

論文内容の要旨

申請者氏名 中村 大祐

分泌タンパク質や膜タンパク質は小胞体膜結合型リボソームによって翻訳され、小胞体内へと送り込まれる。小胞体内に送り込まれたポリペプチド鎖は、糖鎖修飾を受けると共に小胞体分子シャペロンなどによって正しく折りたたまれ、機能的なタンパク質へと成熟する。タンパク質の折りたたみ能力を超えた新規合成タンパク質が小胞体内に流入してくると、折りたたみ不全のタンパク質が小胞体内に蓄積し、小胞体ストレスとなる。小胞体ストレスは細胞にとって有害であり、細胞は小胞体ストレスを感知し、緩和するための応答機構を有している。哺乳動物細胞においては、翻訳を抑制することにより小胞体への新規合成タンパク質の流入を防ぎ、小胞体ストレスを軽減する応答経路がある。その応答経路の起点となる小胞体ストレスセンサーとして、PERK と IRE1 β が知られている。PERK は、自身のキナーゼ活性により翻訳開始因子である eIF2 α をリン酸化することで翻訳を抑制する。IRE1 β はサイトゾル側にキナーゼ領域、リボヌクレアーゼ (RNase) 領域を有しており、自己リン酸化により活性化し、RNase として機能するが、その翻訳抑制機構の詳細はいまだ明らかとなっていない。本研究は IRE1 β の翻訳抑制機構を分子レベル・細胞レベルで明らかにすることを目的とした。

私は、PERK による翻訳抑制が非常に効率の高い翻訳抑制であるのに対し、IRE1 β による翻訳抑制の効率が低いことに着目した。細胞内における翻訳は、遊離型リボソームによる翻訳と小胞体膜結合型リボソームによる翻訳の大きく二つに分類することができ、前者は細胞質や核で機能するタンパク質、後者は分泌タンパク質や膜タンパク質を翻訳する。私は、PERK がこの両者の翻訳を抑制するのにに対し、IRE1 β は、膜結合型リボソームによる翻訳のみを抑制しているのではないかと考えた。この仮説を検証するために、遊離型および膜結合型リボソームによる翻訳を簡便に測定できるアッセイ系を構築し、解析を行った。その結果、IRE1 β が自身の RNase 活性によって膜結合型リボソームに翻訳される mRNA を減少させ、小胞体への新規合成タンパク質の流入を軽減していることが明らかとなった。さらに、先行研究により、IRE1 β がマウス大腸における粘液の合成、分泌を行う杯細胞に特異的に発現していることが明らかとなったため、杯細胞様の特徴を示すヒト大腸癌由来の細胞株、LS174T 細胞を用いた解析を行った。その結果、IRE1 β が粘液の主要構成因子であるムチン mRNA (MUC2 mRNA) を減少させることでムチンの合成量を負に制御し、これにより杯細胞の小胞体ストレスを軽減させ、小胞体ストレスによる細胞死から細胞を守っていることが明らかとなった。

本研究では、遊離型リボソームおよび膜結合型リボソームによる翻訳量を簡便に検出することが出来るとても有用なシステムを構築した。また、このシステムを用いて IRE1 β の翻訳抑制機構の新たな知見を見出した。さらに、IRE1 β が機能している杯細胞において、細胞種特異的な小胞体ストレスに対応するための応答機構を明らかにした点で大きな意義があると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 中村 大祐

小胞体は分泌タンパク質や膜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、哺乳動物細胞には **IRE1 α** と **IRE1 β** の二つのパラログが存在する。当研究室では、ヒト **IRE1 β** を同定し、**IRE1 β** の機能解析を行ってきた。培養細胞株への過剰発現実験において、**IRE1 β** が翻訳抑制やアポトーシスに関わる可能性を示唆していたが、**IRE1 β** の本来の機能や、その翻訳抑制機構については謎であった。

申請者は、**IRE1 β** が小胞体膜上で翻訳されている mRNA を減少させることで小胞体内に流入する新規合成タンパク質量を制限し、小胞体ストレスを軽減させることで細胞生存に貢献していることを明らかにした。まず申請者は、遊離型リボソームによる翻訳量と小胞体膜結合型リボソームによる翻訳量を簡便に検出するための系を構築した。同一細胞内で両者の翻訳量を検出できる系はこれまでになく、非常に有用な系である。この系を用いて申請者は **IRE1 β** の翻訳抑制が、小胞体膜結合型リボソームによる翻訳選択的であることを見出した。次に、この選択的な翻訳抑制に **IRE1 β** のキナーゼ活性が重要なのか **RNase** 活性が重要なのかを **IRE1 β** の変異体を用いて検証し、**RNase** 活性が重要であることを明らかにした。また、**IRE1 β** が自身の **RNase** 活性によって小胞体膜結合型リボソームによって翻訳される mRNA のみ減少させることを見出した。さらに、内在性 **IRE1 β** の発現細胞であるヒト大腸由来の粘液産生細胞(杯様細胞; **LS174T**)において、粘液の主要構成因子であるムチン(**MUC2**) mRNA の発現量を負に制御することで小胞体ストレスを軽減させ、細胞生存に貢献していることがわかった。以上の結果より、**IRE1 β** が小胞体ストレス時に小胞体への新規合成タンパク質を制限するために膜結合型リボソームによって翻訳されている mRNA を減少させ、小胞体の恒常性維持に貢献していることを明らかにした。

以上のように、本論文は、遊離型および膜結合型リボソームによる翻訳量を簡便に検出する非常に有用なアッセイ系を構築しただけでなく、杯細胞における **IRE1 β** の翻訳抑制機構を明らかにし、小胞体の恒常性維持に重要であることを明らかにした点で、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。