

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	岡本 暁彦
論文題目	小胞体ストレス時に PERK を介して誘導される rRNA 新生抑制機構の研究		
(論文内容の要旨)			
<p>小胞体内に構造異常蛋白質が蓄積すると (小胞体ストレス)、細胞は翻訳抑制、小胞体シャペロンの誘導、小胞体関連蛋白質分解、アポトーシス等の様々な細胞応答を引き起こす (小胞体ストレス応答)。小胞体ストレスは、神経変性疾患、糖尿病、動脈硬化、癌、双極性障害といった様々な疾患発症に関わる可能性が報告され、近年注目を浴びている。</p> <p>申請者は、ラジオアイソトープ [<math>\alpha</math>-<math>^{33}\text{P}</math>]UTP を培地に混ぜて細胞を培養すると、新規合成された RNA が [<math>^{33}\text{P}</math>] で標識されることを見だし、この標識された RNA を電気泳動後プロットングし、オートラジオグラフィを撮ることで、RNA、特に rRNA の合成過程を可視化できることを示した。そして、この一連の方法を <b>Visualization of rRNA synthesis (VRS)</b> 法と名付けた。続いて、この VRS 法を用いて rRNA 合成に影響を与えるストレスや薬剤の探索を行った。その結果、小胞体ストレスが誘導される条件下で rRNA への [<math>^{33}\text{P}</math>] の取り込みが減少し、バンドの濃さが減少することを見いだした。一方、合成を終えた rRNA は、小胞体ストレス下でも安定であった。以上の結果から、小胞体ストレス下では、rRNA の新生抑制が起こると結論した。</p> <p>小胞体ストレスは PERK、ATF6、IRE1 の 3 つセンサー分子によって感知され、その情報が伝達される。RNAi 法を用いてどのセンサー分子が rRNA の新生合成阻害に関わるかを調べたところ、ツニカマイシンやタプシガルギン処理による小胞体ストレスは PERK を介して rRNA 新生合成阻害を誘導していることが明らかになった。一方、プロテアソーム阻害剤によって小胞体ストレスを誘導した場合は、PERK がノックダウンされた状態でも rRNA 新生合成阻害が起こることが判明した。</p> <p>PERK は翻訳抑制とアポトーシス誘導に関わることが知られている。そこでこれらのメカニズムが rRNA と関係しているかどうかを調べた。その結果、PERK 下流でアポトーシス誘導に関わる転写因子 CHOP は rRNA 新生抑制には関与しないことが明らかになり、一方、PERK の下流に位置する eIF2<math>\alpha</math> の Ser51 のリン酸化を介した翻訳抑制が rRNA の新生抑制に重要であることが示された。即ち、eIF2<math>\alpha</math> のノックダウンやプロテアソーム阻害剤処理によってもタンパク質の翻訳抑制と同時に rRNA の新生抑制がおこること、さらにサイクロヘキシミドで翻訳を抑制した場合にも rRNA の新生抑制が誘導されることが見いだされ、蛋白質の翻訳抑制が共通に rRNA の新生抑制を引き起こすことが示された。さらに、rDNA プロモーターを用いたレポーターアッセイにより、小胞体ストレス下で rRNA の転写が抑制されることが示された。</p> <p>eIF2<math>\alpha</math> の Ser51 のリン酸化を介した翻訳抑制は、小胞体ストレス時のみならず、ウイルス感染、UV 被曝、アミノ酸飢餓時にも引き起こされることが知られているが、これらのストレスは必ずしも全てがタンパク質の翻訳抑制を必要とするとは考え難く、これらのストレス下での翻訳抑制には何か別の意義があると思われていた。本研究において、翻訳抑制が共通に rRNA の新生を抑制することが明らかになり、ストレス応答の新たな一面が解明された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、rRNAの合成を検出する新たな方法論の確立とその方法を用いて小胞体ストレス時にPERKを介したrRNAの合成抑制が引き起こされることを明らかにしたものである。

小胞体ストレス時、ウイルス感染、UV被爆、アミノ酸飢餓といったストレス時に共通して、翻訳開始因子であるeIF2 $\alpha$ の51番目のSerがリン酸化を受け、細胞全体での翻訳抑制が引き起こされることが示されていた。これらのストレスは必ずしも全てがタンパク質の翻訳抑制を必要とするとは考え難く、これらのストレス下での翻訳抑制には何か別の意義・作用があると思われていたが、その実態は未解明であった。

申請者は、細胞膜を通過しないと考えられていたヌクレオチド三リン酸の1つUTPの放射性標識化合物 [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTPを培地に加えることで、放射性活性が細胞に取り込まれ、さらに、合成過程のRNAに取り込まれることを始めて示した。また、標識されたRNAを回収し、northern blotを行い、オートラジオグラフィを撮ることで、RNA、特にrRNAの合成過程を可視化できることを示し、この一連の方法を **Visualization of rRNA synthesis (VRS)法**と名付けた。

続いて、このVRS法を用いてrRNAへの放射性活性の取り込みに影響を与えるストレスや薬剤を検索した結果、ツニカマイシンやタブシガルギン、プロテアゾーム阻害剤等の小胞体ストレスを誘導する薬剤の処置で、rRNAへの放射性活性の取り込みが著しく減弱することを見いだした。一方、すでにrRNAに取り込まれた放射性活性は、これらの薬剤処理の影響を受けないことから、小胞体ストレスによって、rRNAの分解ではなく、rRNAの新規合成が阻害されると結論した。さらに、3つの主要小胞体ストレスセンサーのうちPERKが、ツニカマイシンとタブシガルギンの作用を仲介していること、プロテアゾーム阻害剤によるrRNAの新生抑制は、必ずしもPERKは必要としないことを示した。

PERKの下流では、アポトーシスの誘導と翻訳抑制が引き起こされる。その内アポトーシス誘導に関わる転写因子CHOPは、小胞体ストレス時のrRNA新生抑制には関与しないことを明らかにし、一方、eIF2 $\alpha$ のSer51のリン酸化を介した翻訳抑制がrRNAの新生抑制に重要であることを示した。即ち、プロテアゾーム阻害剤処理時には、PERKの有無に関わらずeIF2 $\alpha$ リン酸化と翻訳抑制が起こること、さらに、eIF2 $\alpha$ のノックダウンによってもタンパク質の翻訳抑制と同時にrRNAの新生抑制がおこることを見いだした。また、サイクロヘキシミドで翻訳を抑制した場合にもrRNAの新生抑制が誘導されることを示した。即ち、本研究によって、蛋白質の翻訳抑制が共通にrRNAの新生抑制を引き起こすことが示された。

本論文は、新たなrRNAの合成過程を解析する方法としてVRS法を開発し、そのVRS法を用いて、小胞体ストレス時にPERKから誘導される翻訳開始因子eIF2 $\alpha$ の51番目のSerがリン酸化による翻訳抑制が、rRNAの新規合成を抑制するという新たな小胞体ストレス応答機構を解明したものである。本研究成果は、これまで不明であったいろいろなストレス下で観察される翻訳抑制の意義に関して、rRNAの合成抑制という新たな作用点を解明したものである。したがって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成22年8月3日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、論文の表題及び部分的な内容・図表を修正の上、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日