

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	安田 裕助
論文題目	メダカ小胞体ストレスセンサーIRE1 および PERK 活性化機構の比較解析 ならびにCOPII小胞巨大化関連因子Tango1L/SおよびTali/cTAGE5遺伝子破壊メ ダカの表現型解析		
(論文内容の要旨)			
第一章 メダカ小胞体ストレスセンサーIRE1およびPERK活性化機構の比較解析			
小胞体内腔は多数の新生ポリペプチド鎖の折りたたみが行われる場であり、分子 シャペロンによる折りたたみ介助や、小胞体関連分解による構造異常タンパク質の除 去を介して、構造異常タンパク質の存在量が低く保たれている。しかし、種々の生理 的あるいは病的状況下において小胞体内腔に構造異常タンパク質が平時以上に蓄積す る小胞体ストレス状態に陥ることが知られている。 真核細胞は小胞体ストレスセンサータンパク質を備えており、構造異常タンパク質 の蓄積量を減少させるような細胞応答を誘導する。中でも、IRE1は酵母における唯 一の小胞体ストレスセンサータンパク質であり、哺乳動物まで広く保存されていて、 転写因子XBP1をコードするmRNAに対して非典型的な細胞質におけるスプライシン グを起こすことにより小胞体内分子シャペロンや小胞体関連分解因子の転写を誘導す る。加えて、後生動物においては、eIF2αのリン酸化を介して細胞全体の翻訳抑制を 誘導し、構造異常タンパク質の再度の折りたたみならびに分解のための時間を確保す るPERKも存在する。 IRE1とPERKの間には、小胞体内腔側のストレスセンサー領域の一部に配列類似性 がみられ、発見当初から両者は進化上共通起源をもつと考えられている。しかし、全 く異なる細胞応答を誘導する2つの小胞体ストレスセンサータンパク質が、共通のセ ンサー領域によって制御されることは合理的とは考えにくい。従って、進化の過程 で、活性化の閾値、さらには検出する構造異常タンパク質の嗜好性までもが下流出力 に対して最適となるような選択圧が存在した可能性が考えられる。 このような観点から、本章においては、IRE1とPERKのセンサー領域の挙動を比較 した。小胞体ストレス誘導剤の添加による実験に加え、メダカの組織において生理的 に生じる小胞体ストレスに対する応答についても解析を行った。メダカにおいては、 IRE1α/β 二重破壊メダカの表現型より、発生初期の肝臓・尾・孵化腺(孵化時に卵殻 溶解酵素を分泌)においてIRE1を活性化するような生理的小胞体ストレスが存在する ことが示されている。 本研究により、メダカの肝臓・尾・孵化腺において生理的に生じている小胞体スト レスに対して、PERKの小胞体ストレスセンサー領域はIRE1の小胞体ストレスセン サー領域よりも活性化の程度が弱いことが明らかとなった。よって、IRE1とPERK は、進化の過程において、誘導する細胞応答の違いを反映した活性化条件を獲得し し、さらにIRE1とPERKの小胞体ストレス感知機構に関して以下の重要な示唆が得ら れた。IRE1の発見から30年以上も経過しているが、構造異常タンパク質がIRE1やPE			

RKと直接結合しているモデルと小胞体内分子シャペロンを介して結合しているモデルの2つが提唱され、未だ統一的理解が得られていない状況にある。本章の結果は、小胞体内分子シャペロンを介したモデルにおいて予想される結果と合致せず、IRE1やPERKの小胞体ストレス感知機構において、検出する構造異常タンパク質の嗜好性に違いが生じる機構が寄与することを示す。センサータンパク質が構造異常タンパク質と直接結合するモデルにおいては認識する構造異常タンパク質の種類に差が生じることから、本章の結果により、直接結合モデルが小胞体ストレスの感知に寄与している可能性が示唆された。

本章の結果は、薬剤を用いて誘導した小胞体ストレス応答を解析した類似の先行研究とは異なり、生理的小胞体ストレスを用いた解析を行う意義を示すものである。

第二章 COPII小胞巨大化関連因子Tango1L/SおよびTali/cTAGE5遺伝子破壊メダカの表現型解析

COPII小胞巨大化関連因子Tango1は、通常のCOPII小胞(60-90 nm)よりも大きな分子である長鎖コラーゲン(300 nm以上)を分泌する際にCOPII小胞を巨大化する因子として同定された。Tango1はER exit siteに局在する膜貫通タンパク質であり、細胞質側のProline Rich DomainによりCOPII小胞の内側被覆タンパク質と結合し、外側被覆の形成を遅延させ、小胞を大きく成長させる。同時に、小胞体内腔側にはコラーゲンシャペロンであるHsp47と結合するSH3ドメインを有しており、巨大化したCOPII小胞へのコラーゲンの積み込みを促進する。

Tango1のスプライシングバリエントとして、上記機能を持つTango1Lに加えて、小胞体内腔側領域をほとんど欠失したTango1Sが存在する。加えて、Tango1のパログとしてTango1Lと類似のドメイン構造を持つTango1-like (Tali)が発見され、小胞体内腔側のSH3ドメインはChylomicronやVLDLの表面に存在するApoBと結合する。Chylomicronも通常のCOPII小胞よりも大きな複合体であるため、TaliはChylomicronの分泌に必要であるものと考えられる。興味深いことに、Taliにも小胞体内腔側領域をほとんど欠失したスプライシングバリエントであるcTAGE5が存在する。先行研究においては、それぞれのスプライシングバリエントがどのような機能を担っているのかを示す解析結果が不十分であったことから、第二章においては、それぞれのスプライシングバリエント特異的な欠損メダカを用いた解析を行った。

所属研究室卒業生により既に樹立済みのTango1L-破壊/Tango1S-破壊/Tali-破壊/cTAGE5-破壊メダカ系統を用いて、各スプライシングバリエントのmRNA量をqRT-PCRにより定量し、スプライシングバリエント特異的なノックアウトを実現できていることを確認するとともに、片方のバリエントが欠損されたことによってもう片方のバリエントの転写量が補償的に増大する可能性を否定した。また、1-7日目の野生型メダカ胚における各スプライシングバリエントの存在量を絶対定量し、いずれの日齢においても、Tango1LはTango1Sの9倍程度、cTAGE5はTaliの1.5-5倍程度存在することを示した。

加えて、Tango1S-破壊メダカは、成魚までの生存率が有意に低いことを明らかとし

た。これは当該系統において初めて見出された表現型である。さらに、I型コラーゲンの免疫染色を行い、II型コラーゲンと同様に、Tango1L-破壊メダカにおいてのみ正常な分泌が阻害されていることを示した。Tango1LがTango1Sと比較して多量に存在していることが明らかとなり、Tango1L-破壊メダカ系統においては、Tango1Sと共通していてCOPII小胞の巨大化に必要とされるドメインの発現量の大部分が失われることとなる。このことがTango1L-破壊メダカの表現型の原因である可能性が考えられる。一方で、Tango1S-破壊メダカにおいても表現型が見出されたことにより、Tango1Sには、そのドメインを全て含むTango1Lによっては補償できない機能が存在することが明らかとなった。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文はまず、進化的に保存されていると考えられている小胞体ストレスセンサータンパク質 IRE1 と PERK の感知機構に違いがあることを、遺伝子改変メダカを利用して生理的小胞体ストレスに対する応答を用いて初めて明らかにした。ついで、マウスにおいてコラーゲンタンパク質の様な巨大タンパク質を細胞外へ輸送する過程で重要となる COPII 小胞の巨大化に関与することが示されている 2 遺伝子 (Tango1 と Tali) 4 スプライシングバリエーション (Tango1L/Tango1S/Tali/cTAGE5) のうち、メダカでは Tango1L のみが生育と長鎖コラーゲンの細胞内輸送に必須であることを初めて示した。本論文は、多数の遺伝子改変メダカの作製とその表現型解析を多く行うことで可能となる研究であり、小胞体ストレス応答および細胞内分子輸送の理解深化に寄与する重要な知見をもたらすものである。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 7 年 3 月 13 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降