

論文内容の要旨

申請者氏名 柳谷 耕太

動物細胞において、小胞体に変性タンパク質が蓄積した場合（この様な状態を小胞体ストレスと呼ぶ）、変性タンパク質センサーである小胞体膜タンパク質 IRE1 α が活性化し、転写因子 XBP1 の前駆体 mRNA(XBP1u mRNA)を二ヶ所の特異的部位で切断し、スプライシング反応を開始させる。このスプライシングによって ORF 中の 26 塩基のイントロンが切り出され、フレームスイッチが引き起こされる。スプライシングされた成熟型 mRNA(XBP1s mRNA)からは機能的転写因子が合成され、小胞体分子シャペロンなどの発現誘導を通して、変性タンパク質の毒性から細胞を守る。このスプライシング反応は細胞質で起こる非常にユニークな反応であるにもかかわらず、そのメカニズムは十分には理解されておらず、そもそも XBP1u mRNA がどのように小胞体膜上の IRE1 α に出会うのかについては全く明らかにされていなかった。そこで、IRE1 による XBP1u mRNA のスプライシング機構の中でも特に XBP1u mRNA と IRE1 α が出会うステップに着目して解析を行った。

ジギトニンを用いた細胞分画法によって、非ストレス条件下の細胞では XBP1u mRNA は膜上に分布することを見出した。さらに、XBP1u mRNA は IRE1 α によってスプライシングされ、XBP1s mRNA になると膜上から解放されることも明らかにした。XBP1u mRNA の変異解析から、XBP1u mRNA の膜局在化には XBP1u mRNA にコードされるタンパク質が必要であることを明らかにした。XBP1u mRNA の膜局在化能は Puromycin 処理によって著しく減弱することから、XBP1u mRNA は自身を翻訳中のリボソームから伸長中の新生ポリペプチドを介して膜にリクルートされる可能性を示唆する結果が得られた。さらに、XBP1u mRNA がコードする XBP1u タンパク質は C 末端側に存在する高度に疎水的な領域(HR)を介して膜に結合することを見出した。HR の欠失やアミノ酸置換による疎水性度の低下は変異体の mRNA の膜局在化能を大幅に減弱させたことから、XBP1u mRNA は自身を翻訳するリボソームから伸び出した新生鎖の HR を介して膜にリクルートされるという分子モデルを提唱することができた。最後に XBP1u mRNA が膜局在化の生理的意義を検証するために膜に局在化しない XBP1u 変異体を作製し小胞体ストレス時の IRE1 α によるスプライシング効率を調べたところ、野生型と比較して効率がかなり低下していたことから、XBP1u mRNA は膜に局在化することでスプライシングを効率化していることを明らかにした。

本研究は XBP1u mRNA の IRE1 α による細胞質スプライシングにおける未知のステップである XBP1u mRNA の膜局在化機構の存在とそのメカニズムを明らかにした。この機構の様に mRNA の成熟化のために自身がコードするタンパク質を利用する例は知られておらず、mRNA の細胞内局在化機構としても興味深い例を発見できたと考えている。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 柳谷 耕太

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 は酵母からヒトまで保存されているストレス応答であり、細胞の生存だけでなく発生や分化にも重要な応答経路であることが明らかとなってきた。真核生物すべてに保存されている経路は **IRE1 経路** であり、その標的分子は酵母などの下等真核生物では **HAC1 mRNA**、多細胞生物では **XPB1 mRNA** でいずれも転写因子をコードしており、活性化した **IRE1** による特殊なスプライシングを受けることが知られている。**IRE1** は小胞体膜上に局在する小胞体ストレスセンサーであり、分泌蛋白質経路にはいらぬはずの **HAC1/XPB1 mRNA** が、何故ストレス下で効率よくスプライシングを受けるのかは謎であった。

申請者は、動物細胞における **IRE1 α -XPB1** 経路において、転写因子 **XPB1** をコードする前駆体 **XPB1u mRNA** が小胞体膜に局在し、ストレス下で **IRE1 α** による細胞質スプライシングを受け成熟型 **XPB1s mRNA** に変換すると小胞体膜から遊離する、という新知見を得、その制御機構を分子レベルで明らかにした。まず申請者は、哺乳動物細胞を細胞分画しその分画に含まれる RNA を解析することにより、**XPB1u mRNA** の多くが膜画分に来ること、逆にストレス下で生成する **XPB1s mRNA** の多くはサイトゾル画分に来ることを見出した。次にこの膜への局在化が、①**XPB1u mRNA** インترون部分の特殊なループ構造によるのか、②イントロン配列によるのか、③翻訳されるタンパク質によるのかを、様々な変異型 **XPB1u mRNA** を作製し細胞に発現させることにより検討し、③の翻訳される **XPB1u** タンパク質のイントロン以降の配列 (3'断片と表記) に依存していることを見出した。さらに、puromycin 処理をすると **XPB1u mRNA** が膜から遊離すること、3'断片にコードされる疎水性領域 (HR2) が膜への局在化に必要なことを明らかにした。また、膜に局在化しない **XPB1u** 変異体を作製し小胞体ストレス時の **IRE1 α** によるスプライシング効率を調べたところ、野生型と比較して効率がかなり低下していることがわかった。以上の結果より、**XPB1u mRNA** は自身を翻訳するリボソームから伸長している新生鎖の **HR2** 領域を介して膜に局在化しており、この機構により小胞体ストレスに効率良く対応していることが明らかとなった。

以上のように、本論文は、小胞体ストレス時における **XPB1u mRNA** の膜局在化機構と局在化による効率良いストレス応答機構を分子レベルで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。