

201008025A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）

アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬と  
その有効成分の同定

(H22-創薬総合-一般-009)

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 垣 塚 彰

平成23(2011)年5月

## 目 次

I. 総括研究報告-----	1
アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬とその 有効成分の同定 垣塚 彰	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	1 1
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	1 5

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）  
総括研究報告書

アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬とその有効成分の同定  
研究代表者 垣塚 彰 京都大学大学院生命科学研究科教授

## 研究要旨

本研究では、まず、アルツハイマー病発症の最初のイベントである A $\beta$  の産生を担う  $\gamma$ セクレターゼの活性を簡単に評価するアッセイ系を構築した。次に、このアッセイ系を用いて約 1600 種類の漢方薬エキスをスクリーニングし、 $\gamma$ セクレターゼの阻害活性をもつ数種類のエキスを同定した。その内の 1 つ、啤酒花に含まれる  $\gamma$ セクレターゼの阻害成分を約 2 mg 精製し、その分子量と構造を決定した。また、これらの物質のアルツハイマー病に対する発症予防・治療効果を判定するために、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子を発現させるトランスジェニックマウスの作製を行った。

### A. 研究目的

超高齢化社会に突入しつつある我が国では、アルツハイマー病に代表される認知症を患う患者の急激な増加が予想される。しかしながら、現在、有効な治療法が無いため、患者のみならず患者の家族を救う手段が無い。今十分な対応策を講じなければ、来るべき医療費と人的負担の膨大な増加は、我が国の存亡をも左右しかねない事態になる。一方、この状況は多くの先進国にも当てはまり、アルツハイマー病に対する有効な治療法の開発は、先進国に共通する重要課題である。特に世界でもっとも顕著な高齢化社会を迎えつつある我が国にとって、この分野の研究の推進ほど、緊急かつ重要な科学政策は無いとさえいえる。

本研究では、まず、千数百種類の漢方薬エキスをスクリーニングし、アル

ツハイマー病の主要な要因と考えられている A $\beta$  の産生を阻害する活性をもつ漢方薬エキスを同定すること、そして、それらの漢方薬エキに含まれる有効成分を精製し、構造決定を行うことを目的とする。さらに、新たなアルツハイマー病モデルマウスを樹立することを目的とする。

現在世界中で、A $\beta$  の産生を阻害する薬剤や A $\beta$  の排出を促進する薬剤の開発及び抗体を用いた治療法の開発に激しい競争が繰り広げられている。本研究で行う、漢方薬を用いてアルツハイマー病の進行の予防を目指す方法は、漢方薬を用いることでより安全性の高い治療法を提供できる可能性を持っている。即ち、本研究で目指している、少ない副作用で長期投与が可能なアルツハイマー病のリスクを軽減するという治療薬は、欧米で開発が

進められている治療薬とは、一線を描くものと考えている。

## B. 研究方法

### 1. $\gamma$ セクレターゼ活性を簡便に検出するアッセイ系の構築

アルツハイマー病の病因の最も上流に位置すると考えられているのが老人斑の主要構成成分である  $A\beta$  の産生である。 $A\beta$  は、その前駆体蛋白質である APP (amyloid precursor protein) の膜貫通近傍部分から  $\beta$ セクレターゼと  $\gamma$ セクレターゼの2つの蛋白質プロセシング酵素の働きで切り出される。遺伝性アルツハイマー病では、ほとんどの症例で  $A\beta$  (特に  $A\beta_{42}$ ) の産生亢進が観察され、アルツハイマー病の発症には、 $\gamma$ セクレターゼによる  $A\beta$  の APP からの切り出しが律速段階であると想定されている。

従来、 $\gamma$ セクレターゼ活性は、 $A\beta$  の C-末を認識する抗体を用いた ELISA 法によって産生された  $A\beta$  量を定量し、その量から推測する方法しかなかった。しかし、ELISA 法は非常にコストが高いため、 $\gamma$ セクレターゼ阻害物質のスクリーニングを行うには莫大な費用が必要であった。我々は、このコスト高という問題を解決するために、安価に  $\gamma$ セクレターゼ活性を評価するアッセイ系を構築した。このアッセイ系では、APP の C-末部位に非哺乳類の転写因子を接続し、その融合蛋白質を培養細胞に発現させた。 $\gamma$ セクレターゼによってこの融合蛋白質が切断を受けると C-末部位の転写因子が核内移行する。そこで、この転

写因子に応答して、ルシフェラーゼを発現するレポーターを用いることで、この転写因子の転写活性をモニターし、 $\gamma$ セクレターゼ活性の強さを評価するというアッセイ系である (特許準備中)。このアッセイ系によって、 $\gamma$ セクレターゼ活性の評価を高価な ELISA 法を用いることなく、非常に安価なルシフェラーゼ活性の測定で行えるようになった。

### 2. $\gamma$ セクレターゼ阻害活性を持つ漢方エキスのスクリーニング

アルツハイマー病に対する薬物治療・予防においては、かなりの長期間に渡って薬物投与を行う必要が想定される。したがって、いかに副作用の少ない治療薬を提供できるかが極めて重要となる。このような少ない副作用という点で、我々は漢方薬に代表される植物エキスに注目した。漢方薬は数百年から千年を超えてヒトに使われており、大幅に摂取量を間違わない限り安全であることが実証されている。アルツハイマー病は、食生活の欧米化と長寿によって顕在化してきた病気であり、実際、古来の中国での経験則からは、アルツハイマー病の治療・予防効果がある漢方薬という記載は無い。しかしながら、良いアッセイ系でスクリーニングを行えば、漢方薬に代表される植物エキスにアルツハイマー病に対する有効な成分を含むものが存在する可能性は十分に考えられる。

そこで、我々は、漢方薬の原料になっている植物エキス約 1600 種類に対し、上記のアッセイ系を用い、細胞が

持つ $\gamma$ セクレターゼ活性に対する阻害活性の評価を行った。我々のアッセイ系でルシフェラーゼ活性を下げたエキスに対しては、実際に A $\beta$  の産生が抑制されていることを ELISA 法によって確認を行った。

### 3. $\gamma$ セクレターゼ阻害活性を持つ漢方エキス成分の精製と構造決定

上記のスクリーニングによって $\gamma$ セクレターゼの阻害活性を認めたエキスの1つ、啤酒花（ヒシユカ）に対し、その主要活性成分の精製を行った。まず、Bligh Dyer 法で大まかに脂溶性分画と水溶性分画に分け、各分画に対して我々が開発したレポーターアッセイを行い、A $\beta$  の産生を阻害する活性を持つ分画の同定を行った。その結果、 $\gamma$ セクレターゼ阻害活性は脂溶性分画にあることが判明した。次にこの脂溶性分画を、固相抽出、5CN-MS という順相カラムによる HPLC、5C18-AR-II という逆相カラムを用いた HPLC でさらに分画し、各分画に対して同様にレポーターアッセイを行い、A $\beta$  の産生を阻害する活性を持つ分画の同定を行った。さらに、 $\gamma$ セクレターゼの阻害活性が存在する分画を $\pi$ -NAP という逆相カラムを用いた HPLC で分画した。この $\pi$ -NAP カラムを用いた HPLC を2度繰り返すことによって、 $\gamma$ セクレターゼの阻害活性をほぼシングルピークに精製した。精製物に $\gamma$ セクレターゼ活性の阻害活性があることは、ELISA 法でも確認した。

上記の精製を約 100 回繰り返し、最終精製物を約 2 mg 得た。質量解析で、

この物質の分子量を決定し、また、NMR で構造決定をおこなった（京都大学薬学研究科竹本教授、塚野助教の協力による）。

### 4. アルツハイマー病原因遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製

$\gamma$ セクレターゼの抑制活性を示す漢方薬エキスが実際に *in vivo* でアルツハイマー病の抑制効果があるかどうかを確認するためには、動物での検証が不可欠である。これまでに、幾つかのアルツハイマー病モデルマウスの報告があり、その内のいくつかは市販されていたり、また、MTA を交わすことで入手が可能である。しかしながら、これらのマウスは非常に高価であったり、交配によって増やすことが禁じられていたり、さらには、薬物開発に利用することの制限があり、いずれのマウスも非常に使い勝手が悪い。我々はこれまでに幾つかのトランスジェニックマウスを作製した実績があるので、自らアルツハイマー病のモデルマウスを作ることにした。

脳の神経細胞に特異的に発現させることを目的に、神経特異的エノラーゼ(neuron-specific enolase: NSE)遺伝子のプロモーターを用い、まず、家族性アルツハイマー病の原因となる変異 APP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した。さらに、早期発症を期待して、家族性アルツハイマー病の原因となる変異 APP 遺伝子と変異プレセニリン遺伝子とを同時に導入したトランスジェニックマウスの作製も行った。

### (倫理面への配慮)

動物実験：京都大学における動物実験の実施に関する基本指針に従い実施した。具体的には、実験を行う研究者、大学院生は、全員京都大学の「動物実験講習会」を受講し、京都大学内で動物実験を行うために必要な教育受講を終えたのちに実験を行った。その他の実験に関しては、倫理的な問題が関わる実験は含まれていない。

トランスジェニックマウスの作製は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて行った。

## C. 研究結果

### 1. $\gamma$ セクレターゼ活性を簡便に検出するアッセイ系の構築

A $\beta$ の前駆体である APP の C-末部位に酵母の転写因子である GAL4 の DNA 結合領域と Herpes Simplex virus の転写活性化領域を融合した GAL4-VP16(G4V16)を付加した蛋白質 (APP-G4V16)を発現させるベクターを構築した。この GAL4-VP16 は、転写研究領域で汎用されている強力な転写因子で、その活性は、プロモーター領域に GAL4 認識配列(UAS)を挿入したルシフェラーゼのレポーター (TK(UAS)LUC)で測定することができる。この APP-G4V16 と TK(UAS)LUC を培養細胞にトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定した。このルシフェラーゼ活性は、既存の  $\gamma$ セクレターゼの阻害剤である DAPT を添加することで減少したの

で、 $\gamma$ セクレターゼによって膜に存在する APP-G4V16 が切断された結果、G4V16 が核に移行してレポーターの転写を活性化していることが確認できた。従って、このアッセイ (以下レポーターアッセイ) を用いることで、 $\gamma$ セクレターゼに対する阻害活性をルシフェラーゼの活性を指標に評価することが可能となった。

### 2. $\gamma$ セクレターゼ阻害活性を持つ漢方エキスのスクリーニング

我々が開発した  $\gamma$ セクレターゼ活性評価するレポーターアッセイを用いて、現在ヒトに対して使用されている漢方薬の原材料となっている約 1600 種類の植物エキスに対して、それらのエキスが  $\gamma$ セクレターゼの阻害活性を含んでいるかどうかを検証した。このアッセイでは、非特異的な転写抑制作用が擬陽性になるため、サイトメガロウイルス (CMV) のプロモーターで  $\beta$ ガラクトシダーゼ ( $\beta$ gal)を発現させるプラスミッド (CMV- $\beta$ gal)を同時にトランスフェクションし、 $\beta$ gal 活性に変化を与えずルシフェラーゼ活性を低下させるものをポジティブと判定した。このスクリーニングによって、啤酒花 (ヒシュカ) と他に幾つかの漢方薬エキスがルシフェラーゼ活性の特異的な低下を示した。実際、これらの漢方薬エキスに  $\gamma$ セクレターゼの阻害活性があることを ELISA 法によって確認した。

### 3. $\gamma$ セクレターゼ阻害活性を持つ漢方エキス成分の精製と構造決定

まず、啤酒花エキスを Bligh Dyer 法により水溶性、脂溶性の 2 層に分離

した後、レポーターアッセイによりエキス中の $\gamma$ セクレターゼ阻害活性が脂溶性分画に移行していることを確認した。続いて、この脂溶性分画を Silica Cartridges を使用した固相抽出により3分画に分離した。用いた溶媒は①ヘキサン：クロロホルム=50：50、②クロロホルム：メタノール=99：1、③100%メタノールで、レポーターアッセイにより $\gamma$ セクレターゼ阻害活性が、②クロロホルム：メタノール=99：1分画に移行していることを確認した。

次に、②の分画を5CN-MS 順相カラムにより、ヘキサン：クロロホルム=50：50の溶媒からスタートし、毎分1%ずつメタノール濃度を上昇させるプロトコールで HPLC を実施した。結果、5分～7分の分画に活性成分が溶出していることを確認した。

さらに、この順相 HPLC で得た分画を5C18-AR-IIカラム、及び $\pi$ -NAPカラムにより逆相 HPLC を行うことでさらに分離した。アセトニトリル：水=80：20からスタートし、毎分アセトニトリル濃度を1%ずつ上昇させるプロトコールで行い、これら2種類のカラムで合計3回の逆相 HPLC を行うことで、活性成分をシングルピークになるまで精製することに成功した。

一連の実験を8mgのエキスからスタートすることで、約20 $\mu$ gの精製物を得ることができた。このサイクルを約100回繰り返し、最終的に2mgの極めて純度の高い化合物を得た。質量分析によりこの化合物の分子量は416

であり、核磁気共鳴 (NMR)により、構造をC<sub>25</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub>と決定した。

#### 4. アルツハイマー病原因遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製

神経特異的エノラーゼ (neuron-specific enolase: NSE) 遺伝子のプロモーターの支配下に家族性アルツハイマー病で同定された London 変異 (V717F) をもつ APP を発現させるトランスジーンをマウスの受精卵にインジェクションをおこない、トランスジェニックマウスを得た。また、同じ NSE 遺伝子のプロモーターの支配下に家族性アルツハイマー病で同定された変異をもつプレセニリン1 (PS1(P267S)) を発現させるトランスジーンを上記のトランスジーンと同時にマウスの受精卵にインジェクションをおこない、現在数匹のトランスジェニックマウスを得ている。

#### D. 考察

今後著しい患者数の増大が予測されるアルツハイマー病に対して、有効な薬剤を用意することは極めて重要な課題である。家族性アルツハイマー病の研究から、これまでに同定されたほぼ全ての関連遺伝子の変異によってA $\beta$ (特にA $\beta$ 42)の産生亢進が引き起こされていることが示され、孤発性のアルツハイマー病においてもA $\beta$ の産生抑制が有効な治療戦略になるであろうと推測されている。

A $\beta$ は、その前駆体蛋白質であるAPPの膜貫通近傍部分から $\beta$ セクレターゼと $\gamma$ セクレターゼの2つの蛋



白質プロセシング酵素の働きで切り出されるが、 $A\beta$  (特に  $A\beta_{42}$ ) の産生抑制には C-末部位の切り出しを担う  $\gamma$ セクレターゼの活性抑制が極めて重要であると推測されている。 $\gamma$ セクレターゼは、少なくとも4つの蛋白質からなる複合体であり、*in vitro*での複合体の再構築は極めて難しい。一方、細胞の内在性  $\gamma$ セクレターゼの活性は産生される  $A\beta$  の量をELISA法で定量することで推定されている。しかしながら、ELISA法はコストが高く、薬剤のスクリーニングには適さない。従って、 $\gamma$ セクレターゼの阻害を安価にアッセイする方法の確立が急務であった。このような状況の下、我々は  $\gamma$ セクレターゼの活性を転写因子の活性に変換し、ルシフェラーゼをレポーターとしてモニターするシステムを構築した。

長期に渡る治療が想定されるアルツハイマー病の治療薬には、副作用が少なく安全であることが極めて重要である。そこで、我々はこれまでに安全性が確立している漢方薬に注目し、漢方薬の原料となっている薬1600種類の植物エキスを我々が開発したレポーターアッセイを用いてスクリーニングし、啤酒花とあと幾つかの植物エキスを  $\gamma$ セクレターゼの活性を阻害する成分が含まれることを見いだした。

啤酒花とはホップのことで、中国では、緑色の花穂を乾燥させたものが不眠、不安、頭痛、神経痛等に使用されている。啤酒花に含まれる同定成分としては、キサントフモール、イソキサ

ントフモール、8-プレニルナリンゲニン、イソフムロン、ホップフラボノール、メチルプテノールなどがある。また、EUでも民間薬として用いられている。啤酒花には、エストロゲン様の作用も報告されており、更年期障害の改善薬としても使用されているが、妊婦には使用しない。 $\gamma$ セクレターゼの阻害は、発生期に重要なNotchの切断も阻害することとなり、啤酒花に妊婦への使用制限があることは好ましいものと思われる。

精製した  $\gamma$ セクレターゼの阻害活性成分は、脂溶性で分子量が416と小さく、おそらく脳内への移行は問題無いと思われる。

現在、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを得ているので、今後、このマウスのアルツハイマー病のモデルとしての適合性を判定の上、治療効果の評価を行う予定である。

## E. 結論

アルツハイマー病発症の最初期段階である  $A\beta$  のAPPからの切り出しを担う  $\gamma$ セクレターゼの活性を簡便に評価するアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用い、漢方薬の原料となる植物エキス約1600種類のスクリーニングを行い、啤酒花と幾つかの漢方薬エキスに  $\gamma$ セクレターゼの阻害成分が含まれることを明らかにした。次に、啤酒花の  $\gamma$ セクレターゼの活性阻害成分を精製し、質量解析とNMRによってその構造を決定した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Okamoto, A., Koike, M., Yasuda, K., & Kakizuka A. Maintaining ATP levels via the suppression of PERK-mediated rRNA synthesis at ER stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 394: 42-47, 2010.

Koike M, Fukushi J, Ichinohe Y, Higashimae N, Fujishiro M, Sasaki C, Yamaguchi M, Uchihara T, Yagishita S, Ohizumi H, Hori S, & Kakizuka A. Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. **J. Biol. Chem.** 285: 21736-21749, 2010.

Manno, A., Noguchi, M., Fukushi, J., Motohashi, Y., & Kakizuka, A. Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins (VCPs) that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia (IBMPFD). **Genes Cells** 15: 911-922, 2010.

Muguruma, K., Nishiyama, A., Ono, Y., Miyawaki, H., Mizuhara, E., Hori, S., Kakizuka, A., Obata, K., Yanagawa, Y., Hirano, T., & Sasai, Y. Ontogeny recapitulating generation and tissue integration of ES cell-derived Purkinje

cells. **Nat. Neurosci.** 13: 1171-1180, 2010.

Takeshita, Y., Fujinaga, R., Kokubu, K., Islam, M.N., Jahan, M.R., Yanai, A., Kakizuka, A., & Shinoda, K. Interaction of ataxin-3 with huntingtin-associated protein 1 through Josephin domain. **Neuroreport.** 22: 232-238, 2011.

### 2. 学会発表

垣塚 彰「神経細胞が死ぬ病気はなぜおこるの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 京都大学(京都) 平成 22 年 5 月 7 日

垣塚 彰「神経変性疾患発症の分子機構」第 11 回京都大学生命科学研究科シンポジウム 芝蘭会館 (京都) 平成 22 年 7 月 1 日

垣塚 彰「神経変性疾患発症における VCP 蛋白質の役割」ニューロサイエンスセミナー 金沢大学医学部 (金沢) 平成 22 年 9 月 29 日

垣塚 彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 東京大学(東京) 平成 22 年 11 月 2 日

垣塚 彰「神経変性疾患発症における VCP 蛋白質の役割」第 3 回グローバル COE 国内シンポジウム「神経変性疾患とがんの共通分子機構をめぐって」名古屋大学医学部 (名古屋) 平成 22 年 11 月 5 日

Sachi Tsujikawa, Yukio Taniguchi, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Shingo Maegawa, Shigeo Kobayashi, Haruaki Ninomiya, Tomoh Masaki, Akira Kakizuka, & Hiroshi Hosokawa. "MAGI-1 modulates anxiety-like behavior in mice" BMB2010 神戸国際会議場(神戸) 平成 22 年 12 月 7 日

Junpei Fukushi, Yuzuru Ichinohe, & Akira Kakizuka. "Crucial damage of particular classes of linoleoyl phospholipids in polyglutamine disease Drosophila models." The 9<sup>th</sup> International Student Seminar Shiran Kaikan (Kyoto) March 7, 2011.

Masaaki Koike, Junpei Fukushi, Yuzuru Ichinohe, Chiyomi Sasaki, & Akira Kakizuka. "Modifications of VCP via abnormal protein accumulation lead to neuronal cell atrophy and neurodegeneration." The 9<sup>th</sup> International Student Seminar Shiran Kaikan (Kyoto) March 8, 2011.

Sachi Tsujikawa, Keizo Takao, Kazuo Nakanishi, Tsuyoshi Miyakawa, Akira Kakizuka, Haruaki Ninomiya, Tomoh Masaki, & Hiroshi Hosokawa. "Deficiency of sensory motor gating in MAGI-1 knockout mice" 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 パシフィコ横浜(横浜) 平成 23 年 3 月 28 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

発明の名称:「ナフタレン誘導体」 発明者: 垣塚彰、堀清次、首藤敏之、淵上智弘。出願人: 国立大学法人京都大学、ダイトーケミックス株式会社。出願日: 平成 22 年 7 月 30 日、特願 2010-172467

発明の名称:「眼疾患処置薬」、発明者: 垣塚彰、堀清次、池田華子、吉村長久、中野紀子、首藤敏之、淵上智弘。出願人: 国立大学法人京都大学、ダイトーケミックス株式会社。出願日: 平成 22 年 9 月 30 日、特願 2010-221873

発明の名称:「アルツハイマー病予防薬のスクリーニング法と同定物」、垣塚彰、笹岡紀男、兼森祥子、坂本めぐみ 出願準備中

発明の名称:「抗癌剤の副作用を軽減させる薬剤・方法」、垣塚彰、堀清次、河合裕子 出願準備中

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okamoto, A., Koike, M., Yasuda, K., & <u>Kakizuka A.</u>	Maintaining ATP levels via the suppression of PERK-mediated rRNA synthesis at ER stress.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	394	42-47	2010
Koike M, Fukushi J, Ichinohe Y, Higashimae N, Fujishiro M, Sasaki C, Yamaguchi M, Uchihara T, Yagishita S, Ohizumi H, Hori S, & <u>Kakizuka A.</u>	Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression.	J. Biol. Chem.	285	21736- 21749	2010
Manno, A., Noguchi, M., Fukushi, J., Motohashi, Y., & <u>Kakizuka A.</u>	Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins (VCPs) that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia (IBMPFD).	Genes Cells	15	911-92 2	2010
Muguruma, K., Nishiyama, A., Ono, Y., Miyawaki, H., Mizuhara, E., Hori, S., <u>Kakizuka A.</u> , Obata, K., Yanagawa, Y., Hirano, T., & Sasai, Y.	Ontogeny recapitulating generation and tissue integration of ES cell-derived Purkinje cells.	Nat Neurosci.	13	1171-1 180	2010
Takeshita, Y., Fujinaga, R., Kokubu, K., Islam, M.N., Jahan, M.R., Yanai, A., <u>Kakizuka A.</u> & Shinoda, K.	Interaction of ataxin-3 with huntingtin-associated protein 1 through Josephin domain.	Neuroreport.	22	232-23 8	2011

### III. 研究成果の刊行物・別刷



## Maintaining ATP levels via the suppression of PERK-mediated rRNA synthesis at ER stress

Akihiko Okamoto, Masaaki Koike, Kunihiko Yasuda, Akira Kakizuka \*

The Laboratory of Functional Biology, Kyoto University Graduate School of Biostudies/SORST (JST), Kyoto 606-8501, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 January 2010

Available online 19 February 2010

#### Keywords:

eIF2 $\alpha$  phosphorylation

ER stress

PERK

Protein synthesis suppression

rRNA synthesis suppression

### ABSTRACT

Currently, [ $^3\text{H}$ ]uridine is most often used to monitor rRNA synthesis in cultured cells. We show here that radiolabeled ribonucleoside triphosphates, such as [ $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ ]UTP, in culture medium were also incorporated efficiently not only into cells but also into *de novo* RNA, particularly rRNA. Using this method, we first revealed that endoplasmic reticulum (ER) stress inducers such as tunicamycin and thapsigargin suppressed *de novo* rRNA synthesis, and that PERK, but not IRE1 $\alpha$  or ATF6, mediated the suppression. PERK is known to mediate the suppression of *de novo* protein synthesis via phosphorylation of eIF2 $\alpha$ . Consistently, other translational inhibitors such as PSI, proteasomal inhibitor, and cycloheximide suppressed *de novo* rRNA synthesis. eIF2 $\alpha$  knockdown also suppressed both *de novo* protein and rRNA syntheses. Furthermore, ER stress reduced cellular ATP levels, and the suppression of rRNA synthesis apparently mitigated their reduction. These observations provided a close link between ATP levels and suppression of *de novo* rRNA synthesis at ER stress, and we proposed a novel feedback mechanism, in which ATP levels were maintained via suppression of *de novo* rRNA synthesis in ATP-demanding stresses, such as ER stress.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Feedback mechanisms are the core machinery for organisms and cells to remain healthy in the face of changes in the environment. In cellular levels, unfolded protein response (UPR) in endoplasmic reticulum (ER) provides good examples of “feedback mechanisms” [1,2]. ER is an intracellular organelle, in which membrane and secreted proteins are properly folded and modified. When proteins that pass through the ER are not correctly modified or folded, such misfolded proteins are easily accumulated in the ER [3,4]. The accumulation of misfolded proteins triggers several cellular responses, including transcriptional induction of chaperons, stimulation of ER-associated degradation (ERAD) [5], and translational inhibition of mRNAs [6,7]. These responses are collectively called UPR, and all aim to reduce the amounts of accumulated misfolded proteins in the ER [2]. In general, translational inhibition apparently occurs at the earliest time point during UPR, followed by the induction of chaperons and stimulation of ERAD, and thus the translational inhibition, namely suppression of *de novo* protein synthesis, might be a primary demand for cells in handling ER stress.

In UPR, ATF6, IRE1 $\alpha$ , and PERK have been shown to function as sensor proteins [6,8–10], which are able to recognize the accumulation of misfolded proteins in the ER, and after the recognition, these proteins trigger signaling cascades for the UPR. Among the three, PERK, a PKR-like kinase, is known to mediate translational

inhibition [6]. When PERK is activated at ER stress, activated PERK mediates phosphorylation of Ser51 of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor (eIF2 $\alpha$ ), which in turn leads to translational inhibition [6,7]. This provides an elegant feedback system, which prevents further supply of misfolded proteins in the ER. It is noteworthy that the Ser51 phosphorylation of eIF2 $\alpha$  has also been observed in several other stress conditions, such as virus infection, oxidative stress, ultraviolet exposure, amino-acid starvation, etc. [11–14]. However, in some of these stress conditions, there seems to be no need of suppression of *de novo* protein synthesis as a feedback mechanism. Thus, yet unknown meaning of the suppression of *de novo* protein synthesis in these stress conditions, including ER stress, might exist.

ATP is necessary in essentially all cellular activities, and its needs increase in stress conditions such as ER stress, in which chaperons utilize ATP in unfolding [15], VCP in ERAD [16,17], proteasome in the degradation of misfolded proteins [18]. Ubiquitination also utilizes ATP for marking unnecessary proteins to be degraded [19]. ATP levels are maintained in the balance between its synthesis and consumption. Although basic mechanism for ATP production by F1F0 ATPase and its consumption by other ATPases are well documented, regulatory mechanisms in keeping ATP levels are only poorly understood [20]. It is noteworthy that large amounts of ATP are also consumed in RNA synthesis, especially in ribosomal RNA (rRNA) synthesis [21]. In this study, we report profound couplings among ATP-demanding conditions, translational

\* Corresponding author. Fax: +81 75 753 7676.

E-mail address: [kakizuka@lif.kyoto-u.ac.jp](mailto:kakizuka@lif.kyoto-u.ac.jp) (A. Kakizuka).

inhibition, and suppression of *de novo* rRNA synthesis, and propose a novel feedback mechanism.

## Materials and methods

**Antibodies.** Anti-CBP, anti-UBF, anti-TIF-1A, and anti-c-myc antibodies were purchased from Santa Cruz. Anti-eIF2 $\alpha$  antibodies were purchased from Cell Signaling. An anti-actin antibody was purchased from Chemicon. An anti-ATF6 antibody was a gift from Dr. Kazutoshi Mori.

**Cell Culture.** HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum and penicillin and streptomycin. Indicated amounts of tunicamycin (Nacalai Tesque), Thapsigargin (Nacalai Tesque), PSI (Peptide Institute), Actinomycin D (Nacalai Tesque), and  $\alpha$ -amanitin (Invitrogen) were added 2 h prior to the addition of [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP to the medium.

**Visualization of rRNA synthesis (VRS).** When cells grew at 70–80% confluency, 20  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP (3000 Ci/mmol) (GE Healthcare) was added to the culture medium. Total RNA was isolated by the acid guanidine phenol chloroform method using Trizol Reagent (Invitrogen). Five micrograms of total RNA was separated in 1% agarose gel, and then transferred onto a nylon membrane (Hybond-N+ membrane) (GE Healthcare). Dried membranes were subjected to autoradiography.

**RNAi experiments.** Sequences of siRNAs used in this study are listed in Supplementary Table 1. HeLa cells ( $3 \times 10^5$ ) were transfected with 25 nM siRNAs using Oligofectamine (Invitrogen), and were cultured for 3 days. Cells were then cultured for 2 h in the absence or presence of chemicals, followed by the additional 8 h culture with [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP in the absence or presence of chemicals, respectively, and then total RNA was recovered and analyzed.

**Measurement of *de novo* protein synthesis.** HeLa cells ( $3 \times 10^5$ ) were cultured with methionine- and cysteine-free DMEM containing 10% FBS for 30 min. Then, 25  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]methionine/cysteine (37 TBq/mmol) (GE Healthcare) were added to the medium for 30 min. Then cells were washed with ice-cold PBS three times and lysed with RIPA buffer. After centrifugation at 15,000 rpm for 30 min at 4 °C, the supernatants were collected and their protein concentrations were determined. Ten micrograms of lysates was separated by SDS-PAGE, and the gel was fixed with methanol. Then the gel was dried and exposed onto an X-ray film (Fuji film). Alternatively, their radioactivity was determined with a liquid scintillation counter.

**Measurement of ATP in cultured cells.** ATP was measured by luciferase activities by ARVO multilabel counter (Wallac), using Cellno ATP assay reagent (Toyo B-net Co., Ltd.).

**Establishment of HeLa cells expressing eIF2 $\alpha$ .** A full-length human eIF2 $\alpha$  cDNA (No. NM\_004094) was obtained from RIKEN BRC DNA BANK [22]. Using a lenti virus system, HeLa cells continuously expressing eIF2 $\alpha$  were established. These cells, but not normal HeLa cells, allowed the eIF2 $\alpha$  phosphorylation to be detected by Western blot.

**Statistical analysis.** Each experiment was conducted at least three times with consistent results. The representative gel or blot from each experiment is presented in this study. Mean values and standard deviations were obtained from triplicate experiments.

## Results

### Visualization of rRNA synthesis

It is generally thought that ribonucleoside triphosphates cannot pass through the plasma membrane due to their hydrophilic or water-soluble nature [23], and thus that it is impossible to radiolabel newly synthesized rRNA in cultured cells by adding

radiolabeled ribonucleoside triphosphates, such as [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP, to the culture medium. In contrast, [<sup>3</sup>H]uridine, a more hydrophobic and smaller molecule than UTP, has been shown to pass through the plasma membrane, and thus it has been used to radiolabel the RNA in many experiments using cultured cells [24]. We cultured a variety of cell lines (HeLa, HEK293A, HEK293T, CV-1, COS1, COS7, PC12, etc.), added 20  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP (3000 Ci/mmol) to 2 ml of culture medium, incubated for 8 h, harvested the cells, and recovered the RNA. Surprisingly, RNAs from all of the cells exhibited radioactivity. Among the cell lines, RNA from HeLa cells was the most highly radioactive, indicating that UTP was being efficiently incorporated. To the best of our knowledge, this simple method allowed to radiolabel the RNA in cultured cells, for the first time, by using a radiolabeled ribonucleoside triphosphate, namely [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP, although molecular basis as to how UTP passes through the plasma membrane remains to be clarified. [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP contains [<sup>33</sup>P], a high-energy radioisotope, and thus newly synthesized RNA was expected to be detected much more easily by autoradiography than using [<sup>3</sup>H]uridine.

We then pulse-labeled HeLa cells for 30 min and analyzed the RNA by agarose gel electrophoresis, followed by membrane transfer and autoradiography. [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP was first incorporated into rRNA precursors and then shifted to mature 28S, 18S, and 5.8S rRNAs in a time-dependent manner (Fig. 1A). Although mRNA could also be visualized as smears in the gel after long periods of labeling, after 30 min of labeling, the several bands predominated at the expected positions for pre-rRNA and mature rRNA (Fig. 1A). These bands were destroyed by RNase A treatment, but not by DNase I treatment (data not shown). Incorporation of [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP into the RNA in these bands was consistently suppressed by addition of actinomycin D (ActD), an inhibitor of RNA polymerase I, but not  $\alpha$ -amanitin, an inhibitor of RNA polymerase II to the culture medium (Fig. 1B).

### ER stress suppressed rRNA synthesis

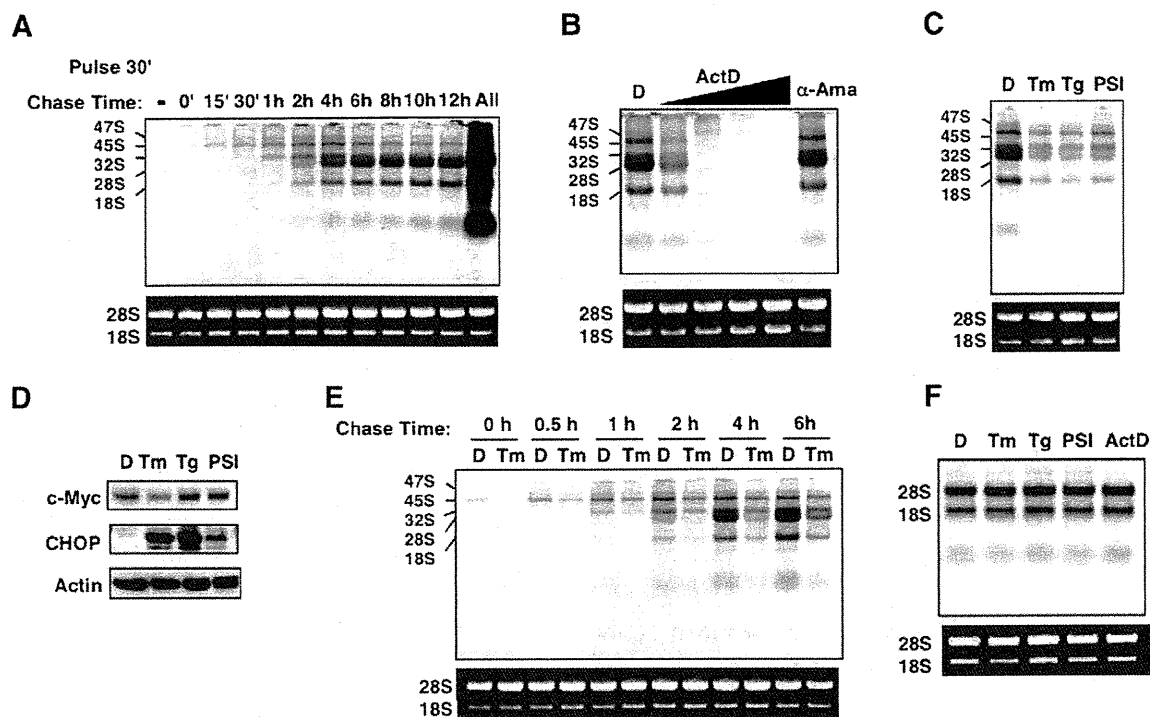
We then searched for stressors or compounds that affected rRNA synthesis, and found that tunicamycin (Tm), thapsigargin (Tg), and proteasome inhibitor (PSI) treatments efficiently suppressed *de novo* rRNA labeling (Fig. 1C). Under the same conditions, c-myc levels were slightly decreased by Tm treatment, but were not affected by Tg or PSI treatment (Fig. 1D). c-myc has been shown to increase rRNA synthesis [24]. However, Tm, Tg, and PSI are known to induce endoplasmic reticulum stress (ER stress). Indeed, these three compounds induced CHOP expression, a well-known ER stress marker (Fig. 1D) [25]. We thus hypothesized that ER stress could induce the suppression of *de novo* rRNA synthesis.

We pulse-labeled cells with or without Tm treatment, and examined the profile of rRNA synthesis suppression. Tm treatment did not appear to change the pattern of the bands labeled by [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP, but the strength of each band was greatly reduced (Fig. 1E). Treatment with Tg or PSI produced results that were essentially identical to those observed in Tm treatment (data not shown). We further examined the effects of these compounds after incorporated [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP had shifted completely into mature 28S and 18S rRNA, and found that none of the compounds affected the incorporated [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP patterns in mature 28S or 18S rRNA (Fig. 1F). These results demonstrate that the rRNA transcription was suppressed by Tm treatment, and that maturation or degradation of rRNA did not appear to be affected by Tm treatment.

### PERK-mediated rRNA synthesis suppression at ER stress

To obtain more evidence in support of the idea that ER stress induces rRNA synthesis suppression, we examined the effect of blocking the major ER stress signaling pathways, namely, IRE1 $\alpha$ ,





**Fig. 1.** Visualization of *de novo* rRNA synthesis and its suppression following ER stress. (A) HeLa cells were labeled with [ $\alpha$ - $^{33}$ P]UTP for 30 min or 12.5 h (All). Following the 30 min labeling, cells were washed, and cultured for the indicated time periods (from 0 to 12 h). Newly synthesized RNA was detected, as described in "Materials and methods". rRNA patterns are shown as a loading control. (B) HeLa cells were cultured for 8 h with 20  $\mu$ Ci of [ $\alpha$ - $^{33}$ P]UTP in the absence (D) or presence of ActD (1, 10, 100, or 1000  $\mu$ g/ml) or  $\alpha$ -amanitin ( $\alpha$ -Ama) (50 nM). RNA was then recovered and analyzed as described in (A). (C) HeLa cells were cultured for 2 h in the absence (D) or presence of Tm (2  $\mu$ g/ml), Tg (500 nM), or PSI (10  $\mu$ M). RNA was radiolabeled and analyzed as described in (A). (D) HeLa cells were cultured for 8 h in the absence (D) or presence of Tm (2  $\mu$ g/ml), Tg (500 nM), or PSI (10  $\mu$ M), and the cell lysates were analyzed by western blot using anti-c-myc, anti-CHOP, and anti-actin antibodies. (E) HeLa cells were cultured for 2 h in the absence (D) or presence of 2  $\mu$ g/ml Tm, and then 20  $\mu$ Ci of [ $\alpha$ - $^{33}$ P]UTP was added to the medium for 30 min. After extensive washing, cells were cultured for the indicated additional time periods (from 0 to 6 h), and RNA was recovered and analyzed as described in (A). (F) HeLa cells were cultured for 3 h with 20  $\mu$ Ci of [ $\alpha$ - $^{33}$ P]UTP. Twenty-four hours after the medium change, cells were cultured for an additional 8 h in the absence (D) or presence of Tm (2  $\mu$ g/ml), Tg (500 nM), or PSI (10  $\mu$ M). RNA was recovered and analyzed as described in (A).

ATF6, and PERK pathways [6,8,9]. Neither of the two different IRE1 $\alpha$  siRNAs inhibited the suppression of rRNA synthesis by Tm (Fig. 2A and Supplementary Fig. S1). Consistent with this, we could not detect inhibition of rRNA synthesis suppression in MEF from IRE1 $\alpha$  (-/-) mice (Supplementary Fig. S2). Furthermore, neither of the two different ATF6 siRNAs inhibited the rRNA synthesis suppression (Fig. 2A), although both ATF6 siRNAs efficiently reduced endogenous ATF6 protein levels (Fig. 2B). However, four different PERK siRNAs did inhibit the suppression of rRNA synthesis by Tm (Fig. 2A), although all of the PERK siRNAs effectively destroyed PERK mRNA (Supplementary Fig. S3). Indeed, in the cells treated with PERK siRNAs, induction of CHOP by Tm was inhibited (Fig. 2B). We could rule out the involvement of CHOP in rRNA synthesis suppression, because we observed clear suppression of rRNA synthesis in MEF from CHOP (-/-) mice (Fig. 2C) [26]. PERK siRNAs also induced a similar inhibition of rRNA synthesis suppression in cells treated with Tg, but not in those treated with PSI (Fig. 2D), suggesting that, in addition to PERK, other as-yet unknown molecule(s) may be involved in suppressing *de novo* rRNA synthesis when misfolded proteins or ubiquitinated proteins accumulate in the cytoplasm, as observed after PSI treatment.

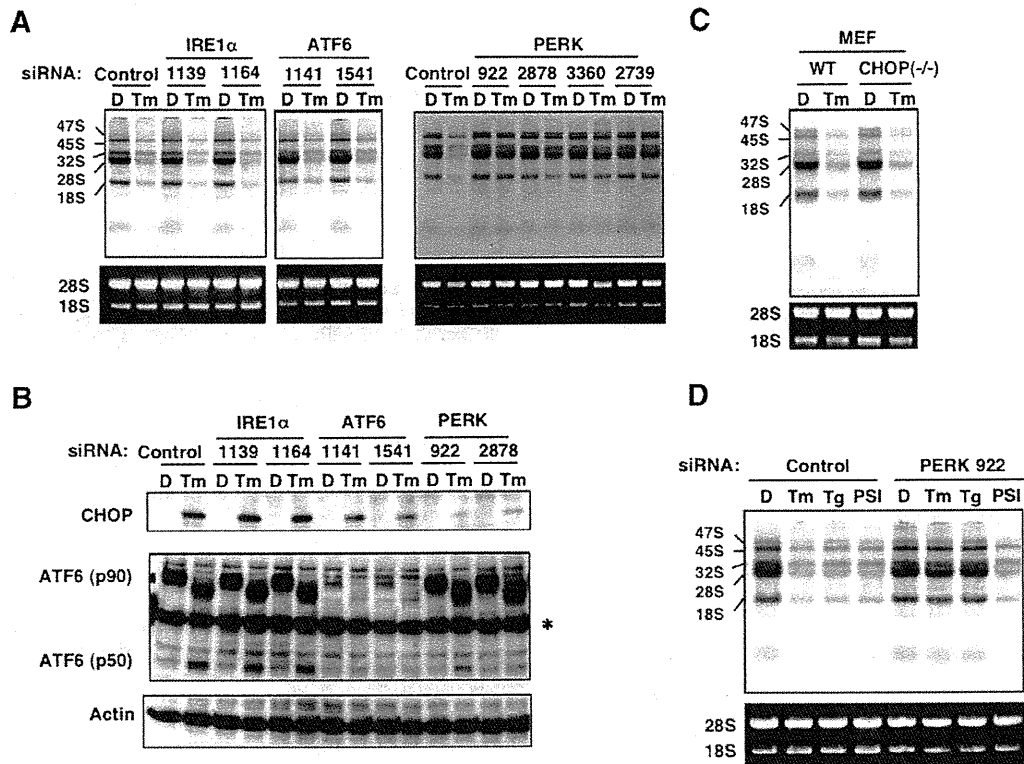
#### Translational inhibition and rRNA synthesis suppression

During UPR, PERK is involved in the translational inhibition of mRNA via eIF2 $\alpha$  phosphorylation at Ser51 [7], in addition to the induction of CHOP [25]. Thus, we next examined the possible involvement of translational inhibition in the suppression of rRNA

synthesis. Indeed, we observed that 10  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX) treatment caused the suppression of not only *de novo* protein synthesis but also rRNA synthesis. Both suppressions were not dependent of PERK (Fig. 3A and B). Although CHX treatment slightly induced eIF2 $\alpha$  phosphorylation, it was not PERK-dependent (Fig. 3C). Likewise, PSI treatment caused not only suppression of *de novo* protein synthesis but also eIF2 $\alpha$  phosphorylation (Fig. 3A and C), which appeared to be partly dependent on PERK (Fig. 3C). Furthermore, two eIF2 $\alpha$  siRNAs markedly suppressed *de novo* protein and rRNA syntheses (Fig. 3D and E, and Supplementary Fig. S4). In cells treated with eIF2 $\alpha$  siRNAs, Tm was not able to further enhance the suppression of *de novo* protein or rRNA synthesis (Fig. 3D and E). These data, altogether, indicated that suppression of *de novo* protein synthesis profoundly couples with the suppression of *de novo* rRNA synthesis.

#### Suppression of rRNA synthesis apparently contributed to maintaining ATP levels

We observed that 10 ng/ml ActD showed slightly stronger suppressive effect on *de novo* rRNA synthesis than 2  $\mu$ g/ml Tm (Fig. 3B), and this concentration of Tm suppressed more than 60% of *de novo* protein synthesis. However, this dose of ActD only marginally suppressed *de novo* protein synthesis for up to 24 h (Fig. 4A). These results indicate that the observed suppression of *de novo* rRNA synthesis affected *de novo* protein synthesis very mildly. How, then, does suppression of *de novo* rRNA synthesis benefit cells with large accumulations of misfolded proteins in



**Fig. 2.** PERK mediates ER stress-induced suppression of *de novo* rRNA synthesis. (A, C, D) HeLa cells were transfected with indicated siRNAs, and cultured for 3 days. Cells were then cultured for 2 h in the absence (D) or presence of Tm (2 μg/ml), and 20 μCi of [ $\alpha$ - $^{33}$ P]UTP was added to the medium. Cells were cultured for an additional 8 h, and RNA was recovered and analyzed as described in Fig. 1A. (B) HeLa cells were transfected with indicated siRNAs and cultured for 3 days. Cells were then cultured for 8 h in the absence (D) or presence of Tm (2 μg/ml), and the cell lysates were analyzed by western blot using anti-CHOP, anti-ATF6, and anti-actin antibodies. \* indicates nonspecific bands. (C) MEF cells from wild-type mice (WT) or from CHOP knockout mice (CHOP (-/-)) were cultured for 2 h in the absence (D) or presence of Tm (2 μg/ml). RNA was radiolabeled and analyzed as described in Fig. 1A. (D) HeLa cells were transfected with PERK siRNA (922), and cultured for 3 days. Cells were then cultured for 2 h in the absence (D) or presence of Tm (2 μg/ml), Tg (500 nM), or PSI (10 μM). RNA was radiolabeled and analyzed as described in Fig. 1A.

the ER (at ER stress) or in the cytoplasm (at PSI treatment)? Large amounts of ATP are consumed continuously during rRNA synthesis [21]. In these cells, ATP is required by chaperons and the ubiquitin–proteasome system for unfolding and ubiquitination-degradation, respectively, of the accumulated proteins [5]. Thus, the observed suppression of *de novo* rRNA synthesis likely maintains the supply of ATP in these cells by reducing the consumption of ATP for rRNA synthesis so that it can be used instead to power chaperons and the ubiquitin–proteasome system. We then examined this possibility. Tm treatment indeed reduced ATP levels in the cells, and this reduction was further enhanced with PERK knockdown (Fig. 4B). Furthermore, addition of ActD significantly recovered ATP levels in cells treated with Tm but not in cells cultured in a normal condition (Fig. 4B).

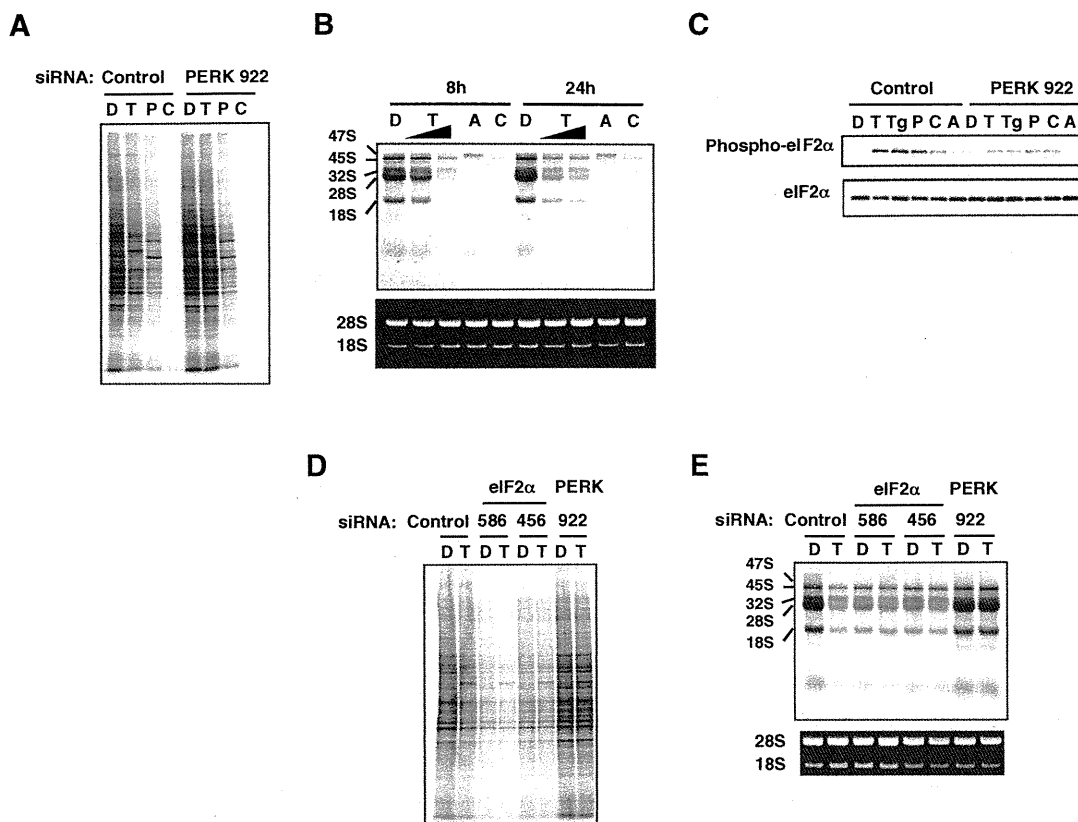
**Discussions**

In this study, we first showed a novel method to analyze *de novo* RNA synthesis, especially rRNA synthesis, in cultured cells by simply adding radiolabeled ribonucleoside triphosphate, such as [ $\alpha$ - $^{33}$ P]UTP in culture medium, followed by RNA extraction, gel electrophoresis, RNA blotting, and autoradiography. This simple method allows to visualize entire steps of rRNA synthesis, e.g. precursor transcription of 47S rRNA, processing, and appearance of mature 18S and 28S rRNA, in a quantitative manner. Thus, we call this method VRS (visualization of RNA synthesis) method.

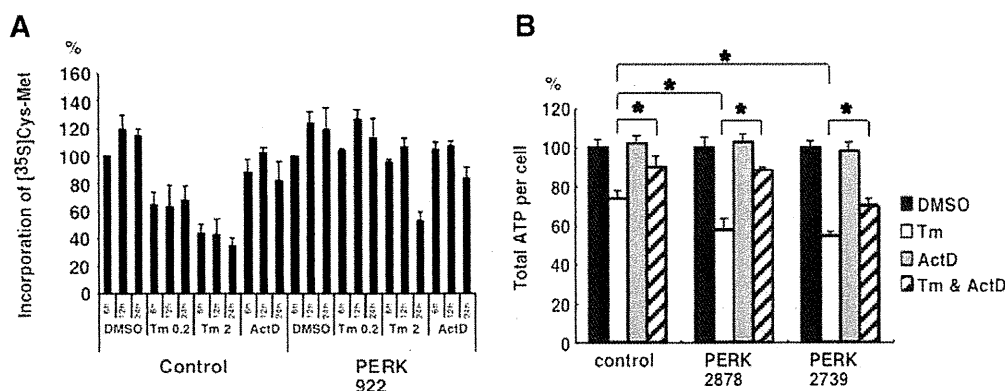
Using VRS method, we next revealed that ER stress-inducing drugs, such as Tm, Tg, and PSI dramatically suppressed *de novo*

rRNA synthesis. It has been reported that ER stress induces various cellular responses via using ER stress sensors, such as ATF6, PERK, IRE1α [6,8,9]. Among the knockdown of these three sensors, only PERK knockdown abolished Tm- and Tg-mediated but not PSI-mediated suppression of rRNA synthesis. These observations evidenced that PERK is involved in the suppression of rRNA synthesis at ER stress. PERK has been known to phosphorylate Ser51 in eIF2α, which in turn causes translational inhibition. Consistently, PSI induced the phosphorylation of Ser51 in eIF2α, even in cells treated with PERK siRNAs. Thus, the suppression of rRNA synthesis observed apparently coupled with the eIF2α phosphorylation.

Recently, DuRose et al. showed very similar observations and suggested that eIF2α phosphorylation couples with RRN3/TIF-1A being released from RNA polymerase I at ER stress, leading to the suppression of rRNA synthesis [27]. They speculated that RRN3/TIF-1A phosphorylation might be responsible for the release [27]. In our experiments, RRN3/TIF-1A knockdown was indeed able to suppress the rRNA synthesis (Supplementary Fig. S5). However, knockdown of eIF2α also induced similar suppression of rRNA synthesis in concomitant with the suppression of *de novo* protein synthesis, indicating that eIF2α phosphorylation is not necessary for the suppression of rRNA synthesis. Furthermore, CHX treatment was able to strongly suppress both protein and rRNA syntheses. These observations could provide an alternative, but not necessarily a mutually exclusive mechanism of the suppression of rRNA synthesis. Namely, translational suppression itself is responsible for the suppression of rRNA synthesis. In this mechanism, it is



**Fig. 3.** Translational inhibition and the suppression of rRNA synthesis. (A and D) Measurements of *de novo* protein synthesis (see "Materials and methods") in the absence (D) or presence of Tm (T) (2  $\mu$ g/ml), PSI (P) (10  $\mu$ M), CHX (C) (10  $\mu$ g/ml) for 8 h from cells treated with indicated siRNAs. (B and E) HeLa cells were transfected with indicated siRNAs and cultured for 3 days. Cells were then cultured for 8 h in the absence (D) or presence of Tm (T) (0.2 or 2  $\mu$ g/ml), PSI (P) (10  $\mu$ M), ActD (A) (10 ng/ml), and CHX (C) (10  $\mu$ g/ml). RNA was radiolabeled and analyzed as described in Fig. 1A. (C) Western blot analysis using anti-phospho eIF2 $\alpha$  and eIF2 $\alpha$  antibodies on cell lysates from HeLa cells overexpressing eIF2 $\alpha$ . Cells were transfected with PERK siRNA (922), and cultured for 3 days. Cells were then cultured for 2 h in the absence (D) or presence of Tm (T) (2  $\mu$ g/ml), Tg (500 nM), PSI (P) (10  $\mu$ M), CHX (C) (10  $\mu$ g/ml), and ActD (A) (10 ng/ml).



**Fig. 4.** Suppression of rRNA synthesis and ATP levels at ER stress. (A) Measurements of the relative amounts of *de novo* protein synthesis (see "Materials and methods") in the absence (DMSO) and presence of Tm (0.2, or 2  $\mu$ g/ml) and ActD (10 ng/ml) for 6, 12 or 24 h. (B) Measurements of the relative amounts of ATP per cell. HeLa cells were treated in the absence (DMSO) and presence of Tm (2  $\mu$ g/ml), ActD (10 ng/ml), or both for 24 h, and were harvested. Then, ATP amounts from  $1.5 \times 10^5$  cells were measured (see "Materials and methods"). \*,  $p < 0.05$ .

speculated that protein(s) with very short half-lives or those that are quickly ubiquitinated would play important roles in rRNA synthesis. These possibilities remain to be clarified.

It was evident that simple suppression of rRNA synthesis by ActD did not appear to contribute to the suppression of *de novo* protein synthesis. Instead, the observed suppression of *de novo*

rRNA synthesis maintained the ATP levels in cells with ER stress by reducing the consumption of ATP for rRNA synthesis so that it can be used by other systems, such as ER chaperons, ERAD, and the ubiquitin–proteasome system. It is noteworthy that eIF2 $\alpha$  phosphorylation occurs not only at ER stress, but also in several other stress conditions, such as amino-acid starvation, oxidative

stress, virus infection, etc. [11–14]. These conditions apparently all require large amounts of ATP, and thus the cells use eIF2 $\alpha$  phosphorylation to suppress the supply of newly synthesized proteins, which in turn suppresses the *de novo* rRNA synthesis, leading to the maintenance of ATP levels in the cell. Thus, this system would be a fundamental feedback system for the cells to adapt or survive against several stressful conditions via efficiently utilizing intracellular pools of ATP.

### Acknowledgments

We wish to thank professors Kenji Kohno (Nara Institute of Science and Technology), Shizuo Akira (Osaka University), Kazutoshi Mori (Kyoto University), and RIKEN BRC DNA Bank for IRE1 $\alpha$  knockout MEF, CHOP knockout MEF, an anti-ATF6 antibody, and pAxCALNLheIF2 $\alpha$ , respectively.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.065.

### References

- [1] C. Sidrauski, R. Chapman, P. Walter, The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features, *Trends Cell Biol.* 8 (1998) 245–249.
- [2] M. Schroder, R.J. Kaufman, The mammalian unfolded protein response, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 739–789.
- [3] R.B. Freedman, A.D. Dunn, L.W. Ruddock, Protein folding: a missing redox link in the endoplasmic reticulum, *Curr. Biol.* 8 (1998) R468–R470.
- [4] A.R. Frand, J.W. Cuozzo, C.A. Kaiser, Pathways for protein disulphide bond formation, *Trends Cell Biol.* 10 (2000) 203–210.
- [5] A. Ahner, J.L. Brodsky, Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome?, *Trends Cell Biol.* 14 (2004) 474–478.
- [6] H.P. Harding, Y. Zhang, D. Ron, Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase, *Nature* 397 (1999) 271–274.
- [7] H.P. Harding, Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, D. Ron, Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response, *Mol. Cell* 5 (2000) 897–904.
- [8] H. Yoshida, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, K. Mori, 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, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 33741–33749.
- [9] X.Z. Wang, H.P. Harding, Y. Zhang, E.M. Jolicoeur, M. Kuroda, D. Ron, Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses, *EMBO J.* 17 (1998) 5708–5717.
- [10] H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, K. Mori, XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor, *Cell* 107 (2001) 881–891.
- [11] M. Gale Jr., M.G. Katze, Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase, *Pharmacol. Ther.* 78 (1998) 29–46.
- [12] 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, D. Ron, An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol. Cell* 11 (2003) 619–633.
- [13] K.M. Vatter, R.C. Wek, Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 11269–11274.
- [14] S. Wu, Y. Hu, J.L. Wang, M. Chatterjee, Y. Shi, R.J. Kaufman, Ultraviolet light inhibits translation through activation of the unfolded protein response kinase PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18077–18083.
- [15] P. Goloubinoff, J.T. Christeller, A.A. Gatenby, G.H. Lorimer, Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP, *Nature* 342 (1989) 884–889.
- [16] T. Kobayashi, K. Tanaka, K. Inoue, A. Kakizuka, Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 47358–47365.
- [17] P.D. Lu, H.P. Harding, D. Ron, Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response, *J. Cell Biol.* 167 (2004) 27–33.
- [18] T. Ogura, K. Tanaka, Dissecting various ATP-dependent steps involved in proteasomal degradation, *Mol. Cell* 11 (2003) 3–5.
- [19] A. Hershko, E. Leshinsky, D. Ganoh, H. Heller, ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1619–1623.
- [20] C. von Ballmoos, A. Wiedenmann, P. Dimroth, Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 649–672.
- [21] J. Russell, J.C. Zomerijk, RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works, *Trends Biochem. Sci.* 30 (2005) 87–96.
- [22] Y. Suzuki, K. Yoshitomo-Nakagawa, K. Maruyama, A. Suyama, S. Sugano, Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library, *Gene* 200 (1997) 149–156.
- [23] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Fifth ed., Garland Science, New York, 2008. pp. 652–653.
- [24] C. Grandori, N. Gomez-Roman, Z.A. Felton-Edkins, C. Ngouenet, D.A. Galloway, R.N. Eisenman, R.J. White, c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 311–318.
- [25] X.Z. Wang, B. Lawson, J.W. Brewer, H. Zinszner, A. Sanjay, L.J. Mi, R. Boorstein, G. Kreibich, L.M. Hendershot, D. Ron, Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153), *Mol. Cell Biol.* 16 (1996) 4273–4280.
- [26] S. Oyadomari, K. Takeda, M. Takiguchi, T. Gotoh, M. Matsumoto, I. Wada, S. Akira, E. Araki, M. Mori, Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 10845–10850.
- [27] J.B. DuRose, D. Scheuner, R.J. Kaufman, L.I. Rothblum, M. Niwa, Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  coordinates rRNA transcription and translation inhibition during endoplasmic reticulum stress, *Mol. Cell Biol.* 29 (2009) 4295–4307.