

氏 名	は ぜ きょう すけ 土 師 京 介
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 665 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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	哺 乳 動 物 の 小 胞 体 ス ト レ ス 応 答 に 関 与 す る 転 写 調 節 因 子 ATF6 の 活 性 発 現 機 構 に 関 す る 研 究
論文調査委員	(主 査) 教 授 川 崧 敏 祐 教 授 市 川 厚 教 授 河 合 明 彦

論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞の小胞体は、分泌蛋白質や膜蛋白質が折り畳まれて正しい高次構造を獲得する場所であり、その内腔にはこのプロセスを介助・促進するため、小胞体シャペロンと総称される分子シャペロンや酵素が多数存在している。小胞体を通過する蛋白質の一過的な増加によりこの小胞体シャペロン量が不足する場合、あるいは外界の環境変化により小胞体での折り畳みのプロセスに支障が生じる場合には、小胞体内に高次構造の異常な蛋白質が蓄積し、小胞体の機能が著しく損なわれることになる。細胞はこのようないわゆる小胞体ストレスに対応して、小胞体シャペロンを転写レベルで誘導して小胞体内に動員し、小胞体の恒常性を維持する機構を有している。この小胞体ストレスに対する細胞の応答は、小胞体ストレス応答あるいは Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれている。

酵母における小胞体ストレス応答機構の詳細はすでに明らかにされ、UPR 特異的に働くシス制御配列ならびに転写調節因子が同定されている。一方、哺乳動物においては、近年 CCAAT (N9) CCACG をコンセンサスとするシス制御配列 ERSE が同定され、小胞体シャペロン遺伝子の転写誘導に必要十分であることが明らかにされた。この発見により、ERSE に特異的に結合し哺乳動物の小胞体ストレス応答を制御する転写調節因子の同定・解析が可能となった。この ERSE の CCAAT には、他の多くの遺伝子の転写調節に関与しているユビキタな転写調節因子 NF-Y が構成的に結合していることがすでに明らかにされていた。そこで著者は、本論文において ERSE の CCACG に結合して哺乳動物の小胞体ストレス応答に特異的に働く転写調節因子を探索し、以下の成果を得た。

第一章 小胞体シャペロン遺伝子の発現を制御する転写調節因子 ATF6 α の単離とその活性発現機構の解析

酵母 one-hybrid 法を用いて ERSE に結合する蛋白質 ATF6 α を単離し、ATF6 α が小胞体ストレス依存的なプロセシングにより活性化される膜結合性転写調節因子であることを見出した。すなわち、生化学的ならびに分子生物学的解析により、ATF6 α は定常時には小胞体に局在する II 型の膜貫通型糖蛋白質であることを明らかにした。細胞に小胞体ストレスが生じると、ATF6 α は特異的なプロセシングを受け、細胞質に位置する領域が小胞体膜より切り離されることを示した。この ATF6 α の細胞質領域には、転写活性化や DNA 結合など転写調節因子として必要な領域が全て揃っており、プロセシング後に小胞体から核へ移行して ERSE に直接結合し、標的遺伝子の転写を活性化することを示した。

第二章 ATF6 α に構造的に類似した蛋白質 ATF6 β の同定とその機能の解析

その塩基性領域が ATF6 α と高い相同性を有する蛋白質 ATF6 β を単離し、これまで機能不明であった ATF6 β が ATF6 α と極めて類似した性質を有することを示した。すなわち、ATF6 β は小胞体に局在する膜蛋白質であり、ATF6 α と同様に小胞体ストレス依存的なプロセシングを受けて活性型に変換され、核へ移行して ERSE に直接結合し、小胞体シャペロン遺伝子の転写を誘導することを明らかにした。

第三章 ATF6 α および ATF6 β を含む転写因子複合体 ERSF の解析

活性型 ATF6 α および ATF6 β がホモあるいはヘテロ二量体を形成して、ERSE の CCACG 部位に結合することを明らかにした。また、両転写調節因子の ERSE への結合は、ERSE を介した転写誘導と極めて良く相関することを示した。さら

に、これら活性型 ATF6 α および ATF6 β から転写活性化領域を欠損させた変異体は、内在性 ATF6 α および ATF6 β による転写誘導を抑制するドミナントネガティブ体として機能することを示した。以上より、小胞体シャペロン遺伝子の転写誘導を司る転写因子複合体 ERSF は、CCAAT に結合する転写調節因子 NF-Y から成る構成的コンポーネント、ならびに CCACG に小胞体ストレス依存的に結合する活性型 ATF6 α および ATF6 β から成る誘導的コンポーネントから構成されると結論した。

以上、本研究は哺乳動物の小胞体ストレス応答に特異的な転写調節因子として、小胞体に局在する膜結合性蛋白質 ATF6 α および ATF6 β を同定し、両分子による小胞体シャペロン遺伝子の転写誘導機構を明らかにしたものである。これらの著者の成果は、未解明であった哺乳動物の小胞体ストレス応答機構の解明に知見を寄与するものである。

論文審査の結果の要旨

生体は紫外線や乾燥などの外的要因のみならず、熱ショックをはじめ低酸素、虚血、炎症、ウイルス感染などの生理的あるいは病理的なストレスに遭遇すると、ストレスタンパク質と総称される一群の分子シャペロンや酵素の発現を誘導してストレスに対応する。細胞が熱ショックを受けた場合に、細胞質に局在する熱ショックタンパク質 (Heat shock, rotein : HSP) と呼称される一群の分子シャペロンが誘導されて温度変化に適応する現象は、熱ショックストレス応答として広く知られている。一方、小胞体には細胞質に局在する HSP とは異なる小胞体シャペロンと呼ばれる一群の分子シャペロンや酵素が存在する。最近、真核生物細胞は小胞体内の異常タンパク質の蓄積を感知してその情報を核へ伝達し、一群の小胞体シャペロンを転写レベルで多量に誘導して小胞体に動員する機構を備えていることが明らかになった。この小胞体ストレスに対する一連の細胞の応答は、小胞体ストレス応答あるいは Unfolded protein response (UPR) と呼ばれている。哺乳動物における小胞体ストレス応答機構に関しては、1998年、小胞体ストレスに応答して転写誘導される遺伝子上に新規のシス制御配列として小胞体ストレス応答エレメント (ER stress response element : ERSE) が見いだされた。この ERSE の同定により小胞体ストレスに特異的に働く転写調節因子の探索に道が開かれた。

本研究は、まず、ERSE に結合するタンパク質 ATF6 を単離し、ATF6 が小胞体に局在する II 型の膜貫通型糖タンパク質として構成的に発現しており、小胞体ストレスに応答してプロセッシングを受けることを明らかにした。この ATF6 の小胞体ストレス依存的なプロセッシングは、単に ATF6 の分子量を変化させるのみならず、その細胞内局在性を変化させた。すなわち、ATF6 は膜結合性の前駆体から可溶性の活性型 ATF6 に変換され、小胞体から核へ移行して ERSE に直接結合し、標的遺伝子の転写を活性化することを示した。次に、その塩基性領域が ATF6 と高い相同性を有するタンパク質 G13/CREB-RP (cAMP-response-element-binding protein-related protein) を単離し、これまで機能不明であった G13/CREB-RP が ATF6 と極めて類似した性質を有することを明らかにした。すなわち、G13/CREB-RP は小胞体に局在する膜タンパク質であり、ATF6 と同様に小胞体ストレス依存的なプロセッシングを受けて活性型に変換され、核へ移行して ERSE に直接結合し、小胞体シャペロン遺伝子の転写を誘導することを明らかにした。これらの結果より、ATF6 遺伝子および G13/CREB-RP 遺伝子発現産物を、それぞれ ATF6 α および ATF6 β と命名した。さらに、活性型 ATF6 α および ATF6 β がホモあるいはヘテロ二量体を形成して、ERSE に結合することを明らかにした。また、両転写調節因子の ERSE への結合は、ERSE を介した転写誘導と極めて良く相関することを示した。最後に、これら活性型 ATF6 α および ATF6 β から転写活性化領域を欠損させた変異体は、内在性 ATF6 α および ATF6 β による転写誘導を抑制するドミナントネガティブ体として機能することを示した。

以上、本研究は、哺乳動物細胞の小胞体に局在する膜結合性タンパク質 ATF6 α および ATF6 β を小胞体ストレス応答に特異的な転写調節因子として同定し、両分子による小胞体シャペロン遺伝子の転写誘導の分子機構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14年1月8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。