

氏 名 きむら こうじ
木村 耕士

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 富生命博甲第77号

学位授与年月日 平成28年3月4日

専攻名 生体情報システム科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第3項該当

学位論文題目 Dynamics and endoplasmic reticulum stress response of
Russell body formed by mutant antithrombin
(変異型アンチトロンビンにより形成される Russell body の
細胞内動態と小胞体ストレス応答)

論文審査委員

(主査)	教授 今中 常雄	(指導教員)
(副査)	教授 酒井 秀紀	
(副査)	教授 門脇 真	

【学位論文内容の要旨】

変異型アンチトロンビンにより形成される Russell body の細胞内動態と 小胞体ストレス応答

分子細胞機能学研究室 木村耕士

小胞体は分泌タンパク質の生合成と成熟化に関与している。新たに生合成された分泌タンパク質は小胞体内に輸送され、糖鎖修飾等を受け正しく folding される。その後、これらのタンパク質は、小胞体の exit site で小胞内に集積され、輸送小胞としてゴルジ装置に輸送され、さらに糖鎖修飾を受ける。一方、分泌タンパク質がアミノ酸変異等により正しく folding されない場合には、変異タンパク質は小胞体に留まり、その後、細胞質に排出されプロテアソームで分解される。しかしながら変異タンパク質の量等によりプロテアソームでの分解が不十分場合、変異タンパク質は細胞質で凝集体を形成し、神経変性疾患の原因となる。

一方、変異タンパク質が小胞体から排出されず小胞体内に蓄積すると、小胞体の拡大を伴う Russell body (RB) と呼ばれる構造体が出現する。Sitia らは、形質細胞において変異型 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ことを見出し、1890 年に Russell が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 RB と命名した。同様の構造体は、変異型 $\alpha 1$ -アンチトリプシンを発現する肝細胞や、トランスジェニックマウス肝臓でも観察されている。RB は、misfolding したタンパク質が過剰に小胞体に蓄積することで小胞体の拡張により形成されると推定されているが、その形成過程や細胞内動態の詳細は不明である。

当研究室では、アンチトロンビン (AT) 欠乏症患者より発見された、AT 変異体 AT(C95R) の細胞内動態を解析してきた。AT(C95R) を CHO 細胞に安定過剰発現させると、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。そこで本研究では、変異型 AT(C95R) により形成される RB の細胞内動態や細胞内ストレス応答を明らかにすることを目的として、CHO 細胞に AT(C95R)-GFP を発現させ、Live-cell imaging により RB の細胞内動態を解析した。さらに、RB 形成と細胞応答に関して、AT(C95R) の小胞体蓄積に伴う unfolded protein response、ER overload response 及び AT(C95R) の分解経路について解析した。

1. RB の形成とその細胞内動態¹⁾

RB の形成過程、詳細な構造を解析するとともに細胞内動態を可視化するため、Doxycycline (Dox) により目的タンパクの発現調節が可能な Tet-On CHO 細胞を用いて、AT(C95R)-GFP を安定発現する CHO 細胞を作製した。Dox の添加により AT(C95R)-GFP の生合成を開始させると、当初 AT(C95R)-GFP は細胞内で網状に分布していたが、24 時間後には球状の RB が出現し、48 時間後には約 70% の細胞に RB が認められた。Dox 添加後 48 時間、72 時間の AT(C95R)-GFP の細胞内局在性を小胞体、ゴルジ装置、リソ

ソーム、ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC)のマーカー抗体の分布と比較することにより、AT(C95R)-GFP は小胞体ネットワークと RB に局在することが示唆された。さらに RB の詳細な構造を解析するため、RB の下側から上に向かって 0.4 μ m 間隔でスライスし観察した。その結果、RB の下部から上部に向かうにつれて管状の構造が密に詰まっていること、小胞体の exit site に存在する膜タンパク質 Sec31 が RB 内部に存在することより、RB は小胞体が単純に拡大した構造体ではなく、管状の小胞体が密に詰まった複雑な構造体であることが示唆された。

RB と小胞体ネットワークとの連続性を fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 及び fluorescence loss in photobleaching (FLIP) 法で解析した。その結果、RB 全体の photobleaching では GFP の蛍光が回復しないこと、RB に近接した小胞体ネットワークの photobleaching を 60 min 継続しても RB の蛍光が消失しないことより、RB は一部 ER との連続性をもつが、小胞体ネットワーク間との流動性の低い独立した構造体であることが示唆された。なお、RB は小胞体が小胞化する細胞分裂時にもその構造が維持されていること、RB にはリボソームが局在し、タンパク質の生成合成が行われていることが示された。最近、小胞体構造を規定するタンパク質の 1 つとして DR1/Yop1p が同定された。DP1 を過剰発現させると、15-20 nm の小胞体管状構造が形成される。そこで AT(C95R)-GFP を安定発現している CHO 細胞に mCherry-DP1 と pss-cfSGFP2 (α 1-アンチトリプシンのシグナル配列を持ち、Cys 残基を改変した単量体 GFP) を発現させると、AT(C95R)-GFP は mCherry-DP1 が局在する細胞周辺の小胞体から排除された。一方、pss-cfSGFP2 は mCherry-DP1 と一致する分布を示した。また cross-correlation of the half-split fluorescence signal の解析により流体力学的半径を算出すると、AT(C95R)-GFP の半径約 28.7 nm の大きな oligomer 構造と約 3.3 nm の構造体として存在している可能性が示唆された。小胞体はシート状構造と管状構造の動的状態を繰り返しているが、AT(C95R)-GFP の oligomer 構造が管状小胞体内に蓄積し、小胞体のシート構造から管状構造に移行する形態変化を阻害することで RB が形成される可能性が示唆された。

2. RB 形成と小胞体ストレス応答と AT(C95R)の分解系²⁾

正常に折り畳まれなかったタンパク質 (unfolded protein) が小胞体に蓄積すると、小胞体の恒常性を維持するため、小胞体ストレスを回避するためのシグナル伝達経路が作動する。その 1 つとして unfolded protein response (UPR) と呼ばれる機構が知られている。実際、unfolded protein が小胞体に増加すると、小胞体膜上の 3 種のセンサー分子、double-strand RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK)、inositol-requiring kinase/endoribonuclease 1 α (IRE1 α)、activating transcription factor 6 (ATF6) が活性化され、新規タンパク生合成の中止、小胞体分子の転写促進を介して、unfolded protein によるストレスが回避される。またもう 1 つのストレス応答として、ER-overload response (EOR) が知られている。EOR では、小胞体内での重合した不溶性変異タンパク質の蓄積により、Ca²⁺が細胞質に遊離され、NF- κ B を介した標的遺伝子の活性化が起こ

る。

そこで本研究では、AT(C95R)が小胞体に蓄積し RB が形成される状態での UPR ならびに EOR 応答を、変異型 AT(C95R)を安定過剰発現する Tet-On CHO 細胞を用いて解析した。UPR のうち PERK ならびに IRE1 α の活性化は、eIF2 α のリン酸化を immunoblot 法で、XBP-1 mRNA の splicing を RT-PCR 法で解析した。一方、EOR は NF- κ B を構成する p65 の核内移行を immunoblot 法により解析した。野生型 AT、変異型 AT(C95R)を発現細胞に Dox 添加後 12-72 時間培養しストレス応答を解析したが、eIF2 α のリン酸化、XBP-1 mRNA の splicing、p65 の核内移行は観察されなかった。一方、上記細胞の thapsigargin 処理では eIF2 α のリン酸化や XBP-1 mRNA の splicing が検出され、TNF α 処理では p65 の核移行が起こることより、細胞自体はストレス応答できることを確認した。一方、AT(C95R)の分解系は、プロテアソーム阻害剤 MG132、オートファジー誘導剤 rapamycin、オートファジー阻害剤 3-methyladenine (3MA) を用いて解析した。その結果、AT(C95R)は合成初期段階にはプロテアソームのみで分解され、RB 形成段階ではオートファジーによっても分解が行われていることが明らかになった。以上の結果より、可溶性である AT(C95R) oligomer の蓄積では UPR ならびに EOR が“silent”な状態であること、RB はオートファジーで分解されることが示唆された。

3. 総括

小胞体に変異タンパク質が蓄積して形成される RB の一つの形態として、下部に小胞体ネットワーク構造を維持しつつ上部に向かうにつれて密になる（極性を持つ）ユニークな構造体があることが示唆された。またこの構造体形成には変異タンパク質のサイズが影響すると推測された。さらに小胞体に蓄積したタンパク質の特性により、UPR や EOR の応答が異なる可能性が示唆された。RB の分解にオートファジーが関与することが初めて示された。

【参考文献】

- 1) Kimura K., Kawaguchi K., Ueda Y., Arai S., Morita M., Imanaka T., and Wada I.: Characterization of Russell bodies accumulating the mutant antithrombin that derived from endoplasmic reticulum. (2015) Biol. Pharm. Bull., **38**, 852-861.
- 2) Kimura K., Inoue K., Okubo J., Ueda Y., Kawaguchi K., Sakurai H., Wada I., Morita M., and Imanaka T.: Endoplasmic reticulum stress response and mutant protein degradation in CHO cells accumulating antithrombin (C95R) in Russell bodies. (2015) Biol. Pharm. Bull., **38**, 1980-1984.

【論文審査の結果の要旨】

小胞体は、生合成された分泌タンパク質を正しく **fold**ing し、ゴルジ装置へ輸送する役割を担っている。しかしながら、分泌タンパク質がアミノ酸変異等により正しく **fold**ing されない場合には、変異タンパク質は小胞体に留まり、その後、細胞質に排出されプロテアソームで分解される。一方、変異タンパク質が小胞体から排出されず小胞体内に蓄積すると、小胞体の拡大を伴う **Russell body (RB)** と呼ばれる構造体が出現する。**RB** は **misfold**ing したタンパク質が過剰に小胞体に蓄積することで、小胞体が拡張し形成されると推定されているが、その形成過程や細胞内動態の詳細は不明である。木村耕士氏は、アンチトロンビン (**AT (C95R)**) をモデルタンパク質として **CHO** 細胞に安定過剰発現させ、**RB** の細胞内動態と **AT(C95R)** の小胞体蓄積に伴うストレス応答ならびに **AT(C95R)** の分解経路について新たな知見を得た。本学位論文の内容と審査結果は以下の通りである。

1. **RB** の形成とその細胞内動態の解析

RB の形成過程と詳細な構造を解析するとともに細胞内動態を可視化することを目的として、**Doxycycline (Dox)** により **AT(C95R)** の発現を調節する **Tet-On CHO** 細胞を作製した。**Dox** 添加後 48 時間、72 時間の **AT(C95R)-GFP** の細胞内局在性を各種オルガネラのマーカータンパク質の分布と比較することにより、**AT(C95R)-GFP** は小胞体ネットワークと **RB** に局在することを確認した。さらに **RB** の詳細な構造を解析するため、**RB** の下側から上に向かって 0.4 mm 間隔でスライスすることにより、**RB** が下部から上部に向かうにつれて管状の構造が密に詰まっていること、小胞体の **exit site** に存在する膜タンパク質 **Sec31** が **RB** 内部に存在することより、**RB** は小胞体が単純に拡大した構造体ではなく、管状の小胞体が密に詰まった複雑な構造体であることを示した。さらに、**RB** と小胞体ネットワークとの連続性を **fluorescence recovery after photobleaching** 法及び **fluorescence loss in photobleaching** 法で解析し、**RB** は一部 **ER** との連続性をもつが、小胞体ネットワーク間との流動性が低い独立した構造体であることを示した。なお、**RB** は小胞体が小胞化する細胞分裂時にもその構造が維持されていること、**RB** にはリボソームが局在し、タンパク質の生合成が行われていることを明らかにした。また **half-split fluorescence signal** の相互相関を解析することにより、**AT(C95R)-GFP** の流体力学的半径を算出し、半径約 28.7 nm の大きな **oligomer** 構造と約 3.3 nm の構造体として存在することを示唆した。小胞体はシート状構造と管状構造の動的状態を繰り返しているが、**AT(C95R)-GFP** の **oligomer** 構造が管状小胞体内に蓄積し、小胞体のシート構造から管状構造に移行する形態変化を阻害することで **RB** が形成される可能性を提示した。

2. **RB** 形成と小胞体ストレス応答と **AT(C95R)-GFP** の分解系

正常に **fold**ing されなかったタンパク質 (**unfolded protein**) が小胞体に蓄積すると、小胞体の恒常性を維持するため **unfolded protein response (UPR)** とよばれるシグナルが作動する。またもう 1 つのストレス応答として、**ER-overload response (EOR)** が知られている。

EOR では、小胞体内での重合した不溶性変異タンパク質の蓄積により、Ca²⁺が細胞質に遊離され、NF-κB を介した標的遺伝子の活性化が起こる。

そこでAT(C95R)が小胞体に蓄積しRBが形成される状態でのUPRならびにEOR応答を、変異型 AT(C95R)を安定過剰発現する Tet-On CHO 細胞を用いて解析した。UPR のうち PERK ならびに IRE1αの活性化は、eIF2αのリン酸化を immunoblot 法で、XBP-1 mRNA の splicing を RT-PCR 法で解析した。EOR は NF-κB を構成する p65 の核内移行を immunoblot 法により解析した。野生型 AT、変異型 AT(C95R)発現細胞に Dox 添加後 12-72 時間培養しストレス応答を解析したが、eIF2αのリン酸化、XBP-1 mRNA の splicing、p65 の核内移行は観察されなかった。一方、上記細胞の thapsigargin 処理では eIF2αのリン酸化や XBP-1 mRNA の splicing が検出され、TNFα処理では p65 の核移行が起こることより、細胞自体はストレス応答できることを確認した。一方、AT(C95R)の分解系は、プロテアソーム阻害剤 MG132、オートファジー誘導剤 rapamycin、オートファジー阻害剤 3-methyladenine を用いて解析した。その結果、AT(C95R) は合成初期段階にはプロテアソームのみで分解され、RB 形成段階ではオートファジーによっても分解が行われていることが明らかになった。以上の結果より、可溶性である AT(C95R) oligomer の蓄積では UPR ならびに EOR が“silent”な状態であること、RB はオートファジーで分解されることをはじめ示した。

以上のように申請者は、小胞体に変異タンパク質が蓄積して形成される RB の一つの形態として、下部に小胞体ネットワーク構造を維持しつつ上部に向かうにつれて密になる（極性を持つ）ユニークな構造体であることを明らかにした。またこの構造体形成には変異タンパク質のサイズが影響する可能性を示した。さらに小胞体に蓄積したタンパク質の特性により、UPR や ROR の応答が異なる可能性が示唆された。RB の分解にオートファジーが関与することが初めて示された。これらの研究は国際学術誌に掲載され、国内学で高く評価されている。主査および副査は、木村耕士氏に口頭試問を行うとともに、論文内容について審査し、博士（薬学）を授与するに値すると判定した。