

| | |
|---------|--|
| 氏名 | かわはらてつし 川原哲史 |
| 学位の種類 | 博士(薬学) |
| 学位記番号 | 論薬博第705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2項該当 |
| 学位論文題目 | 出芽酵母の小胞体ストレス応答を制御する転写因子Haclpの同定と発現調節機構に関する研究 |

論文調査委員 (主査) 教授 川 寄 敏 祐 教授 河 合 明 彦 教授 中 山 和 久

論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞の小胞体は、新規に合成された分泌蛋白質あるいは膜蛋白質が高次構造を形成するオルガネラである。しかしながら、小胞体ストレスと総括される種々の条件下では、小胞体内に高次構造の異常な蛋白質が蓄積し、その機能が著しく阻害される。このとき細胞は小胞体内に存在する分子シャペロンやフォールディング酵素を転写レベルで誘導し、蓄積した異常蛋白質に対処して恒常性を維持する。この細胞応答は小胞体ストレス応答あるいはUPR (unfolded protein response) と呼ばれ、その成立には以下の4つの仕組みが必要とされる。

- ①小胞体内に異常蛋白質が蓄積したことを感知する仕組み
- ②この情報を小胞体外(細胞質側)に伝達する仕組み
- ③情報を細胞質から核へ伝える仕組み
- ④核内で転写誘導を実行する仕組み

UPRの解析は、遺伝学的手法を駆使することのできる出芽酵母を用いて大きく進展した。すなわち、④のうち、UPR標的遺伝子のプロモーター上に存在するシス配列が22bpからなるUPRE (UPR element) として同定され、①と②を一挙に行う分子として小胞体膜貫通型リン酸化酵素 Ire1p が単離された。しかし、④のうちUPREに結合して転写を活性化する転写因子の実体ならびにその転写因子と Ire1p をつなぐ情報伝達機構③は全く不明であった。

本研究は、これら未解明の仕組みを明らかにすることを目的として行ったものであり、その成果を以下の三章において要約する。

第一章 出芽酵母の小胞体ストレス応答を制御する転写因子 Haclp の同定

シス配列UPREの構造活性相関を詳細に解析し、1塩基Cを挟んだE-box (CANNTG) 様のセミパルンドロミックな配列 (CAGCGCG) が最も重要な配列であることを明らかとした。次に、得られた情報をもとにUPRE結合蛋白質をone-hybrid法を用いて探索し、Haclpを単離した。Haclpを構成的に活性型の蛋白質として発現させた酵母では、標的遺伝子の構成的な発現誘導が認められた。一方、*HAC1* 遺伝子座を破壊した株は標的遺伝子の誘導能を喪失した。さらに、HaclpはUPREに直接結合した。よって、Haclpが出芽酵母のUPRに特異的な転写因子であると結論した。

第二章 Haclpの小胞体ストレス依存的発現調節機構の解析

抗Haclp抗体を用いた蛋白質レベルの解析から、Haclpは小胞体ストレスを受けた細胞内でのみ発現することがわかった。次にmRNAレベルの解析により、*HAC1* 遺伝子は通常時も1.4kbのmRNAバンドとして構成的に転写されているが、小胞体ストレスを負荷した場合には1.2kbのバンドへと低分子化することを見だし、この低分子化が252塩基からなるイントロンの切り出し、つまりスプライシングに起因することを証明した。イントロンを含まない*HAC1* cDNAを発現させると、構成的に1.2kbの成熟型mRNAが検出され、標的遺伝子群も構成的に転写誘導された。また、イントロンの存在によって1.4kbの前駆体mRNAの翻訳が抑制されていることを明らかにした。これらの結果から、UPRを制御するHaclpの発現は、小胞体

ストレスに応答して誘導されるスプライシング反応によって調節されていると結論した。

第三章 Haclpの発現を制御するmRNAスプライシングの分子機構解析

*HAC1*前駆体mRNAの小胞体ストレス依存的なスプライシング反応の分子機構を解析し、スプライソソーム依存的なmRNAスプライシングの分子機構と比較検討した。その結果、両者では5'側および3'側の切断部位近傍の塩基配列ならびに切断順序が全く異なることを明らかにした。すなわち、*HAC1*のスプライス部位は特徴的なステム・ループ構造を形成し、ループ内の塩基配列が切断に重要であった。また、5'側と3'側のどちらが先に切断されても反応が進行した。よって、本スプライシング反応がこれまでに報告の無い極めてユニークなメカニズムであると結論した。

以上のように、小胞体ストレス→Ire1Pの活性化→*HAC1*前駆体mRNAのスプライシング→*HAC1*成熟型mRNAの生成→Haclpの翻訳合成→HaclpのUPREへの結合→標的遺伝子の転写誘導という出芽酵母UPR活性化の本流が本研究によって明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

真核生物の小胞体は、新規に合成された分泌タンパク質あるいは膜タンパク質のフォールディングやアセンブリの場であり、その内腔に存在している分子シャペロンがこれら分泌系タンパク質の折り畳みを助けている。種々のストレスによって小胞体内に正常な立体構造をとれない異常タンパク質が蓄積すると、分子シャペロンの発現量が転写レベルで増大されることが知られている。このような状況は小胞体ストレスと呼ばれており、このストレスに対処するため、細胞には小胞体内腔の異常タンパク質の蓄積を感知してその情報を核へと送り、小胞体シャペロン遺伝子の転写量を増大させるというシグナル伝達機構を備えている。このような小胞体ストレス応答 (UPR; unfolded protein response) は酵母からヒトにいたるまで普遍的に保存されている。小胞体内に異常タンパク質が蓄積したことを感知し、この情報を小胞体細胞質側に伝達する分子として、膜貫通型リン酸化酵素 Ire1pが単離され、また、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 (UPRE) が同定されていたが、UPREに結合して転写を活性化する転写因子 (UPRF) の実体ならびにその転写因子と Ire1pをつなぐ情報伝達機構は全く不明であった。

申請者は、これら諸点を解明することを目的として、出芽酵母における小胞体ストレス応答 (UPR) の分子機構に関する研究を行い、以下の新知見を得た。

申請者はまず、シス配列UPREの構造活性相関を詳細に解析し、C塩基を挟んだE-box (CANNTG) 様のセミパリンドロミックな配列 (CAGCGCG) が最も重要な配列であることを明らかとした。さらに、one-hybrid法によりUPREに結合するタンパク質としてHaclpを単離することに成功した。Haclpを構成的に活性型の蛋白質として発現させた酵母では、標的遺伝子の構成的な発現誘導が認められ、一方、*HAC1*遺伝子座を破壊した株は標的遺伝子の誘導能を喪失した。さらに、HaclpはUPREに直接結合することが明らかとなり、Haclpが出芽酵母のUPRに特異的な転写因子であることが証明された。

次いで、申請者は抗Haclp抗体を用いた解析から、Haclpは小胞体ストレスを受けた細胞内でのみ発現することを示した。また、mRNAレベルの解析により、*HAC1*遺伝子は通常時も1.4kbのmRNAバンドとして構成的に転写されているが、小胞体ストレスを負荷した場合には1.2kbのバンドへと低分子化することを見だし、この低分子化が252塩基からなるイントロンの切り出しに起因することを証明した。イントロンを含まない*HAC1c*DNAを発現させると、構成的に1.2kbの成熟型mRNAが検出され、標的遺伝子群も構成的に転写誘導された。また、イントロンの存在によって1.4kbの前駆体mRNAの翻訳が抑制されていることを明らかにした。これらの結果から、UPRを制御するHAC1Pの発現は、小胞体ストレスに応答して誘導されるスプライシング反応によって調節されていることが明らかとなった。さらに、*HAC1*前駆体mRNAの小胞体ストレス依存的なスプライシング反応の分子機構を解析し、これが、従来知られているスプライソソーム依存的なmRNAスプライシングの分子機構と異なる極めてユニークなメカニズムであることを明らかにした。

以上、本研究は小胞体ストレスに応答して転写を活性化する転写因子Haclpを発見し、小胞体Ire1pと核をつなぐ新しい情報伝達機構の存在を明らかにしたものであり、小胞体ストレス応答の機構解明を大きく進展させたものである。よって本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年3月1日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。