

學位審查報告書

(ふりがな)	いしかわ　ときろう
氏　　　　　名	石川　時郎
学位（専攻分野）	博　　士　（　理　学　）
学　位　記　番　号	理　　博　　第　　　　　号
学位授与の日付	平成　　年　　月　　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	理学研究科生物科学専攻
(学位論文題目)	
遺伝子改変メダカを用いた小胞体ストレス応答の生理的意義の解析	
論　文　調　査　委　員	(主査)　　森　和俊　教授 七田　芳則　教授 阿形　清和　教授

京都大学	博士（理学）	氏名	石川 時郎
論文題目	遺伝子改変メダカを用いた小胞体ストレス応答の生理的意義の解析		
(論文内容の要旨)			
真核細胞において、小胞体は膜タンパク質や分泌タンパク質が折り畳まれて立体構造を獲得する場として機能している。しかし、小胞体ストレスと総称される様々な環境下では小胞体内での折り畳みがうまく行かず、立体構造が異常となった構造異常タンパク質が小胞体内に蓄積してしまう。細胞はこれに対処するため、小胞体ストレス応答とよばれる生体防御機構を発動させ、タンパク質の翻訳を一時停止させることで小胞体の負荷を軽減し、分子シャペロンの転写を誘導することで折り畳み能力を増強し、小胞体関連分解構成因子を転写誘導することで分解能力を増強する。 これらの 3 つの経路の役割は遺伝子破壊マウスによって解析されており、いずれの経路も個体の生存に不可欠であることが示されている。しかしながら、マウスを使った実験系では二重遺伝子破壊による各経路の相互作用の解析や発生期の表現型の解析が困難であるという問題が存在する。そこで本研究ではメダカを用いた新しい実験系を構築し、小胞体ストレス応答の包括的な解析を試みた。 第一章では、メダカ細胞を解析し、メダカが哺乳類と同じタイプの小胞体ストレス応答を有していることを示した。すなわち、メダカ細胞に PERK 経路、ATF6 経路、IRE1 経路が機能的な形で存在していることを明らかにした。これにより、硬骨魚類以降の脊椎動物において『高度な小胞体ストレス応答』が保存されていることがわかった。これにより、メダカをマウスに代わるモデル生物として用いることが可能となった。 第二章では、小胞体ストレス応答の各経路の生理的意義を解析するためのツールとして、5 種類の小胞体ストレスセンサー分子の遺伝子破壊メダカ系統をそれぞれ作出した。興味深いことに、5 つのセンサー分子を単独で破壊した際には表現型を示さなかったが、2 つの遺伝子を二重に破壊した系統では致死となることがわかった。すなわち、それぞれの経路が協調して機能していることが示唆された。また、小胞体局在性シャペロン BiP の発現部位と発現量を緑色蛍光タンパク質遺伝子 <i>EGFP</i> の発現によって可視化した遺伝子導入系統を作出した。この系統では小胞体ストレスに応答して、EGFP の蛍光が増加するため、小胞体ストレス応答がいつ、どこで活性化しているのかを生理的な条件で解析することが可能となった。 第三章では、<i>ATF6</i> α、β 二重破壊メダカを作製し ATF6 が個体で果たしている役割を解析した。その結果、二重遺伝子破壊メダカは、二重遺伝子破壊マウスと同じく胚性致死となり、脊索の形態に異常が生じること、小胞体シャペロン BiP の発現量が低下していることがわかった。さらに小胞体シャペロン BiP が発生初期に必要であり、かつ、その過剰発現が <i>ATF6</i> 二重破壊メダカの表現型を回復させるために十分であるという結果を得た。すなわち、ATF6 が活性化されて小胞体シャペロン BiP を転写誘導することが発生の初期に非常に重要であることが示された。これにより、マウスでは解析困難であった <i>ATF6</i> の生理的な意義を、メダカを用いることで明らかにすることができた。			

(論文審査の結果の要旨)

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の折り畳みの場として機能している。小胞体内で正しく折り畳まれたタンパク質はゴルジ体に輸送され、それぞれが働くべき場所に送られる。しかし、折り畳みに失敗した構造異常タンパク質は細胞質に引き出されプロテアソームによって分解される。このように小胞体内には、『正常なタンパク質を選別して輸送系に回し、構造異常タンパク質を識別して分解する』というタンパク質の品質管理機構が備わっている。しかし、様々な生存環境下においては、この機構が破綻し、構造異常タンパク質が小胞体に蓄積することが起こりうる。このような状況に対して、細胞は小胞体ストレス応答を活性化して小胞体の恒常性を維持する。

これまでの解析により、小胞体ストレス応答に関わる因子が多数単離され、哺乳類では3つの経路(PERK、ATF6、IRE1)が機能していることがわかり、それらの個体における重要性は遺伝子破壊マウスを使った逆遺伝学的解析によって確かめられた。しかしながら、それぞれの経路がどのようにストレスを感知して処理しているのかについては十分な知見が得られておらず、また、ユビキタスに発現している小胞体ストレスセンサー分子のノックアウトマウスがなぜ組織特異的な表現型を示すかなど、小胞体ストレス応答の本質について理解されたとは言い難い状況である。

石川はマウスでは上記の疑問に対する回答を得ることは困難と考え、小胞体ストレス応答の生理的意義解明のための新たなモデル生物として、メダカに着目した。メダカは小型であるため、大量飼育が可能である。ゲノム情報が解読されている他、遺伝子抑制、遺伝子破壊、遺伝子導入の手技が確立しており、遺伝学による解析を行うことができる。また、卵生であるため発生の観察が容易である。色素を持たない透明系統も樹立されているため、元々透明である発生期のみならず、成体になっても蛍光タンパク質によるライブイメージングが可能である。さらに、線虫やショウジョウバエとは異なりメダカは脊椎動物であり、哺乳類と比較的近縁である。

石川はまず、メダカ培養細胞を用いて、哺乳動物の場合と同様に、3つの経路(PERK、ATF6、IRE1)が機能していること、ならびに小胞体内に存在する分子シャペロンの転写誘導に ATF6 経路が用いられていること(線虫やショウジョウバエでは IRE1 経路が用いられている)を明らかにし、メダカが小胞体ストレス応答の生理的意義を解析するうえで優れたモデル生物となることを証明した。

次に、5種類の小胞体ストレスセンサー分子の遺伝子破壊系統、および小胞体ストレス応答の活性化を蛍光タンパク質により可視化する系統の作出を行った。

最後に、遺伝子破壊系統と遺伝子導入系統を用いてマウスでは解析困難であった *ATF6 α* 、 *β* 二重破壊メダカを解析し、*ATF6* 機能の完全喪失は、脊索の発達を阻害し、胚性致死の原因が *ATF6* を介した小胞体シャペロンの転写誘導の欠如によることを証明した。

このように石川の研究は小胞体ストレス応答分野に全く新たな方向性をもたらした。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、平成24年1月24日に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。