

氏名	おかだてつや 岡田 徹也
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	生博第15号
学位授与の日付	平成16年3月23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	生命科学研究所高次生命科学専攻
学位論文題目	哺乳動物小胞体ストレス応答を制御する膜結合性転写因子ATF6の標的 ならびに活性化プロセスに関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 根岸 学 教授 垣塚 彰 教授 小堤保則

論文内容の要旨

高次構造の異常な蛋白質が小胞体内腔に蓄積するという、いわゆる小胞体ストレス条件下において活性化される小胞体ストレス応答は、酵母から哺乳動物まで真核生物に広く保存されている生体防御機構である。小胞体ストレスにさらされた細胞は、この応答により小胞体シャペロンをはじめとする多種多様な分子を転写レベルで誘導してストレスに適応しようとする。

哺乳動物の小胞体ストレス応答に関与する転写因子として単離されたATF6は、小胞体膜を一回貫通したⅡ型の膜蛋白質として構成的に発現しており、小胞体ストレスを受けた細胞中ではプロテオリシスを受け、その結果膜から遊離したATF6の細胞質側領域が核へ移行して標的遺伝子の転写を促進することが知られていた。本研究では、このように特徴的な活性制御機構を有する膜結合性転写因子ATF6の標的遺伝子を広範に同定することにより小胞体ストレス応答におけるATF6の意義を明らかにし、さらにその活性化プロセスの解明を試みた。

第一章では、DNAマイクロアレイを用いて約2000種のヒト遺伝子を対象とした解析を行い、そのうち20種の遺伝子が小胞体ストレスにより転写誘導されることをまず明らかにした。次に活性型ATF6の安定発現株を樹立してATF6経路の標的遺伝子を検索し、先に同定した20種の遺伝子のうち小胞体の機能保持に働く8種の遺伝子（このうち7種は小胞体シャペロン遺伝子である）がATF6により特異的かつ包括的に制御されていることを明らかにした。残りの応答遺伝子群の多くは蛋白合成やアミノ酸代謝に関与する遺伝子であったが、これらの誘導に関しては、小胞体膜貫通型プロテインキナーゼPERKが制御する転写誘導経路が主要な役割を担っていることを強く示唆する結果も得た。

第二章では、小胞体ストレスに応答したATF6のプロテオリシスを抑制する化合物の探索を行い、セリンプロテアーゼ阻害剤である4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) にその効果があること、ならびにAEBSF存在下では小胞体シャペロンの誘導が抑制されることを見いだした。本研究進行中に、小胞体ストレス依存的なATF6のプロテオリシスが、細胞内コレステロール量の恒常性維持に働く転写因子SREBPの切断酵素であるSite-1 protease (S1P) ならびにSite-2 protease (S2P) により行われることがYeらによるATF6のトランスフェクション実験で示された。そこでこの知見を利用し、AEBSFにより阻害されるプロテアーゼがS1Pであることを内在性ATF6を用いて明らかにした。また、S1Pがゴルジ装置局在性のプロテアーゼであることから予想されていたように、通常は小胞体に局在する内在性ATF6が小胞体ストレスに応答してまずゴルジ装置へ移行し、そこで切断された後に核へ移行するというATF6の活性化プロセスを間接蛍光抗体法により証明した。興味深いことに、AEBSF存在下においてもこのATF6のゴルジ装置への移行は正常に起こった。この結果は、AEBSFを用いることでATF6の移行と切断を分離して解析することが可能となることを意味していた。したがって、ATF6の活性化プロセスをより詳細に解析する上でAEBSFが有用なツールになると考えられた。

以上、本研究はDNAマイクロアレイ解析および薬理学的解析という二つのアプローチにより、小胞体膜結合性転写因子ATF6の標的と活性化プロセスを明らかにしたものであり、哺乳動物小胞体ストレス応答の解明に大きく寄与するものであ

る。

論文審査の結果の要旨

岡田徹也氏は、生命科学研究科に提出した学位論文「哺乳動物小胞体ストレス応答を制御する膜結合性転写因子ATF6の標的ならびに活性化プロセスに関する研究」の根拠論文として下記の2報を筆頭著者として既に発表している。

- (1) T. Okada, H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi and K. Mori (2002) Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.*, 366, 585-594.
- (2) T. Okada, K. Haze, S. Nakanaka, H. Yoshida, N. G. Seidah, Y. Hirano, R. Sato, M. Negishi and K. Mori (2003) A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J. Biol. Chem.*, 278, 31024-31032.

小胞体にストレスがかかると細胞は多数の遺伝子の転写を誘導し、小胞体の恒常性を維持しようとすることが知られており、この情報伝達に関わる経路としてATF6経路とPERK経路の2つが知られていた。岡田氏は論文(1)で、マイクロアレイの技術を使って約2,000の遺伝子の発現パターンを解析し、小胞体ストレスにより誘導される遺伝子20個を、ATF6経路で誘導されるものとPERK経路で誘導されるものに分類することによって、ATF6経路の活性化は小胞体内の恒常性維持に直結すること、PERK経路の活性化は小胞体ストレスから回復を促進することを明らかにした。このように小胞体ストレス応答において2つの経路が全く異なる役割を果たすという岡田氏の結論は本分野の発展に大きく貢献する顕著な業績と考える。また、論文(2)において岡田氏は、小胞体膜結合性転写因子であるATF6の活性化プロセスを解析し、ATF6の活性化が小胞体内の恒常性維持に極めて重要な役割を果たすことを示すとともに、ATF6活性化の阻害剤を同定してその有用性を示した点は高く評価できる。さらに、平成16年1月27日に本論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。以上より、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。