

# 論文内容の要旨

申請者氏名 及川 大輔

小胞体で合成されたタンパク質は、正しい高次構造を形成した後、小胞輸送により細胞内の目的の場所へ運ばれる。何らかの要因で正しい高次構造の形成が阻害されると、小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積した、小胞体ストレス状態が発生してしまう。細胞は、これを回避するために、BiP に代表される小胞体シャペロン遺伝子等の発現を誘導する。これまでの研究から、細胞は、小胞体膜タンパク質 Ire1 を介して小胞体ストレス状態を感知するとされてきた。通常は Ire1 に結合している BiP が、小胞体ストレス時には、異常タンパク質のリフォールディングを行うために Ire1 から解離し、結果、フリーになった Ire1 が小胞体膜上でホモ会合し、細胞質領域での自己リン酸化を介して活性化する。つまり、BiP の結合が Ire1 の活性化を負に制御しており、小胞体ストレスに応じた BiP の解離が、そのまま Ire1 のホモ会合と活性化につながると考えられていた。しかし本研究における Ire1 小胞体内腔領域の解析によって、上述の BiP 依存的なモデルとは違った、新たな Ire1 活性制御機構の存在が強く示唆された。

本研究では、まず、Ire1 小胞体内腔ドメインの 10 アミノ酸残基欠失スキニングを行い、その必須性に応じて、N 末から膜貫通領域直前までを 5 つのサブ領域に分け、それらをサブ領域 I から V と命名した。活性に必須とされるサブ領域 II、および VI は、構造的にも強固であることが Ire1 小胞体内腔ドメイン全長の組換えタンパク質を用いた限定分解から分かった。この領域を Core 領域と名付け、*in vivo*、あるいは *in vitro* 解析を行ったところ、この Core 領域が Ire1 のホモ会合成を担うことが明らかになった。

また、Ire1 の活性制御に重要だと思われた BiP の結合領域は、サブ領域 V であり、また、この領域を欠くサブ領域 V 欠失変異体 Ire1 は、BiP と結合しないにも関わらず、野生型と同じように小胞体ストレスに応じてホモ会合し活性化することが分かった。このことは、Ire1 のホモ会合および活性化には、BiP の解離以外の事象が必要であることを示唆している。

さらに、小胞体内腔に Core 領域のみを持つ Ire1 変異体、Core 変異体は、BiP と結合せず、また恒常的にホモ会合しているにも関わらず、その活性化は、野生型と同じようにストレスに応じて ON/OFF 制御されていた。また、小胞体内腔領域への一アミノ酸置換 (S96P) の導入により、Core 変異体が恒常的に活性化されることから、Ire1 の活性化には BiP の解離及びホモ会合だけでは不十分であり、さらに、これらとは別の活性制御機構 (S96P 変異によりバイパスされる) が小胞体内腔において ON になる必要があると考えられた。また、Core 変異体はエタノールなど小胞体ストレス以外の要因でも活性化することから、「別の活性制御機構」は、それ単独では応答の精度が低いと考えられた。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 及川 大輔

小胞体は膜タンパク質や分泌タンパク質の合成やその立体構造の組み立てなどを行うだけでなく、構造異常タンパク質が生成しないよう監視する品質管理機構も有している。細胞内外からの種々のストレスにより構造異常タンパク質が蓄積することを小胞体ストレスと呼び、細胞はそのストレスを解消するために **Unfolded Protein Response (UPR)** と呼ばれるストレス応答をする。UPR が起こるためには小胞体内の環境異常をサイトゾル/核へと伝えるシグナル伝達機構が必要である。構造異常タンパク質の蓄積という情報を感知するセンサーとして I 型膜貫通タンパク質 **IRE1** が見出され、小胞体内腔の N 末端部分がセンサー機能をになっていると考えられているが、構造異常という特定の構造をもたないタンパク質をどのように認識しているのかは、今のところ謎である。1 つだけ明らかになっていることは、小胞体シャペロンの **BiP (Hsp70 ファミリータンパク質)** が非ストレス下では **IRE1** に結合しその 2 量体化を抑えていることである。異常タンパク質が蓄積してくるとシャペロンタンパク質 **BiP** は構造異常タンパク質に結合するため **IRE1** への結合がはずれ、**IRE1** の 2 量体化が起こり活性化し、サイトゾル側のキナーゼによるリン酸化、それに伴う **RNase** の活性化により標的 mRNA のスプライシングが起こり情報が伝わると考えられている。申請者はセンサーとしての **IRE1** 自体の機能に着目しこの問題に挑戦し **IRE1** 自体が積極的に活性化に関与しているだけでなく、完全な活性化にはいくつかのステップを必要とするという以下の新知見を得た。

- 1) 酵母 **Ire1** の小胞体内腔側ドメインの変異株をもちいた解析により、**Ire1** N 末端側ドメインは N 末側から I—V と名付けた 5 つのサブ領域に分けることができ、サブ領域 II と IV はセンサー機能に必須である。
- 2) **BiP** 結合領域は V であり、この領域を欠失した変異 **Ire1** には **BiP** は結合しない。またそれにも関わらず、野生型同様に小胞体ストレスに応答する機能を有している。すなわち **Ire1** 自体が小胞体ストレスを感知する能力を有している。
- 3) 組換え **Ire1** を用いたプロテアーゼによる限定分解実験により、サブ領域 II-IV (コア領域) は強固に折り畳まれている。
- 4) **Core** 変異体は **BiP** と結合せず、恒常的にホモ会合体を形成しているにも関わらず活性化しておらず、活性化には小胞体ストレスを必要とする。
- 5) **Core** 変異体の N 末領域に特定のアミノ酸変異を導入すると恒常的活性化型に変わる。

以上のように、本論文は **Ire1** のストレス感知機構に関し新しい概念を導入したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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た。