

膜内切断による小胞体ストレスセンサーの活性化

Activation of endoplasmic reticulum stress sensors by regulated intramembrane proteolysis

宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物学分野教授

Kazunori Imaizumi 今泉和則

Summary

小胞体ストレスの際に、小胞体膜に結合した転写因子群が膜内切断(RIP)機構により切断され活性化する。切断された転写活性化能を有するフラグメントは核内に移行し、遺伝子転写を介してストレスから細胞を保護する。RIPを受ける代表的な分子ATF6(activating transcription factor 6)は、通常の状態では小胞体内腔側でジスルフィド結合により分子間結合しており、ダイマーないしオリゴマーの状態が存在する。小胞体ストレスが負荷されると還元され、分子間架橋が解かれてモノマーの状態になる。すると直ちにゴルジ装置に輸送されS1P(site-1 protease)およびS2P(site-2 protease)による切断を受け活性化する。ATF6に構造的に類似した小胞体局在性の膜結合型転写因子OASIS(old astrocyte specifically induced substance)およびそのファミリーメンバーも小胞体ストレスにตอบสนองしてゴルジ装置に輸送され同じ機構によりRIPを受ける。本稿では、小胞体ストレスにตอบสนองしてRIPを受ける膜結合型転写因子群の活性化機構の詳細と、それらの生体内での役割について概説する。

Key words

- 小胞体ストレス
- unfolded protein response (UPR)
- 膜内切断
- アストロサイト
- 転写因子

Ⅰ はじめに

膜結合型蛋白質あるいは分泌蛋白質は、小胞体内に運び込まれさまざまな修飾を受けて、機能をもった成熟型蛋白質に成長していく。この過程で細胞内外からのさまざまな刺激により蛋白質の成熟が阻害されると小胞体内に不良蛋白質(unfolded proteins)が過剰に蓄積し細胞にダメージを与える。いわゆる小胞体ストレスという状態になる。細胞にとって小胞体機能異常はきわめて重篤な事態で、直ちにストレスから回避するための防御システムを活性化させる。この応答系を小胞体ストレス応答あるいはunfolded protein response (UPR)と呼び、酵母から哺乳細胞に至るまで真核細胞に広く保存されている¹⁾²⁾。哺乳細胞では異常蛋白質の蓄積を感知して細胞質あるいは核内に情報を伝達する3つの小胞体ストレスセンサー[IRE1 (inositol requiring 1), PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), ATF6 (activating transcription factor 6)]が小胞体膜上に存在する^{3)~6)}。このうち膜結合型転写因子ATF6は膜内切断機構(regulated intramembrane proteolysis; RIP)により活性化することが知られている。またATF6に構造的によく似た転写因子の一群がやはりRIPにより活性化し、小胞体内腔の状態を感知してターゲット遺伝子の転写を誘導する機能を有することがわかってきている^{7)~12)}。本稿では、これら小胞体膜局在転写因子の活性化機構と小胞体ストレス

応答における役割について概説する。

II 小胞体ストレス応答に関わる分子群

小胞体内カルシウム濃度の変化、低酸素状態、変異蛋白質の発現などが小胞体ストレスを引き起こす要因である。小胞体ストレスが過剰に負荷された場合あるいは長時間持続する場合、細胞はアポトーシスにより死滅する^{13)~16)}。UPRのシステムは細胞死から回避するための

生存シグナルの活性化に関わる。UPRのシグナル伝達に最も重要な役割を果たしているのが、小胞体膜上に存在する3つの1回膜貫通型蛋白質IRE1、PERK、ATF6である。これらは小胞体内に蓄積した異常蛋白質を感知し、シグナルを細胞質や核に伝えることから小胞体ストレスセンサーと呼ばれている(図1)。膜結合型キナーゼであるIRE1およびPERKはストレス負荷のない状態ではモノマーとして存在する。小胞体ストレスが負荷されると、IRE1はホモダイマーを、PERKはオリゴマーを形成して活性化する。IRE1はそのC末端側に存在する

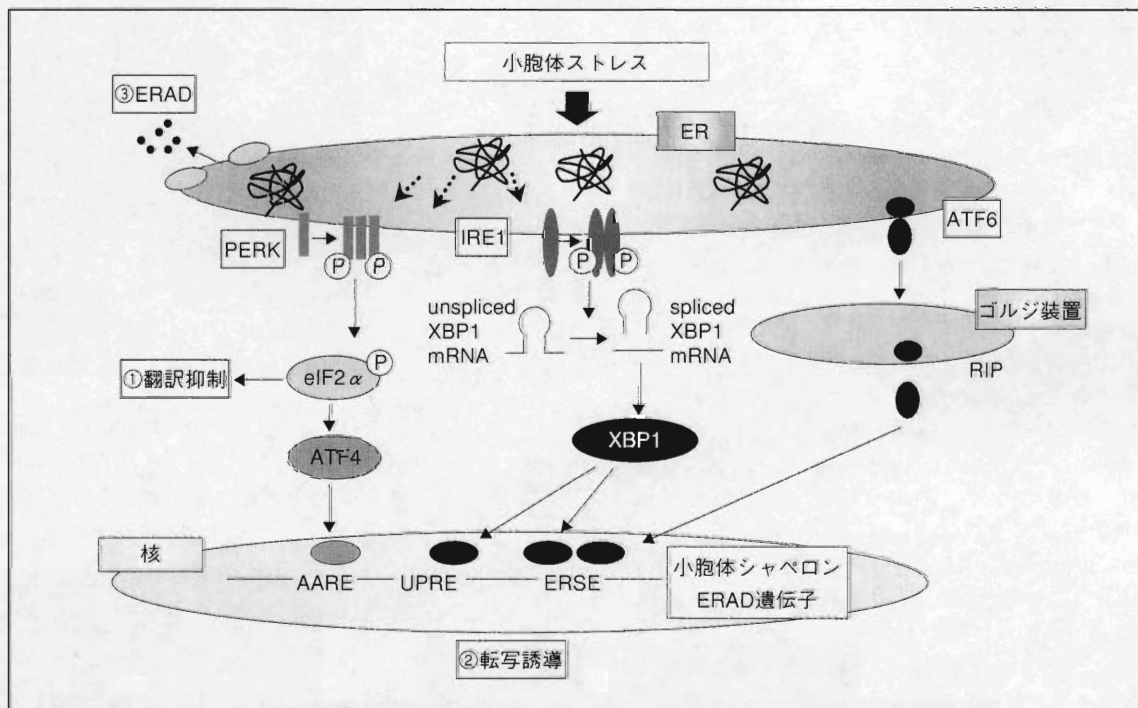


図1 小胞体ストレス応答に関わる分子群

小胞体膜上には3種の小胞体ストレスセンサー(IRE1、PERK、ATF6)が存在する。小胞体ストレスが負荷されると、IRE1はホモダイマーを、PERKはオリゴマーを形成して活性化(自己リン酸化)する。ATF6の場合はゴルジ装置に輸送された後、S1PおよびS2Pによって膜内切断を受け、切断断片が核に移行する。IRE1は、そのC末端側に存在するRNase Lドメインによって転写因子XBP1のpre mRNAを切断し、活性型のXBP1をコードするmRNAに変換する。活性化型XBP1は核に輸送され、ERSEあるいはUPREに結合して分子シャペロンやERAD関連遺伝子を転写する。PERKはeIF2 α をリン酸化して蛋白質翻訳を抑制する。このPERK-eIF2 α 系の活性化は、転写因子ATF4の翻訳を促進する。誘導されたATF4はAAREに結合しアミノ酸合成酵素の転写も誘導する。ATF6切断断片は直接ERSEに結合し、分子シャペロンの転写を促進する。

IRE1: inositol requiring 1, PERK: PKR-like endoplasmic reticulum kinase, ATF: activating transcription factor, S1P: site-1 protease, S2P: site-2 protease, XBP1: X-box binding protein 1, ERSE: endoplasmic reticulum stress-response element, UPRE: unfolded protein response element, eIF2 α : eukaryotic initiation factor 2 α , AARE: amino acid response element, ER: endoplasmic reticulum, ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation

RNase L ドメインによって転写因子 XBP1 (X-box binding protein 1) のプレ mRNA を切断し活性型の XBP1 をコードする mRNA に変換する¹⁷⁾¹⁸⁾。翻訳された活性型 XBP1 は核に輸送され、ERSE (ER stress response element) あるいは ATF6 サイト (あるいは UPR とも呼ばれる) に結合して主に小胞体関連分解 (endoplasmic reticulum associated degradation; ERAD)^{*} に関連する遺伝子の転写を促進する。PERK は eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2- α) を直接リン酸化することにより蛋白質の翻訳を抑制する。もう 1 つの小胞体ストレスセンサーが小胞体膜を貫通する CREB (cyclic AMP-response element binding protein) / ATF ファミリーに属する転写因子 ATF6 である。ATF6 は小胞体ストレス負荷時に膜内切断を受ける。切断された断片のうち、bZIP (basic leucine zipper) ドメインを有する細胞質側の約 50kDa の断片は核に移行して ERSE に結合し、小胞体分子シャペロンの転写を促進する。このようにして転写翻訳された小胞体分子シャペロンは、ATP 存在下で小胞体内の異常蛋白質を折り畳むことで小胞体ストレスを緩和する。

以上のように小胞体ストレスセンサーからのシグナルは、最終的に①蛋白質翻訳抑制、②小胞体分子シャペロンの転写誘導、③ERAD という 3 つのシステムにより小胞体に蓄積した異常蛋白質の排除を行い、生体を小胞体ストレスから防御している。

^{*}小胞体内の異常蛋白質を細胞質へ送り出し、ユビキチン・プロテアゾーム系で分解するシステムのことを指す¹⁹⁾²⁰⁾。

III RIP による ATF6 の活性化機構

ATF6 の構造および膜貫通領域とその前後のアミノ酸配列を図 2 に示した。上述したように ATF6 は小胞体膜上で切断を受ける。それではどのようなメカニズムで切断を受けるのであろうか。Goldstein らは RIP のモデルとしてよく知られている SREBP (sterol regulatory element binding protein) と ATF6 のアミノ酸配列を比較し、SREBP が RIP を受ける際の重要なアミノ酸配列 Arg-x-x-Leu (RxxL) が ATF6 の小胞体内腔側に保持されていることに気づいた²¹⁾。SREBP の場合は、SCAP

(SREBP cleavage activating-protein) と呼ばれるエスコート蛋白質と小胞体で会合し、いったんゴルジ装置に運ばれたのちゴルジ膜にアンカーされたセリンプロテアーゼの一種である S1P (site-1 protease) によって RxxL 配列が認識されてロイシン配列の直後で第 1 段階目の切断を受ける。次に膜に埋もれている疎水性 Zinc メタロプロテアーゼの S2P (site-2 protease) によって膜内に存在するアスパラギン/プロリンモチーフが認識されて第 2 段階目の切断を受ける。切断された basic-helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-ZIP) ドメインを有する断片が核に移行してターゲットであるコレステロールや脂肪酸合成に関わる遺伝子群の転写を活性化する。Goldstein らは ATF6 の小胞体内腔側に RxxL 配列が、また膜内にアスパラギン/プロリンモチーフが存在することから、SREBP と同じように S1P および S2P による 2 段階切断を受けると想定した。実際に ATF6 の RxxL サイトあるいはアスパラギン/プロリンモチーフに変異を与えると RIP が抑制され、さらに S2P 欠損細胞では小胞体ストレスに応答した ATF6 の N 末断片の核移行が全くみられなくなった。以上から ATF6 の切断にはゴルジ装置に局在する S1P および S2P が必須であることが証明されたのである。

次に問題となるのは、ATF6 および SREBP はいずれも S1P および S2P により膜内切断を受けるのにもかかわらず、なぜ小胞体ストレスの際に ATF6 のみが特異的に切断されるかである。ATF6 は小胞体ストレスがない状態では、小胞体内腔側のシステイン残基がジスルフィド結合し分子間架橋を形成してダイマーないしオリゴマーで存在する (図 3)。小胞体ストレスが発生すると ATF6 分子は還元されモノマーの状態になる。この状態になると COP II 小胞に搭載されてゴルジ装置に輸送され、ゴルジ装置内の S1P および S2P による膜内切断を受けるとされている²²⁾。この仮説が正しいとすると、小胞体ストレスの際に限って ATF6 は特異的にゴルジ装置へ輸送され RIP を受けることとなり、ATF6 と SREBP との活性化の違いが説明できる。しかし、小胞体内腔は小胞体ストレスの際に強い酸化状態になることがわかっている。なぜそのような条件で ATF6 のみが特異的に還元さ

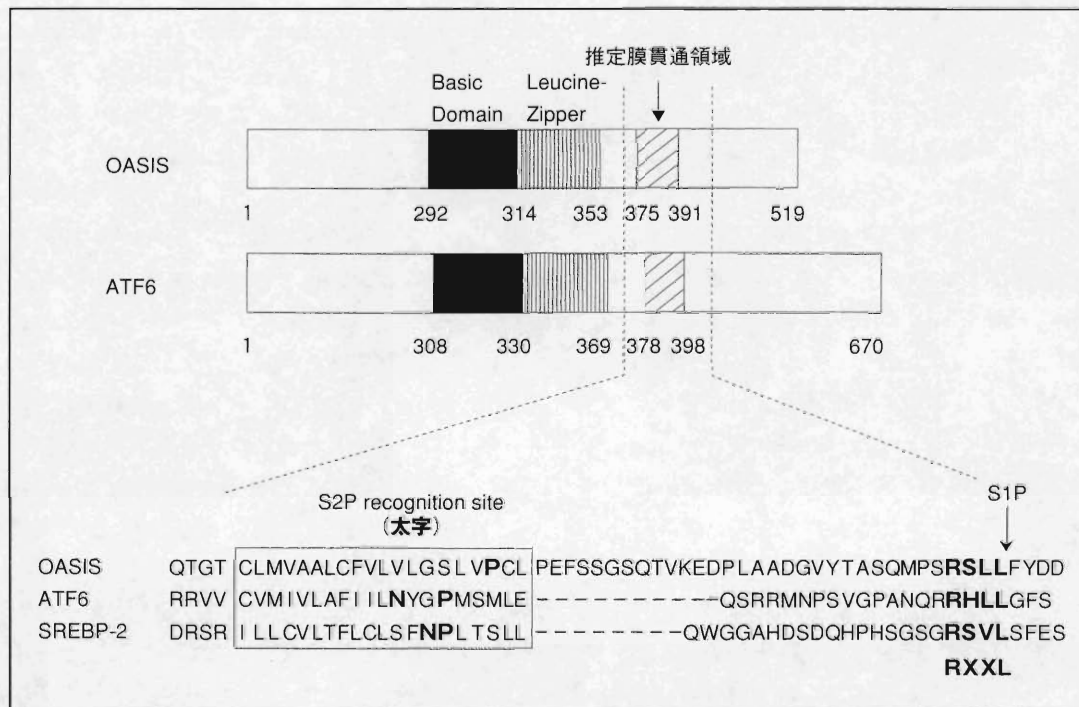


図2 ATF6およびOASISの構造と膜近傍のアミノ酸配列

ATF6およびOASISはいずれも細胞質側にbZIPドメインを有する1回膜貫通型転写因子である。小胞体内腔側のRxxL配列と膜内のアスパラギン/プロリンモチーフがS1PおよびS2Pによる膜内切断(regulated intramembrane proteolysis; RIP)に重要である。

OASIS: old astrocyte specifically induced substance, bZIP: basic leucine zipper, S1P: site-1 protease, S2P: site-2 protease

れるのかは明らかにされていない。ATF6が小胞体からゴルジ装置に輸送され、RIPを受ける現象に関してはさらなる解析が必要である。

IV RIPを受ける小胞体局在膜貫通型転写因子群と活性化機序

ATF6と構造的によく似た小胞体局在膜貫通型転写因子の一群が次々と発見された。OASIS(old astrocyte specifically induced substance)^{79,80}, CREB-H⁸¹, A1bZIP/Tisp40⁸⁰, Luman⁸¹, BBF2H7(BBF2 human homolog on chromosome 7)⁸²である。いずれも膜貫通領域近傍の小胞体内腔側にS1Pの基質になりうるRxxL配列をもつ。これら分子はLumanを除いて実際に小胞体ストレス依存的に切断されることが確認されている。したがって、膜

内切断はS1PおよびS2P依存性に起こると思われる。OASISとBBF2H7の小胞体内腔にはシステイン残基は1つも存在せず、ジスルフィド結合の形成は起こらない。しかもこれら分子の高分子化したバンドは検出されないことから、ATF6でみられるダイマーあるいはオリゴマーからモノマーへの変換は起こっていないようである。つまりOASISやBBF2H7の場合、ATF6とは全く異なった機序で小胞体から離れ、ゴルジ装置に輸送されると考えられる。筆者らの実験ではOASISの小胞体内腔ドメインをほとんど削っても小胞体ストレスに応答したゴルジ装置への移行が起こることから⁸¹、OASISの場合は、細胞質側ドメインにOASIS分子をゴルジ装置へ輸送させるエスコート分子が働いているのではないかと考えられる(図3)。

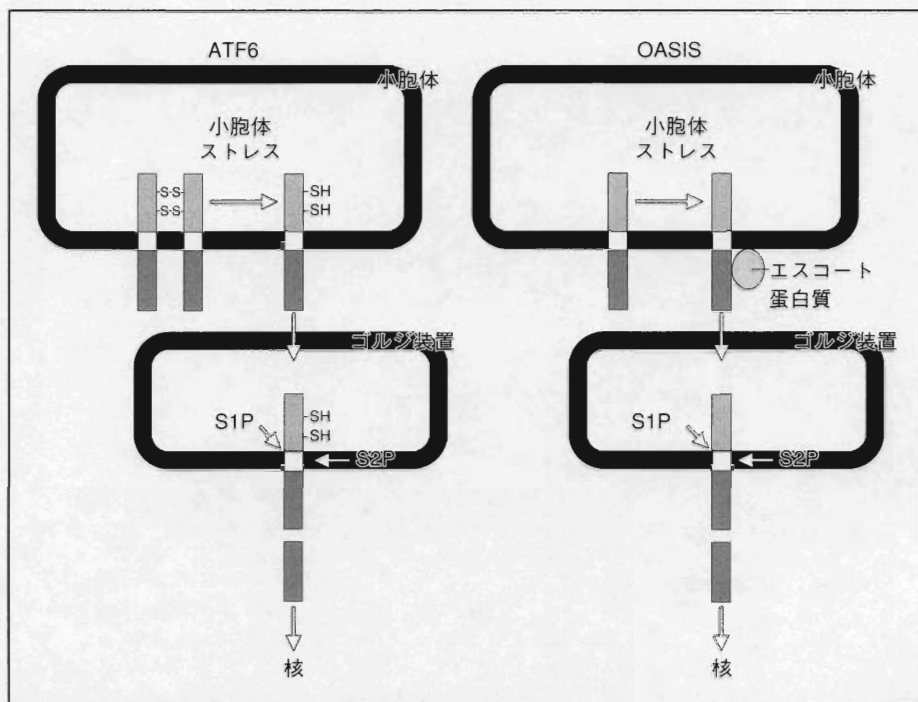


図3 ATF6とOASISの活性化機構の比較

ATF6は小胞体内腔側のシステイン残基がジスルフィド結合し分子間架橋を形成してダイマーないしオリゴマーの状態が存在する。小胞体ストレス時にはジスルフィド結合は還元されATF6はモノマーになる。この状態になるとCOP II小胞に搭載されてゴルジ装置に輸送され、ゴルジ装置内のS1PおよびS2Pによる膜内切断を受ける。一方、OASISの場合は、小胞体内腔にはシステイン残基がないので、常にモノマーの状態である。小胞体ストレスが負荷されると、なんらかの蛋白質(エスコート蛋白質)によってゴルジ装置に運ばれ、S1PおよびS2Pで膜内切断を受けると予想される。

ATF6: activating transcription factor 6, OASIS: old astrocyte specifically induced substance, S1P: site-1 protease, S2P: site-2 protease, ER: endoplasmic reticulum



小胞体局在膜貫通型転写因子群の生体内機能

上述したようにATF6は膜内切断されたbZIPドメインを含む断片が核内でERSEに結合して小胞体分子シャペロンを転写レベルで誘導する。ATF6によって転写誘導される主な小胞体分子シャペロンはBiP, calreticulin, GRP94であり、小胞体内の不良蛋白質を折り畳むことで小胞体ストレスの緩和に寄与している。ATF6は哺乳動物のすべての細胞に一樣に発現している。小胞体ストレスの際に蓄積する異常蛋白質の処理に

ATF6経路は必須であると同時に、この経路は分子シャペロン誘導に特化したものと考えられる。それに対し、他の小胞体局在膜貫通型転写因子群はいずれも発現に組織特異性がある。OASISはアストロサイトと骨芽細胞に発現している。*In vitro*の実験では小胞体ストレスで切断された断片はERSEおよびサイクリックAMP応答配列(cyclic AMP-response element; CRE)に働いてターゲット遺伝子(候補の1つがBiP)を転写誘導し、小胞体ストレスからアストロサイトを守る役割が示されている(図4)。最近作成されたOASIS遺伝子欠損マウスでは全身の骨形成不全になる(論文未発表)。詳細な解析を待たなければならないが、骨芽細胞がコラーゲ

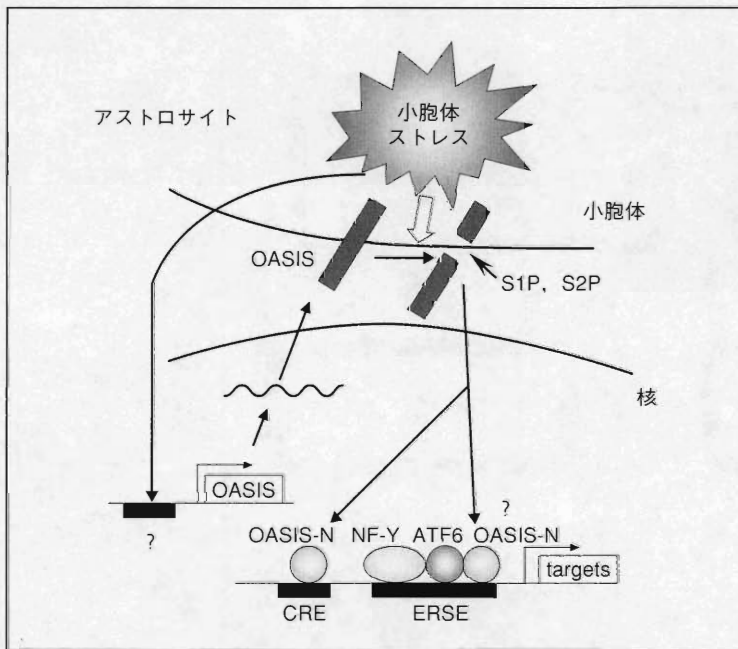


図4 OASISの活性化機構

アストロサイトでは小胞体ストレスが負荷されると、OASISが転写レベルで誘導される。翻訳されたOASISは、小胞体ストレスにตอบสนองしてS1PおよびS2Pによって膜内切断を受ける。切断されたOASISの細胞質側のN末端は、核に移行し、CREおよびERSEサイトを介して標的遺伝子(BiP)の転写を活性化化する。このOASISによるシグナル経路は、アストロサイトにおける小胞体ストレスによる細胞死を抑制する。なお、OASIS遺伝子そのもののアストロサイト特異的な発現誘導機構についてはわかっていない。

OASIS : old astrocyte specifically induced substance, S1P : site-1 protease, S2P : site-2 protease, CRE : cyclic AMP-response element, ERSE : endoplasmic reticulum stress response element, ER : endoplasmic reticulum

ンなどの骨基質を大量に分泌することを考慮に入れると、OASIS 遺伝子欠損により小胞体内の骨基質蛋白質の品質管理機構に異常をきたし、骨基質分泌障害から骨形成不全に至った可能性がある。OASIS の骨芽細胞におけるターゲット遺伝子の同定が、OASIS 遺伝子欠損で起こる骨形成不全のメカニズム解明の鍵となる。

CREB-H は、肝臓に高発現することが以前より報告されていた²³⁾。最近になって膜内切断を受けて活性化し、PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) プロモーターの CRE 配列を活性化することが示された。肝臓は炎症時に、小胞体ストレスが顕著に起こることが *in vivo* 解析で明らかになっており、CREB-H はアミロイド P コンポーネントや CRP (C-reactive protein) などの遺伝子発現誘導を通して急性期炎症にตอบสนองする役割があることがわかってきている²⁴⁾。精巣に高発現する AIBZIP/Tisp40 は、S1P および S2P による膜内切断を受けて UPR 応答エレメント (UPRE) を介して小胞体関連分解 (ERAD) に関連する EDEM (endoplasmic reticulum degradation enhancing α -mannosidase like protein) 遺伝子の転写を促進する。精巣においては、精子形成のために

大量の蛋白質が産生されることや精巣特異的な小胞体分子シャペロンである calnexin の発現が必要なことなど²⁴⁾を考慮すると、精巣は AIBZIP/Tisp40 を介した特別な小胞体ストレス応答経路を有しているのかもしれない。Luman に関しては小胞体ストレスとの関連性は明確になっていないが、S1P の基質配列をもつことや ERAD に関連する Herp 遺伝子の転写を誘導する機能をもつことが明らかにされている²⁵⁾。BBF2H7 に関しては小胞体ストレスにตอบสนองして膜内切断を受けること、脳虚血時の神経細胞に強く発現することなどがわかっている¹²⁾。

このように ATF6 はすべての哺乳細胞において小胞体ストレスから回避するための分子シャペロン誘導に特化した役割を担っているのに対し、ATF6 に構造的に似た膜結合型転写因子群は特定の細胞の小胞体内環境異常を感知して、分子シャペロン誘導とは異なるストレス回避遺伝子を転写活性化させるコンバーターになっている可能性がある。

VI おわりに

小胞体ストレス応答において RIP は膜結合型転写因子(ATF6や OASIS ファミリー)を活性化するうえで最も重要なステップの1つである。本稿で記載したように RIP そのもののメカニズムはきわめて単純である。S1P と S2P の基質となる配列(RxxL)を小胞体内腔側の膜貫通領域の近傍に有している分子は、小胞体からゴルジ装置に運ばれさえすれば切断される。興味深いことに小胞体ストレス応答に関わる膜結合型転写因子のみならず、脂質の濃度を感知して活性化する SREBP においても全く同じ機序で切断されるのである。それでは小胞体ストレスと脂質濃度をどのようにして識別し、いかにしてこれら膜貫通型転写因子切断の選択性を生じさせるのか。おそらく小胞体からゴルジ装置への輸送のタイミングがそれを規定しているのであろう。ATF6の場合は上述のように小胞体ストレス時に還元されモノマーになることが輸送のトリガーになっているようである。一方、OASIS を代表とする OASIS ファミリー分子に関してはトリガーになる現象は全くわかっていない。RIP を生じる前の小胞体からゴルジ装置への輸送メカニズムの全容が解明されれば、小胞体ストレス応答の人為的制御が可能になり、小胞体機能異常を起源とするさまざまな疾患(神経変性疾患, 糖尿病など)に対しても新たな治療方法が確立できるものと期待される。

文献

- 1) Rutkowski DT, Kaufman RJ : A trip to the ER ; Coping with stress. *Trends Cell Biol* 14 : 20-28, 2004
- 2) Ron D : Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 110 : 1383-1388, 2002
- 3) Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ : A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 12 : 1812-1824, 1998
- 4) Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, et al : Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* 17 : 5708-5717, 1998

- 5) Harding HP, Zhang Y, Ron D : Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397 : 271-274, 1999
- 6) Haze K, Yoshida H, Yanagi H, et al : Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10 : 3787-3799, 1999
- 7) Kondo S, Murakami T, Tatsumi K, et al : OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat Cell Biol* 7 : 186-194, 2005
- 8) Murakami T, Kondo S, Ogata M, et al : Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem* 96 : 1090-1100, 2006
- 9) Zhang K, Shen X, Wu J, et al : Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124 : 587-599, 2006
- 10) Nagamori I, Yabuta N, Fujii T, et al : Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway. *Genes Cells* 10 : 575-594, 2005
- 11) Stirling J, O'hare P : CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol Biol Cell* 17 : 413-426, 2006
- 12) Kondo S, Saito A, Hino S, et al : BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol Cell Biol* 27 : 1716-1729, 2007
- 13) Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, et al : The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1536 : 85-96, 2001
- 14) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al : Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403 : 98-103, 2000
- 15) Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, et al : Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276 : 13935-13940, 2001
- 16) Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, et al : Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *J Cell Biol* 165 : 347-356, 2004
- 17) Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, et al : XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription fac-

- tor. *Cell* **107** : 881-891, 2001
- 18) Calfon M, Zeng H, Urano F, et al : IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415** : 92-96, 2002
 - 19) Werner ED, Brodsky JL, McCracken AA : Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation ; An unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** : 13797-13801, 1996
 - 20) Lee RJ, Liu CW, Harty C, et al : Uncoupling retrotranslocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *EMBO J* **23** : 2206-2215, 2004
 - 21) Ye J, Rawson RB, Komuro R, et al : ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* **6** : 1355-1364, 2000
 - 22) Nakanaka S, Okada T, Yoshida H, et al : Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **27** : 1027-1043, 2007
 - 23) Chin KT, Zhou HJ, Wong CM, et al : The liver-enriched transcription factor CREB-H is a growth suppressor protein underexpressed in hepatocellular carcinoma. *Nucleic Acids Res* **33** : 1859-1873, 2005
 - 24) Ikawa M, Wada I, Kominami K, et al : The putative chaperone calnexin is required for sperm fertility. *Nature* **387** : 607-611, 1997
 - 25) Liang G, Audas TE, Li Y, et al : Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element. *Mol Cell Biol* **26** : 7999-8010, 2006