

# 小胞体ストレス誘導性 Cation transport regulator homolog 1 の発現制御および機能の解析

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-08-10
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 野村, 雄紀
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56207

小胞体ストレス誘導性 Cation transport regulator homolog 1 の発現制御 および機能の解析

Characterization of the expression and function of an ER stress-inducible cation transport regulator homolog 1

2017

野村 雄紀

目次

略語					
第一章	序論				

1

4

1-1.	小胞体ストレス応答	4
1-2.	ユビキチン-プロテアソームシステム	7
1-3.	タンパク質の品質管理機構と疾患	10
1-4.	Cation transport regulator homolog 1 (Chac1)	12
1-5.	本研究の目的	15

第二章 ER ストレス下における Chac1 の転写制御解析および翻訳後の

-	プロテアソームによる分解	17
	2-1. 抄録	17
	2-2. 材料と方法	18
	2-2-1. 各種薬剤と抗体	18
	2-2-2. プラスミドの作製	18
	2-2-3. 細胞培養と薬剤処理	18
	2-2-4. RT-PCR	19
	2-2-5. ルシフェラーゼレポーターアッセイ	19
	2-2-6. ウェスタンブロット法	20
	2-2-7. 統計解析	20
	2-3. 結果	21
	2-3-1. Neuro2a 細胞における ER ストレス誘導性の	
	Chac1 mRNA 発現上昇	21
	2-3-2. Neuro2a 細胞における ER ストレス誘導性のマウス Chac1 プロモー	ター
	活性解析	23
	2-3-3. Neuro2a 細胞におけるユビキチン-プロテアソームシステムを介した	
	Chac1 翻訳後制御	28
	2-4. 考察	29

第三章	Chac1 の翻訳および翻訳後の制御機構の解析	32
3-1.	沙録	32
3-2. 7	材料と方法	33
3-2-1.	各種薬剤と抗体	33
3-2-2.	プラスミドの作製	33
3-2-3.	細胞培養と薬剤処理	34
3-2-4.	RT-PCR	34
3-2-5.	ウェスタンブロット法	35
3-2-6.	免疫沈降法	35
3-2-7.	GSH 量の測定	36
3-2-8.	プロテアソーム活性測定	36
3-2-9.	統計解析	36
3 <b>-</b> 3. #	結果	37
3-3-1.	ユビキチン-プロテアソームシステムによる Chac1 発現制御	37
3-3-2.	5'UTR 内の Kozak 様配列による Chac1 翻訳上昇と 2 番目のメチオニ	ン
コドン	から翻訳された低分子型 Chac1	40
3-3-3.	HEK293 細胞における Ub 共発現による Chac1 の安定化と	
直接の	)Ub 化	42
3-3-4.	HEK293 細胞におけるリジンを含まない変異型 Chac1(K0)発現に対す	る
Ub 共	発現と MG132 処理の効果	44
3-3-5.	Ub 共発現による安定化とプロテアソームによる分解に対する	
Chac1	N 末端領域の寄与について	46
3-3-6.	野生型、低分子型 Chac1 発現が細胞内 GSH 量に及ぼす影響	48
3-4.	考察	49
第四章	総括	54
謝辞		56
引用文献	武	57

# 略語

amino acid (aa) amino acid response element (AARE) ATF/CRE modifier (ACM) apoptosis inducing factor (AIF) *N*-Acetyl-L-leucyl-L-norleucinal (ALLN) asparagine synthetase (ASNS) activating transcription factor 4 (ATF4) activating transcription facor 6 (ATF6) amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) bafilomycin A1 (Baf) brefeldin A (BFA) basic leucine zipper domain (bZIP) CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) cation transport regulator homolog 1 (Chac1) C-terminus of Hsc-70-interacting protein (CHIP) cycloheximide (CHX) concanamycin A (CMA) cAMP response element binding protein (CREB) cysteine-rich with EGF-like domains 2 (CRELD2) dimethyl sulfoxide (DMSO) dithiothreitol (DTT) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) eukaryotic translation initiation factor  $2\alpha$  (eIF $2\alpha$ ) endoplasmic reticulum (ER) ER associated degradation (ERAD) extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) ER stress response element (ERSE) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) growth arrest and DNA damage-inducible protein 153 (GADD153) green fluorescent protein (GFP) glucose regulated protein 78 (GRP78) glutathione (GSH) human aortic endothelial cells (HAEC) human embryonic kidney cells 293 (HEK293) homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein (Herp) inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) inhibitor of kappa B (IκB) kelch like ECH associated protein 1 (Keap1) mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) mitogen-activated protein kinase (MAPK) nuclear factor-kappa B (NF-κB) National Institutes of Health (NIH) NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator (Nrf2) oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-3-glycero-phosphorylcholine (ox-PAPC) aka Parkinson protein 2 (Parkin) phosphate buffered saline (PBS) polymerase chain reaction (PCR) PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) protein kinase A (PKA) protein kinase C (PKC) phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) reactive oxygen species (ROS) reverse transcription PCR (RT-PCR) serine protease site-1 (S1P) serine protease site-2 (S2P) sodium dodecyl sulfate (SDS) serum free (SF)

thapsigargin (Tg) tunicamycin (Tm) tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B (TNFRSF6B) tribbles 3 homolog (TRIB3) ubiquitin (Ub) Ub conjugating enzyme (Ubc) unfolded protein response (UPR) X box-binding protein-1 (XBP1)

# 第一章 序論

1-1. 小胞体ストレス応答

小胞体 (ER; endoplasmic reticulum) は膜タンパク質や分泌タンパク質の適切な折り たたみ・翻訳後修飾を行っている。ER 内部の環境悪化によって、折りたたみ不全タン パク質が蓄積し、ER にストレスが生じると、タンパク質の翻訳抑制、分子シャペロン 遺伝子の転写、折りたたみ不全タンパク質の分解などを誘導する UPR (unfolded protein response) と呼ばれる応答が始動する。すなわち、UPR には 3 つの主要なストレス応 答経路があり、ER 膜タンパク質である PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase)、 ATF6 (activating transcription facor 6)、IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) から開始さ れる一連の反応が引き起こされる (1)。PERK から始まる経路では、PERK の二量体化、 自己リン酸化によって、その下流の elF2α (eukaryotic translation initiation factor 2α) が リン酸化される (2、3)。これにより、全体的なタンパク質の翻訳が抑制され、ER 内に 異常タンパク質がさらに蓄積しないようにする。一方、この状況下で ER ストレス誘 導性転写因子の一つ ATF4 (activating transcription factor 4) の翻訳は上昇し、GADD153 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 153) をはじめとする様々な遺伝子の 転写が誘導される (4、5)。GADD153 は細胞周期停止やアポトーシスに関わる多くの 遺伝子やタンパク質に作用し、細胞死を誘導することが報告されている (6、7)。ATF6 から始まる経路では、ER からゴルジ体に移行した ATF6 は S1P (serine protease site-1) と S2P (serine protease site-2) による切断を受け、活性化型 ATF6 (cleaved ATF6) が生じる。 次いで、cleaved ATF6 は核に移行し、GRP78 (glucose regulated protein 78) などの分子シャペロン遺伝子の転写を誘導することで、折りたたみ不全タンパク質の再 構成を促進する (8)。IRE1 から始まる経路では、IRE1 の二量体化、自己リン酸化によ って、XBP1 mRNA (uXBP1) がスプライシングされる (sXBP1)。次いで、sXBP1 は核 に移行し、分子シャペロンや ER 内の折りたたみ不全タンパク質を分解する ERAD (ER associated degradation) に関わる遺伝子の発現を誘導することでストレスを緩和 する (9)。ERAD は後述するユビキチン-プロテアソームシステムによって折りたたみ 不全タンパク質を分解する機構である (図 1-1)。

UPR によって誘導される遺伝子発現は、プロモーター上の特異的な配列に転写調節 因子が結合することで引き起こされる。GADD153 遺伝子はプロモーター上に AARE (amino acid response element; ATTGCATCA)、ERSE (ER stress response element; CCAAT-N9-CCACG) 配列を持ち、それぞれ ATF4、cleaved ATF6 が結合することで、 その転写は誘導されることが報告されている (10)。また、GRP78 などの分子シャペロ ン遺伝子のプロモーター上には ERSE 配列が存在することが多く、cleaved ATF6 の 結合により転写が開始される (8)。一方、ERAD 関連遺伝子の一つである Herp (homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein) のプロモーター上には、AARE、 ERSE-II (ATTGG-N-CCACG) 配列が存在し、それぞれ ATF4、cleaved ATF6 または sXBP1 が結合することで、Herp 遺伝子の転写が誘導される (11、12)。



図 1-1. ER 恒常性の破綻によって作動する UPR 機構

ER 内部の環境悪化によって、折りたたみ不全タンパク質の蓄積が亢進すると、ER ストレ スが生じ、UPR と呼ばれる応答が引き起こされる。UPR は ER 膜タンパク質である PERK、ATF6、IRE1 によって開始され、各々の下流シグナルが活性化する。これらのスト レス応答経路で、タンパク質の翻訳抑制、分子シャペロンの誘導などにより、タンパク質の 再折りたたみや ERAD の活性化を通してストレスに対処する。しかし、ER のストレス状 態が持続する場合は、GADD153 の発現上昇などを介して、細胞死を誘導する。 1-2. ユビキチン-プロテアソームシステム

ユビキチン-プロテアソームシステムとはユビキチン (ubiquitin; Ub) 化されたタンパ ク質を 26S プロテアソームと呼ばれる複合体が特異的に分解する機構である (13、 14)。この機構は異常タンパク質除去・エンドサイトーシス・シグナル伝達・DNA 修復・ 転写制御などの広範な細胞内機構に関わっている (14-17)。

Ub は 76 アミノ酸 (amino acid; aa) から成るタンパク質であり (図 1-2 (A))、Ub の 付加は Ub の 76 番目のグリシン残基のカルボキシル基と標的タンパク質のリジン残 基の ε-アミノ基との間のイソペプチド結合によって形成される。また、標的タンパク質 に結合した Ub のリジン残基に遊離 Ub がイソペプチド結合をさらに形成することで ポリユビキチン (polyUb) 鎖が形成される。一分子の Ub には 7 つのリジン残基 (K6、 K11、K27、K29、K33、K48、K63) が含まれており、一般的に 1 種類のリジン残基を 介して polyUb 鎖が形成される。Ub の 48 番目のリジン残基を介して Ub が連なっ た K48 polyUb 鎖は標的タンパク質を 26S プロテアソームでの分解に導くことが広 く知られている。一方、Ub の 63 番目のリジン残基を介して Ub が連なった K63 polyUb 鎖は分解には関与せず、エンドサイトーシス・シグナル伝達・DNA 修復などに 関わることが知られている (15、16)。

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQ611272933QRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGG(76 aa)486376

図 1-2.(A) マウス Ub 一分子の配列 (NM\_019639、NCBI データベースより取得)

Ub の結合には 3 種類の酵素が関わっている。まず、ユビキチン活性化酵素 (E1, ubiquitin activating enzyme) が ATP の AMP への加水分解依存的なアデニル化を介 して、Ub の 76 番目のグリシン残基のカルボキシル基と E1 の活性中心であるシステ イン残基との間に高エネルギーチオエステル結合を形成することで Ub を活性化する。 次に、E1 はユビキチン結合酵素 (E2, ubiquitin conjugating enzyme; Ubc) とユビキチ

ン様ドメインを介して結合し、E2 はチオエステル結合を介して、活性化した Ub を受 け取る。最後に、E2 はユビキチンリガーゼ (E3, ubiquitin ligase)の触媒ドメインに結 合し、標的タンパク質に Ub を付加する (14、図 1-2(B))。E1 は全ての真核生物にお いて 1 種類しか存在しないが、E2 はヒトでは約 35 種類、E3 は 600 種類以上の遺 伝子が同定されている (18)。E3 はその活性中心であるモチーフの違いから HECT 型、 RING 型、U-box 型と主に 3 つに分類され、標的タンパク質の多様性を形成している (19)。



図 1-2. (B) ユビキチン-プロテアソームシステムにおける Ub 化反応 Ub 化は 3 種類の酵素 (E1、E2、E3) による連続的な Ub の付加反応 を介して行われ、最終的に、標的タンパク質に Ub が結合する。 (Jung T *et al.* The proteasomal system. Mol Aspects Med 30, 191-296 (2009) より一部改編して転載)

さらに、Ub が付加される部位にも多様性が存在する。一般的に Ub は標的タンパク 質のリジン残基に付加されるが、それ以外の部位が Ub 化される非標準的な Ub 化に ついても報告されている (20)。p21、ERK3 (extracellular signal-regulated kinase 3)、 Cyclin G1 は N 末端メチオニン残基の α-アミノ基と Ub がイソペプチド結合を形成 することで Ub 化され、プロテアソームによる分解を受ける (21-24)。さらに、システ イン、セリン、トレオニン、チロシン残基も Ub 化の標的であることが報告されており、 システイン残基の Ub 化ではチオエステル結合が形成される (25-28、図 1-2 (C))。



図 1-2. (C) Ub 化部位の多様性

Ub 化は一般的に Ub の 76 番目のグリシン残基のカルボキシル基と標 的タンパク質のリジン残基の &-アミノ基との間のイソペプチド結合によ って形成されるが、それ以外の部位が Ub 化される非標準的な Ub 化も 存在する。タンパク質の N 末端メチオニン、システイン、セリン、トレ オニン、チロシン残基も Ub の結合部位である。Ub はシステイン残基と はチオエステル結合を形成し、セリン・トレオニン・チロシン残基とはイ ソペプチド結合を形成する。

(McDowell GS *et al*. Non-canonical ubiquitylation: mechanisms and consequences. Int J Biochem Cell Biol 45, 1833–1842 (2013) より転載)

1-3. タンパク質の品質管理機構と疾患

UPR とユビキチン-プロテアソームシステムはどちらも細胞内タンパク質の品質管 理を担っており、ERAD が ER 内の折りたたみ不全タンパク質をプロテアソームによ って分解する機構であることからも両者は密接に関連している。そして、これらは広範 な細胞内機構に関わっており、その破綻によって様々な疾患が引き起こされる (29、30、 図 1-3)。

神経変性疾患であるアルツハイマー病やパーキンソン病などは細胞内に異常タンパ ク質の蓄積が見られ、細胞に障害をもたらすことが疾患の一因となっている (31、32)。

アルツハイマー病は脳内のアミロイド老人班と神経原線維変化の蓄積を神経病理学 的特徴とし、進行性の認知症を臨床主症状とする (31、33)。アミロイド老人班の主成 分はアミロイドβ (amyloid β; Aβ) タンパク質であり、神経原線維変化の主成分は微小 管の構成成分であるタウタンパク質である。Aβ の過剰産生やタウのリン酸化によって、 細胞内にそれらタンパク質の凝集・蓄積が起こり、UPR 活性化・プロテアソーム活性 低下を誘導することで、毒性を発揮すると考えられている (33、34)。

パーキンソン病は中脳黒質緻密部の選択的なドーパミン神経脱落を主な特徴とし、ド ーパミン欠乏による運動障害(振戦・固縮・無動・姿勢反射障害など)を臨床主症状と する(32)。パーキンソン病の原因遺伝子はいくつか同定されている。その一つである α-シヌクレインは神経細胞に多く発現しており、点変異によってミスフォールド化を起 こし、蓄積することで、プロテアソーム機能不全を含む毒性を発揮することが知られて いる(35)。また、E3 である Parkin (aka Parkinson protein 2) もパーキンソン病の原 因遺伝子の一つであり、その活性が低下することで、基質の一つである Pael receptor が蓄積する。Pael receptor は ERAD によって分解されることが報告されており、その 過剰な蓄積が ER ストレスを引き起こし、毒性を発揮すると考えられている(32,36)。

また、細胞周期を制御している p53 や RB などのタンパク質もユビキチン-プロテ アソームシステムによって分解されており、それらを分解する E3 の異常によりがん 化に繋がる (37)。がん細胞は低酸素やグルコース欠乏などのストレス状態に常にさら されており、その状態に適応し、生存するために UPR を利用している (38)。よって、 UPR に関わる遺伝子の発現を制御することでがん細胞特異的に細胞死を誘導させるこ とが抗がん剤の一つの標的となるものと考えられる (39)。その中には GRP78 の分子 シャペロン活性を抑制する化合物やプロテアソームを阻害することで UPR をさらに 活性化させる薬剤が挙げられている (40、41)。

	Causative/ associated gene	UPR activation	Defective proteasome
Monogenic autoinflammatory diseases TNF receptor- associated periodic syndrome (TRAPS)	TNFRSF1A	~	
Sideroblastic anemia with immunodeficiency, fevers, and developmental delay (SIFD)	TRNT1	~	
Proteasome-associated autoinflammatory syndromes: JMP, NNS, CANDLE, JASL	PSMB8	~	~
Polygenic inflammatory diseases Inflammatory bowel disease (IBD): HLA-B27 associated and Crohn's disease	ATG16L	~	
Rheumatoid arthritis (RA)		~	
Type 2 diabetes (T2D)	IAPP, APP	~	
Alzheimer's disease (AD)	APOE, APP, ADAM10	~	~
Parkinson's disease (PD)	PS1, PS2, LRRK2, SNCA, Parkin, DJ-1, PINK1, HTRA2	~	~
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	SOD1, TDP-43, PDI	~	
Age-related macular degeneration (AMD)		~	~
Malignancy (e.g., multiple myeloma)		~	~
Cardiovascular diseases		~	
Chronic pancreatitis		~	

図 1-3. UPR とプロテアソーム機能不全に関わる疾患とその原因遺伝子 ATNF receptor super family, member 1A (TNFRSF1)、tRNA nucleotidyltransferase, CCA-adding 1 (TRNT1)、proteasome subunit beta type 8 (PSMB8)、islet amyloid polypeptide (IAPP)、amyloid precursor protein (APP)、apolipoprotein E (APOE)、 a disintegrin andmetalloproteinase domain 10 (ADAM10)、preselenin 1 (PS1)、 preselenin 2 (PS2)、leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2)、synuclein alpha (SNCA)、 PTEN-induced putative kinase 1 (PINK)、oncogene DJ 1 (DJ-1)、aka Parkinson protein 7 (PINK1)、HTRA serine peptidase 2 (HTRA2)、superoxidase dismutase 1 (SOD1)、transactive response DNA binding protein 1 (TDP43)、protein disulfide isomerase (PDI)、huntingtin (HTT)。

(Agyemang AF *et al.* Protein misfolding and dysregulated protein homeostasis in autoinflammatory diseases and beyond. Semin Immunopathol 37, 335-347 (2015) より一部改編)

## 1-4. Cation transport regulator homolog 1 (Chac1)

ヒト大動脈内皮細胞 (human aortic endothelial cells; HAEC) をアテローム性動脈硬 化症の病巣中で増加する酸化リン脂質である ox-PAPC (oxidized 1-palmitoyl-2arachidonyl-*sn*-3-glycero-phosphorylcholine) で刺激した時に誘導される遺伝子として Chac1 は同定された (42)。また、HAEC、ヒト胎児腎臓細胞 (human embryonic kidney cells 293; HEK293)、ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa) を N 型糖鎖修飾阻害剤であるツニカ マイシン (tunicamycin; Tm)、還元剤である dithiothreitol (DTT)、ER 膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 阻害剤であるタプシガルギン (thapsigargin; Tg) などの ER ストレス誘導剤で処理し た時にも Chac1 mRNA 発現が上昇することが報告され、ATF4 によって誘導される GADD153 の下流に存在することも示唆された (43)。現在では、他の種々の ER スト レス誘導刺激によっても、Chac1 mRNA 発現上昇が起こることは我々を含めて報告さ れており (第二章)、ER ストレス誘導性遺伝子として認識されている (43-49)。

Chac1 のプロモーター上には ATF4 やその関連する転写因子によって認識される CREB (cAMP response element binding protein) /ATF、AARE 配列のような高い相同性 を持った特徴的な配列が含まれている (図 2-2)。当初、Chac1 は GADD153 の下流に 存在することが示唆されたが、プロモーター解析により ATF4 が直接関与することが 明らかとなっている (50)。その後、第二章で述べるように、ATF4 強制発現によって CREB/ATF、AARE 配列を介して、マウス Chac1 プロモーター活性が上昇することが 分かった。現在では、ヒト Chac1 プロモーター上の ATF4 応答性の配列についても同 定されている (51)。さらに、Chac1 は乳がんや卵巣がんの予後不良時に mRNA 発現 が上昇していること、それらの細胞で発現をノックダウンすると細胞遊走が抑制される など、がんとの関わりについての報告もされている (52)。

Chac1 mRNA の発現制御に関する報告はされているが、Chac1 タンパク質の発現制 御に関する報告はない。よって、第二章、第三章において、その詳細を検討した。

グルタチオン (glutathione; GSH) はグルタミン酸・システイン・グリシンからなるト リペプチドであり、生体内の反応性に富む活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の除去に深く関わっている。GSH の産生系が損なわれ、ROS が蓄積するとがんや神 経変性疾患などの病気に繋がる (53)。Kumar らは、Chac1 タンパク質の機能として γglutamyl cyclotransferase 活性を持ち、GSH に作用し、5-oxoprorine と cysteineglycine に分解することを報告した (54、図 1-4)。そして、その酵素活性部位はマウス とヒトでそれぞれ 116 番目、115 番目のグルタミン酸残基であり、この残基に変異を 加えると酵素活性を失う (51、55)。また、Chac1 は Notch の 1669 番目のグルタミ ン酸残基を脱グリシン化することで、Notch シグナルを抑制し、神経分化を制御するこ とも報告されている (56、57)。

以上のように、ER ストレス誘導性の Chac1 は GSH 制御を介する酸化ストレスとの関連のみならず、そのリアーゼ活性により、いくつかのタンパク質を制御することで、 発生・分化を含めた生理・病態反応に関わると考えられる。



図 1-4. GSH 生合成における推定上の  $\gamma$ -glumamyl cycle と Chac1 の GSH 分解機構 (A) GSH の生合成には細胞内、細胞外における様々な酵素が関わっていると考えられてお り、 $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase は  $\gamma$ -glutamyl-amino acid を 5-oxoproline と amino acid に分解する酵素である。 $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS)、glutathione synthetase (GS)、  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT)。

(Kalinina EV *et al.* Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. Biochemistry (Mosc) 79, 1562-1583 (2014) より一部改編) (B) Chac1 タンパク質の γ-glutamyl cyclotransferase 活性中心はマウスとヒトでそれぞれ 116 番目、115 番目のグルタミン酸残基である。

(Kumar A *et al.* Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. EMBO Rep 13, 1095-1101 (2012) より一部改編)

1-5. 本研究の目的

ER ストレスによって活性化される UPR は広範な細胞内応答に関わっており、その 破綻や過剰な活性化は様々な疾患に繋がる。よって、UPR に関わる遺伝子の発現機構 を知ることは、多様な疾患の原因解明や治療において重要である。3 つの主要な ER ス トレス応答経路である PERK-ATF4、ATF6、IRE1-sXBP1 については発現・制御機構の 解析が進んでいる (29)。しかし、それらの下流の遺伝子発現については未だ十分に解明 されておらず、Chac1 はその中でも比較的新規の因子である。また、UPR によるアポ トーシス誘導機構についても、さらなる解析が必要である。

Chac1 は ER ストレスを誘導する種々の刺激によって mRNA 発現が上昇するこ とが分かっており (42-48)、そのプロモーター上には CREB/ATF、AARE 配列などの転 写調節因子が結合すると考えられる特徴的な配列が存在する。3 つの主要な ER スト レス応答経路の中で、PERK-ATF4 が Chac1 遺伝子の転写制御に関与することが示唆 された (50)。よって、Chac1 発現機構について詳しく知るために、ATF4 応答性のマ ウス Chac1 プロモーター上の領域について解析を行った (第二章)。

また、Chac1 タンパク質に関しては、GSH 分解や Notch シグナルに関連した機能 について報告されているが (53-56)、Chac1 の翻訳および翻訳後調節機構についての報 告はほとんどない。そこで、Chac1 タンパク質発現の制御機構の解明を目的として、ユ ビキチン-プロテアソームシステムと Chac1 mRNA 上に存在する 5'非翻訳領域 (5'UTR、図 1-5) に焦点を当てて解析した (第三章)。

15



図 1-5. マウス、ラット、ヒト間での Chac1 mRNA 内の 5'UTR の比較 マウス、ラット、ヒト間で 5'UTR は、推定上の翻訳開始点直前の Kozak 様配列も含め高 度に保存されている (\* が保存されている配列を表す)。ATG(赤) が推定上の翻訳開始点で ある。ヒトでは推定上の翻訳開始点上流にもう一つ ATG (青) が存在する。マウス (NM\_026929)、ラット (NM\_001173437)、ヒト (NM\_024111) の Chac1 5'UTR の配列は それぞれ NCBI データベースより取得した。

# 第二章 ER ストレス下における Chac1 の転写制御解析および翻訳後の プロテアソームによる分解

## 2-1. 抄録

近年、Chac1 が ER ストレスにより誘導される、新規のアポトーシス促進因子であ ることが報告された (43)。また、3 つの主要な ER ストレス応答経路の中で、PERK-ATF4 が Chac1 遺伝子発現の転写制御に関与することが示唆された (50)。しかし、 Chac1 プロモーターの詳細な解析についてはまだ行われていない。本研究では、ER Ca<sup>2+</sup>-ATPase 阻害剤である Tg で処理したマウス神経芽細胞腫 (Neuro2a) における Chac1 mRNA 発現誘導について、DNA アレイと RT-PCR 法を用いて解析した。Chac1 mRNA 発現は他の ER ストレス誘導剤である Tm や BFA(brefeldin A) 処理によって も著しく誘導された。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いたマウス Chac1 プロ モーター活性の解析では、プロモーター上の CREB/ATF と AARE と呼ばれる 2 つの 特徴的な配列が Tm 処理や ATF4 強制発現に対して応答することが分かった。Chac1 プロモーター上の一方の配列に対する変異では Tm 処理や ATF4 強制発現による応 答性を阻害しなかった。そこで、両方の配列に対し変異を導入したところ、基礎転写活 性と ER ストレス刺激応答能が著しく減少した。さらに、転写制御に加えて、マウス Chac1 発現コンストラクトを一過的に強制発現した Neuro2a 細胞において、Chac1 タンパク質発現を検討した。その結果、ユビキチン-プロテアソーム分解系阻害剤であ る MG132 存在下でのみ Chac1 が検出できた。以上より、神経細胞系における Chac1 の転写および翻訳後制御について初めて解析を行った。

17

# 2-2. 材料と方法

#### 2-2-1. 各種薬剤と抗体

Tg、Tm、BFA、forskolin は Sigma-Aldrich より購入した。MG132 は Peptide Institute から購入した。Chac1、Actin に対する抗体はそれぞれ Abcam、Calbiochem から購入 した。

#### 2-2-2. プラスミドの作製

マウス Chac1 プロモーターレポーターコンストラクトを作製するために、Neuro2a 細胞からゲノム DNA を抽出し、Chac1 プロモーター領域 (-334/+112) (図 2-2) を PCR (polymerase chain reaction) 法によって増幅した。そして、PCR 産物を pGL3b (pGL3-Basic) ベクター (Promega) にクローニングした。欠損型、変異型 Chac1 プロ モーターを含む他のレポーターコンストラクトも PCR 法によって作製した。転写開始 点は NCBI データベース (NM\_026929、NM\_024111) を用いて定義した。マウス ATF4 発現コンストラクトを作製するために、Neuro2a 細胞由来の mRNA から RT-PCR (reverse transcription PCR) 法によって cDNA を増幅し、ATF4 タンパク質コー ド領域を pFLAG-CMV ベクター (Sigma-Aldrich) にクローニングした。マウス Chac1 遺伝子 (NM\_026929) は PCR 法によって C57/BL6 マウス脳由来の mRNA から RT-PCR によって cDNA を増幅し、Chac1 タンパク質コード領域 (+162/+833) (図 3-1 (A)) を pcDNA3.1 ベクター (Life Technologies) にクローニングした。

# 2-2-3. 細胞培養と薬剤処理

Chac1 遺伝子解析には ER ストレス応答についての先行論文に従い、Neuro2a 細胞を 用いた (58、59)。Neuro2a 細胞は 8% ウシ胎児血清と 1% ペニシリン-ストレプトマ イシンを含んだ Dulbecco's Modified Eagle's Medium によって培養した。この研究に おける各コンストラクトのトランスフェクションはメーカーの説明に従い、 Lipofectamine Plus reagent (Life Technologies) を用いて行った。Neuro2a 細胞は Tg (0.1 µM)、Tm (2 µg/mL)、BFA (5 µg/mL)、血清欠乏 (serum free; SF)、forskolin (10 µM)、 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (0.1 µM)、MG132 (20 µM) にて記載の時間処理 した。

### 2-2-4. RT-PCR

TRIzol (Life Technologies) にて細胞を溶解後、クロロホルムを加えて混和し、氷上で 10 分静置した。そして、15,000 rpm、4°C で 10 分遠心後、上層を一定量移し、イソプロ パノールを加えて混和した。氷上で 15 分放置後、15,000 rpm、4°C で 10 分遠心した。 上清を除去の後、70% エタノールを加え、8,500 rpm、4°C で 5 分遠心後、上清を除 去し、沈殿物を全 RNA として使用した。全 RNA を 72°C で 10 分保温した後、全 RNA (0.5  $\mu$ g/10  $\mu$ L)、DTT (10 mM)、dNTP (0.5 mM)、random ninemers (0.05  $\mu$ g/10  $\mu$ L)、 RNaseOUT (2 U/10  $\mu$ L) (Life Technologies)、prime superscript III RNase reverse transcriptase (25 U/10  $\mu$ L) (Life Technologies) を混合し、42°C で 60 分保温すること で cDNA にした。特定の遺伝子発現は以下に示すプライマーペア (1  $\mu$ M)、dNTP (0.1 mM)、rTaq (0.25 U/10  $\mu$ L) (Taq PCR kit、Takara) を含む PCR reaction mixture を使う ことで増幅した。この研究で用いたプライマーペアは

Chac1 sense primer; 5'-CATAGGGGCAGCGACAAGATG-3',

Chac1 antisense primer; 5'-CTGTGTGGCAATGACCTCTTC-3'、

GADD153 sense primer; 5'-GAATAACAGCCGGAACCTGA-3'、

GADD153 antisense primer; 5'-GGACGCAGGGTCAAGAGTAG-3'、

GRP78 sense primer; 5'-ACCAATGACCAAAACCGCCT-3'、

GRP78 antisense primer; 5'-GAGTTTGCTGATAATTGGCTGAAC-3'、

G3PDH sense primer; 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'、

G3PDH antisense primer; 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

である。典型的な反応条件は 96°C で 30 秒、58°C で 30 秒、72°C で 30 秒で行っ た。結果は各遺伝子に適切なサイクル (20 から 28 サイクル) で増幅したのものが示 してある。cDNA 増幅産物は 2.0% のアガロースゲルを用いて電気泳動によって分離 し、エチジウムブロマイドで可視化した。Chac1 遺伝子の相対的な mRNA 発現レベル は NIH imaging を用いて数値化し、薬剤で未処理の細胞の G3PDH (glyceraldehyde 3phosphate dehydrogenase) の値で標準化したものを示した。実験は複数回行い、再現 性を確認した。

2-2-5. ルシフェラーゼレポーターアッセイ 各マウス Chac1 遺伝子レポーターコンストラクト (0.1 μg) と内部コントロールとし ての pGL4.70 (Rluc) (0.04 μg) (Promega) を使い、48 well プレートにまいた Neuro2a 細胞に Lipofectamine Plus reagent (Life Technologies) を用いてトランスフェクション を行った (58)。トランスフェクションから 24 時間後、細胞を Tm (2 μg/mL)、forskolin (10 μM)、PMA (0.1 μM) または、溶媒である DMSO (dimethyl sulfoxide) のみを含んだ 培地で 12 時間処理した。プロモーター活性に対する ATF4 強制発現の効果を解析す る場合は、ATF4 発現コンストラクト (0.01 μg)、または、空ベクター (mock) (0.01 μg) をレポーターコンストラクトと共にトランスフェクションし、36 時間培養した。各条 件で培養した後、1 x passive lysis buffer (Promega) を用いて細胞を室温で 15 分間溶 解し、遠心後、上清を測定に用いた。各細胞溶解物のプロモーター活性は Dual-Luciferase assay system (Promega) を用いて複数回測定した。それぞれのプロモータ ー活性は同時にトランスフェクションを行ったウミシイタケルシフェラーゼの活性で 標準化し、相対的な活性として示した。実験は複数回行い、再現性を確認した。

# 2-2-6. ウェスタンブロット法

細胞は homogenate buffer [20 mM Tris-HCI (pH 8.0)、137 mM NaCl、2 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、10% グリセロール、1% Triton X-100、1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)、10 µg/mL ロイペプチン、10 µg/mL ペプスタチンA] で溶解した。各細胞溶解物を Bradford 法にて、タンパク量測定後、各細胞溶解物は SDS (sodium dodecyl sulfate) Laemmli sample buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% SDS、10% グリセロール] と混和した。等量の細胞溶解物を 12.5% ポリアクリルアミ ド電気泳動ゲルを用いて分離し、polyvinylidene difluoride membranes (Merck Millipore) に転写した。そして、Chac1 (1:1,000)、Actin (1:5,000) に対する抗体を用いて、enhanced chemiluminescence (GE Healthcare Bioscience) によって目的のバンドを検出した。実験は複数回行い、再現性を確認した。

# 2-2-7. 統計解析

結果は示してある回数の平均 ± 標準偏差で表した。統計解析は one way-ANOVA に より値を解析し、Fischer's PLSD 検定を行った。\*p < 0.05 は統計的に有意とみなす。

#### 2-3. 結果

2-3-1. Neuro2a 細胞における ER ストレス誘導性の Chac1 mRNA 発現上昇

新規の ER ストレス誘導性の遺伝子である Chac1 の発現は特定の病理学的状況下 で上昇することが報告されている (43-49、52)。Mungrue らは Chac1 が ATF4 の下 流の遺伝子であることを報告しているが、ER ストレス下における転写制御の正確な機 構についてはまだ解析されていない (43)。以前、我々は CRELD2 (cysteine-rich with EGF-like domains 2)、MANF (mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor) 遺 伝子の発現が Tg で処理した Neuro2a 細胞において上昇することを DNA アレイの 結果に基づいて解析した (58、59)。この DNA アレイ解析では Chac1 も Tg 誘導性 遺伝子に含まれていたことから、Neuro2a 細胞における ER ストレス誘導性の Chac1 mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて解析した。図 2-1 (A) に示すように、Tg 処理は時 間依存的に Chac1、GADD153、GRP78 mRNA 発現上昇を引き起こした。G3PDH mRNA 発現レベルで標準化した Chac1 mRNA 発現は Tg 処理後、4、8、12 時間でそ れぞれ 1.5、1.8、2.3 倍増加した。他の ER ストレス誘導性の薬剤である Tm、BFA 処 理でも GADD153、GRP78 mRNA を同様に増加させ、Chac1 mRNA はそれぞれ 1.7、 1.5 倍上昇した (図 2-1 (B))。しかし、血清欠乏条件では変化しなかった。



#### 図 2-1. Neuro2a 細胞における ER ストレス誘導性の Chac1 mRNA 発現上昇

(A) Neuro2a 細胞を Tg (0.1  $\mu$ M) にて記載の時間処理した。(B) Neuro2a 細胞を Tg (0.1  $\mu$ M)、Tm (2  $\mu$ g/mL)、BFA (5  $\mu$ g/mL)、血清欠乏 (SF)、溶媒である DMSO (con) で 8 時間 処理した。それぞれの細胞サンプルから抽出した全 RNA を用いて RT-PCR 法を行った。

マウス	-334	ACCGTTTAGACCACTGAGAGGGCCTTCCCGGGAGACGGCGGGTGCCCGCGCCCATTCTAAG
		* * *** *** * * **** ** * ***** ****
ヒト	-318	AGGGGCCCAGGTCATGAG-GGGGCGGCTGGGGGAGACGCCCGGCCCG
		** ** *** **** ** *********************
		GCGGGTGCCCCTGCCGCCGCCTGACGCAATCCGAGGCGCCCTTGCTGCATGCCGGCGCTGGAG
		AARF
		AAACCTTCCCTGCGTTGCATCACTCCTGCCAGGTCTGCCACGGGAGGAGGAGCCGAACCAATCA
		***** *****
		AAACCTCCCCTGCCGTTGCATCACTCCTGCCAGGTTTGCCAC-AGAGGTGGAGCTGAACCAATCA
		GCACGCGCGTTGGCCCTGGGGCGGGCTGCTCTGGTACCCACTCGGAGGGCGGCGCGCGGTTAACCGA
		* **** ** **** * **********************
		GGCCCGCGGCGGGGTTAAGTGA
		GAAGCAAAATCTAAAGGTGATTGGCCAGAAAGAGATTTGCCCCGCCCCAATCATAGGGACAGCTG
		***** **** *** ********* ** * *********
		GAAGCAGAATCCGAAGTTGATTGGCCAAAAGGGGGATTTGCCCCACCCCAATCACCGCGGCAGCTG
		GGAACGACCGATCGGTGCCAGGCCAGGTGTACGCGCCGTCGGTCCTTCCGTGCCCGTGCCGGAG
		*** * ***** ***************************
		GGAGCTACCGAGCGGTGCCAGGCCAGGTGTGTGCGTCCGTC
		ACCAGTCTCGGAGGCCACCCGGGTC +142
		**** * ****** ** *** *
		ACCAGCCCCGGAGGCCGCCTGGGCC +127

# 図 2-2. マウスとヒト間での Chac1 遺伝子のプロモーター配列の比較

マウスとヒト間で保存されている Chac1 遺伝子のプロモーター配列はアスタリスク (\*) で、推定上の転写開始点は矢印で示した。マウス (NM\_026929)、ヒト (NM\_024111) の Chac1 遺伝子配列はそれぞれ NCBI データベースより取得した。

2-3-2. Neuro2a 細胞における ER ストレス誘導性のマウス Chac1 プロモーター活 性解析

図 2-2 に示すように、マウス Chac1 プロモーター領域はヒト Chac1 プロモーター 領域と比較して良く保存されている。その領域には ATF4 やその関連する転写因子に よって認識される CREB/ATF、AARE 配列のような高い相同性を持った特徴的な配列 が含まれている。Chac1 プロモーター活性制御におけるこれらの配列の役割を解析す るために、長さの異なるマウス Chac1 プロモーター領域および CREB/ATF や AARE 配列に変異を持つレポーターコンストラクトを作製し、Neuro2a 細胞にトランスフェ クションした。その結果、CREB/ATF、AARE 配列を含む Chac1 レポーターコンスト ラクト (-334/+112、-262/+112) は両配列を欠いたもの (-136/+112) と比較して、より 高い基礎転写活性を持ち、Tm 処理 (図 2-3 (A)) や ATF4 強制発現 (図 2-3 (B)) に応 答した。また、CREB/ATF 配列を欠いたレポーターコンストラクト (-210/+112) では、 基礎転写活性が 50% 以上減少したが、上記の 2 つの処理に対して有意な応答を示し た。CREB/ATF 及び AARE 配列を欠いたレポーターコンストラクト (-136/+112) は 基礎転写活性がそれらの配列を含むもの (-334/+112、-262/+112) と比較して 10 分の 1 以下になり、さらに Tm 処理、ATF4 強制発現に対する応答性が消失した。



# 図 2-3. Neuro2a 細胞における Tm 処理と ATF4 強制発現による Chac1 プロモーター 活性解析

(A) Neuro2a 細胞に pGL3b または各マウス Chac1 レポーターコンストラクトをトラン スフェクションした。24 時間後、Tm (2 µg/mL) または溶媒である DMSO (-) で 12 時間 処理し、プロモーター活性を測定した。(B) Neuro2a 細胞に pGL3b または各マウス Chac1 レポーターコンストラクトと ATF4 発現コンストラクトまたは空ベクター (mock) を共に トランスフェクションした。36 時間後、プロモーター活性を測定した。結果は異なる 3 wells より得られた値の平均 ± 標準偏差で表し、未処理の pGL3b ベクターの値で標準化 した (\*p < 0.05)。

次いで、Chac1 mRNA の発現における CREB/ATF 配列を介する転写制御について さらに解析するために、PKA (protein kinase A)-CREB カスケード活性化剤である forskolin で Neuro2a 細胞を処理した。予備実験より、forskolin 処理は CREB のリン 酸化を誘導したが、Chac1 mRNA 発現誘導と Chac1 プロモーター活性上昇を引き起 こさなかった (図 2-4 (A)、(B))。また、Chac1 の転写制御について、PKC (protein kinase C) 活性化剤である PMA の効果も解析したが、mRNA 発現、プロモーター活性に影響 を及ぼさなかった (図 2-4 (A)、(C))。



# 図 2-4. Neuro2a 細胞における Chac1 mRNA 発現とプロモーター活性に対する Forskolin、PMA 処理の効果

(A) Neuro2a 細胞を Tm (2 µg/mL)、forskolin (F) (10 µM)、PMA (0.1 µM) または溶媒であ る DMSO (con) で 12 時間処理した。それぞれの細胞サンプルから抽出した全 RNA を用 いて RT-PCR 法を行った。(B) Neuro2a 細胞に pGL3b または各マウス Chac1 レポータ ーコンストラクトをトランスフェクションした。24 時間後、forskolin (F) (10 µM)、Tm (2 µg/mL) または DMSO (-) で 12 時間処理し、プロモーター活性を測定した。(C) Neuro2a 細胞に pGL3b または各マウス Chac1 レポーターコンストラクトをトランスフェクショ ンした。24 時間後、PMA (0.1 µM) または DMSO (-) で 12 時間処理し、プロモーター活 性を測定した。結果は異なる 3 wells より得られた値の平均 ± 標準偏差で表し、未処理の pGL3b ベクターの値で標準化した (\*p < 0.05)。 ER ストレス誘導性の Chac1 発現における CREB/ATF、AARE 配列の役割につい てより詳しく理解するために、両配列に変異を含む Chac1 レポーターコンストラクト を用いてプロモーター活性を解析した。図 2-5 (A) に示すように、変異型レポーターコ ンストラクト (-262/+112 m1、m2) は野生型のもの (-262/+112) と比較して基礎転写 活性が低かった。しかし、これらの変異型レポーターコンストラクトは Tm 処理や ATF4 強制発現に対し、有意に応答した (図 2-5 (B)、(C))。両配列変異型レポーターコ ンストラクト (-262/+112 m3) では両配列を欠いたもの (-136/+112) と同様に刺激に 対する応答性が消失していた。また、AARE 配列のみを含むレポーターコンストラクト の AARE 配列に対する変異 (-210/+112 m1、m2、m3) は基礎転写活性を減少させ、Tm 処理や ATF4 強制発現に応答しなくなった (図 2-5 (D)、(E)、(F))。





図 2-5. Tm 処理、ATF4 強制発現に対する変異型マウス Chac1 プロモーターの応答性の解析

(A) マウス Chac1 プロモーター内の CREB/ATF、AARE 配列 (大文字) およびその変異 (小文字) を示す。(B) Neuro2a 細胞に pGL3b または各マウス Chac1 レポーターコンスト ラクトをトランスフェクションした。24 時間後、Tm (2µg/mL) または溶媒である DMSO (-) で 12 時間処理し、プロモーター活性を測定した。(C) Neuro2a 細胞に pGL3b または 各マウス Chac1 レポーターコンストラクトと ATF4 発現コンストラクトまたは空ベクタ ー (mock) を共にトランスフェクションした。36 時間後、プロモーター活性を測定した。 (D) マウス Chac1 プロモーター内の AARE 配列 (大文字) およびその変異 (小文字) を 示す。(E) Neuro2a 細胞に pGL3b または各マウス Chac1 レポーターコンストラクトをト ランスフェクションした。24 時間後、Tm (2µg/mL) または溶媒である DMSO (-) で 12 時間処理し、プロモーター活性を測定した。(F) Neuro2a 細胞に pGL3b または各マウス Chac1 レポーターコンストラクトと ATF4 発現コンストラクトまたは空ベクター (mock) を共にトランスフェクションした。36 時間後、プロモーター活性を測定した。結果は異な る 3 wells より得られた値の平均 ± 標準偏差で表し、未処理の pGL3b ベクターの値で 標準化した (\*p < 0.05)。 2-3-3. Neuro2a 細胞におけるユビキチン-プロテアソームシステムを介した Chac1 翻訳後制御

マウス Chac1 遺伝子の転写制御解析に加えて、マウス Chac1 タンパク質発現につ いて解析を行った。ER ストレス誘導剤 (Tg、Tm) 処理した Neuro2a 細胞における内 因性 Chac1 タンパク質は検出できなかったため、Chac1 を強制発現することで解析 を進めた。内因性 Chac1 mRNA は Tg、Tm 処理で変化したが、MG132 処理では著 しい影響を受けなかった (図 2-6 (A))。一方、Chac1 は Chac1 発現コンストラクトを トランスフェクションしてから 24 時間後に、ユビキチン-プロテアソーム分解系阻害 剤である MG132 で 12 時間処理した細胞において検出された (図 2-6 (B))。



図 2-6. Neuro2a 細胞における MG132 処理による Chac1 タンパク質発現上昇

(A) Neuro2a 細胞を Tg (0.1 μM)、Tm (2 μg/mL)、MG132 (MG) (20 μM) または溶媒である DMSO (con) で 12 時間処理した。それぞれの細胞サンプルから抽出した全 RNA を用い て RT-PCR 法を行った。(B) Neuro2a 細胞にマウス Chac1 発現コンストラクトをトラン スフェクションした。24 時間後、Tg (0.1 μM)、Tm (2 μg/mL)、MG132 (MG) (20 μM) また は DMSO (con) で 12 時間処理した。そして、細胞溶解物を Chac1 または Actin 抗体を 用いてウェスタンブロット法により解析した。

### 2-4. 考察

HAEC をアテローム性動脈硬化症の病巣中で増加する酸化リン脂質である ox-PAPC で刺激した時に誘導される遺伝子として Chac1 が同定されて以降、様々なモデ ルにおいて Chac1 mRNA の発現誘導が報告されてきた (43-49、52)。 我々は Tg 誘導 性の ER ストレスが Neuro2a 細胞においても Chac1 mRNA 発現レベルを増加させ ることを DNA アレイと RT-PCR 法を用いて示した。また、Chac1 発現が転写および 翻訳後の両方で制御されていることを明らかにした。Neuro2a 細胞における Chac1 mRNA の発現パターンは GADD153(60)、GRP78(61、62) のような既知の ER スト レス誘導性の遺伝子と同様であった (図 2-1)。マウス Chac1 遺伝子のプロモーター上 には CREB/ATF、AARE と呼ばれる 2 つの特徴的な配列が存在し、マウスとヒト含め た他の脊椎動物間でよく保存されている (図 2-2)。一般的に、3 つの ER 局在ストレ スセンサーである PERK(2)、IRE1(63)、ATF6(64) は、ER 機能不全を引き起こす様々 な刺激によって同時に活性化され、下流の標的因子の発現を誘導することが知られてい る (65-68)。活性化した PERK は elF2α をリン酸化し、それにより ATF4 の翻訳が 上昇する。さらに、リン酸化された elF2α は全体的に殆どのタンパク質の翻訳を抑制 する (69)。ER ストレス応答によって増加した ATF4 は AARE 配列を認識し、 GADD153 (60, 70), TRIB3 (tribbles 3 homolog) (71), ASNS (asparagine synthetase) (72) などの標的遺伝子の転写を誘導する。Romanski らはヒト Chac1 プロモーター上 の AARE 配列上流にある CREB/ATF 配列が ATF4 強制発現に対し著しく応答する ことを HAEC でのプロモーター活性を解析することによって報告した (50)。本研究で は、マウス-ヒト間で保存されているマウス Chac1 プロモーター上の CREB/ATF 配列 は基礎転写活性に重要であるが、一方、その配列を欠いた (-210/+112)、変異型 (-262/+112 m1) レポーターコンストラクトが Tm 処理や ATF4 強制発現に応答するこ とを示した (図 2-3、図 2-5(B)、(C))。さらに、AARE 配列変異型レポーターコンスト ラクト (-262/+112 m2) はそれらの刺激に対して、CREB/ATF 配列変異型 (-262/+112 m1) と同様の応答を示した。これら欠損型、変異型 Chac1 プロモーターレポーターコ ンストラクトの解析結果から、CREB/ATF、AARE 配列はそれぞれ ER ストレス刺激 に応答するが、相乗的に働かないことが示唆された。一方で、これらの配列は Chac1 プロモーターの基礎転写活性の維持に関しては協調して働く可能性が考えられる。なぜ なら、両配列変異型レポーターコンストラクト (-262/+112 m3) は片方の配列の変異型

コンストラクト (-262/+112 m1、m2) と比較して著しくプロモーター活性が低下した からである (図 2-5 (B)、(C))。

CREB2 とも呼ばれる ATF4 は CREB/ATF ファミリー転写因子の一つである (73)。 CREB は PKA や MAPK (mitogen-activated protein kinase) を含む様々な酵素によっ てリン酸化され、様々な遺伝子発現を制御することが知られている (74)。Forskolin あ るいは PMA 処理による Chac1 mRNA の発現とルシフェラーゼレポーターアッセイ の結果から、PKA、PKC 依存的なシグナル経路は CERB/ATF、AARE 配列を介する Chac1 遺伝子の発現誘導には関与していないことが分かった (図 2-4)。従って、マウス Chac1 遺伝子発現は ER ストレス誘導性の刺激によって、選択的に促進されることが 明らかとなった。

Chac1 mRNA 発現は様々な病理学的状況において上昇することが報告されているが (43-49、52)、Chac1 タンパク質の制御機構はあまり解析されていない。Mungrue らは GFP (green fluorescent protein) タグが付加された Chac1 の強制発現は HEK293 細 胞や HAEC にアポトーシスを引き起こすことを報告している (43)。 また、その時、ア ポトーシス活性化因子であるカスパーゼ 3、AIF (apoptosis inducing factor) 発現は上昇 し、アポトーシス阻害因子である TNFRSF6B (tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B) 発現は減少することを見出している。しかし、Chac1 タンパ ク質発現制御については解析されていない。予備実験において、MG132 や他の ER ス トレス誘導剤で Neuro2a 細胞を処理した時の内因性 Chac1 タンパク質の検出を試 みたが、本研究の条件では特異的なバンドは検出できなかった。そこで、タグの付いて いないマウス Chac1 を強制発現した Neuro2a 細胞において、そのタンパク発現を検 討したところ MG132 で処理した時のみ検出できた (図 2-6(B))。以上の結果は、 Chac1 タンパク質はユビキチン-プロテアソームシステムで迅速に分解されており、細 胞内で非常に不安定であることを示唆するものである。Ub 化を介したプロテアソーム によるタンパク質分解は異常タンパク質除去・エンドサイトーシス・シグナル伝達・DNA 修復・転写制御を含む広範な細胞内機構に関わっている (14-17)。同様に、ER ストレ ス応答に関わる多くの因子の発現が、ユビキチン-プロテアソームシステムによって転 写および翻訳レベルで制御されていることが報告されている。Jiang と Wek らはマウ ス線維芽細胞においてプロテアソーム阻害が ATF4 mRNA 発現レベルを変化させるこ となく、ATF4 タンパク質蓄積を導くことを報告している (75)。彼らは MG132 誘導

性の ATF4 安定化とリン酸化 elF2 $\alpha$  による ATF4 蓄積の結果として GADD153 mRNA とタンパク質発現レベルが増加することも報告している。本研究でも、ATF4 タンパク質は MG132 で処理した Neuro2a 細胞において増加するという結果を予備実験から得ている。この ATF4 増加は Tg、Tm 処理よりも MG132 処理によって著しく増加した。しかし、MG132 で処理した Neuro2a 細胞における ATF4 タンパク質の蓄積は Chac1 mRNA 発現レベルに影響を与えなかった (図 2-6 (A))。また、その時の GADD153 mRNA 発現は緩やかな上昇だった。MG132 で処理した Neuro2a 細胞における ATF4 タンパク質の増加が、Chac1 と GADD153 mRNA 発現と比例しなかった 機構については不明である。bZIP (basic leucine zipper domain) を持つ ATF4 のよう な転写因子のいくつかは同様の構造を持つ転写因子と相互作用することが報告されて いる (76)。 ATF4 は標的となる遺伝子の発現を誘導するために C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ )、GADD153、Nrf2 (NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator) と相互作用することが報告されている (72、77、78)。従って、様々な細胞種におけるこれら因子のさらなる解析が、Chac1 の転写制御を明らかにするのに必要であると考えられる。

以上より、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いることでマウス Chac1 プロモ ーター上の 2 つの ATF4 応答性の配列としての CREB/ATF、AARE 配列を初めて同 定した。ER ストレス、酸化ストレス、ウイルス感染によって活性化する多くのシグナ ルには eIF2α のリン酸化を介する ATF4 経路の活性化が報告されている (79-82)。従 って、異なる細胞種におけるさらなる Chac1 プロモーターの解析が様々な細胞応答や 疾患 (神経変性疾患、がん、炎症) の理解に寄与する可能性が考えられる (33-36、38、 83、84)。本研究では、Chac1 タンパク質は細胞内で不安定であり、その細胞内含量は ユビキチン-プロテアソームシステムによって厳密に制御されていることが示唆された (図 2-6 (B))。最近、Kumar らがアポトーシス誘導性の特徴を持つ Chac1 が、その γglutamyl cyclotransferase 活性によって GSH を特異的に分解することを報告した (54)。従って、Chac1 プロモーターについての本研究は ER ストレスが細胞内酸化還 元状態の異常を引き起こす機構を裏付けるものと考えられる (85)。今後のさらなる Chac1 の解析が、eIF2α-ATF4 経路を介したストレス応答によって引き起こされる 様々な疾患の発症と進行を防ぐ新たな知見を与えると考えられる。

# 第三章 Chac1 の翻訳および翻訳後の制御機構の解析

#### 3-1. 抄録

Chac1 は ER ストレス誘導性の遺伝子であり、GSH を分解する γ-glutamyl cyclotransferase としての機能を持つことが報告されている (43-49、54、55)。本研究 では Chac1 の翻訳と安定性について解析し、Chac1 mRNA 内の 5'UTR に存在する Kozak 様配列が Chac1 の翻訳に寄与することを見出した。加えて、5'UTR を含まな い Chac1 発現コンストラクトからは、Chac1 タンパク質コード領域の 2 番目の ATG コドンより翻訳された低分子型 Chac1 (△Chac1) が産生されることが分かった。 第二章より我々は、ユビキチン-プロテアソームシステムが Chac1 タンパク質の分解 に関与していることを明らかにしている。しかし、Chac1 発現は Ub 遺伝子を共発現 させることによって顕著に上昇した。さらに、免疫沈降法を用いて、Ub 分子が直接 Chac1 に結合していることと、リジン残基を全てアルギニンに置換した変異型 Chac1 も Ub 化されていることを明らかにした。最後に、野生型 Chac1 は細胞内 GSH レベ ルを減少させるが、△Chac1 は減少させないことを示した。以上より、Chac1 タンパク 質発現は 5'UTR 内の Kozak 様配列と Ub 仲介性の経路によって、翻訳および翻訳後 レベルで制御されていることを明らかにした。Chac1 タンパク質の発現調節における Ub による双方向性の制御は、病態生理学的な状況における GSH 恒常性を理解する上 で新しい知見となると考えられる。

32
## 3-2. 材料と方法

#### 3-2-1. 各種薬剤と抗体

CHX (cycloheximide)、 Baf (bafilomycin A1)、 ALLN (*N*-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-Lnorleucinal) は Sigma-Aldrich より購入した。Suc-LLVY-MCA は Peptide Institute か ら購入した。CMA (concanamycin A) は Wako より購入した。c-Myc、HA、LC-3 に対 する抗体はそれぞれ Santa Cruz Biotechnology、Clontech Laboratories、Medical & Biological Laboratories から購入した。

# 3-2-2. プラスミドの作製

マウス Chac1 遺伝子 (NM 026929) は PCR 法によって C57/BL6 マウス脳由来の mRNA から RT-PCR によって cDNA を増幅し、Chac1 タンパク質コード領域 (+162/+833) を pcDNA3.1 ベクターにクローニングした (pcDNA3.1-Chac1)。c-Myc 抗体によって Chac1 タンパク質を検出するために、Myc エピトープをアンチセンス プライマー (5'-TCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGGTCAGTGCCAGA GGC-3')を用いて PCR 法により pcDNA3.1-Chac1 の C 末端に直接付加し、 pcDNA3.1-Chac1-Myc (+162/+830; Chac1-Myc) を作製した (図 3-1 (A))。5'UTR 全長 (+1/+830; 5'-Chac1-Myc)、5'UTR の一部 (+82/+830; △5'Chac1-Myc)、翻訳開始点直前 の Kozak 様配列 (+156/+830; Kozak-Chac1-Myc) を含む Chac1 コンストラクトと 2 番目のメチオニンから翻訳された低分子型 Chac1 コンストラクト (+393/+830; △Chac1-Myc) は pcDNA3.1-Chac1-Myc を鋳型として PCR 法によって作製した (図 3-1 (A))。さらに、pcDNA3.1-Chac1-Myc を PCR 法の鋳型としてメチオニン残基をイ ソロイシンに置換することで、3 つの変異型コンストラクト (M11、M781、M1871; 図 3-2(C)) を作製し、また、pcDNA3.1-5'-Chac1-Myc を PCR 法の鋳型としてコード領域 の全てのリジン残基をアルギニンに置換することで、5'-Chac1(K0)-Myc(図 3-4(A))を 作製した。加えて、pcDNA3.1-5'-Chac1-Myc (WT、K0)-Myc から PCR 法によって終 止コドンと 5'UTR を除き、その PCR 産物を pcDNA3.1-MycHis ベクター (Life Technologies) にクローニングすることによって Chac1 (WT、K0)-MycHis を作製した。 Chac1 コード領域の 2-6 アミノ酸と 2-26 アミノ酸を欠いた 2 つの N 末端欠損型 コンストラクト (Kozak-Chac1 ( $\Delta$ 5)-Myc、Kozak-Chac1 ( $\Delta$ 25)-Myc) は pcDNA3.1Kozak-Chac1-Myc を鋳型として PCR 法によって作製した (図 3-5 (B))。N 末端に Myc タグの付いた Chac1 コンストラクト (Myc-Chac1; 図 3-5 (A)) を作製するため に、pcDNA3.1-Chac1 の Chac1 コード領域を pCMV-Myc ベクター (Clontech Laboratories) にサブクローニングして N 末端に Myc エピトープを付加し、その後、 pcDNA3.1 ベクターにサブクローニングした。Myc タグ内のリジンをアルギニンに置 換した変異型 Chac1 (K0) コンストラクト (+162/+830; Chac1 (K0)-Myc(KR)His) は Chac1 (K0)-MycHis を鋳型として PCR 法によって作製した。N 端に HA タグが付加 された野生型 (HA-Ub (WT)) と 48、63 番目のリジンのみを持つ単ーリジン変異型 Ub コンストラクト (HA-Ub (K48、K63)) は Dr. Kah-Leong LIM より供与された (86)。

#### 3-2-3. 細胞培養と薬剤処理

HEK293 細胞は 8% ウシ胎児血清と 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含んだ Dulbecco's Modified Eagle's Medium によって培養した。この研究における各コンスト ラクトのトランスフェクションはメーカーの説明に従い、polyethylenimine Max (Polysciences)を用いて行った (87)。HEK293 細胞は Tg (0.1 μM)、Tm (2 μg/mL)、 MG132 (20 μM)、CHX (10 μg/mL)、Baf (50 nM)、CMA (50 nM)、ALLN (10 μM) にて記 載の時間処理した。

# 3-2-4. RT-PCR

TRIzol にて細胞を溶解後、クロロホルムを加えて混和し、氷上で 10 分静置した。そ して、15,000 rpm、4°C で 10 分遠心後、上層を一定量移し、イソプロパノールを加え て混和した。氷上で 15 分放置後、15,000 rpm、4°C で 10 分遠心した。上清を除去の 後、70% エタノールを加え、8,500 rpm、4°C で 5 分遠心後、上清を除去し、沈殿物 を全 RNA として使用した。そして、DNase 処理を行った全 RNA を 72°C で 10 分 保温した後、全 RNA (0.5  $\mu$ g/10  $\mu$ L)、DTT (10 mM)、dNTP (0.5 mM)、random ninemers (0.05  $\mu$ g/10  $\mu$ L)、RNaseOUT (2 U/10  $\mu$ L)、prime superscript III RNase reverse transcriptase (25 U/10  $\mu$ L) を混合し、42°C で 60 分保温することで cDNA にした。 特定の遺伝子発現は以下に示すプライマーペア (1  $\mu$ M)、dNTP (0.1 mM)、rTaq (0.25 U/10  $\mu$ L) を含む PCR reaction mixture を使うことで増幅した。外因性の Chac1 mRNA を検出するために T7 primer、Chac1 antisense primer を用い、G3PDH mRNA を検出 するために、G3PDH sense primer、G3PDH antisense primer を用いた。

T7 primer; 5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3'、

Chac1 antisense primer; 5'-CTGTGTGGCAATGACCTCTTC-3'、

G3PDH sense primer; 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'、

G3PDH antisense primer; 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

典型的な反応条件は 96°C で 30 秒、58°C で 30 秒、72°C で 30 秒で行った。結果 は各遺伝子に適切なサイクル (20 から 34 サイクル) で増幅したのものが示してある。 cDNA 増幅産物は 2.0% のアガロースゲルを用いて電気泳動によって分離し、エチジ ウムブロマイドで可視化した。外因性 Chac1 遺伝子の相対的な mRNA 発現レベルは Image J software (National Institutes of Health; NIH) を用いて数値化し、Chac1-Myc の 値で標準化したものを示した。実験は複数回行い、再現性を確認した。

## 3-2-5. ウェスタンブロット法

細胞は homogenate buffer [20 mM Tris-HCI (pH 8.0)、137 mM NaCl、2 mM EDTA、10% グリセロール、1% Triton X-100、1 mM PMSF、10 µg/mL ロイペプチン、10 µg/mL ペ プスタチンA] で溶解した。各細胞溶解物を Bradford 法にて、タンパク量測定後、各 細胞溶解物は SDS Laemmli sample buffer [62.5 mM Tris-HCI (pH 6.8)、2% SDS、10% グリセロール] と混和した。等量の細胞溶解物を 12.5% または 15% ポリアクリルア ミド電気泳動ゲルを用いて分離し、polyvinylidene difluoride membranes に転写した。 そして、Chac1 (1:1,000)、c-Myc (1:1,000)、HA (1:1,000)、LC3 (1:3,000)、Actin (1:5,000) に対する抗体を用いて、ECL Detection System または Western Blotting Substrate Plus (Thermo Fisher Scientific) によって目的のバンドを検出した。バンド強度は Image J software によって解析した。実験は複数回行い、再現性を確認した。

## 3-2-6. 免疫沈降法

トランスフェクションを行った 60 mm ディッシュ上の HEK293 細胞を回収し、lysis buffer [20 mM Tris-HCI (pH8.0)、150 mM NaCI、1% Nonidet P-40、1 mM EDTA、1 mM PMSF、10 μg/mL ロイペプチン、10 μg/mL ペプスタチン A] で溶解した。溶解物は 12,000 x g で 6 分遠心し、可溶性画分を回収後、2 μg の c-Myc 抗体と Protein G Sepharose (GE Healthcare Bioscience) を用いて免疫沈降を行った。レジンに結合した タンパク質は wash buffer [20 mM Tris-HCI (pH 8.0)、150 mM NaCI、0.2% Nonidet P-40、1 mM EDTA、1 mM PMSF] で 3 回洗浄後、SDS Laemmli sample buffer に懸濁 し、ウェスタンブロット法によって解析した。実験は複数回行い、再現性を確認した。

#### 3-2-7. GSH 量の測定

細胞内の GSH 含量は Hisson と Hill の方法に従い、蛍光法により定量した (88)。簡 潔に述べると、回収した細胞沈殿物は 5 mM EDTA と 25% (w/v) メタリン酸溶液を含 む 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) に懸濁した。10,000 x g で 10 分遠心後、 各上清を 5 mM EDTA と 0.1% o-phthalaldehyde を含む 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) と 15 分反応させた。各サンプルの蛍光強度は励起波長 350 nm/蛍光 波長 420 nm で測定した。実験は複数回行い、再現性を確認した。

# 3-2-8. プロテアソーム活性測定

記載した条件の HEK293 細胞における 26S プロテアソーム活性を含むキモトリプシン様プロテアソーム活性は Mark FP らの方法に従い、蛍光法により定量した (89)。簡 潔に述べると、回収した細胞沈殿物は lysis buffer [1% (v/v) Triton X-100 を含む PBS (phosphate buffered saline)] に懸濁し、30 分氷上に静置した。16,500 x g で 15 分遠 心後、各上清を 20 µM MG132 存在下、非存在下で assay solution [30 mM Tris-HCI (pH 7.6)、2 mM MgCl、10 mM NaCl、10 mM KCl、0.5 mM DTT、1 mM ATP、100 µM Suc-LLVY-MCA] と 37°C で 60 分反応させた。各サンプルの蛍光強度は励起波長 360 nm/ 蛍光波長 450 nm で測定した。実験は複数回行い、再現性を確認した。

#### 3-2-9. 統計解析

結果は示してある回数の平均 ± 標準偏差で表した。統計解析は one way-ANOVA に より値を解析し、Tukey's 検定を行った。\*\*p < 0.01 は統計的に有意とみなす。

36

#### 3-3. 結果

## 3-3-1. ユビキチン-プロテアソームシステムによる Chac1 発現制御

マウス Chac1 mRNA は 5'UTR (+1/+161) とその下流のタンパク質コード領域 (+162/+833)、3'UTR (+834/+1583) で成り立っており、翻訳されると 223 アミノ酸 (aa) より成る (図 3-1 (A))。第二章の結果より、Chac1 発現コンストラクト (+162/+833) をトランスフェクションした Neuro2a 細胞において Chac1 はプロテ アソーム阻害剤である MG132 処理によって安定化することが分かった。よって、次に Chac1 mRNA 内の 5'UTR 領域、特に翻訳開始点直前に存在する Kozak 様配列 (GGCACC) に着目した。そこで、5'UTR 全長 (+1/+830; 5'-Chac1-Myc)、5'UTR のー 部 (+82/+830; △5'Chac1-Myc)、翻訳開始点直前の Kozak 様配列 (+156/+830; Kozak-Chac1-Myc) を含む Chac1 コンストラクトと 5'UTR を含まないコンストラクト (+162/+830; Chac1-Myc) を作製した (図 3-1 (A))。まず始めに、作製したコンストラク トの中で Chac1-Myc を HEK293 細胞にトランスフェクションし、ER ストレス誘導 剤である (Tg、Tm) とプロテアソーム阻害剤である MG132 で処理した (図 3-1 (B))。 第二章の結果と同様に、Chac1 タンパク質は MG132 処理によって安定化し、他の薬 剤ではほとんど効果がなかった。内因性 Chac1 タンパク質が MG132 処理によって 安定化するかを解析するために、Chac1 抗体を用いて MG132 処理、未処理下の HEK293 細胞における発現を検討した (図 3-1 (C))。結果として、内因性 Chac1 発現 は未処理下の細胞ではごくわずかであり、MG132 処理によって著しく増加した。従っ て、以降の実験は各 Chac1 コンストラクトを一過的にトランスフェクションすること により、タンパク質発現制御を解析した。次に、MG132 処理による Chac1 発現上昇 が翻訳後のタンパク質分解阻害によるものかを解析するために、タンパク質翻訳阻害剤 である CHX を用いた。強制発現した 5'-Chac1-Myc 遺伝子からの Chac1 は CHX 処 理によって時間依存的に分解され、CHX と MG132 の共処理によって著しく安定化し た (図 3-1 (D))。MG132 はオートファジーを活性化するという報告があるので (90)、 Chac1 の発現制御について、オートファジーとの関わりについて検討した。Chac1-Myc を強制発現した HEK293 細胞を MG132、オートファジー阻害剤 (Baf、CMA)、カルパ イン I 阻害剤 (ALLN) で処理した。結果として、Chac1 は MG132 処理で安定化した が、Baf、CMA、ALLN 処理では緩やかな安定化しか見られなかった (図 3-1 (E))。 図 31 (E) において、オートファジーマーカーである LC3-II (LC3-I にホスファチジルエタ ノールアミンが結合) は Baf、CMA 処理によって著しく増加したが (91)、MG132 処 理ではわずかな影響しか見られなかった。さらに、プロテアソームによる分解の基質と して知られている内因性の c-Myc タンパク質は MG132 の処理でのみ安定化し (92、 93)、他の薬剤処理では効果はなかった (図 3-1 (E))。これらの結果から、主にユビキチ ン-プロテアソームシステムによって Chac1 タンパク質発現が制御されていることが 示された。





#### 図 3-1. ユビキチン-プロテアソームシステムによる Chac1 発現制御

(A) 本研究で使用した Chac1 発現コンストラクトの模式図と Chac1 コード領域内のメ チオニン、リジン残基の位置 (NM\_026929、NCBI データベースより取得)。(B) HEK293 細 胞に空ベクター (mock) と Chac1-Myc をトランスフェクションした。24 時間後、Tg (0.1  $\mu$ M)、Tm (2  $\mu$ g/mL)、MG132 (MG) (20  $\mu$ M) または溶媒である DMSO (con) で 12 時間処 理した。そして、細胞溶解物を c-Myc または Actin 抗体を用いてウェスタンブロット法に より解析した。(C) HEK293 細胞を MG132 (MG) (20  $\mu$ M) または DMSO (con) で 12 時 間処理した。そして、細胞溶解物を Chac1 または Actin 抗体を用いてウェスタンブロット 法により解析した。(D) HEK293 細胞に 5'-Chac1-Myc をトランスフェクションした。24 時間後、CHX (10  $\mu$ g/mL) 単独または CHX と MG132 (MG) (20  $\mu$ M) で 記載の時間処理し た。そして、細胞溶解物を c-Myc または Actin 抗体を用いてウェスタンブロット 法により 解析した。バンド強度は Image J software によって数値化し、Actin の値で標準化した。 (E) HEK293 細胞に Chac1-Myc をトランスフェクションした。24 時間後、Baf (50 nM)、 CMA (50 nM)、ALLN (10  $\mu$ M)、MG132 (MG) (20  $\mu$ M) または DMSO (con) で 12 時間処理 した。そして、細胞溶解物を c-Myc、LC3 または Actin 抗体を用いてウェスタンブロット 法により解析した。 3-3-2. 5'UTR 内の Kozak 様配列による Chac1 翻訳上昇と 2 番目のメチオニンコ ドンから翻訳された低分子型 Chac1

Chac1 mRNA 内の 5'UTR がタンパク質の翻訳と安定化に寄与するかを解析するた めに、図 3-1 (A) に示す各 Chac1 コンストラクトを HEK293 細胞にトランスフェク ションした。その結果、Chac1 発現は翻訳開始点直前の Kozak 様配列の存在によって 顕著に上昇した (図 3-2 (A))。また、Chac1 が Kozak 様配列によって翻訳制御を受け ているかどうかを明らかにするために、各 5'UTR 欠損型コンストラクトをトランスフ ェクションした細胞における外因性 Chac1 mRNA 発現を比較した。図 3-2 (B) に示す ように、Kozak-Chac1-Myc、Chac1-Myc を強制発現した細胞における mRNA 発現は 同程度であり、5'-Chac1-Myc、∆5'-Chac1-Myc を強制発現した細胞では、発現がより低 かった。Chac1 はウェスタンブロット法によって通常約 30 kDa に検出されるが、 HEK293 細胞を MG132 で処理時、約 17 kDa にも △Chac1 が検出されることを見出 した (図 3-1 (B)、(E)、図 3-2 (A))。Chac1 mRNA のコード領域には推定上の翻訳開始 点の他に 2 つのメチオニンコドンが存在し (図 3-1(A))、△Chac1 はそのどちらかのメ チオニンコドンから翻訳されたものであると考えた。そこで、各メチオニンコドンをイ ソロイシンに置換した 3 つの変異型 Chac1 コンストラクト (Chac1 (M1I、M78I、 M187I)-Myc)) と 2 番目の ATG コドンの上流を欠いたコンストラクト (+393/+830; △Chac1-Myc)を作製した (図 3-1 (A))。Chac1 (WT)-Myc、Chac1 (M1I)-Myc、Chac1 (M187I)-Myc、△Chac1 (+393/+830)-Myc を強制発現した HEK293 細胞において △Chac1 は検出されたが、Chac1 (M78I)-Myc を強制発現したものでは検出されなかっ た (図 3-2(C))。従って、∆Chac1 はコード領域の 2 番目の ATG コドンから翻訳され たものであることが示唆された。

40





(A) HEK293 細胞に各 5'UTR 欠損型 Chac1 発現コンストラクトをトランスフェクション した。24 時間後、MG132 (+MG) (20  $\mu$ M) または溶媒である DMSO (-MG) で 12 時間処 理した。そして、細胞溶解物を c-Myc または Actin 抗体を用いてウェスタンブロット法に より解析した。(B) HEK293 細胞に各 5'UTR 欠損型 Chac1 発現コンストラクトをトラン スフェクションした。36 時間後、それぞれの細胞サンプルから抽出した全 RNA を用いて RT-PCR 法を行った。バンド強度は Image J software を用いて数値化し、Chac1-Myc の 値で標準化した。結果は 3 回の実験の平均 ± 標準偏差で表した。(C) HEK293 細胞に各 Chac1 発現コンストラクトをトランスフェクションした。24 時間後、MG132 (20  $\mu$ M) で 12 時間処理した。そして、細胞溶解物を c-Myc または Actin 抗体を用いてウェスタンブ ロット法により解析した。 3-3-3. HEK293 細胞における Ub 共発現による Chac1 の安定化と直接の Ub 化 Chac1 はユビキチン-プロテアソームシステムによって分解されることが示された ことから、その分解が Ub を強制発現させることによって進むのではないかと考え解 析を行った。5'-Chac1-Myc を N 端に HA タグが付加された野生型 Ub(HA-Ub(WT)) または 48、63 番目のリジン残基のみを持つ単一リジン変異型 Ub (HA-Ub (K48)、HA-Ub (K63)) コンストラクトと共にトランスフェクションした (86)。予想に反し、Chac1 は各 HA-Ub コンストラクトとの共発現によって安定化し、HA-Ub (K63) の効果が最 も顕著だった (図 3-3 (A))。HA-Ub (WT) との共発現による Chac1 発現上昇は HA-Ub (K48) による上昇と同程度だった。一方、内因性 c-Myc 発現は各 HA-Ub 強制発現に よって影響を受けなかった (図 3-3 (A))。そこで、各 HA-Ub コンストラクトを HEK293 細胞に強制発現した時のプロテアソーム活性への影響を検討した。その結果、活性は HA-Ub 発現によって変化せず、アッセイ中に MG132 を添加することによって減少し た (図 3-3 (B))。次に、HA-Ub (WT または K63) を強制発現した細胞において、Chac1 は直接 Ub 化されているかどうか、免疫沈降法を用いて解析した。Chac1-MycHis と HA-Ub (WT または K63) を共発現し、MG132 で処理した細胞溶解物の Myc 抗体に よる免疫沈降後に HA 抗体で検出したところ、高分子量のラダー状のバンドが検出さ れた (図 3-3(C)、(D))。興味深いことに、HA-Ub(K63) を共発現した細胞における Ub-Chac1 のバンドは HA-Ub (WT) を共発現したものと比較して弱い傾向を示した (図 3-3 (D))。



42



図 3-3. HEK293 細胞における Ub 共発現による Chac1 の安定化と直接の Ub 化 (A) HEK293 細胞に 5'-Chac1-Myc と HA-Ub (WT、K48 または K63) 発現コンストラク トをトランスフェクションした。24 時間後、MG132 (+MG) (20 μM) または DMSO (-MG) で 12 時間処理した。そして、細胞溶解物を c-Myc または Actin 抗体を用いてウェスタン ブロット法により解析した。(B) HEK293 細胞に pcDNA3.1 (mock) と HA-Ub (WT または K63) 発現コンストラクトをトランスフェクションした。36 時間後、細胞を回収し、プロテ アソーム活性の測定を行った。結果は異なる 3 wells より得られた値の平均 ± 標準偏差 で表した。(C) HEK293 細胞に Chac1-MycHis と HA-Ub (WT) 発現コンストラクトをトラ ンスフェクションした。24 時間後、MG132 (20 μM) で 12 時間処理した。そして、細胞溶 解物を c-Myc 抗体と Protein G Sepharose により免疫沈降し、HA または c-Myc 抗体を 用いてウェスタンブロット法により解析した。免疫沈降を行わない細胞溶解物 (Input) は c-Myc 抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。(D) HEK293 細胞に Chac1-MycHis と HA-Ub (WT または K63) 発現コンストラクトをトランスフェクションした。 24 時間後、MG132 (20 µM) で 12 時間処理した。そして、細胞溶解物を c-Myc 抗体と Protein G Sepharose により免疫沈降し、HA または c-Myc 抗体を用いてウェスタンブロ ット法により解析した。免疫沈降を行わない細胞溶解物 (Input) は c-Myc 抗体を用いてウ ェスタンブロット法により解析した。Ub-Chac1 は Ub 化された Chac1 を表す。

3-3-4. HEK293 細胞におけるリジンを含まない変異型 Chac1 (K0) 発現に対する Ub 共発現と MG132 処理の効果

Ub を強制発現した細胞において Chac1 が直接 Ub 化されることが分かったので、 多くの Ub 化タンパク質と同様に、Chac1 もそのリジン残基に Ub が付加されている のかどうか解析を行った。マウス Chac1 のコード領域には 5 つのリジン残基がある ことから (図 3-1 (A))、それらのリジン残基をアルギニンに置換した変異型 Chac1 (K0) コンストラクト (+1/+830; 5'-Chac1 (K0)-Myc) を作製した。HEK293 細胞に 5'-Chac1 (WT)-Myc または 5'-Chac1 (K0)-Myc をトランスフェクションし、さらに HA-Ub (WT) を共発現もしくは MG132 で処理した。HA-Ub(WT) との共発現、MG132 処理によっ て Chac1 (WT)-Myc と Chac1 (K0)-Myc は発現が上昇した (図 3-4 (A))。そこで、次 に変異型 Chac1 (K0) が直接 Ub 化されているかを解析した。Chac1 (K0)-MycHis と HA-Ub (WT) を共発現し、MG132 で処理した細胞溶解物の Myc 抗体による免疫沈降 後に HA 抗体で検出したところ、Ub-Chac1 のバンドが検出された (図 3-4 (B))。Myc タグは本研究の様なタンパク質の Ub 化と分解の研究に用いられているが、Myc タグ 内にもリジン残基が 1 つ存在する。そこで、Myc タグ内のリジンをアルギニンに置換 した変異型 Chac1 (K0) コンストラクト (+162/+830; Chac1 (K0)-Myc(KR)His) を作製 し、HA-Ub (WT) 共発現と MG132 処理の効果を検証した。その結果、リジン残基を持 たない Chac1 (K0)-Myc(KR)His の発現は Ub 共発現によって上昇し、MG132 処理条 件下で直接 Ub 化されることが示唆された (図 3-4 (C)、(D))。





# 図 3-4. HEK293 細胞におけるリジンを含まない変異型 Chac1 (K0) 発現に対する Ub 共 発現と MG132 処理の効果

(A) HEK293 細胞に 5'-Chac1-Myc (WT または K0) と HA-Ub (WT) 発現コンストラクト をトランスフェクションした。24 時間後、MG132(MG)(20μM) または溶媒である DMSO で 12 時間処理した。そして、細胞溶解物を c-Myc または Actin 抗体を用いてウェスタン ブロット法により解析した。(B) HEK293 細胞に Chac1 (WT または K0)-MycHis と HA-Ub (WT) 発現コンストラクトをトランスフェクションした。24 時間後、MG132 (20 µM) で 12 時間処理した。そして、細胞溶解物を c-Myc 抗体と Protein G Sepharose により免 疫沈降し、HA または c-Myc 抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。免疫沈 降を行わない細胞溶解物 (Input) は c-Myc 抗体を用いてウェスタンブロット法により解 析した。(C) HEK293 細胞に Chac1 (K0)-Myc(KR)His と HA-Ub (WT) 発現コンストラク トをトランスフェクションした。24 時間後、MG132 (MG) (20 μM) または DMSO で 12 時間処理した。そして、細胞溶解物を c-Myc または Actin 抗体を用いてウェスタンブロッ ト法により解析した。(D) HEK293 細胞に Chac1 (K0)-Myc(KR)His と HA-Ub (WT) 発現 コンストラクトをトランスフェクションした。24 時間後、MG132 (20 µM) で 12 時間処 理した。そして、細胞溶解物を c-Myc 抗体と Protein G Sepharose により免疫沈降し、HA または c-Myc 抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。免疫沈降を行わない細 胞溶解物 (Input) は c-Myc 抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。Ub-Chac1 は Ub 化された Chac1 を表す。

3-3-5. Ub 共発現による安定化とプロテアソームによる分解に対する Chac1 N 末端 領域の寄与について

ユビキチン-プロテアソームシステムによる p21、ERK3、Cyclin G1 の分解はリジン 残基の Ub 化ではなく、N 末端のメチオニン残基に Ub が付加されることで引き起こ される (21-24)。それらのタンパク質は N 末端のメチオニンに Myc タグを付加する ことで安定化することから、Kozak 配列 (CCCACC) の付いた Myc タグを Chac1 の N 末端に付加したコンストラクトを作製した (+162/+833; Myc-Chac1)。そして、Myc-Chac1 と Kozak-Chac1-Myc 発現に対する HA-Ub (WT または K63) 共発現と MG132 処理の効果を検証した。Myc-Chac1 強制発現は未処理の細胞において Kozak-Chac1-Myc よりも高い Chac1 発現レベルを示したが、HA-Ub (K63) 共発現、MG132 処理によって共に発現が増加した (図 3-5 (A))。また、それらの処理によって、Myc-Chac1 のバンドよりも高分子量の位置にラダー状のバンドが検出された。Chac1 翻訳 開始点の次のアミノ酸はリジン残基 (K2) であり、また Chac1 コード領域の N 末端 側にはプロリンが豊富な領域 (10-24 aa) が存在し、それらの配列はマウスとヒトの遺 伝子間でよく保存されている。そこで、Chac1 の N 末端領域が安定化に寄与するかど うかを解析するために、N 末端領域の 2-6 aa、2-26 aa が欠損したコンストラクトを 作製した (Kozak-Chac1 (△5)-Myc、Kozak-Chac1 (△25)-Myc)。図 3-5 (B) に示すように、 Ub 共発現、MG132 処理によって野生型 Chac1 と同様に欠損型 Chac1 も発現が上 昇した。





# 図 3-5. Ub 共発現による安定化とプロテアソームによる分解に対する Chac1 N 末端領域 の寄与について

(A) HEK293 細胞に Myc-Chac1 または Kozak-Chac1-Myc と HA-Ub (WT または K63) 発現コンストラクトをトランスフェクションした。24 時間後、MG132 (MG) (20  $\mu$ M) また は溶媒である DMSO で 12 時間処理した。そして、細胞溶解物を c-Myc または Actin 抗 体を用いてウェスタンブロット法により解析した。(B) HEK293 細胞に Kozak-Chac1 ( $\Delta$ 5、  $\Delta$ 25 または WT)-Myc と HA-Ub (WT または K63) 発現コンストラクトをトランスフェク ションした。24 時間後、MG132 (MG) (20  $\mu$ M) または DMSO で 12 時間処理した。そし て、細胞溶解物を c-Myc または Actin 抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。 3-3-6. 野生型、低分子型 Chac1 発現が細胞内 GSH 量に及ぼす影響

Chac1 はその酵素活性部位である E116 (マウス)、E115 (ヒト) を介して細胞内 GSH を特異的に分解することが報告されている (51、54、55)。よって、最後に  $\Delta$ Chac1 が酵素活性を持つかどうかを HEK293 細胞に  $\Delta$ Chac1-Myc、Chac1-Myc または 5'-Chac1-Myc をトランスフェクションすることによって解析した。図 3-6 (A) に示すよ うに、それぞれの Chac1 発現量は異なっていた。Chac1-Myc、5'-Chac1-Myc 強制発 現によって、細胞内 GSH 量は同程度、有意に減少した (\*\*p < 0.01)。しかし、 $\Delta$ Chac1 は酵素活性部位 (E116) を含むのにも関わらず、GSH 量に影響を及ぼさなかった (図 3-6 (B))。



#### 図 3-6. 野生型、低分子型 Chac1 発現が細胞内 GSH 量に及ぼす影響

(A) HEK293 細胞に空ベクター (mock) または各 Chac1 発現コンストラクトをトランス フェクションした。24 時間後、MG132 (+MG) (20  $\mu$ M) または溶媒である DMSO (-MG) で 12 時間処理した。そして、細胞溶解物を c-Myc または Actin 抗体を用いてウェスタンブ ロット法により解析した。(B) HEK293 細胞に空ベクター (mock) または各 Chac1 発現コ ンストラクトをトランスフェクションした。36 時間後、細胞を回収し、細胞内 GSH 量を 測定した。結果は異なる 3 wells より得られた値の平均 ± 標準偏差で表した (\*\*p < 0.01)。

#### 3-4. 考察

本研究では、Chac1 mRNA 内の 5'UTR に存在する Kozak 様配列が Chac1 発現を 増加させ、最初のメチオニンコドンからの翻訳を規定していることを見出した。この配 列の非存在下では、下流の 2 番目のメチオニンコドンからの翻訳も可能となり、低分 子型 Chac1 が産生された。また、Chac1 の発現レベルは主にユビキチン-プロテアソ ームシステムによって制御されていることを明らかにした。プロテアソームによるタン パク質分解は、特異的な Ub を付加する酵素により連続的な Ub 分子の結合を介して 行われることがよく知られているが、Chac1 と HA-Ub コンストラクトとの共発現に よって Chac1 発現レベルは増加した (図 3-3)。興味深いことに、変異型 Chac1 (K0)、 N 末端欠損型 Chac1 (Δ5、Δ25) 発現も Ub との共発現によって増加した (図 3-4、3-5)。さらに、細胞内 GSH 量は野生型 Chac1 発現によって有意に減少したが、翻訳領 域にある 2 つ目の ATG コドンから合成された酵素活性部位である 116 番目のグルタ ミン酸残基を含む ΔChac1 では減少しなかった (図 3-6)。

第二章で、Chac1 発現コンストラクト (+162/+833) をトランスフェクションした Neuro2a 細胞において Chac1 が MG132 処理で安定化することを明らかにした。こ の結果に一致して、HEK293 細胞に強制発現した Chac1-Myc は MG132 処理によっ て安定化し、内因性 Chac1 タンパク質発現も MG132 存在下で増加した (図 3-1 (B)、 (C))。よって、内因性と外因性 Chac1 は共にユビキチン-プロテアソームシステムによ って制御されていることが示唆された。Chac1 は翻訳後、MG132 処理によって安定化 されるが (図 3-1 (D))、一方で、オートファジー阻害剤である Baf、CMA 処理により、 わずかに発現レベルが増加することから、一部はオートファジーによって分解されてい ることが示唆された (図 3-1 (E))。また、ALLN は一般的にカルパイン I 阻害剤として 使用されているが、プロテアソームのトリプシン様、キモトリプシン様、カスパーゼ様 タンパク質分解活性を抑制することが報告されている (94-96)。以上のことから、本研 究の条件における ALLN 処理による Chac1 発現上昇は、プロテアソーム活性に及ぼ す影響を反映したものであると考えられる。

本研究では、Chac1 は 30 kDa 付近に 2 本のバンドとして検出された。そこで、N 型糖鎖修飾阻害剤 Tm による Chac1 発現に対する効果を解析したが、2 本のバンド に変化は見られなかった (図 3-1 (B))。加えて、N 末端または C 末端に Myc タグを付

49

加した Chac1 はいずれも 2 本のバンドとして検出されたことから (図 3-5 (A))、 Chac1 は両末端付近で切断を受けていないものと考えられる。また、Ub の分子量 (約 9kDa) を考えると、Ub の付加によるバンドシフトが起こったとは考えにくい。多くの タンパク質はその機能を変化させるために、様々な翻訳後修飾 (例えば、リン酸化、ア セチル化など) を受ける。従って、2 本のバンドに関してより詳細に解析すれば、Chac1 の酵素活性制御に関する理解が深まると考えられる。

ATG コドン直前の Kozak 配列は翻訳を促進することが報告されている (97)。マウ ス、ラット、ヒト Chac1 mRNA の 5'UTR を比較すると、推定上の翻訳開始点直前の Kozak 様配列も含め高度に保存されており (図 1-5)、Kozak 様配列が Chac1 タンパ ク質発現を促進するのに重要な役割を担っていることを示した (図 3-2 (A))。また、 Kozak-Chac1-Myc を強制発現した細胞における Chac1 mRNA 発現は、5'-Chac1-Myc、 Δ5'-Chac1-Myc を強制発現した細胞における発現より高かった (図 3-2 (B))。Kozak-Chac1-Myc 発現細胞における Chac1 タンパク発現は 5'-Chac1-Myc 発現細胞と同程 度だったので、Kozak 様配列に加えて Chac15'UTR 内の他の領域も Chac1 発現に寄 与するものと考えられる。従って、Chac1 の翻訳を上昇させる上で Kozak 様配列は重 要な役割を担っているが、5'UTR による Chac1 発現制御はより複雑なものであると 思われる。

MG132 処理により Chac1 発現が増加するにも関わらず、HEK293 細胞では Ub 共発現によって、Chac1 発現は増加し、Chac1 タンパク質は直接 Ub 化されていた (図 3-3)。一方、Ub 強制発現はプロテアソーム活性に影響を及ぼさなかった。Chac1 の Ub 化がどのように安定化と分解を制御しているかは明らかではない。外因性 Chac1 と比較して、内因性 c-Myc は MG132 処理によって上昇するにも関わらず、Ub 強制 発現による影響を受けなかった (図 3-3 (A))。HEK293 細胞の高いトランスフェクショ ン効率を考慮に入れると、発現した Ub が内因性 c-Myc を増加させるのに不十分とは 考えにくい。これらの結果は Chac1 と c-Myc は両方ともプロテアソームの基質であ るが、異なる機構でタンパク質発現が制御されていることを示唆する。加えて、HA-Ub (K63) の共発現は Chac1 発現を著しく増加させたが、免疫沈降法により検出した HA-Ub (K63) による Chac1 の Ub 化の程度は HA-Ub (WT) による Ub 化と比較して、 低い傾向を示した (図 3-3 (D))。この HA-Ub (K63) 共発現による Chac1 の安定化の 機構については、今後さらなる検討が必要と思われる。NF-кB (nuclear factor-kappa B)、

50

Nrf2 経路の場合、co-factor である IkB (inhibitor of kappa B)、Keap1 (kelch like ECH associated protein 1) のユビキチン-プロテアソームシステムによる分解が、それら分子 の安定化において重要である (98、99)。また、同じタンパク質の分解と安定化が異な るユビキチンリガーゼ酵素複合体によって、違う様式の polyUb 化を介して制御される 報告もある (Myc の場合: SCF (Fbw7) と SCF (β-TrCP)、Cryptochromes の場合: FBXL3 と FBXL21)(100、101)。よって、Chac1 においてもこのような Ub 化の差異 がプロテアソームによる分解と安定化を制御している可能性が考えられる。従って、 Chac1 に特異的な Ub 結合に関わる酵素の同定が、その翻訳後制御機構を同定する上 で重要と考えられる。さらに、E2 である UbcH5 と U-box 型 E3 である CHIP (C-terminus of Hsc-70-interacting protein) の組み合わせによって、Ub の 7 つのリジン残 基全てを介するイソペプチド結合を含む polyUb 鎖が形成され、そのヘテロな polyUb 鎖はプロテアソームによる基質タンパク質の分解を阻害するという報告がある (102)。今後、様々な単ーリジン変異型コンストラクトを用いて、どのような様式の polyUb 鎖 が Chac1 の安定化、分解に関わっているかを明らかにすることで新たな知見が得られ るかもしれない。

今回作製した全てのリジン残基をアルギニンに置換した変異型 Chac1 (K0) は、野生 型と同様にプロテアソーム阻害と Ub 共発現によって発現が上昇し、MG132 処理条件 下で直接 Ub 化されることを示した (図 3-4)。これらの結果は、Chac1 の Ub 化がリ ジン残基を介するものではないことを示唆する。また、リジンを置換した変異型 p21、 ERK3、Cyclin G1 においても野生型と同様にユビキチン-プロテアソームシステムによ って分解されることが報告されている (21-24)。以上より、Chac1 は非標準的な Ub 化 経路によって制御されていることが示唆された。いくつかの基質タンパク質では N 末 端のメチオニンが特異的に Ub 化され、N 末端への Myc タグの付加によってそのタ ンパク質は安定化することが報告されている (20-24)。本研究では、Chac1 の N 末端 に Myc タグを付加させた Myc-Chac1 と Kozak 配列を付加させた Kozak-Chac1-Myc を強制発現した細胞における Chac1 発現は HA-Ub (K63) 共発現と MG132 処 理によって上昇したが、HA-Ub (WT) の共発現では効果を示さなかった (図 3-5 (A))。 一方、N 末端領域を欠いた Chac1 (△5、△25) は HA-Ub (WT または K63) 共発現と MG132 処理によって発現が上昇した (図 3-5 (B))。Myc-Chac1 は一部異なる結果を示 したが、以上の結果より、Chac1 の N 末端領域は Ub 化による安定化と分解に深く 関与していないことが示唆された。また、予備実験から、タグを持たない Kozak-Chac1 コンストラクトを強制発現した時も Ub 共発現や MG132 処理に対し、Kozak-Chac1-Myc と近い応答を示すことが分かっている。

本研究においては、ウェスタンブロット法によって Ub 化された Chac1 に相当す るバンド (Ub-Chac1) が高分子量サイズに広く検出されたが、その Ub 化部位につい ては不明なままである。リジン、メチオニン残基以外にも、システイン、セリン、トレ オニン、チロシン残基も Ub 化部位に成り得ることが報告されている (25-28)。よって、 これらの部位の Ub 化が Chac1 タンパク質の安定化とプロテアソームによる分解に 関与している可能性がある。また、我々は長さの異なる欠損型 Chac1 (1-77 aa、1-130 aa、1-186 aa、78-223 aa) コンストラクトを用いた検討により、これらの欠損型 Chac1 も全て Ub 共発現や MG132 処理によって安定化するという知見を得ている。つまり、 Chac1 には多くの Ub 化部位があると考えられる。従って、Chac1 の翻訳後制御につ いて理解するためには Chac1 の polyUb 化様式と Ub 化部位の同定が必要と考えら れる。

今回の実験条件では、5'-Chac1-Myc 強制発現は Chac1-Myc と比較して Chac1 タ ンパク質の発現量が高かった (図 3-6 (A))。しかし、ウェスタンブロット法によるその 違いは細胞内 GSH 量の減少に反映されなかった (図 3-6 (B))。GSH はその生合成の 律速酵素である γ-glutamylcysteine synthetase の活性を阻害し、GSH 減少がそのフィ ードバック阻害から γ-glutamylcysteine synthetase を開放するという報告がある (103、104)。よって、Chac1 の発現レベルと細胞内 GSH 量に単純な相関関係が見ら れなかったことは、Chac1 活性の制御に関わる未同定の因子が存在すると考えられる。 一方、ΔChac1 は酵素活性部位 (E116) を含んでいるのにも関わらず、細胞内 GSH 量 に影響を及ぼさなかった。この結果から、適切な構造の維持や GSH との相互作用によ る γ-glutamyl cyclotransferase 活性に Chac1 の N 末端領域 (1-77 aa) が不可欠であ ることが示唆される。従って、Chac1 タンパク質の三次元構造解析がさらなるこの酵 素活性の理解に必要とされる。

以上より、Chac1 5'UTR が野生型と低分子型 Chac1 発現に関して重要な役割を担っており、Chac1 タンパク質の発現レベルは主に Ub 化によって双方向性に制御されることを示した。Chac1 の基質である GSH は酸化ストレス誘導性の様々な病理学的症状の抑制に寄与することが知られている (105-107)。従って、Chac1 発現機構をさら

52

に解析することは、酸化ストレス関連性の疾患の病態理解および新たな治療法開発に 繋がるものと期待される。

## 第四章 総括

Chac1 は種々の病態モデルやストレス刺激によって、その mRNA 発現が上昇する ことが報告されている (43-49、52)。しかし、Chac1 の発現制御機構については不明な 点が多い。よって、本研究では Chac1 mRNA およびタンパク質の発現制御について解 析を行った。

Neuro2a 細胞において ER ストレス誘導剤により Chac1 mRNA 発現は上昇し、マ ウス Chac1 プロモーター活性も CREB/ATF、AARE 配列を介して有意に上昇した。 そして、その活性上昇には主に ATF4 が関与していた。しかし、forskolin、PMA 処理 による PKA、PKC 依存的なシグナル経路はそれらの上昇に影響を及ぼさなかった。一 方、Mangrue らは HEK293 細胞、ヒト骨肉腫細胞において ATF4 によるヒト Chac1 プロモーター活性上昇には CREB/ATF 配列に加えて、CREB/ATF と AARE 配列間に 存在する ACM (ATF/CRE modifier; CCTTGCTGCA) 配列が関与することを報告してい る (51)。また、ATF4 は他の転写因子と相互作用し、転写を制御することが報告されて いる (72、76-78)。よって、ATF4 も含めた他の転写因子の Chac1 プロモーター活性 へ与える影響の解析が Chac1 遺伝子の発現制御を詳しく知るうえで、必要であると考 えられる。

さらに、本研究では、各 Chac1 コンストラクトの強制発現による解析から、Chac1 mRNA 内の翻訳開始点直前の Kozak 様配列が、Chac1 の翻訳上昇に寄与し、プロテ アソーム阻害条件下での低分子型 Chac1 の発現抑制を導くという結果を得た。また、 Neuro2a、HEK293 細胞において外因性 Chac1 タンパク質がプロテアソーム阻害剤に よって安定化すること、また、HEK293 細胞においては内因性 Chac1 の安定化も検出 できた。さらに、Chac1 は Ub との共発現によって安定化し、直接 Ub 化されること が分かり、Chac1 が Ub 化によって分解と安定化の双方向性の制御を受けていること が示唆された。しかし、Ub 化の様式やユビキチンリガーゼ複合体の同定はできていな いため、その制御機構については不明なままである。現在までに、Ub 化によって双方 向性の制御を受けるタンパク質は Myc と Cryptochromes のみしか報告がない (100、 101)。よって、今後は全長型、低分子型を含めた内因性の Chac1 タンパク質の発現や ユビキチン-プロテアソームシステムによる制御の解析が必要と思われる。 神経変性疾患をはじめとする多くの疾患において、UPR の活性化とユビキチン-プロ テアソームシステムの破綻が起こることが報告されている (図 1-3)。従って、そのよう な状況下における Chac1 発現の上昇が、GSH 分解や ROS 蓄積を引き起こし、酸化 ストレス誘導性疾患の発症・悪化に寄与している可能性が考えられる。過去においても、 亜ヒ酸処理による Chac1 の発現上昇が GSH の分解を誘導し、細胞死を引き起こすと いう報告がある (108)。GSH は酸化ストレスの抑制のみならず、シグナル伝達、細胞 周期制御、細胞分化などにも関与している (109、110)。よって、Chac1 は GSH の分 解を介して、このような生理学的な過程にも関わっている可能性がある。

以上より、GSH 分解活性を持つ Chac1 の発現と ER ストレスやユビキチン-プロ テアソームシステムとの関わりが明らかとなった。今後、Chac1 発現の変化と GSH 枯 渇に起因する疾患の関連を解明することが、さらなる病態理解および治療法開発に繋が るものと期待される。 本研究を遂行するにあたり、研究の方向性を指南、さらに、丁寧で的確なご助言、ご 指導をしていただいた連合創薬医療情報研究科 大橋憲太郎准教授に深く感謝致します。 また、ご指導、ご教示を受け賜りました連合創薬医療情報研究科 平田洋子教授、生命 科学総合研究支援センター 木内一壽特任教授に深く感謝申し上げます。

また、多くのご助言を頂き、ご相談にも乗っていただいた本研究室の皆様に心より感 謝申し上げます。

# 引用文献

- Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. Biochim Biophys Acta 1833, 3460-3470 (2013).
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature 397, 271-274 (1999).
- Liu CY, Schröder M, Kaufman RJ. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 275, 24881-24885 (2000).
- Takayanagi S, Fukuda R, Takeuchi Y, Tsukada S, Yoshida K. Gene regulatory network of unfolded protein response genes in endoplasmic reticulum stress. Cell Stress Chaperones 18, 11-23 (2013).
- Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. J Mol Biol 318, 1351-1365 (2002).
- Maytin EV, Ubeda M, Lin JC, Habener JF. Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. Exp Cell Res 267, 193-204 (2001).
- Barone MV, Crozat A, Tabaee A, Philipson L, Ron D. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. Genes Dev 8, 453-464 (1994).
- Okada T, Haze K, Nadanaka S, Yoshida H, Seidah NG, Hirano Y, Sato R, Negishi M, Mori K. A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. J Biol Chem 278, 31024-31032 (2003).
- Chen L, Li Q, She T, Li H, Yue Y, Gao S, Yan T, Liu S, Ma J, Wang Y. IRE1α-XBP1 signaling pathway, a potential therapeutic target in multiple myeloma. Leuk Res 49, 7-12 (2016).
- 10. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element

responsible for the mammalian unfolded protein response. Mol Cell Biol 20, 6755-6767 (2000).

- Ma Y, Hendershot LM. Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. J Biol Chem 279, 13792-13799 (2004).
- Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cisacting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. J Biochem 136, 343-350 (2004).
- 13. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. Annu Rev Biochem 78, 477-513 (2009).
- Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. Mol Aspects Med 30, 191-296 (2009).
- Lim KL, Lim GG. K63-linked ubiquitination and neurodegeneration. Neurobiol Dis 43, 9-16 (2011).
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. Cell 103, 351-361 (2000).
- 17. Lipford JR, Smith GT, Chi Y, Deshaies RJ. A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. Nature 438, 113-116 (2005).
- Polge C, Attaix D, Taillandier D. Role of E2-Ub-conjugating enzymes during skeletal muscle atrophy. Front Physiol 6, 59 (2015).
- 19. Liu J, Shaik S, Dai X, Wu Q, Zhou X, Wang Z, Wei W. Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment. Biochim Biophys Acta 1855, 50-60 (2015).
- McDowell GS, Philpott A. Non-canonical ubiquitylation: mechanisms and consequences. Int J Biochem Cell Biol 45, 1833-1842 (2013).
- 21. Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. Cell 115, 71-82 (2003).
- 22. Coulombe P, Rodier G, Bonneil E, Thibault P, Meloche S. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the

proteasome. Mol Cell Biol 24, 6140-6150 (2004).

- Li H, Okamoto K, Peart MJ, Prives C. Lysine-independent turnover of cyclin G1 can be stabilized by B'alpha subunits of protein phosphatase 2A. Mol Cell Biol 29, 919-928 (2009).
- Ciechanover A, Ben-Saadon R. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join In. Trends Cell Biol 14, 103-106 (2004).
- Wang X, Herr RA, Chua WJ, Lybarger L, Wiertz EJ, Hansen TH. Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. J Cell Biol 177, 613-624 (2007).
- Tokarev AA, Munguia J, Guatelli JC. Serine-threonine ubiquitination mediates downregulation of BST-2/tetherin and relief of restricted virion release by HIV-1 Vpu. J Virol 85, 51-63 (2011).
- Cadwell K, Coscoy L. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. Science 309, 127-130 (2005).
- Léon S, Subramani S. A conserved cysteine residue of Pichia pastoris Pex20p is essential for its recycling from the peroxisome to the cytosol. J Biol Chem 282, 7424-7430 (2007).
- Dufey E, Sepúlveda D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. Am J Physiol Cell Physiol 307, C582-94 (2014).
- 30. Paul S. Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. Bioessays 11-12, 1172-1184 (2008).
- Li JQ, Yu JT, Jiang T, Tan L. Endoplasmic reticulum dysfunction in Alzheimer's disease. Mol Neurobiol 51, 383-395 (2015).
- Mercado G, Castillo V, Soto P, Sidhu A. ER stress and Parkinson's disease: Pathological inputs that converge into the secretory pathway. Brain Res 1648, 626-632 (2016).
- Overk CR, Masliah E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. Biochem Pharmacol 88, 508-516 (2014).
- 34. Fonseca AC, Oliveira CR, Pereira CF, Cardoso SM. Loss of proteostasis induced by

amyloid beta peptide in brain endothelial cells. Biochim Biophys Acta 1843, 1150-1161 (2014).

- Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. α-Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. Mol Neurobiol 47, 537-551 (2013).
- Takahashi R, Imai Y. Pael receptor, endoplasmic reticulum stress, and Parkinson's disease. J. Neurol 250 (Suppl 3), III25-9 (2003).
- Ying H, Xiao ZX. Targeting retinoblastoma protein for degradation by proteasomes. Cell Cycle 5, 506-508 (2006).
- Yadav RK, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and cancer. J Cancer Prev 19, 75-88 (2014).
- Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. Eur J Pharmacol 625, 234-246 (2009).
- 40. Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. Annu Rev Med 57, 33-47 (2006).
- Backer JM, Krivoshein AV, Hamby CV, Pizzonia J, Gilbert KS, Ray YS, Brand H, Paton AW, Paton JC, Backer MV. Chaperone-targeting cytotoxin and endoplasmic reticulum stress-inducing drug synergize to kill cancer cells. Neoplasia 11, 1165-1173 (2009).
- 42. Gargalovic PS, Imura M, Zhang B, Gharavi NM, Clark MJ, Pagnon J, Yang WP, He A, Truong A, Patel S, Nelson SF, Horvath S, Berliner JA, Kirchgessner TG, Lusis AJ. Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids. Proc Natl Acad Sci USA 103, 12741-12746 (2006).
- Mungrue IN, Pagnon J, Kohannim O, Gargalovic PS, Lusis AJ. CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. J Immunol 182, 466-476 (2009).
- Bower NI, Johnston IA. Discovery and characterization of nutritionally regulated genes associated with muscle growth in Atlantic salmon. Physiol Genomics 42, 114-130 (2010).

- 45. Magne L, Blanc E, Legrand B, Lucas D, Barouki R, Rouach H, Garlatti M. ATF4 and the integrated stress response are induced by ethanol and cytochrome P450 2E1 in human hepatocytes. J Hepatol 54, 729-737 (2011).
- 46. Galluzzi L, De Santi M, Crinelli R, De Marco C, Zaffaroni N, Duranti A, Brandi G, Magnani M. Induction of endoplasmic reticulum stress response by the indole-3carbinol cyclic tetrameric derivative CTet in human breast cancer cell lines. PLoS One 7, e43249 (2012).
- 47. Selvik LK, Fjeldbo CS, Flatberg A, Steigedal TS, Misund K, Anderssen E, Doseth B, Langaas M, Tripathi S, Beisvag V, Lægreid A, Thommesen L, Bruland T. The duration of gastrin treatment affects global gene expression and molecular responses involved in ER stress and anti-apoptosis. BMC Genomics 14, 429 (2013).
- Joo JH, Ueda E, Bortner CD, Yang XP, Liao G, Jetten AM. Farnesol activates the intrinsic pathway of apoptosis and the ATF4-ATF3-CHOP cascade of ER stress in human T lymphoblastic leukemia Molt4 cells. Biochem Pharmacol 97, 256-268 (2015).
- Dixon SJ, Patel DN, Welsch M, Skouta R, Lee ED, Hayano M, Thomas AG, Gleason CE, Tatonetti NP, Slusher BS, Stockwell BR. Pharmacological inhibition of cystineglutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. eLife 3, e02523 (2014).
- 50. Romanoski CE, Che N, Yin F, Mai N, Pouldar D, Civelek M, Pan C, Lee S, Vakili L, Yang WP, Kayne P, Mungrue IN, Araujo JA, Berliner JA, Lusis AJ. Network for activation of human endothelial cells by oxidized phospholipids: a critical role of heme oxygenase 1. Circ Res 109, e27-41 (2011).
- Crawford RR, Prescott ET, Sylvester CF, Higdon AN, Shan J, Kilberg MS, Mungrue IN. Human CHAC1 Protein Degrades Glutathione, and mRNA Induction Is Regulated by the Transcription Factors ATF4 and ATF3 and a Bipartite ATF/CRE Regulatory Element. J Biol Chem 290, 15878-15891 (2015).
- 52. Goebel G, Berger R, Strasak AM, Egle D, Müller-Holzner E, Schmidt S, Rainer J, Presul E, Parson W, Lang S, Jones A, Widschwendter M, Fiegl H. Elevated mRNA expression of CHAC1 splicing variants is associated with poor outcome for breast

and ovarian cancer patients. Br J Cancer 106, 189-198 (2012).

- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease, Biomed Pharmacother 57, 145-155 (2003).
- 54. Kumar A, Tikoo S, Maity S, Sengupta S, Sengupta S, Kaur A, Bachhawat AK. Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as γ-glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. EMBO Rep 13, 1095-1101 (2012).
- 55. Tsunoda S, Avezov E, Zyryanova A, Konno T, Mendes-Silva L, Pinho Melo E, Harding HP, Ron D. Intact protein folding in the glutathione-depleted endoplasmic reticulum implicates alternative protein thiol reductants. eLife 3, e03421 (2014).
- Chi Z, Zhang J, Tokunaga A, Harraz MM, Byrne ST, Dolinko A, Xu J, Blackshaw S, Gaiano N, Dawson TM, Dawson VL. Botch promotes neurogenesis by antagonizing Notch. Dev Cell 22, 707-720 (2012).
- 57. Chi Z, Byrne ST, Dolinko A, Harraz MM, Kim MS, Umanah G, Zhong J, Chen R, Zhang J, Xu J, Chen L, Pandey A, Dawson TM, Dawson VL. Botch is a γ-glutamyl cyclotransferase that deglycinates and antagonizes Notch. Cell Rep 7, 681-688 (2014).
- Oh-hashi K, Koga H, Ikeda S, Shimada K, Hirata Y, Kiuchi K. CRELD2 is a novel endoplasmic reticulum stress-inducible gene. Biochem Biophys Res Commun 387, 504-510 (2009).
- Oh-hashi K, Tanaka K, Koga H, Hirata Y, Kiuchi K. Intracellular trafficking and secretion of mouse mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor. Mol Cell Biochem 363, 35-41 (2012).
- Luethy JD, Fargnoli J, Park JS, Fornace AJ Jr, Holbrook NJ. Isolation and characterization of the hamster gadd153 gene. Activation of promoter activity by agents that damage DNA. J Biol Chem 265, 16521-16526 (1990).
- 61. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6α and XBP1. Dev Cell 13, 365-376 (2007).
- 62. Wang M, Ye R, Barron E, Baumeister P, Mao C, Luo S, Fu Y, Luo B, Dubeau L,

Hinton DR, Lee AS. Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis. Cell Death Differ 17, 488-498 (2010).

- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. Nature 415, 92-96 (2002).
- Zhu C, Johansen FE, Prywes R. Interaction of ATF6 and serum response factor. Mol Cell Biol 17, 4957-4966 (1997).
- 65. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. Biochem J 366, 585-594 (2002).
- 66. Rutkowski DT, Kaufman RJ. All roads lead to ATF4. Dev Cell 4, 442-444 (2003).
- 67. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell 107, 881-891 (2001).
- Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. Mol Cell Biol 23, 7448-7459 (2003).
- 69. Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 101, 11269-11274 (2004).
- Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M, Fafournoux P. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. Mol Cell Biol 20, 7192-7204 (2000).
- Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stressinducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. EMBO J 24, 1243-1255 (2005).
- 72. Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Kilberg MS. ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase

gene. J Biol Chem 277, 24120-24127 (2002).

- 73. Hai T, Hartman MG. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. Gene 273, 1-11 (2001).
- Johannessen M, Delghandi MP, Moens U. What turns CREB on? Cell Signal 16, 1211-1227 (2004).
- 75. Jiang HY, Wek RC. Phosphorylation of the  $\alpha$ -subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2 $\alpha$ ) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. J Biol Chem 280, 14189-14202 (2005).
- Newman JR, Keating AE. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. Science 300, 2097-2101 (2003).
- 77. Su N, Kilberg MS. C/EBP homology protein (CHOP) interacts with activating transcription factor 4 (ATF4) and negatively regulates the stress-dependent induction of the asparagine synthetase gene. J Biol Chem 283, 35106-35117 (2008).
- 78. He CH, Gong P, Hu B, Stewart D, Choi ME, Choi AM, Alam J. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. J Biol Chem 276, 20858-20865 (2001).
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol Cell 6, 1099-1108 (2000).
- 80. Berlanga JJ, Santoyo J, De Haro C. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor  $2\alpha$  kinase. Eur J Biochem 265, 754-762 (1999).
- 81. Chen JJ, London IM. Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2α kinase. Trends Biochem Sci 20, 105-108 (1999).
- Clemens MJ, Elia A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. J Interferon Cytokine Res 17, 503-524 (1997).
- Lange PS, Chavez JC, Pinto JT, Coppola G, Sun CW, Townes TM, Geschwind DH, Ratan RR. ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo. J Exp Med 205, 1227-1242 (2008).
- 84. Woo CW, Cui D, Arellano J, Dorweiler B, Harding H, FitzgeraldKA, Ron D, Taba I.

Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. Nat Cell Biol 11, 1473-1480 (2009).

- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. Mol Cell Biol 21, 1249-1259 (2001).
- 86. Lim KL, Chew KC, Tan JM, Wang C, Chung KK, Zhang Y, Tanaka Y, Smith W, Engelender S, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM. Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. J Neurosci 25, 2002-2009 (2005).
- 87. Hikiji T, Norisada J, Hirata Y, Okuda K, Nagasawa H, Ishigaki S, Sobue G, Kiuchi K, Oh-hashi K. A highly sensitive assay of IRE1 activity using the small luciferase NanoLuc: Evaluation of ALS-related genetic and pathological factors. Biochem Biophys Res Commun 463, 881-887 (2015).
- Hissin, PJ, Hilf RA. fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem 74, 214-226 (1976).
- Marx FP, Soehn AS, Berg D, Melle C, Schiesling C, Lang M, Kautzmann S, Strauss KM, Franck T, Engelender S, Pahnke J, Dawson S, von Eggeling F, Schulz JB, Riess O, Krüger R. The proteasomal subunit S6 ATPase is a novel synphilin-1 interacting protein–implications for Parkinson's disease. FASEB J 21, 1759-1767 (2007).
- 90. Wu WK, Wu YC, Yu L, Li ZJ, Sung JJ, Cho CH. Induction of autophagy by proteasome inhibitor is associated with proliferative arrest in colon cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 374, 258-263 (2008).
- Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. J Cell Sci 117, 2805-2812 (2004).
- 92. Farrell AS, Sears RC. MYC degradation. Cold Spring Harb Perspect Med 4, a014365 (2014).
- 93. Hann SR. Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. Semin Cancer Biol 16, 288-302 (2006).
- 94. Gerber A, Heimburg A, Reisenauer A, Wille A, Welte T, Bühling F. Proteasome

inhibitors modulate chemokine production in lung epithelial and monocytic cells. Eur Respir J 24, 40-48 (2004).

- 95. Hong M, Li M, Mao C, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress triggers an acute proteasome-dependent degradation of ATF6. J Cell Biochem 92, 723-732 (2004).
- Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roelofs J. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. Trends Cell Biol 20, 391-401 (2010).
- 97. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J Mol Biol 196, 947-950 (1987).
- Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. Mol Carcinog 48, 91-104 (2009).
- Wertz IE, Dixit VM. Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. Cold Spring Harb Perspect Biol 2, a003350 (2010).
- Popov N, Schülein C, Jaenicke LA, Eilers M. Ubiquitylation of the amino terminus of Myc by SCF<sup>β-TrCP</sup> antagonizes SCF<sup>Fbw7</sup>-mediated turnover. Nat Cell Biol 12, 973-981 (2010).
- 101. Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, Matsumoto M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nakagawa T, Lanjakornsiripan D, Nakayama KI, Fukada Y. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. Cell 152, 1106-1118 (2013).
- 102. Kim HT, Kim KP, Lledias F, Kisselev AF, Scaglione KM, Skowyra D, Gygi SP, Goldberg AL. Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitinprotein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. J Biol Chem 282, 17375-17386 (2007).
- 103. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. Mol Aspects Med 30, 86-98 (2009).
- 104. Yang Y, Chen Y, Johansson E, Schneider SN, Shertzer HG, Nebert DW, Dalton TP. Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase. Biochem Pharmacol 74, 372-381 (2007).
- 105. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari

UM, Domenicotti C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. Oxid Med Cell Longev 2013, 972913 (2013).

- 106. Kang DH, Kang SW. Targeting cellular antioxidant enzymes for treating atherosclerotic vascular disease. Biomol Ther (Seoul) 21, 89-96 (2013).
- 107. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. J Parkinsons Dis 3, 461-491 (2013).
- 108. Örd D, Örd T, Biene T, Örd T. TRIB3 increases cell resistance to arsenite toxicity by limiting the expression of the glutathione-degrading enzyme CHAC1. Biochim Biophys Acta 1863, 2668-2680 (2016).
- Kalinina EV, Chernov NN, Novichkova MD. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. Biochemistry (Mosc) 79, 1562-1583 (2014).
- Biswas S, Chida AS, Rahman I. Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. Biochem Pharmacol 71, 551-564 (2006).

# 発表論文

Translational and post-translational regulation of mouse cation transport regulator homolog 1.

Scientific Reports 6, 28016 (2016).

Nomura Yuki, Hirata Yoko, Kiuchi Kazutoshi, Oh-hashi Kentaro.

第三章に要約して記載

# 参考論文

Transcriptional and post-translational regulation of mouse cation transport regulator homolog 1.

Molecular and Cellular Biochemistry 380, 97-106 (2013).

Oh-hashi Kentaro\*, <u>Nomura Yuki\*</u>, Shimada Kiyo, Koga Hisashi, Hirata Yoko, Kiuchi Kazutoshi. (\*, equal contribution)

第二章に要約して記載