

論文内容の要旨

申請者氏名 山田 誠子

小胞体ストレスとは一般に、小胞体におけるタンパク質の高次構造形成が不全をきたし、構造異常タンパク質が小胞体内に蓄積することをいう。真核細胞には、この状態を回避するために、小胞体ストレス応答機構が備わっている。小胞体ストレス応答として当初から知られていたのが、小胞体内在性分子シャペロンの転写レベルでの発現誘導である。本研究は、小胞体ストレス応答により発現が誘導される新規遺伝子を、HeLa 細胞を用いたサブトラクション法を用いて検索することから開始した。その結果、脂質代謝関連遺伝子 STARD4 cDNA を新規に取得し、その転写機構の解析を行った。

ヒト STARD4 の発現誘導がプロモーター領域に依存していることを、様々な小胞体ストレス誘導剤を用いてレポーターアッセイにより確かめた。この STARD4 プロモーター領域内には、小胞体ストレス依存的活性型転写因子 ATF6 により制御されるシスエレメント ERSE (ER Stress response Element) 様の配列が 3 つ存在する。そこで活性型 ATF6 やドミナントネガティブ型 ATF6 を用いて STARD4 遺伝子プロモーター領域の活性化レベルを調べる実験を行ったところ、STARD4 遺伝子の発現誘導に ATF6 が関与していることが示された。また、各 ERSE 様配列の重要性を調べるため、これらの配列に対し個別に変異を導入し、そのプロモーター活性の評価を行ったところ、ERSE 様配列のひとつに変異を導入したときにプロモーター活性化レベルが半分以下にまで低下し、この ERSE 様配列が機能していることが示された。

STARD4 mRNA の発現量を経時的に調べると、他の小胞体ストレス応答標的分子とは異なり小胞体ストレスにより一過的に上昇した後、数時間で元のレベルにまで低下する。アクチノマイシン D で転写反応を止めて STARD4 mRNA 量の変化を調べたところ、他の mRNA に比べて速く減少しているということは認められなかった。よって、STARD4 発現レベルの小胞体ストレスによる一過的な上昇後の急速な低下は、STARD4 mRNA の選択的な分解亢進ではないと考えられ、そのメカニズムは未だ不明である。

STARD4 の局在を調べるため、一過的に発現させ細胞ライセートを超遠心法により分画すると、STARD4 は可溶性画分に認められた。さらに蛍光抗体染色を行ったところ、STARD4 はサイトゾルマーカースとして用いた HSC70 と似た染色パターンをとるが、濃く染まる領域が細胞膜近くに存在することが明らかになった。STARD4 はサイトゾルタンパク質であるが、細胞膜付近に集まり機能している可能性がある。

STARD4 は脂質結合ドメイン START を有し、脂質代謝に関わるとされる STARD 分子群に分類される。興味深いことに、小胞体ストレス応答のアウトプットとして最近、膜の形態や脂質組成の変化が着目されている。出芽酵母でも、小胞体ストレス応答経路の活性化により、脂質代謝関連の遺伝子の発現が誘導された。真核生物全般で小胞体ストレスに対応する手段として、小胞体膜の性状を変化させるという現象があると考えている。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 山田 誠子

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。B細胞が抗体産生のプラズマ細胞に分化する時には、小胞体が急激に発達するがその時に UPR 経路の活性化が必要なことが報告されている。小胞体が発達するためには膜合成が行われねばならず、UPR と脂質合成との関連が注目されているが、未だ明らかとなっていない。申請者は、UPR が起こった時に転写誘導される遺伝子をサブトラクション法で抽出した中に、今まで全く解析されていない脂質代謝に関連すると考えられる STARD4 遺伝子を見出した。STARD4 遺伝子は小胞体ストレスにより誘導されることを確認するとともに、その転写誘導機構に着目し以下の新知見を得た。

- 1) STRD4 遺伝子は、ツニカマイシン、タプシガルジンなどの小胞体ストレス誘導剤処理により転写レベルで誘導される。
- 2) レポーター遺伝子を用いてプロモーター領域の同定を試みたところ、転写開始点上流から 300bp 内に転写誘導能があり、その中に 3つの ERSE(ER stress response element)様配列を見出した。点突然変異を導入することにより種々の変異を導入しどの ERSE 配列が重要かをレポーターアッセイにより調べたところ、2番目の ERSE が大きく貢献していることがわかった。
- 3) 恒常的活性型 ATF6 の過剰発現によりレポーター遺伝子の発現が誘導され、ドミナントネガティブ型 ATF6 の過剰発現によりレポーター遺伝子の発現誘導が完全に抑えられたことから、STARD4 遺伝子の発現誘導に ATF6 が関与していることが示唆され、前項の結果を支持する結果を得た。
- 4) 小胞体ストレス時初期の STARD4 遺伝子の一過的発現誘導は、mRNA の分解昂進によるものではない。

以上のように、本論文は小胞体ストレス時における脂質代謝関連遺伝子 STARD4 の転写誘導機構を初めて明らかにしたもので、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。