

【課程博士用】

学 位 審 査 報 告 書

（ふりがな） 氏 名	さとう よしみ 佐藤 吉美
学位（専攻分野）	博 士 （ 理 学 ）
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 ・ 専 攻	理学研究科 生物科学専攻
（学位論文題目） 哺乳動物小胞体ストレス応答を制御する小胞体膜結合性転写因子 ATF6 の 活性化機構に関する研究	
論 文 調 査 委 員	（主査） 森 和俊 教授 土井 知子 准教授 船山 典子 准教授

理 学 研 究 科

京都大学	博士 (理学)	氏名	佐藤 吉美
論文題目	哺乳動物小胞体ストレス応答を制御する小胞体膜結合性転写因子 ATF6 の活性化機構に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>新たに合成された分泌タンパク質や膜タンパク質は、小胞体に局在する多種多様な分子シャペロンやフォールディング酵素の働きにより、正しい高次構造を獲得した後、ゴルジ体以降の分泌経路へ進む。この時、正しくフォールディングされなかった構造異常タンパク質は小胞体から細胞質へと逆行輸送され、ユビキチン化されてプロテアソームにより分解される。この過程は小胞体関連分解と呼ばれる。</p> <p>通常、分子シャペロンの働きや小胞体関連分解により構造異常タンパク質が小胞体内に多量に蓄積することはない。しかし、①環境要因的なストレスによりフォールディングや分解装置に不具合が生じる、②装置は正常であってもそれらの処理能力を超える量のタンパク質が小胞体内に送り込まれる、③遺伝学的変異により元来正常にフォールディングされないタンパク質が合成される状況で、構造異常タンパク質が通常以上に小胞体に蓄積する小胞体ストレスが発生する。真核生物は小胞体ストレスが発生すると小胞体ストレス応答あるいはUnfolded protein response (UPR)と呼ばれる機構を活性化することにより小胞体ストレスに対処し、恒常性を保とうとする。</p> <p>哺乳動物には小胞体ストレスが発生した事を感知しその情報を核へと伝達するセンサー分子が3種類 (IRE1、PERK、ATF6) 存在する。本研究で解析を行った ATF6 は細胞質側に転写因子ドメインを持つ小胞体膜結合性転写因子である。ATF6 は通常、不活性化型転写因子として小胞体に局在するが、小胞体ストレスが生じると COP II 被覆小胞に乗ってゴルジ体へと移行する。ゴルジ体に移行した ATF6 は site-1 protease (S1P)、site-2 protease (S2P) による切断を受けると転写因子ドメインは膜から遊離して活性型転写因子となる。活性型転写因子は核へ移行して、分子シャペロンやフォールディング酵素の転写を誘導する事で小胞体ストレスを軽減する。このように ATF6 が不活性化型転写因子から活性型転写因子へと変換される機構は良く知られている。しかし、ATF6 の小胞体ストレス感知機構は不明な点が存在するが、これまでに2つの分子機構が知られている。</p> <p>一つは小胞体シャペロン BiP の結合・解離による制御である。近年、Prywes らのグループが ATF6 内腔ドメインの部分欠失変異体の解析から、ATF6 内腔ドメインには Golgi localization signals (GLS) が存在すると報告している。通常時には GLS 近傍に BiP が安定的に結合しているため小胞体に留まっているが、異常タンパク質が蓄積すると、BiP は ATF6 から解離し、ATF6 はゴルジ体へ移行することができるというモデルを彼らは提唱している。</p> <p>もう一つは、ATF6 のジスルフィド結合の還元による制御である。これは当研究室から報告した機構である。通常、ATF6 は内腔ドメインに存在する2つの保存されたシステイン残基間でジスルフィド結合を形成し、酸化型モノマー、ダイマー、オリゴマーとして存在する。小胞体ストレスが発生するとこのジスルフィド結合は還元され、還元型 ATF6 モノマーのみがゴルジ体へ移行することが明らかとなった。小胞体からゴルジ体への逆行輸送を阻害する薬剤である brefeldin A で細胞を処理し、ゴルジ体に存在する S1P と S2P を小胞体に強制的に局在させた時、還元型 ATF6 は酸化型 ATF6 よりも切断されやすいという知見も得られている。ATF6 が通常、酸化型である理由として、非小胞体ストレス時に誤ってゴルジ体へ輸送された時、S1P、S2P により切断されず、無意味な小胞体シャペロンの転写誘導を防ぐという利点が考えられている。しかしながら現在まで小胞体ストレス発生時に ATF6 のジスルフィド結合を還元する酵素は同定されていない。</p> <p>ATF6 のように小胞体からゴルジ体へ移行して SREBP がよく知られている。SREBP はステロール飢餓時にコレステロール合成に関わる因子の転写誘導を行う。通常、SREBP はゴルジ体エスコートタンパク質 SCAP、SREBP-SCAP 複合体を小胞体に留めるアンカータンパク質 INSIG と複合体を形成し小胞体に局在する。しかし、細胞内のステロールが不足すると、SREBP-SCAP 複合体は INSIG から離れてゴルジ体へ移行し、S1P、S2P による切断を受けて活性型</p>			

転写因子となる。このように ATF6 と SREBP は共に小胞体からゴルジ体へ移行して活性化されることから、ATF6 にも SREBP のようにゴルジ体エスコートタンパク質やアンカータンパク質が存在する事が予想されていた。

以前、当研究室で作製した ATF6 mut B12 という変異体の解析結果は ATF6 にも SREBP のようにゴルジ体エスコートタンパク質や小胞体アンカータンパク質が存在する事を示唆するものであった。mut B12 は ATF6 内腔ドメインの 468-471、476-481 の領域をアラニンに置換した変異体である。ATF6 mut B12 は小胞体ストレス時に BiP の解離は起こるが、ゴルジ体へ移行して活性化型転写因子となる事ができない。この結果から、ATF6 にもゴルジ体エスコートタンパク質あるいは小胞体アンカータンパク質が存在する事が示唆された。しかし、現在これらの因子は同定されていない。

本研究は ATF6 活性化制御に関わる ATF6 ジスルフィド結合還元酵素、ゴルジ体エスコートタンパク質や小胞体アンカータンパク質を同定し、ATF6 活性化機構を明らかとすることを目的として開始した。ATF6 は膜タンパク質なので精製に不向きであると考え、今回 ATF6 内腔ドメインにタグをつけたコンストラクトを作製し、これを用いて ATF6 内腔ドメイン結合タンパク質スクリーニングを行うことにした。今回作製したコンストラクトは ATF6 内腔ドメイン (405-670a. a) の N 末端側にシグナル配列、C 末端側に 3×myc - TEV protease 認識部位 - 2×IgG binding domain からなる Tandem affinity purification (TAP) タグをつけたものである。TAP タグをつけたことにより 2 段階での精製を行う事ができる。

初めに作製した内腔ドメインコンストラクトは ATF6 還元酵素やゴルジ体エスコートタンパク質のスクリーニングに使用可能であるか解析を行った。その結果、ATF6 内腔ドメインのみでも全長型 ATF6 同様に小胞体ストレス依存的なゴルジ体への移行が観察された。次に ATF6 内腔ドメインのみでもジスルフィド結合を形成するか調べた。全長型 ATF6 はジスルフィド結合でつながったオリゴマー、ダイマー、酸化型モノマーとして存在する。しかし、ATF6 内腔ドメインでは分子間ジスルフィド結合を 2 つあるいは 1 つ持つ 2 種類のダイマーと還元型モノマーとして存在する事が明らかとなった。この分子間ジスルフィド結合は小胞体ストレス時に還元されることも明らかとなった。また、全長型 ATF6 同様に小胞体ストレス時の BiP の解離も見られた。これらの結果から、作製した ATF6 内腔ドメインコンストラクトは全長型 ATF6 と同様の性質を持つと考えられた。また、小胞体ストレスを感知する領域とゴルジ体への移行に十分な領域は小胞体内腔ドメインに存在する事が示唆された。

作製したコンストラクトを用いて TAP 精製し、ATF6 内腔ドメイン結合タンパク質のスクリーニングを行った。今回、ATF6 内腔ドメイン新規結合タンパク質として小胞体シャペロン Calnexin、protein disulfide isomerase (PDI) が同定された。その後の解析から Calnexin、PDI 共に ATF6 活性化制御に関与しない事が明らかとなった。しかし、今回同定されたカルネキシンは I 型小胞体膜タンパク質、PDI は小胞体に局在する可溶性タンパク質である。従って、今回立ち上げた ATF6 内腔ドメイン結合タンパク質スクリーニングの系は膜タンパク質、可溶性タンパク質、どちらのタンパク質でもスクリーニング可能な有用な系であることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

真核細胞に存在する小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質が高次構造を形成し成熟する場所であり、これら分泌系タンパク質の品質を管理するオルガネラとして知られている。すなわち、小胞体内には新生タンパク質の高次構造形成を介助・促進する分子シャペロンやフォールディング酵素（以降、小胞体シャペロンと総称）が多種多様に存在し、また高次構造形成に失敗したタンパク質を分解排除するために小胞体関連分解と呼ばれる機構が存在する。さらに、小胞体に高次構造の異常なタンパク質が蓄積すると、小胞体から核への細胞内情報伝達を伴う転写誘導機構である小胞体ストレス応答が活性化され、小胞体シャペロンや小胞体関連分解構成因子が転写誘導されて小胞体の恒常性が維持される。

小胞体ストレス時に小胞体内に高次構造異常タンパク質が蓄積したことは、小胞体膜貫通型タンパク質により感知される。哺乳動物では、小胞体ストレスセンサーとして IRE1、PERK、ATF6 がユビキタスに発現している。ノックアウトマウスの解析から、ATF6 α と ATF6 β という 2 つのアイソフォームのうち、ATF6 α が小胞体シャペロンや小胞体関連分解構成因子の転写誘導に必要であることが明らかにされている。

ATF6 α はその N 末端側にベーシック・ロイシンジッパー型のドメインを持つ転写因子であるが、分子の中央に疎水領域を持ち、II 型の 1 回膜貫通タンパク質として小胞体に構成的に存在する。小胞体ストレスが発生すると、ATF6 α はゴルジ体へと移行し、S1P および S2P と呼ばれるプロテアーゼによる限定分解を受ける。この結果膜から遊離した細胞質側の転写因子ドメインは核へ移行し、小胞体シャペロンや小胞体関連分解構成因子の転写を活性化する。しかしながら、ATF6 α が小胞体ストレスを感知しているメカニズムには不明な点が多く、また、ATF6 α をゴルジ体へとエスコートするタンパク質も同定されていない。

これまでに報告されていることは、小胞体ストレス時に ATF6 α の内腔側領域に結合していた小胞体シャペロン BiP が解離すること、ならびに内腔領域に形成された分子間・分子内ジスルフィド結合が還元されることである。いずれも内腔側で起こる変化であることから、佐藤は ATF6 α の内腔側のみでも小胞体ストレスを感知しゴルジ体へ移行するのではないかと考え、ATF6 α の内腔側に精製用のタグをつけた ATF6 α (C)-TAP を作成して解析し、以下の結果を得た。

- 1) ATF6 α (C)-TAP は小胞体ストレスに応答してゴルジ体へ移行する。
- 2) ATF6 α (C)-TAP は小胞体内でダイマーを形成し、小胞体ストレス時に還元される。
- 3) 小胞体ストレス時に ATF6 α (C)-TAP から BiP が解離する。

これらは全長 ATF6 α で得られている結果と同じであることから、ATF6 α (C)-TAP を用いて ATF6 α 結合タンパク質を探索し、新規タンパク質として Calnexin と PDI を同定した。解析の結果、これらはシャペロンとして ATF6 α (C)-TAP に結合しているものと考えられた。ATF6 α (C)-TAP は ATF6 α エスコートタンパク質を単離するための有用なツールとなることから、本論文は、ATF6 α の活性化機構の解明に向けての重要な一里塚である。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 23 年 1 月 25 日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。