

論文内容の要旨

申請者氏名 金本 聡自

<目的>

本論文は小胞体ストレス時における転写調節機構の解明および転写調節機構を応用した薬剤の開発を目的とした二つのテーマについて研究を行った。①小胞体ストレス時における転写調節機構の解明については、転写因子 XBP1 が小胞体ストレスに応答して結合する DNA 配列を *in vitro* の系で探索した。②転写調節機構を応用した薬剤の開発では、小胞体分子シャペロン BiP を転写誘導する化合物を見出し、その化合物の薬効を *in vitro* および *in vivo* の系で検討した。

<方法>

①小胞体ストレス応答時に XBP1 によって転写制御される MDG1 遺伝子のプロモーター領域を用いてレポーターアッセイを行った。様々なデリーションタイプ・レポータープラスミドを用いて、XBP1 によって制御される領域を絞り込んだ。また、ゲルシフトアッセイにより XBP1 が MDG1 プロモーター領域に結合するか検討した。

②BiP プロモーターによって発現が制御されるレポータープラスミドを用いて、レポーター遺伝子の発現を誘導する化合物のスクリーニングを行った。得られた化合物を用いてノザンブロット解析および RT-PCR 解析で BiP の誘導効果について検討した。また、化合物による小胞体ストレス誘導性細胞死の抑制効果を *in vitro* で評価した。さらに、*in vivo* における化合物の効果を脳虚血モデルマウスを用いて検討した。

<結果と考察>

①様々なデリーションタイプ・プラスミドによるレポーターアッセイの結果から、XBP1 が小胞体ストレス応答の際に MDG1 プロモーター領域の-142 から-139 に存在する ACGT コア配列を介して発現制御していることが示唆された。また、ゲルシフトアッセイの結果から、XBP1 が直接 ACGT コア配列に結合することが明らかになった。

②化合物スクリーニングの結果、BiP を発現誘導する化合物 BIX を見出した。半定量的 RT-PCR やウェスタンブロット解析の結果から、BIX は小胞体ストレスを惹起することなく BiP を発現誘導することが分かった。培養細胞に対して小胞体ストレス刺激をすると細胞死が誘発されるが、細胞を BIX で処理しておくこと小胞体ストレス誘導性の細胞死が抑制されることが判明した。マウスの脳室内に直接 BIX を投与すると BiP の発現が誘導されたことから、BIX が *in vivo* でも効果を発揮することが分かった。脳虚血モデルマウスを用いた実験の結果から、BIX が虚血による脳組織の損傷を抑制することが明らかになった。

<結論>

①XBP1 が小胞体ストレス応答時に MDG1 の転写を誘導する際、MDG1 プロモーター領域の ACGT コア配列に結合して発現調節していることが明らかになった。

②化合物 BIX は小胞体ストレスを惹起することなく BiP を誘導し、小胞体ストレス性の細胞死を抑制する効果を持つことが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 金本 聡自

近年、小胞体ストレス応答機構について多くの知見が蓄積されてきたが、未だメカニズムの全容解明には至っておらず、いくつかのシグナル経路についての詳細も明確ではない。

本論文では、小胞体ストレス応答機構に着目した二つのテーマについて研究を行っており、一つは小胞体ストレス応答時に機能する転写因子 **XPB1** による標的遺伝子に対する発現調節機構の解明を取り上げている。これまで、**XPB1** は標的遺伝子のプロモーター領域に存在する **ERSE** や **UPRE** と呼ばれるコンセンサス配列に結合して、標的遺伝子の発現を調節すると報告されていた。しかしながら、標的遺伝子の全てがプロモーター領域中に既知のコンセンサス配列を有しているわけではなく、また、小胞体ストレス応答時にこれらのコンセンサス配列が機能的かどうかは明らかになっていなかった。本論文では、**ERSE** などのコンセンサス配列をプロモーター領域に持たない **XPB1** の標的遺伝子 **MDG1** に着目し、**MDG1** プロモーター領域を利用して小胞体ストレス応答時における **XPB1** の転写調節に関わる新たな *cis* 配列の同定を試み、その結果、新たに **ACGT** コア配列を見出した。この結果は、**XPB1** による標的遺伝子の転写制御に多様性があることを示唆しており、この多様性によって特定の標的遺伝子の発現を厳密かつ巧妙に調節している可能性が推察された。本研究は小胞体ストレス応答における転写調節機構についてその1経路を明らかにしたものである。

ついで、後半では小胞体分子シャペロンを人為的に転写誘導させる化合物の開発とその化合物をスクリーニングし、その結果新規の化合物 **BIX** を得ている。これは小胞体ストレスを惹起することなく小胞体分子シャペロン **BiP** を発現誘導することが示された。また、*in vitro* において **BIX** が小胞体ストレス誘導性の神経細胞死を抑制することを明らかにされた、さらに、*in vivo* においても、脳虚血モデルマウスを用いた実験から、**BIX** が虚血による脳組織の障害を抑制することを示した。したがって、**BIX** は小胞体ストレスが関与する各種疾患における小胞体ストレスによる障害性を抑制することを示唆し、今後の発展が期待される薬物である。

以上のように、本論文は小胞体ストレス応答機構の一端を解明し、また将来的に小胞体ストレス応答機構を利用した薬物開発をおこなったもので、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。