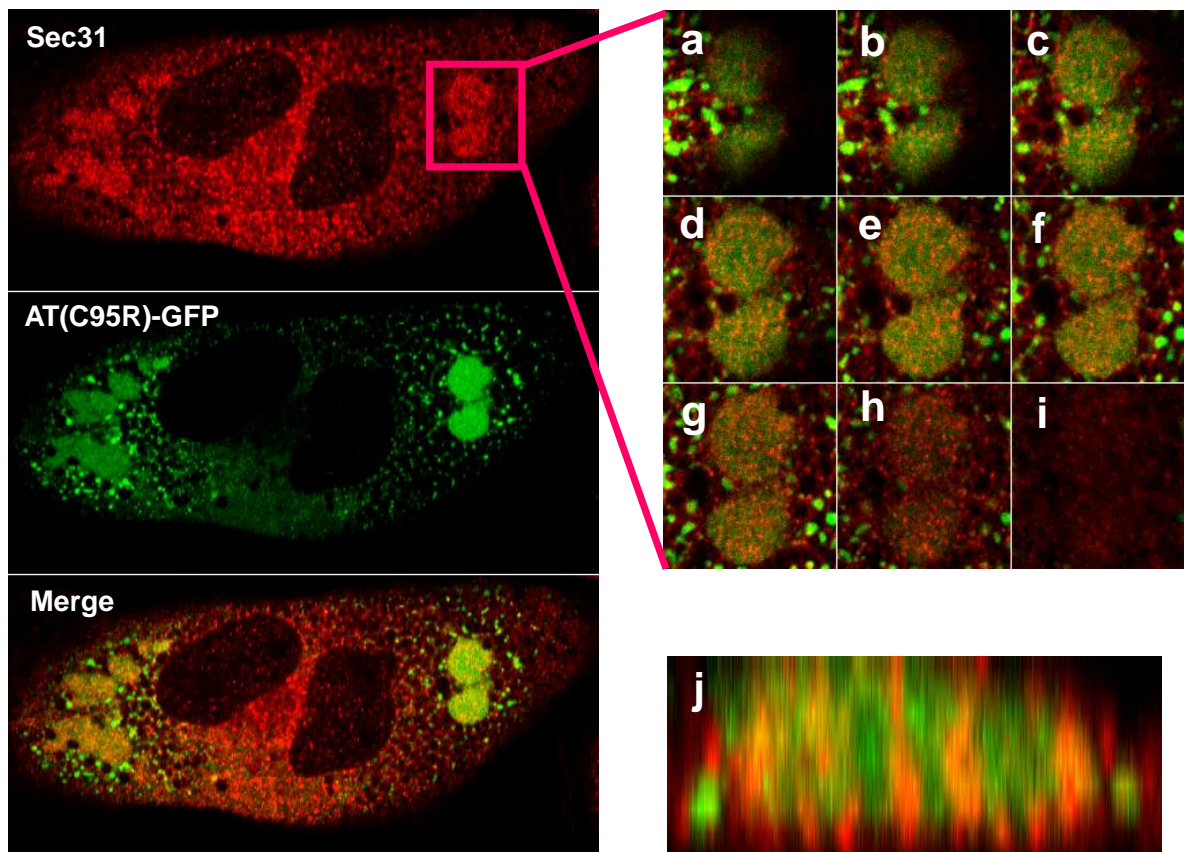


Fig. 11 RB の詳細な解析—Sec31 の分布—

AT(C95R)-GFP を発現する CHO 細胞を Dox 存在下で 48 h 培養した。AT(C95R)-GFP は抗 GFP 抗体処置後、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG を用いて染色した。Sec31 は抗 Sec31 抗体処置後、Alex Fluor 546 goat anti-mouse IgG を用いて染色した。RB 領域を 0.4 μm 間隔で撮影し、Merge 画像の最下部を (i)、最上部を (a) となるよう示した。撮影画像を統合し、3D イメージにした Z 軸断面を (j) に示した。

1-2-6 RB 構造体の安定性

AT(C95R)-GFP により形成される RB は、以前から考えられていたように「小胞体が単純に膨れた」という構造ではなく、「ネットワーク構造の集まり」というこれまで報告のないユニークな構造体であることが明らかとなった。このことから、その形成過程または構造維持に細胞骨格系が関わっている可能性も考えられた。そこで抗 tubulin 抗体を用いて、RB と tubulin の関連性を検討した。またその機能を調べるために、tubulin 重合阻害剤である nocodazole 存在下でのその細胞内動態の変化を、蛍光抗体法で解析した。

その結果、RB は tubulin と特に目立って共局在してはおらず、また 5 $\mu\text{g/mL}$ nocodazole 1.5 h 処理後も RB は存在していた (Fig. 12)。これらのことから、少なくとも RB の構造維持に tubulin は関わっていないことが示唆された。

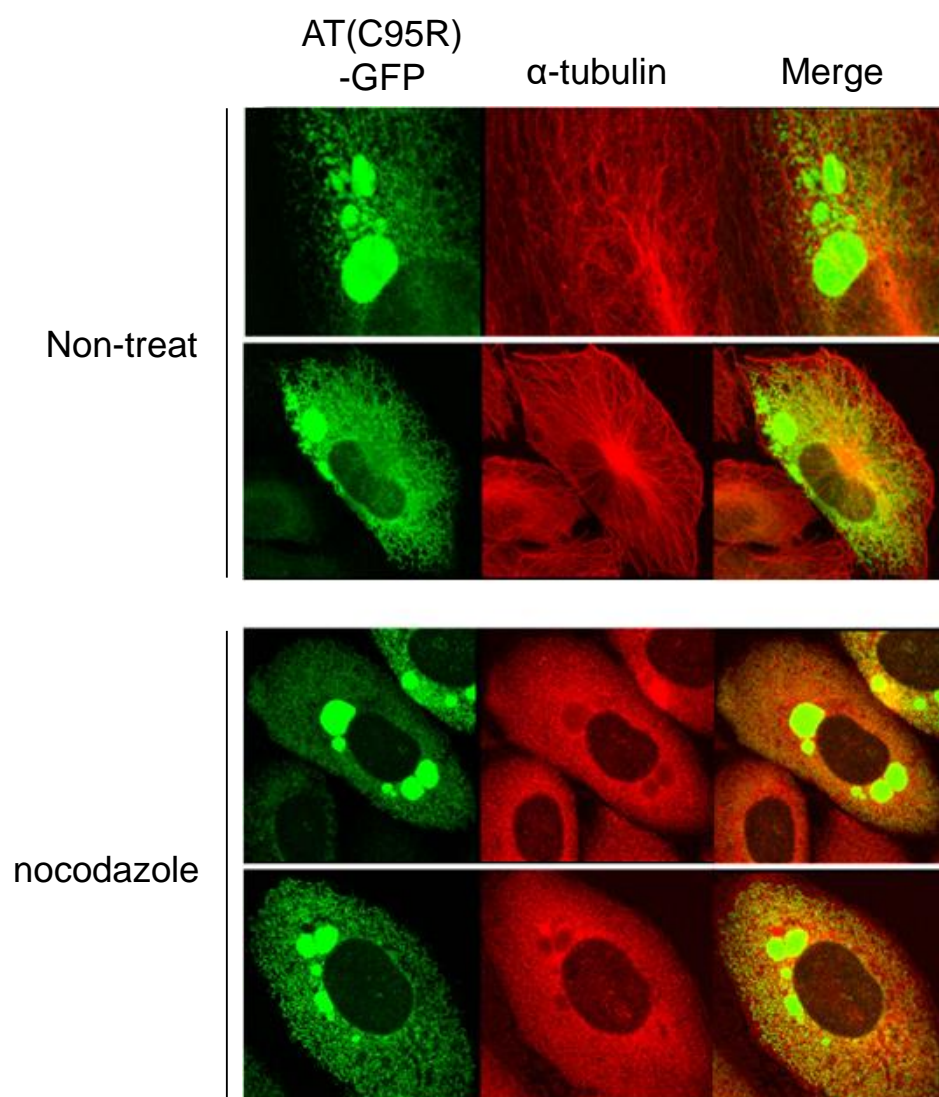


Fig. 12 細胞骨格の影響

AT(C95R)-GFP を発現する CHO 細胞を Dox 存在下で 48 h 培養した。ホルムアルデヒド固定後、抗 GFP 抗体または抗 tubulin 抗体を処置後、それぞれ Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG または Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG を用いて染色した。nocodazole は、Tet-On 46.5 h で 5 $\mu\text{g/mL}$ を添加し、1.5 h 後 (Dox 添加 48 h 後) 固定し、観察した。

1-2-7 細胞分裂時における RB の動態

小胞体は細胞分裂ににおいて、ネットワーク構造が崩れ小胞化することが知られている。そこで、細胞分裂において RB はどのような挙動を示すかを、Live-cell imaging の技術を用いて観察した。Tet-On 48 h の CHO 細胞を、37°C、5% CO₂ 存在下培養しながら、15 秒ごと 90 分間連続撮影した。分裂中の細胞を約 1 μm 間隔で撮影した画像を再構築した。その結果、RB は全体的にかなりダイナミックに動き、かつ分裂中に構造体自体が完全に断片化することはなく、多くが維持されていた (Fig. 13A)。また、分裂による RB の振り分けはランダムであることが、その他の細胞を蛍光抗体法により観察することで確認された (Fig. 13B)。よって、RB は小胞体ネットワークとは異なり、細胞分裂時においてもその構造が安定に維持されていることが示唆された。

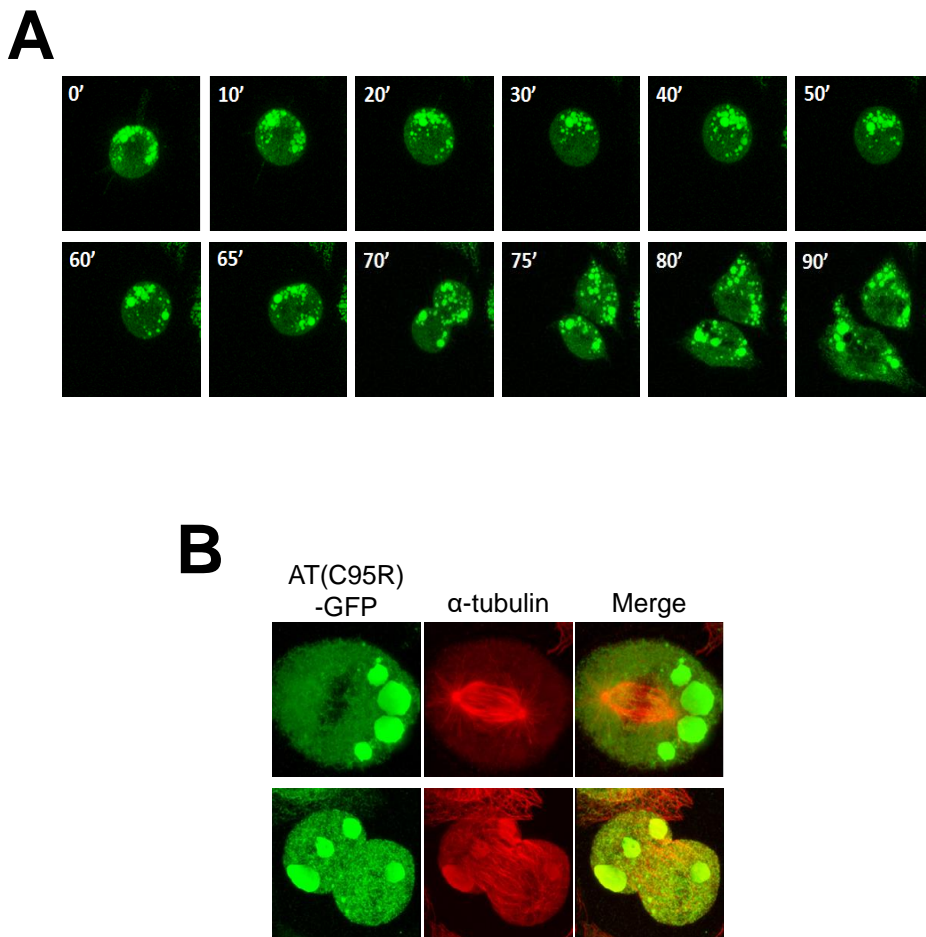


Fig. 13 細胞分裂時における RB の動態

(A) Tet-On 48 h の CHO 細胞を 15 秒間隔で共焦点顕微鏡を用いて撮影した。分裂中の細胞の、最下部から最上部までを約 1 μm 間隔でスライスした画像を再構築した。0-60 分は 10 分ごとの写真を表示し、分裂中の 60-80 分は 5 分間隔の画像を表示した。(B) AT(C95R)-GFP を発現する CHO 細胞を Dox 存在下で 48 h 培養した。ホルムアルデヒド固定後、抗 GFP 抗体または抗 tubulin 抗体を処置後、それぞれ Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG または Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG を用いて染色した。

1-2-8 Thapsigargin (Tg) 処理が RB 形成に与える影響の解析

RB は、小胞体内タンパク量以外の要因においてもその動態が変化しうるか確かめるため、Tg 処理により RB がどのように変化するか解析した。Tg は、小胞体の Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} の取り込みを抑制することにより、小胞体ストレスを惹起する薬剤である。Tg 処理中の RB 数の変化を生細胞で観察し、さらに増加数を定量することにより変化の程度を判断した。Tet-On 24 h における CHO 細胞をランダムに 200 選び、細胞の最上部から最下部までを約 $0.8 \mu\text{m}$ 間隔でスライスし再構築した画像を得て、全体の細胞数における RB 数をカウントした。その結果、Tg 処理により RB 形成が増加した (Fig. 14)。よって、小胞体内の Ca^{2+} イオンの枯渇もしくはそれに伴って起こる小胞体ストレスにより、RB 形成が促進される可能性が示唆された。

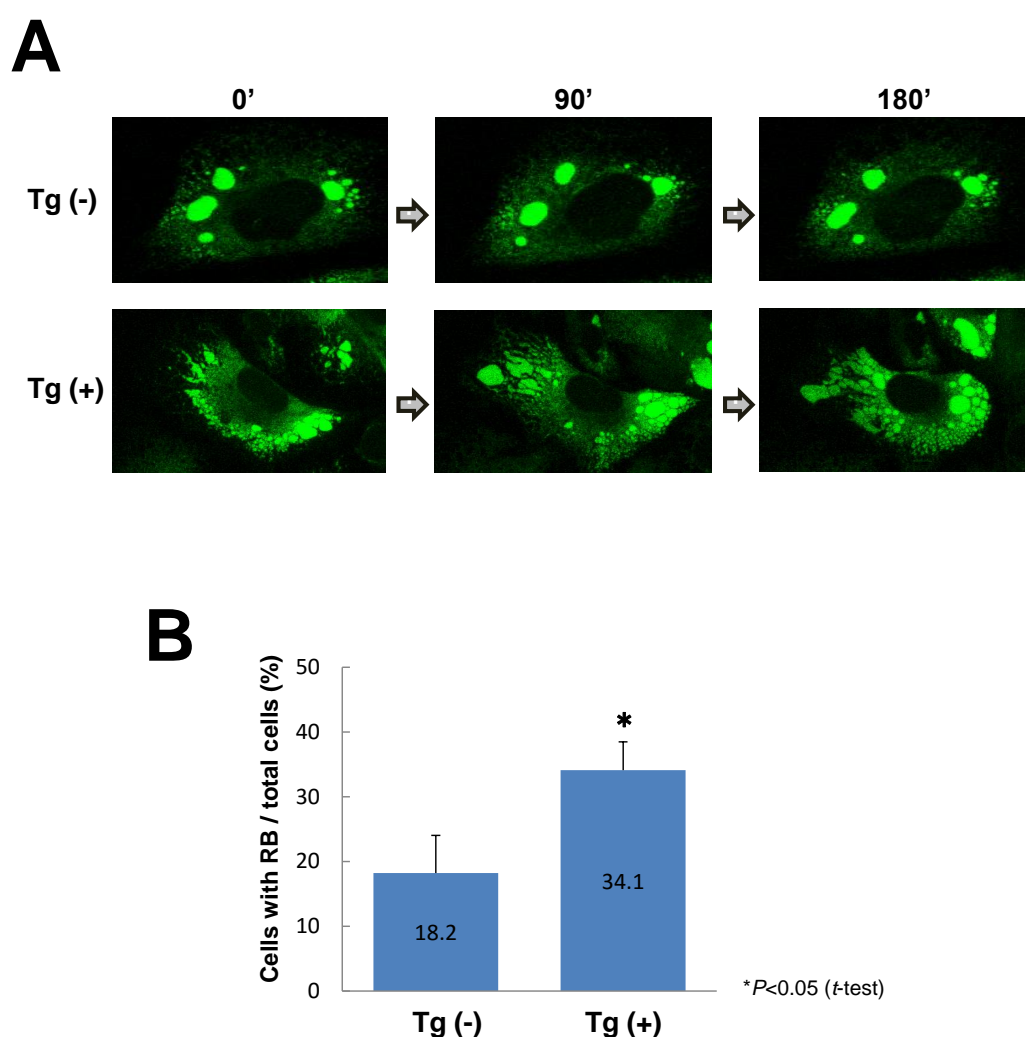


Fig. 14 Tg 処理が RB 形成に与える影響

(A) CHO 細胞を Dox 存在下で 24 h 培養した後 medium で 3 回洗い、発現誘導を停止させた。その後 Thapsigargin を最終濃度 $1 \mu\text{M}$ 処置したものを Tg+, 処置せずそのまま培養したものを Tg-とし、20 秒ごとに 3 h 撮影した。約 $1 \mu\text{m}$ でスライスした画像を再構築した。(B) 上記条件における 200 の異なる細胞をランダムに選びカウントした。mean 及び standard error は 3 回の計測から算出した。

1-2-9 小胞体及び RB 内における AT(C95R)-GFP の流動性

RB 形成時の RB 内部、隣接する RB 間及び RB-小胞体間における AT (C95R)-GFP 分子の拡散の程度を調べるため、FRAP を用いて解析した。FRAP は、小胞体を直径 2 μm の正円で bleach しその蛍光回復を測定することにより、新たに合成された AT(C95R)-GFP の動態とその領域の分子の動きを解析した。その結果、Tet-On 8 h では AT(C95R)-GFP 分子の拡散がかなり速く起こっていることが確認された (Fig. 15A, B)。

小胞体から RB 構造への推移の過程で、RB は小胞体の一部なのか独立したオルガネラ様の顆粒であるのかを解析するため、RB 形成以前の Tet-On 8 h の細胞と、RB を形成した Tet-On 72 h の細胞で FRAP による蛍光の回復を測定した。まず合成された AT(C95R)-GFP の細胞内動態を解析するため、RB を形成していない Tet-On 8 h の細胞にて、小胞体部分を直径 2 μm の正円で Bleach し FRAP により解析した。その結果、10 秒以内に蛍光がほぼ完全に回復し、AT(C95R)-GFP はかなり自由に動けることが示唆された。曲線を描く回復はそれが拡散によることを意味し、すなわち構造体が繋がっていることを示唆している (Fig.15A, B)。

次に、Tet-On 72 h において、RB 内部を直径 2 μm の正円で Bleach した結果、Tet-On 8 h の AT(C95R)-GFP と同程度の速度で蛍光が回復し、RB 内で凝集体を形成していないことが示唆された。一方、72 時間発現細胞で一つの RB 全体を Bleach した結果、短時間ではほとんど蛍光は回復しなかった (Fig.15C-E)。よって、隣接する巨大な RB 間では AT(C95R)-GFP の拡散はほとんど起こっていないことが示唆された。なお、細胞をパラホルムアルデヒドで固定すると RB 内を直径 2 μm の正円で Bleach しても全く蛍光回復は観測出来なかった (data not shown)。

さらに RB の独立性を確認するため、Tet-On system による AT(C95R)-GFP の 72 時間発現 CHO 細胞において、1 分置きに小胞体と思われる部分を bleach し、FLIP (fluorescence loss in photobleaching) により小胞体連続性を解析した (Fig. 15F)。その結果、RB は 60 分後も消光しなかったことから、RB は独立した構造体であり、外部との流動性は高くないことが確認された。

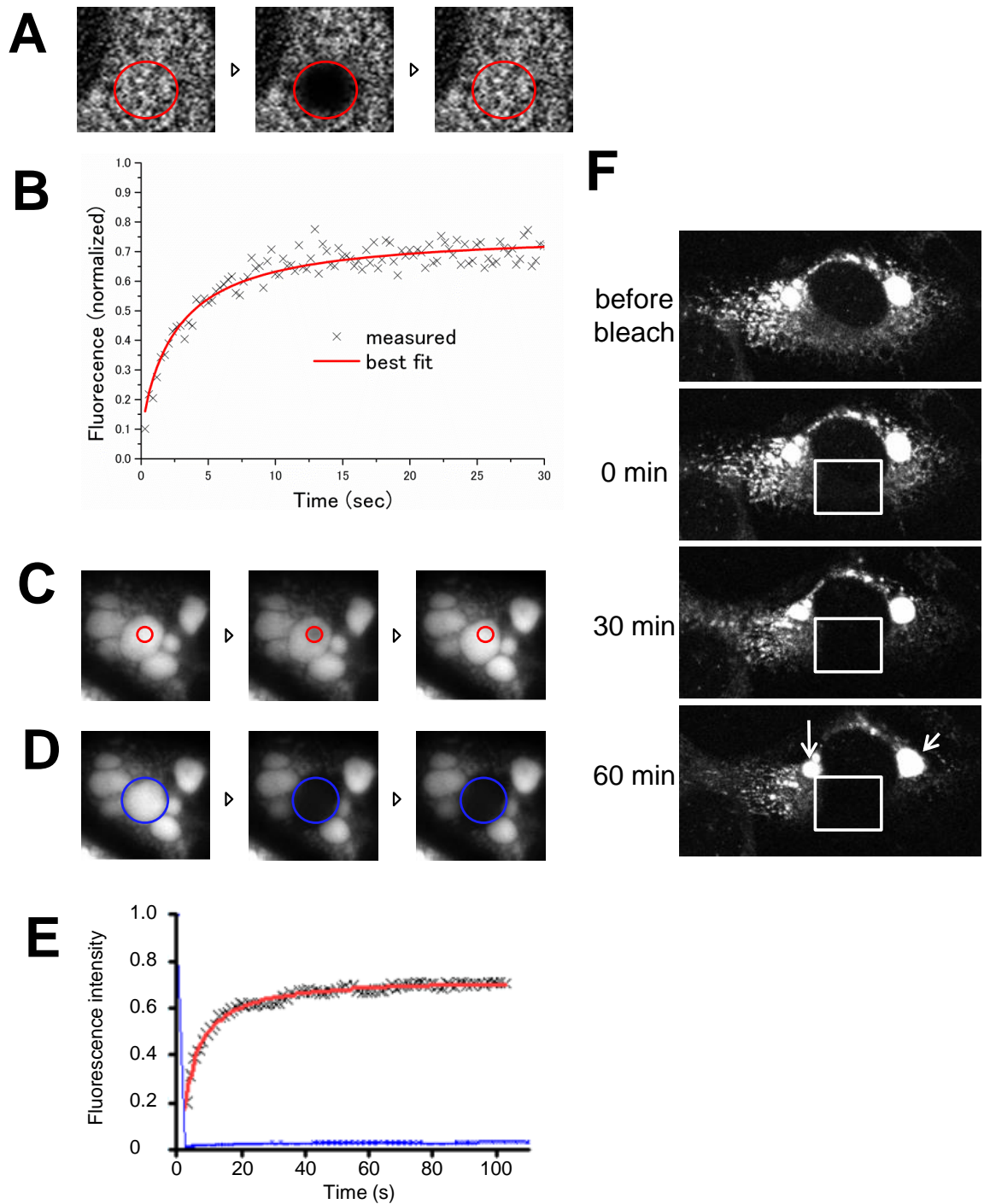


Fig. 15 小胞体及びRB内におけるAT(C95R)-GFPの流動性

(A, B) AT(C95R)-GFPを発現するCHO細胞をDox存在下で8h培養し、小胞体のネットワーク領域を(A)に示すように直径2 μ mの円でbleachした。その蛍光の回復を測定した(B)。(C-E) AT(C95R)-GFPを発現するCHO細胞をDox存在下で72h培養し、RB内部(C)もしくはRB全体(D)をbleachした。その蛍光の回復を測定した(E)。(F) Tet-On 72hr CHO細胞の白線で囲った領域を1分毎60分までbleachした。連続退光させた小胞体ネットワーク領域の蛍光は回復しなかったが、矢印で示すRBの蛍光に顕著な減少はなかった。

1-2-10 RB 形成細胞において新たに生合成される AT(C95R)-GFP の合成場所

RB が独立しかつネットワーク構造の集まった構造体であることが明らかとなったため、リボソームが他の領域の小胞体と同様に RB 上でも機能しているのかどうか、RB を含む細胞全体を Bleach して消光し、生合成による蛍光の回復を FRAP により解析した (Fig. 16)。その結果、RB 自体に蛍光回復が見られ (Fig. 16 Spot1)、その蛍光回復スピードはその他の小胞体領域 (Fig. 16 Spot2, 3) よりも速い傾向があった。RB が独立した構造体であるというこれまでの結果と併せ、RB 自体で AT(C95R)-GFP の合成が行われたと考えられた。

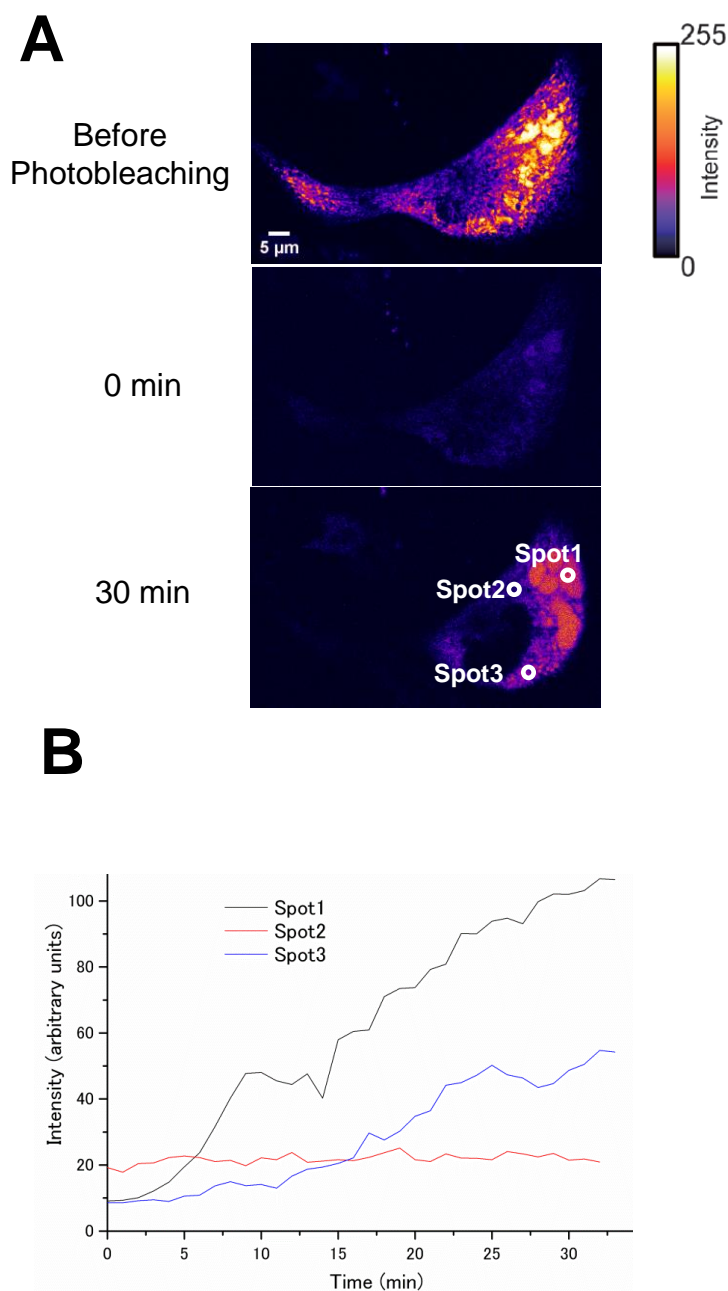


Fig. 16 RB における AT(C95R)-GFP の生合成

AT(C95R)-GFP を発現する CHO 細胞を Dox 存在下で 72 h 培養した後、細胞全体を bleach した (0 min)。その後、3つのスポットの回復を 30 分後まで測定した。bleach 前、bleach 直後及び 30 分後の画像を (A) に示し、測定結果を (B) に示した。

1-2-11 DP1 発現による AT(C95R)-GFP の小胞体管状構造からの排除

RB は、低い膜曲率を持つ安定した大きなシート膜構造だと考えられてきたが、Fig. 4 で示したように、RB は小胞体の管状構造が密接し集まっていた。そこで AT(C95R)-GFP が小胞体のネットワーク構造内に蓄積し、その詰まった構造が他の小胞体ネットワークから隔離され、次第に詰まった管構造同士が集まっていくモデルを考えた。そこで、小胞体の膜構造形成に関わる DP-1 に着目した。DP-1 は、小胞体管状構造に、細く（狭く）枝分かれがない高い曲率を与えると考えられている膜タンパクである。

初めに、DP1 発現により形成される narrow ER tubules 構造が AT(C95R)-GFP の分布に与える影響を調べた。Tet-On 8 時間後に pmCherry-DP1 をトランスフェクションし、その 16 時間後細胞を観察した。その結果、mCherry-DP1 過剰発現により形成された網状構造内に AT(C95R)-GFP はほとんど観察されなかった (Fig. 17A)。

次に、Tet-On 8 h に pmCherry-DP1 及び pss-cfSGFP2 (cysteine-free SGFP2 with a signal sequence of α 1-antitrypsin、GFP モノマーのみを形成し、小胞体内で発現するように改変したもの) をトランスフェクションし、その 16 時間後細胞を観察した結果、両者の小胞体内局在はほぼ完全にオーバーラップした (Fig. 17B)。よって AT(C95R)-GFP は、DP-1 過剰発現により形成された狭い管状構造 (narrow tubules) から排除されていることが示唆された。

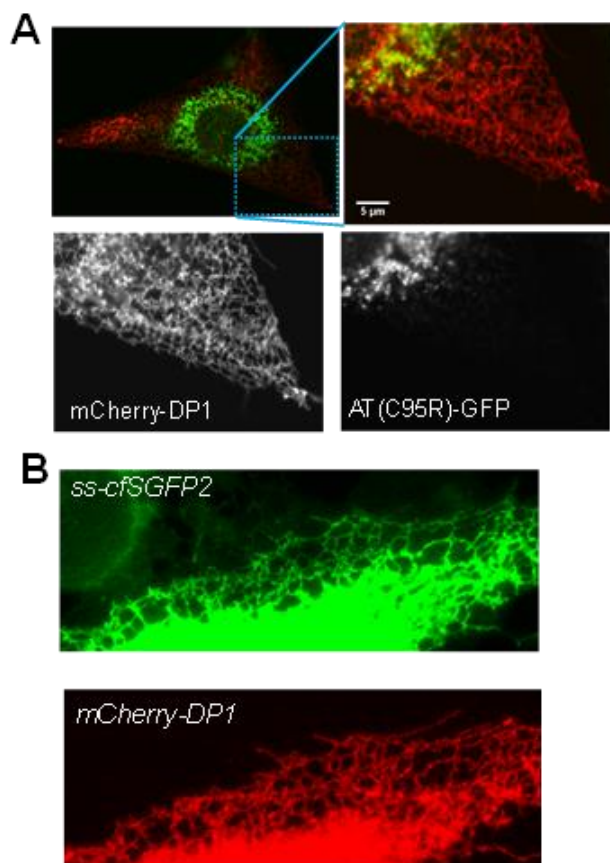


Fig.17 DP1 による AT(C95R)-GFP の排除

AT(C95R)-GFP を発現する CHO 細胞 (A) または control CHO Tet-On cells (B) を Dox 存在下で 8 h 処置し、pmCherry-DP1 (A) または pss-cfSGFP2 及び pCherry-DP1 を transfection した。その 16 h 後、共焦点顕微鏡を用いて細胞を観察した。A は生細胞を観察したもので、左上図の点線領域を拡大したものを merge (右上)、mCherry-DP1 (左下) 及び AT(C95R)-GFP (右下) に示した。AT(C95R)-GFP は、ss-cfSGFP2 (B) と対照的に、DP1 陽性ネットワーク構造より排除されていた (A)。

1-2-1 2 AT(C95R)-GFP の流体力学的半径

DP-1 過剰発現細胞ではカルレティキュリンが同様に排除されることが知られている³²⁾。DP-1 過剰発現により形成される ER tubules は直径 15-20 nm ほどであり、AT(C95R)-GFP の分子サイズがこれより大きければ排除されていることと矛盾しない。このことを確かめるために、AT(C95R)-GFP の流体力学的半径の算出を試みた。

その結果、AT(C95R)-GFP は 3.3 nm の母集団に 28.7 nm の巨大なオリゴマーの集団を含むことが明らかとなり、このことがミスフォールディングした AT(C95R)-GFP が DP1 過剰な小胞体のネットワーク構造から排除されている理由と考えられた。(Fig. 18)

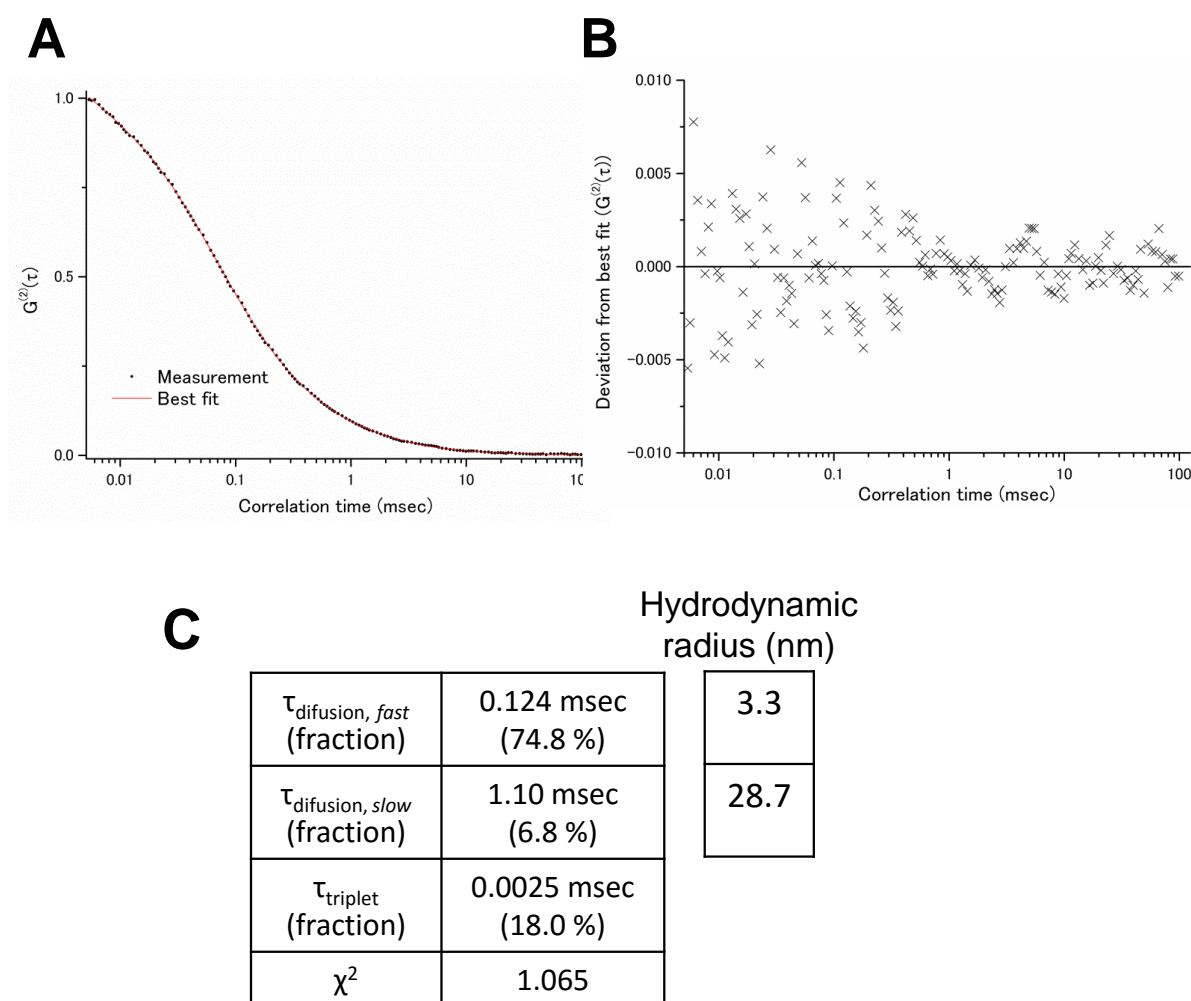


Fig.18 AT(C95R)-GFP の流体力学的半径

(A, B) GFP の蛍光のスプリットした相関係数を測定し、材料を方法に示すように 2 コンポーネントモデルに外挿した。測定した相関及びベストフィット (実線) を A に示し、誤差を B に示した。

(C) ベストフィットから算出された流体力学的半径 (hydrodynamic radius) を右に示した。

1-3. 考察

小胞体は、平らなシート構造もしくは多角形のネットワーク構造に分岐する管状構造からなり、膜及び分泌タンパクの生合成、modulation、糖鎖修飾、輸送及び分泌において重要な役割を担う²³⁾。小胞体の全体構造は、小胞体ネットワーク構造の、速い fission 及び fusion で維持される^{46,47)}。RB は、ミスフォールディングタンパクが蓄積した小胞体から派生した構造だと考えられてきたが²⁵⁻²⁷⁾、その動態と他のオルガネラとの関連性は不明であった。そこで本研究では、GFP タグの付いた AT(C95R)を CHO 細胞の Tet-On system 下でコントロールできる系を用いて、RB の詳細な構造及び動態を、生細胞を用いて明らかにすることを目的とした。

RB の動態について検討する前に、AT(C95R)-GFP の細胞内局在を調べた。抗 KDEL 抗体と一致する分布を示した (Fig. 9A) 一方、ERGIC、リソソーム及びゴルジ体とは異なる分布を示した (Fig. 9B、C)。一部のタンパクは ERGIC 及びゴルジ体を通して分泌経路に向かっている、もしくは分解されている可能性も考えられるが、総じて AT(C95R)-GFP の分布は AT(C95R)と一致しており、今回の系が RB の細胞内動態について解析可能であることを示している。GM130 が一部重ね合っで見えているのは、AT(C95R)-GFP の高発現が原因と考えられる。

Tet-On 8 h では、小胞体は「通常」と推定される連続した網状構造を形成しており、RB は形成されていなかった。小胞体ネットワーク構造部分の photobleaching では、蛍光回復は速く (Fig. 15A, B)、その回復速度は過去の研究と同程度であった^{48,49)}。RB の時間経緯としては、Tet-On 24 h で形成が見られ始め、その後時間が経つにつれて大きさと数が上昇した (Fig. 8A)。

次に、①AT(C95R)-GFP の蛍光回復は、RB 内部の bleach では即座に起こるのに対し、RB 全体を bleach した時はほとんど起こらない (Fig. 15C、D、E)、②FLIP 解析により、RB の蛍光は消失しないこと (Fig. 15F) から、RB が小胞体ネットワーク構造から独立して存在していると推測した。これらの結果は、AT(C95R)-GFP は RB 内で自由に動き回れることが示唆された。しかし詳細な構造解析では、RB はその下部で小胞体のネットワーク構造とつながっていることが明らかとなり (Fig. 10)、さらにミスフォールディングした AT(C95R)-GFP の大きさは小胞体及び RB から排出できないことが示唆された (Fig. 18)。これらの結果から、RB は小胞体ネットワーク構造と細胞下部の一部の「管」を経由しつながっているものの、RB とその他の RB 及び小胞体ネットワークとの流動性は低いことが示唆された。

今回の研究で、AT(C95R)-GFPにより形成されるRBの詳細な構造は、非常にユニークなものであることが明らかとなった。AT(C95R)-GFPを含む管状もしくはシート状構造は、巨大で上から皿をかぶせたような構造であった (Fig. 10)。その構造は、下部はコンパクトになっておらず、上部に向かうに従い密度が高くなっているものであった。Sec31が内部に見られていることから、小胞体膜由来であり、高い密度で集まったものであると考えられる (Fig. 11 j)。またこの構造は細胞分裂中でも維持されており、高密度に集合したRB構造は高い持続力があると示唆された (Fig. 13)。加えて、RB上ではタンパク生合成が行われており (Fig. 16)、その合成量は細胞内の小胞体ネットワーク構造領域より速かった。

しかしながら、今回のような構造上の密度勾配の理由は不明であり、今後の課題である。

AT(C95R)により形成されるRBは、他の分子内ジスルフィド結合を担う変異型ATと比較すると、AT(C8R)及びAT(C128R)はRB様構造を形成しない²²⁾。今回の研究から、Tet-On 72hrにおけるRB内部のAT(C95R)-GFPの蛍光回復は、8hrと比べわずかに遅い程度であった (Fig. 15)。これらの結果より、RBはネットワークの停滞を防ぐため、自発的に形成されているのではないかと仮説を立てた。最近の研究より特定の小胞体膜タンパクが小胞体の構造を規定することが示されてきており、今回は哺乳類細胞で小胞体の管状構造を形成するDP1に着目した⁵⁰⁾。DP1は小胞体の管状構造領域に豊富に見られ、管状を形成するのに関与している。もしAT(C95R)-GFPが小胞体ネットワークにおいて大きなcargoとして蓄積している場合、DP1は高い曲率を持つ膜に局在するという特性から、小胞体からのcargo形成を阻害すると思われる。Fig. 17に示すように、AT(C95R)-GFPはmCherry-DP1ポジティブの周辺(末梢)領域から排除されていた。この効果は、細い管から大きな分子が排除された状況に酷似している。蛍光タンパクは一般的に流体力学的半径が2 nm程度であることが知られており、そのみであれば管に入っていくことができる (Fig. 17B)が、AT(C95R)-GFPは10倍大きいサイズ群を含み (Fig. 18)、そういった領域に拡散することができない。Climp63やpolysomeといったタンパクでも同様に管に流入できないことが知られている。これらの結果から、AT(C95R)-GFPは、小胞体がシート構造から管状構造に移行するような通常の形態変化を阻害し、RB構造の形成につながっていると考えられる。

第2章 Russell body 形成における小胞体ストレスと 変異型 AT(C95R)の分解機構

序文

小胞体の恒常性を維持するためには、ミスフォールドしたタンパク質に対する応答が、小胞体におけるタンパク質の品質管理において重要である²³⁾。ミスフォールドしたもしくは凝集したタンパク（以下 **unfolded protein** と定義する）が小胞体に蓄積すると、小胞体恒常性維持のため、いくつかのシグナル経路が活性化される。そのうちの 하나가 **unfolded protein response (UPR)** であり、タンパクのフォールディングを更新させる等の働きにより、小胞体内腔に制御不可の凝集体が蓄積することを防いでいる⁵¹⁾。ミスフォールドしたタンパク質が小胞体内に増加すると、3つのセンサータンパク[**activating transcription factor 6 (ATF6)**、**double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK)** 及び **inositol-requiring kinase/endoribonuclease 1 α (IRE1 α)**]が **Grp78/BiP** の乖離をシグナルとし、活性化される (Fig. 19)。

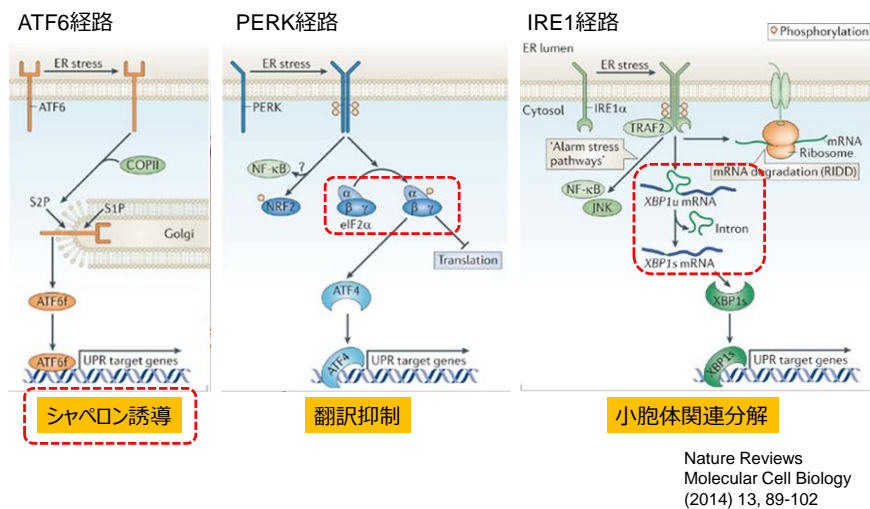


Fig. 19 小胞体ストレス応答 (UPR) を担う 3つのセンサータンパク

ミスフォールディングタンパクが蓄積するなどのストレスが加わると、細胞は直ちにストレスを回避し小胞体の恒常性を維持するために、防御システムを作動させる。それぞれのセンサータンパクは、**Grp78/BiP** の乖離を主なシグナルとし活性化される。

Grp78 が離れた **ATF6** は Golgi 体へ運ばれ、**S1P** 及び **S2P** プロテアーゼにより切断された後、**N** 末領域が転写因子として活性化される⁵²⁾。

PERK は eukaryotic translation-initiation factor 2 α (eIF2 α)の α サブユニットをリン酸化し、80S リボソームのアセンブリーを阻害する。結果として新規タンパク合成を阻害する⁵³)。IRE1 は RNase 活性を示し、X-box-binding protein-1 (XBP1) mRNA のイントロンを除く (スプライシング)。その後翻訳された XBP1 は、小胞体シャペロンの産生を誘導する転写因子として振る舞う⁵⁴)。シャペロン誘導もしくは翻訳抑制は、結果として小胞体恒常性維持に重要な役割を示す。

また、UPR とは異なるストレス応答として、ER-overload response (EOR)が知られている。ニューロセルピンや $\alpha 1$ -アンチトリプシンといったセルピンスーパーファミリーのポリマー化された変異タンパクは、UPR は活性化しないが EOR を誘導することが報告されている⁵⁵)。その場合、蓄積したポリマー化された変異タンパクにより小胞体内カルシウムが細胞質へ放出されることにより nuclear factor-kappa B (NF- κ B)が活性化され、細胞障害に関わる遺伝子の転写を促進する⁵⁶)。(Fig. 20)

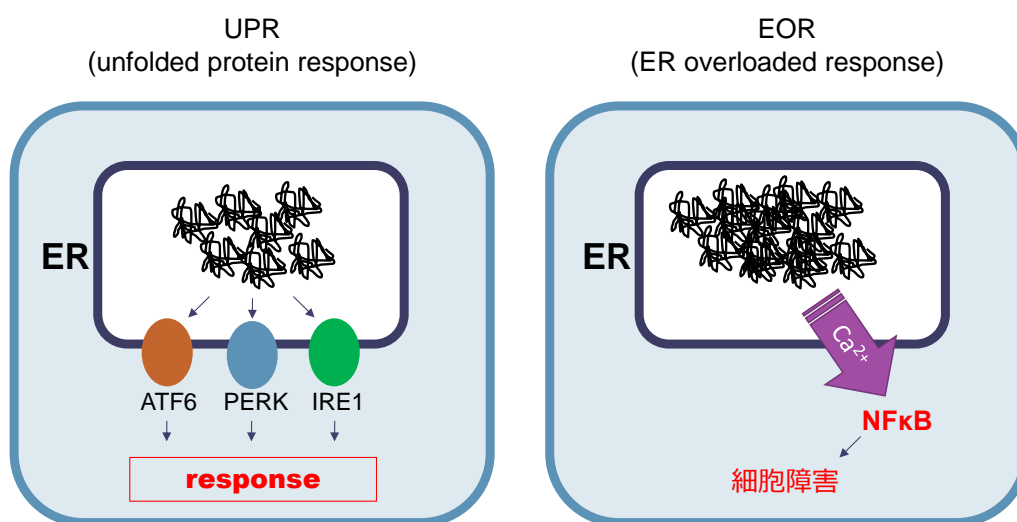


Fig. 20 UPR 及び EOR の模式図

センサータンパクがミスフォールディングタンパクなどを感知しその後のストレス応答を行う UPR に対し、EOR は、蓄積したポリマー変異タンパクにより小胞体内カルシウムが放出され、活性化された NF- κ B により細胞障害が引き起こされる。

また、当研究室のこれまでの研究及び前章までに、セルピンスーパーファミリーである AT(C95R)は、CHO 細胞においてユニークな構造体である RB を形成し、可溶性の大きなオリゴマー状態で存在することが分かっている^{21,22})。そこで本章では、CHO 細胞において AT(C95R)の過剰発現により小胞体ストレスシグナルが誘導されるのかどうか、さらにタンパク分解系がどのように制御されているか解明することを目的とし、検討を行った。

2-1. 材料及び方法

2-1-1 材料

実験に用いた細胞ならびに試薬等は以下に示す会社より購入した。その他の試薬は生化学用もしくは特級を用いた。

CHO K1 Tet-On 細胞 : Clontech Laboratories (Franklin Lake, NJ)

Fetal bovine serum (FBS) : Filtron (Tokyo, Japan)

Geneticin (G418) : Sigma (St.Louis, MI)

Trypsin : DIFCO Laboratories (Detroit, MI)

Dye Reagent : Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)

PVDF Membrane : Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)

ECL Plus : Amersham Bioscience (Little Chalfont, UK)

Donkey anti-rabbit Ig horseradish peroxidase linked whole antibody : GE Healthcare (Little Chalfont, UK)

Block Ace : AbD Serotec (Oxford, UK)

10×PCR Buffer II without MgCl₂ : Applied Biosystems Japan (Tokyo, Japan)

25 mM MgCl₂ solution : Applied Biosystems Japan (Tokyo, Japan)

2 mM dNTP mix : Applied Biosystems Japan (Tokyo, Japan)

Ampli Tag Gold (5U/μl) : Applied Biosystems Japan (Tokyo, Japan)

Primer XBP-1 (rat) : Nippon Gene (Toyama, Japan)

Primer GAPDH (mouse) : Nippon Gene (Toyama, Japan)

Agarose, Type I : Sigma (St Louis, MO)

Certified™ Low Range Ultra Agarose : Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)

Rabbit polyclonal anti-IκB antibody : Santa Cruz Biotechnology (Santa Crus, CA)

Goat polyclonal anti-NF-κB p65 antibody : Santa Cruz Biotechnology (Santa Crus, CA)

Donley anti-goat IgG-HRP : Santa Cruz Biotechnology (Santa Crus, CA)

Block Ace : AbD Serotec (Oxford, UK)

MG132 : Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan)

3-methyl adenine (3MA) : Sigma (St. Louis, MO)

2-1-2 AT (C95R)を発現する Tet-On system CHO 細胞の構築

AT (C95R)を Tet-On system により発現する CHO 細胞は、当研究室田中幸博士により構築されたものを用いた²¹⁾。

2-1-3 Tet-On system CHO 細胞の培養

Tet-On system CHO 細胞は 5%(v/v) Tet System Approved FBS、100 units/mL penicillin G、100 µg/mL streptomycin、11 µg/mL geneticin (G418) と、hygromycinB 耐性のもは 110 µg/mL hygromycinB を含む Dulbecco's Modification of Eagles Medium (D'MEM/ 5%tetFBS/ G418/ hyg) を用い、37°C、5% CO₂ で培養した。また、継代は D'MEM/ 5% tetFBS/ G418/ hyg で行い、実験用に培養する時は細胞の増殖を抑えるため D'MEM/ 2%tetFBS/ G418/ hyg を用いた。

2-1-4 Immunoblot 法

UPR の検出では、24 well dish で培養した Tet-On System AT(C95R)-GFP 発現細胞を PBS(-)で洗浄した後、各々を 100 µL 1x sample buffer に溶解、回収した。sonication し、70°C 10 分でタンパクを変性させ、10 µL を 15% mini gel で 80 mA、30 min SDS-PAGE を行った。ゲルを切り出し、ニトロセルロース膜に 400 mA、1 h タンパク転写し、PBS で 6 倍希釈した Block Ace (Blocking Buffer) で 4°C overnight でブロッキングした³⁸⁾。次いで、ニトロセルロース膜を 0.1% Tween 20 入り Blocking Buffer で希釈した 1 次抗体に浸し、室温で 1 時間 shake した。膜を 0.05% Tween 20 入り PBS (PBS-T) で 10 分洗浄した後、2 次抗体に浸し、室温で 1 時間 shake した。膜を PBST で 5min 3 回洗浄し、western blotting detection reagent に 3~5 分浸し、暗室にて X 線フィルムに露光した。定量は GAPDH を control とし、フィルムから Image J を用いて行った。なお、一次抗体の希釈倍率は抗 AT 抗体 2,000 倍、2 次抗体は全て 10,000 倍希釈で行った。

NF-κB の検出では、PVDF 膜にタンパク質を転写し、10%の skim milk を含む TBS-T 溶液 [0.1% tween 20/Tris-buffered saline (pH7.6)] に浸して 1 時間ブロッキングした。次いで PVDF 膜を TBS-T 溶液で 2 分間 2 回洗浄し、TBS-T 溶液で 1,000 倍希釈した抗 IκB 抗体 (from rabbit) または、抗 NF-κB p65 抗体 (from goat)に浸して室温で 1 時間シェイクした。この PVDF 膜を TBS-T 溶液で 2 分間 2 回、10 分間 3 回洗浄後、TBS-T 溶液で 10,000 倍希釈した anti-goat IgG、または 5,000 倍希釈した anti-goat IgG で 45 min シェイクした。その後 PVDF 膜を

TBS-T 溶液で軽く 2 回、10 分 6 回洗浄し、ECL-Plus の基質に浸して 5 分間インキュベートし、軽く基質を拭き取ってから暗室にて X 線フィルムに露光した。もしくはルミノイメージアナライザー (LAS 4000 mini EPUV, Fuji Film) で定量を行った。

phosphorylated eIF2 α の検出のために、培養していた細胞を phosphatase inhibitors (0.4 mM sodium orthovanadate, 0.4 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate) 入り溶液を用いてストックした。

2-1-5 RNA 抽出法

RNA の抽出には、RNA 抽出 kit の NucleoSpin® RNA II を用いた。6 cm dish に培養した細胞を Trypsin/EDTA 0.25% ではがし、エッペンドルフチューブに回収した。遠心 (15000rpm, 5 min, 4°C) 後、pellet に Lysis Buffer RA1 350 μ l, β -Mercapt ethanol 3.5 μ l を加え、vortex して Collection Tube にのせた Filter Column (violet ring) に全量を移した。遠心 (11000g, 1 min, 4°C) 後、Column を通過した液体を新しいエッペンドルフチューブに移し、そこに 70% DPEC 処理 ethanol (ethanol を DPEC 処理 milliQ 水で 70% に薄めたもの) を 350 μ l 加えた。vortex 後、RNA II Column (light blue ring-plus Collection Tube) に全量を移し、遠心 (11,000 g, 30 sec, 4°C) した。Column を通過した液体を捨て、Membrane Desalting Buffer (MDB) 350 μ l 加え、遠心 (11,000 g, 1 min, 4°C) した。Column の中心に DNase reaction mixture (90 μ l の reaction buffer for rDNase に 10 μ l の rDNase solution を加えたもの。rDNase solution = rDNase の vial に 540 μ l の RNase-free Water 加え溶解したもの。) 95 μ l を直接加え、室温で 15 min incubate した。Wash Buffer RA2 200 μ l を加え、遠心 (11000g, 1 min, 4°C) した。Column を通過した液体を捨て、Wash Buffer RA3 (kit の RA3 に 50 ml の ethanol) 600 μ l を加え、再度遠心 (11000g, 1 min, 4°C) した。再び Column を通過した液体を捨て、Wash Buffer RA3 250 μ l を加え、遠心 (11000g, 2 min, 4°C) した。Column を新しいエッペンドルフチューブにのせ、Column の上に RNase-free Water 10 μ l を滴下し、遠心 (11000g, 1 min, 4°C) し、RNA を含む液体を採取した。この溶液の吸光度を測定し RNA の濃度を測定した。

2-1-6 mRNA から cDNA への逆転写酵素反応

mRNA から cDNA の合成には、AffinityScript™ QPCR cDNA Synthesis kit を用いた。抽出した RNA を 1 μ g/6 μ l (全量 6 μ l) となるように RNase-free Water を加えて希釈し、2 \times Master mix 10 μ l, Random primer 3 μ l, Affinity script RT/RNase

Block 1 μl を RNA 溶液に混和した。25°C で 5 min、42°C で 15 min、95°C で 5 min 反応させた後、4°C で保存した。

2-1-7 PCR 反応

逆転写反応後の cDNA 溶液 (total 20 μl) の 5 μl に DPEC 処理 milliQ 水 95 μl を加えて 20 倍希釈し、サンプルとした。10 \times PCR bufferII 1 μl , 25 mM MgCl₂ 0.6 μl , 2 mM each dNTP 1 μl , Ampli Tag gold 0.05 μl , Forward primer (10 μM) 0.4 μl , Reverse primer (10 μM) 0.4 μl , DPEC 処理 milliQ 水 6.0 μl , サンプル 0.5 μl を混和し、以下の条件で PCR 反応を行った。

95°C	9min		
94°C	30sec	} 20sec	} 30cycle
57°C (XBP-1)			
55°C (GAPDH)			
72°C	30sec		
72°C	7min		
4°C	∞		

目的の cDNA を増幅させるために用いた primer の塩基配列を以下に示す。

XBP-1 (forward)	5'-GCTTGTGATTGAGAACCAGG-3'
XBP-1 (reverse)	5'-ACAGGGTCCAACCTTGTCCAG-3'
GAPDH (forward)	5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'
GAPDH (reverse)	5'-GATGCAGGGATGATGTTC-3'

2-1-8 Agarose gel 電気泳動

XBP-1 のサンプルを流すゲルは Ultra Agarose を用い、GAPDH のサンプルを流すゲルは Agarose, Type I(Sigma)を用いた。それぞれ、0.6 g を TBE 溶液(Tris 10.8 g, Boric acid 5.5 g, EDTA 0.74g を蒸留水に溶かし 1L にしたもの) 30 ml に加熱溶解し、EtBr 1.5 μl を加え、50°C くらいになったらゲル版に流し込み固めた。それぞれの PCR 産物全量を新しいエッペンドルフチューブに移し、5 \times TBE 緩衝液 2.5 μl を加えサンプルとした。70°C, 5 min Heat shock し、その後すぐに氷にチューブを氷にさして 2 min 急冷した。Marker (100bp DNA Ladder, TOYOBO, Osaka, Japan) 2 μl 、サンプル 10 μl を Apply し、100V で 4~5cm 程度泳動した。ゲルを暗室にて X 線フィルムに露光した。さらに、ルミノイメージアナライザー (LAS4000miniEPUV, Fuji Film) の Fluorescence:EtBr でバンドを検出した。

2-1-9 核抽出液、細胞質抽出液の調製

核ならびに細胞質抽出を行うため、以下の溶液を調製した。Buffer A としては 10mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA の 1 ml あたり 1 M DTT 1 μ l, 0.1 M PMSF 10 μ l, 1 M β -glycerophosphate 20 μ l, 10 μ g/ml Aprotinine 1 μ l, 10 μ g/ml Leupeptin 1 μ l, 1 M sodium orthovanadate 1 μ l を含む溶液を作製した。また Buffer B としては、20mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 400mM KCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA の 1 ml あたり、Buffer A と同様に添加試薬を加えた。

細胞を培養したシャーレの培地を除き、細胞に PBS 1 ml (6 cm dish の場合) を加えた。セルスクレーパーで細胞をはがし、エッペンドルフチューブに移し、遠心 (5000 rpm, 15 sec, 4°C) した。Pellet に Buffer A 100 μ l 加え、イエローチップで 20 回程度、細胞をよく懸濁し、氷上に 15 min 静置した。10% NP-40 を 25 μ l 加え、10 秒 vortex し、遠心 (15000 rpm, 5 min, 4°C) した。上清が細胞質抽出液 (100 μ l) であり、新しいエッペンドルフチューブに移した。

Pellet には Buffer B 30 μ l 加え、vortex した。すぐに氷上に移し、5 min ごとに沈殿が粉碎されるように激しく vortex し、15 min 静置した。遠心 (15000 rpm, 5 min, 4°C) した後の上清が核抽出液 (30 μ l) である。

2-1-10 タンパク定量法

タンパク定量は Lowry らの方法に準じて行った⁵⁷⁾。牛血清アルブミン (BSA) を standard として検量線を作成した。試料を 1 N NaOH で 30 分間以上、室温で可溶化後、よく懸濁し、1 N NaOH で適当に希釈した後その 100 μ L を 1.5 mL チューブに移した。2% (w/v) Na_2CO_3 50 mL に対し 1% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ と 2% (w/v) Na-K tartrate を 1:1 (v/v) で混合した溶液を 1 mL 加えた reagent を作製した。standard 及び各試料が入っている 1.5 mL チューブに作製した reagent を 1 mL 入れすぐに攪拌し、室温で 10 分間反応させた。次に 2 N のフェノール試薬 (Sigma) を水で 2 倍希釈したものを 100 μ L 入れすぐに攪拌した。30 分間室温に静置した後、吸光度 660 nm (A660) で測定した。この試料の測定値を BSA 0~0.5 mg/mL 間で 7 点とって作製した検量線を用いてタンパク質量を算出した。

2-2. 結果

2-2-1 AT(C95R)の蓄積 (RB 形成) における UPR の関与

異常タンパク質が細胞内に増加すると UPR が誘導され、小胞体シャペロンは 10 倍程度増加することが知られている²⁷⁻²⁹。そこで AT(C95R)の蓄積に伴う UPR の誘導を解析した。Tet-On system により AT(C95R)を 0、12、24、48、72、96 時間発現させた CHO 細胞を回収、SDS-PAGE し抗 AT 抗体および抗 KDEL 抗体で immunoblotting した (Fig. 19)。その結果、Grp98、BiP 及び PDI の増加は 96 時間発現誘導で 2 倍程度 (Grp78, Grp97 及び PDI はそれぞれ 2.2, 1.9 及び 1.4 倍)であった。よって、UPR が誘導されている可能性は低いと考えられた。

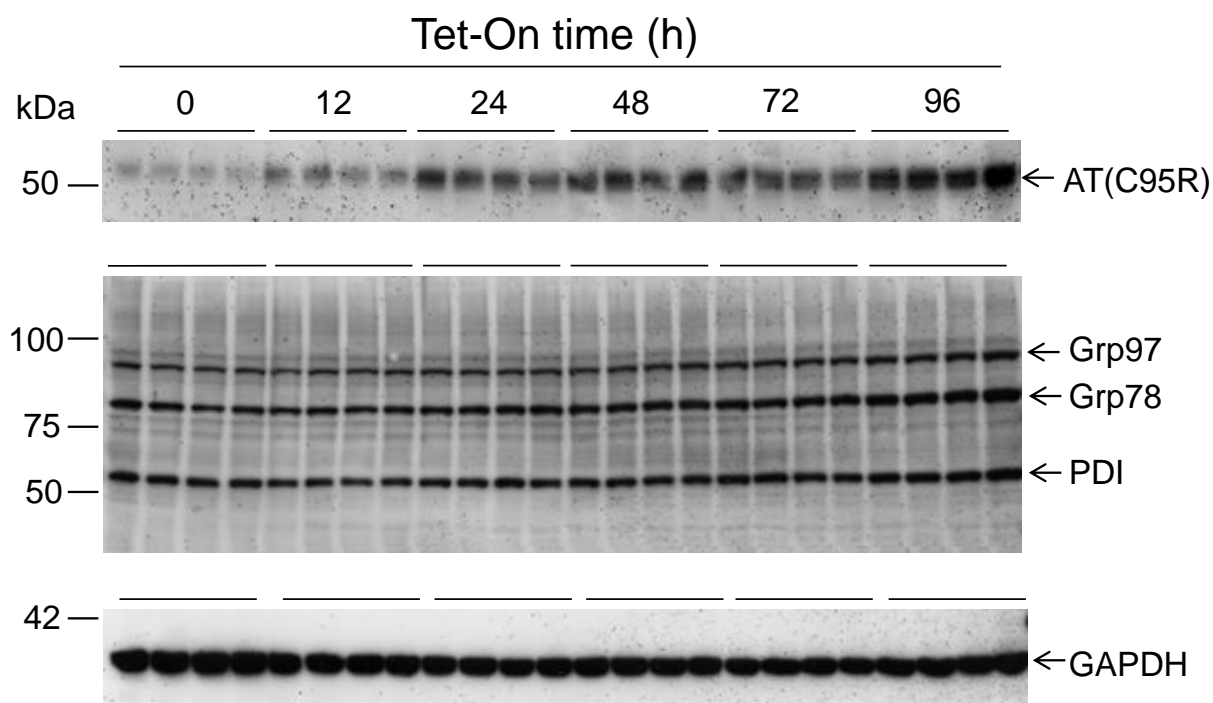


Fig. 19 AT(C95R)発現における小胞体シャペロンの経時的変化

AT(C95R)を発現する CHO 細胞を、Dox 存在下 0、12、24、48、72 及び 96 h 培養した後 Immunoblot を行った。各レーン 100 μ g のタンパクを泳動した。小胞体シャペロンは、抗 KDEL 抗体により検出した。

2-2-2 AT(C95R)の蓄積 (RB 形成) は XBP-1 及び eIF2 α -P を活性化しない

次に Tet-On system CHO 細胞において、Dox を添加し Tet-On system により AT(C95R)が過剰発現し RB が形成されるような条件下での UPR 経路の活性を検討した。Control の細胞として Tet-on system のベクターのみが入った Tet-on K1 細胞、AT の野生型が発現する Tet-AT wild 細胞とバンドを比較した。

まず、3細胞とも0、12及び24hにおいていずれも splicing を受けていない XBP-1 mRNA に相当する 281 bp 付近に濃いバンド検出された (Fig. 20A 上段)。次に Tet-On 0h から 48 及び 72hr を比較した結果においても、281 bp 付近のバンドのみ検出された (Fig. 20A 下段)。どちらも小胞体ストレスを惹起する Thapsigargin 存在下ではほぼ 100% の mRNA がスプライシングされ、234 bp 付近に観察されている。またそれぞれ対応する時間の AT の発現量は、AT(C95R)は 72 h までにかかなりの量の蓄積が見られるのに対し、AT wild の蓄積はわずかであり、既報と同様の条件で XBP-1 の挙動を観察できていることが確認された (Fig. 20B)。さらに UPR の経路の活性化の有無を確認するため、PERK 経路下流である eIF2 α のリン酸化の検出を試みた。XBP-1 と同様、Tg 処理では UPR 活性化を示すリン酸化が検出されたのに対し、Tet-On 48 及び 72 h ではリン酸化シグナルが検出されなかった (Fig. 20C) これらの結果より、約 7 割以上の細胞が RB を持つようになる Tet-on 48 h 以降の条件においても、UPR 経路は活性化されていないことが示唆された。

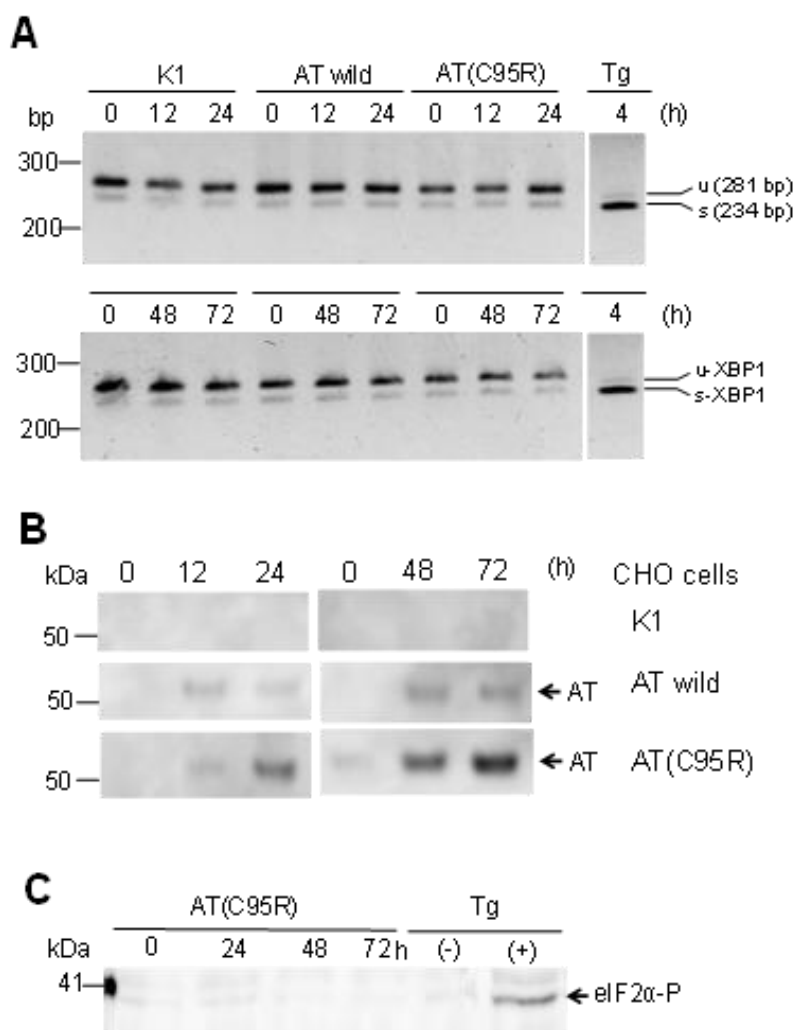


Fig. 20 AT WT 及び C95R 発現における UPR 経路への影響

(A) XBP1 mRNA のスプライシングを示す。各 CHO 細胞を Dox 存在下で 0、12、24、48 及び 72 h で培養し、mRNA を抽出した。上部のバンドは 'unspliced' XBP-1 を示し、下部のバンドは 'spliced form' を示す。positive control として、control CHO 細胞を thapsigargin (1 μ M) で 4 h 処理した。(B) control CHO 細胞, wild type AT を発現する CHO 細胞及び AT(C95R)を発現する CHO 細胞の AT 量を、Immunoblot 法により解析した。(C) AT(C95R)発現する CHO 細胞を、Dox 存在下で 0、24、48 及び 72 h で培養し、eIF2 α のリン酸化を測定した。positive control として、control CHO 細胞を thapsigargin (1 μ M) で 4 h 処理した。

2-2-3 AT(C95R)の蓄積 (RB 形成) は EOR を活性化しない

次に、小胞体ストレスに反応するもう一つの経路である EOR 経路の活性と AT(C95R)の過剰発現 (RB の形成) との関連性について検討した。

以前一部のニューロセルピン及び $\alpha 1$ アンチトリプシン変異体 (E342K) が、小胞体に蓄積し NF- κ B を活性化するにも関わらず、UPR を誘導しないことが示されていることから⁶¹⁾、AT(C95R)の蓄積が NF- κ B を活性化するかどうか検討した。

Fig. 14 同様に 3 種類の細胞を用いた。Tet-On system により AT(C95R)が過剰発現し RB が形成されるような条件に細胞を培養し、核抽出液と細胞質抽出液をそれぞれ調整して、核抽出液では NF- κ B を構成する p65 の量を、細胞質抽出液では I κ B の量を Immunoblot 法により解析した。また、positive control として EOR 経路を活性化させる TNF- α (1 μ g/ml)で細胞を 3 min 処理した。その結果、TNF- α 処理条件では増加が確認された p65 が、AT(C95R)を 48 及び 72 h 発現した CHO 細胞の核抽出液中で増加していなかった。また、同時取得の細胞質抽出液において、顕著な I κ B の分解はなかったことも確認している (data not shown)。以上より、AT(C95R)が過剰発現し RB が形成されるような条件下において、NF- κ B を構成する p65 の核内移行や細胞質における I κ B の分解が確認されなかったため、EOR 経路は活性化されていないことが示唆された。(Fig. 21)

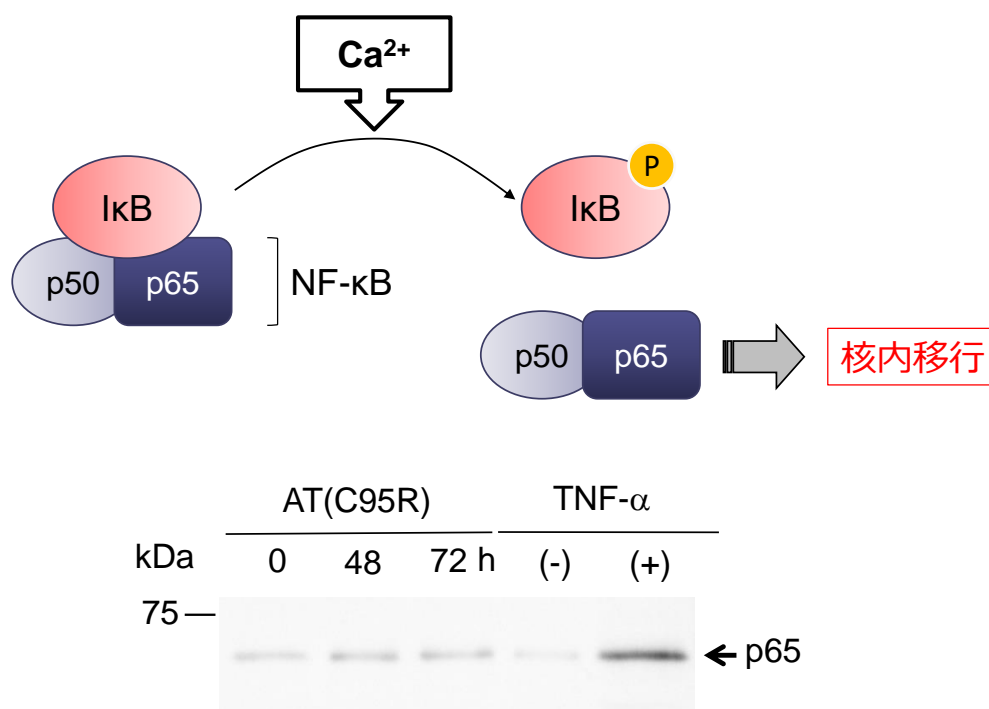


Fig. 21 AT(C95R) 蓄積が EOR へ与える影響

NF- κ B p65 の Immunoblot を行った。AT(C95R)発現する CHO 細胞を、Dox 存在下で 0、48 及び 72 h で培養し、核抽出液中の p65 を検出した。positive control として、control CHO 細胞を TNF- α (1 μ g/mL) で 3 分処置した。

2-2-4 AT(C95R)の分解経路の解析

本試験系に用いている CHO 細胞では、AT(C95R)の増加に関わらず小胞体ストレス応答が見られなかったことから、AT(C95R)に対する分解経路の反応を調べた。Dox 添加 12 もしくは 72 h 後 (Tet-On 12 もしくは 72 h) に、プロテアソーム阻害剤 MG132 (5 μ M)、オートファジー誘導剤 rapamycin (100 nM) 及びオートファジー阻害剤として 3-methyladenine (3MA) (5 mM) 入り培地と括弧内が最終濃度となるよう交換し、24 h 培養した。その後細胞を回収し、Immunoblot を行った。

その結果、細胞全体の小胞体が通常の網目構造を示す Tet-On 12 h では、MG132 処理は AT(C95R)量が 2 倍程度多かったが、rapamycin 及び 3MA は影響がなかった。このことから、小胞体が通常の網目構造を示す段階では、プロテアソームが主要な分解経路であることが示唆された。一方、RB が多く形成される Tet-On 72 h における AT(C95R)量は、MG132 及び 3MA 処理により増加し、rapamycin 処理により減少した。よって、RB が増加した条件下の CHO 細胞において、AT(C95R)の分解にプロテアソーム及びオートファジーの両分解系が関与していることが示唆された。(Fig. 22)

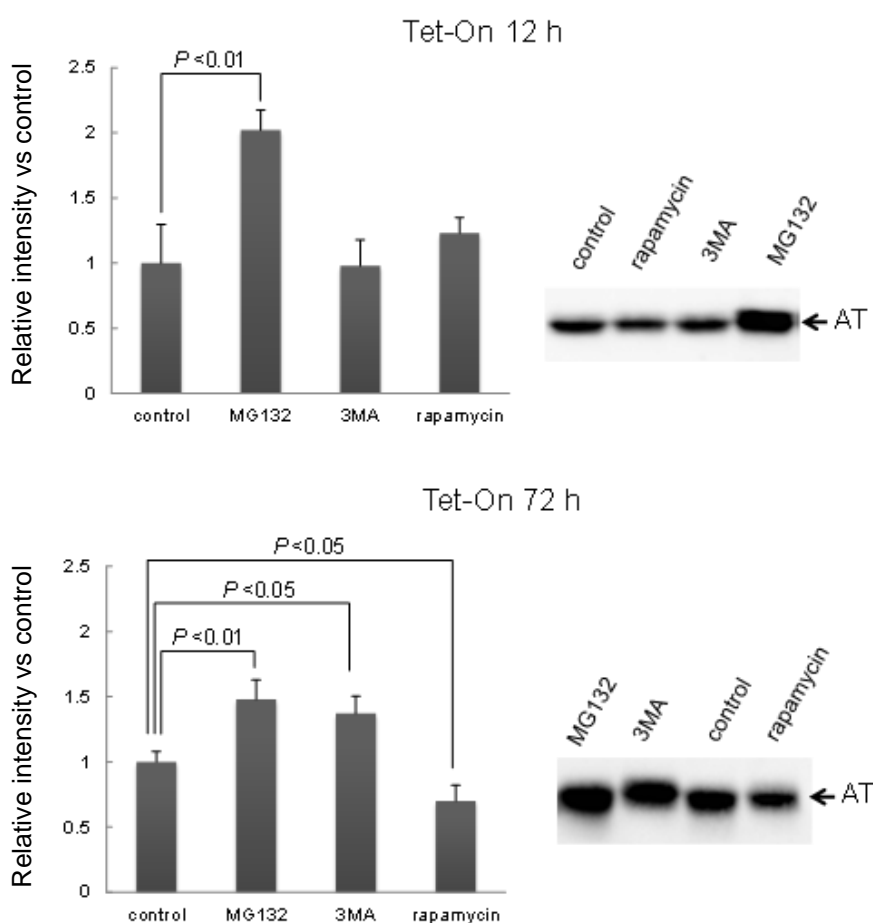


Fig. 22 AT(C95R)発現における分解経路
AT(C95R)を発現する CHO 細胞を、Dox 存在下で 12 または 72 h 培養した。培地交換により Dox を除去し、MG132 (5 μ M) , rapamycin (100 nM) 及び 3MA (5 mM) を 24 h 処置した。各レーン 100 μ g 泳動した。LAS1000 を用いて測定し、未処置 (control) に対する強度比を左に示した。独立した 3 試験から mean \pm S.D.を算出した。それぞれの有意差は、Student's t-test により検定した。(p<0.05; p<0.01).

2-3. 考察

真核細胞において、小胞体は細胞外へ分泌されるタンパク質の生合成の場である。正常に折りたたまれたタンパク質はゴルジ装置に輸送されるが、異常タンパク質は小胞体から細胞質に逆輸送され、プロテアソームを介して分解される。また小胞体において、アミノ酸変異などにより正常なフォールディングや修飾が行われなかった異常タンパク質や過剰発現タンパク質が蓄積するなど小胞体ストレスが生じると、UPR が活性化されタンパク質の折りたたみを助ける分子シャペロンの発現誘導、タンパク質の翻訳抑制、異常タンパクを分解する機構である ERAD 関連酵素の発現が促進する³⁻⁵⁾。小胞体ストレスが長時間持続し、上記の応答で小胞体の機能回復が望めない場合にはアポトーシス経路が活性化され、細胞死が起こる。これは個体レベルへの悪影響を防止していると考えられる³⁾。

一方 EOR は当初、主に感染、炎症など多数のストレスをもたらす状況において、炎症の中心的な役割を担う転写制御因子である NF- κ B の活性化を伴う経路として発見された⁵⁸⁾。

本章では、CHO 細胞の AT(C95R)に蓄積により引き起こされる小胞体ストレス応答及び分解について解析を行った。以下3点により、CHO 細胞において UPR 及び EOR は活性化されていないことが示唆された。

- ① Tet-On 72 h までに、XBP-1 mRNA のスプライシング及び eIF2 α のリン酸化は検出されなかった。(Fig. 20)
- ② Tet-On 72 h までに、核抽出液中の NF- κ B は検出されなかった。(Fig. 21)
- ③ 主要な小胞体シャペロンである Grp78、Grp98 及び PD1 は、最大で2倍以内の増加であった。(Fig. 19)

これは以前当研究室からの報告で、カルネキシンの増加が見られなかった結果と一致する²⁰⁾。Thapsigargin または TNF- α により UPR 及び EOR 活性は確認されるため (Fig. 20, 21)、CHO 細胞が小胞体ストレスに応答する能力を失っている可能性は排除されると考えられる。さらに AT(C95R)は、合成初期段階ではプロテアソームのみで分解されていたのに対し、合成後期段階ではプロテアソーム及びオートファジーにより分解されていた。(Fig. 22)

近年、Tet-On system を用いた CHO 細胞の解析として変異 α 1-antitrypsin の蓄積による小胞体ストレス応答を確認した報告がなされており⁵⁶⁾、AT(C95R)を発現する CHO 細胞を用いての研究は妥当であると考えられる。

今回 AT(C95R)を発現する CHO 細胞において、小胞体ストレス応答は活性化されなかった。その一つの可能性として、AT(C95R)は可溶性かつオリゴマーに折り

たたまれて存在しており^{20,21)}、IRE1 や PERK といったセンサータンパクから Grp78 が AT(C95R)へリクルートされる量もしくはシグナルが限定的である可能性が考えられる。

AT(C95R)は、ジスルフィド結合を担うシステイン残基を欠くため適切にフォールディングされないが、ある程度の折りたたまれた構造を維持しているのかもしれない。事実、シヨ糖密度勾配遠心法を用いた実験により、200 kDa で存在していることが示されている²¹⁾。AT(C95R)が小胞体に留まるものの UPR を誘導しない理由は、タンパク質がフォールディングしている可能性が考えられる。

興味深いことに、変異 $\alpha 1$ -antitrypsin の運命は 2 種類に分けられる⁶⁰⁾。一つは polymeric Z mutant (E342K、 α -antitrypsin Z、ATZ とも呼ばれる)型及び polymeric King's mutants (H334D)型で、これらの変異は、小胞体に不溶性ポリマーとして存在し EOR を引き起こすが UPR は起こさない⁵⁾。ATZ 研究はストレス応答に対する知見が多く報告され、Hidvegi らは、AT と同じセルピンスーパーファミリーに分類される $\alpha 1$ -antitrypsin Z (ATZ)において、Dox で ATZ の産生を誘導する HeLa 細胞株やヒト ATZ を過剰発現しているトランスジェニックマウス肝臓を用い、ATZ の小胞体蓄積は BiP などの発現は増加させないが、caspase-4 や caspase-12 を活性化することを報告している⁵⁵⁾。ただしこの培養細胞系は 5~28 日を要する。ATZ の場合は小胞体内で多量体を形成して凝集していることから、BiP のリクルートが起こらず UPR に結びつかないのかもしれない。なお、ATZ も RB 様構造体を形成する³⁰⁾。

ATZ は EOR についても研究が進められている。Lawless らは ATZ を CHO 細胞や HEK293 細胞に一過性に発現させることにより UPR は誘導されないが EOR が誘導されることを報告している⁶⁰⁾。また EOR の誘導には長時間の ATZ の発現誘導が必要であることから⁵⁵⁾、EOR には小胞体内の異常タンパク質の発現量の多さと凝集性が必要であると推察される。

変異 $\alpha 1$ -antitrypsin の運命のもう一つは、null Hong Kong (NHK)型 (C 末側 61 アミノ酸がフレームシフトにより欠失⁶¹⁾) は適切にフォールディングされず、ポリマー形成はしないが、UPR を活性化する¹⁹⁾。ニューロセルピンの研究では、UPR の代わりに NF- κ B 経路を活性化する⁵⁶⁾。これらの報告より、可溶性オリゴマータイプの変異型 AT(C95R)は、CHO 細胞における UPR 及び EOR に関してはサイレントであると考えられる。

また今回の研究で、RB 形成段階の小胞体内 AT(C95R)がオートファジーにより分解されることを初めて示した。RB の形成が多く見られる Tet-On 72 h という AT(C95R)を大量発現させた条件下で、AT(C95R)の分解にプロテアソームだけではなくオートファジーが関わっていることが明らかとなった (Fig. 22)。オートフ

オートファジーは新たな膜系が細胞内に出現し、それが細胞質の一部を隔離して分解するというきわめてダイナミックな現象であり、1993年 Ohsumi らにより必須の遺伝子群 (ATG) が同定されたことにより^{62,63}、その解明が急速に進んできた。その後は、プロテアソームがユビキチンにより認識されたタンパク質の選択的分解、オートファジーは細胞の恒常性維持を担う大雑把な (バルク) 分解を担うと考えられてきたが、近年オートファジーの選択性の高さが相次いで報告されてきている^{64,65}。

今回、RB を形成していない Tet-On 12 h の条件下では、分解にオートファジーが関わることはなく、プロテアソームのみによって分解が行われていた。この現象は、ヒト肝がん由来細胞である HuH-7 に AT(C95R) を発現させた細胞や、Tet-On system ではない AT(C95R) 安定過剰発現 CHO 細胞でも確認されている⁶⁶。

変異タンパクと分解の関連を示唆した研究では、前述の ATZ や変異型 dysferlin の蓄積によりユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の両方が亢進され分解に関わるという報告^{67,68}や、ハンチントン舞踏病の原因タンパクとされるポリグルタミンの異常蓄積により、小胞体ストレス (PERK/ eIF2 α リン酸化経路) が活性化され、オートファジーが誘導されるという報告等がある⁶⁹。細胞質に生成されたタンパク質凝集体はユビキチン・プロテアソーム系の阻害となることが知られており⁷⁰、RB が細胞内にかなりの体積を占めるようになり、第二章に示したように密に詰まる構造をとることで、ユビキチン・プロテアソーム系の分解経路に破綻をきたし、不足した分解機能を補う形でオートファジーが誘導される可能性も否定できない。

具体的にどのようなタンパクの特性が UPR 及び EOR の活性化に重要になるか、また分解経路の決定に必要となるか、今後の研究課題であると考えられる。

第3章 総括

本研究により、AT(C95R)-GFPにより形成されるRBの細胞内動態及び応答機構について、以下の結果が得られた。

- (1) RBは、これまで考えられてきたような小胞体が膨れた構造ではなく、小胞体の管状ネットワーク構造が上部に向かうに従い密度が高くなる、巨大な皿状構造であることが明らかとなった。
- (2) AT(C95R)-GFPは小胞体の管状構造より大きい半径の分子を含むため、網目状態となっている狭い管状構造から排除されている可能性が示された。よってAT(C95R)-GFPは、小胞体がシート構造から管状構造に移行するような通常の形態変化を阻害し、RB構造の形成につながっていると考えられる。
- (3) CHO細胞において、AT(C95R)の過剰発現によりRBが形成されている状態でもUPR及びEORは誘導されていなかった。
- (4) AT(C95R)は、RBを形成しないTet-On初期段階ではユビキチン・プロテアソーム系のみで分解されていた。一方RBを多数形成するTet-On 72 hでは、ユビキチン・プロテアソーム系のみならず、オートファジー・リソソーム系でも分解されていた。

本研究から、AT(C95R)により形成されるRBのユニークな構造及び細胞応答を提唱した。まず、RBは小胞体が単純に膨れたわけではなく、ネットワークが密に集まり上部に向かう（細胞内に極性を持つ）ユニークな構造であり、分裂時でも維持されていた。またその形成メカニズムは、AT(C95R)-GFPの分子サイズが小胞体の管状構造より大きく、小胞体のシート構造から管状構造に移行するような通常の形態変化を阻害していることが一因と考えられた。

次に、AT(C95R)が蓄積しRBを形成している際のCHO細胞の応答について解析した結果、UPR及びEORが誘導されていないことが示された。これまでのセリピンファミリータンパクの報告と併せて考えても新たな知見であり、ストレス応答については小胞体に蓄積するタンパクの特性が重要であることを示した。

最後に、RBが形成前の合成初期段階のAT(C95R)は主にプロテアソームで分解されていた一方、RBが形成される合成後期段階のAT(C95R)の分解にはオートファジーが関わっていることが初めて明らかとなった。

参考文献

1. Ellgaard, L., Morinari, M., and Helenius, A. (1999) *Science*, **286**, 1882-1888.
2. Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 181-191.
3. Hashida, K., Kitao, Y., Sudo, H., Awa, Y., Maeda, S., Mori, K., Takahashi, R., Inuma, M., Hori, O. (2012) *PLoS One*, **7**, e47950.
4. Otda, T., Takamura, T., Misu, H., Ota, T., Murata, S., Hayashi, H., Takayama, H., Kikuchi, A., Kanamori, T., Shima, K. R., Lan, F., Takeda, T., Kurita, S., Ishikura, K., Kita, Y., Iwayama, K., Kato, K., Uno, M., Takeshita, Y., Yamamoto, M., Tokuyama, K., Iseki, S., Tanaka, K., Kaneko, S. (2013) *Diabetes*, **3**, 811-824.
5. Cao S. S., et al (2013) *Gastroenterology*, **144**, 989-1000.
6. Pathak, R. K., Luskey, K. L., and Anderson, R. G. (1986) *J. Cell Biol.*, **102**, 2158-2168.
7. Profant, D. A., Roberts, C. J., Koning, A. J., and Wright, R. L. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3409-3423.
8. Vergeres, G., Yen, T. S. B., Aggeler, J., Lausier, J., and Waskell, L. (1993) *J. Cell Biol.*, **106**, 249-259.
9. Snapp, E. L., Hegde, R. S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N., and Lippincott-Schwartz, J. (2003) *J. Cell Biol.*, **163**, 257-269.
10. Yamamoto, A., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1996) *J. Cell Sci.*, **109**, 1727-1738.
11. Valetti, C., Grossi, C. E., Milstein, C., and Sitia, R. (1991) *J. Cell Biol.*, **115**, 983-994.
12. Lomas, D. A., Evans, D. L., Finch, J. T., and Carrell, R. W. (1992) *Nature*, 605-607.
13. Carlson, J. A., Rogers, B. B., Sifers, R. N., Hawkins, H. K., Finegold, M. J., and Woo, S. L. (1988) *J. Clin. Invest.*, **82**, 26036.
14. Umebayashi, K., Hirata, A., Fukuda, R., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. (1997) *Yeast*, **13**, 1009-1190.
15. Jonathan, H. L., Han, L., Douglas, Y., Hannah R. C., Chao, Z., Barbara, P., Kevan, M. S., Matthew M. L., and Peter, W. (2007) *Science*, **318**, 944-949.
16. Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2008) *Cell Struct. Funct.*, **33**, 75-89.
17. Egger, L., Madden, D. T., Rheme, C., Rao, R. V., and Bredesen, D. E. (2007) *Cell Death Differ.*, **14**, 1172-1180.
18. Davies M. J., Miranda E., Roussel B. D., Kaufman R. J., Marciniak S. J., Lomas D. A. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 18202-18209.

19. Ordóñez A., Snapp E. L., Tan L., Miranda E., Marciniak S. J., Lomas D. A. (2013) *Hepatology*, **57**, 2049–2060.
20. Ozawa, T., Takikawa, Y., Niiya, K., Fujiwara, T., Suzuki, K., Sato, S., Sakuragawa, N. (1997) *Thromb. Haemost.*, **77**, 403.
21. Tanaka, Y., Ueda, K., Ozawa, T., Sakuragawa, N., Yokota, S., Sato, R., Okamura, S., Morita, M., and Imanaka, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 51058-51067.
22. Tanaka, Y., Ueda, K., Ozawa, T., Kitajima, I., Okamura, S., Morita, M., Yokota, S., and Imanaka, T. (2005) *J. Biochem.*, **137**, 273-285.
23. Braakman I., Bulleid N. J. (2011) *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 71–99.
24. Hegde R. S., Ploegh H. L. (2010) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 437–446.
25. Kopito R. R. (2000) *Trends Cell Biol.*, **10**, 524–530.
26. Kopito R. R., Sitia R. (2000) *EMBO Rep.*, **1**, 225–231.
27. Schweitzer, P. A., Taylor, S. E., Shultz, L. D. (1991) *J. Cell Biol.*, **114**, 35–43.
28. Chin, D. J., Luskey, K.L., Anderson, R. G., Faust, J. R., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 1185–1189.
29. Valetti, C., Grossi, C. E., Milstein, C., Sitia, R. (1991) *J. Cell Biol.*, **115**, 983–994.
30. Alanen, A., Pira, U., Colman, A., Franklin, R. M. (1987) *J. Immunol.*, **17**, 1573–1577.
31. Lomas, D. A., Li-Evans, D., Finch, J. T., Carrell, R. W. (1992) *Nature*, **357**, 605–607.
32. Carlson, J. A., Rogers, B. B., Sifers, R. N., Finegold, M. J., Clift, S. M., DeMayo, F. J., Bullock, D. W., Woo, S. L. (1989) *J. Clin. Invest.*, **83**, 1183–1190.
33. Hu, J., Shibata, Y., Voss, C., Shemesh, T., Li, Z., Coughlin, M., Kozlov, M. M., Rapoport, T. A., Prinz, W. A. (2008) *Science*, **319**, 1247–1250.
34. Shibata, Y., Voeltz, G. K., Rapoport, T. A. (2006) *Cell*, **126**, 435–439.
35. Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M., Rapoport, T. A. (2006) *Cell*, **124**, 573–586.
36. Hu, J., Prinz, W. A., Rapoport, T. A. (2011) *Cell*, **147**, 1226–1231.
37. Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W. A., Palazzo, A. F., Kozlov, M. M., Rapoport, T. A. (2010) *Cell*, **143**, 774–788.
38. Mori, K. (2000) *Cell*, **101**, 451-454
39. Valetti, C., Grossi, C. E., Milstein, C., and Sitia, R. (1991) *J. Cell Biol.*, **115**, 983-994.
40. Mattioli, L., Anelli, T., Fagioli, C., Tacchetti, C., Sitia, R., and Valetti, C. (2006) *J. Cell Sci.*, **119**, 2532-2541.
41. Nagata, H., Wada, I., Jia, Y. J., and Kanoh, H. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 302-316.
42. Jacobson, K., Wu, E., Poste, G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.*, **433**, 215-222.
43. Suzuki, T., Arai, S., Takeuchi, M., Sakurai, C., Ebana, H., Higashi, T., Hashimoto,

- H., Hatsuzawa, K., Wada, I. (2012) *PLoS ONE*, **7**, e37551.
44. Gendron, P. O., Avaltroni, F., Wilkinson, K. J. (2008) *J. Fluoresc.*, **18**, 1093–1101.
45. 平成 18 年度 上田由美子 修士論文
46. Kano, F., Kondo, H., Yamamoto, A., Tanaka, A. R., Hosokawa, N., Nagata, K., Murata, M. (2005) *Genes Cells*, **10**, 333–344.
47. Pendin, D., McNew, J. A., Daga, A. (2011) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23**, 435–442.
48. Kamada, A., Nagaya, H., Tamura, T., Kinjo, M., Jin, H. Y., Yamashita, T., Jimbow, K., Kanoh, H., Wada, I. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 21533–21542.
49. Nagaya, H., Tamura, T., Higa-Nishiyama, A., Ohashi, K., Takeuchi, M., Hashimoto, H., Hatsuzawa, K., Kinjo, M., Okada, T., Wada, I. (2008) *J. Cell Biol.*, **180**, 129–143
50. Shibata, Y., Voss, C., Rist, J. M., Hu, J., Rapoport, T. A., Prinz, W. A., Voeltz, G. K. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 18892–18904.
51. Walter, P., Ron, D. (2011) *Science*, **334**, 1081–1086.
52. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. (2001) *Cell*, **107**, 881–891.
53. Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., Ron, D. (2000) *Mol. Cell*, **5**, 897–904.
54. Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., Ron, D. (2002) *Nature*, **415**, 92–96.
55. Hidvegi, T., Schmidt, B. Z., Hale, P., Perlmutter, D. H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 39002–39015.
56. Davies, M. J., Miranda, E., Roussel, B. D., Kaufman, R. J., Marciniak, S. J., Lomas D. A. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 18202–18209.
57. Lowry, O. H. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
58. Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G., and Karin, M. (2008) *Nature*, **453**, 807–811.
59. Lomas, D. A., Evans, D. L., Finch, J. T., and Carrell, R. W. (1992) *Nature*, 605–607.
60. Lawless, W. M., Green, C. M., Mulgrew, A., Taggart, C. C., O’Neill, S. J., and McElvaney, N. G. (2004) *J. Immunol.*, **172**, 5722–5726.
61. Sifers, R. N., Brashears-Macatee, S., Kidd, V. J., Muensch, H., Woo, S. L. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 7330–7335.
62. Takeshige, K., and Ohsumi, Y. (1992) *J. Cell Biol.*, **119**, 301–311.
63. Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993) *FEBS Lett.*, **333**, 169–174.
64. Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I. J., Kiel, J. A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1763**, 1767–75.
65. Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., Lemasters, J. J. (2007) *Arch. Biochem. Biophys.*, **15**,

245-53.

66. 平成 18 年度 石田雅人 修士論文

67. Eriko, F., Yoriko, K., Atsushi, I., Hiromichi, K., Akifumi, M., Chie, M., Yukiko, K. H., and Takashi, M. (2007) *Human Mol. Gene.*, **16**, 618-629.

68. Bence, N. F., Sampat, R. M., and Kopito, R. R. (2001) *Science*, **292**, 1552-1555.

69. Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007) *Cell Death Differ.*, **14**, 230-239.

70. Kamimoto, T., Shoji, S., Hidvegi, T., Mizushima, N., Umebayashi, K., Perlmutter, D.H., and Yoshimori, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 4467-4476.

謝辞

本博士論文は、筆者が本学 分子細胞機能学研究室及び福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門において行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました本学今中常雄教授に深く感謝の意を表します。また、**FRAP** や流体力学的半径算出等重要なデータ取得のご支援ご指導賜りました福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門 和田郁夫教授に深謝いたします。本論文をご精読頂き有用なコメントを頂きました本学酒井秀紀教授，門脇真教授に深謝致します。実験の実施にあたり、多岐にわたるご助言ご支援賜りました本学守田雅志准教授及び川口甲介博士に深謝いたします。**EOR** 経路の活性を解析する実験等のご指導を賜りました本学櫻井宏明教授に深謝いたします。また一部の実験を実施していただいた渡邊由美子氏、大久保純氏、井上健吾氏に感謝いたします。研究その他手厚くサポートしていただいた研究室の皆さまに心より感謝しております。最後に、研究をサポートしてくれた家族に感謝します。