論文内容の要旨

申請者氏名 今川 佑介

細胞がグルコース飢餓などのストレスを受けると、小胞体でのタンパク質の折りたたみに不具合が生じ、構造異常タンパク質が小胞体内に蓄積する。この状態は、小胞体ストレスと呼ばれ、細胞にとって致命的である。そこで細胞は、これらのストレスに対抗するため、Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれる一群の遺伝子の転写レベルでの誘導とタンパク質の翻訳抑制からなる細胞内シグナル経路や Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD) と呼ばれる異常タンパク質をユビキチン-プロテアソーム系により分解する経路を活性化する。小胞体ストレスセンサー分子 IRE1 は、小胞体ストレス応答において重要な分子のひとつであり、哺乳動物には IRE1 α と IRE1 β の二つのパラログの存在が知られているが、小胞体ストレス応答におけるその役割は異なっている。IRE1 α は、小胞体ストレス条件下で転写因子 XBP1 の mRNA をスプライソソーム非依存的に選択的スプライシングすることにより、小胞体分子シャペロンや ERAD 関連因子などの UPR 標的遺伝子群を転写レベルで誘導する。一方、IRE1 β は、同条件下で 28S rRNA の部位特異的切断およびタンパク質の翻訳抑制を導くことが示されている。

本論文は、この IRE1 の各機能の詳細を明らかにすることを目的に、(1)「IRE1 α と IRE1 β の機能の違いにおける RNase 領域の役割」、(2)「XBP1 mRNA スプライシングの *in vitro* での解析」の 2 点について解析を行った結果をまとめたものである。

まず「IRE1 α と IRE1 β の機能の違いにおける RNase 領域の役割」について解析を加えた。特に IRE1 α と IRE1 β の機能の違いに着目し、IRE1 α と IRE1 β の RNase 領域を入れ換えたキメラ体を作製し、その機能差がそれぞれの RNase 領域に依存することを培養細胞に強制発現させることにより *in vivo* の系で示し、次に各 IRE1 組換えタンパク質を用いて、その機能差がそれぞれの RNase 領域の基質特異性に依存することを *in vitro* の系で明らかにした。

また、小胞体ストレス応答特異的に観察される XBP1 mRNA スプライシングの分子機構は、IRE1 α によって切断されること以外ほとんどわかっていない。そこで、XBP1 mRNA スプライシングの分子機構をさらに詳細に解明するため、このスプライシング反応を IRE1 α 組換えタンパク質と細胞抽出液を用いて *in vitro* で再構成する系を構築した。XBP1 mRNA スプライシングは、核抽出液よりも細胞質抽出液で効率よく起きることから、この反応はサイトゾルで起きている可能性が高いことが示唆された。また、この反応には、GTP は必須であるが、ATP は必須ではないことがわかった。酵母 Ire1p によって引き起こされる HAC1 mRNA のスプライシングは、tRNA スプライシングと同様な機構で行われることがわかっており、GTP と ATP が必須であることが既に報告されていることを考えると、XBP1 mRNA スプライシング機構は、HAC1 mRNA スプライシングとは異なる新たなスプライシング様式である可能性が高いことが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 今川 佑介

小胞体ストレスセンサーである IRE1 は、真核生物すべてに保存されていると考えられているセンサーであるが、進化の過程で重複し哺乳動物細胞では IRE1 α 、IRE1 β という 2 つのパラログがある。IRE1 α は転写因子 XBP1mRNA のスプライシングに関与しており、ストレス存在下で小胞体品質管理に関わる遺伝子群の転写誘導を行ない、IRE1 β は 28S rRNA 切断活性をもっており、翻訳レベルを抑制することが知られている。本論文は、ヒト IRE1 の機能を明らかにする目的で、IRE1 α と IRE1 β の生理活性の違いが C 末端側の RNase 領域に依存していることを *in vivo*、*in vitro* で示すとともに、IRE1 α による XBP1mRNA のスプライシング反応の無細胞再構築系を考案し IRE1 α による XBP1mRNA 切断後のリガーゼ反応をになう分子の単離を試みたものである。

本論文第一章は、IRE1 α と IRE1 β の機能差異をになう領域の同定を試みたものである。申請者は両者の機能差異をになる領域は C 末側の RNase 領域にあると考え、その領域を入れ換えたキメラ遺伝子 6 種を作製し、それぞれの遺伝子を培養細胞で発現することにより、IRE1 α 活性は XBP1mRNA のスプライシングと BiP プロモータをもつルシフェラーゼレポーターアッセイで、IRE1 β は 28S rRNA 切断活性を指標として調べた。その結果 IRE1 α の RNase 領域をもつ IRE1 は、IRE1 α の活性を示し、IRE1 β の RNase 領域をもつ IRE1 は、IRE1 β の生理活性を強く示すことがわかった。次に IRE1 α 、IRE1 β それぞれのサイトゾル側部分の組換えタンパク質をバキュロウィルスを用いて作製し、XBP1mRNA と 28S rRNA の IRE1 による切断反応を *in vitro* で調べたところ、*in vivo* で調べた結果を支持する結果を得た。このことから、IRE1 の RNase 領域がそれぞれの特異性を規定しているという新知見を示した。続いて第二章では、IRE1 α の XBP1mRNA スプライシングに関与する未知分子を単離同定するための、*in vitro* のスプライシング再構築系について述べている。IRE1 α のサイトゾル側領域の組換えタンパク質と XBP1mRNA 前駆体に HeLa 細胞由来の無細胞抽出液を加えることにより XBP1mRNA スプライシング反応を試験管内で再現できることを初めて示すことに成功した。この反応系を用いて ATP, GTP 要求性について調べたところ、酵母の Ire1-Hac1mRNA の系とは異なることがわかり、哺乳動物の IRE1 α -XBP1mRNA のスプライシングは酵母の系と関与する因子が異なる可能性があることを示した。

以上のように、本論文は哺乳動物 IRE1 α 、IRE1 β の生理機能を明らかにするとともに、IRE1 α による XBP1mRNA 前駆体の細胞質スプライシング機構の解明に迫るもので、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。