

氏名	おがわ なお き 尾川直樹
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第706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の活性ならびに発現量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 中山和久 教授 藤井信孝

論文内容の要旨

小胞体は真核生物に特徴的なオルガネラであり、新規に合成された分泌蛋白質や膜蛋白質が高次構造を形成する場として細胞機能に必須の役割を果たしている。これら分泌系蛋白質は小胞体局在性の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総称する)の介助を受けて、通常は効率よく折り畳まれている。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、折り畳み過程が阻害され、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異常事態が発生する。このとき細胞は、小胞体内部の異常を感知して核へ情報を伝達し、小胞体シャペロンをコードする遺伝子の転写を活性化することが知られていた。誘導された小胞体シャペロンが異常蛋白質に直接的に作用することにより小胞体の機能が保たれるのである。このような小胞体の恒常性維持に必須の細胞応答は、小胞体ストレス応答あるいはUnfolded Protein Response (UPR)と呼ばれている。

UPRの分子機構解析は、モデル生物である出芽酵母を用いて大きく進展した。まず、小胞体シャペロン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)として同定された。次いで、小胞体における異常を感知してこれを細胞質側に伝達する分子として小胞体膜貫通型蛋白質リン酸化酵素 Ire1p, UPREに結合して転写を実行する転写因子としてベーシック・ロイジンジッパー蛋白質 Haclpが単離された。さらに、Ire1pとHaclpの間をつなぐイベントとして、小胞体ストレス依存的な*HAC1* mRNAのスプライシングが発見された。すなわち、Haclpをコードする*HAC1* mRNAは恒常的に発現しているが、その内部に強い翻訳抑制作用を持つイントロンが存在するためにHaclpは合成されていない。小胞体ストレス下で小胞体内に異常蛋白質が蓄積するとIre1pが活性化され、その結果*HAC1*前駆体mRNAからイントロンが切除され*HAC1*成熟型mRNAが生成する。*HAC1*成熟型mRNAから翻訳されたHaclpがUPREを介して小胞体シャペロン遺伝子の転写を活性化するという図式である。

このように、Ire1p→Haclp→UPREという情報の大まかな流れが明らかにされていたが、個々のステップにおいて依然未解明な点が多く残されていた。本研究はHaclpの活性ならびに発現量の調節機構に焦点を当て、出芽酵母UPRのより詳細な仕組みを明らかにすることを目的として行なったものであり、その成果を以下の3章に要約する。

第一章 *HAC1* mRNAのスプライシングに伴うHaclp C末端置換の解析

*HAC1*前駆体mRNAは230個のアミノ酸からなるHaclpをコードしている。このmRNAがスプライシングを受けると、5'側のスプライス部位が読み枠の中にあるため、合成されるHaclpのC末端が置換される。すなわち、N末端から220アミノ酸領域は変わらないが、C末端の10アミノ酸が第2エキソンによってコードされている18アミノ酸に置換される。この置換の生物学的意味を追求し、スプライシング後Haclpに新たに加わる18アミノ酸領域が転写活性化ドメインとして機能することを見いだした。一方、DNA結合ドメインはスプライシングによって変化しない220アミノ酸領域に存在する。すなわち、*HAC1* mRNAが小胞体ストレス依存的なスプライシングを受けると、強い翻訳抑制作用を持つイントロンが除かれてHaclpが合成されると同時に、DNA結合ドメインと転写活性化ドメインが合体し、強力な転写活性化能を有する転写因子が細胞

内で発現することを証明した。

第二章 種々の小胞体シャペロン遺伝子プロモーター上の Haclp 結合部位の解析

代表的な小胞体シャペロンである Kar2p (HSP70ファミリーのメンバー) のプロモーター上に存在する UPRE の解析結果から、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 (CAGCGTG) が Kar2p の UPRE の機能に極めて重要であることが明らかにされていた。そこで他の小胞体シャペロン、Fkb2p (ペプチジルプロリルイソメラーゼ)、Pdilp (蛋白質ジスルフィド交換酵素)、Lhslp (HSP70ファミリーのメンバー) ならびに Euglp (蛋白質ジスルフィド交換酵素様タンパク質) のプロモーターを解析し、それぞれの小胞体ストレス応答に必須な UPRE 配列を同定して、そこに Haclp が結合することを示した。いずれの UPRE も、1塩基Cを挟んだE-box様の配列という定義にほぼ合致することから、UPRE のコンセンサス配列は CANCNTG であると結論した。Haclp 結合部位である UPRE がこのように特徴的な配列であることが、小胞体ストレス下では小胞体シャペロン遺伝子が誘導されるという特異性の基礎となっていると考えられた。

第三章 Haclp の自律的発現量調節機構の発見とその解析

転写因子 Haclp をコードする *HAC1* 遺伝子自身が小胞体ストレスに応答して転写誘導されることを見いだした。*HAC1* プロモーター上には実際に UPRE 配列が存在し、この配列に Haclp が結合することを明らかにした。機能的な UPRE を含む野性型の *HAC1* プロモーターから Haclp が発現される酵母は、長時間の小胞体ストレス下でも Haclp が持続的に発現し、生存した。一方、UPRE の機能を失わせた変異型の *HAC1* プロモーターから Haclp が発現される酵母では、Haclp の発現が持続せず、小胞体ストレス感受性となった。よって、Haclp の自律的発現量調節機構は、継続的な小胞体ストレス状況下における持続的な応答に必要であると結論した。

以上、Haclp の活性調節機構 (小胞体ストレスを受けた細胞では転写活性化能の高い Haclp が発現される)、特異性 (小胞体シャペロンのプロモーター上に存在する特徴的なシス配列を特異的に認識する) および発現量調節機構 (自律的な発現量調節により持続的な応答を可能にする) のいずれも、蓄積した異常蛋白質に対抗するという小胞体のニーズに合致しており、本研究により出芽酵母の UPR が極めて洗練されたシステムであることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

分泌系タンパク質は小胞体に局在する分子シャペロンやフォールディング酵素の働きにより、効率よく折り畳まれている。しかしながら、小胞体ストレスと総称される種々の条件下では、折り畳み過程が阻害され、高次構造の異常なタンパク質が小胞体内腔に蓄積する。このとき細胞は、小胞体内部の異常を核へ伝達し、小胞体シャペロンをコードする遺伝子の転写を活性化する。このような小胞体の恒常性維持に必須の細胞応答は、小胞体ストレス応答あるいは Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれている。UPR の解析においては、まず、小胞体シャペロンのプロモーター上に存在する 22bp からなるシス配列が UPRE (UPR element) として同定された。次いで、小胞体における異常を感知してこれを細胞質側に伝達する分子として膜貫通型タンパク質リン酸化酵素 Ire1p、UPRE に結合して転写を実行する転写因子として Haclp が単離された。さらに、小胞体ストレス依存的な *HAC1* mRNA のスプライシングが発見された。このように、Ire1p → Haclp → UPRE という情報の流れが明らかにされていたが、個々のステップにおいて依然未解明な点が多く残されていた。

申請者は、Haclp の活性ならびに発現量の調節機構に焦点を当て、出芽酵母 UPR のより詳細な機構を明らかにすることを目的として研究を行ない、次のような新しい知見を得た。

申請者はまず、*HAC1* mRNA のスプライシングに伴う Haclp C 末端置換を解析した。その結果、*HAC1* 前駆体 mRNA は 230 個のアミノ酸からなる Haclp をコードしているが、スプライシングを受けると、C 末端の 10 アミノ酸が第 2 エキソンによってコードされている 18 アミノ酸に置換されることを示した。興味深いことに、この 18 個のアミノ酸領域は転写活性化ドメインとして機能する。一方、DNA 結合ドメインはスプライシングによって変化しない 220 アミノ酸領域に存在する。すなわち、スプライシングにより強い翻訳抑制作用を持つイントロンが除かれて Haclp が合成されると同時に、DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインが合体し、強力な転写活性化能を有する転写因子が細胞内で発現することが明らかとなった。

次いで、申請者は代表的な小胞体シャペロンである Kar2p (HSP70ファミリー) のプロモーター上に存在する UPRE の解

析結果から、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 (CAGCGTG) がUPREの機能に極めて重要であることを明らかにしていた。そこで他の小胞体シャペロン、Fkb2p (ペプチジルプロリルイソメラーゼ)、Pdip (蛋白質ジスルフィド交換酵素)、Lhslp (HSP70ファミリーのメンバー) ならびにEuglp (蛋白質ジスルフィド交換酵素様タンパク質) のプロモーターを解析し、それぞれの小胞体ストレス応答に必須なUPRE配列を同定し、そこにHaclpが結合することを示した。これらの実験よりUPREのコンセンサス配列はCANCNTGであると結論された。Haclp結合部位であるUPREがこのように特徴的な配列であることが、小胞体ストレス下では一連の小胞体シャペロン遺伝子が誘導されるという特異性の基礎となっている。

申請者はさらに、転写因子Haclpをコードする*HAC1*遺伝子自身が小胞体ストレスに応答して転写誘導されることを見いだした。*HAC1*プロモーター上には実際にUPRE配列が存在し、この配列にHaclpが結合することを明らかにした。機能的なUPREを含む野性型の*HAC1*プロモーターからHaclpが発現される酵母は、長時間の小胞体ストレス下でもHaclpが持続的に発現し、生存した。すなわち、Haclpの自律的発現量調節機構は、継続的な小胞体ストレス状況下における持続的な応答に必要であることが示された。

以上、本研究はHaclpの活性調節機構、その普遍性および発現量調節機構を明らかにしたものであり、UPR機構の中心的な課題を明らかにしたものである。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。