

論文内容の要旨

申請者氏名 Promlek Thanyarat

In all eukaryotic cells, impairment of protein folding in the endoplasmic reticulum (ER) leads to ER stress and evokes the unfolded protein response (UPR), which contributes to restoration of conditions in the ER lumen. The UPR is triggered by some transmembrane signal-transducing proteins, among which Ire1 is evolutionally conserved through eukaryotes. Ire1 carries kinase and RNase motifs on its cytosolic domain. Upon ER stress, Ire1 is oligomerized and autophosphorylated for its activation as an RNase. This results in cytoplasmic splicing, maturation in other words, of mRNAs encoding transcription factors, including yeast Hac1, which promote gene induction for the UPR. To explain the stress-sensing mechanism of Ire1, it is an attractive hypothesis that the luminal domain of Ire1 directly recognizes unfolded proteins accumulated in the ER. According to the X-ray crystal structure of the luminal domain of yeast Ire1, its dimer forms a groove-like structure, which sterically resembles that of the major histocompatibility complex and thus may capture unfolded peptides. Also, a recombinant fragment of the luminal domain of yeast Ire1 was shown to have an ability to interact with unfolded proteins. However, until now, *in vivo* association of Ire1 with unfolded proteins has not been presented.

In this study, a misfolded version of vacuolar carboxypeptidase Y (CPY), CPY*, was employed as an unfolded protein model for demonstrating the interaction of Ire1 with unfolded proteins in yeast cells. Immunofluorescent staining of a GFP-tagged version of CPY* (CPY*-GFP) exhibited that CPY*-GFP cannot reach to the vacuole but is retained in the ER lumen. Also, as expected, cellular expression of CPY*-GFP induced the UPR. Importantly, CPY*-GFP and Ire1 were crosslinked and co-immunoprecipitated from the cell lysates. This complex formation was impaired by the luminal domain mutations mutation points of which are located on or near the groove-like structure, suggesting that CPY*-GFP is directly captured by the groove-like structure. One of these mutations, the Delta-III mutation, considerably compromised Ire1's ability to evoke the UPR, while Delta-III Ire1 exhibited high-order oligomerization upon ER stress as observed in the wild type.

In the present study, I also generated an experimental technique to check autophosphorylation of Ire1, which includes electrophoresis of protein samples on acrylamide gels containing SDS and Mn²⁺-Phos-tag. By using this method, I noticed that ER stress-dependent phosphorylation of Ire1 is considerably compromised by the Delta-III mutation.

Based on the observations from this study and previous reports, here I propose a scenario for Ire1 sensing of and activation by unfolded proteins accumulated in the ER. Initially, ER stress causes dissociation of an ER-located molecular chaperone BiP from Ire1, which leads to dimerization of Ire1. Through homo-association of the Ire1 dimers, high-order oligomers of Ire1 are formed. Unfolded proteins are then captured by the groove-like structure of the luminal part of the Ire1 dimers, causing a conformational change in the cytosolic part to evoke the cytosolic events, autophosphorylation of Ire1 and activation of its RNase activity.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Promlek Thanyarat

小胞体は、細胞内で分泌蛋白質や膜蛋白質の折り畳みを行う細胞内小器官である。さまざまな病的要因によりこのプロセスが不全を来すことが知られており、そのような状態は小胞体ストレスと総称される。小胞体ストレスに対応して、細胞は小胞体ストレス応答を引き起こす。すなわち、小胞体分子シャペロンあるいは変性蛋白質分解因子などの発現が転写レベルで誘導され、細胞は小胞体ストレス状態を脱することができるのである。小胞体膜には、小胞体ストレスを感知し、小胞体ストレス応答のための細胞内情報伝達の起点となる蛋白質、すなわち小胞体ストレスセンサーが存在している。I 型膜貫通蛋白質 Ire1 は、高等動植物から酵母に至るあらゆる真核生物に保存された小胞体ストレスセンサーであり、小胞体ストレス応答についての研究において、もっとも注目されている分子であると言える。

小胞体ストレス応答における大きな謎のひとつは、小胞体ストレスセンサーがいかにして小胞体ストレスを感知し、下流にシグナルを発信すべく活性化するかということである。申請者は、出芽酵母 Ire1 をモデルケースとし、この疑問に正面から取り組んだ。

Ire1 の小胞体内腔ドメインは、X 線結晶構造解析や *in vitro* での生化学的解析から、変性蛋白質と直接的に相互作用する能力を有することが以前から知られていた。一方、申請者は酵母細胞抽出液を免疫沈降解析に供することにより、実際に酵母細胞内において、モデル変性蛋白質が Ire1 に会合することを見いだした。これは、「小胞体内腔に蓄積した変性蛋白質が Ire1 を活性化する」という仮説を、強く支持するものである。さらに申請者は、多様な変異を Ire1 に導入し、モデル変性蛋白質との会合を精査するとともに、これらの変異が Ire1 活性化における他の素過程（ホモ多量体化、自己リン酸化、小胞体ストレス応答経路へのアウトプット）に対してどのような影響を及ぼすのかについても調べた。そして、それらの知見を統合することを通じ、構造異常蛋白質の直接的な相互作用により Ire1 分子にどのような変化が起き、小胞体ストレス応答が惹起されるのか、明確なモデルを確立することが可能となった。なお、出芽酵母 Ire1 の自己リン酸化を迅速に評価する手法はこれまで存在しておらず、申請者は Phos-tag 電気泳動法を用いてそれを可能ならしめた。この手法により、Ire1 活性化過程における自己リン酸化の位置づけが明らかになったことは、申請者の研究における重要な副産物であると言える。

以上のように、本論文は、Ire1 が小胞体ストレスに応じて小胞体ストレス応答を惹起するメカニズムについて、従来は仮説にとどまっていたいくつかの点を明確にただけでなく、「ストレスセンサー蛋白質がいかにしてストレスを感知するか」という分子細胞生物学的に興味深い問題へのアプローチとして先鞭をつけるものであり、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。