

Comparative Analysis of  
the Unfolded Protein Response  
Caused by Small Molecule Compounds

June 2013

Satoko Shinjo

# 主 論 文 要 旨

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	新莊聡子
主 論 文 題 目： Comparative Analysis of the Unfolded Protein Response Caused by Small Molecule Compounds (小分子化合物が誘導する UPR の比較解析)				
(内容の要旨) 小胞体は膜タンパク質及び分泌タンパク質の折りたたみが行われる細胞内小器官であると同時に、異常に折りたたまれてしまったタンパク質の蓄積（小胞体ストレス）を緩和させるための恒常性維持機構（unfolded protein response (UPR)）を備えている。この応答は、小胞体膜上に局在する3つの小胞体ストレスセンサータンパク質(ATF6, IRE1 $\alpha$ , PERK)の活性化が引き金となり、下流の UPR 関連遺伝子が発現誘導されることで実行される。これまでに、作用点の異なる小分子化合物が UPR を誘導することは報告されているが、これら化合物が誘導する UPR を比較解析した例はなかった。本論文では、UPR 制御機構の解明に向けて、これら化合物が誘導する UPR 関連遺伝子の発現挙動の比較解析を行った。 (1) 小分子化合物が誘導する UPR 関連遺伝子発現挙動の解析 異なる作用点を持つ UPR 誘導剤 7 種(2-deoxyglucose, brefeldin A, DTT, eeyarestatin I, monensin, thapsigargin, tunicamycin)が誘導する 9 種の UPR 関連遺伝子(ATF4, CHOP, EDEM, ERdj4, GADD34, GRP78, GRP94, PDI, p58 <sup>IPK</sup> )の発現を経時的に測定した。得られたデータを階層的クラスタリングによって解析したところ、9 遺伝子全体の発現プロファイルの違いは化合物の作用点の違いに起因することが示唆された。さらなる解析の結果、7 化合物による UPR 関連遺伝子の発現パターンは大きく 3 つのクラスター(クラスター A', B', C')に分類された。このうち、クラスター C'では ATF6, IRE1 $\alpha$ により発現制御される遺伝子の発現が低かったことから、クラスター A', B'の化合物は 3 つのストレスセンサーを活性化させる一方で、クラスター C'の化合物は PERK のみを活性化させることが示唆された。実際にストレスセンサータンパク質の活性化検出を行った結果、クラスター A'の化合物は 3 つのセンサーを、クラスター B'の化合物は ATF6 と PERK を活性化させるのに対し、クラスター C'の化合物は PERK のみを活性化させることが示唆された。また、各クラスターに分類された化合物の作用点に着目すると、クラスター A'の化合物は折りたたみ不全もしくは糖鎖修飾がされていない、すなわち未成熟なタンパク質の蓄積を誘導する一方、クラスター C'の化合物は成熟したタンパク質の蓄積を誘導するということが示唆された。これらの結果から、化合物の作用点によって小胞体内に蓄積するタンパク質の折り畳み状態に違いが生じ、それがセンサータンパク質の活性化、およびその下流の UPR 関連遺伝子の発現パターンに影響を与えたことが示唆された。 (2) BiFC 法による IRE1 二量体化検出法の構築 小胞体センサータンパク質の活性化の検出は UPR を解析する上で必須であるにもかかわらず、それを直接、簡便かつ定量的に評価できる手法が乏しかった。そこで、3 つのセンサータンパク質を 1 細胞内で同時かつ定量的に測定するため、3 つのセンサータンパク質の活性を 3 色の蛍光でイメージングする系の構築を目的とした。そのために本論文では、IRE1 $\alpha$ 活性化検出を目的とし、IRE1 $\alpha$ の活性化に必要な十分なステップである二量体化を、分断された蛍光蛋白質の再構成によりタンパク質間相互作用を検出する手法である Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)法を用いて検出する系を構築した。IRE1 $\alpha$ の二量体化は N 末端の小胞体内腔ドメインで起こるため、IRE1 $\alpha$ の C 末端欠損体に、青色蛍光タンパク質である cerulean の N 末端もしくは C 末端を結合させたコンストラクトを作製し、その両方を安定発現する細胞を得た。この細胞では、通常培養条件において内在性 IRE1 $\alpha$ と同様に小胞体に局在していたが、cerulean の蛍光は観察されなかった。一方、この細胞に小胞体ストレス誘導化合物 DTT を添加したところ、IRE1 $\alpha$ の二量体化が起こる条件で cerulean の再構成が観察された。これらの結果から、IRE1 $\alpha$ の二量体化を cerulean の再構成により評価する系の構築に成功した。				

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School School of Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name SHINJO, Satoko
Title Comparative Analysis of the Unfolded Protein Response Caused by Small Molecule Compounds		
Abstract <p>Endoplasmic reticulum (ER) is the organelle for folding and conformational maturation of transmembrane and secreted proteins. ER stress, which is caused by the accumulation of unfolded proteins in the ER, leads to a process known as the unfolded protein response (UPR). UPR is triggered by the activation of the three ER stress sensors (ATF6, IRE1<math>\alpha</math> and PERK) and executed by the transcriptional induction of UPR target genes. Since several UPR-inducing compounds have different modes of action, their mechanisms for protein accumulation are thought to be different; however, the effects of these compounds on the UPR have not been compared each other. In this thesis, the author performed comparative analysis of the expression pattern of UPR target genes.</p> <p><u>(1) Comparative Analysis of the Expression Patterns of UPR-Target Genes Caused by UPR-inducing Compounds</u></p> <p>The author compared the expression patterns of nine UPR target genes (ATF4, CHOP, EDEM, ERdj4, GADD34, GRP78, GRP94, PDI, and p58<sup>IPK</sup>) induced by seven UPR-inducing compounds. Hierarchical clustering analysis revealed that the expression profiles of UPR target genes induced by the seven compounds were dependent on the modes of action of the compounds. Further analysis revealed that the expression patterns of UPR target genes were classified into three clusters; cluster A (thapsigargin, tunicamycin, 2-deoxyglucose and DTT), B (eeyarestatin I) and C (brefeldin A and monensin). Since the compounds in cluster C less up-regulated the genes which were reported to be regulated by ATF6 and IRE1<math>\alpha</math>, it is suggested that the compounds in cluster A and B would activate all of three ER stress sensors; on the other hand, the compounds in cluster C would activate only PERK. As a consequence of detection of activation of ER stress sensors, it is revealed that the compounds in cluster A activated the three sensors, the compounds in cluster B activated ATF6 and PERK, and the compounds in cluster C activated only PERK.</p> <p>The compounds in cluster A were thought to accumulate incorrectly folded proteins in the ER; on the other hand, the compounds in cluster C were thought to accumulate correctly folded proteins in the ER. Hence, the difference of the folding status of the accumulated proteins might affect the ER stress sensors' activation and consequently the expression pattern of UPR target genes.</p> <p><u>(2) Establishment of a New Detection System for the Dimerization of IRE1<math>\alpha</math> by BiFC Assay</u></p> <p>The quantitative detection system that enables the detection of the activation of three ER stress sensors at the same time in a single cell was required. Therefore, the author aimed to establish a detection system for three ER stress sensors, at first IRE1<math>\alpha</math> dimerization, using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC), which detects protein interaction through the complementation of non-fluorescent fragments of fluorescent protein. The author constructed a plasmid encoding the C-terminal deleted IRE1<math>\alpha</math> (IRE1<math>\alpha</math><math>\Delta</math>KR) fused to either N- or C-terminal domain of blue fluorescent protein cerulean and established stably expressing cells of both fusion proteins. Whereas cerulean fluorescence was hardly detected under normal conditions, it was observed upon DTT treatment. These results indicated that the author succeeded in the establishment of detection system of IRE1<math>\alpha</math> dimerization with BiFC method in a single cell.</p>		