

博士学位論文

論文題目

**MITOL は IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を介して小胞体ストレス誘導性  
アポトーシスを抑制する**

東京薬科大学大学院生命科学研究科生命科学専攻

氏名 武田 啓佑

主指導者 柳 茂

研究室名 分子生化学研究室

## 目次

<b>第1章</b>	<b>序論</b> .....	<b>2</b>
1-1.	小胞体ストレス応答 <u>Unfolded protein response</u> (UPR)	
1-2.	PERK および ATF6 によるアポトーシス誘導	
1-3.	IRE1 $\alpha$ によるアポトーシス誘導	
1-4.	小胞体ストレスにおけるミトコンドリアの役割	
1-5.	<u>Mitochondrial ubiquitin ligase</u> (MITOL)の同定	
1-6.	要旨	
<b>第2章</b>	<b>結果</b> .....	<b>8</b>
2-1.	MITOL はミトコンドリア機能維持と独立し、小胞体恒常性維持に機能する	
2-2.	MITOL は小胞体ストレス下においてアポトーシス抑制効果を示す	
2-3.	MITOL は PERK と ATF6 の経路に影響しない	
2-4.	MITOL は IRE1 $\alpha$ 依存的な mRNA 分解と JNK のリン酸化を抑制する	
2-5.	MITOL は IRE1 $\alpha$ RNase および Kinase 依存的なアポトーシスを阻害する	
2-6.	MITOL は IRE1 $\alpha$ オリゴマーを不安定化する	
2-7.	IRE1 $\alpha$ は MITOL の新規基質である	
2-8.	MITOL は RNase 不活性型 IRE1 $\alpha$ を優先的に基質とする	
2-9.	IRE1 $\alpha$ K481 における変異は自身のオリゴマー化と RIDD 活性を増加させる	
2-10.	IRE1 $\alpha$ K481 における変異は小胞体の形態異常を増加させる	
2-11.	MITOL による IRE1 $\alpha$ のユビキチン化は MAM に依存する	
2-12.	神経特異的 MITOL 欠損マウスの樹立	
2-13.	MITOL は脊髄において IRE1 $\alpha$ の過剰活性化とアポトーシス誘導を抑制する	
<b>第3章</b>	<b>考察</b> .....	<b>48</b>
3-1.	結論	
3-2.	MITOL による IRE1 $\alpha$ のユビキチン化と活性制御	
3-3.	小胞体ストレス下における MAM の動的な機能変化	
3-4.	疾患における MITOL-IRE1 $\alpha$ 相互作用の役割	
<b>第4章</b>	<b>実験操作・試薬</b> .....	<b>53</b>
<b>第5章</b>	<b>参考文献</b> .....	<b>59</b>

**MITOL は IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を介して  
小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制する**

**第 1 章 序論**

## 1-1. 小胞体ストレス応答 Unfolded protein response (UPR)

小胞体はタンパク質の成熟とフォールディングに必要な細胞内区画である。多様な生理的あるいは病的な変化は、タンパク質のフォールディング、変性タンパク質の除去、酸化ストレスの解消のような小胞体機能の向上を要求する。その結果生じる小胞体恒常性の不均衡は小胞体ストレスの原因となり、UPRの引き金となる。UPRのシグナルは3種類の小胞体ストレスセンサータンパク質 Protein kinase RNA-like ER kinase (PERK), Inositol-requiring enzyme 1 alpha (IRE1 $\alpha$ ), Activating transcription factor 6 (ATF6)によって惹起され、ER-associated degradation (ERAD)や小胞体シャペロンを上方制御することで小胞体恒常性の回復に貢献する(Travers et al., 2000)。しかしながら、小胞体ストレスが重度で不可避なものとなると、一転して、代替的なUPRのシグナルがアポトーシスを引き起こす(Shore et al., 2011, 図 1-1)。UPR 媒介性アポトーシスは糖尿病や心不全、神経変性疾患などの多様なヒト疾患において発症原因の一端を担っている。そのため、UPRの分子機序の理解はそれらの疾患の治療発展に貢献すると期待されるが、UPRのシグナルを細胞生存から細胞死へと変化させる具体的な制御機構はほとんど解明されていない。

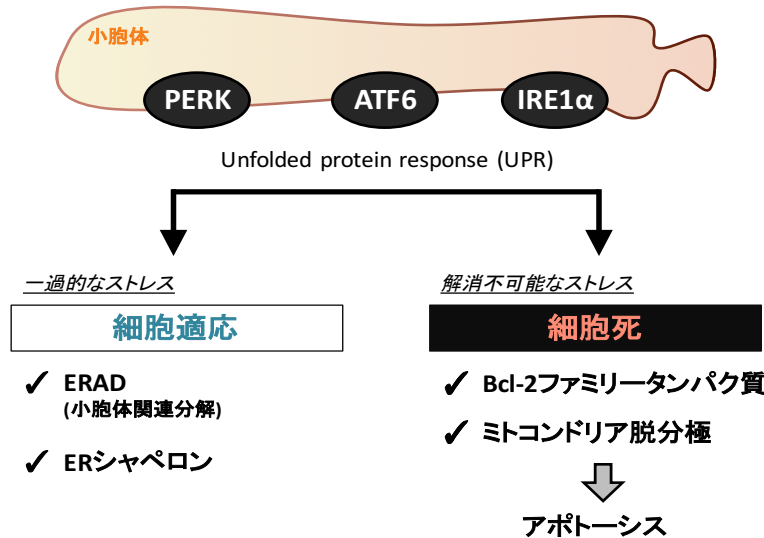


図1-1. UPRによる細胞適応と細胞死

## 1-2. PERK および ATF6 によるアポトーシス誘導

UPR センサーの一種である PERK と ATF6 は共通の下流分子 C/EBP-homologous protein (CHOP)の発現誘導を介することでアポトーシスを引き起こす。小胞体ストレ



ス下において、PERK は自己リン酸化により活性化し、下流の転写因子 ATF4 によって CHOP の転写活性を増加させる。一方で、ATF6 はゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体局在型プロテアーゼによる切断を受ける。ATF6 の C 末端フラグメントは転写因子としての活性を持ち、CHOP の発現を誘導する。PERK および ATF6 依存的に発現した CHOP は B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)ファミリータンパク質の発現誘導を亢進させることで、ミトコンドリア膜透過性遷移穴 Mitochondrial permeability transition pore (mPTP)を引き起こし、細胞運命をアポトーシスへと導いている(Galehdar et al., 2010, 図 1-2)。

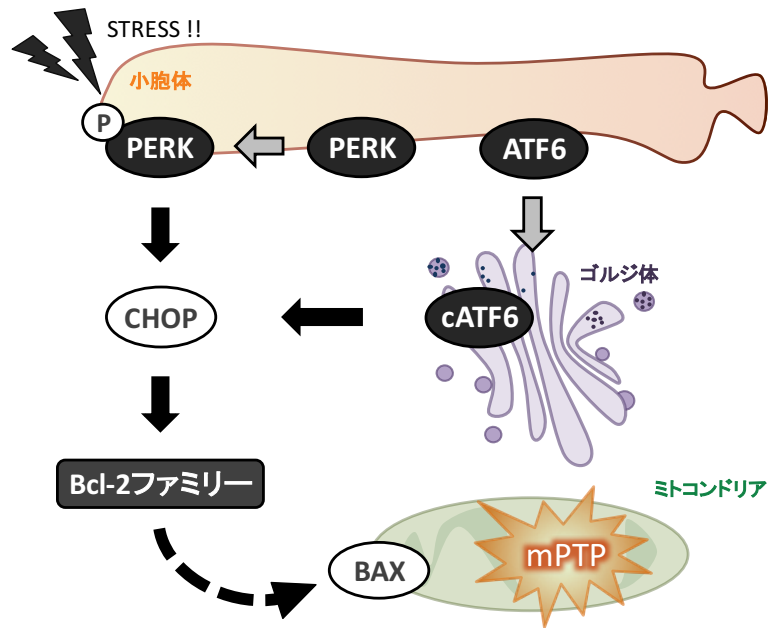


図1-2. PERK/ATF6によるアポトーシス誘導

### 1-3. IRE1 $\alpha$ によるアポトーシス誘導

IRE1 $\alpha$  は Kinase と RNase の両活性を持つ、最も保存された UPR センサーである。小胞体ストレスに応じて、IRE1 $\alpha$  は直接的あるいは、Binding immunoglobulin Protein (BiP)を介して間接的に変性タンパク質を認識し、活性化する。IRE1 $\alpha$  の活性化は段階的に制御されており、第一に Kinase 活性の増加に伴う自己リン酸化、第二にリン酸化 IRE1 $\alpha$  による自己オリゴマー化が行われる(Gardner and Walter, 2011; Kimata et al., 2003)。IRE1 $\alpha$  のオリゴマー化は自身の RNase 活性化に必須なステップである(Li et al., 2010)。このように活性化した IRE1 $\alpha$  は X-box binding protein (XBP1) mRNA をスプライスすることで成熟 XBP1 タンパク質を生じさせ、小胞体品質管理に関わる遺伝子

群の発現を誘導する(He et al., 2010)。しかしながら、強力な小胞体ストレスにおいては、IRE1 $\alpha$ 自身の基質特異性が低下し、小胞体に局在する多種多様な mRNA を切除するよう変化する。このような IRE1 $\alpha$  RNase を介した mRNA 分解は Regulated IRE1 $\alpha$  dependent decay (RIDD) と呼ばれている(Hollien et al., 2009)。加えて、RIDD では抗アポトーシス microRNA である miR-17 や miR-34 もまた分解され、Bcl-2 ファミリータンパク質関連分子である Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) の mRNA 量およびタンパク質量を増加させる。そのため、RIDD の亢進は mPTP を媒介した内因性アポトーシス経路の引き金となる(図 1-3)。近年の研究は、IRE1 $\alpha$  自身のオリゴマー化が *xbp1* mRNA スプライスに必須であるものの、過度なオリゴマー化はむしろ IRE1 $\alpha$  の基質を広げ RIDD の原因となることを提唱しているもので、IRE1 $\alpha$  オリゴマーの形態こそが IRE1 $\alpha$  のシグナルを細胞生存から細胞死へと変化させるキーコンセプトであると想定できる(Ghosh et al., 2014)。しかしながら、IRE1 $\alpha$  のオリゴマー化の制御機構については、IRE1 $\alpha$  自身の Kinase 活性と自己リン酸化による誘導が報告されるのみで、外的な要因によるオリゴマー化の制御機構は未だ不明瞭である。

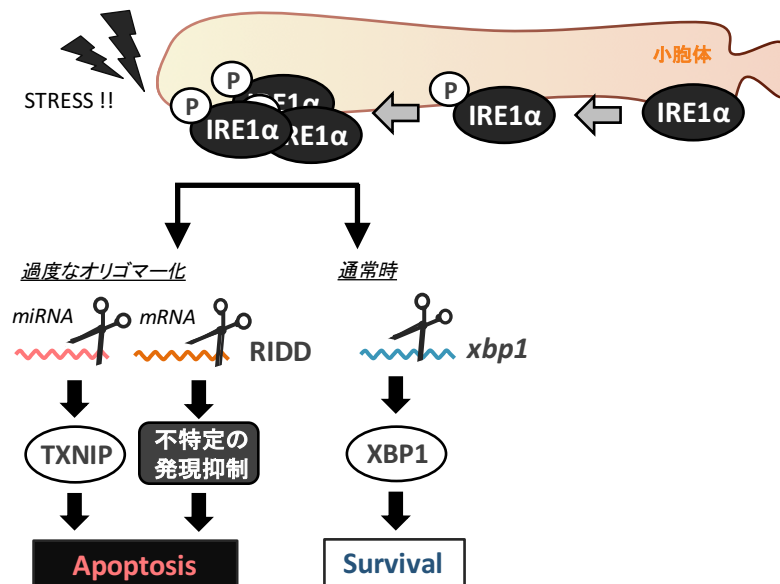


図1-3. IRE1 $\alpha$  RNaseによるアポトーシス誘導

また IRE1 $\alpha$  は Kinase 活性依存的なアポトーシス誘導経路を有している。小胞体ストレス下における IRE1 $\alpha$  は TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) をアダプタータンパク質として媒介することで c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) をリン酸化し、Bcl-2 ファミリータンパク質の活性化とアポトーシスを引き起こす(Nishitoh et al., 2002)。近年では IRE1 $\alpha$  オリゴマーの形態と IRE1 $\alpha$  Kinase によるアポトーシス誘導の関係性についても注目されているものの、具体的な因果関係は解き明かされていない。

#### 1-4. 小胞体ストレスにおけるミトコンドリアの役割

興味深いことに、小胞体ストレス下におけるアポトーシス経路の多くはミトコンドリアを経由しており、Bcl-2 ファミリータンパク質の制御と mPTP の惹起によって細胞運命をアポトーシスへと方向付ける(Reimertz et al. 2003)。言い換えれば、小胞体から駆動する UPR のシグナルがミトコンドリアへ伝達されることこそが、小胞体ストレス下における細胞運命、生と死を決定づける。

小胞体膜の中でもミトコンドリアと直接的に膜接触するユニークな領域は Mitochondria-associated ER membrane (MAM) と呼ばれ、小胞体-ミトコンドリア間の脂質代謝やカルシウム輸送における足場として必須な役割を担っている(Raturi and Simmen, 2013)。近年では、UPR センサータンパク質 PERK および IRE1 $\alpha$  は小胞体膜の中でも、MAM の領域に多く局在することが明らかとなっている。MAM における PERK は小胞体からミトコンドリアへのカルシウムシグナル伝達を増強させることで mPTP を誘発させ、小胞体ストレス下におけるアポトーシス誘導に重要な機能を有している(Verfaillie et al., 2012)。一方で、MAM に局在する IRE1 $\alpha$  は細胞生存経路の一つである *xbp1* mRNA スプライスを促進する(Mori et al., 2013)。MAM は小胞体膜とミトコンドリア外膜の接触によって構築されるので、ミトコンドリアは UPR 媒介性アポトーシスのシグナル終着点として機能するのみならず、UPR センサータンパク質 PERK, IRE1 $\alpha$  の活性そのものにさえ関与すると予想できる。しかしながら、UPR の活性制御における MAM の役割を解明するためには、更なる研究が必要とされる。

#### 1-5. Mitochondrial ubiquitin ligase (MITOL)の同定

私たちは以前、ミトコンドリア外膜局在型の新規ユビキチンリガーゼ MITOL/MARCH5 を同定し(Yonashiro et al., 2006, 図1-4)、MITOL の基質である Mitofusin 2 (Mfn2) について詳細な機能解析を試みた。Mfn2 はミトコンドリア同士の外膜融合に必須な GTPase の一つであるが、小胞体-ミトコンドリア外膜間の架橋因子としての役割も果たす(de Brito et al., 2008; Naon et al., 2016)。MITOL による Mfn2 のユビキチン化は、古典的なユビキチン-プロテアソーム経路によるタンパク質分解でなく、Mfn2 の GTPase 活性化に寄与する。実際に近年、ポリユビキチン鎖はユビキチン同士のリジン(K)の結合様式によって機能的に変化し、タンパク質分解のみならず多様な役割を持つことが報告された (Mukhopadhyay and Reizman, 2007; Pickart and Fushman, 2004)。特に、K63 結合型ポリユビキチン鎖は基質の活性化を調整できる新しいユビキチン修飾であると考えられている。さらに、私たちは MITOL による Mfn2 の活性化がミトコンドリア同士の融合よりむしろ、小胞体とミトコンドリアの接着を特異的に誘導することを明らかとした(Sugiura et al., 2013)。注目すべきことに、MITOL の発現抑制は、Mfn2 の不活性化

と未解明の分子機序によって、小胞体ネットワークの整合性を低下させた。また MITOL はミトコンドリアの中でも特に小胞体との接触場に豊富に存在するため、MITOL の機能が小胞体まで波及する可能性は十分想定できる。しかしながら、これまでの研究により、MITOL はミトコンドリアの動態やミトコンドリアを中心としたシグナル伝達に重要な機能を持つことが発見されたが(Nagashima et al., 2014; Yoo et al., 2015; Cherok et al., 2017)、小胞体との機能的関連については明らかとなっていない。

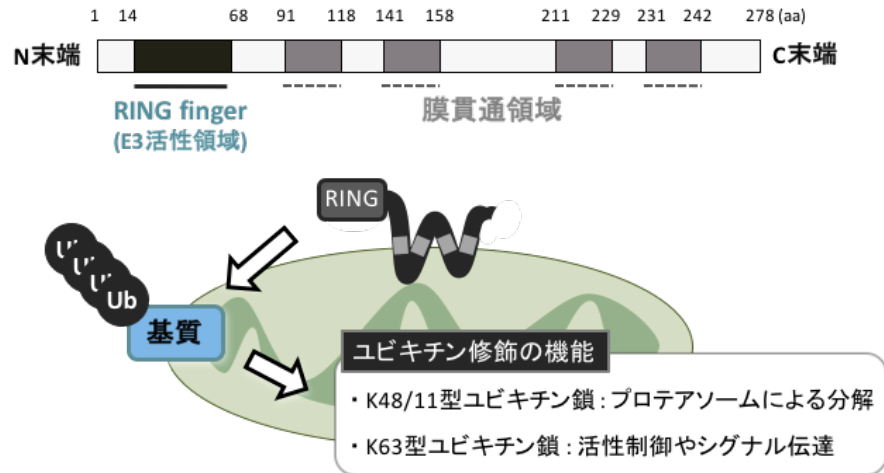


図1-4. MITOLの同定と、ユビキチン化修飾の多様な機能

## 1-6. 要旨

ここで、私は IRE1 $\alpha$  を MITOL の新規基質として同定した。MITOL は K63 結合型ユビキチン鎖によって IRE1 $\alpha$  を修飾する。そのため、IRE1 $\alpha$  の分解よりもむしろ、IRE1 $\alpha$  の機能を制御した。実際に、マウス脊髄と培養細胞の両方において MITOL は IRE1 $\alpha$  の過剰なオリゴマー化を抑制し、アポトーシス抑制効果を発揮した。また MITOL は IRE1 $\alpha$  の K481 を特異的にユビキチン化することが明らかとなり、IRE1 $\alpha$  K481 における変異は MITOL によるユビキチン化とアポトーシス抑制効果を回避するため、過剰なオリゴマー化とアポトーシスの原因となった。重要なことに、小胞体ストレスが慢性化すると、MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化は次第に減弱する。そのため、解消不可能な小胞体ストレスでは、MITOL-IRE1 $\alpha$  の関係性が破綻することで UPR の細胞死シグナルが惹起されると想定される。驚くべきことに、MITOL と IRE1 $\alpha$  の結合は MAM に依存していた。だから、私の研究成果は、ミトコンドリアが MAM を足場として IRE1 $\alpha$  を直接的に制御し、小胞体ストレス下の運命決定に関与できるという新しいコンセプトを提唱した。

MITOL は IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を介して  
小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制する

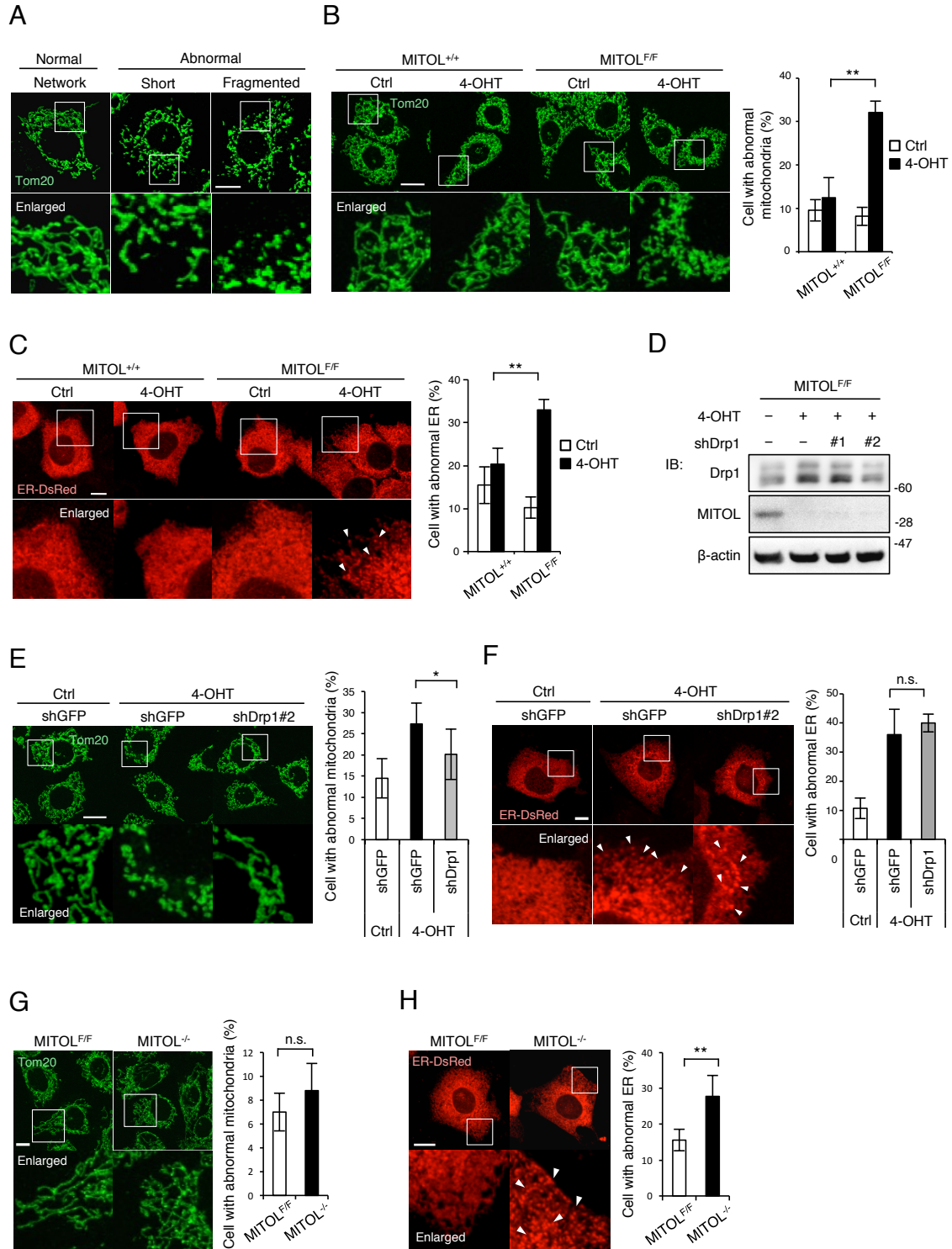
## 第 2 章 結果

## 2-1. MITOL はミトコンドリア機能維持と独立し、小胞体の恒常性維持に機能する

以前の研究において、私たちは loxP 配列を *mitol/march5* 遺伝子のエキソン 2 番に隣接するように配座することで 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) 依存的に MITOL を欠損する MEFs を作製した。この MITOL<sup>F/F</sup> MEFs は ERT2-Cre を発現するため、4-OHT 処理後、48 時間以内に急速に MITOL を欠損する(Sugiura et al., 2013)。MITOL<sup>F/F</sup> MEFs において、通常、ミトコンドリアはネットワーク状の正常な形態と、断片化または短いミトコンドリアによって構成される異常な形態を示す(Figure 1A)。MITOL の発現抑制を用いた以前の実験結果と同様に(Sugiura et al., 2013)、急性的な MITOL の欠損は異常形態なミトコンドリアを増加させた(Figure 1B)。また小胞体においても、MITOL の急性的な欠損は、正常な網状構造の小胞体を減少させ、膨潤または凝集性によって示される異常形態の小胞体を増加させた(Figure 1C)。小胞体の異常形態は小胞体ストレスや UPR の指標としても用いられるため、MITOL の急性的な欠損が小胞体のストレス応答を増大させると考えられる。

MITOL はミトコンドリア分裂因子 Drp1 や Drp1 受容体である Mid49, hFis1 などの基質を介してミトコンドリアの形態異常を引き起こす(Yonashiro et al., 2013; Xu S et al., 2016)。近年の研究において、ミトコンドリア恒常性の不均衡が小胞体ストレスの原因となることが示唆されている。そのため、私は急性的な MITOL の欠損による小胞体形態の異常がミトコンドリア機能障害を原因とするのではないかと疑った。実際に、急性的な MITOL の欠損 MEFs においては、MITOL の基質である Drp1 の分解が阻害されるため、Drp1 が僅かに蓄積していた(Figure 1D)。加えて、この Drp1 量の増加は Drp1 をターゲットとした shRNA である shDrp1#2 によって解消された(Figure 1D)。注目すべきことに、shDrp1#2 は MITOL の急性欠損によるミトコンドリア形態異常を回復したものの、小胞体形態の異常には影響を及ぼさなかった(Figure 1E, 1F)。これらの結果は、MITOL がミトコンドリアの恒常性維持とは独立して、小胞体の恒常性維持においても機能する可能性を示唆している。

# Figure 1



**Figure 1. MITOL の欠損は小胞体の形態異常を増加させる。**

(A) ミトコンドリア形態は正常なネットワークと異常な断片に分類される。MEFs は anti-Tom20 抗体によってミトコンドリアを染色される。下のパネルは四角領域の高倍率画像を示す。スケールバー; 10 $\mu$ m。

(B) 4-OHT 処理による MITOL の急性欠損はミトコンドリア形態異常を促進する。MEFs は 0.4 $\mu$ M 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) または Ethanol (Ctrl) によって二日間処理される(B-F)。ミトコンドリアは anti-Tom20 抗体によって染色される。下のパネルは四角領域の高倍率画像を示す。異常形態なミトコンドリアを持つ細胞の割合は、独立した各々の実験について 100 細胞を解析し計算する。スケールバー; 10 $\mu$ m。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*\*; p<0.01 student's t test。MITOL<sup>+/+</sup>; MITOL<sup>+/+, ERT2-Cre</sup>。MITOL<sup>F/F</sup>; MITOL<sup>F/F, ERT2-Cre</sup>。

(C) 4-OHT 処理による MITOL の急性欠損は小胞体形態異常を促進する。MEFs は解析の 24 時間前に DsRed-ER を遺伝子導入される。下のパネルは四角領域の高倍率画像を示す。矢頭は異常凝集した小胞体領域を示す。異常形態な小胞体を持つ細胞の割合は、独立した各々の実験について 100 細胞を解析し計算する。スケールバー; 10 $\mu$ m。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*\*; p<0.01 student's t test。

(D to F) shDrp1 の Drp1 発現抑制効果と、急性的な MITOL 欠損 MEFs におけるミトコンドリア・小胞体形態への影響。MEFs はそれぞれの shDrp1 ベクターをウエスタンブロットの 24 時間前に遺伝子導入され、各抗体を用いて検出した(D)。ミトコンドリアは anti-Tom20 抗体を用いて可視化した(E)。DsRed-ER は shDrp1 ベクターと共に遺伝子導入された。下のパネルは四角領域の高倍率画像を示す。矢頭は異常凝集した小胞体領域を示す。異常形態なミトコンドリア・小胞体を持つ細胞の割合は、独立した各々の実験について 100 細胞を解析し計算する。スケールバー; 10 $\mu$ m。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。n.s.; not significant student's t test。

(G and H) 慢性的な MITOL の欠損は小胞体形態異常を亢進させる。Ctrl または 4-OHT 処理から 2 週間以上経過した MEFs は anti-Tom20 抗体によって免疫染色された(G)。MEFs の小胞体は DsRed-ER を解析の 24 時間前に遺伝子導入することで可視化された(H)。下のパネルは四角領域の高倍率画像を示す。矢頭は異常凝集した小胞体領域を示す。異常形態なミトコンドリア・小胞体を持つ細胞の割合は、独立した各々の実験について 100 細胞を解析し計算する。スケールバー; 10 $\mu$ m。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。n.s.; not significant student's t test。

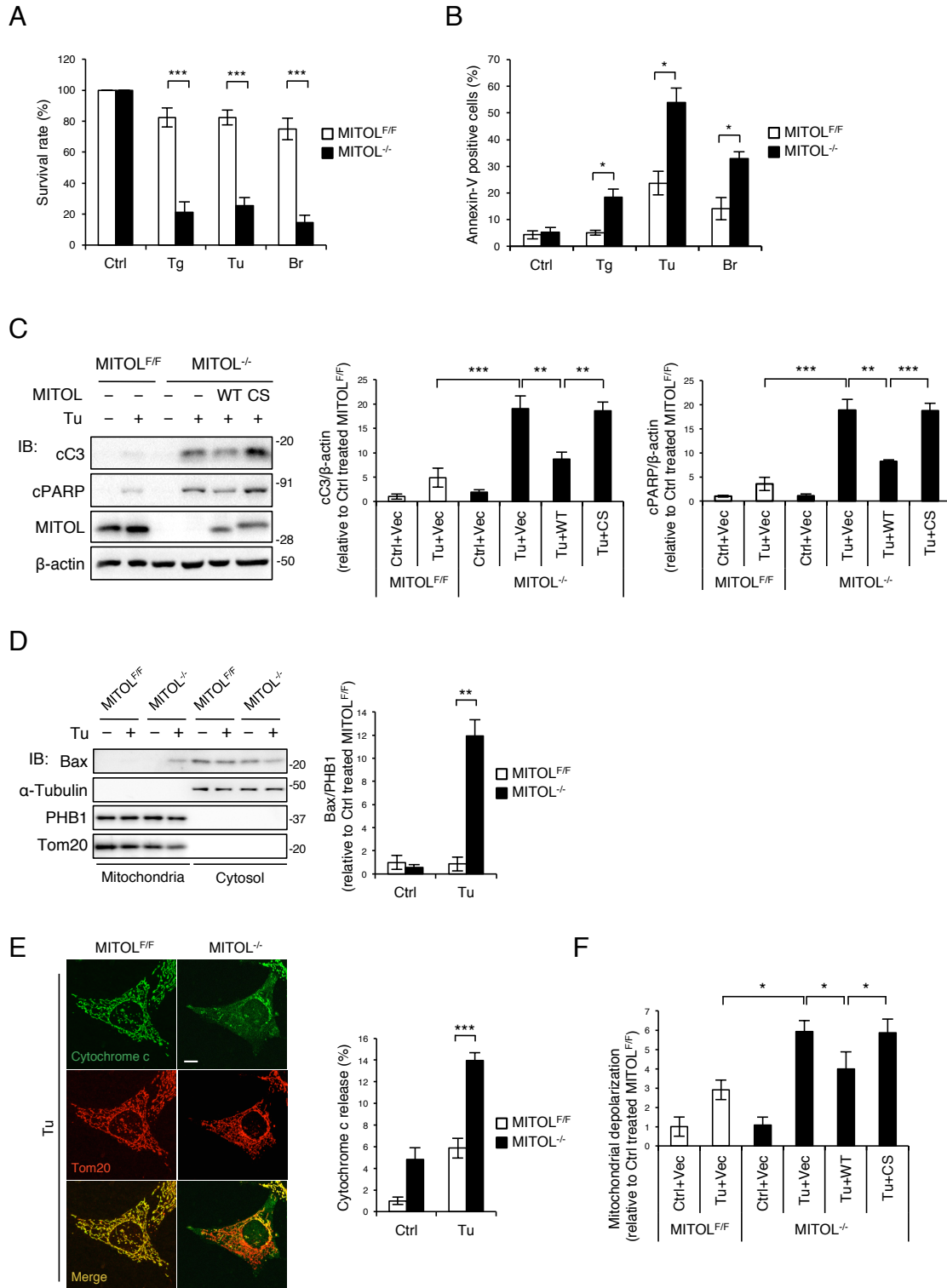


## 2-2. MITOL は小胞体ストレス下においてアポトーシス抑制効果を示す

小胞体の恒常性維持における MITOL の役割を特徴づけるため、私は 4-OHT 処理から 2 週間以上経過した MEFs を使用した。急性的な MITOL の欠損と比較して、慢性的な MITOL 欠損 MEFs は僅かな小胞体形態異常を示すものの、ミトコンドリアの形態異常を殆ど示さなかった(Figure 1G, 1H)。私は最初に、この MITOL 安定欠損 MEFs を用いて、小胞体ストレス誘導剤 Thapsigargin, Tunicamycin, Brefeldin A の影響を調べた。その結果、MITOL の欠損は小胞体ストレス後の生存率を著しく減少させた(Figure 2A)。同じように、MITOL 欠損 MEFs は MITOL<sup>F/F</sup> MEFs と比較して、非常に強いホスファチジルセリンの細胞外露出を示した(Figure 2B)。小胞体ストレスにおける MITOL の細胞生存機能を更に実証するため、私は野生型 MITOL、又は酵素活性の欠如変異体 MITOL (C65/68S)を用いたレスキュー実験を試みた。期待通り、Tunicamycin を処理した MITOL 欠損 MEFs では Caspase-3 と PARP の切断が増加していたが、それらの表現型は MITOL の再発現によって回復した(Figure 2C)。対照的に、MITOL CS 変異体の再発現は MITOL 欠損 MEFs における Caspase-3 と PARP の切断を解消しなかった(Figure 2C)。これらの結果は、MITOL の酵素活性が小胞体ストレスにおける細胞生存に貢献することを示している。

一般的な小胞体ストレスにおいて、ミトコンドリアの脱分極と遷移孔形成を媒介することでアポトーシスが誘起される(Reimertz et al. 2003)。どのように MITOL が小胞体ストレスにおける細胞運命を決定付けるか調べるため、私は BAX の活性を比較した。MITOL の欠損は Tunicamycin 誘導性の BAX のミトコンドリア移行を向上させ、次いで、シトクロム c の放出を促進させた(Figures 2D, 2E)。さらに、Tunicamycin 処理することで MITOL 欠損 MEFs は非常に激しいミトコンドリア脱分極を起こした(Figure 2F)。そして、MITOL 欠損 MEFs におけるミトコンドリア脱分極の亢進は MITOL CS 変異体ではなく、MITOL 野生型の発現によってのみ回復した(Figures 2F)。これらより、小胞体ストレスに対する MITOL のアポトーシス抑制機能はミトコンドリア脱分極またはその上流シグナルに関わることが示唆された。

**Figure 2**



**Figure 2. MITOL の欠損は小胞体ストレス依存的なアポトーシスを亢進させる。**

(A and B) MITOL 欠損 MEFs は小胞体ストレスに対して脆弱性を示す。コントロール MEFs (MITOL<sup>F/F</sup>) と MITOL 欠損 MEFs (MITOL<sup>-/-</sup>) は 0.8  $\mu$ M Thapsigarsin (Tg), 0.7  $\mu$ g/ml Tunicamycin (Tu), 1.2  $\mu$ g/ml Brefeldin A (Br) を 24 時間処理される。細胞生存率は Cell Counting Kit-8 (CCK8) アッセイによって検出される(A)。フローサイトメトリーを用いたアポトーシス細胞の検出のため、小胞体ストレス誘導剤を 18 時間処理した MEFs は Annexin-V-FITC によって染色された(B)。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (A: n=6, B: n=3)。\*; p<0.05 student's t test。\*\*\*; p<0.001 student's t test。

(C) MITOL の再発現は MITOL 欠損 MEFs の小胞体ストレス脆弱性を回復させる。Empty vector (Vec), 野生型 MITOL (WT), C65/68S 変異型 MITOL (CS) をコードするベクターを Tu 処理の 24 時間前に遺伝子導入し、各抗体を用いてウエスタンブロットにて検出した。cC3; Cleaved caspase-3。cPARP; Cleaved PARP。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*\*; p<0.01 student's t test。\*\*\*; p<0.001 student's t test。

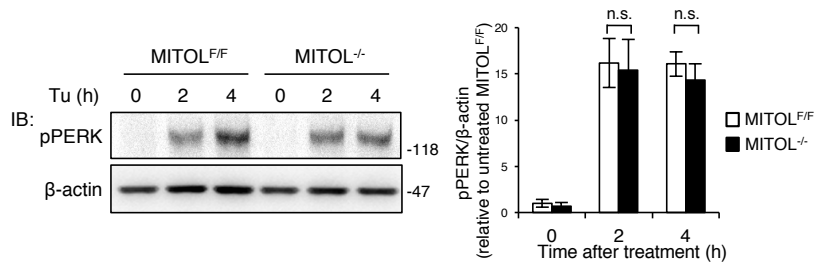
(D to F) MITOL の欠損は小胞体ストレスによるミトコンドリア脱分極を過剰に誘導する。Tu を 18 時間処理した MEFs のミトコンドリア分画、サイトゾル分画は各抗体を用いたウエスタンブロットによって検出される(D)。またそれらの MEFs は図に示した抗体によって免疫染色された(E)。細胞質漏洩したシトクロム C を持つ細胞の割合は、独立した各々の実験について 100 細胞を解析し計算する。また Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) によって膜電位を可視化したそれらの MEFs はフローサイトメトリーによって解析された(F)。スケールバー; 10 $\mu$ m。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。\*\*; p<0.01 student's t test。\*\*\*; p<0.001 student's t test。

### 2-3. MITOL は PERK と ATF6 の経路に影響しない

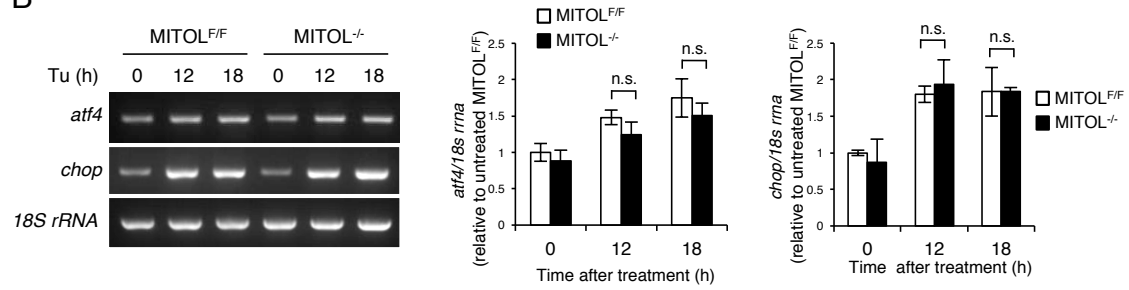
小胞体ストレス応じて、3つのUPRセンサータンパク質 PERK, ATF6, IRE1 $\alpha$  は対立するUPRシグナル、適応と細胞死を引き起こす(Shore et al., 2011)。そこで、私はUPRセンサータンパク質の活性を評価した。しかしながら、MITOLの欠損はPERKの自己リン酸化と、下流遺伝子である *chop*, *atf4* の発現誘導に影響を与えなかった (Figure 3A, 3B)。また同様に MITOL は ATF6 の C 末端フラグメントの量、ATF6 の転写誘導活性にも影響を与えなかった (Figure 3C, 3D)。だから、私は MITOL が IRE1 $\alpha$  を介して小胞体ストレス誘導性アポトーシスを制御すると仮説立てた。

**Figure 3**

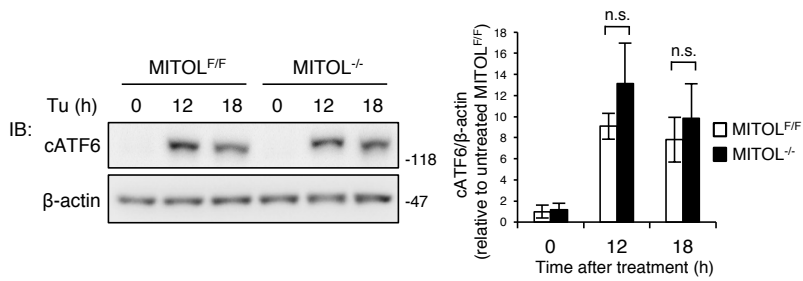
**A**



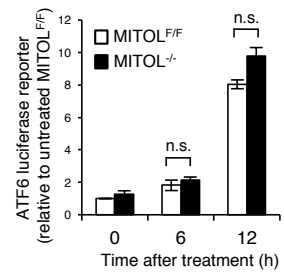
**B**



**C**



**D**



**Figure 3. MITOL の欠損は PERK/ATF6 経路に影響しない.**

(A and B) MITOL の欠損は PERK の自己リン酸化とその下流遺伝子の発現に影響しない。示された時間にて Tu 処理された MEFs は各抗体を用いたウエスタンブロットによって解析された(A)。またそれらの MEFs の mRNA 発現量は各プライマーを用いた RT-PCR にて測定された(B)。エラーバー; 平均±S.D. (n=3)。n.s.; not significant student's t test。

(C and D) MITOL の欠損は ATF6 の活性に影響しない。図で示された時間にて Tu 処理された MEFs は各抗体を用いたウエスタンブロットによって解析された(C)。示された時間の Tu 処理より 24 時間前に p5×ATF6-GL3 と pRL-CMV ベクターを遺伝子導入された MEFs は Dual-luciferase reporter アッセイにて評価された(D)。エラーバー; 平均±S.D. (n=3)。n.s.; not significant student's t test。

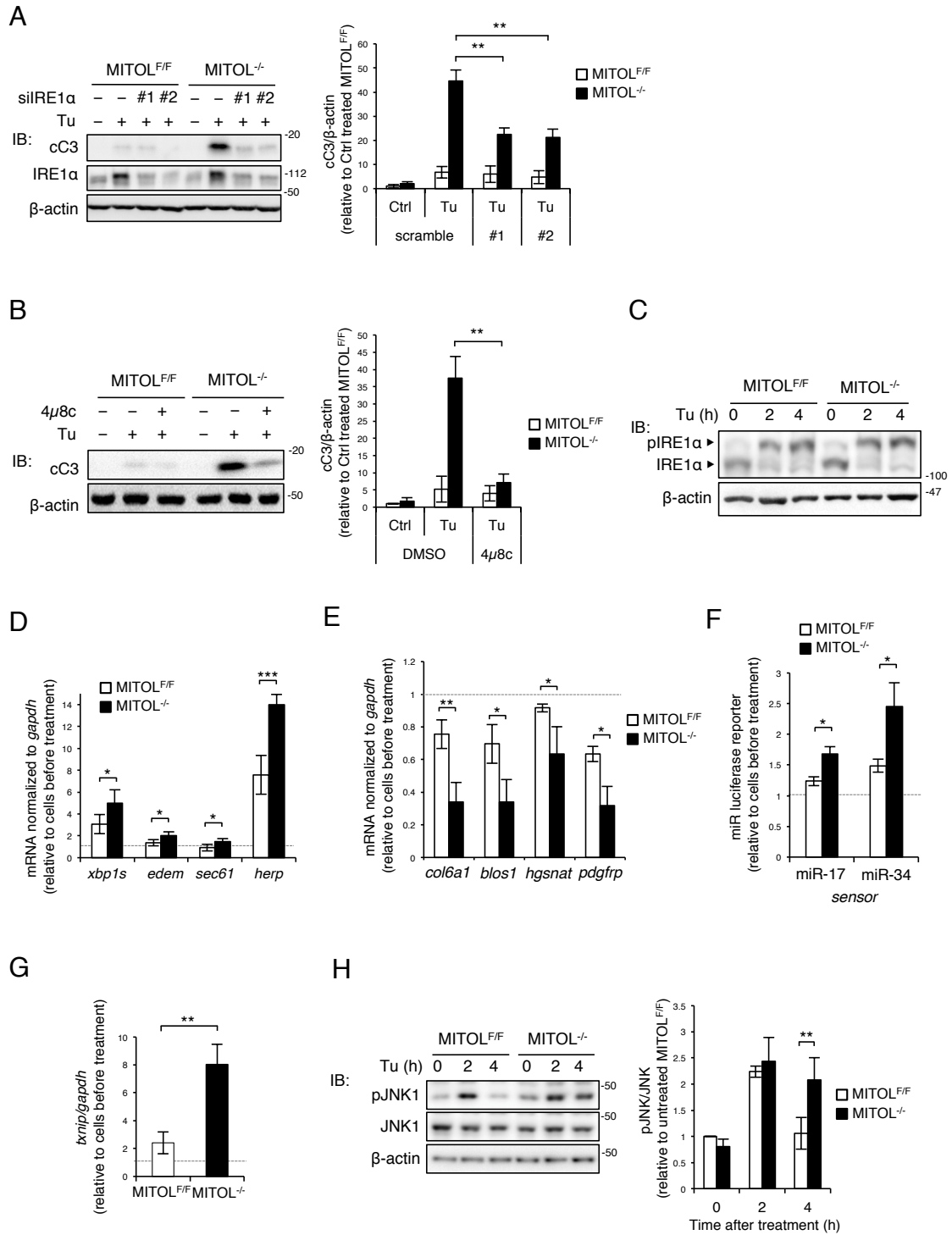
## 2-4. MITOL は IRE1 $\alpha$ 依存的な mRNA 分解と JNK のリン酸化を抑制する

小胞体ストレス下における MITOL 欠損 MEFs において、IRE1 $\alpha$  がアポトーシス誘導に関与するかどうか解明するため、IRE1 $\alpha$  の抑制による影響を検証した。期待通り、IRE1 $\alpha$  を標的とした siRNA、または IRE1 $\alpha$  RNase 阻害剤 4 $\mu$ 8c によって、MITOL 欠損 MEFs における Caspase-3 の切断が解消された(Figure 4A, 4B)。そのため、MITOL は IRE1 $\alpha$  を介して小胞体ストレス媒介性アポトーシスに抵抗性を発揮すると考えられる。しかしながら MITOL は小胞体ストレス下における IRE1 $\alpha$  の自己リン酸化に大きな影響を与えなかったため(Figure 4C)、IRE1 $\alpha$  が誘導する二つの対立シグナル、適応と細胞死について評価した。興味深いことに、Tunicamycin 処理した MITOL 欠損 MEFs は顕著な細胞死を示すにもかかわらず(Figure 1)、MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$  依存的な適応経路である *xbp1* mRNA のスプライスと下流遺伝子群 *edem*, *sec61*, *herp* の発現は増加させた(Figure 4D)。小胞体ストレスが持続すると、IRE1 $\alpha$  は細胞適応のみならず、Bifunctional な活性依存的に細胞死を引き起こす。Tunicamycin 処理した MITOL 欠損 MEFs では *xbp1* mRNA のスプライスのみならず、RIDD の標的遺伝子群 *col6a1*, *blos1*, *hgsnat*, *pdgfrp* において mRNA 量が激しく減少した (Figure 4E)。

近年の報告では IRE1 $\alpha$  は mRNA のみならず、抗アポトーシス性 miRNA を分解することで、TXNIP の発現を増加させ、細胞をアポトーシスへ導くことが報告された (Lerner et al., 2012)。私は発現ベクターに組み込まれた Luciferase の 3'-UTR 領域に RIDD の標的 miRNA である miR-17 と miR-34 の結合領域を挿入することで、Luciferase によって miRNA 量を評価する実験系を利用した。このレポーターシステムでは 3'-UTR に対応する miRNA 存在下では *luciferase* mRNA の分解によって発現が低く抑えられるが、特異的な miRNA が十分に減少すると Luciferase の発現は増加する。実際に、小胞体ストレス下では RIDD により miR-17, miR-34 の発現が減少するため、MITOL<sup>F/F</sup> MEFs における Luciferase 量は Tunicamycin 刺激依存的に増加した (Figure 4F)。さらに、MITOL 欠損は Tunicamycin 刺激依存的な Luciferase の発現誘導を著しく増大させた(Figure 4F)。そのため、MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$  による mRNA 分解のみならず、miRNA 分解もまた同様に増加させることが示唆された。miR-17, miR-34 の分解増加と一貫して、MITOL 欠損 MEFs は Tunicamycin 誘導性の *txnip* mRNA 発現を高めた(Figure 4G)。

IRE1 $\alpha$  は RNase 活性のみならず、Kinase 活性に依存したアポトーシス誘導経路を有している。以前より、IRE1 $\alpha$  Kinase の標的としてアポトーシス誘導因子である JNK が報告されていたため(Nishitoh et al., 2002; Urano et al., 2000)、私は次に JNK のリン酸化について解析した。その結果、MITOL 欠損 MEFs では、Tunicamycin 処理による JNK のリン酸化が延長していた(Figure 4H)。したがって、MITOL は小胞体ストレス下における IRE1 $\alpha$  RNase および Kinase の過剰な活性化を阻害することが示された。

**Figure 4**





**Figure 4. MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$  の過剰な活性化を引き起こす**

(A and B) IRE1 $\alpha$  の抑制は MITOL 欠損 MEFs における小胞体ストレス脆弱性を改善する。Scramble または IRE1 $\alpha$  を標的とする siRNA (#1, #2) を Tu 処理の 24 時間前に MEFs に遺伝子導入した(A)。MEFs は Tu 処理の 2 時間前に 25 $\mu$ M 4 $\mu$ 8c を処理される(B)。それらの MEFs は図に示す各抗体を用いたウエスタンブロットにて検出された。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*\*; p<0.01 student's t test。

(C) MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$  の自己リン酸化に影響しない。MEFs は図に示す時間にて Tu 処理される。リン酸化 IRE1 $\alpha$  は Phos-tag SDS-PAGE にて検出された。

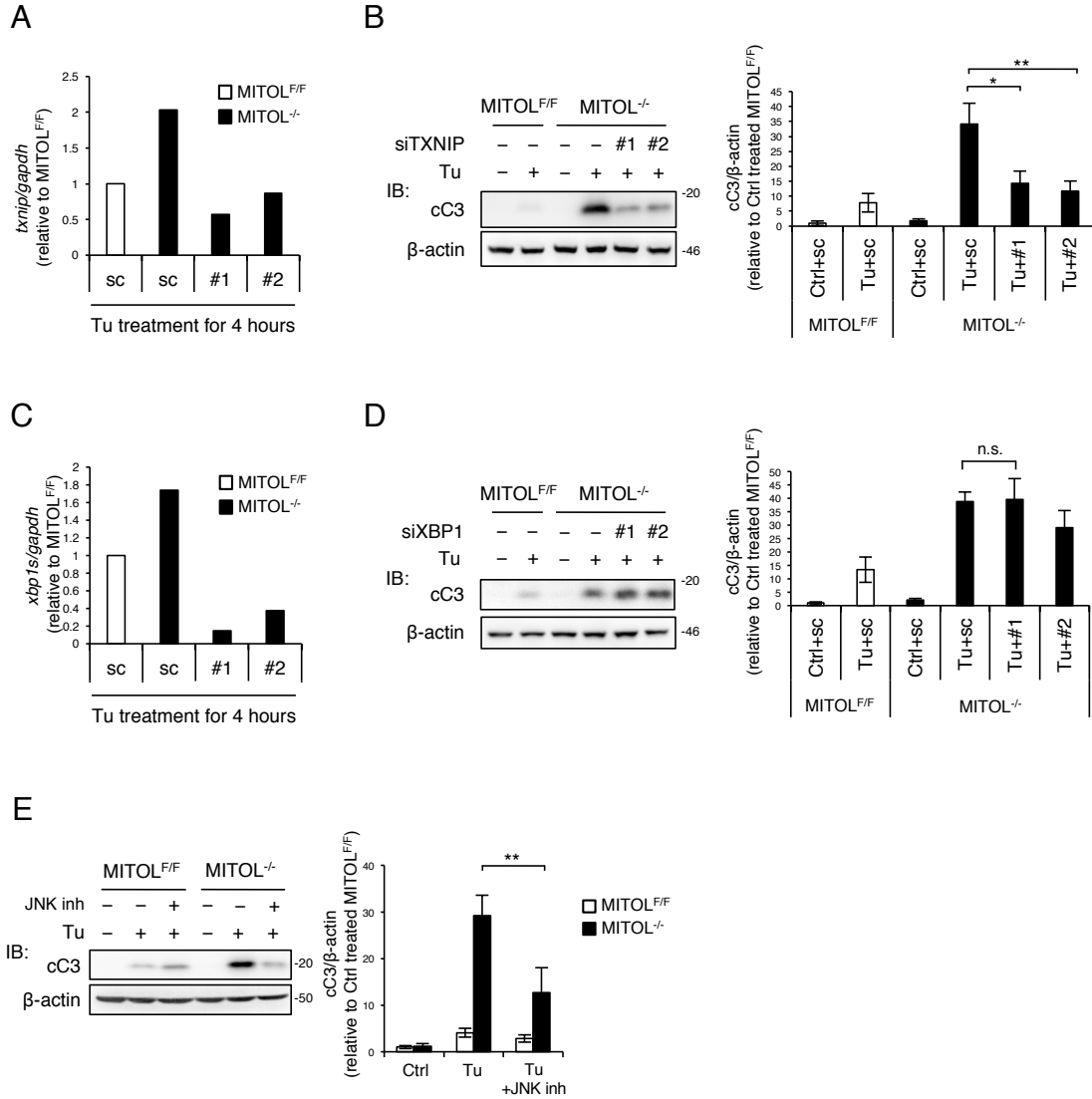
(D to G) MITOL の欠損は RIDD と *xbp1* mRNA スプライスを増加させる。Tu を 4 時間処理した MEFs の UPR 関連遺伝子の mRNA 発現量は定量的 RT-PCR にて測定された(D)。RIDD 関連遺伝子の mRNA 発現量は定量的 RT-PCR にて測定された(E and G)。4 時間の Tu 処理から 24 時間前に miR-17 luciferase reporter または miR-34 luciferase reporter を遺伝子導入された MEFs は luciferase reporter アッセイにて評価された(F)。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。\*\*; p<0.01 student's t test。\*\*\*; p<0.001 student's t test。

(H) MITOL の欠損は小胞体ストレス下における JNK のリン酸化を持続させる。MEFs は図に示す時間、Tu によって処理された。リン酸化 JNK は各抗体にて検出された。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*\*; p<0.01 student's t test。

## 2-5. MITOL は IRE1 $\alpha$ RNase および Kinase 依存的なアポトーシスを阻害する

私は MITOL 欠損 MEFs の示す小胞体ストレス脆弱性が IRE1 $\alpha$  の過剰活性化とその下流因子を原因とするかどうか詳細に検証を行った。重要なことに、siRNA を用いた TXNIP の発現抑制は MITOL 欠損 MEFs に認められた Tunicamycin 誘導性の Caspase-3 活性化を有意に回復した(Figure 5A, 5B)。一方で、XBP1 を標的とした siRNA は MITOL 欠損における Caspase-3 の活性に影響を及ぼさなかった(Figure 5C, 5D)。したがって、MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$  による *xbp1* mRNA のスプライスと RIDD を増加させるものの(Figure 4D-4G)、MITOL のアポトーシス抑制効果は RIDD を介したものであると想定される。siTXNIP と同様に、MITOL 欠損 MEFs における小胞体ストレス脆弱性は JNK の阻害剤によっても解消された(Figure 5E)。それらの結果は MITOL が小胞体ストレス下において IRE1 $\alpha$  RNase および Kinase 依存的なアポトーシス誘導を抑制することを強く提示した。

**Figure 5**



**Figure 5. MITOL 欠損による小胞体ストレス脆弱性は IRE1 $\alpha$  の過剰活性化に依存する**

(A and B) MITOL 欠損による小胞体ストレス脆弱性は TXNIP の発現抑制によって改善する。MEFs は Tu 処理の 24 時間前に Scramble または TXNIP を標的とした siRNA (#1, #2) を遺伝子導入される。Tu を 4 時間処理したそれらの MEFs における TXNIP mRNA 発現量は定量的 RT-PCR にて評価された(A)。また Tu を 24 時間処理したそれらの MEFs は各抗体を用いたウエスタンブロットにて解析された(B)。エラーバー; 平均±S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test 。\*\*; p<0.01 student's t test。

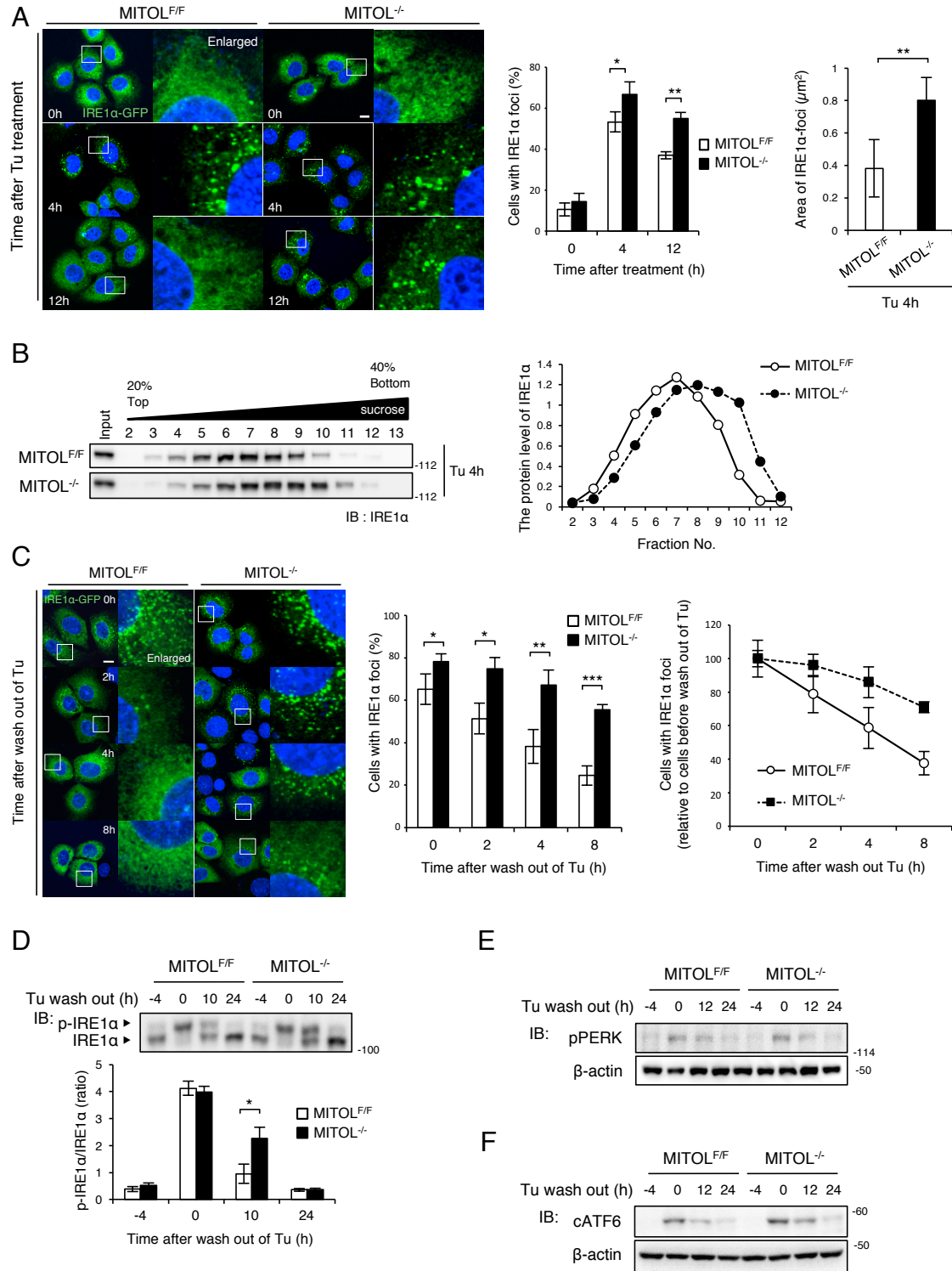
(C and D) MITOL 欠損による小胞体ストレス脆弱性は XBP1 の発現抑制によって影響されていない。MEFs は Tu 処理の 24 時間前に Scramble または XBP1 を標的とした siRNA (#1, #2) を遺伝子導入される。Tu を 4 時間処理したそれらの MEFs における TXNIP mRNA 発現量は定量的 RT-PCR にて評価された(C)。また Tu を 24 時間処理したそれらの MEFs は各抗体を用いたウエスタンブロットにて解析された(D)。エラーバー; 平均±S.D. (n=3)。n.s.; not significant student's t test。

(E) MITOL 欠損による小胞体ストレス脆弱性は JNK の抑制によって解消される。MEFs は Tu 処理の 2 時間前に 20 $\mu$ M JNK inhibitor-II (JNK inh) を添加し、培養される。Tu を 24 時間処理したそれらの MEFs は各抗体を用いたウエスタンブロットによって解析された。エラーバー; 平均±S.D. (n=3)。\*\*; p<0.01 student's t test。

## 2-6. MITOL は IRE1 $\alpha$ オリゴマーを不安定化する

IRE1 $\alpha$  のオリゴマー化は自身の RNase 活性化に必要である(Li et al., 2010)。一方で、IRE1 $\alpha$  の過剰なオリゴマー化と活性化は RIDD 依存的なアポトーシスの原因となる。MITOL による IRE1 $\alpha$  活性抑制機構を更に明らかとするため、IRE1 $\alpha$  のオリゴマー化を評価した。末端にタグを付加された IRE1 $\alpha$  はオリゴマー化を阻害されるため、近年の研究では、IRE1 $\alpha$  の膜貫通領域と Kinase 領域の間に GFP を挿入した IRE1 $\alpha$ -GFP が考案され、IRE1 $\alpha$  オリゴマーの可視化に用いられている(Li H et al., 2010)。MITOL<sup>F/F</sup> MEFs において IRE1 $\alpha$ -GFP は foci 様構造を Tunicamycin 処理後 4h で示した(Figure 6A)。しかしながら、MITOL 欠損 MEFs においては、より効率的に IRE1 $\alpha$ -GFP が foci を形成した(Figure 6A)。次に、私は内在性の IRE1 $\alpha$  オリゴマーをスクロース密度勾配遠心法にて検出した。IRE1 $\alpha$ -GFP の結果と一貫して、MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$  のオリゴマー化を増加させた(Figure 6B)。注目すべきことに、MITOL 欠損 MEFs においては、Tunicamycin 依存的に形成された IRE1 $\alpha$  の foci 様構造が Tunicamycin の洗浄後も長く維持された (Figure 6C)。同様に、MITOL の欠損 MEFs においては、IRE1 $\alpha$  の自己リン酸化もまた Tunicamycin の洗浄後も長く維持された (Figure 6D)。一方で、PERK の自己リン酸化や ATF6 の C 末端フラグメントは Tunicamycin の洗浄後、MITOL の欠損にかかわらず、24 時間以内に基底状態まで回復した(Figure 6E, 6F)。これらより、MITOL は IRE1 $\alpha$  活性化に必要な IRE1 $\alpha$  のオリゴマー化を不安定化させることで、IRE1 $\alpha$  の過剰なオリゴマー化を阻害することが示唆された。

**Figure 6**



## Figure 6. MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$ オリゴマーを安定化する

(A and B) MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$  のオリゴマー化を促進する。Tu を処理される 24 時間前に MEFs は IRE1 $\alpha$ -GFP 発現ベクターを遺伝子導入される。Tu は図に示された時間添加される(A)。右のパネルは四角領域の高倍率画像を示す。オリゴマー化された IRE1 $\alpha$ -GFP を持つ細胞の割合は独立した各々の実験について 100 細胞ずつ解析することで計算される。Tu 刺激 4 時間時の各 IRE1 $\alpha$  オリゴマーの平均サイズは独立した各々の実験について 20 細胞ずつを ImageJ の Analyze particles を用いて解析した。MEFs のライセートはスクロース密度勾配遠心法によって分離され、anti-IRE1 $\alpha$  抗体を用いたウエスタンブロットによって検出された(B)。スケールバー; 10 $\mu$ m。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。\*\*; p<0.01 student's t test。

(C) MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$  オリゴマーの形成を維持する。IRE1 $\alpha$ -GFP 発現ベクターを遺伝子導入された MEFs は Tu と共に 4 時間インキュベートされた後、PBS にて洗浄され、新鮮な培地と共に図に示した時間、培養される。オリゴマー化された IRE1 $\alpha$ -GFP を持つ細胞の割合は独立した各々の実験について 100 細胞ずつ解析することで計算される。右のパネルは四角領域の高倍率画像を示す。スケールバー; 10 $\mu$ m。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。\*\*; p<0.01 student's t test。\*\*\*; p<0.01 student's t test。

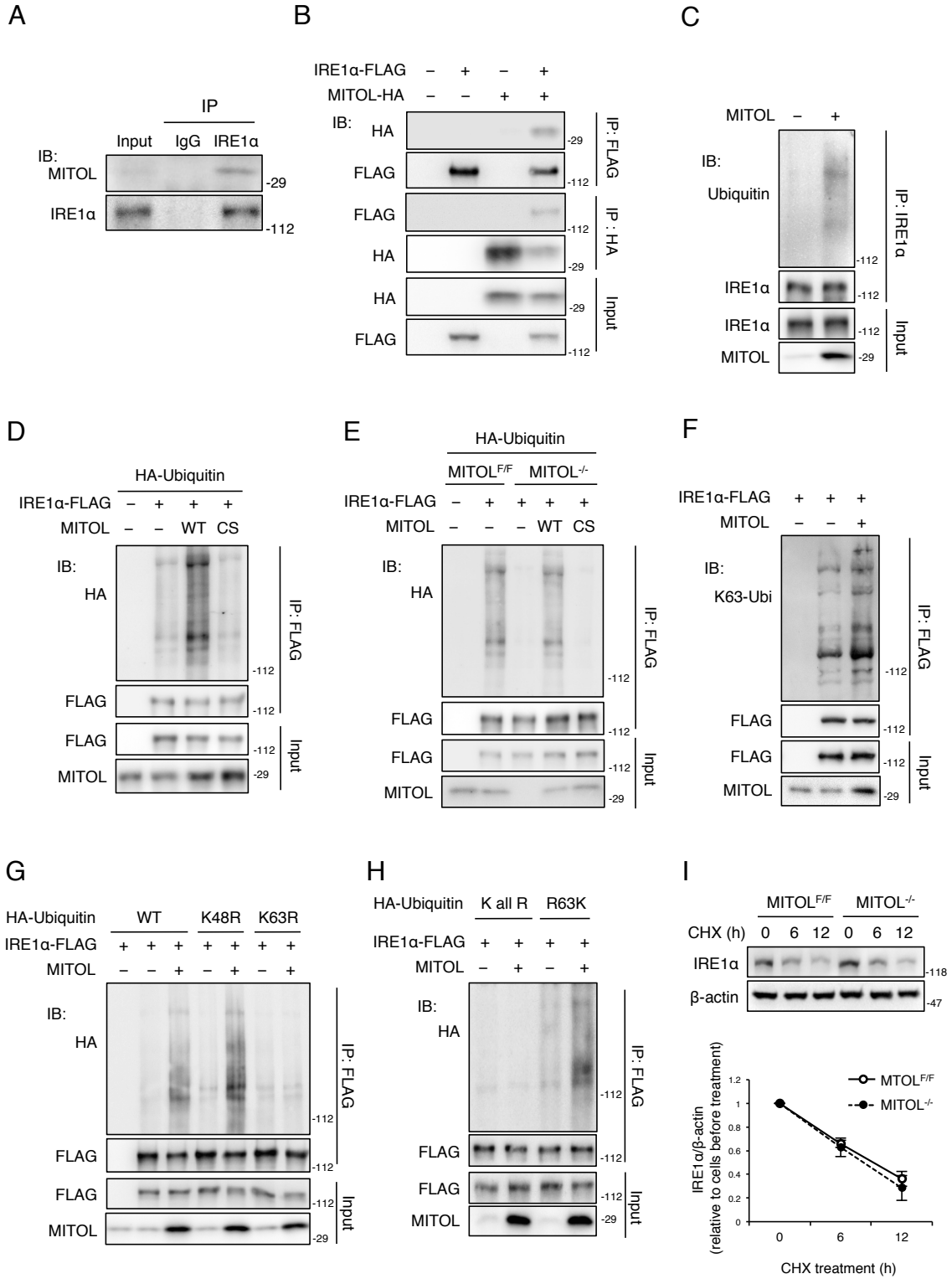
(D to F) MITOL の欠損は PERK や ATF6 ではなく、IRE1 $\alpha$  の活性化のみを維持する。Tu を 4 時間処理した MEFs は PBS にて洗浄され、新鮮な培地にて図に示す時間、培養される。ウエスタンブロットは各抗体にて行われた。リン酸化 IRE1 $\alpha$  の検出は Phos-tag SDS-PAGE にて行なわれた。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。

## 2-7. IRE1 $\alpha$ は MITOL の新規基質である

MITOL の欠損が IRE1 $\alpha$  の過剰活性化と細胞死を引き起こすことが明らかとなった (Figure 2 to 6)。そのため、私は MITOL と IRE1 $\alpha$  が結合するかどうか調べた。HEK293 細胞において、内在性の IRE1 $\alpha$  は内在性の MITOL と共沈降した (Figure 7A)。また IRE1 $\alpha$ -FLAG と MITOL-HA を導入した HEK293 細胞を用いた免疫沈降実験は MITOL が IRE1 $\alpha$  と結合することを示唆した (Figure 7B)。MITOL による IRE1 $\alpha$  の制御機構を詳細に解明するため、私は MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化について検証した。内在性の IRE1 $\alpha$  の免疫沈降実験において、MITOL の過剰発現は IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を増加させた (Figure 7C)。さらに、野生型 MITOL の過剰発現は、コントロールベクターや MITOL の不活性変異体と比較し、IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を高めた (Figure 7D)。また MITOL 欠損 MEFs は IRE1 $\alpha$  のユビキチン化に対して強烈的な抑制を示し、この IRE1 $\alpha$  ユビキチン化の減弱は、MITOL の不活性変異体ではなく、MITOL の野生型によってのみ解消された (Figure 7E)。それらの結果は IRE1 $\alpha$  が MITOL の新規基質であることを示している。近年、ポリユビキチン鎖はユビキチン同士のリジンの結合様式によって機能的に分類できることが報告された (Mukhopadhyay and Reizman, 2007; Pickart and Fushman, 2004)。K48 結合型ポリユビキチン鎖は主にプロテアソームによる基質の分解を媒介するのに対して、K63 結合型ポリユビキチン鎖は基質の活性化や局在変化、結合タンパク質の調整を担っている。興味深いことに、MITOL の過剰発現による IRE1 $\alpha$  ユビキチン化の増加は、K63 結合型ポリユビキチン鎖の特異的抗体によっても確認された (Figure 7F)。また、野生型ユビキチンや K48R 変異型ユビキチンを共発現した際には、MITOL の過剰発現によって IRE1 $\alpha$  のユビキチン化が増加したが、K63R 変異型ユビキチンを用いた際には MITOL の発現量は IRE1 $\alpha$  のユビキチン化に変化を及ぼさなかった (Figure 7G)。以前、私はポリユビキチン鎖の種類を同定するため、リジンを持たない K0 変異体や単一の K を持つ RK 変異体を含む多様なユビキチン変異体を作製した (Sugiura et al., 2013)。KR 変異体の結果と一貫して、MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化は R63K 変異型ユビキチンを導入した HEK293 細胞においてのみ確認された (Figure 7H)。実際に、MITOL の欠損は CHX 処理後の IRE1 $\alpha$  の分解速度に影響を与えなかった (Figures 7I)、MITOL は IRE1 $\alpha$  の活性や局在、結合分子の調節を担うと考えられる。これらの結果より、MITOL は IRE1 $\alpha$  に対して K63 結合型ポリユビキチン鎖を付加することで IRE1 $\alpha$  の活性を制御することが示唆された。



**Figure 7**



## Figure 7. MITOL は IRE1 $\alpha$ を K63 結合型ポリユビキチン鎖にて修飾する

(A and B) MITOL と IRE1 $\alpha$  は結合する。HEK293 細胞のライセートは anti-IRE1 $\alpha$  抗体を用いて免疫沈降され、anti-MITOL 抗体、または anti-IRE1 $\alpha$  抗体にてウエスタンブロットされる(A)。示されたベクターを遺伝子導入された HEK293 細胞のライセートは免疫沈降され、各抗体を用いたウエスタンブロットにて検出される(B)。

(C to E) MITOL は IRE1 $\alpha$  をユビキチン化する。図に示すベクターを遺伝子導入した HEK293 細胞(C and D)、または MEFs (E)のライセートは各抗体を用いた免疫沈降の後、ウエスタンブロットによって検出される。WT: 野生型 MITOL。CS: リガーゼ活性欠失変異型 MITOL。

(F to H) MITOL は IRE1 $\alpha$  に K63 結合型ポリユビキチン鎖を付加する。図に示すベクターを遺伝子導入した HEK293 は各抗体を用いて免疫沈降され、ウエスタンブロットにより検出される。WT: 野生型ユビキチン。K48R, K63R: K48 または 63 におけるアルギニン(R)への点変異型ユビキチン。K all R: 全ての K を R へ置換した変異型ユビキチン。R63K: K all R の R63 のみを本来のアミノ酸である K に再置換した変異型ユビキチン。

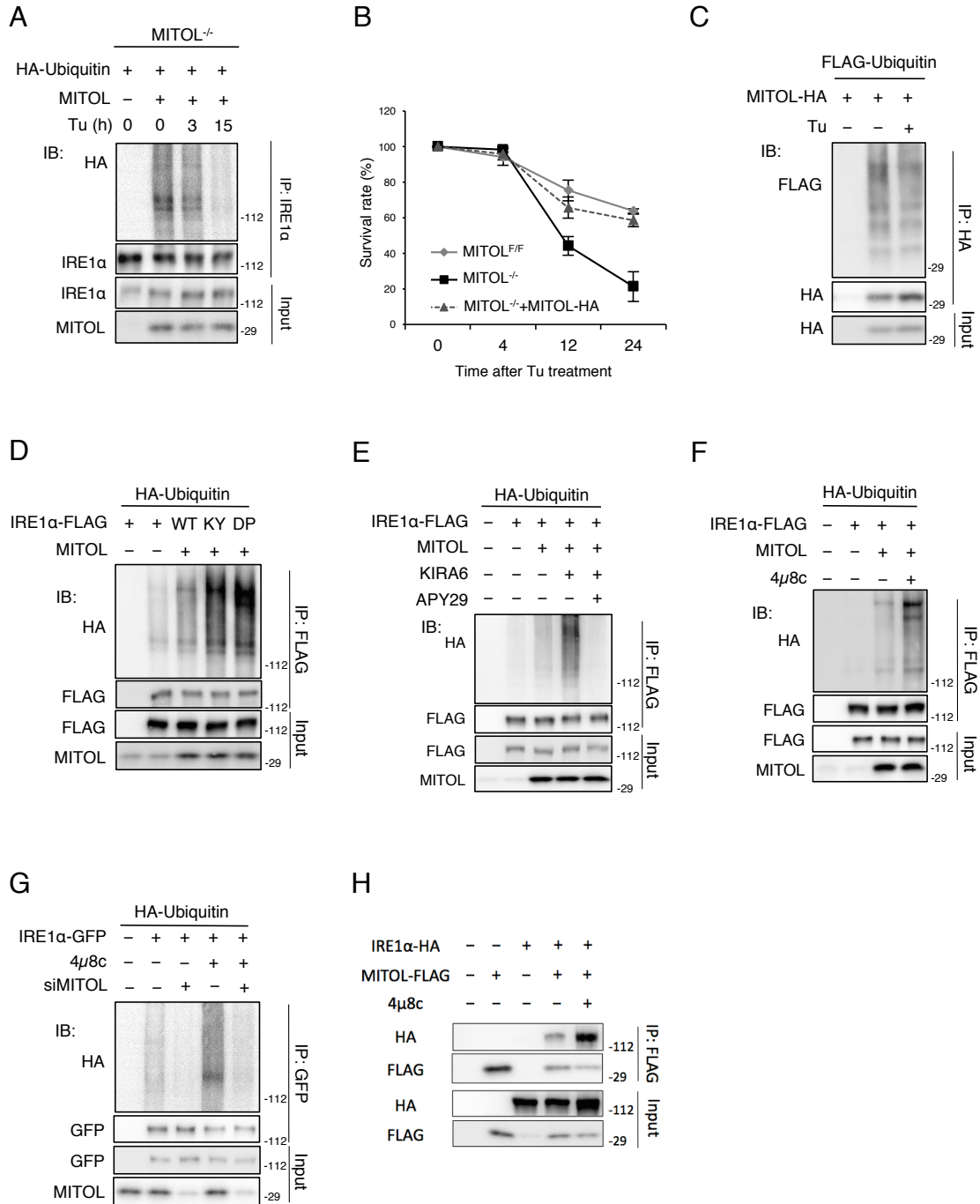
(I) MITOL は IRE1 $\alpha$  のタンパク質分解速度に影響しない。MEFs は 10 $\mu$ g/ml Chycloheximide (CHX)と共に図に示す時間、培養される。IRE1 $\alpha$  のタンパク質量は各抗体によって検出される。

## 2-8. MITOL は RNase 不活性型 IRE1 $\alpha$ を優先的に基質とする

私は次に MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化が小胞体ストレス下において、どのような生理的変化を示すか解析した。興味深いことに、Tunicamycin の添加時間が長くなると、MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化は急速に減弱した(Figure 8A)。特に Tunicamycin 処理から 15 時間程度で IRE1 $\alpha$  のユビキチン化は顕著に消失した。重要なことに、Tunicamycin 処理後の細胞生存率は 12 時間程度から顕著に低下しており、ユビキチン化 IRE1 $\alpha$  の減少と相関していた(Figure 8B)。そのため、MITOL 媒介性のユビキチン化 IRE1 $\alpha$  の消失こそが、IRE1 $\alpha$  シグナルのアポトーシススイッチの分子機構の一端であると考えられる。一方で、Tunicamycin 処理は MITOL の自己ユビキチン化活性に影響を及ぼさなかった(Figure 8C)。

私は MITOL による IRE1 $\alpha$  の基質認識について詳細な分子機構を解明するため、IRE1 $\alpha$  同士の結合とオリゴマー化を阻害する K121Y 変異または D123P 変異を IRE1 $\alpha$  に導入した。意外なことに、MITOL 媒介性の IRE1 $\alpha$  ユビキチン化は K121Y や D123P の変異によって増加した(Figure 8D)。私は MITOL が不活性型の IRE1 $\alpha$  を優先的にユビキチン化すると仮説立てて、IRE1 $\alpha$  の阻害剤を用い検討した。興味深いことに、IRE1 $\alpha$  の Kinase 阻害剤 KIRA6 を添加することで MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化は増加したが、もう一つの Kinase 阻害剤 APY29 の添加では IRE1 $\alpha$  のユビキチン化はむしろ低下した(Figure 8E)。近年の報告より、IRE1 $\alpha$  のオリゴマー化は Kinase 領域の ATP 結合部位におけるアロステリック変化により制御されることが明らかとなった(Ghosh et al., 2014)。APY29 と KIRA6 はどちらも Kinase 領域の ATP 結合部位における拮抗阻害薬であるが、APY29 の結合によるアロステリック変化は IRE1 $\alpha$  のオリゴマー化を誘導し、むしろ RNase 活性を向上させることが示されている。反対に、KIRA6 と IRE1 $\alpha$  の結合はオリゴマー化を抑制し、IRE1 $\alpha$  の RNase 活性をも減弱させる。次に私は IRE1 $\alpha$  の RNase 阻害剤 4 $\mu$ 8c を添加し、MITOL 媒介性の IRE1 $\alpha$  ユビキチン化を評価した。期待通り、4 $\mu$ 8c 処理は MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を亢進させた(Figure 8F)。この 4 $\mu$ 8c 添加による IRE1 $\alpha$  ユビキチン化の増加は、MITOL を発現抑制した条件では認められなかったため(Figure 8G)、IRE1 $\alpha$  RNase の阻害時における IRE1 $\alpha$  ユビキチン化の増加は MITOL に依存したものであると考えられる。実際に、4 $\mu$ 8c 添加は MITOL と IRE1 $\alpha$  の結合を増大させた(Figure 8H)。そのため、MITOL は RNase 不活性型の IRE1 $\alpha$  を優先的にユビキチン化すると考えられる。

**Figure 8**



## Figure 8. MITOL による IRE1 $\alpha$ の認識は IRE1 $\alpha$ RNase 活性化に伴い減弱する

(A and B) 小胞体ストレスによる細胞死誘導と協調して MITOL による IRE1 $\alpha$  ユビキチン化は減弱する。MEFs は各ベクターを遺伝子導入される。24 時間後、図に示す時間 Tu を処理した MEFs は anti-IRE1 $\alpha$  抗体により免疫沈降され、各抗体を用いたウエスタンブロットによって検出される(A)。細胞生存率は Figure 2A と同様に検出される(B)。

(C) MITOL の自己ユビキチン化活性は小胞体ストレスによって変化しない。12 時間の Tu 刺激の 24 時間前に HEK293 細胞は各ベクターを遺伝子導入される。細胞のライセートは図に示す抗体によって免疫沈降され、ウエスタンブロットにて検出される。

(D) MITOL はモノマー型 IRE1 $\alpha$  を優先的にユビキチン化する。HEK293 細胞は図に示すベクターを遺伝子導入される。細胞のライセートは図に示す抗体によって免疫沈降され、ウエスタンブロットにて検出される。

(E to G) IRE1 $\alpha$  RNase の抑制は MITOL によるユビキチン化を亢進させる。HEK293 細胞は図に示すベクターを遺伝子導入され、24 時間後、1 $\mu$ M KIRA6, 2 $\mu$ M APY29, 10 $\mu$ M 4 $\mu$ 8c を 3 時間処理される(E and F)。MEFs は図に示すベクターまたは siRNA を遺伝子導入され、24 時間後、4 $\mu$ 8c を 3 時間処理される(G)。細胞のライセートは図に示す抗体によって免疫沈降され、ウエスタンブロットにて検出される。

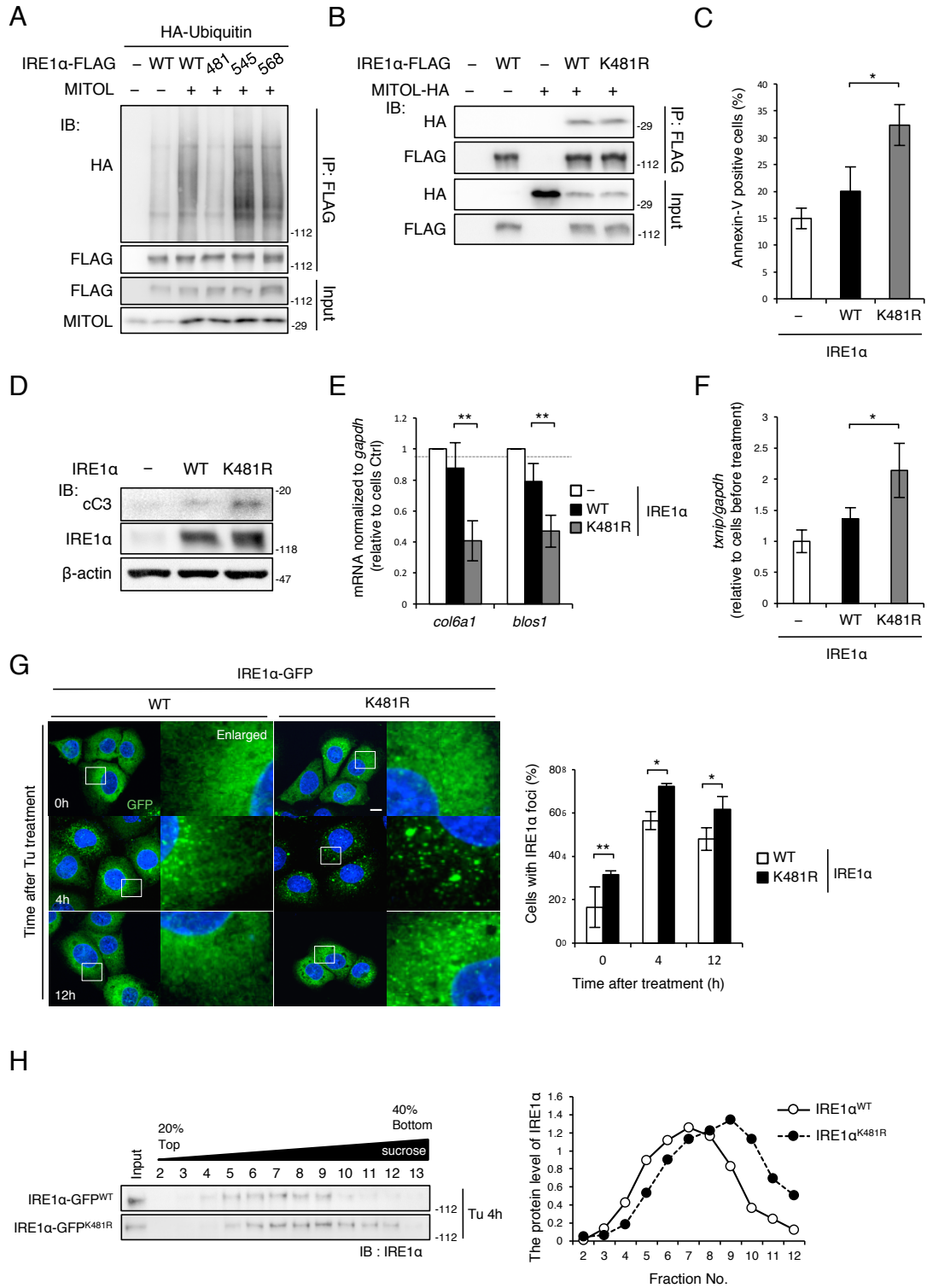
(H) IRE1 $\alpha$  RNase の抑制は MITOL-IRE1 $\alpha$  の結合を増加させる。HEK293 細胞は図に示すベクターを遺伝子導入され、24 時間後、4 $\mu$ 8c を 3 時間処理される。細胞のライセートは図に示す抗体によって免疫沈降され、ウエスタンブロットにて検出される。

## 2-9. IRE1 $\alpha$ K481 における変異は自身のオリゴマー化と RIDD 活性を増加させる

MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化に必須なリジンを同定するため、私は *in silico* search の一種である UbPred を用いた。その予測結果は IRE1 $\alpha$  のいくつかのリジンをユビキチン結合部位として示したため、私は IRE1 $\alpha$  のユビキチン化候補部位のリジンをアルギニンに置換した 3 つの変異体を作製した。IRE1 $\alpha$  K481R では、野生型 IRE1 $\alpha$  や他の KR 変異型 IRE1 $\alpha$  と比較して、MITOL の過剰発現によるユビキチン化が減弱した(Figure 9A)。一方で、MITOL と IRE1 $\alpha$  の結合について K481 における変異は影響を与えなかった(Figure 9B)。だから、MITOL は IRE1 $\alpha$  の K481 を介して、ポリユビキチン鎖を付加すると考えられる。

さらに私は MITOL によるユビキチン化を受けない IRE1 $\alpha$  K481R が MITOL 欠損 MEFs と同様に IRE1 $\alpha$  の過剰オリゴマー化とアポトーシス誘導を示すことを確認した。通常状態において IRE1 $\alpha$  は小胞体の分子シャペロン BiP と結合することで、少なくとも一部は、オリゴマー化と活性化を阻害されている。一方で、変性タンパク質が蓄積すると BiP は変性タンパク質と優先的に結合するため IRE1 $\alpha$  と解離し、IRE1 $\alpha$  の活性化を許す。したがって、IRE1 $\alpha$  の過剰発現は小胞体へストレスを強いることなく、UPR の枝分かれした経路の中でも IRE1 $\alpha$  のシグナルのみを活性化することができる。IRE1 $\alpha$  K481R の過剰発現は、野生型 IRE1 $\alpha$  やコントロールベクターと比較して、Annexin-V positive-cells や Cleaved caspase-3 を増加させた(Figure 9C, 9D)。また IRE1 $\alpha$  K481R の過剰発現は、RIDD の標的遺伝子群の mRNA 量を減少させた(Figure 9E)。同様に IRE1 $\alpha$  K481R の過剰発現は、RIDD 標的 miRNA である miR-17, miR-34 の下流遺伝子 TXNIP の mRNA 量を増加させた(Figure 9F)。さらに、IRE1 $\alpha$  K481R は野生型 IRE1 $\alpha$  と比較して、高いオリゴマー形成能を有していた(Figure 9G, 9H)。これらの結果は、IRE1 $\alpha$  における K481 の変異は、MITOL 欠損 MEFs と同様に IRE1 $\alpha$  の過剰なオリゴマー化と活性化の原因となることを示している。

**Figure 9**



**Figure 9. IRE1 $\alpha$  K481R は高い RNase 活性とアポトーシス誘導能を示す**

(A) MITOL は IRE1 $\alpha$  K481 にポリユビキチン鎖を付加する。各 IRE1 $\alpha$  変異体と図に示すベクターを遺伝子導入された HEK293 細胞のライセートは anti-FLAG 抗体を用いて免疫沈降され、各抗体によるウエスタンブロットにて検出される。481: K481R, 545: K545R, 568: K568R。

(B) IRE1 $\alpha$  K481R は野生型 IRE1 $\alpha$  と同程度、MITOL と結合する。図に示す各ベクターを遺伝子導入された HEK293 細胞のライセートは anti-FLAG 抗体にて免疫沈降され、ウエスタンブロットを用いて検出される。KR: K481R。

(C and D) IRE1 $\alpha$  K481R の過剰発現はアポトーシスを誘導する。図に示すベクターを遺伝子導入された MEFs は 24 時間後、Annexin V-FITC によって染色される(C)。また図に示す抗体によってウエスタンブロットされる(D)。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。

(E and F) IRE1 $\alpha$  K481R は高い RIDD 活性を示す。MEFs は解析の 24 時間前に図に示すベクターを遺伝子導入される。RIDD の活性は定量的 RT-PCR によって検討される。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。\*\*; p<0.01 student's t test。

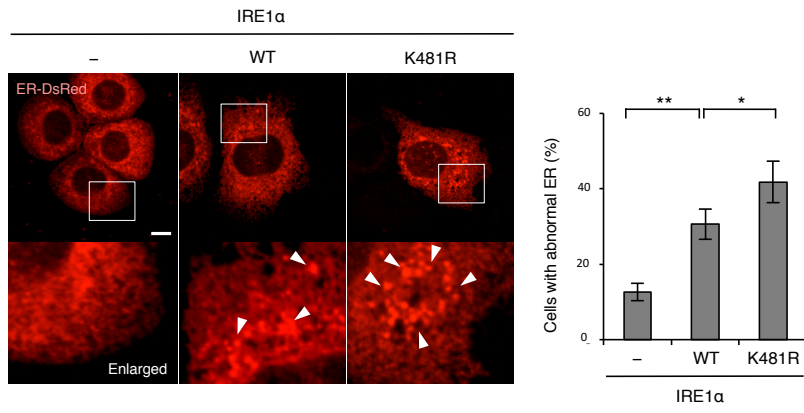
(G and H) IRE1 $\alpha$  K481R は過剰なオリゴマー化を起こす。MEFs は IRE1 $\alpha$ -GFP を遺伝子導入される。24 時間後、MEFs は図に示す時間、Tu によって刺激され、GFP の蛍光シグナルを観察される(G)。オリゴマー化された IRE1 $\alpha$ -GFP を持つ細胞の割合は独立した各々の実験について 100 細胞ずつ解析することで計算される。またスクロース密度勾配遠心法によって分離されたライセートは anti-IRE1 $\alpha$  抗体を用いたウエスタンブロットによって検出される(H)。スケールバー; 10 $\mu$ m。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。\*\*; p<0.01 student's t test。



## 2-10. IRE1 $\alpha$ K481 における変異は小胞体の形態異常を増加させる

私は、MITOL の欠損が小胞体の形態異常を引き起こすという研究観察に基づいて、MITOL が IRE1 $\alpha$  を直接的に制御することを新たに提示してきた(Figure 1-8)。そこで、私は MITOL による IRE1 $\alpha$  の活性制御機構が小胞体の形態に与える影響を確認した。急性的な、または慢性的な MITOL 欠損 MEFs と一貫して(Figure 1)、IRE1 $\alpha$  K481R の過剰発現は、コントロールベクターや野生型 IRE1 $\alpha$  と比較して、有意に小胞体形態の異常を増加させた(Figure 10)。

Figure 10



### Figure 10. IRE1 $\alpha$ K481R の過剰発現は小胞体の形態異常を引き起こす

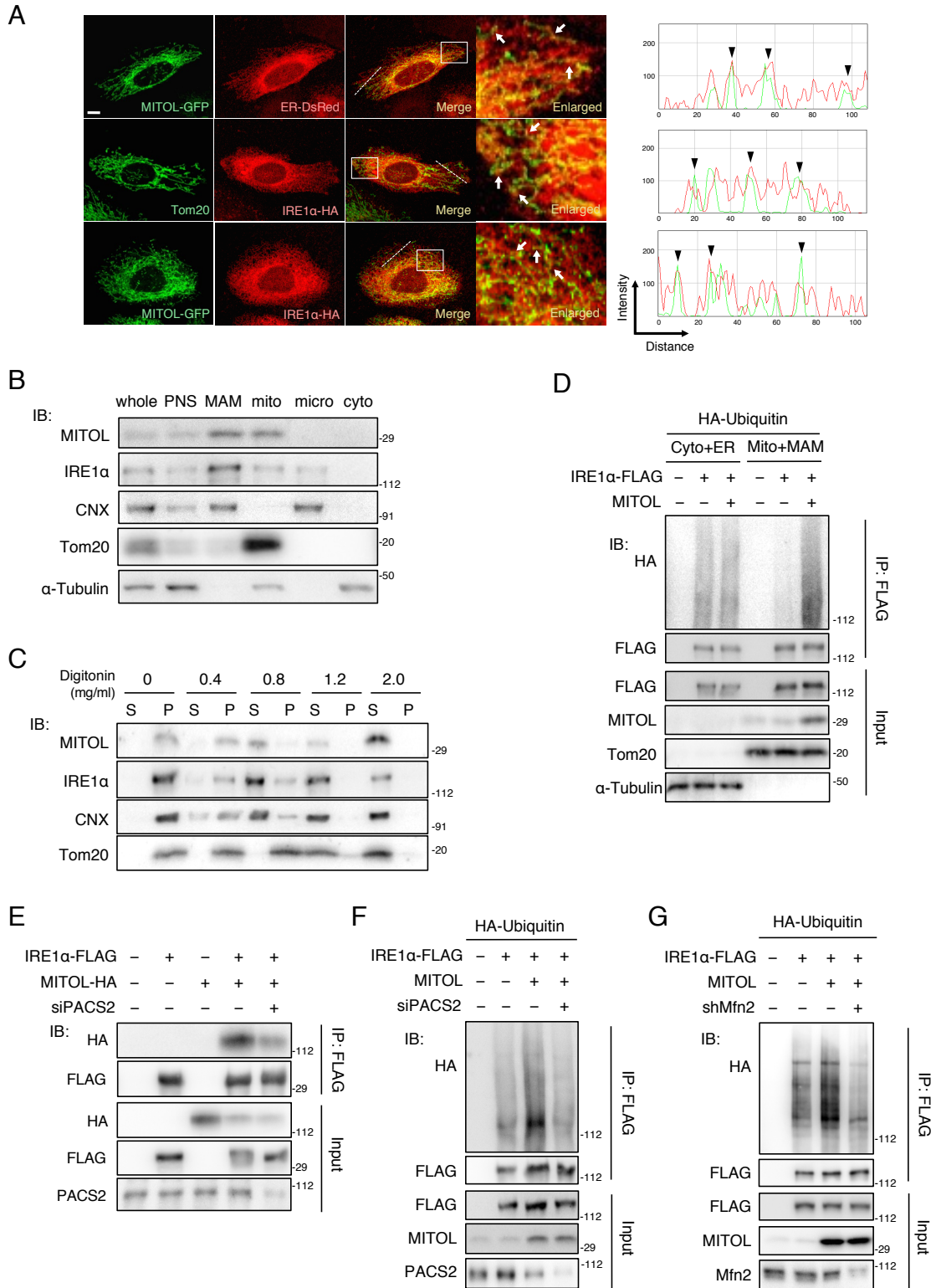
MEFs は解析の 24 時間前に示されたベクターと DsRed-ER を遺伝子導入される。下のパネルは四角領域の高倍率画像を示す。矢頭は異常凝集した小胞体領域を示す。異常形態な小胞体を持つ細胞の割合は、独立した各々の実験について 100 細胞を解析し計算する。スケールバー; 10 $\mu$ m。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。\*\*; p<0.01 student's t test。

## 2-11. MITOL による IRE1 $\alpha$ のユビキチン化は MAM に依存する

近年、IRE1 $\alpha$  および MITOL は MAM に豊富に存在することが報告された(Mori et al., 2013; Sugiura et al., 2013)。私は最初に、IRE1 $\alpha$  や MITOL が MAM に局在することを再確認した。タグ付けされた MITOL はミトコンドリア様の構造を示すものの、一部において小胞体との共局在を示した(Figure 11A)。また HA タグを付加した IRE1 $\alpha$  は小胞体様の構造を示すものの、一部においてミトコンドリアとの共局在を示した(Figure 11A)。同様に、MITOL と IRE1 $\alpha$  もまた一部において共局在した(Figure 11A)。さらに、Percoll 密度勾配遠心法によって精製された MAM 画分には、内在性の MITOL と IRE1 $\alpha$  が豊富に存在することを示した(Figure 11B)。遠心分離による細胞分画法によって採取された粗ミトコンドリア画分は MAM とミトコンドリアの混在画分である。MAM はコレステロールに富んだユニークな膜構造であるため、低濃度の Digitonin によって優先的に可溶化される。粗ミトコンドリア画分に 0.8mg/ml の Digitonin を処理したところ、IRE1 $\alpha$  と MITOL は小胞体マーカーである CNX と同様に可溶化され、一方で、ミトコンドリア外膜マーカーである Tom20 は沈殿物として検出された(Figures 11C)。それらの結果は、IRE1 $\alpha$  と MITOL が MAM においても多く局在することを示している。

次に私は MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化における MAM の必要性を調べた。MITOL の過剰発現は、小胞体を含む粗細胞質画分ではなく、MAM を含む粗ミトコンドリア画分においてのみ IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を亢進させた(Figure 11D)。PACS2 は最初に同定された MAM 形成に関わる分子であり、PACS2 のノックダウンは小胞体とミトコンドリアを解離させる(Simmen et al., 2005)。MITOL と IRE1 $\alpha$  の結合は PACS2 の発現抑制によって阻害された(Figure 11E)。同様に、MITOL 媒介性の IRE1 $\alpha$  ユビキチン化もまた siPACS2 によって減弱した(Figure 11F)。加えて、小胞体-ミトコンドリア接触の他の架橋因子である Mfn2 のノックダウンもまた MITOL 媒介性の IRE1 $\alpha$  ユビキチン化を抑制した(Figure 11G)。これらの結果は、MITOL による IRE1 $\alpha$  の基質認識は MAM に依存して行われることを示唆している。

**Figure 11**



## Figure 11. MITOL は MAM 依存的に IRE1 $\alpha$ を基質認識する

(A) MITOL と IRE1 $\alpha$  は共局在する。図に示すベクターを遺伝子導入された HeLa 細胞は anti-HA 抗体、または anti-Tom20 抗体によって免疫染色される。右図は四角領域の高倍率画像を示す。矢印は共局在する部位を示す。白破線の蛍光強度プロファイルは ImageJ によって解析される。屋頭はラインプロファイルにおける共局在部位を示す。

(B) MITOL と IRE1 $\alpha$  は MAM に局在する。それぞれのオルガネラ分画は Percoll 密度勾配遠心法によって MEFs から単離され、各抗体を用いたウエスタンブロットによって解析される。mito: Mitochondria。micro: Microsome。cyto: Cytosol。

(C) MITOL と IRE1 $\alpha$  は粗ミトコンドリア分画において高い Digitonin 溶解性を示す。粗ミトコンドリア分画は MEFs から単離された。粗ミトコンドリア分画における MAM を含むラフト様構造は図に示す各濃度の Digitonin を用いて可溶化した。S: Supernatant。P: Pellet。

(D) MITOL による IRE1 $\alpha$  ユビキチン化は粗ミトコンドリア分画において起こる。図に示す各ベクターを遺伝子導入した HEK293 細胞から MAM を含む粗ミトコンドリア分画(Mito+MAM)と ER を含む粗サイトゾル分画(Cyto+ER)を単離し、免疫沈降法を行った。図に示す各抗体を用いたウエスタンブロットによって検出した。

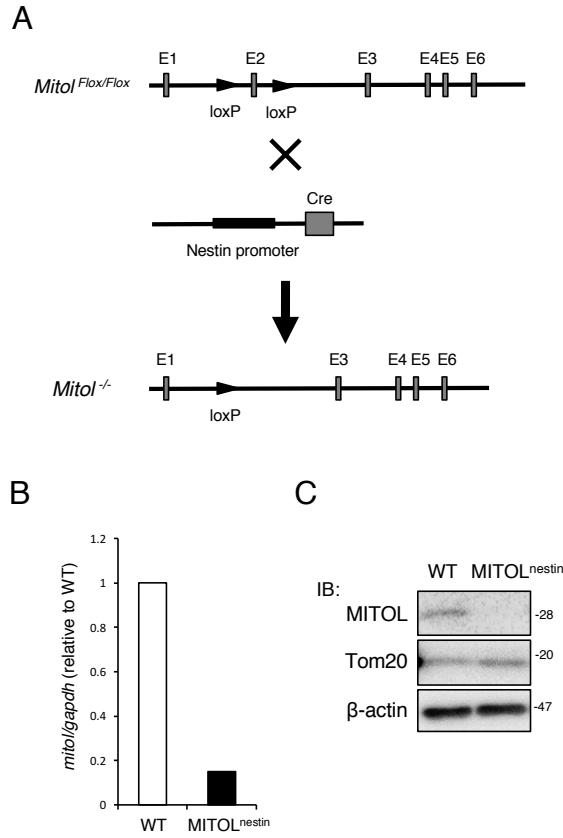
(E) PACS2 の発現抑制は MITOL と IRE1 $\alpha$  の結合を障害する。免疫沈降実験の 24 時間前に HEK293 細胞は PACS2 を標的とした siRNA を遺伝子導入される。その後、各抗体を用いたウエスタンブロットによって検出した。

(F and G) PACS2 または Mfn2 の発現抑制は MITOL による IRE1 $\alpha$  ユビキチン化を抑制する。免疫沈降実験の 24 時間前に HEK293 細胞は PACS2 を標的とした siRNA、または Mfn2 を標的とした shRNA を遺伝子導入される。その後、各抗体を用いたウエスタンブロットによって検出した。

## 2-12. 神経特異的 MITOL 欠損マウスの樹立

MITOL による IRE1 $\alpha$  の活性制御の生理的意義を追求するため、私は Nestin プロモーター依存的に発現する Cre を用いて神経特異的に MITOL を欠損した MITOL<sup>nestin</sup> を作製した(Figure 12A)。MITOL<sup>nestin</sup> の脊髄において MITOL の mRNA とタンパク質量は著しく減少しており(Figure 12B, 12C)、神経系にて MITOL が欠失していることが確認された。

Figure 12





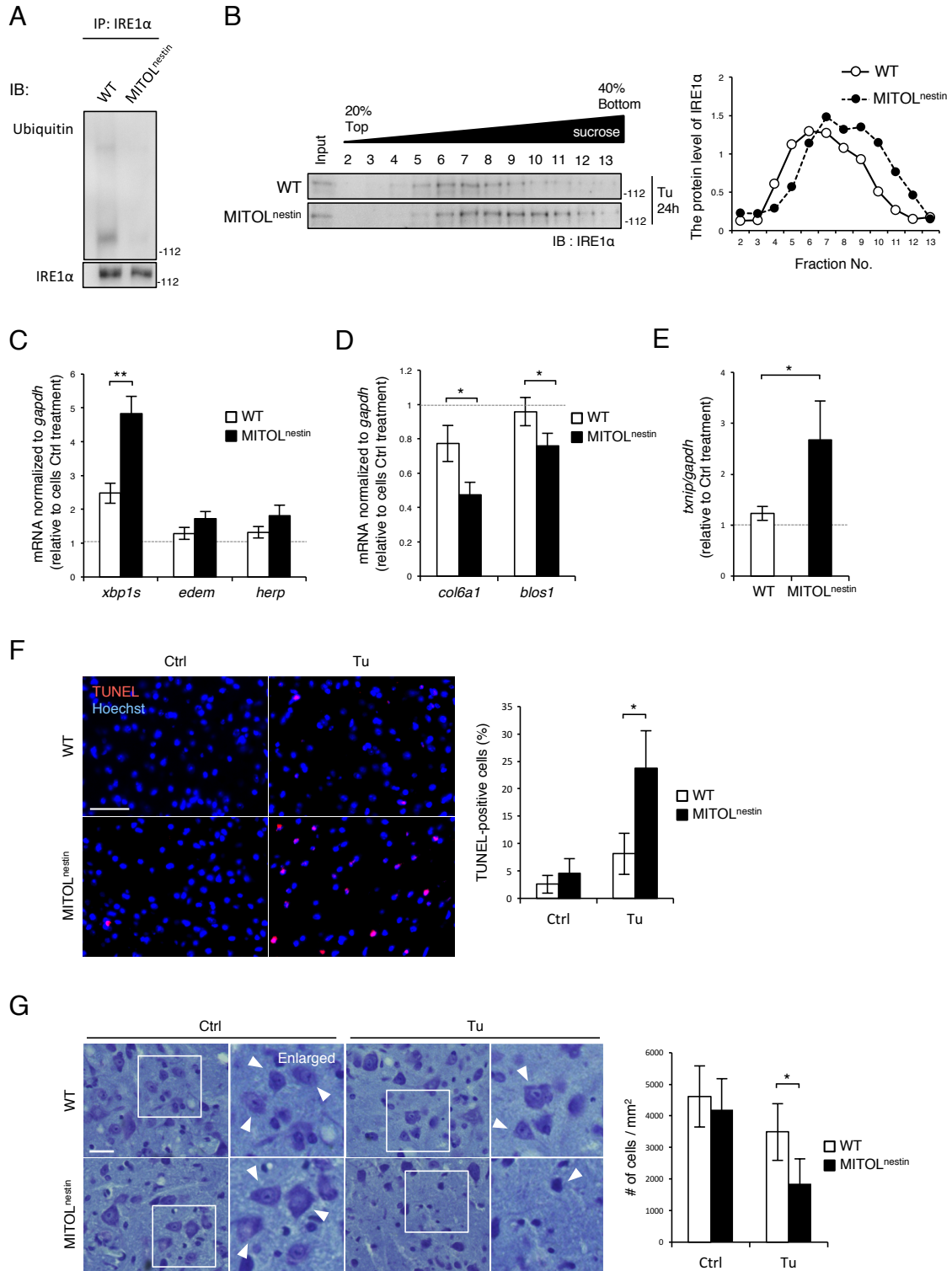
## Figure 12. Nestin-Cre を用いた MITOL 欠損マウスの作製

(A to C) 神経系特異的 MITOL 欠損マウスの樹立。 *mitol/march5* 遺伝子のエクソン 2 を挟み込む形で LoxP 配列は挿入される(MITOL<sup>Flox/Flox</sup>)。それらのマウスを Nestin-Cre トランスジェニックマウスと交配することで、神経系特異的な MITOL 欠損マウスを樹立した(A)。マウス脊髄における MITOL のタンパク質量と mRNA 量について定量的 RT-PCR とウエスタンブロットにより解析した(B and C)。

## 2-13. MITOL は脊髄において IRE1 $\alpha$ の過剰活性化とアポトーシス誘導を抑制する

MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化がマウス脊髄において再確認されたので (Figure 13A)、さらに私は Tunicamycin の腹腔内投与によって、MITOL<sup>nestin</sup> を用いた小胞体ストレスモデルマウスの作製を試みた。スクロース密度勾配遠心法より、Tunicamycin の投与から 24 時間後の MITOL<sup>nestin</sup> では WT マウスと比較して、IRE1 $\alpha$  のオリゴマー化が増加した (Figure 13B)。また MITOL<sup>nestin</sup> の脊髄では、Tunicamycin 刺激に伴って IRE1 $\alpha$  依存的な *xbp1* mRNA のスプライスとその下流遺伝子群の発現が増大し、対照的に IRE1 $\alpha$  依存的な mRNA 分解の標的遺伝子の発現は低下した (Figure 13C, 13D)。MEFs の実験結果と一貫して、MITOL<sup>nestin</sup> の脊髄では TXNIP の mRNA 量が増加した (Figure 13E)。さらに、Tunicamycin 投与から 48 時間後、MITOL<sup>nestin</sup> の脊髄では、WT マウスと比較して TUNEL 陽性細胞が顕著に増加し、また神経細胞数が有意に減少した (Figure 13F, 13G)。これらの結果は、MITOL 欠損 MEFs と同様に、脊髄においても MITOL は IRE1 $\alpha$  の過剰活性化とそれを原因とした細胞死を抑制できることを示している。

**Figure 13**



**Figure 13. 脊髄における MITOL 欠損は IRE1 $\alpha$  の過剰な活性化と細胞死を引き起こす**

(A) 脊髄において MITOL は IRE1 $\alpha$  をユビキチン化する。マウス脊髄のライセートは anti-IRE1 $\alpha$  抗体によって免疫沈降され、各抗体を用いたウエスタンブロットによって検出される。

(B to E) 脊髄において MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$  の過剰活性化を引き起こす。2ヶ月齢のマウスは 1mg/kg Tu を腹腔内投与される。24 時間後、マウス脊髄のライセートはスクロース密度勾配遠心法によって分離され、各分画は anti-IRE1 $\alpha$  抗体を用いたウエスタンブロットによって検出される(B)。また、マウス脊髄における mRNA 発現量は定量的 RT-PCR によって解析される(C to E)。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。\*\*; p<0.01 student's t test。

(F and G) 脊髄において MITOL の欠損は小胞体ストレス脆弱性の原因となる。Tu を 24 時間投与された 2ヶ月齢マウスの脊髄は TdT-mediated d UTP nick end labeling (TUNEL)と Hoechst によって染色される(F)。また Cresyl violet によって染色される(G)。右のパネルは四角領域の高倍率画像を示す。スケールバー; 50 $\mu$ m (F), 20 $\mu$ m (G)。エラーバー; 平均 $\pm$ S.D. (n=3)。\*; p<0.05 student's t test。

MITOL は IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を介して  
小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制する

### 第3章 考察

### 3-1. 結論

ここで私は、MITOLの欠損が小胞体の形態異常を誘発する観察結果に基づき、MITOLのミトコンドリア恒常性維持機能とは独立した、小胞体恒常性維持における新機能を探索した。その結果、UPRのキーセンサーであるIRE1 $\alpha$ をMITOLの新規基質として同定した。MITOLはMAMを足場としてIRE1 $\alpha$ と結合し、K63結合型のポリユビキチン鎖を用いてIRE1 $\alpha$ を修飾する。そのため、MITOLはIRE1 $\alpha$ の分解の誘導でなく、過剰活性化の抑制に寄与している。実際にMITOLの欠損は、小胞体ストレス下におけるIRE1 $\alpha$ の過剰なオリゴマー化と活性化の原因となり、RIDD依存的なアポトーシスを促進させた。またMITOLによるIRE1 $\alpha$ のユビキチン化はIRE1 $\alpha$  K481にて媒介されていることを明らかとした。MITOLの欠損と一貫して、IRE1 $\alpha$  K481R変異体の過剰発現もまたIRE1 $\alpha$ の過剰活性化とアポトーシスを引き起こした。MITOLによるIRE1 $\alpha$ の抑制とアポトーシス抑制機能はマウス脊髄においても確認された。重要なことに、MITOLは不活性化型のIRE1 $\alpha$ を優先的にユビキチン化するため、小胞体ストレスの持続にしたがって、IRE1 $\alpha$ のユビキチン化は減衰する。そのため、解消不可能な小胞体ストレスでは、MITOL-IRE1 $\alpha$ の関係性が破綻することでUPRの細胞死シグナルが惹起されると想定される(図1)。私の結果は、ミトコンドリアが小胞体との接触場を介することで、IRE1 $\alpha$ のシグナルを直接制御できるという新しい概念を提示する。この概念は、小胞体ストレス下における細胞運命の決定は小胞体のみならず、ミトコンドリアもまた大きく方向付けられることを示しており、両オルガネラ接触の機能的な変化が細胞運命の決定に寄与していると考えられる。

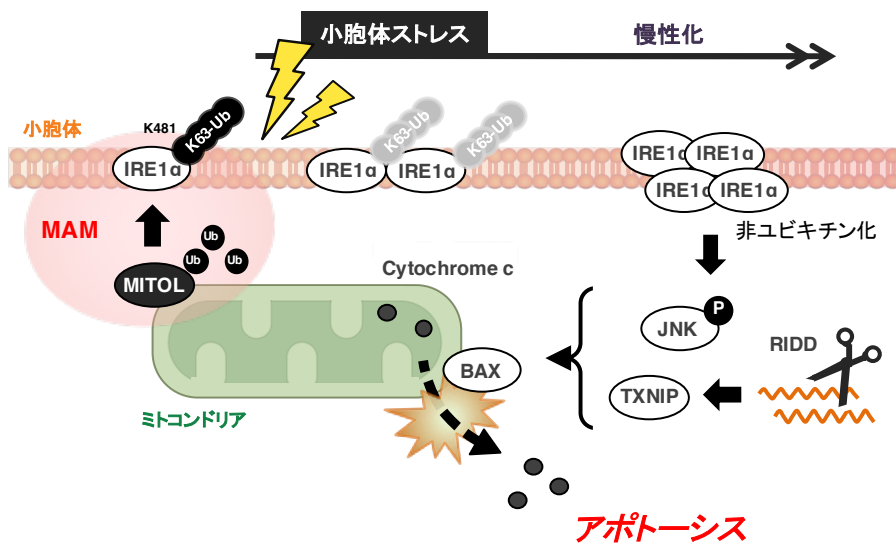


図3-1. MITOLによるIRE1 $\alpha$ の制御機構

### 3-2. MITOL による IRE1 $\alpha$ のユビキチン化と活性制御

IRE1 $\alpha$  は小胞体ストレス下における細胞適応と細胞死を決定できる重要なセンサータンパク質である。最近の報告では、細胞適応を誘導する *xbp1* mRNA のスプライスは IRE1 $\alpha$  の Dimer フォームが構造学的に最適であることが示された(Zhou et al., 2006)。一方で、IRE1 $\alpha$  の過剰なオリゴマー化は IRE1 $\alpha$  による基質認識を広げ、*xbp1* mRNA のみならず、多種多様な mRNA, miRNA を分解することを可能とする(Ghosh et al., 2014)。この RIDD は IRE1 $\alpha$  によるアポトーシス誘導に関与することが示唆されている。また IRE1 $\alpha$  は TRAF2 をアダプターとして ASK をリン酸化し、JNK 依存的なアポトーシスも引き起こす(Nishitoh et al., 2002)。ここで私は、IRE1 $\alpha$  の新規制御分子として MITOL を同定した(Figure 7)。MITOL は IRE1 $\alpha$  に K63 結合型ポリユビキチン鎖を付加することで、IRE1 $\alpha$  の過剰なオリゴマー化と活性化を抑制した(Figure 2 to 7)。これまでに IRE1 $\alpha$  が HRD1 や TRAF6 によってユビキチン化および分解されることは知られていたが(Qiu et al., 2013; Sun et al., 2015)、K63 結合型ポリユビキチン鎖による活性制御の報告は初めてとなる。いくつかの報告によって IRE1 $\alpha$  のオリゴマーが BIM を含む Bcl-2 ファミリータンパク質との直接的な結合によって安定化されることが示されている(Woehbier and Hetz, 2011; Rodriguez et al., 2012)。MITOL の欠損は IRE1 $\alpha$  と Bcl-2 ファミリータンパク質との結合を増加させることで IRE1 $\alpha$  オリゴマーを安定化する可能性も十分考えられるので、今後詳細な解析を試みたい。

### 3-3. 小胞体ストレス下における MAM の動的な機能変化

これまでに小胞体とミトコンドリアは直接的な膜接触することによって、機能的に協調することが知られていた。実際に、脂質やカルシウムは MAM を介して、小胞体-ミトコンドリア間を相互輸送されることが明らかとなっている(Raturi and Simmen, 2013)。また MAM は脂質ラフトに富んだ膜領域であるため、シグナル調節の足場として機能すると考えられ、これまでに炎症反応やオートファジー誘発のための足場として働くことも示されている(Hamasaki et al., 2013; Horner et al., 2015; Zhou et al., 2011)。しかしながら、生理的または病的な条件下における MAM の機能的な影響について不明瞭な部分が多く残されている。近年、小胞体ストレス下において MAM が増加することが報告された(Csordas et al., 2006)。加えて、UPR センサーである PERK や IRE1 $\alpha$  は MAM に局在することで、小胞体からミトコンドリアへのカルシウム過剰流入を引き起こし、小胞体ストレス依存的なアポトーシス誘導に貢献することも示唆されている(Son et al., 2014; Verfaillie et al., 2012)。他の報告では、小胞体タンパク質 CDIP1 とミトコンドリアタンパク質 BAP31 による複合体形成が小胞体-ミトコンドリア間におけるアポトーシスシグナルの伝達に重要であることも提唱されてい

る(Namba et al., 2013)。これらの発見は、ミトコンドリアのカルシウム貯蔵能が終末期の小胞体ストレスにおける運命決定に関与できることを示している。一方で、アポトーシスシグナルがミトコンドリアへ伝達する前段階である早期の小胞体ストレスにおいて、ミトコンドリアのもつ役割は殆ど特徴づけされていない。重要なことに、この研究にて発見した MITOL による IRE1 $\alpha$  の K63 結合型ユビキチン化は MAM に依存する (Figure 11)。実際に、小胞体-ミトコンドリア間の繫留因子である PACS や Mfn2 の発現抑制は MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を減弱させた。そのため、小胞体ストレスにおける MAM は、ミトコンドリアへのカルシウム過剰流入を介したアポトーシス誘導のみならず、IRE1 $\alpha$  の過剰活性化を直接的に抑制し、結果として細胞生存にも機能することが示唆される。注目すべきことに、MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化は基底状態においても観察されるが、反対に小胞体ストレスの慢性化したことによって低下した(Figure 8)。これらの発見を踏まえると、小胞体ストレスに応じて MAM の機能は動的に変化しており、不可避な小胞体ストレスにおいて MITOL- IRE1 $\alpha$  の関係性の減弱が細胞死の引き金となると想定される。実際に、基底状態や早期の小胞体ストレスにおける MAM 形成はミトコンドリアへのカルシウム流入を許すものの、細胞死に至る致命的な過剰流入を引き起こしていない。さらに、MITOL による IRE1 $\alpha$  のユビキチン化は保たれており、IRE1 $\alpha$  の過剰なオリゴマー化と活性化は抑制されている。しかしながら、小胞体ストレスが慢性化すると、MITOL による IRE1 $\alpha$  の抑制機構が破綻した結果、IRE1 $\alpha$  依存的なミトコンドリアへのカルシウム過剰流入と IRE1 $\alpha$  の Bifunctional な活性によって迅速にアポトーシスが誘導されると仮説立てられる。これまでは小胞体ストレスにおける二つのアウトプット、細胞適応と細胞死の切り替えについてあまり分子理解がされていなかった。外因性アポトーシスの受容体である Death receptor 5 (DR5) の細胞内発現はその切り替えについて中心的な役割を担うことが報告されたが(Lu et al., 2014)、私の MEFs を用いた実験系では DR5 の顕著な増減は認められなかった(Date not shown)。そのため、MAM は DR5 とは独立して二つのアウトプットを切り替える新しい制御機構かもしれない。しかしながら、この仮説を実証するためには、MAM に着目した更なる研究が必要である。

### 3-4. 疾患における MITOL-IRE1 $\alpha$ 相互作用の役割

慢性的な小胞体ストレスによる細胞死の誘導は癌や心不全、糖尿病や神経変性疾患など多様なヒト疾患の原因となる(Yoshida, 2007)。ALS の患者およびモデルマウスでは小胞体の断片化や不均一な膨潤が観察されるため、小胞体ストレスとの関連が示唆されている(Dal Canto and Gurney, 1995; Lautenschlaeger et al., 2012; Oyanagi et al., 2008)。興味深いことに、ALS において発症に先立って IRE1 $\alpha$  のタンパク質量が増加する(Atkin et al., 2006; Atkin et al., 2008)。そのため、ALS では IRE1 $\alpha$  の過剰活性化に



よるアポトーシスが生じやすいと予想できる。私はこの研究において MITOL による IRE1 $\alpha$  の抑制機構が脊髄の神経細胞においても機能することを明らかとした(Figure 13)。重要なことに、IRE1 $\alpha$  の RNase 活性化は MITOL による K63 ユビキチン化を不明な機序によって減少させる(Figure 8)。そのため、ALS において IRE1 $\alpha$ -MITOL 経路が負に制御された結果、IRE1 $\alpha$  の過剰活性化と神経細胞死を許すと想定できる。私は不可避な小胞体ストレスにおける IRE1 $\alpha$ -MITOL 軸の下方制御について詳細な分子機序解明を試みている。この下方制御の阻害剤、または IRE1 $\alpha$ -MITOL 軸の活性化剤の開発は、ALS をはじめとした小胞体ストレス関連疾患の新しい治療戦略を提供するだろう。

**MITOL は IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を介して  
小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制する**

#### **第 4 章 実験操作・試薬**

#### 4-1. 抗体と試薬

ウサギポリクローナルの anti-MITOL 抗体は以前に述べた詳細にて作製された。anti- $\alpha$ -tubulin, anti- $\beta$ -actin, anti-FLAG-M2 抗体は Sigma から購入した。anti-Cleaved Caspase-3, anti-Cleaved PARP, anti-IRE1 $\alpha$ , anti-PHB1, anti-SAPK/JNK, anti-pSAPK/JNK (Thr183/Tyr185), anti-pPERK(Thr980)抗体は Cell Signaling Technology から購入した。anti-Cytochrome C, anti-DLP1 抗体は BD Biosciences から購入した。anti-Mfn2, anti-Tom20, anti-Calnexin, anti-BAX, anti-ATF6 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。anti-Ubiquitin, anti-GFP 抗体は MBL から購入した。anti-HA 抗体は COVANCE から購入した。anti-PACS2 抗体は Proteintech から購入した。Tunicamycin は Wako から購入された。Brefeldin A は Focus Biomoleculs から購入された。Thapsigargin は Nakalai から購入された。CHX と 4-OHT は Sigma から購入された。4 $\mu$ 8c は Millipore から購入された。APY29 は ChemScene から購入された。KIRA6 は Cayman Chemical から購入された。JNK inhibitor II は CALBIOCHEM から購入された。

#### 4-2. DNA コンストラクト

MITOL やユビキチンの変異体発現ベクターは以前述べたように作製された(Sugiura et al., 2013)。IRE1 $\alpha$ -FLAG 発現ベクターは IRE1 alpha-pcDNA3.EGFP(Addgene より購入)をテンプレートとしたサブクローニングによって獲得された。IRE1 $\alpha$  の点変異は site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて作製された。IRE1 $\alpha$ -GFP 発現ベクターは以前に述べたものと同様に作製された(Li et al., 2010)。

#### 4-3. 細胞培養と遺伝子導入

MEFs や HEK293T 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS)と Penicillin/Streptomycin を加えた Delbecco's modified Eagle's medium (DMEM)にて培養される。細胞は Lippofectamin 3000 (Invitrogen)または RNAiMax (Invitrogen)を用いてメーカープロトコールに則って遺伝子導入する。siRNA は以下のものを使用した。siIRE1 $\alpha$  #1; sense, 5'-GAGGAUAUUCUCAGGCUUCAGGUCCUUTT-3', antisense, 5'-UUUAAAGUCCACUUGAUGGAGCCCGTT-3', siIRE1 $\alpha$  #2 ; sense, 5'-AAGAUGGACUGGCGGGAGATT-3', antisense, 5'-UCUCCCGCCAGUCCAUCUUTT-3', and siPACS2; sense, 5'-AACACGCCCGUGCCCAUGAACTT-3', antisense, 5'-GUUCAUGGGCACGGGGGUGUUTT-3'。siXBP1 と siTXNIP は Qiagen より購入された。

#### 4-4. 細胞分画法

精製された MAM 分画は以前に述べたように粗ミトコンドリア分画から単離される (Sugiura et al., 2013)。

#### 4-5. RNA 単離と定量的 RT-PCR

RNA は哺乳類細胞より RNeasy kit (Qiagen)を用いて単離され、ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO)を用いて cDNA へ逆転写される。PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いて行われる。PCR の条件を以下に示す。95°Cにて 1 分間 インキュベートした後、95°Cを 15 秒、60°Cを 30 秒、72°Cを 60 秒のインキュベート時間を 40 サイクル繰り返す。またプライマーは以下を使用した。ATF4 ; forward, 5'-GGACAGATTGGATGTTGGAGAAAATG-3', reverse, 5'-GGAGATGGCCAATTGGGTTTCAC-3', CHOP ; forward, 5'-CATACACCACCACACCTGAAAG-3', reverse, 5'-CCGTTTCCTAGTTCTTCCTTGC-3', 18S rRNA ; forward, 5'-GTGGAGCGATTTGTCTGGTT-3', reverse, 5'-CAAGCTTATGACCCGCACTT-3', Xbp1s ; forward, 5'-GTGTCAGAGTCCATGGGA-3', reverse, 5'-GAGTCCGCAGCAGGTG-3', Edem ; forward, 5'-AAGCCCTCTGGAACCTTGCG-3', reverse, 5'-AACCCAATGGCCTGTCTGG-3', Sec61 ; forward, 5'-CTATTTCCAGGGCTTCCGAGT-3', reverse, 5'-AGGTGTTGTACTGGCCTCGGT-3', Herp ; forward, 5'-CATGTACCTGCACCACGTCG-3', reverse, 5'-GAGGACCACCATCATCCGG-3', Col6a1 ; forward, 5'-TGCTCAACATGAAGCAGACC-3', reverse, 5'-TTGAGGGAGAAAGCTCTGGA-3', Blos1 ; forward, 5'-CAAGGAGCTGCAGGAGAAGA-3', reverse, 5'-GCCTGGTTGAAGTTCTCCAC-3', Hgsnat ; forward, 5'-TCTCCGCTTTCTCCATTTTG-3', reverse, 5'-CGCATAACACGTGGAAAGTCA-3', Pdgfrp ; forward, 5'-AACCCCTTACAGCTGTCCT-3', reverse, 5'-TAATCCCGTCAGCATCTTCC-3', Txnip ; forward, 5'-TCAAGGGCCCCTGGGAACATC-3', reverse, 5'-GACACTGGTGCCATTAAGTCAG-3', and Gapdh ; forward, 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3', reverse, 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'.

#### 4-6. Digitonin 処理

コレステロール含有脂質を MAM から抽出するため、100 $\mu$ g の粗ミトコンドリアは 10 分間、示された終濃度の Digitonin にて氷上インキュベートされる。8000 $\times$ g にて延伸した後、上清と沈殿はウエスタンブロットによって解析される。

#### 4-7. 免疫沈降

タンパク質の結合を解析するため、細胞は NP-40 lysis buffer (1% NP-40, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaF, and protease inhibitors)によって可溶化され、15000 rpm にて 20 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心される。上清は示された抗体を用いて免疫沈降される。タンパク質のユビキチン化を評価するため、細胞は RIPA lysis buffer (0.1% SDS, 0.05% DOC, 1% TritonX-100, 10mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, and protease inhibitors)によって可溶化され、15000 rpm にて 20 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心される。上清は示された抗体を用いて免疫沈降される。

#### 4-8. 免疫ブロットと Phos-tag SDS-PAGE

SDS-PAGE によって分離された全ライセートは PVDF 膜 (Millipor)へ転写される。ブロットは示された抗体と反応させられ、タンパク質バンドは enhanced chemiluminescence reganet (Millipore)によって可視化される。Phos-tag SDS-PAGE は 10 $\mu$ M Phos-tag (Wako)と 100 $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>を用いて行われた。

#### 4-9. 免疫蛍光染色

細胞は PBS によって希釈された 4% Paraformaldehyde によって 20 分間固定される。そして、PBS にて 2 回洗浄され、PBS にて希釈された 0.1% Triton X-100 によって 15 分間処理される。2 回 PBS にて洗浄され、PBS にて希釈された 1% Bovine Serum Albumin によってブロッキングされる。染色のため、細胞は示された一次抗体と共に 1 時間インキュベートされる。PBS によって 3 回洗浄された後、二次抗体と 30 分間インキュベートされる。サンプルは Flourescent Mounting Medium (Dako)によって封入され、Olympus IX81 共焦点顕微鏡によって解析される。これらは全て室温にて行われる。

#### 4-10. 免疫化学染色

脊髄は 10% formalin neutral buffer solution (Wako)によって固定され、5 $\mu$ m の厚さにパラフィン切片として準備される。TUNEL 染色は In Situ Cell Death Detection Kit (Roche)によって行われる。Nissl 染色は 0.5% cresyl violet によって行われる。切片は All-in-one Fluorescence microscope BZ-9000 によって観察される。

#### 4-11. スクロース密度勾配遠心法

スクロース密度勾配遠心法は以前にも述べられた手法にて行われる(He et al., 2012)。簡単に述べると、Tunicamycin を 4 時間処理した細胞、または Tunicamycin 投与から 24 時間経過したマウスは NP-40 lysis buffer によって氷上にて可溶化され、15000 rpm にて 20 分間遠心される。上清は 50000 rpm にて 12 時間、4°C で 20%-40% のスクロース勾配液(150 mM NaCl, 1mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7.4, and protease inhibitors)によって遠心される。4mL の勾配液は 250 $\mu$ L ずつ 16 フラクションに分配され、ウエスタンブロットによって解析される。

#### 4-12. マウス

MITOL<sup>Flox/Flox</sup> マウスは Nestin-Cre トランスジェニックマウスと交配させられる。Genotype は 21 日齢マウスの尾を用いて確認される。Genotype の確認にはプライマー #1, 5' - CAC AGG TAC GGT AGG TGT GTA AGC - 3', and primer #2, 5' - ATG GGA ATG TGG TTC AGT TGT ACC - 3'を用いる。全ての動物は大学のガイドラインに沿って維持されている。脊髄における小胞体ストレス誘導のため、3 ヶ月齢マウスは生理食塩水にて希釈された DMSO または 1mg/kg Tunicamycin を腹腔内投与される。

#### 4-13. フローサイトメトリー

Annecin-V-FITC 染色は Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BioVision)のメーカープロトコールに沿って行われる。ミトコンドリア脱分極の検出のため、細胞は 10nM Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM)によって 30 分間、37°C にて染色される。細胞は PBS で洗浄され、TMRM の蛍光は flow cytometer (Beckman Dickinson)によって解析される。

#### **4-14. Dual-luciferase reporter アッセイ**

ルシフェラーゼアッセイは dual-luciferase reporter assay system (Promega)のメーカープロトコールに沿って行われた。

#### **4-15. Cell viability アッセイ**

細胞生存率は Cell Counting kit-8 (dojido)によって観測される。

MITOL は IRE1 $\alpha$  のユビキチン化を介して  
小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制する

第 5 章 参考論文



Arasaki, K., Shimizu, H., Mogari, H., Nishida, N., Hirota, N., Furuno, A., Kudo, Y., Baba, M., Baba, N., Cheng, J., et al. (2015). A role for the ancient SNARE syntaxin 17 in regulating mitochondrial division. *Dev Cell* 32, 304-317.

Atkin, J.D., Farg, M.A., Turner, B.J., Tomas, D., Lysaght, J.A., Nunan, J., Rembach, A., Nagley, P., Beart, P.M., Cheema, S.S., et al. (2006). Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem* 281, 30152-30165.

Atkin, J.D., Farg, M.A., Walker, A.K., McLean, C., Tomas, D., and Horne, M.K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 30, 400-407.

Cherok, E., Xu, S., Li, S., Das, S., Meltzer, W.A., Zalzman, M., Wang, C., and Karbowski, M. (2017). Novel regulatory roles of Mff and Drp1 in E3 ubiquitin ligase MARCH5-dependent degradation of MiD49 and McI1 and control of mitochondrial dynamics. *Mol Biol Cell* 28, 396-410.

Csordas, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnoczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* 174, 915-921.

Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1995). Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* 676, 25-40.

Gardner, B.M., and Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 333, 1891-1894.

de Brito OM., Scorrano L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605-610.

Galehdar Z., Swan P., Fuerth B., Callaghan SM., Park DS., Cregan SP. (2010). Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci* 30, 16938-16948

Ghosh, R., Wang, L., Wang, E.S., Perera, B.G., Igarria, A., Morita, S., Prado, K., Thamsen, M., Caswell, D., Macias, H., et al. (2014). Allosteric inhibition of the IRE1alpha RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell* 158, 534-548.

Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389-393.

He, Y., Beatty, A., Han, X., Ji, Y., Ma, X., Adelstein, R.S., Yates, J.R., 3rd, Kempfues, K., and Qi, L. (2012). Nonmuscle myosin IIB links cytoskeleton to IRE1alpha signaling during ER stress. *Dev Cell* 23, 1141-1152.

He, Y., Sun, S., Sha, H., Liu, Z., Yang, L., Xue, Z., Chen, H., and Qi, L. (2010). Emerging roles for XBP1, a sUPER transcription factor. *Gene Expr* 15, 13-25.

Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol* 186, 323-331.

Horner, S.M., Wilkins, C., Badil, S., Iskarpatyoti, J., and Gale, M., Jr. (2015). Proteomic analysis of mitochondrial-associated ER membranes (MAM) during RNA virus infection reveals dynamic changes in protein and organelle trafficking. *PLoS ONE* 10, e0117963.

Kimata, Y., Kimata, Y.I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I.C., Takeuchi, M., Rose, M.D., and Kohno, K. (2003). Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell* 14, 2559-2569.

Lautenschlaeger, J., Prell, T., and Grosskreutz, J. (2012). Endoplasmic reticulum stress and the ER mitochondrial calcium cycle in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 13, 166-177.

Lerner, A.G., Upton, J.P., Praveen, P.V., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igarria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B.J., Heiman, M., et al. (2012). IRE1alpha induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab* 16, 250-264.

Li, H., Korennykh, A.V., Behrman, S.L., and Walter, P. (2010). Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 16113-16118.

Lu, M., Lawrence, D.A., Marsters, S., Acosta-Alvear, D., Kimmig, P., Mendez, A.S., Paton, A.W., Paton, J.C., Walter, P., and Ashkenazi, A. (2014). Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science* 345, 98-101.

Mori, T., Hayashi, T., Hayashi, E., and Su, T.P. (2013). Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. *PLoS ONE* 8, e76941.

Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315, 201-205.

Nagashima, S., Tokuyama, T., Yonashiro, R., Inatome, R., and Yanagi, S. (2014). Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases. *J Biochem* 155, 273-279.

Namba, T., Tian, F., Chu, K., Hwang, S.Y., Yoon, K.W., Byun, S., Hiraki, M., Mandinova, A., and Lee, S.W. (2013). CDIP1-BAP31 complex transduces apoptotic signals from endoplasmic reticulum to mitochondria under endoplasmic reticulum stress. *Cell Rep* 5, 331-339.

Naon D., Zaninello M., Giacomello M., Varanita T., Grespi F., Lakshminaranayan S., Serafini A., Semenzato M., Herkenne S., Hernández-Alvarez MI., Zorzano A., De Stefani D., Dorn GW 2nd., Scorrano L. (2016). Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 11249-11254.

Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16, 1345-1355.

Oyanagi, K., Yamazaki, M., Takahashi, H., Watabe, K., Wada, M., Komori, T., Morita, T., and Mizutani, T. (2008). Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34, 650-658.

Pickart, C.M., and Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8, 610-616.

Qiu, Q., Zheng, Z., Chang, L., Zhao, Y.S., Tan, C., Dandekar, A., Zhang, Z., Lin, Z., Gui, M., Li, X., et al. (2013). Toll-like receptor-mediated IRE1alpha activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis. *EMBO J* 32, 2477-2490.

Raturi, A., and Simmen, T. (2013). Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta* 1833, 213-224.

Reimertz C., Kögel D., Rami A., Chittenden T., Prehn JH. (2003). Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J cell Biol* 162, 587-597.

Rodriguez, D.A., Zamorano, S., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Urra, H., Cubillos-Ruiz, J.R., Armisen, R., Henriquez, D.R., Cheng, E.H., Letek, M., et al. (2012). BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE1alpha. *EMBO J* 31, 2322-2335.

Shore, G.C., Papa, F.R., and Oakes, S.A. (2011). Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol* 23, 143-149.

Simmen, T., Aslan, J.E., Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S.F., Hung, C.H., Crump, C.M., and Thomas, G. (2005). PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J* 24, 717-729.

Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H.M., Fukuda, T., Matsushita, N., et al. (2013). MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via mitofusin2. *Mol Cell* 51, 20-34.

Sun, S., Shi, G., Sha, H., Ji, Y., Han, X., Shu, X., Ma, H., Inoue, T., Gao, B., Kim, H., et al. (2015). IRE1alpha is an endogenous substrate of endoplasmic-reticulum-associated degradation. *Nat Cell Biol* 17, 1546-1555.

Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13, 184-190.

Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-666.

Verfaillie, T., Rubio, N., Garg, A.D., Bultynck, G., Rizzuto, R., Decuypere, J.P., Piette, J., Linehan, C., Gupta, S., Samali, A., et al. (2012). PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ* 19, 1880-1891.

Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., and Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* 17, 5708-5717.

Woehlbier, U., and Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends Biochem Sci* 36, 329-337.

Xu S, Cherok E, Das S, Li S, Roelofs BA, Ge SX, Polster BM, Boyman L, Lederer WJ, Wang C, Karbowski M. (2016). Mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 controls mitochondrial fission and cell sensitivity to stress-induced apoptosis through regulation of MiD49 protein. *Mol Biol Cell* 2, 349-359.

Yoo, Y.S., Park, Y.Y., Kim, J.H., Cho, H., Kim, S.H., Lee, H.S., Kim, T.H., Sun Kim, Y., Lee, Y., Kim, C.J. (2015). The mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 resolves MAVS aggregates during antiviral signalling. *Nat Commun* 6, 7910.

Yoshida, H. (2007). ER stress and diseases. *FEBS J* 274, 630-658.

Yonashiro R, Ishido S, Kyo S, Fukuda T, Goto E, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Sada K, Hotta H, Yamamura H, Inatome R, Yanagi S. (2006). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J* 15, 3618-3626.

Zhou, J., Liu, C.Y., Back, S.H., Clark, R.L., Peisach, D., Xu, Z., and Kaufman, R.J. (2006). The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization

interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 14343-14348.

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221-225.