

(論文内容の要旨)

小胞体は分泌系蛋白質が正しい高次構造を獲得する場であるが、外界の急激な環境変化や、分化の過程、または遺伝的な変異によって構造の異常な蛋白質が蓄積する場合があります、このような状況を小胞体ストレスと呼ぶ。細胞はこのストレスに対し、小胞体ストレス応答または Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれる防御機構を活性化し、細胞の恒常性を維持しようとする。UPR は翻訳抑制機構や、小胞体シャペロン、小胞体関連分解 (ERAD) 因子の転写誘導機構からなっている。

哺乳類細胞は IRE1、PERK、ATF6 の 3 種の小胞体膜貫通型 UPR センサー分子を発現している。IRE1 は酵母から哺乳類まで広く保存されており、下流の活性型転写因子 XBP1 により転写誘導機構を制御している。PERK は線虫以降の後生動物で翻訳抑制機構、転写誘導機構を制御している。ATF6 は哺乳類細胞では ATF6 α と ATF6 β が存在し、小胞体ストレス時に ATF6 は小胞体からゴルジ体に移行し、ゴルジ体に存在する 2 種のプロテアーゼによって切断され、膜から遊離した活性型の転写因子となり、ATF6 α が小胞体シャペロン遺伝子の転写誘導に必要な十分な転写因子として機能することが分かっている。本研究では UPR における ATF6 の意義を明らかにするために、ATF6 の活性化制御機構の解析、および ATF6 標的遺伝子の同定を行った。

ATF6 α を切断するプロテアーゼ S1P、S2P は小胞体ストレスに関わらず常時活性型でゴルジ体に存在しているため、ATF6 の活性型への変換にはストレスの感知およびゴルジ体への移行が重要なステップである。第 1 章では ATF6 α の小胞体内腔領域にアラニン置換変異を導入し、小胞体ストレス依存的なゴルジ体への移行を起こさない変異体 ATF6 α (Mut B12) の作製に成功した。この変異体 ATF6 α の解析より、ATF6 α のゴルジ体への移行の既知の制御因子である、小胞体シャペロン BiP のストレス依存的な解離や、酸化還元による制御以外にも制御因子が存在することが示唆された。野生型、変異型 ATF6 α を用いた今後の新規制御因子の同定により、ATF6 α の活性化制御機構が解明されると期待される。

筆者の所属する研究室で最近 ATF6 α/β ノックアウトマウスを作製し、MEF 細胞を解析した結果、ATF6 α が既知の小胞体シャペロンや ERAD 因子の転写誘導に必要であることが示された。この解析で調べられた UPR 標的遺伝子は、既知の遺伝子のみであったため、第 2 章では ATF6 α の欠損 MEF 細胞を用いたマイクロアレイ解析を行い、ATF6 α の標的遺伝子の広範な同定を行い、小胞体ストレス時の ATF6 α の標的遺伝子として、30 種の遺伝子を同定した。その 40% が小胞体シャペロンや ERAD 因子の遺伝子で、20% が小胞体で機能する蛋白質の遺伝子であることを明らかにした。また、IRE1-XBP1 経路とは異なり、ATF6 α は分泌輸送関連遺伝子の転写は制御していないことも示した。これらの結果より、酵母からヒトまで一貫して IRE1 経路が UPR 転写制御を広く行っているのに対し、ATF6 α は小胞体内の蛋白質の品質管理に関わる遺伝子の転写制御に特化した転写因子として、哺乳類動物のような高等動物で初めて UPR に重要な役割を担うようになったと結論付けた。

(論文審査の結果の要旨)

分泌系タンパク質の高次構造形成の場である小胞体の機能が阻害され、高次構造の異常なタンパク質が蓄積すると、真核細胞は小胞体ストレス応答を活性化させ、小胞体の恒常性を維持しようとする。すなわち、新規タンパク質合成を停止させて小胞体の負荷を軽減させ、小胞体局在性分子シャペロンやフォールディング酵素（以後小胞体シャペロンと略す）を転写誘導して高次構造形成能を強化し、小胞体関連タンパク質分解構成因子を転写誘導して、異常タンパク質を排除する。小胞体ストレス応答は酵母からヒトまで広く保存された生体防御機構であるが、酵母からヒトまで共通しているのは、小胞体シャペロンと小胞体関連タンパク質分解構成因子の転写誘導機構である。

ATF6 α は、哺乳動物細胞での小胞体シャペロンの転写誘導に関与するタンパク質として単離された転写因子であるが、通常時は小胞体に埋め込まれたII型の膜貫通型タンパク質として合成されている。小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積すると、ATF6 α は選別されてゴルジ装置へと輸送され、そこでS1P、S2Pという2つのプロテアーゼにより連続的に切断される。この切断により膜から遊離した細胞質側断片は、転写因子として必要なドメインを全て備えており、核へ移行して小胞体シャペロン遺伝子のプロモーター上に存在するシス配列ERSEに結合して小胞体シャペロンを転写誘導する。

細胞レベルでのATF6 α の解析において、残された重要課題は、ATF6 α の活性化機構の解明と標的遺伝子の確定であった。安達はこの2つの課題に取り組み、以下の重要な成果を挙げた。

ATF6 α の内腔領域にアラニン置換を導入した種々の変異体を作製して解析した結果、10個のアミノ酸をアラニン置換すると、小胞体内に異常タンパク質が蓄積してもゴルジ装置へ移行しないことを見いだした。この変異体でも、野生型の場合と同様に、小胞体シャペロンが解離すること、還元型モノマーATF6 α にこの変異を導入してもゴルジ装置への移行が起こらないことから、これまで未知のステップがこの変異により阻害されたと考えられた。本変異体の単離は、ATF6 α 活性化機構解明において極めて重要な貢献である。

ATF6 α を欠損するマウス胎児線維芽細胞を用いてゲノムワイドな解析を行った結果、ATF6 α 標的遺伝子として30個の遺伝子を同定した。その内、60%にあたる18個が小胞体シャペロン、小胞体関連タンパク質分解構成因子、小胞体局在性タンパク質をコードしており、小胞輸送関係の遺伝子をATF6 α は制御していないことから、ATF6 α は小胞体におけるタンパク質の品質管理に特化した転写であるという極めて明瞭かつ重要な結論が得られた。本発見は小胞体ストレス応答の進化的変遷を考える上でも貴重な資料となった。

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た。また、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。