

論文内容の要旨

申請者氏名 緒方 麻衣子

小胞体が様々な刺激により機能異常をきたすと、小胞体内に異常な折り畳みをもつ蛋白質が集積する現象を小胞体ストレスという。細胞はこのストレスに対し、**unfolded protein response (UPR)**と呼ばれる応答機構を活性化する。これまでアルツハイマー病やハンチントン病などの異常蛋白蓄積を伴う神経変性疾患において、小胞体ストレスがその発症メカニズムに関わることが多数報告されているが、また近年になり、細胞内の長寿命蛋白質やオルガネラなどの分解（バルク分解）を担う系であるオートファジーと神経変性疾患との関連性についても注目されるようになってきている。本研究において私は、小胞体ストレス応答の一環として、オートファジーが活性化していることを見出した。まず最初に、ツニカマイシンやサブシガルジンにより小胞体ストレスを負荷した神経芽細胞腫 **SK-N-SH** 細胞の電子顕微鏡による観察を行うと、ストレス処理後 2-6 時間で、オートファゴソームに特徴的な所見である、オルガネラを取り込んだ 2 重膜形成が高頻度に観察された。オートファジーのマーカーとして知られる **LC3** の動態を蛍光顕微鏡による観察とウエスタンブロッティングにより検討したところ、小胞体ストレス時に **LC3** がプロセッシングを受け活性化し、オートファゴソームに局在していることが観察されたことから、小胞体ストレス時にオートファジーが活性化することが明らかになった。次に、小胞体ストレスセンサーのうち、**IRE1** をノックアウトした細胞では小胞体ストレス誘導オートファジーが観察されなかったことから、小胞体ストレスによるオートファジーのシグナルは **IRE1** の下流であることが示唆された。さらに、各種変異体・阻害剤を用いた実験により、小胞体ストレス時のオートファジーには、**IRE1-JNK** 経路が必要であることが示唆された。オートファジーの阻害剤である **3-methyladenine** を処理すると小胞体ストレスによる細胞死が増強され、またオートファジー不全株である **ATG5** 欠損細胞、**ATG5** ノックダウン細胞でも同様に小胞体ストレスに対する抵抗性は減弱していたため、オートファジーは小胞体ストレスから細胞を保護している可能性が示された。**JNK** は細胞死を誘導する経路として知られているが、薬剤の刺激時間を調節した実験により、早い段階での **JNK** 活性化がオートファジー活性に寄与し、**JNK** 活性が長く続いた場合に細胞はアポトーシスを起こすことが示された。以上の結果から、オートファジーは小胞体ストレス応答機構の経路のひとつとして活性化し、小胞体ストレスから細胞を保護する役割を果たしている可能性が強く示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 緒方 麻衣子

小胞体ストレス反応はタンパク質のフォールディングとタンパク質の品質管理の上で非常に重要な細胞内ストレス反応系であり、様々な疾患との関与が指摘されている。申請者は、小胞体ストレス応答の一環として、オートファジーが活性化していることを見出した。オートファジーは、細胞内のバルク分解系であり、こちらもまた多様な生命活動や疾病において重要であると近年注目を集めている。当研究は、1) 電子顕微鏡を用いた観察、2) オートファゴソーム膜に局在する LC3 に GFP タグをつけた GFP-LC3 発現ベクターによる GFP の細胞内局在の観察、3) LC3 のウェスタンブロッティングによる観察、などから、小胞体ストレスによってオートファジーが誘導されていることを初めて示した。また、小胞体ストレスセンサーの各種ノックアウト・ノックダウン細胞を用いて、小胞体ストレスセンサー IRE1 がオートファジー誘導に必要であることを示し、さらに IRE1 の各種変異体と JNK 阻害剤を用いた実験により、IRE1 の kinase domain から JNK 経路を介してオートファジーが活性化していることを見出した。当研究では、またオートファジーの阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) を用いて、3-MA を前処理すると小胞体ストレスによる細胞死が増強されることが、オートファジー不全株である ATG5 欠損細胞、ATG5 ノックダウン細胞でも同様に小胞体ストレスに対する抵抗性が減弱していたこともあわせて、オートファジーは小胞体ストレスから細胞を保護している可能性が示された。オートファジーが細胞の生存に寄与しているのか、それとも細胞死を誘導するのか、その細胞内における意義についてはまだ結論が出ないが、以上の研究結果は、小胞体ストレス応答の一部としてのオートファジーの存在を示し、疾病との関与も含めて今後の研究開発の可能性を広げる大きな成果である。したがってこの成果は学術上、応用上貢献するところがきわめて大きく、よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認める。