

小胞体膜結合性転写因子 ATF6 α と ATF6 β が
ヌードマウスにおける癌細胞増殖に及ぼす影響の解析

金 聖宇

目次

要旨	3
略語表	4
序論	6
実験結果	12
考察	50
実験手法	53
結論	59
論文目録	60
引用文献	61
謝辞	72

要旨

真核細胞において、分泌経路に進む膜タンパク質と分泌タンパク質は小胞体内で折りたたまれ、正しい立体構造を形成する。しかし、様々な原因により正しい立体構造を取れなかった構造異常タンパク質が小胞体に蓄積してしまうことがある。これを小胞体ストレスと呼び、細胞は恒常性を維持するため、小胞体ストレス応答を発動させて小胞体ストレスを解消しようとする。

癌細胞は活発に増殖する特徴を持ち、正常な組織では見られない低酸素やグルコース飢餓などの環境に晒されている。癌細胞はこのような微小環境ストレス下で生存するため小胞体ストレス応答を活用する。

哺乳類細胞の小胞体ストレス応答は IRE1, PERK, ATF6 3つの経路から構成されている。IRE1 経路下流の転写因子 XBP1 あるいは PERK を欠損し、不死化したマウス線維芽細胞はヌードマウス内での増殖が顕著に遅いことが知られている。一方哺乳類 ATF6 には ATF6 α と ATF6 β の2種類のアイソフォームが存在し、これらの二重ノックアウトマウスは非常に早期の胎性致死となるため、ATF6 α /ATF6 β を二重欠損するマウス線維芽細胞は樹立されていない。それゆえ、ATF6 経路が癌細胞のヌードマウス内増殖に及ぼす影響は調べられていない。

そこで本研究では ATF6 α /ATF6 β 二重ノックアウトヒト癌細胞株を樹立し、ATF6 経路の重要性を解析した。まず、ヒト大腸癌由来細胞である HCT116 細胞株とゲノム編集技術である TALEN 法を用いて ATF6 α 、ATF6 β シングルノックアウトおよび ATF6 α / β ダブルノックアウト細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いた解析により ATF6 α が欠損した場合、HCT116 細胞では IRE1 と PERK 経路が持続的に活性化されることがわかった。

次に、ヌードマウスへの移植実験を行い、HCT116 細胞の腫瘍形成における ATF6 経路の必須性について検討した。興味深いことに、IRE1 α 、ATF6 α のシングルノックアウトおよび ATF6 α / β ダブルノックアウト細胞は正常に腫瘍を形成できたが、IRE1 α ノックアウト/ATF6 α ノックダウン細胞は腫瘍形成が有意に抑制されることがわかった。HCT116 細胞において、ATF6 α が欠損した場合、マウス線維芽細胞とは異なる補償機構が存在し、3つの経路が協調して腫瘍形成に寄与していることが示唆された。

略語表

ATF4	: Activating transcription factor 4
ATF6	: Activating transcription factor 6
BiP	: Immunoglobulin heavy chain binding protein
bZIP	: Basic leucine zipper
CHOP	: CCAAT/enhancer binding protein homologous protein
COP II	: Coat protein complex II
CRT	: Calreticulin
DKO	: Double knock out
DSB	: Double strand break
eIF2	: Eukaryotic translation initiation factor 2
ER	: Endoplasmic reticulum
ERAD	: Endoplasmic reticulum associated degradation
ERdj3	: ER localized DnaJ homologue 3
ERdj4	: ER localized DnaJ homologue 4
ERO1 β	: ER oxidoreductase 1 beta
GRP58	: Glucose regulated protein 58
GRP78	: Glucose regulated protein 78
GRP94	: Glucose regulated protein 94
Hac1p	: Homologue of ATF/CREB 1 protein
HSP70	: Heat shock protein 70
IRE1	: Inositol requiring enzyme 1
KO	: Knock out
KD	: Knock down
MEFs	: Mouse embryonic fibroblasts
NF-Y	: Nuclear transcription factor Y
ORF	: Open reading frame
ORP150	: Oxygen regulated protein 150
PCR	: Polymerase chain reaction
PDI	: Protein disulfide isomerase
PERK	: PKR like endoplasmic reticulum kinase

qRT-PCR : Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

S1P : Site 1 Protease

S2P : Site 2 Protease

TALEN : Transcription activator like effector nucleases

Tm : Tunicamycin

UPR : Unfolded protein response

UPRE : Unfolded protein response element

XBP1 : X box binding protein 1

序論

小胞体と小胞体ストレス

細胞の主要な構成成分であるタンパク質は多様な機能を持ち、生命活動に必須である。タンパク質はアミノ酸配列により決定される固有の立体構造を形成することで担うべき機能を発揮することが可能になる[1]。細胞が合成する全タンパク質の約3分の1が分泌経路に進む膜タンパク質と分泌タンパク質であり、翻訳された後、あるいは翻訳途中で小胞体(ER: Endoplasmic reticulum)に輸送される[2]。小胞体内腔には小胞体シャペロンと総称される分子が大量に存在し、タンパク質の折りたたみを介助する BiP (Immunoglobulin heavy chain Binding Protein)/GRP78(Glucose regulated protein 78)、GRP94(Glucose regulated protein 94)、calreticulin(CRT)などの小胞体局在性分子シャペロン、ジスルフィド結合の形成を触媒する PDI(Protein disulfide isomerase)、ERp72(Endoplasmic reticulum protein 72)などのフォールディング酵素が含まれている。小胞体シャペロンは新規に合成された膜タンパク質と分泌タンパク質の折り畳みを介助する。正しい立体構造を取れたタンパク質のみがゴルジ体以降へと進み、機能する場所へと運ばれる[3]、[4]。正しい立体構造を形成できなかったタンパク質は細胞質に逆行輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系により分解されることで小胞体内の恒常性が維持される。この機構を小胞体関連タンパク質分解(ERAD:ER associated degradation)と呼び、小胞体は分泌系タンパク質の品質管理を担うオルガネラといえることができる[5]、[6]。

しかしながら、様々な原因によりタンパク質が正しい立体構造を形成できず、小胞体に蓄積してしまう場合がある。例えば、ウイルス感染や分化の過程で多量のタンパク質が合成されて小胞体に送り込まれた場合、外界の変化によりタンパク質のフォールディング過程に異常が生じた場合、あるいは遺伝子変異により元々から通常のフォールディングができない変異体タンパク質が合成された場合などがある。このような小胞体に構造異常タンパク質が蓄積してしまった状況を小胞体ストレスと呼ぶ。細胞は小胞体ストレスを解消するため、小胞体ストレス応答、あるいはUPR(Unfolded protein response)と呼ばれる生体防御機構を活性化することで細胞の恒常性を維持しようとする。

真核細胞の小胞体ストレス応答は、以下の3つの機構から構成されている。

- ① タンパク質の新規合成を一時的に停止し、小胞体に向かうタンパク質の流れ込みを

抑制することで小胞体の負荷を軽減させる。

- ② 小胞体シャペロンの転写誘導を行うことで小胞体のフォールディング能力を増強させる。
- ③ ERAD 関連遺伝子の転写を誘導することで小胞体に蓄積された構造異常タンパク質の分解を促進する。

小胞体ストレス応答は酵母から哺乳類に至るまで広く保存され、哺乳類細胞の小胞体ストレス応答には 3 つの経路が存在する。いずれの経路においても小胞体内部に異常タンパク質が蓄積したという情報を感知し、小胞体から細胞質、核へと情報を伝達する特徴を持っている[7]、[8]、[9]。PERK(PKR like endoplasmic reticulum kinase)、ATF6(Activating transcription factor 6)、IRE1(Inositol requiring enzyme 1)の3つの小胞体膜貫通タンパク質が小胞体ストレスセンサーとしてそれぞれの役割を担っている(Fig.1)。小胞体ストレス応答によっても小胞体ストレスが解消されない場合、細胞はアポトーシスを誘導する。

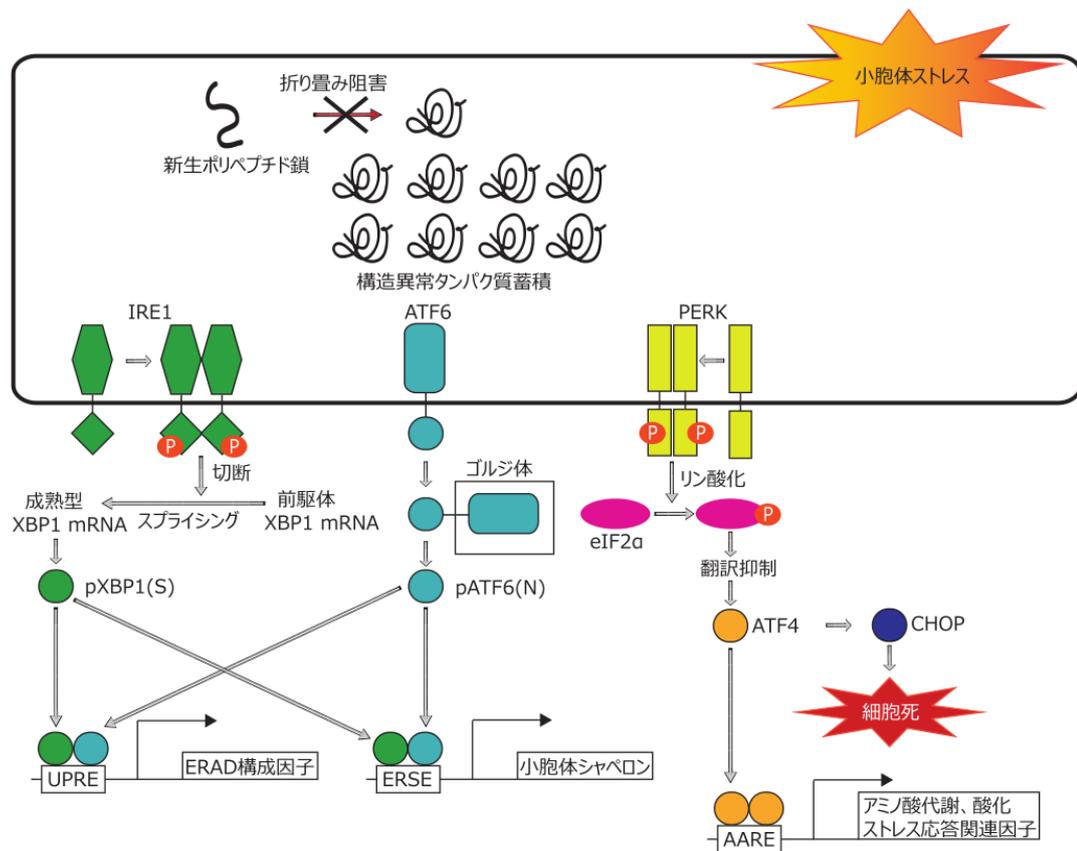


Fig.1 小胞体ストレス応答模式図

PERK 経路による翻訳抑制

PERK は細胞質側にキナーゼドメインを持つ I 型小胞体膜貫通型タンパク質であり、酵母には存在せず、metazoan のみに存在する。小胞体ストレスを感知すると二量体を形成し、自己リン酸化することで活性化する。通常時、翻訳開始因子である eIF2(Eukaryotic initiation factor 2)の α サブユニットに結合している GDP は eIF2B(Eukaryotic initiation factor 2B)により GTP に交換される。活性化した PERK により eIF2 の α サブユニットがリン酸化されると、eIF2B との結合が強くなるため、eIF2B による GDP-GTP リサイクル機能が阻害され、全体的にタンパク質の翻訳が抑制される[10]、[11]。この機構により小胞体に輸送される新規合成タンパク質量が減少されるため、小胞体の負荷が軽減される。一方で、逆説的に ATF4(Activating transcription factor 4)の翻訳が誘導される[12]。ATF4 は転写因子 CHOP(CCAAT/enhancer binding protein homologous protein)や、アミノ酸代謝、酸化ストレス応答関連因子の転写誘導に関与している[13]。ATF4 により転写誘導された GADD34 がリン酸化 eIF2 α を脱リン酸化させることで細胞は翻訳抑制から回復する[14]。

IRE1 経路による転写誘導

IRE1 は酵母から哺乳類まで広く保存されており、細胞質側にキナーゼドメインとリボヌクレアーゼドメインを持つ I 型小胞体膜貫通型タンパク質である。小胞体ストレスが起こると、IRE1 は二量体を形成し、自己リン酸化することで活性化する[15]、[16]、[17]、[18]。Metazoan で IRE1 リボヌクレアーゼの基質として同定されたのは XBP1(X-box binding protein 1) mRNA である。前駆体 XBP1 mRNA は細胞核ではなく、細胞質でユニークな方法で IRE1 依存的なスプライシングを受け、成熟型の XBP1 mRNA になる[19]、[20]、[21]。前駆体 XBP1 mRNA には 2 つの ORF(Open reading frame)が存在する。通常時では ORF1 から pXBP1(U)(U: Unspliced)が翻訳されるが、pXBP1(U)は安定性が低いため、常に分解される。小胞体ストレスが起こると、活性化された IRE1 は前駆体 XBP1 mRNA を切断し、前駆体 mRNA からスプライシングにより 26 塩基のイントロンが除去される。26 は 3 の倍数ではないため、ORF にフレームシフトが起こり、ORF 1 と ORF 2 が連結され、活性化能を持つ pXBP1(S)(S: Spliced)が翻訳される。pXBP1(S)はシス配列 ERSE(Endoplasmic reticulum stress response element: 5'-CCAAT-N9-CCACG-3')に結合し、また pATF6(N)(次項参照)とヘテロダイマーを形

成してシス配列 UPRE(Unfolded protein response element:5'-TGACGTGG/A-3')に結合することで小胞体シャペロンと小胞体関連分解構成因子の転写誘導を担う [22]。pXBP1(U)にも bZIP(basic leucine zipper)ドメインが存在し、pXBP1(S)と pATF6(N)に結合することができる。さらに、pXBP1(U)には核移行シグナルと核排出シグナルが備えられているため、核内で結合した pXBP1(S)と pATF6(N)を細胞質に引き出して分解させる [23]、[24]。

ATF6 経路による転写誘導

ATF6 は N 末端領域に転写活性化ドメインと bZIP 領域を持つ II 型小胞体膜貫通型タンパク質である。脊椎動物には転写因子としての機能を獲得した ATF6 α と ATF6 β の二種類のアイソフォームが存在する。通常時では全長の前駆体 pATF6(P) (P:precursor)として構成的に発現しており、小胞体膜に局在している[25]、[26]。小胞体ストレスが起こると、前駆体 pATF6(P)は COP II (Coat protein complex II)小胞に乗せられて小胞体からゴルジ体に輸送され、ゴルジ体に局在するプロテアーゼである S1P(Site 1 protease)と S2P(Site 2 protease)により2段階の切断を受ける[27]。この限定分解により切り離された pATF6(N)(N:Nuclear)は核へ移行し、NF-Y(Nuclear transcription factor Y)と複合体を形成して小胞体シャペロンなどの標的遺伝子プロモーター上に存在する ERSE に結合することで標的遺伝子の転写誘導を担う [22]、[28-32]。

小胞体ストレス応答の進化と小胞体シャペロンの転写誘導

酵母の小胞体ストレス応答は Ire1p-Hac1p(Homologue of ATF/CREB 1 protein)経路のみから構成されている。酵母の Ire1p は唯一の UPR センサーとして働き、小胞体シャペロンと ERAD 構成因子の転写誘導を担っている[15]、[16]、[33]、[34]。線虫/ショウジョウバエでは翻訳抑制を担う PERK 経路を獲得し、ATF6 も存在するが、ATF6 経路は小胞体ストレス応答に関与していない。酵母と同様に、小胞体シャペロンと ERAD 構成因子の転写誘導は IRE1 経路により制御される[35]、[36]。

脊椎動物に至ると、機能する ATF6 経路が現れ、IRE1 経路と PERK 経路に加えて 3 つの経路が協調して小胞体ストレスに応答する。脊椎動物には ATF6 α 、ATF6 β 、IRE1 α 、IRE1 β 、PERK、5 つの小胞体ストレスセンサーが存在する。先行研究により、ATF6 α 、ATF6 β 、IRE1 α 、および IRE1 α 経路の下流因子である XBP1 欠損 MEF(Mouse

embryonic fibroblasts)細胞が樹立され、種々の小胞体シャペロンの転写誘導機構が解析されてきた[22]、[32]、[37]、[38]、[39]。BiP/GRP78 は HSP70 ファミリーに属する重要な小胞体シャペロンの一つである。ノーザンブロット法、qRT-PCR 解析により、小胞体ストレスに応答した BiP の転写誘導が ATF6 α 欠損 MEFs 細胞では顕著に抑制されたが、ATF6 β 、IRE1 α 、XBP1 欠損 MEFs 細胞では変化がないことがわかった。マイクロアレイ解析によると、BiP、GRP94、ORP150、Calreticulin などの分子シャペロン、ERdj3 コシャペロン、そして ERp72、P5、GRP58、ERO1 β などのオキシドレダクターゼが ATF6 α の標的因子であることがわかった。以上の結果から、哺乳類細胞において ATF6 α は小胞体品質管理機構の制御に特化した転写因子であると結論づけられた[32]。

硬骨魚類であるメダカを用いた解析によると、ATF6 α/β ダブルノックアウトメダカでは脊索の形成に異常が生じることがわかった。この表現型は BiP の一過性過剰発現により部分的に回復できたことから、ATF6 が担う小胞体シャペロンの転写誘導がメダカ脊索の正常な発生に必須であることが明らかにされた[40]。

進化の過程で哺乳類細胞は小胞体ストレス応答の複雑性を獲得したと同時に、小胞体シャペロンと ERAD 構成因子の転写誘導を担う UPR センサーが Ire1p から IRE1 と ATF6 に分岐し、脊椎動物は小胞体シャペロンの転写誘導に特化した ATF6 を獲得したと考えられる[41]。

小胞体ストレス応答と腫瘍形成

初期段階の癌細胞は正常な組織では見られない低酸素やグルコース飢餓などの微小環境ストレスに晒されている[42]。癌細胞はこのようなストレス環境下で生存するため、低酸素応答、小胞体ストレス応答を活用する[43]、[44]。癌細胞の小胞体ストレス応答の活性化は抗癌剤薬剤耐性の原因にもなるため、腫瘍形成における小胞体ストレス応答の重要性が示唆された[45]。

ウイルス感染により癌化された MEFs 細胞をヌードマウスに移植すると、野生型 MEFs 細胞を移植した場合に比べ、XBP1 あるいは、PERK をノックアウトした細胞の場合は腫瘍形成が顕著に抑制されたことがわかった[46]、[47]。IRE1 α をノックアウトしたヒトトリプルネガティブ乳癌細胞、ヒト多発性骨髄腫を移植したヌードマウスでは腫瘍形成が顕著に抑制されると報告された[48]、[49]。IRE1 をターゲットした阻害剤のスクリーニング系の構築に伴い、何種類かの IRE1 阻害剤が開発された。ヒト多発性骨髄腫を IRE1 阻害剤で処理してからヌードマウスに移植すると、腫瘍形成が顕著に抑制されることがわかった[50]、

[51]。ヒト前立腺癌において、IRE1 α をノックダウン、あるいは IRE1 阻害剤で処理することでヌードマウスでの腫瘍形成が抑制されたという報告もある[52]、[53]。このような研究に基づき、小胞体ストレス応答センサーの阻害剤を抗癌剤として利用することが期待される[54]。

これに対し、ATF6 経路についてはまだ研究が進んでいない。ATF6 には ATF6 α と ATF6 β の 2 種類のアイソフォームが存在し、これらのダブルノックアウトマウスは非常に早期の胎性致死となるため、ATF6 α /ATF6 β を二重欠損するマウス線維芽細胞は樹立されていない。それゆえ、ATF6 経路が癌細胞のヌードマウス内増殖に及ぼす影響は調べられていない。ヒト扁平上皮癌細胞で ATF6 α をノックダウンするとヌードマウスでの腫瘍形成が抑制されるという報告しかない現状である[55]。興味深いことに、ATF6 α 、ATF6 β シングルノックアウトマウス、メダカは正常に発達し、繁殖できるが、ATF6 α / β ダブルノックアウト個体は胚の発生早期段階で致死である[22]、[40]。ATF6 α と ATF6 β は重複した機能を持ち、ATF6 α が欠損した場合、生存に必須な因子の転写誘導が ATF6 β により補われる補償機構が存在すると予想される。

実験結果

第一節 ATF6 遺伝子ノックアウト細胞株の樹立

TALEN 法を用いて ATF6 ノックアウト HCT116 細胞の作製を行った。HCT116 細胞はヒト大腸癌由来細胞であり、安定的な増殖能力を持つ二倍体細胞である[56]。HCT116 細胞でも pATF6 α (P)と pATF6 β (P)が構成的に発現しており、小胞体ストレスに応答して活性型の pATF6 α (N)と pATF6 β (N)が生じることが Western blot 解析により確認された(Fig.6-A、B、C の左側)。

1-1. TALEN とターゲティングベクターの設計

TALEN とは TALE(Transcription activator like effectors)ドメインに DNA ヌクレアーゼドメインを融合させた人工ヌクレアーゼである[56]。TALE ドメインは RVD(Repeat variable diresidues)と呼ばれる可変領域を含み、通常は 34 個のアミノ酸からできている。RVD は NI、NG、NN、HD のいずれかからなり、それぞれアデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)を認識する。この TALE ドメインを人為的に並べることで標的とする DNA 領域に TALEN を結合させると、二量体となった時に DNA ヌクレアーゼ活性を発揮する FokI 酵素が DNA 二重鎖を切断する。切断部位で相同末端結合(HEJ: Homologous end joining)が起こる際に、塩基の欠損や置換が生じることを利用して標的遺伝子のノックアウトあるいは外来遺伝子のノックインが可能になる(Fig.2)。

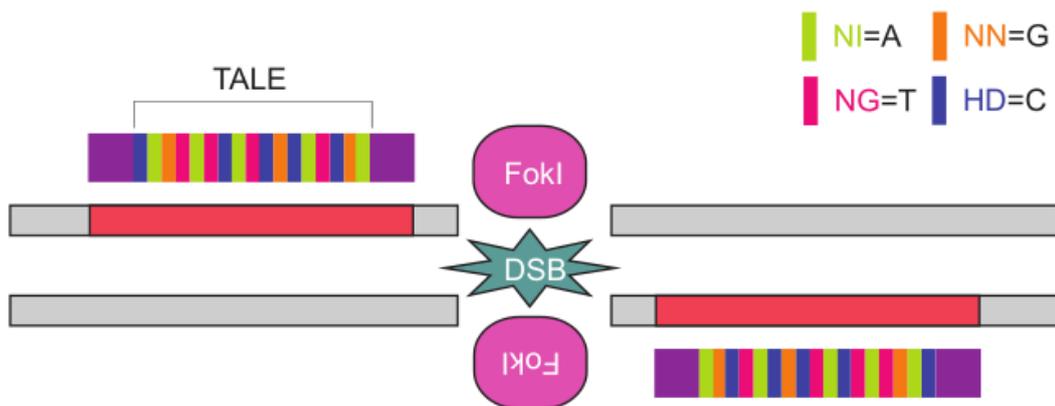


Fig.2 TALEN 模式図

TALEN 法をノックアウト細胞作製に適用する時には、TALEN を発現させるベクターと遺伝子ターゲティングベクターを共に細胞に導入する方法が有効である。ターゲティングベクターとは、Puromycin、Neomycin などの抗生物質に対する耐性遺伝子が入っているベクターにターゲット遺伝子の一部塩基配列をクローニングして挿入したものである(Fig.3-A、Fig.4-A)。TALEN ベクターとターゲティングベクターを共に細胞にトランスフェクションしてから抗生物質が含まれた培地でセクションを掛けると、細胞内で発現された TALEN によりターゲットした所で DNA 二重鎖切断が起り、切断部位で相同末端結合により耐性遺伝子との組み替えが起きたコロニーのみが生き残る。しかし、その中ではゲノム上のランダムな場所で耐性遺伝子の組み替えが起こったコロニーも混合されている。引き続き、生き残ったコロニーを回収し、Western blot、あるいはゲノム PCR でジェノタイピングを行うことで、最終的にターゲット遺伝子がノックアウトされた細胞株が選別される。

本研究ではヒト ATF6 α の exon1 と ATF6 β の exon1 それぞれをターゲットしてターゲティングベクターを設計した(Fig.3-A、Fig.4-A)。TALEN を発現させるベクターは広島大学大学院理学研究科の山本博士に作製して頂いた。

1-2. ATF6 α シングルノックアウト細胞株の作製

ヒト ATF6 α exon1 上流(5'-arm)と下流(3'-arm)の一部塩基配列を PCR でクローニングし、Puromycin に対する耐性遺伝子が入っているベクターに挿入することで ATF6 α ターゲティングベクターの作製を行った(Fig.3-A)。作製された ATF6 α ターゲティングベクターと TALEN ベクターを HCT116 細胞にトランスフェクションし、0.5 μ g/ml の Puromycin が含まれた DMEM 培地を用いてコロニーセクションを行った。その結果、16 個のコロニーが得られ、これらに対してジェノタイピングを行った。

まずは ATF6 α 抗体を用いた Western blot 解析により ATF6 α タンパク質の発現を調べた。その結果、野生型(WT: Wild Type)で見られた ATF6 α が 10 番と 11 番細胞株(以降では#10、#11 と呼ぶ)では見られなかった(Fig.3-B)。

引き続き、#10、#11 から抽出したゲノム DNA をテンプレートとしてゲノム PCR を行った。用いたプライマーは Fig.3-A に示している。その結果、#10 と#11 で 5'-arm、3'-arm に相当する長さのバンドが見られ、ターゲットした ATF6 α の exon1 で切断と組み換えが起こり、Puromycin 耐性遺伝子の挿入が起こったと判断した(Fig.3-C、primer set 1 と primer set 2)。全長の exon1 を挟んだプライマーを用いた PCR の結果では#10 と#11 いずれにおいても長さが異なる二本のバンドが([Puro+]と[Puro-])見られたため

(Fig.3-C, primer set 3)、ATF6αの片側アレルのみに Puromycin 耐性遺伝子の挿入が起こったと判断した。

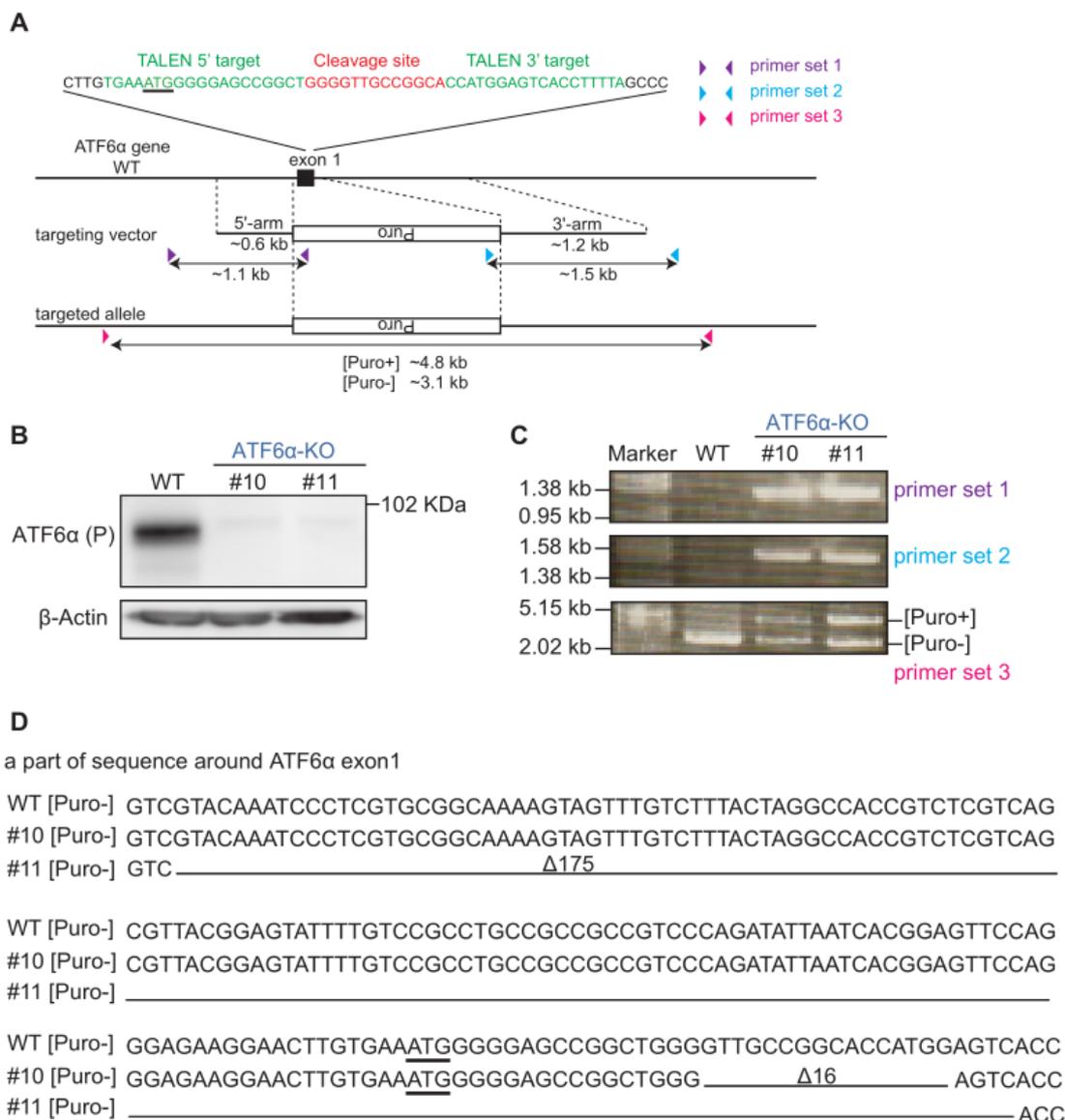


Fig.3 ATF6αシングルノックアウト細胞株の作製

A. TALEN 法を用いた ATF6αシングルノックアウト細胞作製の模式図。

TALEN は ATF6α の exon 1 を切断し、ピュロマイシン耐性遺伝子が入ったターゲティングベクターと組み換えが起こるように設計された。有色三角形はゲノム PCR に用いられたプライマーセットを、両方向矢印は PCR により増幅される領域を示す。

- B. 野生型または ATF6aノックアウト#10,#11 細胞から作ったライゼートを 20 µg ずつ泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 ATF6aおよび抗β-actin 抗体を使用した。
- C. A に示されたプライマーセットを用いて PCR を行った結果、片側のアレルにおけるピューロマイシン耐性遺伝子の組み換えが確認された。
- D. WT、ATF6aノックアウト#10,#11 細胞に対するシーケンシング解析により決定された ATF6a exon1 一部領域の塩基配列を示す。#10 の ATF6a exon1 では 16 塩基の欠失、#11 の ATF6a exon1 では 175 塩基の欠失が見られた。

さらに、#10と#11のゲノムに対して、Puromycin 耐性遺伝子の挿入が起らなかったアレル側の ATF6a exon1 配列を決定するため、シーケンシング解析を行った。その結果、#10の ATF6a Exon1 では 16 塩基、#11の ATF6a exon1 では 175 塩基の欠失が生じたことがわかった(Fig.3-D)。16と175は3の倍数ではないため、フレームシフトが起こり、正常に機能する ATF6aは翻訳されないと判断した。

以上の結果から、#10と#11いずれにおいても両方のアレルに変異が導入されており、ATF6aシングルノックアウト細胞株が樹立できたと判断した。2つ細胞株の中で#10を以降の解析に使用することにした(ATF6a-KOと表記する)。

1-3. ATF6 β シングルノックアウト細胞株の作製

ATF6 α と同様の方法で ATF6 β シングルノックアウト細胞の作製を行った。ヒト ATF6 β exon1 上流と下流の一部塩基配列を PCR でクローニングし、Neomycin 耐性遺伝子が入っているベクターに挿入することで ATF6 β ターゲティングベクターの作製を行った(Fig.4-A)。作製された ATF6 β ターゲティングベクターと TALEN ベクターを HCT116 細胞にトランスフェクションし、0.6mg/ml の G418(Neomycin)が含まれた DMEM 培地を用いてコロニーセレクションを行った。その結果、17 個のコロニーが得られ、これらに対してジェノタイピングを行った。

Western blot 解析により ATF6 β の発現を調べた結果、#2、#3、#4、#8 で ATF6 β のバンドが見られなかった。Fig.4 では#2 と#4 細胞株の結果のみを示している(Fig.4-B)。

引き続き、#2 と#4 から抽出した DNA をテンプレートとしてゲノム PCR を行った。用いたプライマーセットは Fig.4-A に示している。その結果、#2 と#4 いずれにおいても 5'-arm、3'-arm に相当する長さのバンドが見られたため、ターゲットした ATF6 β の exon1 で切断と組み換えが起こり、Neomycin 耐性遺伝子の挿入が起こったと判断した(Fig.4-C、primer set 1 と primer set 2)。全長の exon1 を挟んだプライマーを用いて PCR を行った結果、#2 と#4 いずれにおいても長さが異なる二本のバンドが([Neo+]と[Neo-]) 見られたため(Fig.4-C、primer set 3)、ATF6 β の片側アレルのみに Neomycin 耐性遺伝子の挿入が起こったと判断した。

さらに、#2 と#4 の Neomycin 耐性遺伝子の挿入が起らなかったアレル側の ATF6 β exon1 配列を決定するため、シーケンシング解析を行った。その結果、#2 の ATF6 β Exon1 では 9 塩基の欠失が生じ、欠失した 9 塩基には ATF6 β の一番目の開始コドンが含まれていることがわかった。さらに下流に存在する二番目の開始コドンが含まれた領域では 29 塩基の置換が生じたことがわかった。#4 では 16 塩基の欠失が生じたことがわかった(Fig.4-D)。16 は 3 の倍数ではないため、フレームシフトが起こり、#2 と#4 いずれにおいても正常に機能する ATF6 β は翻訳されないと判断した。

以上の結果から ATF6 β シングルノックアウト細胞株が樹立できたと判断し、2 つ細胞株の中で#2 を以降の解析に使用することにした(ATF6 β -KO と表記する)。

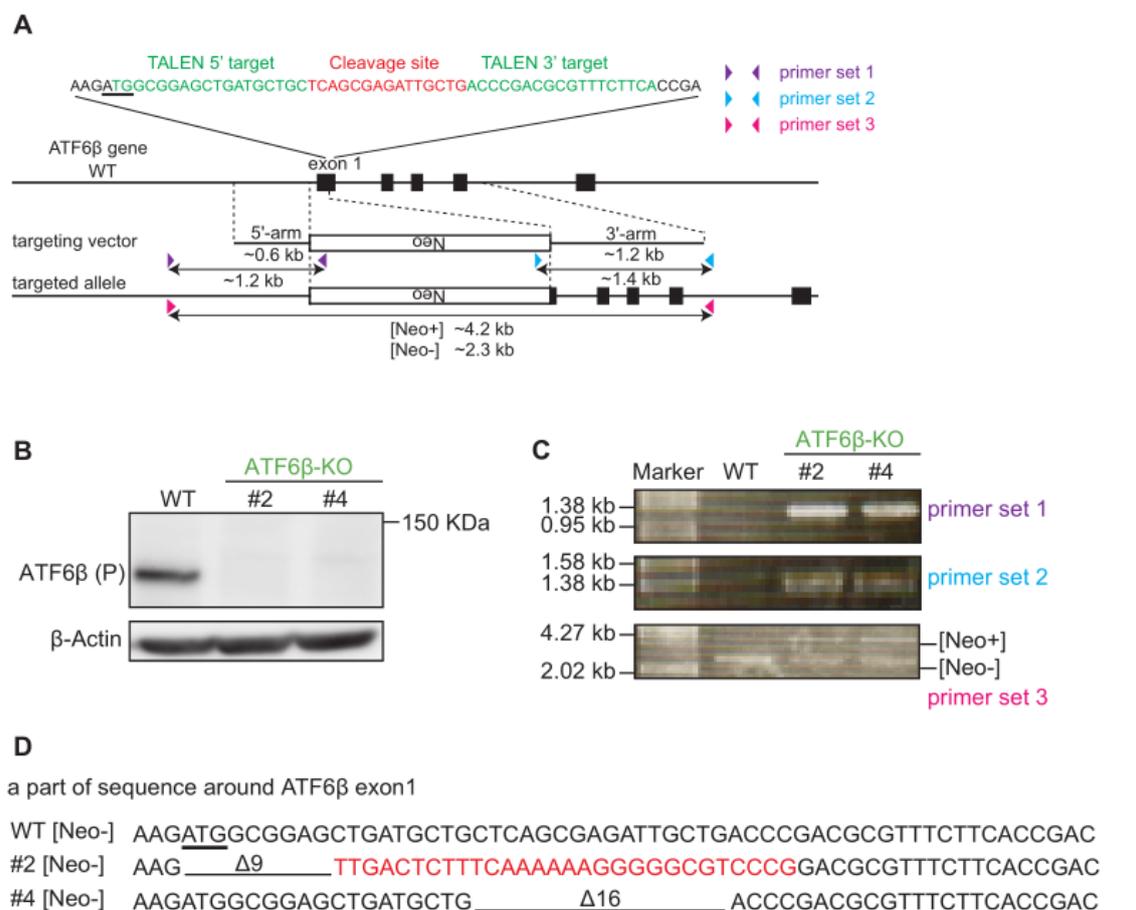


Fig.4 ATF6β シングルノックアウト細胞株の作製

- A. TALEN 法を用いた ATF6β シングルノックアウト細胞作製の模式図。
 TALEN は ATF6β の exon 1 を切断し、ネオマイシン耐性遺伝子が入ったターゲティングベクターと組み換えが起こるように設計された。有色三角形はゲノム PCR に用いられたプライマーセットを、両方向矢印は PCR により増幅される領域を示す。
- B. 野生型または ATF6β ノックアウト #2, #4 細胞から作ったライゼートを 20μg ずつ泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 ATF6β および抗 β-actin 抗体を使用した。
- C. A に示されたプライマーセットを用いて PCR を行った結果、片側のアレルにおけるネオマイシン耐性遺伝子の組み換えが確認された。
- D. WT、ATF6β ノックアウト #2, #4 細胞に対するシーケンシング解析により決定された ATF6β exon1 一部領域の塩基配列を示す。#2 の ATF6β exon1 では 9 塩基の欠失と 29 塩基の置換が、#4 の ATF6β exon1 では 16 塩基の欠失が見られた。

1-4. ATF6 α / β ダブルノックアウト細胞株の作製

引き続き、ATF6 α -KO 細胞の ATF6 β をノックアウトすることで ATF6 α / β ダブルノックアウト細胞の作製を行った。

ATF6 α -KO 細胞に ATF6 β ターゲティングベクターと ATF6 β TALEN ベクターをトランスフェクションし、0.6mg/ml の G418 が含まれた DMEM 培地を用いてコロニーセレクションを行った結果、93 個のコロニーが得られた。

Western blot 解析により ATF6 β の発現を調べた結果、40 個のコロニーで ATF6 β の発現が見られなかった。Fig.5 では#15 と#54 の結果のみを示している (Fig.5-A)。

引き続き、ゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行った。用いたプライマーセットは Fig.4-A に示している。その結果、#15 と#54 いずれにおいても 5'-arm、3'-arm に相当する長さのバンドが見られ、ターゲットした ATF6 β の exon1 で切断と組み換えが起こり、Neomycin 耐性遺伝子の挿入が起こったと判断した (Fig.5-B、primer set 1 と primer set 2)。全長の ATF6 β exon1 を挟んだプライマーを用いた PCR 結果で#15 と#54 いずれにおいても[Neo+]バンドのみが検出されたため、2 つのアレルの両方側で Neomycin 耐性遺伝子の挿入が起こったと判断した。

ATF6 α 抗体を用いた Western blot 解析により#15 と#54 において ATF6 α の発現が見られないことを確認した (Fig.5-A)。以上の結果から ATF6 α / β ダブルノックアウトの細胞株が樹立できたと判断し、二つ細胞株の中で#54 を以降の解析に使用することにした (ATF6-DKO と表記する)。

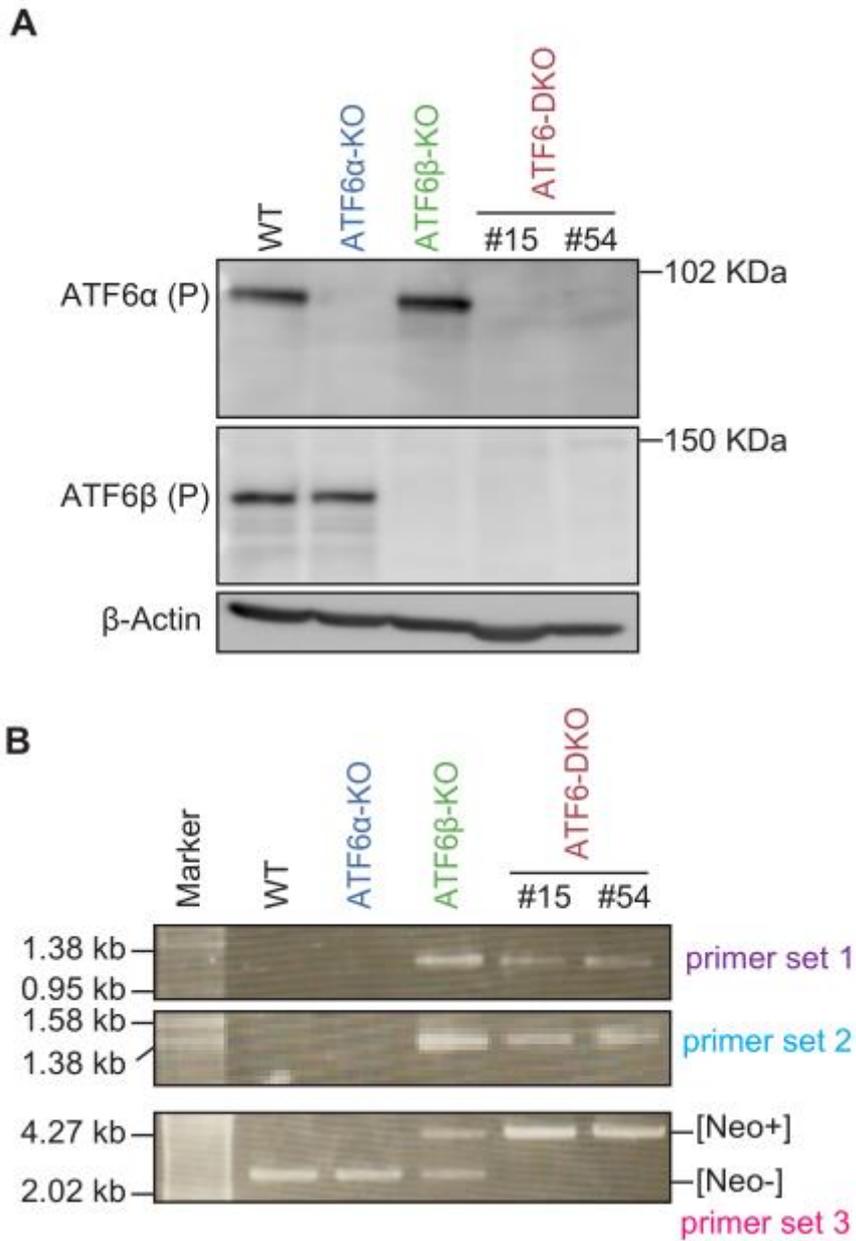


Fig.5 ATF6 α / β ダブルノックアウト細胞株の作製

- A. 野生型または ATF6 α -KO、ATF6 β -KO、ATF6 ダブルノックアウト #15, #54 細胞から作ったライゼートを 20 μ g ずつ泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 ATF6 α 、抗 ATF6 β および抗 β -actin 抗体を使用した。
- B. Fig.4-A に示されたプライマーを用いた PCR 結果、両側のアレルにおけるネオマイシン耐性遺伝子の組み換えが確認された。

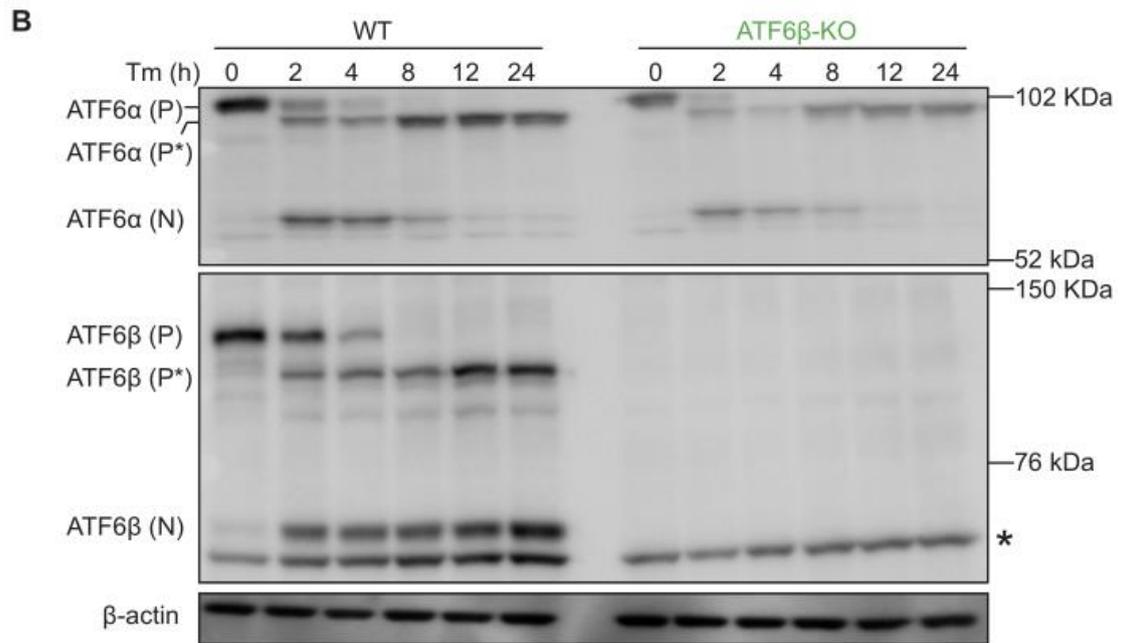
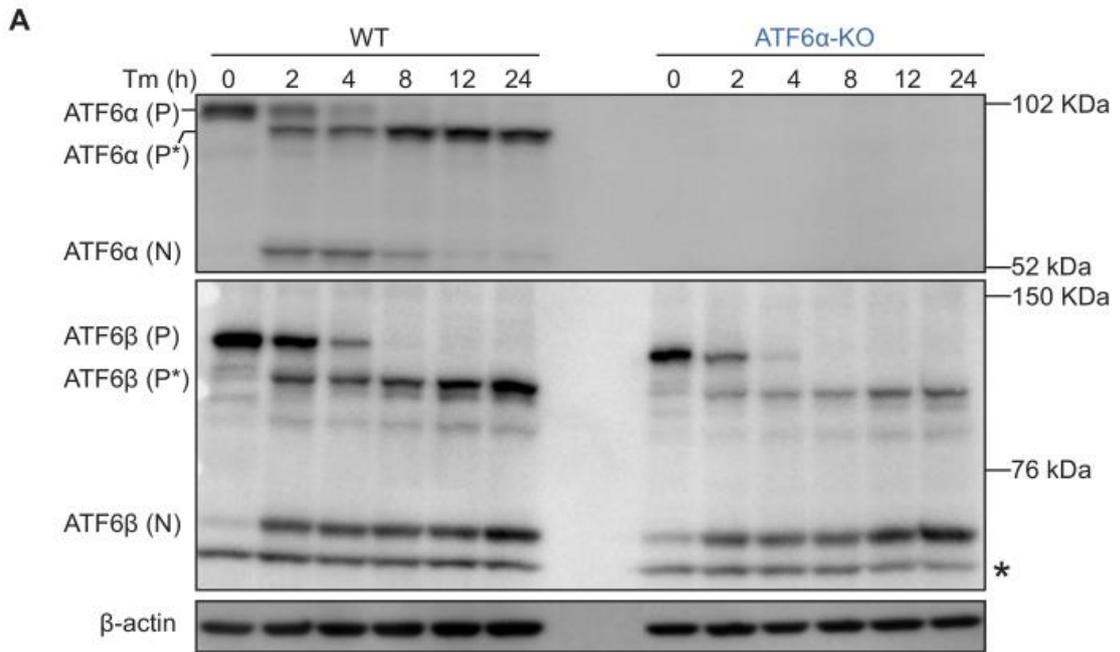
第二節 ATF6 ノックアウト細胞株を用いた解析

2-1. ATF6 ノックアウト細胞における小胞体シャペロンの転写誘導

MEFs 細胞を用いた先行研究により、小胞体ストレスに応答した BiP、GRP94 などの主要な小胞体シャペロンの転写誘導が野生型細胞に比べ ATF6 α ノックアウト細胞では顕著に抑制されていることがわかっている。ヒト癌細胞である HCT116 細胞において、小胞体シャペロンの転写誘導が ATF6 欠損により抑制されるか調べた。

ツニカマイシン(Tm:Tunicamycin)はよく使われる小胞体ストレス誘導剤である。細胞をツニカマイシンで処理すると、小胞体内に輸送された新規合成タンパク質への糖鎖付加が阻害され、小胞体に構造異常タンパク質が蓄積されるため、小胞体ストレスが引き起こされる。小胞体ストレスが起こると、ATF6 は小胞体からゴルジ体に輸送され、ゴルジ体に局在するプロテアーゼである S1P、S2P により 2 段階切断を受け、活性型の ATF6(N)を細胞質に放出する。ATF6(N)は核へ移行し、転写因子として BiP、GRP94 などの転写誘導を担う。

まず、WT 細胞と 3 種の ATF6 ノックアウト細胞に 2 μ g/ml 濃度の Tm 処理を行い、Western blot で ATF6(N)発現のタイムコースを調べた。その結果、WT 細胞において、全長型の ATF6 α (P)と ATF6 β (P)が徐々に減少することに伴い、糖鎖が付加されていない型の ATF6 α (P*)と ATF6 β (P*)が増えていくことが見られた。小胞体内での新規合成タンパク質への糖鎖付加が阻害されており、Tm が細胞に確実に効いて小胞体ストレスを引き起こしたと判断した(Fig.6-A、B、C の左側)。ATF6 α (N)はおよそ Tm 処理 2 時間後から現れ、12 時間後になるとほぼ分解されることがわかった。これに対し、ATF6 β (N)は Tm 処理 24 時間後まで残っていることから、ATF6 β (N)は ATF6 α (N)より安定であると考えられる。ATF6 α -KO 細胞では WT 細胞とほぼ同じレベルの ATF6 β (N)が検出されており、ATF6 β -KO 細胞では WT 細胞とほぼ同じレベルの ATF6 α (N)が検出されたことから、ATF6 α と ATF6 β の活性化は互いに他方の欠損による影響を受けていないと考えられる(Fig.6-A、B、の右側)。ATF6-DKO 細胞においては、ATF6 α 、ATF6 β 両方が欠損されており、小胞体ストレスに応答した ATF6 経路が完全に遮断されることが確認された(Fig.6-C の右側)。



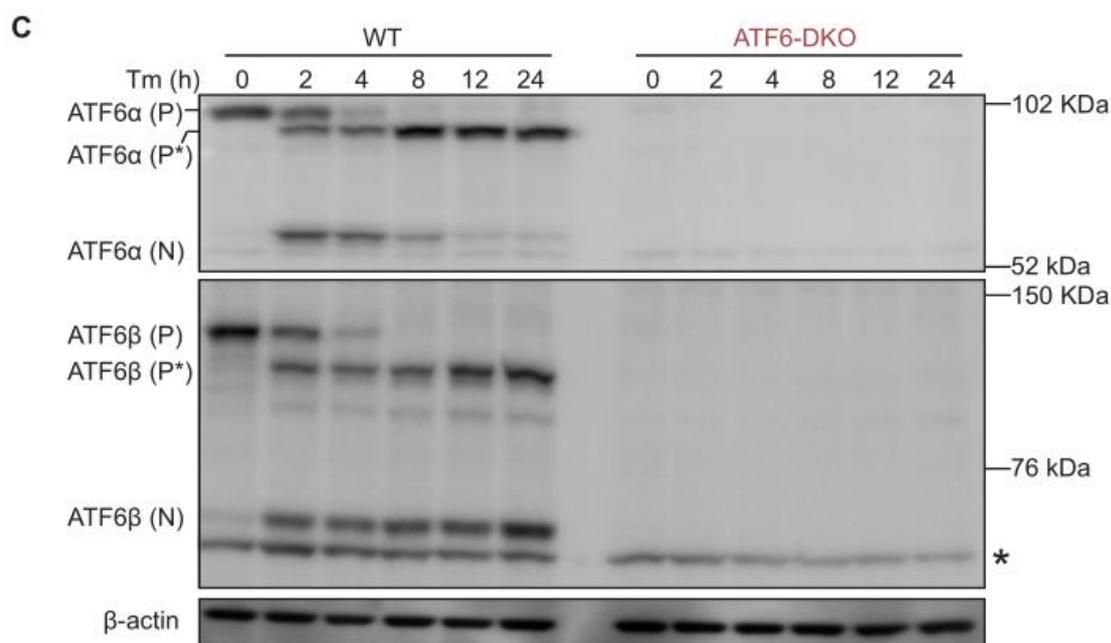


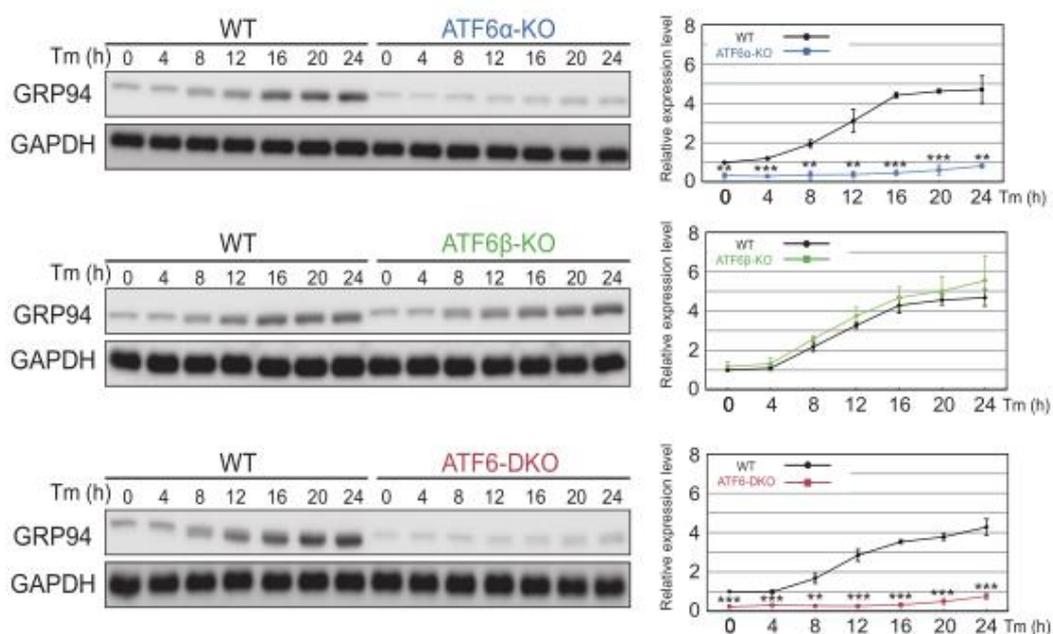
Fig.6 ATF6α、ATF6βの Western blot 結果

A.B.C. 野生型または ATF6α-KO、ATF6-KO、ATF6-DKO 細胞に示されている時間で 2μg/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、細胞から作ったライゼートを 20μg ずつ泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 ATF6α、抗 ATF6βおよび抗β-actin 抗体を使用した。* は non-specific バンドを示す。

次に、小胞体ストレスに応じた小胞体シャペロンの転写誘導を Western blot と qRT-PCR で調べた。GRP94 の発現を Western blot で調べた結果、WT 細胞において、GRP94 の発現量は小胞体ストレスが持続することに伴って徐々に増加することが見られた。Loading Control である GAPDH に対する相対量を定量すると、Tm 処理 24 時間後では 0 時間に比べて 4 倍以上増加したことがわかった。ATF6β-KO 細胞では WT 細胞と同じレベルの GRP94 が誘導されることが見られた。これに対し、ATF6α-KO と ATF6-DKO では GRP94 の誘導が完全に抑制されていることから(Fig.7-A)、MFEs 細胞と同様に、小胞体ストレスに応じた GRP94 の転写誘導は ATF6βではなく ATF6αにより制御されると考えられる。

次に、BiP の発現を Western blot で調べた結果、GRP94 の結果と同様に WT 細胞と ATF6 β -KO 細胞において、小胞体ストレスが持続することに伴って徐々に増加し、Tm 処理 24 時間後では 0 時間に比べて 5 倍以上増加したことがわかった。しかし、完全に抑制されている GRP94 とは異なり、ATF6 α -KO と ATF6-DKO における BiP の発現量は WT 細胞と比べて若干減少し、小胞体ストレスが持続することに伴って増加しているように見られた(Fig.7-B)。

A



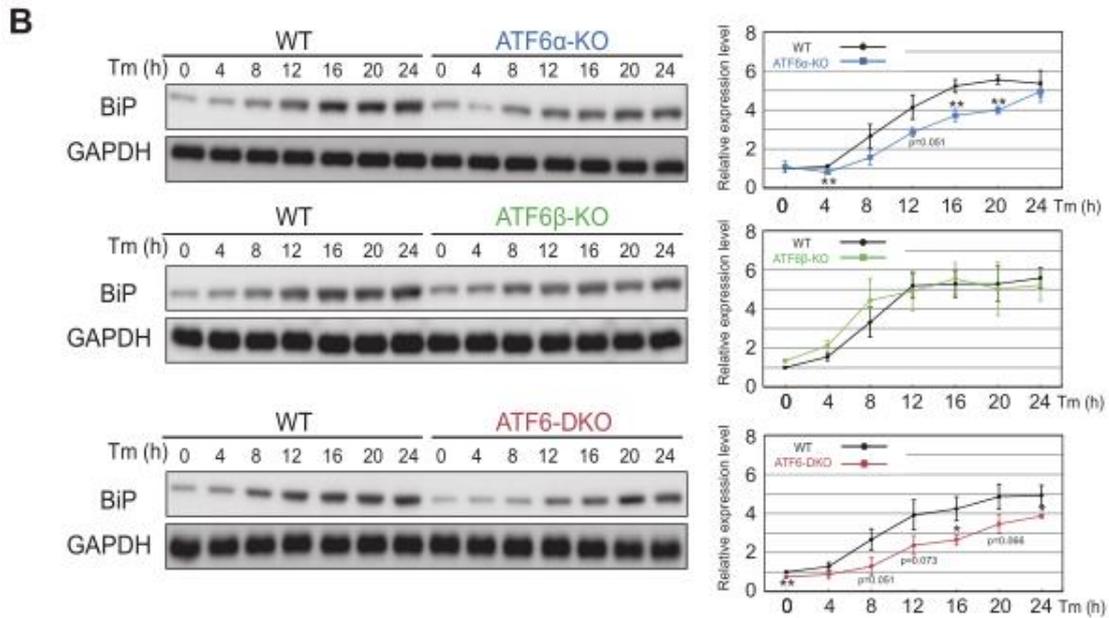


Fig.7 GRP94、BiP の Western blot

A. 野生型または ATF6 α -KO、ATF6 β -KO、ATF6-DKO 細胞に示されている時間で 2 μ g/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、作ったライゼートを泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 KDEL および抗 GAPDH 抗体を使用した。右側は GAPDH に対する GPR94 の相対定量を行った結果を示す。抗 KDEL ウエスタンブロットでは 3 μ g、抗 GAPDH ウエスタンブロットでは 0.25 μ g ずつ泳動を行った。合計 3 回行った実験結果の平均と標準偏差を計算し、ttest で有意差検定を行った *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001。示しているのは一回目実験の結果である。

B. A と同様な方法で求めた BiP の相対定量の結果を示す。

引き続き、mRNA の発現量を qRT-PCR で調べた。その結果、WT 細胞と ATF6 β -KO 細胞において、GRP94 と BiP の mRNA は小胞体ストレスに応じて速やかに転写誘導され、Tm 処理後 8 時間と 12 時間で発現量がピークになった後、徐々に減少することが見られた。しかし、ATF6 α -KO 細胞と ATF6-DKO 細胞において、GRP94 mRNA と BiP mRNA の発現は異なるパターンを示した。転写誘導が完全に抑制されている GRP94 に対し、BiP mRNA の転写誘導は Tm 処理後 8 時間まで抑制されていたが、その以降からは亢進されており、12 時間以降からは WT 細胞と ATF6 β -KO 細胞の場合を上回っていることが見られた(Fig.8)。GRP94 と BiP は同様にプロモーター上に存在する

ERSE シス配列に結合する ATF6aにより転写誘導が制御されると報告された先行研究から考えると、これは予想外な結果であった。

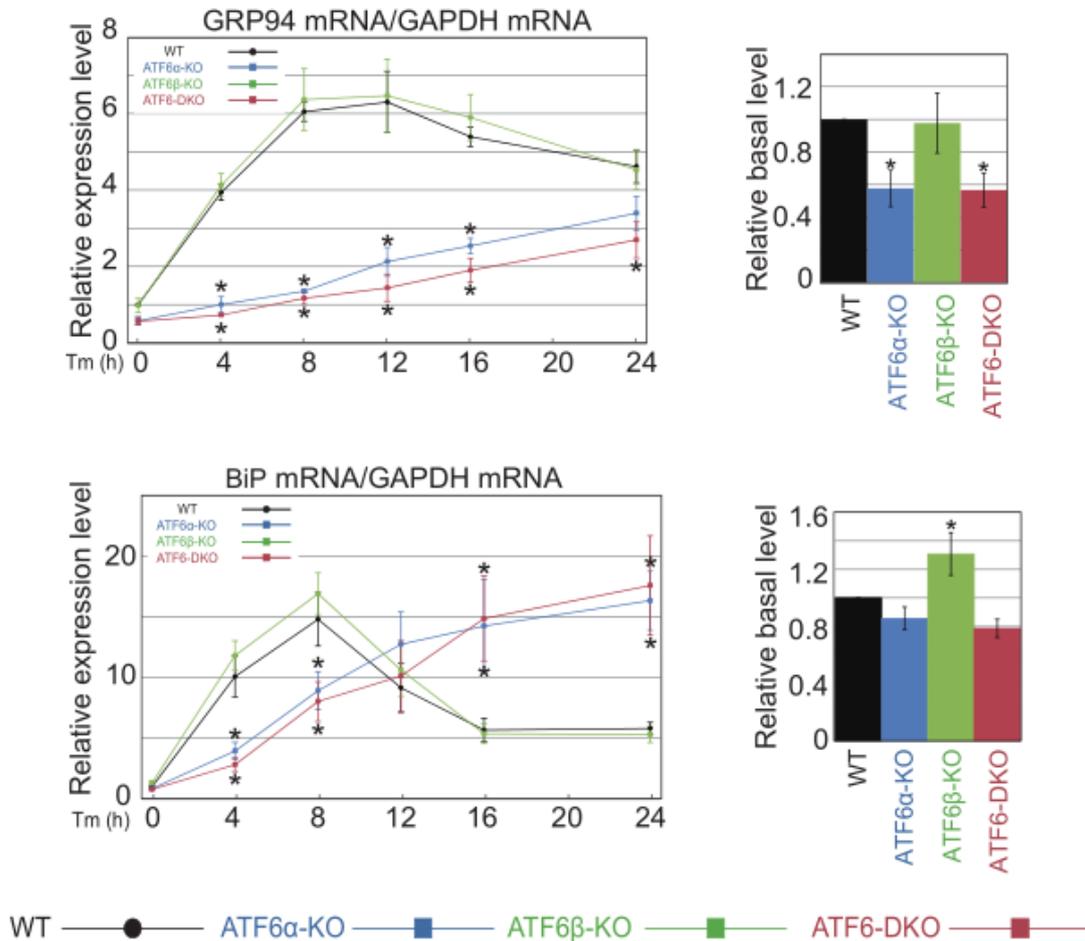


Fig.8 GRP94、BiP の qRT-PCR

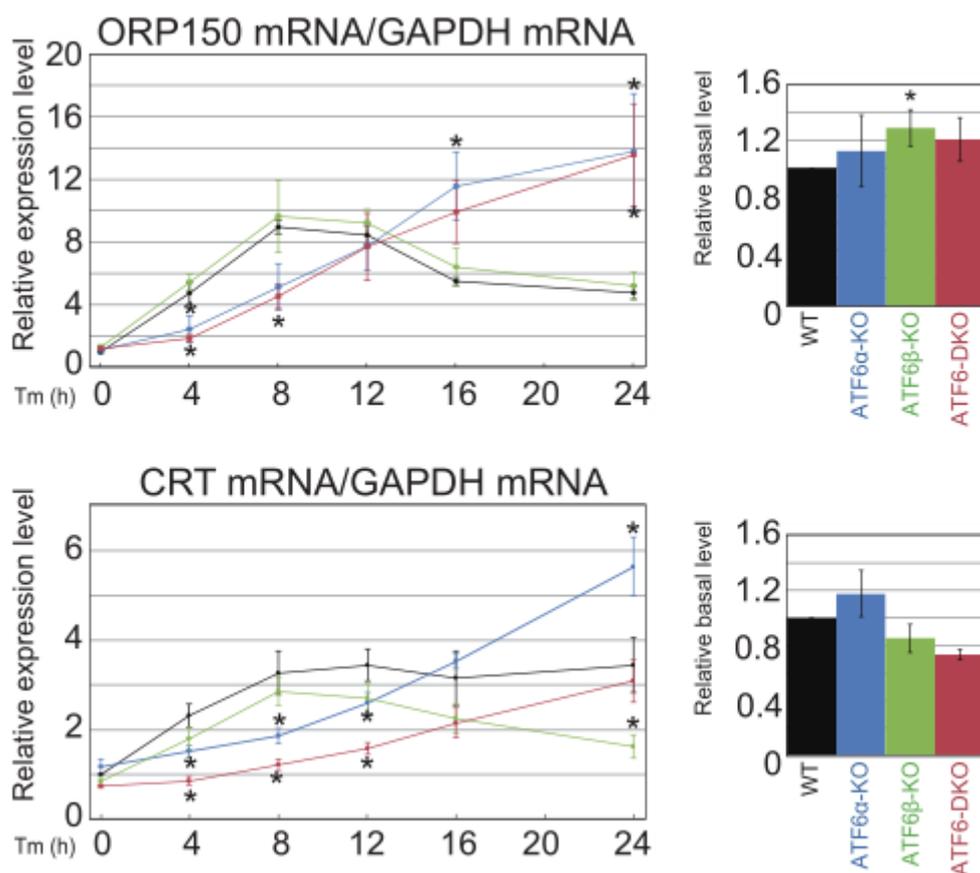
A. 野生型または ATF6α-KO、ATF6β-KO、ATF6-DKO 細胞に示されている時間で 2μg/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、抽出した RNA から逆転写で得られた cDNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。左側は GAPDH に対する GRP94 mRNA の相対量を示す。右側は Tm 処理 0 時間の野生型に対する相対量を示す。合計 3 回の実験結果の平均と標準偏差を計算し、Dunnnett test で有意差検定を行った *p<0.05。

B. A と同様な方法で求めた BiP mRNA の相対量を示す。

さらに、ORP150, CRT、ERdj3 の転写誘導を qRT-PCR で調べた結果、これらの転写誘導は BiP と類似したパターンを示した(Fig.9)。

Fig.1 で示しているように、IRE1 経路の下流因子である XBP1(S)は小胞体シャペロンのプロモーター上に存在する ERSE シス配列に結合し、また ATF6 α とヘテロダイマーを形成して ERAD 関連因子の転写誘導を行うことが既に明らかになっている。XBP1(S)のターゲット遺伝子である ERdj4 mRNA の発現を qRT-PCR で調べた結果、ATF6 α 欠損により抑制されておらず、8 時間以降では WT 細胞と ATF6 β -KO 細胞の場合を顕著に上回っていることが見られた(Fig.9)。

以上の結果から、ATF6 α -KO 細胞と ATF6-DKO 細胞において、Tm 処理 8 時間以降で見られた BiP などの転写誘導の亢進は IRE1 経路の活性化による結果である可能性が考えられ、ATF6 欠損が IRE1 経路の活性化に及ぼす影響について調べることにした。



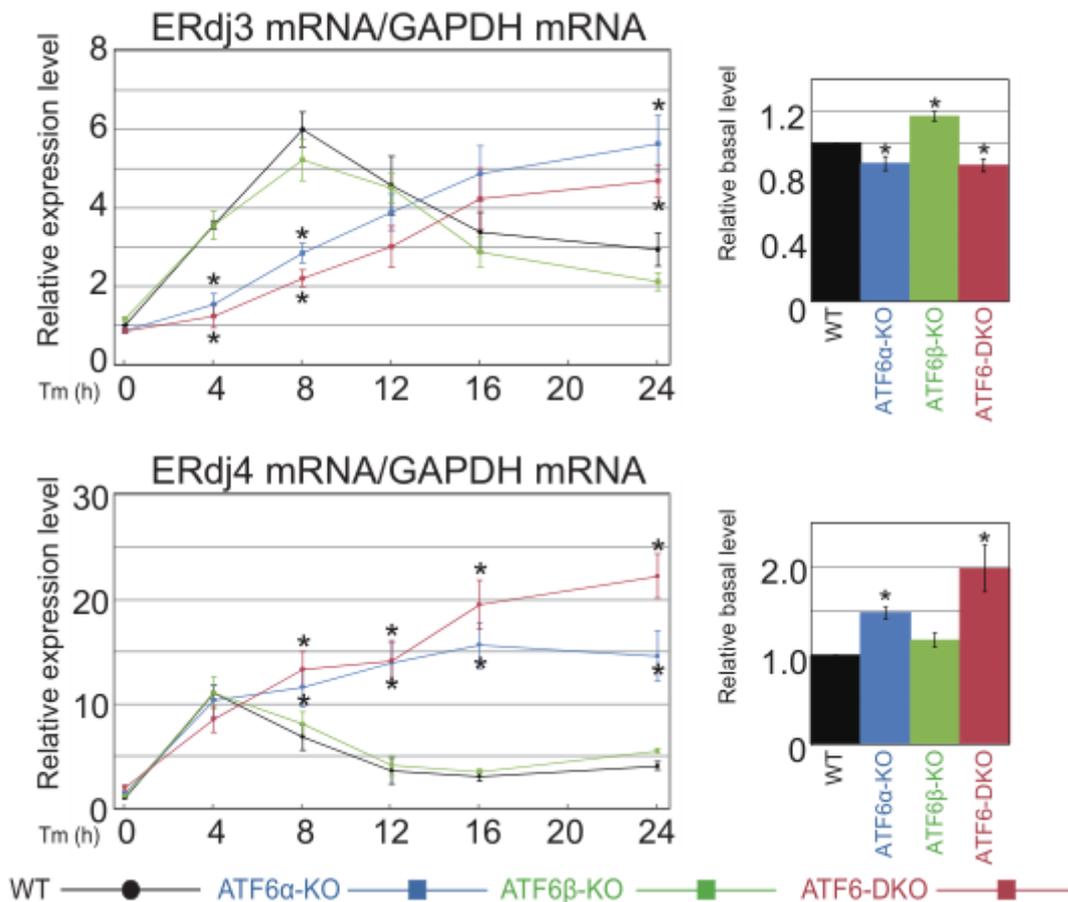


Fig.9 ATF6 ノックアウト細胞における小胞体シャペロンの転写誘導

Fig.8-A と同様な方法で求めた各小胞体シャペロン mRNA の相対量を示す。

2-2. ATF6 欠損による IRE1 経路の活性化

小胞体ストレスが発生すると、IRE1aは二量体を形成し、自己リン酸化することで活性化される。リン酸化された IRE1a分子は SDS-PAGE 中に非リン酸化 IRE1a分子に比べより遅い移動度を示す。この原理を利用して Western blot 解析で IRE1 の活性化状態を調べることが可能になる。

WT 細胞と ATF6 ノックアウト細胞に Tm 処理を行い、脱リン酸化阻害剤が含まれたバッファーで細胞を融解してタンパク質を回収した。IRE1a抗体を用いて Western blot を行った結果、WT 細胞と ATF6β-KO 細胞において、Tm 処理 4 時間後でリン酸化された IRE1aバンドが現れ、8 時間以降から徐々に非リン酸化状態に戻ることが見られた。これに対し、ATF6α-KO 細胞と ATF6-DKO 細胞においては Tm 処理 4 時間後でリン酸化され

た IRE1 α が 24 時間後になってもほぼリン酸化状態を保っていることが見られた。Phos-tag ゲルを用いた SDS-PAGE では分離度がさらに上がり、IRE1 α の持続的な活性化がより顕著に見られた(Fig.10)。

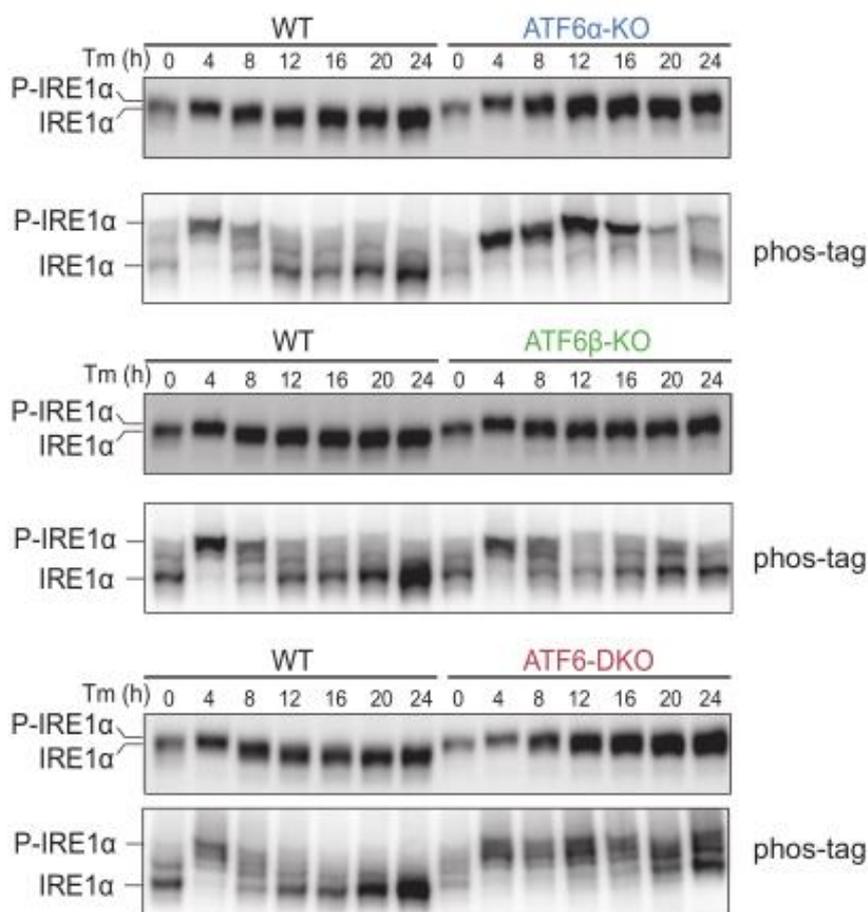


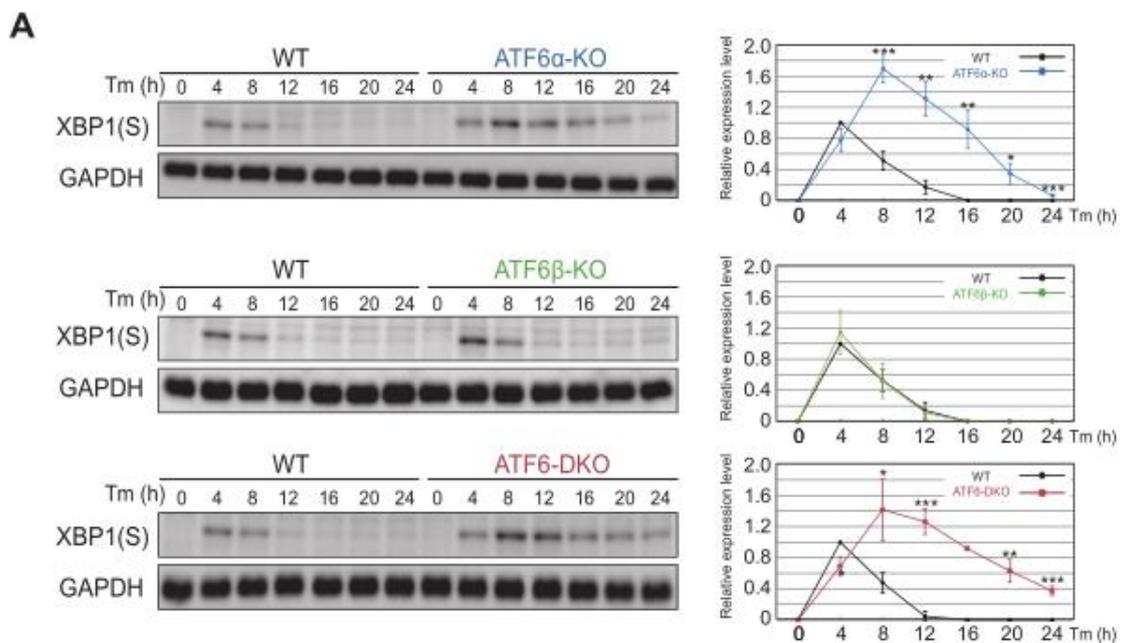
Fig.10 ATF6 α ノックアウトによる IRE1 α の持続的な活性化

野生型または ATF6 α -KO、ATF6 β -KO、ATF6-DKO 細胞に示されている時間で 2 μ g/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、作ったライゼートを泳動してウエスタンブロットを行った。上側は 10 μ g ずつノーマルゲルで、下側は 7.5 μ g ずつ phos-tag ゲルで泳動を行い、検出には抗 IRE1 α 抗体を使用した。

小胞体ストレス応答が起こると、前駆体型 XBP1 mRNA は活性化した IRE1αによりスプライシング反応を受けて成熟型 XBP1 mRNA になり、転写因子として機能する XBP1(S)に翻訳される。XBP1(S)の発現量を Western blot で調べることで IRE1 経路の活性化状態が反映される。

引き続き、XBP1(S)の発現量を Western blot で調べた結果、WT 細胞と ATF6β-KO 細胞において、Tm 処理 4 時間後で XBP1(S)の発現がピークになってから徐々に減少することが見られた。これに対し、ATF6α-KO 細胞と ATF6-DKO 細胞において、XBP1(S)の発現量は Tm 処理 8 時間後でピークになってから徐々に減少するが、WT 細胞と ATF6β-KO 細胞に比べ顕著に高いレベルでの発現が 24 時間まで持続することが見られた(Fig.11-A)。次に XBP1 mRNA を qRT-PCR で調べた結果、ATF6α-KO 細胞と ATF6-DKO 細胞において、XBP1(S)の発現量と、XBP1(T)(T:Total)に対する XBP1(S)の割合も WT 細胞と ATF6β-KO 細胞の場合に比べ、Tm 処理 4 時間以降から持続的に上回っていることが見られた(Fig.11-B)。

以上の結果から、HCT116 細胞では ATF6αを欠損すると、IRE1 経路が持続的に活性化することがわかった。これにより XBP1(S)が持続的に発現されており、Tm 処理 8 時間以降で見られた BiP などの小胞体シャペロンの転写誘導に関与していると考えられる。この仮説については第三節で論証する。



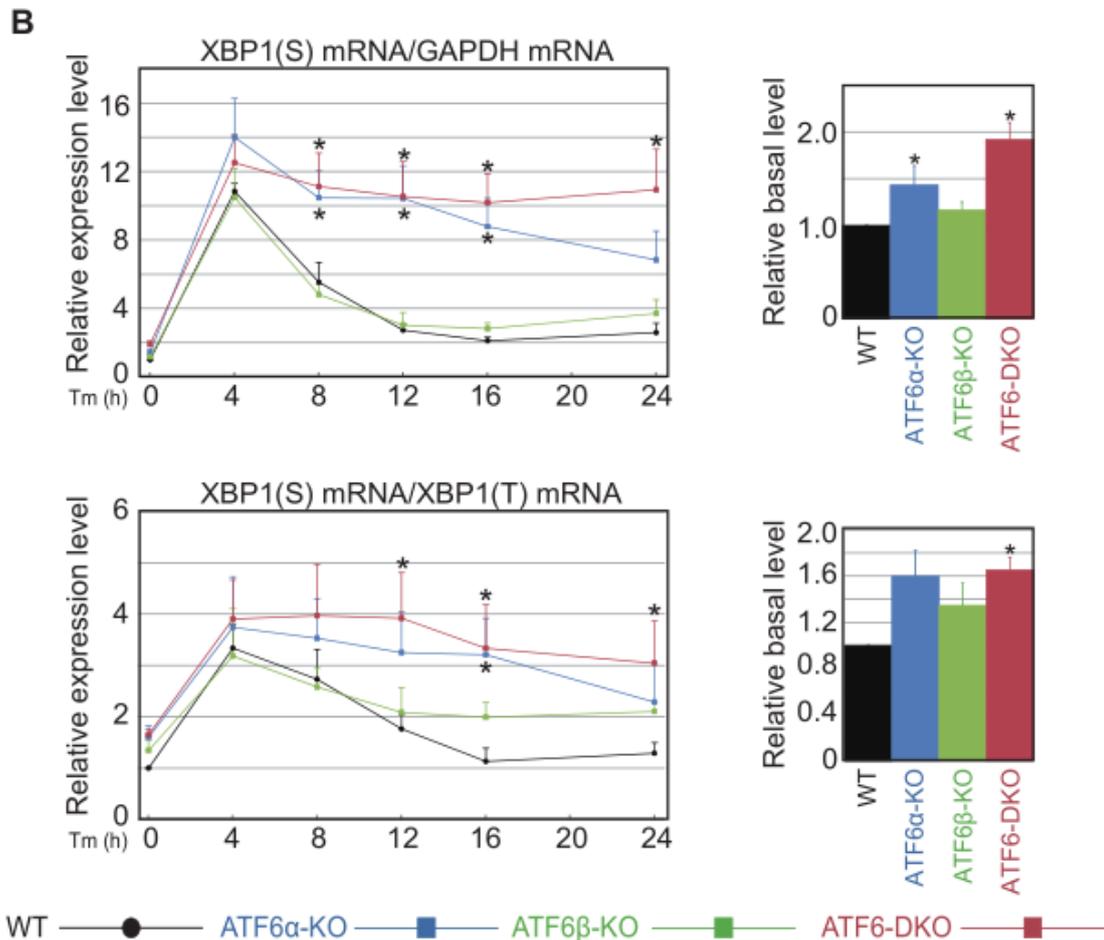


Fig.11 XBP1 の持続的な発現

- A. Fig.7-Aと同様な方法で求めた XBP1(S)の相対定量の結果を示す。検出には抗 XBP1 および抗 GAPDH 抗体を使用した。抗 XBP1 ウェスタンブロットでは 10 μ g、抗 GAPDH ウェスタンブロットでは 0.25 μ g ずつ泳動を行った。
- B. Fig.8-Aと同様な方法で求めた XBP1(S) mRNA の相対量を示す。

2-3. ATF6 欠損による PERK 経路の活性化

ATF6 欠損による PERK 経路の活性化についても検討した。PERK は小胞体ストレスの刺激を感知すると二量体になり、自己リン酸化することで活性化される。IRE1 と同様に、Western blot により PERK の活性化状態を調べた。PERK 抗体を用いて Western blot を行った結果、WT 細胞と ATF6 β -KO 細胞において、Tm 処理 4 時間後で PERK がリン酸化され、4 時間以降から徐々に非リン酸化状態に戻ることが見られた。これに対し、ATF6 α -KO 細胞と ATF6-DKO 細胞においては PERK のリン酸化がほぼ 20 時間後まで持続することが見られた(Fig.12)。

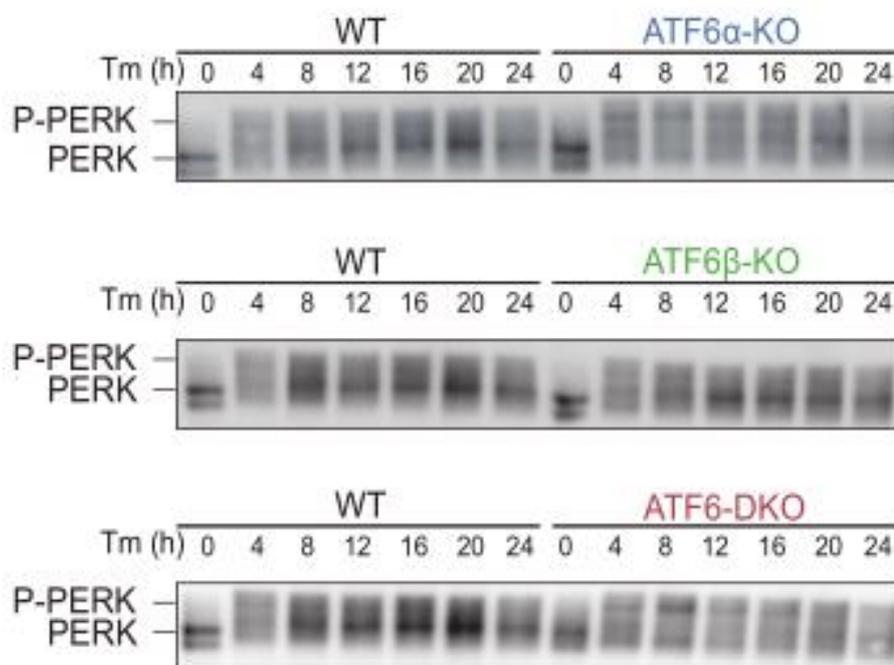
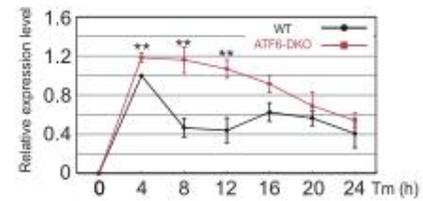
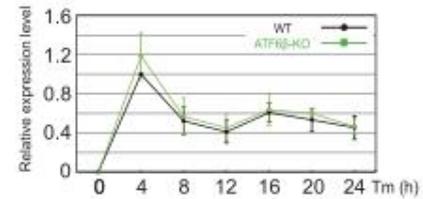
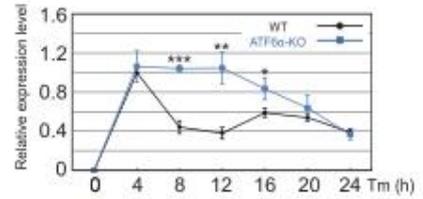
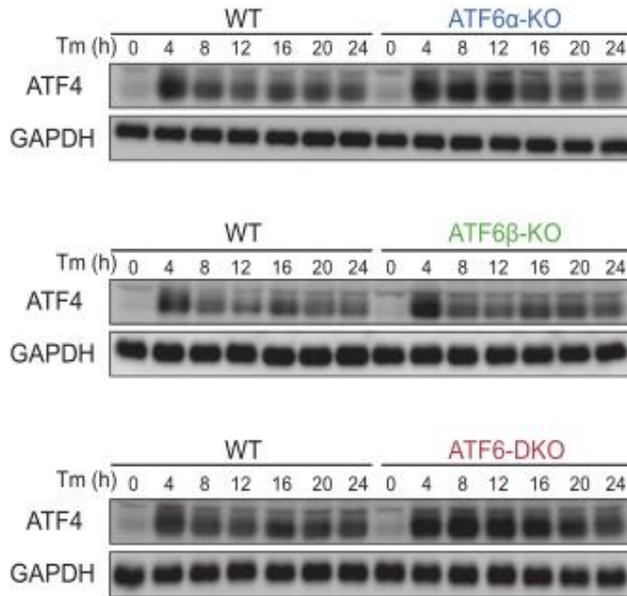
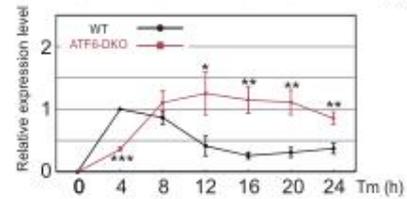
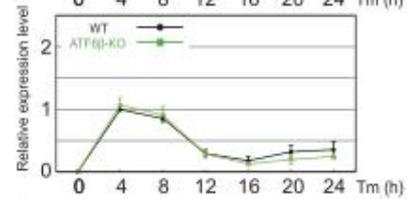
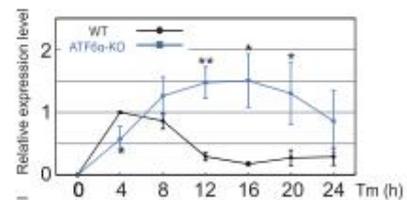
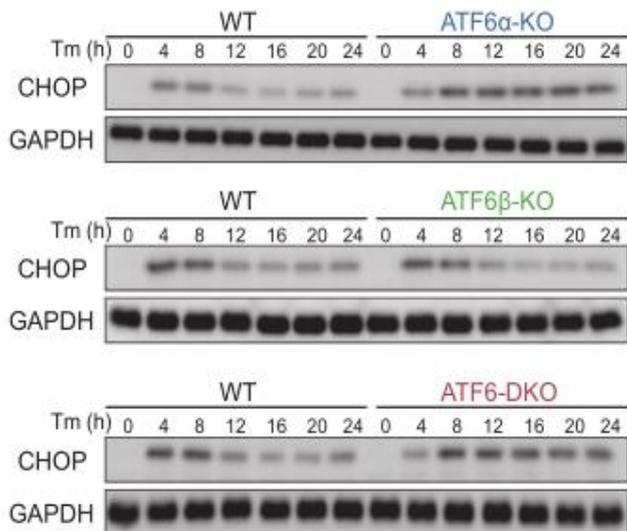


Fig.12 PERK 抗体を用いた Western blot

野生型または ATF6 α -KO、ATF6-KO、ATF6-DKO 細胞に示されている時間で 2 μ g/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、作ったライゼートを 7.5 μ g ずつ泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 PERK 抗体を使用した。

ATF4 と CHOP は PERK 経路の下流遺伝子である。活性化した PERK により翻訳開始因子である eIF2 α がリン酸化されると、全般的なタンパク質翻訳が抑制される。しかし、一方で逆説的に ATF4 の翻訳が誘導される。ATF4 は転写因子として機能し、CHOP の転写誘導を促進する。ATF4 と CHOP の発現を Western blot で調べることで PERK 経路の活性化状態が反映される。その結果、XBP1 (S) と類似して WT 細胞と ATF6 β -KO 細胞では ATF4 の発現量が増加し、Tm 処理 4 時間後でピークになってから徐々に減少することが見られた。それに対し、ATF6 α -KO 細胞と ATF6-DKO 細胞においては ATF4 の発現が Tm 処理 4 時間以降から WT 細胞と ATF6 β -KO 細胞の場合を上回っていることがわかった(Fig.13-A)。ATF4 の標的遺伝子である CHOP も ATF6 α -KO 細胞と ATF6-DKO 細胞において持続的な発現が見られた(Fig.13-B)。Caspase3 はアポトーシスのマーカーであり、ATF4-CHOP 経路により制御されると知られている。Caspase3 の発現を Western blot で調べた結果、ATF6 α -KO 細胞と ATF6-DKO 細胞において Caspase3 が WT 細胞と ATF6 β -KO 細胞に比べ顕著に増加したことが見られた(Fig.13-C)。

以上の結果から、ATF6 α 欠損されると、IRE1 と同様に PERK 経路も持続的に活性化されることがわかった。

A**B**

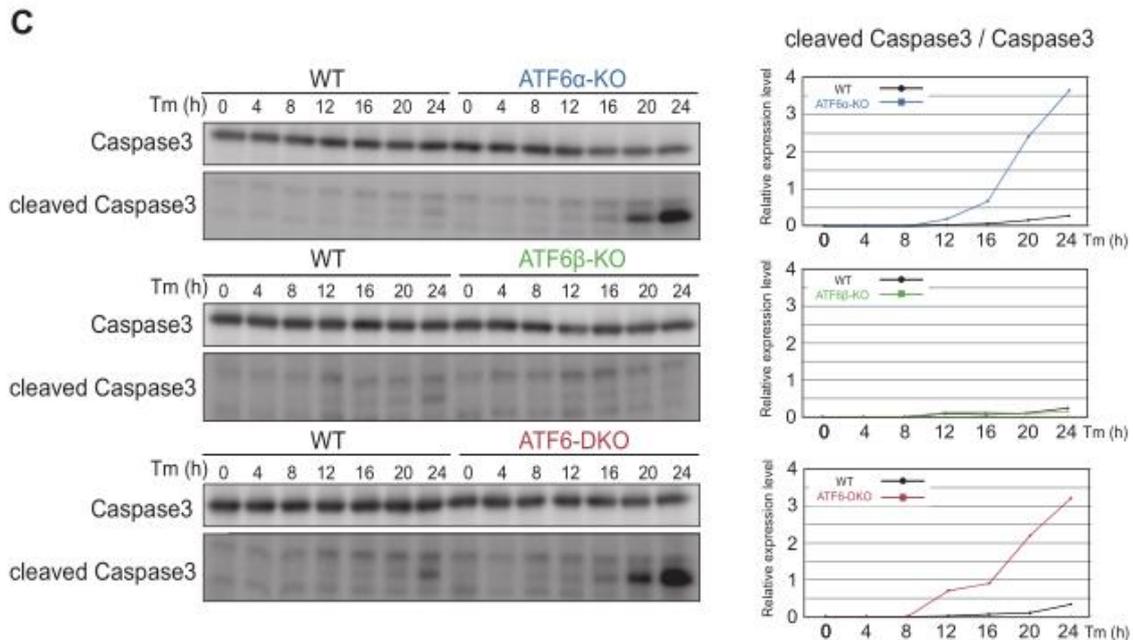


Fig.13 PERK 経路の持続的な活性化

- A. Fig.7-Aと同様な方法で求めた ATF4 の相対定量の結果を示す。検出には抗 ATF4 および GAPDH 抗体を使用し。抗 ATF4 ウェスタンブロットでは 10 μ g、抗 GAPDH ウェスタンブロットでは 0.25 μ g ずつ泳動を行った。
- B. Fig.7-Aと同様な方法で求めた CHOP の相対定量の結果を示す。検出には抗 CHOP および抗 GAPDH 抗体を使用し。抗 CHOP ウェスタンブロットでは 20 μ g、抗 GAPDH ウェスタンブロットでは 0.25 μ g ずつ泳動を行った。
- C. 野生型または ATF6 α -KO、ATF6-KO、ATF6-DKO 細胞に示されている時間で 2 μ g/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、作ったライゼート 20 μ g ずつを泳動してウェスタンブロットを行った。検出には抗 Caspase3 および抗 cleaved Caspase3 抗体を使用した。右側は Caspase3 に対する cleaved Caspase3 の相対定量を行った結果を示す。

第三節 ATF6、IRE1 二重遺伝子ノックアウト細胞株樹立と解析

3-1. ATF6 α /IRE1 α ダブルノックアウト細胞株の作製

第二節の解析結果により、ATF6 α が欠損された HCT116 細胞では、小胞体ストレスが持続すると BiP などの小胞体シャペロンの転写誘導が亢進されることがわかった。ATF6 α が欠損されると IRE1 α が持続的に活性化することから、このような小胞体シャペロンの転写誘導は IRE1 α の下流因子である XBP1 によるものであると予想した。この仮説を論証するため、引き続き ATF6 α /IRE1 α ダブルノックアウト細胞株の作製を試した。

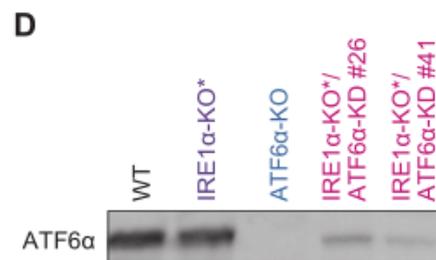
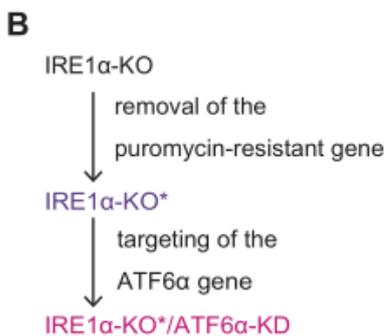
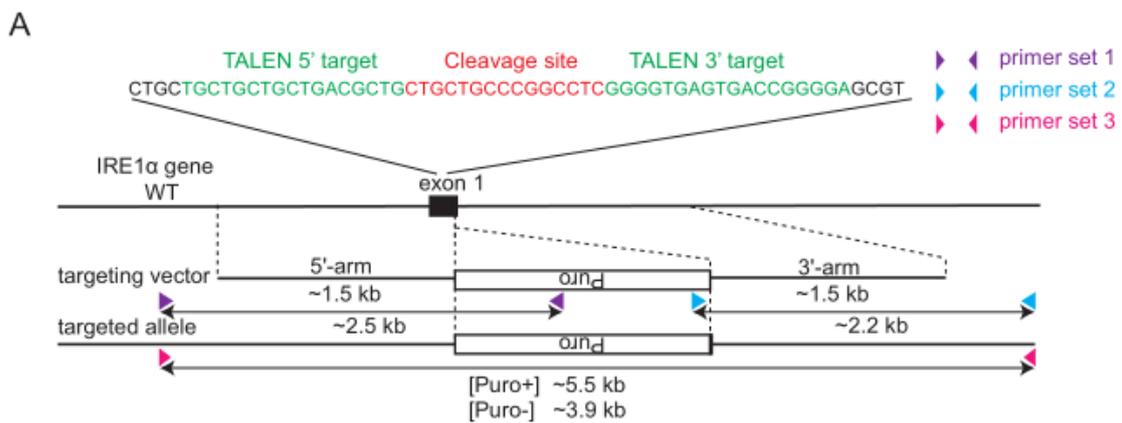
Cre-LoxP-Recombination システムを利用して ATF6 α -KO 細胞に挿入された Puromycin 耐性遺伝子を取り除いた後、同研究室の陳炳碩氏から頂いた IRE1 α ターゲットベクターと TALEN ベクターをトランスフェクション(Fig.14-A)、Puromycin セレクションをかけたが、ポジティブコロニーは得られなかった。

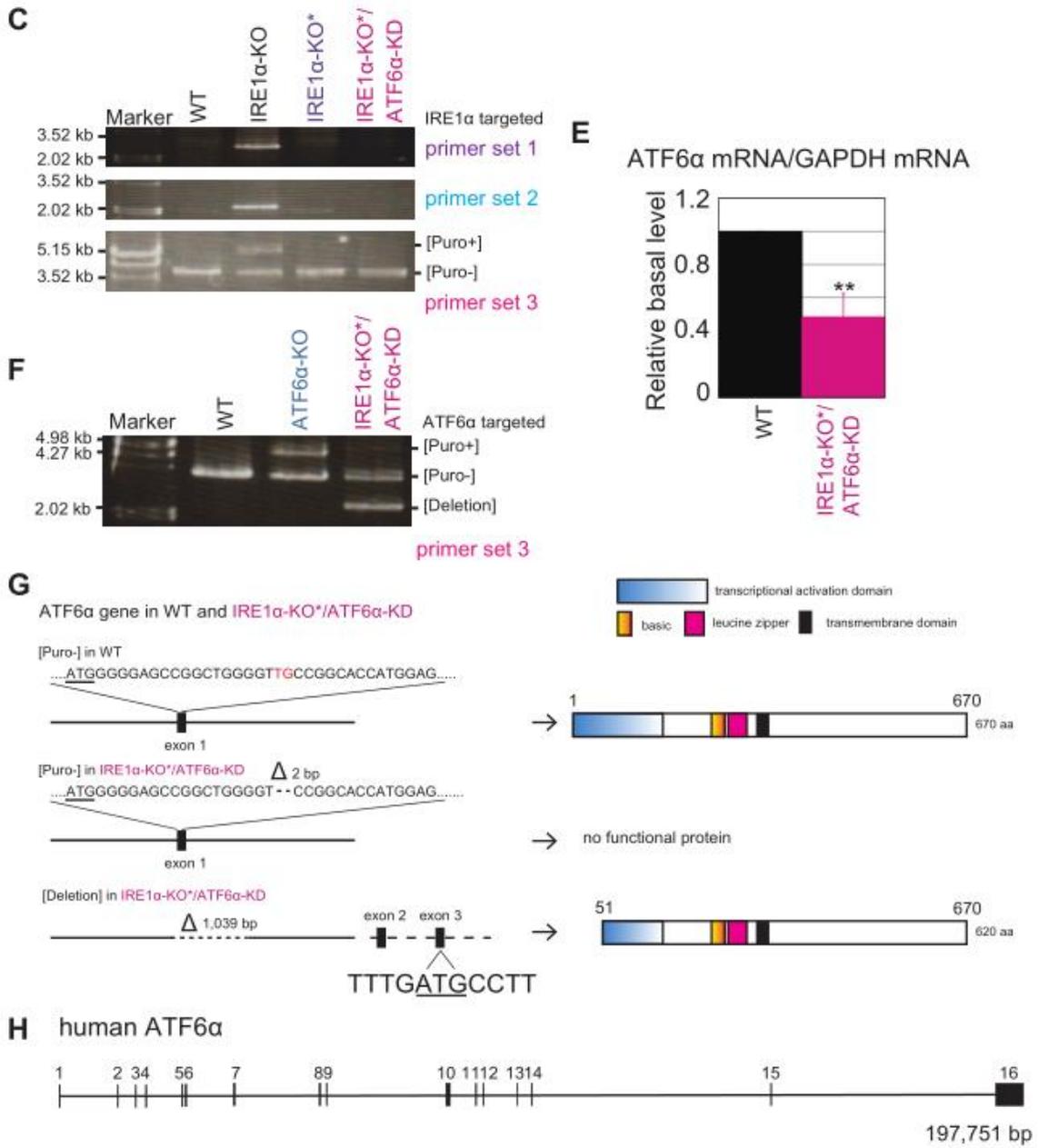
次に、陳炳碩氏から Puromycin 耐性遺伝子を取り除いた IRE1 α ノックアウト HCT116 細胞を頂き(IRE1 α -KO*と表記する)、ATF6 α をノックアウトすることでダブルノックアウト細胞株作製を試した(Fig.14-B、C)。2回のトランスフェクションとコロニーセレクションを行ったが、ポジティブコロニーは得られなかった。

一方で、得られたコロニー中で ATF6 α の発現が WT 細胞に比べ顕著に低下している変異株が見つかった(Fig.14-D の#26と#41)。ATF6 α の発現量がより低い#41に対してさらにジェノタイピングを行った(IRE1 α -KO*/ATF6 α -KD と表記する。KD:Knock down)。IRE1 α -KO*/ATF6 α -KD 細胞で転写される ATF6 α mRNA を qRT-PCR で定量した結果、WT 細胞に比べ半分以下まで低下していることが見られた(Fig.14-E)。引き続き、細胞から抽出した DNA をテンプレートとしてゲノム PCR を行った。用いたプライマーは Fig.4-A に示している。その結果、IRE1 α -KO*/ATF6 α -KD 細胞において WT 細胞で見られたバンドと同じ高さのバンド([Puro-])、これに比べて塩基配列の欠損により大幅に下にシフトしたバンドが見られた([Deletion])(Fig.14-F)。シーケンシング解析により ATF6 α exon1 前後の配列を決定した結果、一方のアレル([Puro-])には 2 塩基の欠損、もう一方のアレル([Deletion])には exon1 が全部含まれた 1039 塩基の欠損が生じたことがわかった(Fig.14-G)。

最後に、5' RACE(Rapid amplification of cDNA ends)システムを用いて IRE1 α -KO*/ATF6 α -KD 細胞から転写される ATF6 α mRNA 配列に対して解析を行った結果、2種類の変異型の mRNA が同定された。1種類は ATF6 α Exon1 塩基配列の変

異により終止コドンが生じ、正常なタンパク質に翻訳されない mRNA である。もう 1 種類は exon1 配列が全部欠損され、ATF6a Exon 2 から Exon16 までの配列が転写された mRNA である。データベースで ATF6a のゲノム配列を調べた結果、Exon 3 にも開始コドンが存在し、もう一つの少し短い ORF が存在することがわかった。Exon1 の配列が除かれた mRNA からは、670 アミノ酸からなる野生型 ATF6a より少し短い変異体 ATF6a が翻訳されると予想される (Fig.14-G, H)。Endo H 酵素 (Endoglycosidase H) はグリコシダーゼであり、小胞体中存在する N 結合型糖タンパク質から高マンノース型糖鎖を切断できる。Endo H で細胞抽出液を処理し、ATF6a 抗体を用いて Western blot を行った結果、WT 細胞で見られた ATF6a の糖鎖切除が IRE1 α -KO*/ATF6a-KD 細胞においても見られたため、この変異型の短い ATF6a は小胞体に局在していることがわかった (Fig.14-I)。





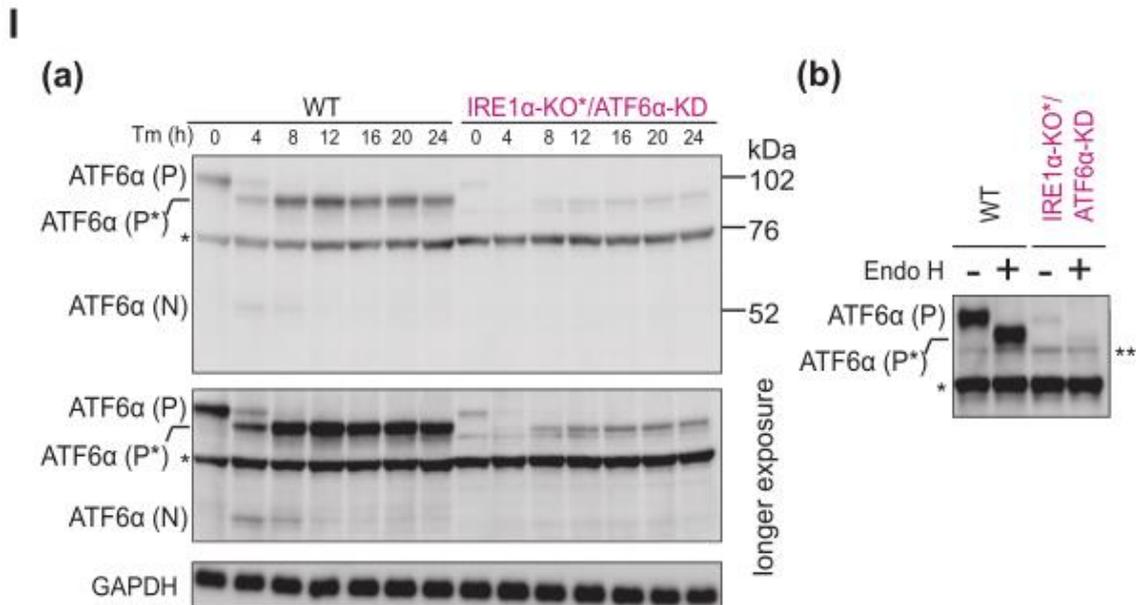


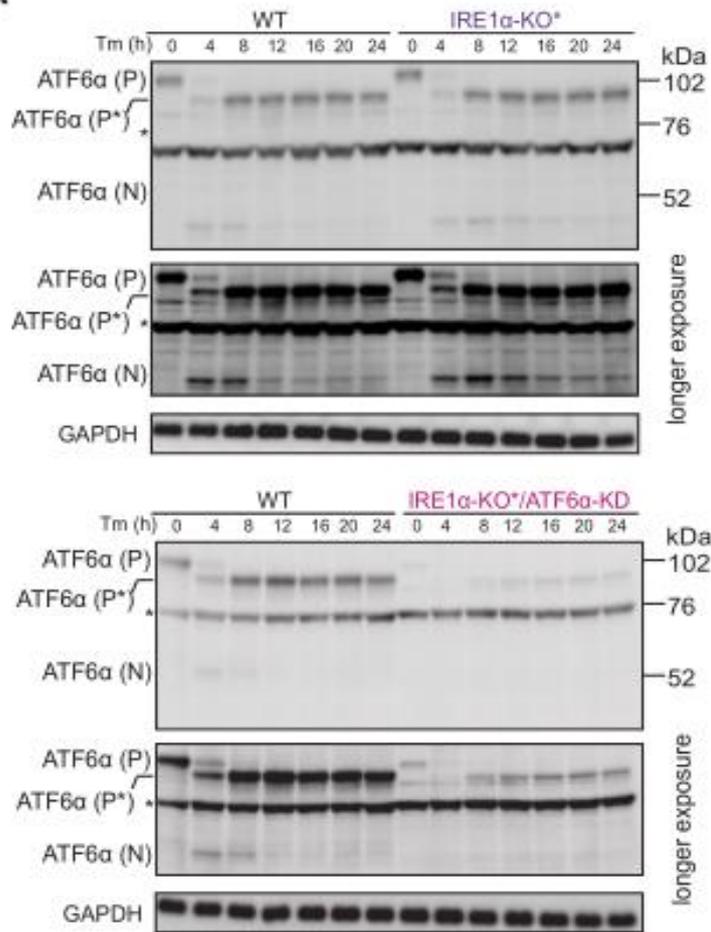
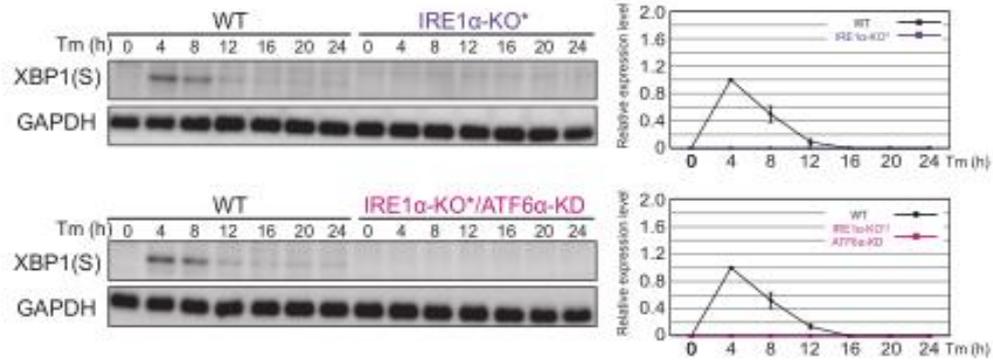
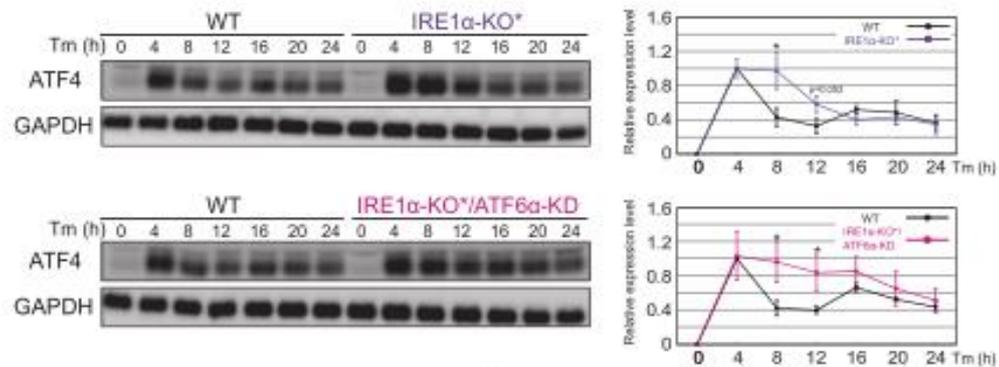
Fig.14 IRE1α-KO/ATF6αダブルノックアウト細胞株の作製

- A. TALEN 法を用いた IER1αシングルノックアウト細胞作製の模式図。TALEN は IER1αの exon 1 を切断し、ピューロマイシン耐性遺伝子が入ったターゲティングベクターとの組み換えが起こるように設計された。有色三角形はゲノム PCR に用いたプライマーセットを、両方向矢印は PCR により増幅される領域を示す。
- B. IRE1α-KO 細胞から LoxP recombination システムによりピューロマイシン耐性遺伝子が除かれた IRE1α-KO*細胞が得られた。さらに、Fig.3-A で示した方法で ATF6α ノックアウトを行った結果、IRE1α-KO*/ ATF6α-KD 細胞が得られた。
- C. A に示されたプライマーセットを用いて PCR を行った結果、IRE1α-KO 細胞における片側のアレルに挿入されたピューロマイシン耐性遺伝子が IRE1α-KO*細胞では除去されたことが確認された。
- D. 野生型または ATF6α-KO, IRE1α-KO*, IRE1α-KO*/ ATF6α-KD #26, #41 細胞から作ったライゼートを 20 μg ずつ泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 ATF6α抗体を使用した。
- E. 野生型または IRE1α-KO*/ ATF6α-KD 細胞から抽出した RNA から逆転写で得られた cDNA をテンプレートとして RT-PCR を行い、GAPDH に対する ATF6α mRNA の相対量を示す。

- F. Fig.3-A に示したプライマーを用いた PCR 結果。下の G を参照
- G. 野生型または IRE1 α -KO*/ ATF6 α -KD 細胞に対するシーケンシング解析により決定された ATF6 α exon1 一部領域の塩基配列を示す。IRE1 α -KO*/ ATF6 α -KD 細胞において片側のアレル([Puro-])の ATF6 α exon1 では 2 塩基の欠失、もう一方のアレル([Deletion]) の ATF6 α では exon1 が含まれた 1039 塩基の欠失が見られた。
- H. human ATF6 α のゲノム模式図
- I. 左側は野生型または IRE1 α -KO*/ ATF6 α -KD 細胞に示されている時間で 2 μ g/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、作ったライゼートを 20 μ g ずつ泳動してウエスタンブロットを行った結果を示す。右側は野生型または IRE1 α -KO*/ ATF6 α -KD 細胞から作ったライゼートを EndoH で処理し、20 μ g ずつ泳動してウエスタンブロットを行った結果を示す。検出には抗 ATF6 α および抗 GAPDH 抗体を使用した。

細胞に Tm 処理を行い、小胞体ストレスに応じて生じる切断型 ATF6 α (N)と IRE1 経路の下流因子である XBP1(S)の発現を Western blot で調べた結果、IRE1 α -KO*/ATF6 α -KD 細胞において ATF6 α (N)と XBP1(S)は検出されなかった(Fig.15-A、B)。従って、ATF6 α /IRE1 α ダブルノックアウト細胞と類似した小胞体ストレス応答機構を持つ変異株として IRE1 α -KO*/ATF6 α -KD を解析に使用することにした。

引き続き、ATF4 と CHOP の発現量を Western blot で調べた結果、ATF6 α -KO 細胞、ATF6-DKO 細胞と同様に、ATF4 と CHOP の持続的な発現が見られた。CHOP は PERK 経路と ATF6 経路共により制御されているため[58]、IRE1 α -KO*細胞に比べ IRE1 α -KO*/ATF6 α -KD 細胞での発現はより低下していることがわかった(Fig.15-C、D)。

A**B****C**

D

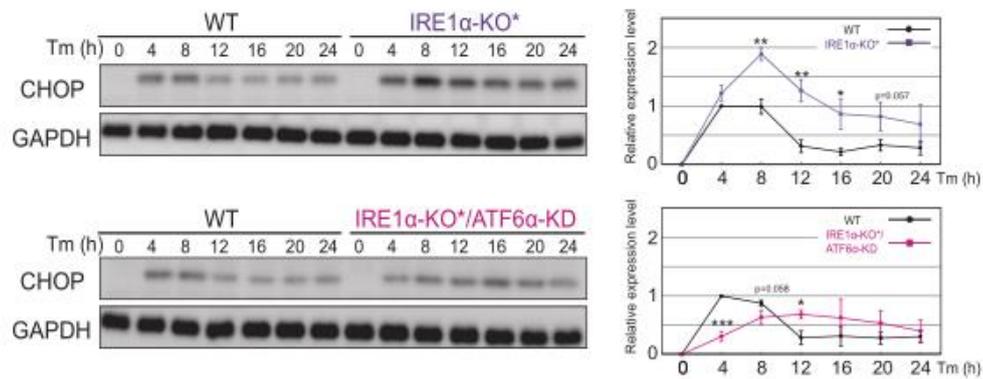


Fig.15 IRE1α-KO*/ATF6α-KD 細胞の小胞体ストレス応答

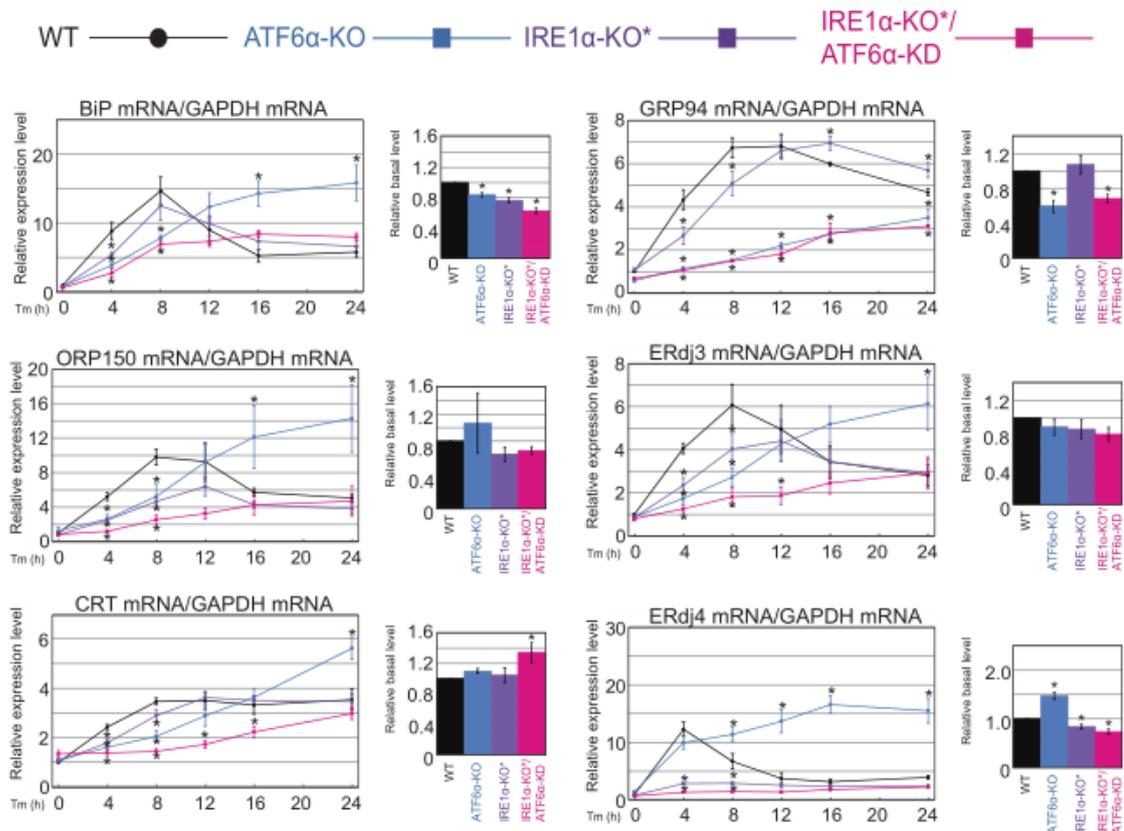
- A. 野生型または IRE1α-KO*, IRE1α-KO*/ ATF6α-KD 細胞に示されている時間で 2μg/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、作ったライゼートを泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 ATF6αおよび抗 GAPDH 抗体を使用した。抗 ATF6αウエスタンブロットでは 20μg、抗 GAPDH ウエスタンブロットでは 0.25μg ずつ泳動を行った。
- B. 野生型または IRE1α-KO*, IRE1α-KO*/ ATF6α-KD 細胞に示されている時間で 2μg/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、作ったライゼートを泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 XBP1 および GAPDH 抗体を使用した。右側は GAPDH に対する XBP1(S)の相対定量を行った結果を示す。抗 XBP1 ウエスタンブロットでは 10μg、抗 GAPDH ウエスタンブロットでは 0.25μg ずつ泳動を行った。合計 3 回行った実験結果の平均と標準偏差を計算し、ttest で有意差検定を行った *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.05。示しているのは一回目実験の結果である。
- C. Bと同様な方法で求めた ATF4 の相対定量の結果を示す。検出には抗 ATF4 および抗 GAPDH 抗体を使用し、抗 ATF4 エスタンブロットでは 10μg、抗 GAPDH ウエスタンブロットでは 0.25μg ずつ泳動を行った。
- D. Bと同様な方法で求めた CHOP の相対定量の結果を示す。検出には抗 CHOP および抗 GAPDH 抗体を使用し、抗 CHOP エスタンブロットでは 20μg、抗 GAPDH ウエスタンブロットでは 0.25μg ずつ泳動を行った。

3-2. IRE1α-KO*/ATF6α-KD を用いた解析

次に、IRE1α-KO*/ATF6-KD細胞でBiPなどの小胞体シャペロンの転写誘導をqRT-PCRで調べた。その結果、ATF6α-KO細胞においてTm処理8時間以降で見られたBiP、ORP150、CRT、ERdj3の転写誘導の亢進がIRE1α-KO*/ATF6α-KD細胞では完全に抑制されていることが見られた(Fig.16-A)。BiPの発現量をWestern blotで調べた結果、IRE1α-KO*細胞はWT細胞に比べ顕著な差は見られなかったが、IRE1α-KO*/ATF6α-KD細胞では顕著に低下していることが見られた(Fig.16-B)。GRP94はATF6α依存的に、ERdj4はIRE1α依存的に転写誘導が制御されることも確認された(Fig.16-A, C)。

以上の結果から、ATF6αノックアウト細胞においてTm処理8時間以降から見られた小胞体シャペロンの転写誘導の亢進は、ATF6α欠損により持続的に活性化されたIRE1経路による結果であると判断した。

A



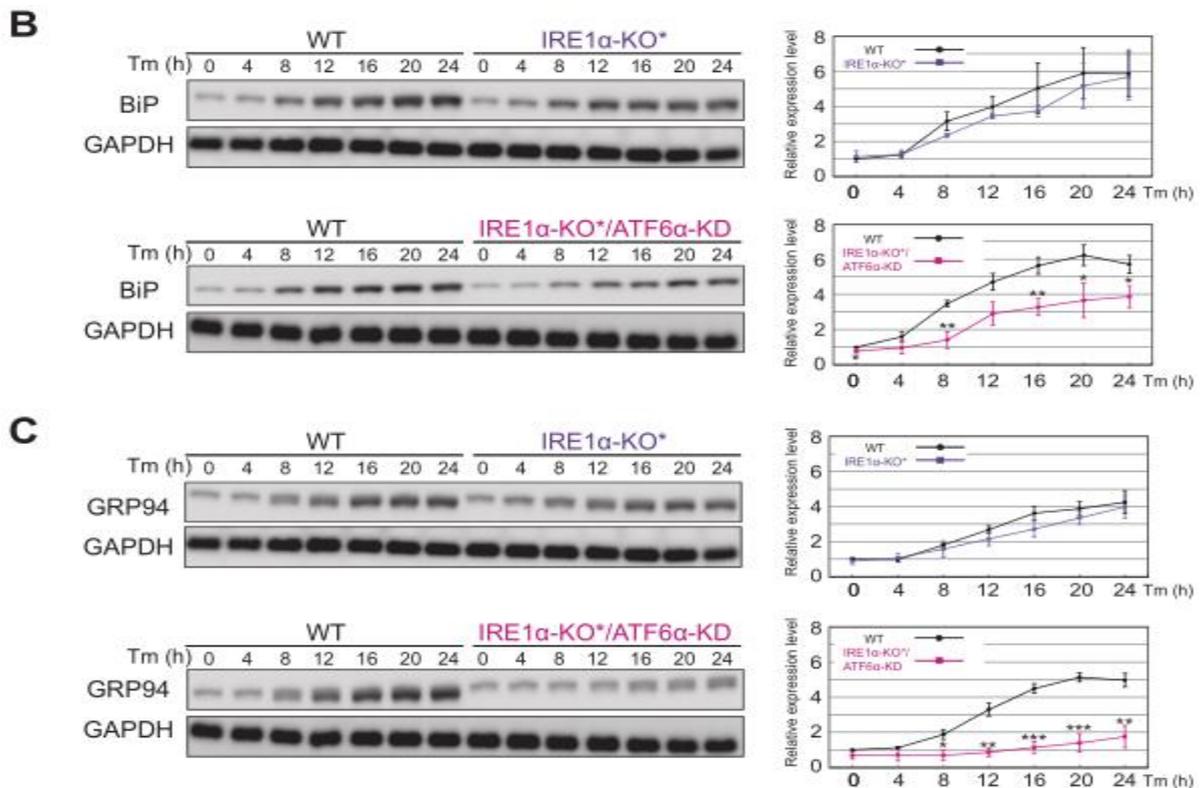


Fig.16 IRE1α-KO/ATF6-KD 細胞の解析

- A. 野生型または ATF6α-KO、IRE1α-KO*、IRE1α-KO*/ ATF6α-KD 細胞に示されている時間で 2μg/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、抽出した RNA から逆転写で得られた cDNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。左側は GAPDH に対する各小胞体シャペロン mRNA の相対量を示す。右側は Tm 処理 0 時間時の野生型に対する相対量を示す。合計 3 回の実験結果の平均と標準偏差を計算し、Dunnett test で有意差検定を行った *p<0.05。
- B. 野生型または IRE1α-KO*、IRE1α-KO*/ ATF6α-KD 細胞に示されている時間で 2μg/ml 濃度のツニカマイシン(Tm)処理を行い、作ったライゼートを泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 KDEL および抗 GAPDH 抗体を使用した。右側は GAPDH に対する BiP の相対定量を行った結果を示す。抗 KDEL ウエスタンブロットでは 3μg、抗 GAPDH ウエスタンブロットでは 0.25μg ずつ泳動を行った。合計 3 回行った実験結果の平均と標準偏差を計算し、ttest で有意差検定を行った *p<0.05,**p<0.01,***p<0.05。示しているのは一回目実験の結果である。
- C. B と同様な方法で求めた GRP94 の相対定量の結果を示す。

第四節 ノードマウス移植実験

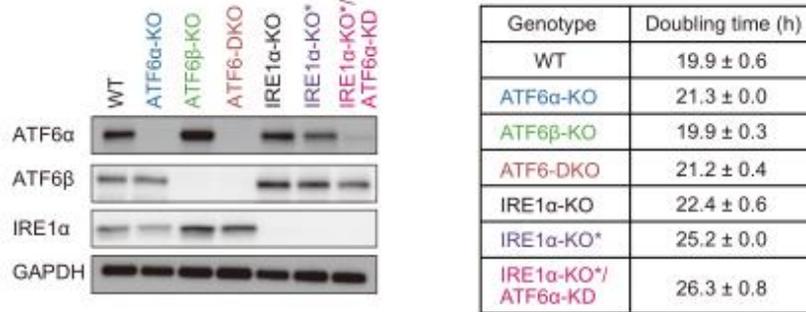
この節ではノードマウス移植実験を計画し、ATF6 欠損が腫瘍形成に及ぼす影響を調べた。ノードマウスは胸腺に障害を引き起こす遺伝子変異を持っており、T 細胞の数が顕著に減少しているため、免疫系が阻害されている。そのため、移植された腫瘍に対する免疫拒絶反応を起こせないのも、腫瘍移植実験に適切な動物モデルである。

本研究では 500 万個の HCT116 細胞を 50 μ l PBS に懸濁してノードマウスの右側後脚の皮下組織に注射し、形成した腫瘍の体積を測った。まず、WT、ATF6 α -KO、ATF6 β -KO、ATF6-DKO 細胞を移植した結果、腫瘍形成に顕著な差は見られなかった (Fig.19-B)。HCT116 細胞において ATF6 経路は腫瘍形成に必須ではないと結論を付けた。

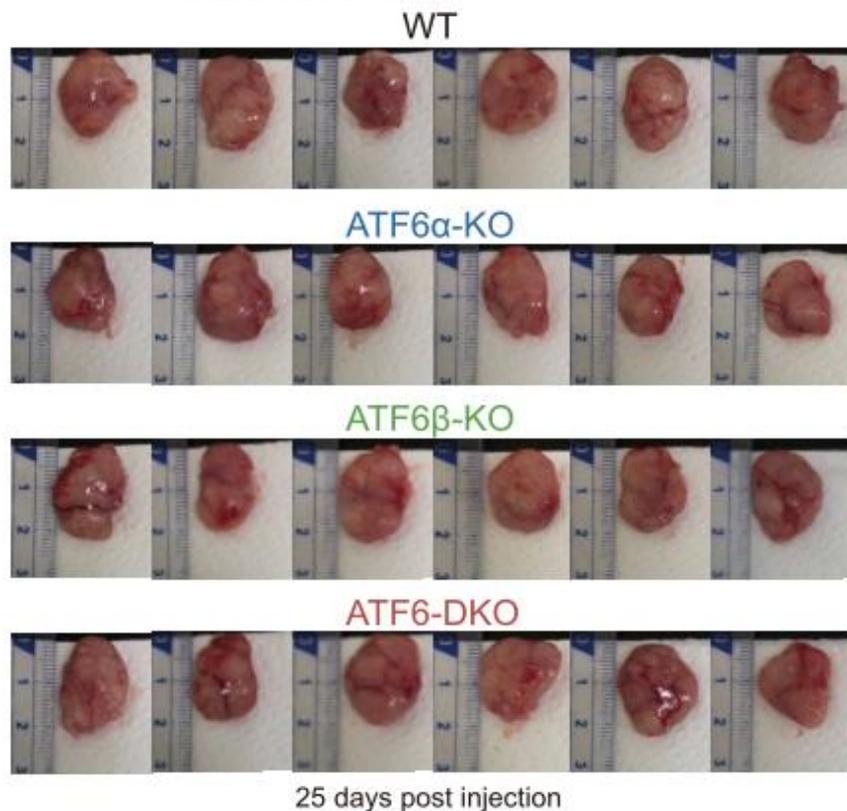
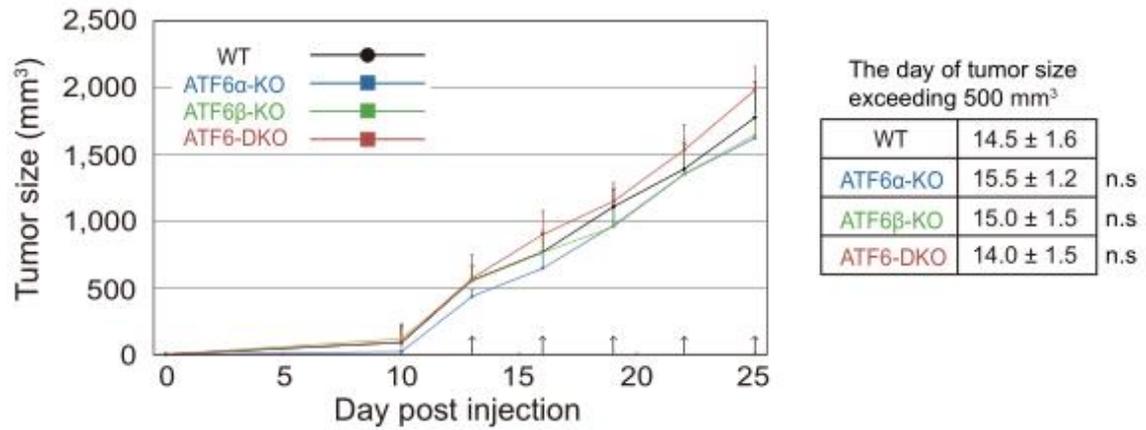
引き続き、WT、ATF6 α -KO、IRE1 α -KO*、IRE1 α -KO*/ATF6 α -KD 細胞を用いて移植実験を行った。その結果 IRE1 α -KO*では WT 細胞に比べ顕著な差は見られなかったが、IRE1 α -KO*/ATF6 α -KD 細胞の腫瘍形成は有意に抑制されていることが見られた (Fig.19-C)。IRE1 α -KO*細胞の増殖能力は WT 細胞に比べ顕著に低下しているが、腫瘍形成には差が見られなかったため、IRE1 α -KO*/ATF6 α -KD 細胞における抑制された腫瘍形成は細胞増殖能力の差による結果ではないことがわかった (Fig.19-A、C)。

先行研究により、XBP1 は腫瘍形成に必須であることが既に明らかになっている。従って、今回のノードマウス移植実験を行う際に、ポジティブコントロールとして使用した IRE1 α -KO*細胞がノードマウスで正常に腫瘍を形成できたのは予想外の結果であった。ヒト大腸癌由来細胞である HCT116 細胞においては、IRE1 α 、ATF6 α シングルノックアウトは腫瘍形成に影響がないが、二重ノックアウト細胞の腫瘍形成は抑制されることがわかった。

A



B



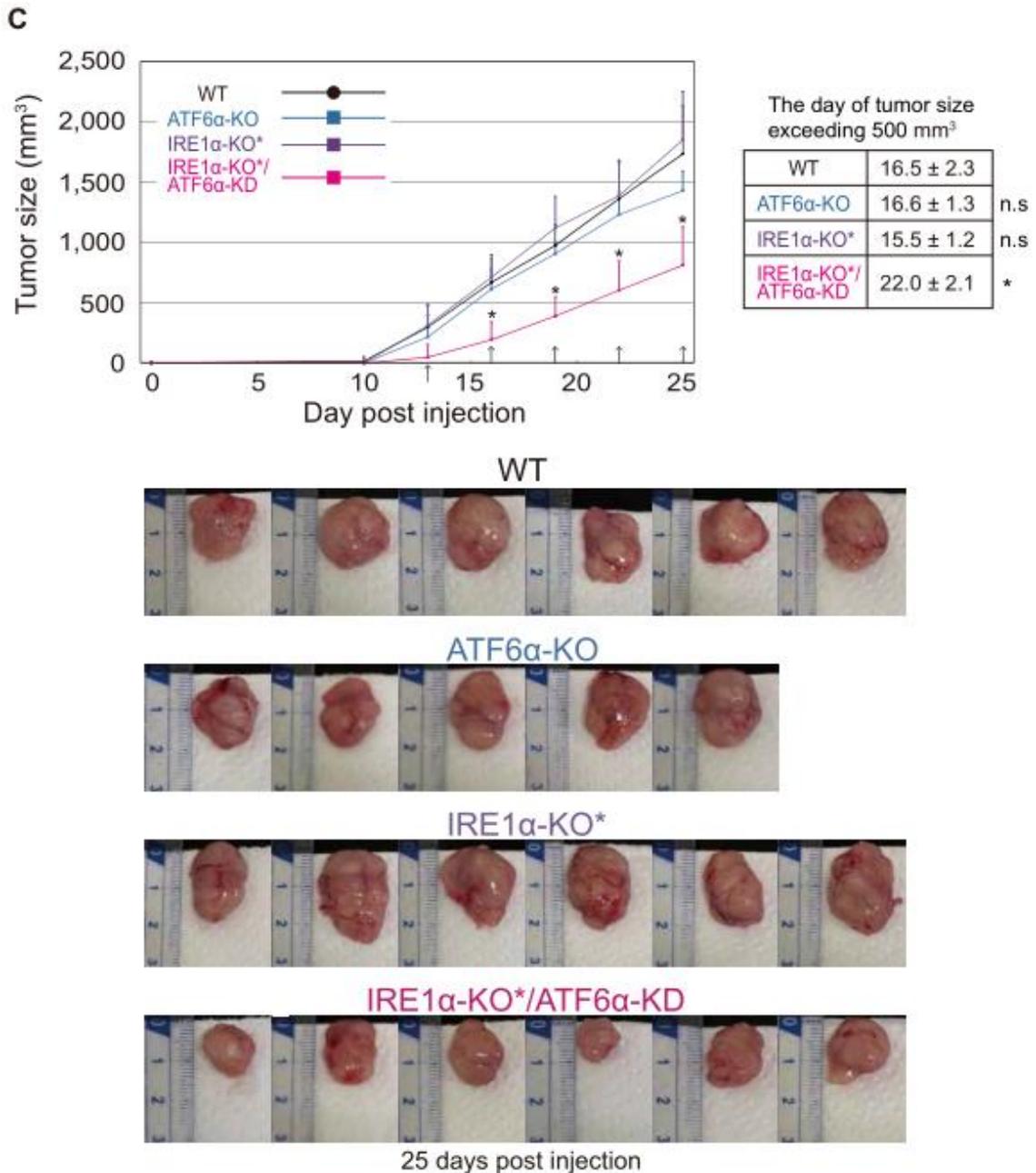


Fig.17 HCT116 細胞のヌードマウス移植実験

A. 左側は各種細胞から作ったライゼートを泳動してウエスタンブロットを行った結果を示す。検出には抗 ATF6α、抗 ATF6β、抗 IRE1α、および抗 GAPDH 抗体を使用した。右側は Cell titer-glo luminescent cell viability assay より測定された各種細胞の Doubling time を示す。

- B. 500 万個の野生型または ATF6 α -KO、ATF6 β -KO、ATF6-DKO 細胞を 50 μ l PBS に懸濁し、ヌードマウスの右側後脚の皮下組織に移植した。左側は移植後 10,13,16,19,22,25 日目で腫瘍の体積を測った結果を示す。8 匹のマウスに移植し、25 日目での腫瘍体積が一番高いものと低いものを除いた 6 匹の平均と標準偏差を計算し、Dunnett test で有意差検定を行った * $p < 0.05$ 。右側は腫瘍体積のが 500mm³ を超えた日の平均値を示し、Dunnett test で有意差検定を行った * $p < 0.05$ 。下側は移植後 25 日目で摘出した腫瘍の写真である。
- C. 野生型、ATF6 α -KO、IRE1 α -KO*、IRE1 α -KO*/ ATF6 α -KD 細胞を用いて B と同様な方法で行ったヌードマウス移植実験の結果を示す。

第五節 MEFs 細胞と HCT116 細胞の比較

MEFs 細胞を用いた先行研究により、ATF6 α ノックアウト細胞では小胞体ストレスに応じた小胞体シャペロンの転写誘導が完全に抑制されているが、ATF6 β ノックアウト細胞では変化が見られなかったことから、哺乳類細胞では ATF6 α が小胞体シャペロンの転写誘導を制御し、小胞体タンパク質の品質管理を担うと結論を付けられている[32]。第二節の解析結果によると、ヒト癌細胞である HCT116 細胞においても、BiP、GRP94 などの小胞体シャペロンの転写誘導は ATF6 β ではなく、主に ATF6 α により制御されていることが分かり、これは MEFs 細胞を用いた解析の結果と一致している。しかし、MEFs 細胞と HCT116 細胞にはいくつかの相違点がある。

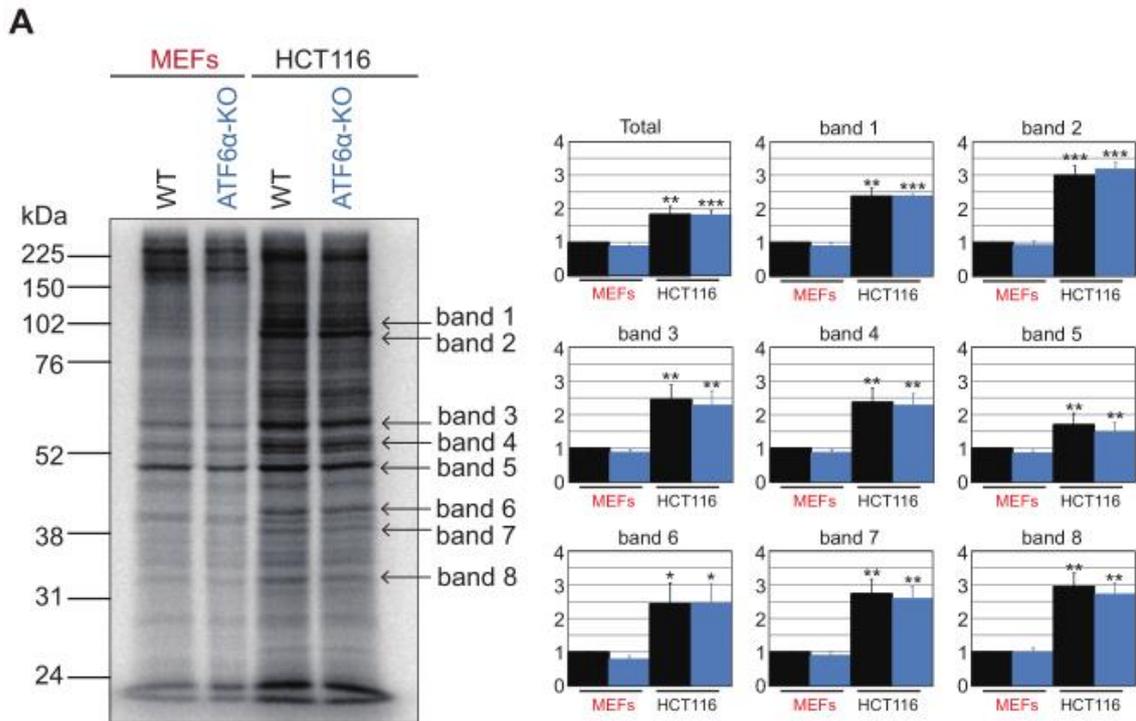
1. ATF6 α 、ATF6 β 二重遺伝子ノックアウトマウスは胚の発生早期段階で致死となるため、ATF6 α / β ダブルノックアウト MEFs 細胞は樹立できなかった。マウス細胞において、ATF6 α と ATF6 β は生存に必須な一部の機能を重複して持っていると考えられる。これに対し、ATF6 α 、ATF6 β ダブルノックアウト HCT116 細胞は正常に生存できている。
2. MEFs 細胞において、ATF6 α 欠損は IRE1 と PERK 経路の活性化に影響を及ぼさなかった。これに対し、HCT116 細胞では ATF6 α が欠損されると、IRE1 と PERK 経路が持続的に活性化されることが明らかになった。

同じ哺乳類細胞であるにもかかわらず、これらの相違点の存在は MEFs 細胞と HCT116 細胞のタンパク質合成量の差に起因し、ATF6 α が欠損された場合、異なる機構により小胞体シャペロンの転写誘導が補われると予想した。これを検証するため、両者のタンパク質合成量を比較することにした。

まず放射線同位元素 ³⁵S を用いた Pluse label 法で細胞全体のタンパク質合成を調

べた。その結果、HCT116 細胞は MEFs 細胞に比べ 2 倍ほど上回るタンパク質合成量を示した(Fig.18-A)。

引き続き、細胞分画を伴い、小胞体内に輸送される新規合成タンパク質の量を比較することにした。細胞分画手法は Fig.18-B(b)に示している。実験手法の制限により、今回は non-RI 条件である Puromycin labeling assay 法を用いた。Puromycin labeling assay はよく使用されるタンパク質合成量を調べる手法である。新規合成中のポリペプチド鎖に Puromycin が取り込まれると、ポリペプチド鎖の延長が中止されるため、Puromycin 抗体を用いた Western blot 解析により単位時間で新規合成されたタンパク質の量を比較することが可能になる。その結果、細胞全体、小胞体、細胞質いずれにおいても、HCT116 細胞は MEFs 細胞に比べタンパク質合成量が顕著に上回っていることが見られた (Fig.18-B (a))。



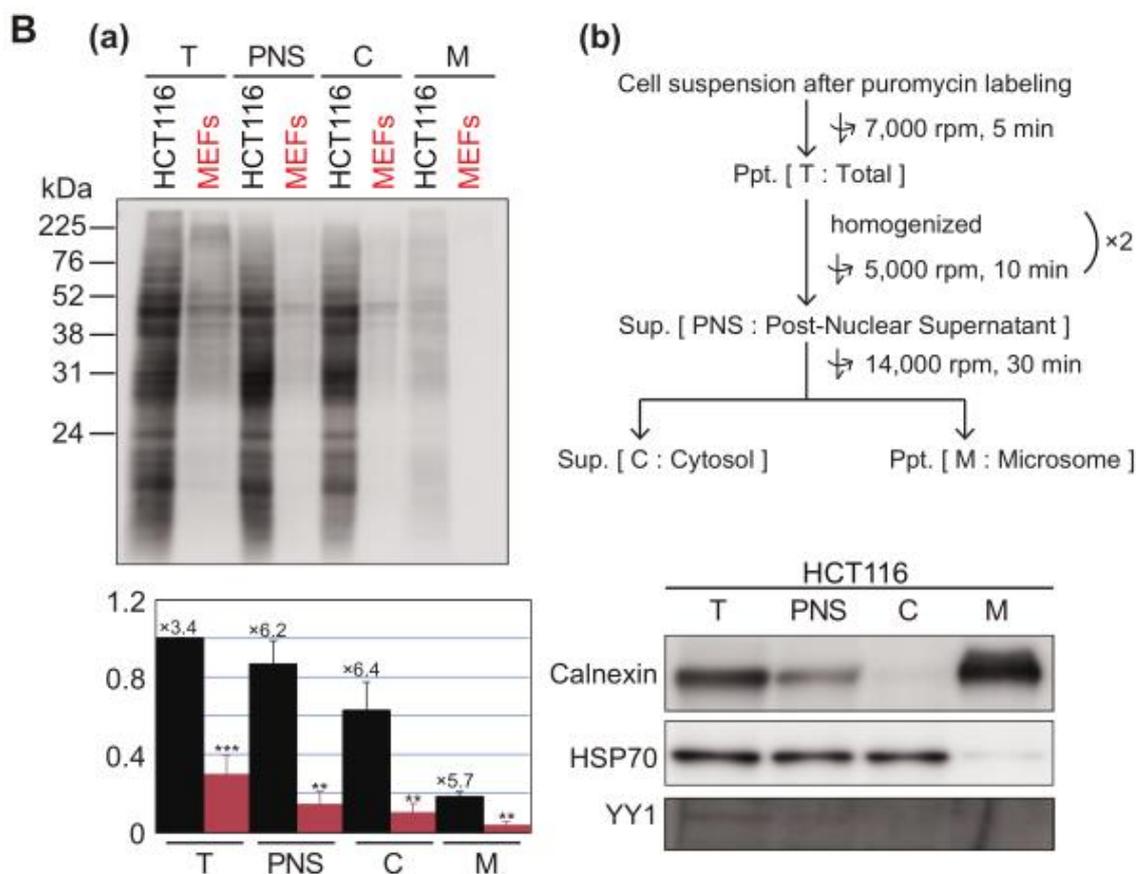


Fig.18 MEF 細胞と HCT116 細胞の比較

- A. MEF または HCT116 細胞をメチオニン、システインなしの DMEM 培地で 30 分で培養した後、³⁵S で標識してからさらに 20 分培養して作ったライゼートを用いて SDS-PAGE を行った。右側はバンド 1-10 を定量し、MEF 細胞に対する相対定量を示す結果である。合計 3 回行った実験結果の平均と標準偏差を計算し、ttest で有意差検定を行った *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005。示しているのは一回目実験の結果である。
- B. (a) MEF または HCT116 細胞を 10 mg/ml puromycin で 5 分処理し、作ったライゼートを泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 puromycin 抗体を使用した。右側は各分画のバンドを定量し、MEF 細胞に対する相対定量を示す結果である。
 (b) MEF または HCT116 細胞を用いて細胞分画を行った後（分画方法は実験手法を参照）、作った各分画のライゼートを泳動してウエスタンブロットを行った。検出には抗 Calnexin、HSP70、YY1 抗体を使用した。

考察

ATF6 遺伝子ノックアウト細胞株の樹立について

UPR の 3 つの経路の中で XBP1、PERK ノックアウト MEFs 細胞は既に樹立され、XBP1 と PERK は腫瘍形成に必須であることは既に明らかになった[46]、[52]。これに対し、ATF6 経路についてはまだ解析されていなかった。

脊椎動物ではユビキタスに発現する ATF6 α と ATF6 β が存在する。ATF6 遺伝子ノックアウトマウスとメダカが樹立され、ATF6 α 、ATF6 β シングルノックアウトマウスとメダカは明らかな表現型を示さないが、ATF6 ダブルノックアウトマウスとメダカは発生の早期段階で致死となる。そのため、ATF6 ダブルノックアウト MEFs 細胞を用いたヌードマウス移植実験は不可能であった[22]、[40]。

本研究により、TALEN 法を用いた ATF6 遺伝子ノックアウト HCT116 細胞(ヒト大腸癌由来細胞)の作製を行った結果、ATF6 α 、ATF6 β シングルノックアウト細胞と、さらに ATF6 α/β ダブルノックアウト細胞株の樹立に成功した。ヒト癌細胞を用いた ATF6 の機能解析、並びに ATF6 ノックアウト癌細胞を用いたヌードマウス移植実験が可能になった。

ATF6 ノックアウト細胞解析について

ATF6 ノックアウト細胞を用いた解析より、初期段階の小胞体ストレス環境では(Tm 処理 0-8 時間後)、BiP を含めた小胞体シャペロンの転写誘導が ATF6 α シングルノックアウト、ATF6 α/β ダブルノックアウト細胞で顕著に抑制されたことがわかった。これに対し、ATF6 β シングルノックアウト細胞では野生型と同じレベルの転写誘導が見られたことから、ヒト大腸癌由来細胞である HCT116 細胞において、ATF6 α が小胞体シャペロンの転写誘導を制御すると結論つけた。これは MEFs 細胞を用いた先行研究と一致している。

一方で、HCT116 ATF6 α シングルノックアウト、ATF6 α/β ダブルノックアウト細胞において、小胞体ストレスが持続すると(Tm 処理 12 時間以降)、初期段階で抑制された小胞体シャペロン(BiP、CRT、ORP150、ERdj3)の転写誘導が亢進されることが見られた。この現象は MEFs 細胞を用いた先行研究とは異なり、予想以外の面白い結果であった。

引き続き、IRE1 と PERK 経路の活性化を調べた結果、ATF6 α が欠損されると IRE1 α と PERK が持続的に活性化されることがわかった。IRE1 α ノックアウト細胞でさらに ATF6 α をノックダウンすると、Tm 処理 8 時間以降で見られた小胞体シャペロンの転写誘導の亢進

が抑制されることがわかった。

HCT116 細胞では MEFs 細胞と異なり、ATF6 α が欠損されると、パラログである ATF6 β の代わりに、IRE1 と PERK 経路が活性化されることで持続的な小胞体ストレスに対応し、生存に必須な小胞体シャペロンの転写誘導が補われると考えられる。

小胞体シャペロン転写誘導の補償機構について

本研究により ATF6 α シングルノックアウト、ATF6 α/β ダブルノックアウト細胞において、BiP、CRT、ORP150、ERdj3 の転写誘導は小胞体ストレス初期段階で抑制されたが、小胞体ストレスが持続すると亢進されたことがわかった。さらに HCT116 細胞では ATF6 α が欠損すると、IRE1 と PERK 経路が持続的に活性化されており、IRE1 α ノックアウト/ATF6 α ノックダウン細胞では亢進された転写誘導が抑制されたことから、小胞体ストレス後期段階で見られた転写誘導の亢進は持続的に活性化される IRE1 と PERK 経路により補われたものであると判断した。これに対し、同様に小胞体シャペロンに属する GRP94 においてはこのような転写誘導の補償が見られなかった。

先行研究により BiP のプロモーター上には 3 つ、GRP94 のプロモーター上には 4 つの ERSE 配列が存在し、これらのシス配列に結合する ATF6 α により転写誘導が制御されると報告された[25]。以上の結果から、GRP94 のプロモーター上には存在しないが、BiP、CRT、ORP150、ERdj3 のプロモーター上に存在する別のシス配列(ERSE 配列以外のもの)により後期段階で亢進される転写誘導が制御されるという仮説が考えられる。IRE1 経路の下流因子である XBP1 が結合する UPRE 配列か、あるいは PERK 経路の下流因子である ATF4 が結合する AARE 配列か、あるいは別のシス配列か、今後の興味深い研究課題として残される。プロモーター解析を行うことで、このシス配列について検討する予定である。

ヌードマウス移植実験について

HCT116 細胞を用いたヌードマウス移植実験により、ATF6 α 、ATF6 β シングルノックアウト、ATF6 α/β ダブルノックアウト細胞はヌードマウスで正常に腫瘍を形成できることがわかった。上述したように、ATF6 経路が完全に遮断されても持続的に活性化する IRE1 と PERK 経路により小胞体シャペロンの転写誘導が補われることが原因であると考えられる。一方で、IRE1 α ノックアウト/ATF6 α ノックダウン細胞を移植した場合には腫瘍形成が有意に抑制された結果から、IRE1 α ノックアウト/ATF6 α ノックダウン細胞でさらに PERK 経路をノックアウト

すると、腫瘍形成がより抑制されると予想される。

先行研究により、IRE1 下流因子である XBP1 をノックアウトすると、腫瘍形成が抑制されることが明らかになった[46]。これに基づいて本研究の移植実験では IRE1 α ノックアウト細胞をポジティブコントロールとして使用したが、IRE1 α ノックアウト細胞は野生型細胞と同様の腫瘍形成能力を示し、この結果は予想以外であった。IRE1 α をノックアウトした HCT116 細胞はヌードマウスで正常に腫瘍が形成できるが、下流因子である XBP1 をノックアウトして癌化した MEFs 細胞は腫瘍を形成できなかったということは興味深い問題である。IRE1 α がノックアウトされると、IRE1 α 依存的なスプライシングにより生じる XBP1(S)が翻訳されない。従って、腫瘍形成において XBP1(S)ではなく、XBP1(U)が必須である可能性が考えられる。これを検証するためには XBP1 ノックアウト細胞の作製とヌードマウスへの移植実験が必要になる。XBP1 ノックアウト HCT116 細胞はヌードマウスで正常に腫瘍を形成できるか、もしできなかった場合、XBP1(U)あるいは XBP1(S)の入れ戻しにより腫瘍形成能力が回復するか、今後の興味深い研究課題として残された。

ヒト癌細胞とマウス細胞小胞体ストレス応答の比較

本研究により、ヒト癌由来細胞である HCT116 とマウス由来である MEFs 細胞にはいくつかの相違点があることがわかり、異なる小胞体ストレス応答戦略が存在することが示唆された。ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞においても ATF6 α をノックダウンすると、IRE1 経路が持続的に活性化されるという報告があり、このような戦略は HCT116 特有のものではないことがわかった[59]。

同じ哺乳類細胞であるにもかかわらず、このような相違点が存在することは興味深い問題である。Pulse label と puromycin labeling assay 解析を用いてタンパク質合成量を比べた結果、HCT116 細胞は MEFs 細胞より顕著に上回っている合成能力を示した。ヒト癌細胞のように活発に増殖し、大量のタンパク質が合成されて小胞体に輸送される細胞においては、ATF6 α により制御される小胞体シャペロンの転写誘導が阻害されると、よりシビアな小胞体ストレス(ツニカマイシン処理と同程度のストレス)に晒されると考えられる。生理的なレベルを超えた小胞体ストレスに対応するため、癌細胞は ATF6 α のパラログである ATF6 β のでは対応できず、IRE1 と PERK 経路を持続的に活性化させることで小胞体シャペロンの転写誘導を補わなければならないと考えられる。

実験手法

TALEN ベクターとターゲティングベクターの設計

TALEN ベクターは広島大学大学院理学研究科の山本卓 博士に作製して頂いた。ATF6 α ターゲティングベクターの 5'-arm は Kpn1 と Xho1、3'-arm は Not1 と HindIII の制限酵素サイトを利用した。HCT116 細胞の DNA をテンプレートとして PCR で増幅した ATF6 α ターゲティングインサートは DT-A-pA-LoxP-PGK-Puro-pA-loxP ベクターにライゲーションした。ATF6 β の 5'-arm は Kpn1 と Xho1、3'-arm は Not1 と Sal1 の制限酵素サイトを利用した。HCT116 細胞の DNA をテンプレートとして PCR で増やした ATF6 β ターゲティングインサートは DT-A-pA-LoxP-PGK-Neo-pA-loxP ベクターにライゲーションした。PCR に用いたプライマー配列は下に示す。

ATF6 α

5'-arm

Fw: GGGGTACCAGGGTAGACTCGCTTGGACTTTG

Rv: CCGCTCGAGTGACGAGACGGTGGCCTAGT

3'-arm

Fw: ATAAGAATGCGGCCGCTCGTGGTGACAGGTGTGGAC

Rv: CCCAAGCTTACCTGGTCTGATCCTTCTTCTGC

ATF6 β

5'-arm

Fw: GGGGTACCCCCTTGGGAACCTGGAAAAA

Rv: CCGCTCGAGGCTCTACCGACCAGTAAGAGACCTG

3'-arm

Fw: ATAAGAATGCGGCCGCCACCGACAACCTGCTTAGCC

Rv: ACGCGTCGACCCACACCTCACACACCTCA

ジェノタイピング PCR に用いられたプライマー配列は下記の通りのである。

IRE1 α targeted primer set1 Fw	CTTCTCTTTTAAGTCAAGTATACAGGGTCTA
IRE1 α targeted primer set1 Rv	CCTCGATCGAGATCCGGAAC
IRE1 α targeted primer set2 Rv	ATAATAATTCTTACTATGTTTGGGGGTAAAAA
IRE1 α targeted primer set3 Fw	CTTCTCTTTTAAGTCAAGTATACAGGGTCTA
IRE1 α targeted primer set3 Rv	ATAATAATTCTTACTATGTTTGGGGGTAAAAA
ATF6 α targeted primer set1 Fw	GGGGTACCCGCCCGGCCTTATTTTAGTTT
ATF6 α targeted primer set1 Rv	AGCAACAGATGGAAGGCCTC
ATF6 α targeted primer set2 Fw	CCCGGTAGAATTAGCTTGGC
ATF6 α targeted primer set2 Rv	GAGCCAAGATTGCGCCATTA
ATF6 α targeted primer set3 Fw	GGTGTCTAGTGGGATACAGAAGACTCG
ATF6 α targeted primer set3 Rv	GCTACCAGGAAGTGTCCCACAGTTAT
ATF6 β targeted primer set1 Fw	CCGCTCGAGTGGCTTTGGGGTTTCCTTTC
ATF6 β targeted primer set1 Rv	CCTCGATCGAGATCCGGAAC
ATF6 β targeted primer set2 Fw	CCCGGTAGAATTAGCTTGGC
ATF6 β targeted primer set2 Rv	GCTAGATAACCAAAGGGGATGTGG
ATF6 β targeted primer set3 Fw	CCGCTCGAGTGGCTTTGGGGTTTCCTTTC
ATF6 β targeted primer set3 Rv	GCTAGATAACCAAAGGGGATGTGG

細胞培養とトランスフェクション

HCT116 細胞(ヒト大腸癌由来培養細胞)は 37 °C、5% CO₂ 条件のインキュベーターで培養した。培地は 10% ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM 培地を用いた。5 \times 10⁵ 個の細胞を 3.5cm dish に撒き、インキュベーターで一晩培養した。翌日、500 μ l Opti-MEM、8.75 μ l Lipofectamin LTX、300 ng TALEN-L ベクター、300 ng TALEN-R ベクター、5 ng targeting vector を混ぜ、常温で 30 分インキュベーションした後、一晩培養した 3.5cm dish に全量を加える。インキュベーターで 6 時間培養した後、新しい培地に交換した。さらにインキュベーターで 24 時間培養した後、3 枚の 10cm dish に撒き直した。インキュベーターで 72 時間培養した後、0.5 μ g/ml Puromycin あるいは 0.6 mg/ml G418(Neomycin)が含まれた選択培地でコロニーセレクションを行った。

Western blot 解析

6cm dish で培養した細胞を PBS で洗浄し、ラバーポリスマンでかきとり、10% DTT、10% プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)、10 μ M MG132 が含まれた 1×SDS サンプルバッファーを加えた。100 °C で 5 分間溶解させた後、サンプルを SDS ポリアクリルアミドのゲルにアプライして電気泳動を行った。泳動は 1000 V、20 mA で 80 分間行った。ゲルはセミドライ方法で PVDF 膜にブロットインした。トランスファーは 50 V、108 mA で 60 分間行った。トランスファー後 5% スキムミルクを含む 0.1% tween20 PBS バッファーで 60 分間ブロッキングを行った。その後、膜を希釈した抗体が含まれたスキムミルクあるいは、Can Get signal reagent A 溶液中に入れ、4 °C で一晩反応させた。抗体の情報は下記の通りのである。

anti-KDEL (Mouse monoclonal)	MBL	Cat#: M181-3	WB (1:5000)
anti-GAPDH (Rabbit polyclonal)	Trevigen	Cat#:2275-PC-100	WB (1:1000)
anti-IRE1 α (Rabbit monoclonal)	Cell Signaling Technology	Cat#: 3294	WB (1:1000)
anti-XBP1 (Rabbit polyclonal)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#: sc-7160	WB (1:1000)
anti-ATF4 (Rabbit polyclonal)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#: sc-200	WB (1:1000)
anti-CHOP (Rabbit polyclonal)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#: sc-793	WB (1:1000)
anti-Caspase-3 (Rabbit polyclonal)	Cell Signaling Technology	Cat#: 9662	WB (1:1000)
anti-Cleaved Caspase-3 (Rabbit polyclonal)	Cell Signaling Technology	Cat#:9661	WB (1:1000)
anti-Puromycin (Mouse monoclonal)	MERCK	Cat#: 12D10 - 3695829	WB (1:1000)

anti-calnexin (Rabbit polyclonal)	Enzo Life Science	Cat#: ADI- SPA-865-F	WB (1:1000)
anti-HSP70 (Mouse monoclonal)	Enzo Life Science	Cat#: C92F3A-5	WB (1:1000)
anti-YY1 (Rabbit polyclonal)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#: H414	WB (1:500)

翌日、膜を 0.1% tween20 PBS バッファーで 5 分間三回洗浄し、希釈した二次抗体が含まれたスキムミルクあるいは、Can Get signal reagent B 溶液中で室温で 1 時間反応させた。膜を 0.1% tween20 PBS バッファーで 5 分間三回洗浄し、WESTERN BLOTTING LUMINOL REAGENT Solution A/B(1:1 で混合)を膜にかけ、発光シグナルを LAS-3000minolmage analyzer(Fuji film)を用いて検出した。

qRT-PCR

6 cm dish 培養した細胞($\sim 5 \times 10^6$)から ISOGEN(ニッポンジーン)を用いて RNA を回収した。回収した RNA 0.5 μ g に H₂O を加えて 6 μ l のボリュームに合わせ、65 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートすることで変性させた。氷上で急冷した後、2 μ l 4 \times DN Master Mix(1/50 の gDNA Remover を添加)を加え、37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートすることで gDNA を除去した。引き続き、氷上にて、5 \times RT Master Mix II を加えて逆転写反応を行った。反応は、37 $^{\circ}$ C で 15 分、50 $^{\circ}$ C で 5 分、98 $^{\circ}$ C で 5 分間行った。反応終了後、得られた cDNA を 20 倍希釈して qRT-PCR のテンプレートに使用した。3 μ l テンプレート、2 μ l プライマー(Fw と Rv それぞれ 0.75 μ M)、5 μ l SYBR-Green PCR Master Mix(Applied Biosystem)を混合して qRT-PCR 反応を行った。コントロールである GAPDH の Ct 値に対して相対定量を行い、各遺伝子の発現量を計算した。用いられたプライマー配列は下に示す。

GRP94 Fw	CCGCGAGACTCTTCAGCAA
GRP94 Rv	TGTCCAGCGTTTTACGAACAAG
BiP Fw	TCTCAGATCTTTTCTACAGCTTCTGA
BiP Rv	TGTCTTTTGTTCAGGGGTCTTTCA
ORP150 Fw	TCCGCCGGAAAGATATTAACA
ORP150 Rv	GCCTGAGCCCATGTCATAGAA

CRT Fw	TTCCCGCTGGATCGAATC
CRT Rv	CGGAACTGAGAACGAATTTGC
ERdj3 Fw	ACCATGGCTCCGCAGAAC
ERdj3 Rv	CGCCCCGATGAGGTATAGC
ERdj4 Fw	TAAGAGCCCGGATGCTGAAG
ERdj4 Rv	TCGTCTATTAGCATCTGAGAGTGT
GAPDH Fw	GACCCCTTCATTGACCTCAA
GAPDH Rv	TTGACGGTGCCATGGAATT

ヌードマウス移植実験

20cm dish で培養した細胞を PBS で洗浄してトリプシン処理で dish から細胞を外し、 5×10^6 数の細胞を 50 ml PBS に懸濁した。細胞懸濁液はマウスの右側後脚の皮下組織に移植した。ヌードマウスは BALB/c nu/nu; Japan SLC. Inc., Hamamatsu, Japan を用いた。移植後形成された腫瘍の長径(R)と短径(r)を電子ノギスで測り、腫瘍の体積(V)は $V=R \times r \times r/2$ 公式で計算した。

細胞 Doubling Time

2000 個の細胞を 96 well plate に撒いて培養し、18 時間後の濃度(C1)と 90 時間後の濃度(C2)を Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay agent を用いて測定した。DoublingTime= $72 \times \log(2)/\log(C2) - \log(C1)$ 公式で Doubling Time を計算した。実験を三回繰り返し、平均値を示している。

Pulse Chase

6 wells dish で培養した細胞をメチオニン、システインなしの DMEM 培地で 30 分で培養した後、2.5 Mbq/well EXPRE ^{35}S で標識した。37°C、5% CO_2 条件のインキュベーターで 20 分培養した後、PBS バッファーで二回洗浄し、400 μl NP-40 バッファー [1% NP-40、50 mM Tris/Cl, pH 8.0、150 mM NaCl, protease inhibitor cocktail(Nacalai), 20 μM MG132、2 μM Z-VAD-fmk]を加え、4°C で 10 分放置させた。14,000 rpm、10 分遠心した後、上清を同量の 2xSDS サンプルバッファー (10% プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)、10 μM MG132 を含む)と混ぜ、100°Cで 5 分沸騰させた。5 μl サンプルを SDS ポリアクリルアミドのゲルにアプライして電気泳動を行い、LAS-3000miniolmage analyzer(Fuji film)を用いて RI シグナルを検

出した。

Puromycin Labeling assay と細胞分画

細胞を 6 cm dish で 18 時間培養した後、10 mg/ml puromycin が入った DMEM 培地に交換した。37°C、5% CO₂ 条件のインキュベーターで 5 分培養した後、PBS で洗浄し、ラバーポリスマンでかきとり、1.2 ml の 10% プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)、10 μM MG132 を含む PBS で懸濁した。300 ml の細胞懸濁液は 4°C で 7,000 rpm、5 分遠心し、得られたペレットを T(total)とした。残り 900 ml の細胞懸濁液は 4°C で 7,000 rpm、5 分遠心し、得られたペレットに 150 ml homogenization medium(0.25 M sucrose 10 mM Tris/Cl, pH 7.4,) を加え、25 nm 針が付いた注射器を用いて 30 回ピペッティングを行った。4°C で 7,000 rpm、5 分遠心し、得られたペレットにさらに 150 ml homogenization medium を加え、ピペッティングを繰り返した。2 回の遠心で集めた上清を PNS(post-nuclear supernatant)とした。半分の PNS は 4°C、14,000 rpm で、5 分遠心し、得られた上清は C(cytosol) と、ペレットは M(microsome)とした。PNS と C は同量の 2xSDS サンプルバッファー(10% プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)、10 μM MG132)と混ぜた。T と M は 100 ml RIPA バッファー(10% プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)、10 μM MG132)を加え、4°C で 10 分放置した後、4°C、14,000 rpm で、10 分遠心した。得られた上清は同量の 2xSDS サンプルバッファー(10% プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)、10 μM MG132)と混ぜた。100°C で 5 分沸騰させた後、puromycin 抗体を用いて western blot を行った。

結論

本研究により、以下の結論をつけた。

1. ヒト癌由来である HCT116 細胞において、ATF6aが欠損されると小胞体ストレス初期段階における小胞体シャペロンの転写誘導は抑制されるが、小胞体ストレスが持続すると亢進される。
2. ATF6aが欠損されると、IRE1 と PERK 経路が持続的に活性化する。
3. IRE1aノックアウト/ ATF6aノックダウン細胞では小胞体ストレス後期段階で見られる小胞体シャペロンの転写誘導の亢進が抑制される。
4. ATF6a、IRE1aシングルノックアウト、ATF6a/ β ダブルノックアウト細胞は移植されたヌードマウスで正常に腫瘍を形成できるが、IRE1aノックアウト/ ATF6aノックダウン細胞の腫瘍形成は有意に抑制される。

論文目録

本研究内容は以下の論文で公表した。

Shengyu Jin, Byungseok Jin, Tokiro Ishikawa, Satoshi Ninagawa ,

Tetsuya Okada, Sho Koyasu, Hiroshi Harada, and Kazutoshi Mori

Loss of ATF6 α in a human carcinoma cell line is compensated not by its
paralogue ATF6 β but by sustained activation of the IRE1 and PERK arms
for tumor growth in nude mice

Molecular Biology of the Cell. 25 Jan 2023. PMID: 36696173

DOI: 10.1091/mbc.E22-07-0292

引用文献

1. **C. B. Anfinsen (1973)**. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 181: 223-30.
2. **M. J. Gething, and J. Sambrook (1992)**. Protein folding in the cell. *Nature*. 355: 33-45.
3. **J. B. Huppa, and H. L. Ploegh (1998)**. The eS-Sence of –SH in the ER. *Cell*. 92: 145-8.
4. **A. Helenius, T. Marquardt, and I. Braakman (1992)**. The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trend in cell biology*. 2: 227-31.
5. **M. H. Smith, H. L. Ploegh, and J. S. Weissman (2011)**. Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum. *Science*. 334: 1086-90.
6. **L. Ellgaard, and A. Helenius (2003)**. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4: 181-91.
7. **K. Mori (2000)**. Tripartite management of unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 101: 451-4.
8. **D. Ron, and P. Walter (2007)**. Signalintegration in the endoplasmic reticulum unfoled Protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8: 519-29.

9. **P. Walter, and D. Ron (2011).** The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 334: 1081-6.

10. **H. P. Harding, Y. Zhang, and D. Ron (1999).** Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 397: 271-4.

11. **H. P. Harding, Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron (2000).** Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cell*. 5: 897-904.

12. **H. P. Harding, I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, and D. Ron (2000).** Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*. 6: 1099-108.

13. **H.P Harding, Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden, and D. Ron (2003).** An Integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*. 11: 619-33.

14. **I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Jungreis, H. P. Harding, and D. Ron (2003).** Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *The EMBO journal*. 22: 1180-7.

15. **K. Mori, W. Ma, M. J. Gething, and J. Sambrook (1993).** A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*. 74: 743-56.
16. **J. S. Cox, C. E. Shamu, and P. Walter (1993).** Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident protein requires a transmembrane protein kinase. *Cell*. 73: 1197-206.
17. **C. E. Shamu, and P. Walter (1996).** Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic to nucleus. *The EMBO journal*. 15: 3028-39.
18. **A. A. Welihinda, and R. J. Kaufman (1996).** The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *The Journal of biological chemistry*. 271: 18181-7.
19. **H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, and K. Mori (2001).** XBP1 mRNA is Induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 107: 881-91.
20. **M. Calton, H. Zeng, F. Urano, J. H. Till, S. R. Hubbard, H. P. Harding, S. G. Clark, and D. Ron (2002).** IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 415: 92-6.

21. **A. Uemura, M. Oku, K. Mori, and H. Yoshida (2009).** Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *Journal of cell science.* 122: 2877-86.
22. **K. Yamamoto, T. Sato, T. Matsui, M. Sato, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, and K. Mori (2007).** Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Developmental cell.* 13: 365-76.
23. **H. Yoshida, M. Oku, M. Suzuki, and K. Mori (2006).** pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of cell biology.* 172: 565-75.
24. **H. Yoshida, A. Uemura, and K. Mori (2009).** pXBP1(U), a Negative Regulator of the Unfolded Protein Response Activator pXBP1(S), Targets ATF6 but not ATF4 in Proteasome-mediated Degradation. *Cell structure and Function.* 34: 1-10.
25. **K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori (1999).** Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology of the Cell.* 10: 3787-99.

26. **K. Haze K, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, and K. Mori (2001).** Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochemical Journal*. 355: 19-28.
27. **J. Ye, R. B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U. P. Dave, R. Prywes, M. S. Brown, and J. L. Goldstein (2000).** ER stress Induces Cleavage of Membrane- Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Molecular Cell*. 6: 1355-64.
28. **H. Yoshida, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori (1998).** Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins: INVOLVEMENT OF BASIC LEUCINE ZIPPER TRANSCRIPTION FACTORS. *The Journal of biological chemistry*. 273: 33741-9.
29. **H. Yoshida, T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, and K. Mori (2000).** 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. *Molecular and cellular biology*. 20: 6755-67.
30. **H. Yoshida, T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, and K. Mori (2001).** Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Formation of Transcription Factor Complex ERSF Including NF-Y (CBF) and Activating Transcription Factors 6 α and 6 β That Activates the Mammalian Unfolded Protein Response. *Molecular and cellular biology*. 21: 1239-48.

31. **T. Okada, H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi, and K. Mori (2002)**. 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. *The Biochemical journal*. 366: 585-94.
32. **Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A and Mori K (2008)**. ATF6 Is a Transcription Factor Specializing in the Regulation of Quality Control Proteins in the Endoplasmic Reticulum. *Cell Structure and Function*. 33: 75-89.
33. **K. Mori, T. Kawahara, H. Yoshida, H. Yanagi, and T. Yura (1996)**. Signaling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 1: 803-17.
34. **J. S. Cox, and P. Walter (1996)**. A Novel Mechanism for Regulating Activity of a Transcription Factor That Controls the Unfolded Protein Response. *Cell*. 87: 391-404.
35. **J. Hollien, and J. S. Wissman (2006)**. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science*. 313: 104-7.

36. **X. Shen , R. E. Ellis, K. Sakaki, and R. J. Kaufman (2005)**. Genetic Interactions Due to Constitutive and Inducible Gene Regulation Mediated by the Unfolded Protein Response in *C. elegans*. *PLoS genetics*. 1: e37.
37. **J. Wu, D. T. Rutkowski, M. Dubois, J. Swathirajan, T. Saunders, J. Wang, B. Song, G. D. Yau, and R. J. Kaufman (2007)**. ATF6 α Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress. *Developmental Cell*. 13: 351-64
38. **H. Yoshida, T. Matsui, N. Hosokawa, R.J. Kaufman, K. Nagata, and K. Mori (2003)**. A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response. *Developmental Cell*. 4: 265-71.
39. **A. H. Lee, N. N. Iwakoshi, and L. H. Glimcher (2003)**. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Molecular and cellular biology*. 23: 7448-59.
40. **T. Ishikawa, T. Okada, T. Ishikawa-Fujiwara, T. Todo, Y. Kamei, S. Shigenobu, M. Tanaka, T. L. Saito, J. Yoshimura, S. Morishita, A. Toyoda, Y. Sakaki, Y. Taniguchi, S. Takeda, and K. Mori (2013)**. ATF6 α/β -mediated adjustment of ER chaperone levels is essential for development of the notochord in medaka fish. *Molecular Biology of the Cell*. 24: 1387-95.
41. **K. Mori (2009)**. Signaling Pathways in the Unfolded Protein Response: Development from Yeast to Mammals. *The Journal of Biochemistry*. 146: 743-50.

42. **S. E. Rademakers, P. N. Span, J. H. A. M. Kaanders, F. C. G. J. Sweep, A. J. V. D. Kogel, and J. Bussink (2008)**. Molecular aspects of tumour hypoxia. *Molecular Oncoogy*. 2: 41-53.
43. **M. Akman, D. C. Belisario, I. C. Salaroglio, J. Kopecka, M. Donadelli, E. D. Smaele, and C. Riganti (2021)**. Hypoxia, endoplasmic reticulum stress and chemoresistance: dangerous liaisons. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 40: 28.
44. **S. Satija, H. Kaur, M. M. Tambuwala, P. Sharma, M. Vyas, N. Khurana, N. Sharma, H. A. Bakshi, N. B. Charbe, F. C. Zacconi, A. A. Aljabali, S. Nammi, H. Dureja, T. G. Singh, G. Gupta, D. S. Dhanjal, K. Dua, D. K. Chellappan, and M. Mehta (2021)**. Hypoxia-Inducible Factor (HIF): Fuel for Cancer Progeression. *Current Molecular Pharmacology*. 14: 321-32.
45. **F. Martinon (2012)**. Targeting endoplasmic reticulum signaling pathways in cancer. *Acta Oncologica*. 51: 822-30.
46. **L. Romero-Ramirez, H. Cao, D. Nelson, E. Hammond, A. H. Lee, H. Yoshida, K. Mori, L. H. Climcher, N. C. Denko, A. J. Giaccia, Q. T. Le, and A. C. Koong (2004)**. XBP1 Is Essential for Survival under Hypoxic Conditions and Is Required for Tumor Growth. *Cancer Research*. 64: 5943-7.

47. **M. Bi, C. Naczki, M. Koritzinsky, D. Fels, J. Blais, N. Hu, H. Harding, I. Novoa, M. Varia, J. Raleigh, D. Scheuner, R. J. Kaufman, J. Bell, D. Ron, B. G. Wouters, and C. Koumenis (2005).** ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *The EMBO journal*. 24: 3470-81.
48. **J. M. Harnoss, A. Le. Thomas, M. Reichelt, O. Guttman, T. D. Wu, S. A. Marsters, A. Shemorry, D. A. Lawrence, D. Kan, E. Segal, M. Merchant, K. Totpal, L. M. Crocker, K. Mesh, M. Dohse, M. Solon, Z. Modrusan, J. Rudolph, H. Koeppen, P. Walter, and A. Ashkenazi (2020).** IRE1 α Disruption in Triple-Negative Breast Cancer Cooperates with Antiangiogenic Therapy by Reversing ER Stress Adaptation and Remodeling the Tumor Microenvironment. *Cancer Research*. 80: 2368-79.
49. **J. M. Harnoss, A. Le Thomas, A. Shemorry, S. A. Marsters, D. A. Lawrence, M. Lu, Y. A. Chen, J. Qing, K. Totpal, D. Kan, E. Segal, M. Merchant, M. Reichelt, H. A. Wallweber, W. Wang, K. Clark, S. Kaufman, M. H. Beresini, S. T. Laing, W. Sandoval, M. Lorenzo, J. Wu, J. Ly, T. De Bruyn, A. Heidersbach, B. Haley, A. Gogineni, R. M. Weimer, D. Lee, M. G. Braun, J. Rudolph, M. J. VanWyngarden, D. W. Sherbenou, P. Gomez-Bougie, M. Amiot, D. Acosta-Alvear, P. Walter, and A. Ashkenazi (2019).** Disruption of IRE1 α through its kinase domain attenuates multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 116: 16420-29.

50. **N. Mimura, M. Fulciniti, G. Gorgun, Y. T. Tai, D. Cirstea, L. Santo, Y. Hu, C. Fabre, J. Minami, H. Ohguchi, T. Kiziltepe, H. Ikeda, Y. Kawano, M. French, M. Blumenthal, V. Tam, N.L. Kertesz, U.M. Malyankar, M. Hokenson, T. Pham, Q. Zeng, J. B. Patterson, P. G. Richardson, N. C. Munshi, and K. C. Anderson (2012).** Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*. 119: 5772-81.
51. **I. Papandreou, N. C. Denko, M. Olson, H. Van Melckebeke, S. Lust, A. Tam, D. E. Solow-Cordero, D. M. Bouley, F. Offner, M. Niwa, and A. C. Koong (2011).** Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood*. 117: 1311-14.
52. **Sheng, X., H. Z. Nenseth, S. Qu, O. F. Kuzu, T. Frahnw, L. Simon, S. Greene, Q. Zeng, L. Fazli, P. S. Rennie, I. G. Mills, H. Danielsen, F. Theis, J. B. Patterson, Y. Jin, and F. Saatcioglu (2019).** IRE1 α -XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling. *Nature Communications*. 10: 323.
53. **X. Sheng, Y. J. Arnoldussen, M. Storm, M. Tesikova, H. Z. Nenseth, S. Zhao, L. Fazli, P. Rennie, B. Risberg, H. Wæhre, H. Danielsen, I. G. Mills, Y. Jin, G. Hotamisligil, and F. Saatcioglu (2015).** Divergent androgen regulation of unfolded protein response pathways drives prostate cancer. *EMBO Molecular Medicine*. 7: 788-801.
54. **H. Urra, E. Dufey, T. Avril, E. Chevet, and C. Hetz (2016).** Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends in Cancer*. 2: 252-62.

55. **D. M. Schewe, and J. A. Aguirre-Ghiso (2008)**. ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 10519-24.
56. **M. G. Brattain, W. D. Fine, F. M. Khaled, J. Thompson, and D. E. Brattain (1981)**. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Research*. 41: 1751-1756.
57. **Boch. J (2011)**. TALEs of genome targeting. *Nature Biotechnology*. 29 (2): 135-6.
58. **Y. Ma, J. W. Brewer, J. A. Diehl, and Linda. M. Hendershot (2002)**. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *Journal of Molecular Biology*. 318: 1351-65.
59. **F. Walter, A. O'Brien, C. G. Concannon, H. Düssmann, J. H. M Prehn (2018)**. ER stress signaling has an activating transcription factor 6 α (ATF6)-dependent "off-switch". *Journal of Biological Chemistry*. 293: 18270-18284.

謝辞

本研究の終わりにあたり、本研究を通じて終始優しい御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院理学研究科 生物物理学教室 ゲノム情報発現学分科教授 森和俊博士に心より感謝いたします。森教授には素晴らしい研究環境と有益な助言を与えて頂きました。

本研究を遂行に際し、毎日終始丁寧なご指導と的確なご助言を賜りました同分科助教 岡田徹也 博士に深い謝意を表します。先生のご指導を通して実験手法だけでなく、研究者として多くの有益な情報と、常に温かい助言を頂き、深く感謝いたします。

また、同分野助教でいらっしゃいました、住友化学株式会社 生物環境科学研究所 研究員 石川時朗 博士から研究に関して丁寧な御指導と賜りました。深く感謝いたします。

大学院の生活を通して、同分科研究室の先輩方ならびに後輩諸氏に終始有益な議論を頂きました。特に、同じ留学生である陳炳碩先輩に留學生活において色々お世話になり、深く感謝いたします。ありがとうございました。

宮川かおるさんには試薬調製や事務の仕事をして頂きました。今西佳美さんには留學生活について色々な手伝いをして頂きました。心より感謝します。

また、経済的な御支援をくださったとうきゅ留學生奨財団の方に心よりお礼申し上げます。ありがとうございました。

広島大学大学院理学研究科 教授 山本卓 博士には ATF6 遺伝子ノックアウト細胞作出に際し、TALEN ベクターを作製して頂きました。深く感謝申し上げます。

京都大学 放射線生物研究センター ゲノム動態研究部門 癌細胞生物学分野 原田浩 博士にはマウス移植実験に関する多数の御指導を賜りました。心よりお礼申し上げます。

また、同分科 子安翔 博士には多数の御指導を頂き、大変お世話になりました。深く感謝申し上げます。

最後に、常に私の留學を物心両面で支えてくれた家族、父 陽煥、母 恵英、外祖母 美子に心よりお礼申し上げます。また、いつもそばで私を支えてくれた趙瑩瑩さんに深く感謝いたします。ありがとうございました。