



蛋白質の合成・成熟・品質管理を基盤とした分子生物学・細胞工学的研究

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 教授 河野 憲 二

蛋白質はDNAから転写、翻訳され合成されることは周知の事実であるが、それで100%の生理機能を持つわけではない。蛋白質は翻訳過程でさまざまな修飾を受け、その後正しい立体構造をとり、適切な場に輸送されて初めて機能する。細胞にはこのような蛋白質の合成・成熟過程が正しく進行しているかどうかを見極め、異常蛋白質が生じた場合にはそれらを適切に処理する品質管理機構が備わっている。近年明らかにされてきた小胞体ストレス応答は、その品質管理機構の代表的なシステムであり、分泌経路の蛋白質の合成・成熟・分解を統合的に調整し細胞の生存を保証する役割を持っている(図1)。この品質管理機構を、分子・細胞レベルで理解することは、生命の基本的な理解に通じるだけでなく、構造異常蛋白質により生じる疾患原因の究明や治療、また微生物や細胞を用いた蛋白質の効率良い生産への応用にもたいへん有用である。また、筆者は蛋白質合成を特異的に阻害するジフテリア毒素とその受容体(ヒトHB-EGF)を利用することにより、動物個体の特定の細胞のみを任意の時期にロックアウトできるTRECK法を開発した。TRECK法はヒト疾患モデル動物の作製や細胞機能解析、移植再生研究に極めて有用な方法である。以下にその研究成果を概

説する。

1. 小胞体ストレス応答機構に関する研究

(1) 小胞体に蓄積した構造異常蛋白質を感知する分子機構

小胞体に異常蛋白質が蓄積したことを感知するセンサーとして、出芽酵母のIRE1遺伝子が同定された。この蛋白質はN末側を小胞体内腔にC末側をサイトゾル側に向けたI型の膜貫通蛋白質で、C末側のエフェクター領域はキナーゼとRNase両者の活性を持つたいへんユニークな蛋白質である(図1)。その構造からN末側で異常蛋白質を感知すると予想されるが、どのように感知しているのかは全くわかっていなかった。筆者らは、Ire1は通常BiP(binding protein: 小胞体のHsp70)と結合し不活化状態にあるが、ストレス下では速やかにBiPを解離し活性化される現象を見いだした。これはBiPがIre1を負に制御していることを示している。さらにN末側の変異体の詳細な解析から、小胞体内腔側はストレス感知に必須であるコア領域とそれ以外の調節領域とに分けられること、BiP結合領域は膜貫通領域に近い調節領域にあること、さらにIre1からBiPが解離するとIre1のクラスター形成が起こること、しかしクラスター形成だけではIre1の活性化は起こらないこと、

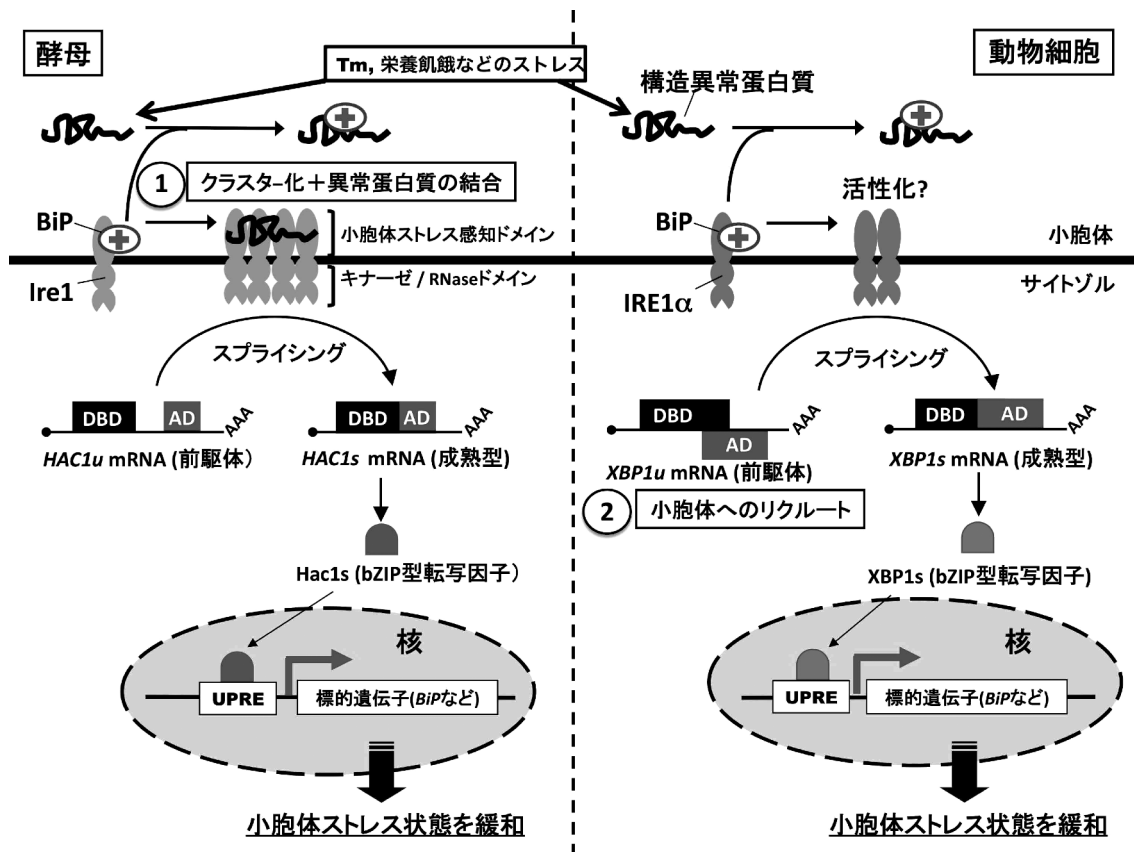


図1 小胞体ストレス応答の概略: 酵母(左)と哺乳動物(右)

Tm, ツニカマイシン; DBD, DNA binding domain; AD, transcriptional activation domain; UPRE, unfolded protein response element

コア領域には異常蛋白質凝集活性を抑える働きがあること、などを見だし、図1に示す2段階活性化制御モデルを提唱した(図1①)。すなわち、さまざまな細胞内外のストレスにより小胞体内腔に構造異常蛋白質が蓄積すると、BiPはIre1から解離し、フリーになったIre1はクラスターを形成する。さらにコア領域に異常蛋白質が直接結合することで立体構造変化を誘起し、エフェクター部のキナーゼ・RNaseが活性化、標的の*HAC1* mRNAの特殊スプライシングを引き起こす、というものである。この間、米国Peter Walter博士らのグループがコア部分の結晶化に成功しその立体構造を決定したが、その領域は筆者らが同定したコア領域とびたりと一致していた。筆者らはこのモデルが大筋において正しいことを証明してきたが、詳細に関しては現在さらに検証中である。

(2) 翻訳の一時停止によるシグナル伝達の効率化の発見

酵母における小胞体ストレス応答はIRE1-HAC1経路ただ一つで、ストレスにより活性化したIre1が標的分子の*HAC1* mRNAを特殊スプライシングし、スプライシング後に合成された転写因子Hac1が小胞体シャペロンなどを誘導しストレスを緩和する。同様の経路は哺乳動物にもIRE1 α -XBP1経路として進化的に保存されている(図1)。すなわちストレスにより活性化したIRE1 α は、標的分子である*XBPIu* mRNA (*u*はunspliced)を小胞体膜上で特殊スプライシングし、その結果活性型の転写因子XBP1s (*s*はspliced)を産生する。しかし転写因子(前駆体)をコードする*XBPIu* mRNAが、どのようにして小胞体膜上に標的化され、効率良いスプライシングを受けるのかに関しては全くの謎であった(図1②)。筆者らはこの謎解きに挑戦し、非常に洗練された*XBPIu* mRNAの小胞体膜へのリクルート機構を見出した。キーポイントは非ストレス下でも常時転写・翻訳されているXBP1u蛋白質にあった。XBP1u蛋白質はC末側に小胞体移行シグナルと一時的翻訳停止配列の二つを持っていたのである。その結果、翻訳途上のXBP1u蛋白質はリボソームを介して*XBPIu* mRNAを常に小胞体膜上に運んでいたのである。この標的化によりIRE1 α は*XBPIu* mRNAをストレス時に効率良くスプライシングし、活性型転写因子XBP1sを産生、小胞体からのシグナルを核に効率良く伝えていることが明らかとなった。この発見は、「mRNAの細胞内標的化」「翻訳途上蛋白質の生理機能」

という点で、新しい概念を生み出した。

(3) 哺乳動物個体における小胞体ストレス応答の生理的役割

小胞体の恒常性を保つために小胞体ストレス応答が重要な役割を果たしていることは、酵母や培養細胞を用いた研究により明らかにされてきた。しかし哺乳動物個体レベルでこの応答はどのような生理的役割を担っているのだろうか？酵母のIRE1遺伝子破壊株はストレス下では生育できないが、通常の培養条件下での増殖には全く影響はない。一方、マウスではIRE1 α は必須遺伝子であり、IRE1 α ノックアウト(KO)マウスは胎生致死を示す。すなわち、哺乳動物ではIRE1 α -XBP1経路は発生・分化の過程で生理的に必須な機能を担っていることになる。そこで、岩脇隆夫博士(現群馬大学)と協力して、小胞体ストレスがいつ、どこで起きているかを生体レベルでモニターできるERAI(ER stress-activated indicator)マウスを開発した。このマウスを用いることにより、膵臓のランゲルハンス島や胎盤で、常にIRE1 α が活性化していることがわかった。詳細な解析によりIRE1 α KOマウスの胎盤では、VEGF(血管内皮増殖因子)の発現が低く、その結果として血管形成が悪く、胎児への養分補給が不十分であり耐性致死が起こると考えられた。一方、膵島 β 細胞はインスリン分泌に特化した細胞で、IRE1 α がインスリンの産生・分泌や β 細胞の維持に重要であるという興味深い結果を得ている。

2. ジフテリア毒素受容体を用いたTRECK法の開発と細胞工学への展開

ジフテリア毒素(DT)は、ペプチド鎖伸長因子2(eEF2)をADPリボシル化することにより不活化し、真核生物すべての蛋白質合成を阻害する。面白いことにすべての真核生物のeEF2は*in vitro*ではDTに感受性を示すにもかかわらず、動物個体でのDT感受性は大きく異なる。ヒトやサルはDTに高感受性を示すが、マウスやラットはDT非感受性を示す。この感受性の差はDT受容体の有無に依存している。筆者は、DT感受性の差が動物種により1万倍以上も異なることに着目し、哺乳動物細胞の個体レベルでの生理機能解析のため、このDT感受性の差異を利用することを考えた。個体レベルでの特定の細胞機能や細胞系譜の解析には、狙った細胞だけを望む時期に簡便に死滅させる系の確立が必要である。特に哺乳動物では、発生後の細胞ネットワーク形成により高次生体機能を補償

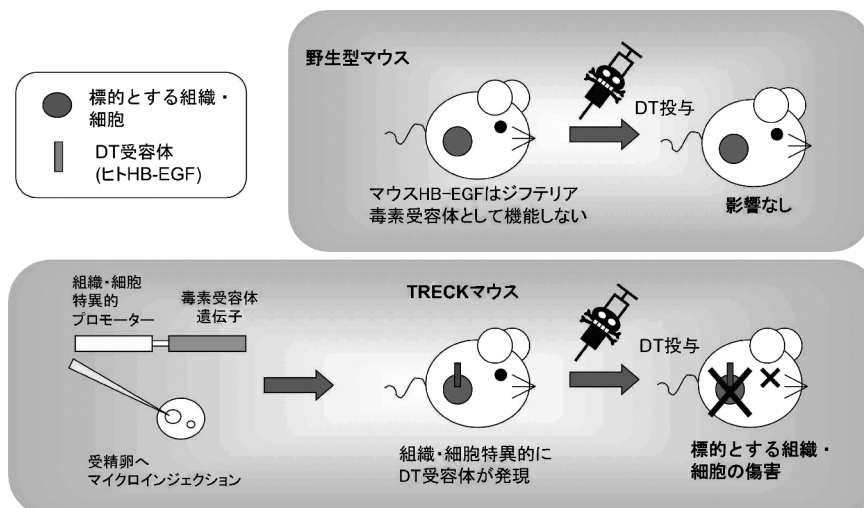


図2 TRECK法の原理

する機構があるため、頻用されている遺伝子ノックアウト法ではなく、新たな細胞ノックアウト法の開発が必要とされた。そこでヒト DT 受容体 (DTR: hHB-EGF) を細胞・組織特異的プロモーターにつないだトランスジーンを作製し、そのトランスジェニックマウスを作製した (図 2)。肝実質細胞や膵島β細胞特異的に DTR を発現するマウスを作製したところ、DT を投与しなければ全く正常な野生型形質を示すが、DT を投与すると 2~3 日以内に劇症肝炎や糖尿病を発症した。これらの疾患モデルマウスに DT 投与後、野生型マウス由来の肝細胞や膵島を移植すると病気の治癒が認められ、さらにこれらの野生型由来細胞は DT 耐性を示すことからドナー細胞を容易に識別でき、このシステムは移植再生研究にも大変有用であることが示された。本法を「毒素受容体を介した標的細胞ノックアウト法 (Toxin Receptor-mediated Cell Knockout: TRECK)」と命名した。TRECK 法は主に次の三つの研究、(i) 狙った細胞に傷害を与えることにより病気を誘発できる疾患モデルマウスやラットの作製、(ii) 細胞の生理機能の個体レベルでの解析、(iii) 細胞・組織の移植再生研究への応用、にたいへん有用であり、世界のいろいろな研究室で TRECK マウスが作製され、利用されている。

3. おわりに

以上、奈良先端科学技術大学院大学で研究室を主催してからの研究成果を中心にその概要をまとめた。小胞体ストレス応答の研究は、筆者が今から約 25 年ほど前に米国の Mary-Jane Gething, Joe Sambrook 両博士の研究室に留学中、酵母 BiP の

研究を端緒として始まったものである。しかしその研究には、筆者が東京大学農学部微生物学教室在籍中に研究したツニカマイシンが、小胞体ストレス誘導剤として非常に有用であり本研究の推進に貢献した。また、ジフテリア毒素を用いた研究は筆者が基礎生物学研究所助手のときに行った「ジフテリア毒素耐性の分子機構の研究」がその端緒となっている。今後は、ここで述べた基礎・応用研究を進展させ、若い人とともにさらに新しい研究に挑戦していきたいと思っている。

謝 辞 本研究は、おもに奈良先端科学技術大学院大学において進めた研究で、これらの研究成果は、動物細胞工学研究室に在籍するすべてのスタッフ、研究員、院生、また卒業生の努力の賜物であり、皆様に心より感謝いたします。また、学内外の多くの共同研究者の方々の暖かいご支援や励ましにより本研究を進めることができましたことを、この場を借りて御礼申し上げます。最後に本研究を遂行するきっかけを与えていただき、また常に暖かいご指導をしていただいた、東京大学名誉教授の故 田村學造先生、山崎眞狩先生、現 法政大学の高月 昭先生、東京都臨床医学総合研究所の故 三井宏美先生、大阪大学名誉教授の故 岡田善雄先生、故 内田 驍先生、現 大阪バイオサイエンス研究所の中西重忠先生、共同研究として大きな力添えをいただいた東京都臨床医学総合研究所の米川博通博士、小胞体ストレス応答研究へのきっかけを作っていただいた、Mary-Jane Gething, Joe Sambrook 両先生に心より感謝の意を表したいと思います。