

論文内容の要旨

申請者氏名 新谷 紗代子

分泌タンパク質の膜輸送の起点となる小胞体に不完全な折りたたみ状態のタンパク質が蓄積すると（この状態を「小胞体ストレス」と呼ぶ）、細胞に様々な障害をもたらす。そこで細胞はこの状態を感知し、これに対処するための応答経路を発達させてきた。ほ乳類動物では小胞体ストレス応答の一環として、転写因子 XBP1s の前駆体 mRNA (*XBP1u* mRNA) がスプライソーム非依存的に、細胞質にてスプライシングを受ける。この小胞体ストレス時におけるスプライシング反応は真核生物において広く保存されており、出芽酵母では小胞体ストレス時に転写因子 Hac1 の前駆体 mRNA がスプライシングを受ける。この *HAC1* mRNA スプライシング機構は詳細に解析されている一方で、*XBP1u* mRNA スプライシングに関する細かな分子機構、特にその連結反応の仕組みは不明である。そこで本研究では、未だ解析されていない *XBP1u* mRNA スプライシングにおける連結反応の分子機構を明らかにすることを目的とした。

まず私は、ほ乳類細胞における *XBP1u* mRNA スプライシング反応を解析するため、このスプライシング反応を *in vitro* で再構成した。現在までにこのスプライシング反応は細胞質で起こる事が報告されている。これまでの報告から予測されたように、ほ乳類細胞の細胞質に高い連結酵素活性が存在し、ほ乳類細胞質抽出液をもちいて *XBP1u* mRNA スプライシング反応の再構成に成功した。また現段階において、*XBP1u* mRNA スプライシングに関わる RNA ligase は同定されていない。そこで作成した *in vitro* 再構成系を利用して、この RNA ligase の精製を、カラムクロマトグラフィーをもちいた生化学的手法により行った。その結果、*XBP1u* mRNA スプライシングに関わる RNA ligase は複数の因子から構成されることが明らかになった。また興味深いことに、ほ乳類細胞質に存在する RNA ligase による *XBP1u* mRNA 切断断片の連結反応は、ホスホジエステル結合形成の過程において、酵母における *HAC1* mRNA スプライシング機構と異なる反応で行われていることが明らかとなった。

本研究では、細胞質で起きる *XBP1u* mRNA スプライシングを *in vitro* にて再構成した。またこの再構成系をもちいた解析により *XBP1u* mRNA スプライシングにおける連結反応の特徴が明らかとなり、*XBP1u* mRNA スプライシング連結反応は酵母 *HAC1* mRNA スプライシング連結反応と異なる機構であるという新たな知見を見いだした。*XBP1u* mRNA スプライシング再構成系という有用な解析手段を作成した点、そしてこの再構成系をもちいて得られた *XBP1u* mRNA スプライシング連結反応に関する知見は、*XBP1u* mRNA スプライシングに関する連結反応の分子機構の解明に寄与するという点から、本研究は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 新谷 紗代子

膜タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体内において正しく折り畳まれ、分泌される。しかし、細胞が様々なストレスにさらされると、小胞体内に不完全な折りたたみ状態のタンパク質が蓄積する。この状態を小胞体ストレスとよび、細胞に障害をもたらす。そこで、細胞には小胞体ストレスを感知し、小胞体シャペロンやタンパク質の分解に関わる分子の転写を促進することで小胞体ストレス状態を改善する応答機構が存在する。この応答機構を **unfolded protein response (UPR)** という。ほ乳類細胞における UPR 経路の一つに小胞体膜局在型のタンパク質 IRE1 α と転写因子 XBP1s で構成される IRE1 α · XBP1 経路が存在する。この経路は、小胞体ストレス時に、転写因子 XBP1s を誘導合成するために次のような巧妙な方法を用いている。この経路では、XBP1s の mRNA は、イントロンを持つ前駆体の形でサイトゾルに常在している。そのため転写因子 XBP1s が翻訳されるには、小胞体ストレスを感知し活性化した IRE1 α により、XBP1 前駆体 mRNA (XBP1u mRNA) がイントロン部分で切断され、その後 2 つの翻訳領域が連結されることが必要である。このスプライシングはスプライソソームに依存しない非常にユニークな反応であるが、しかしその連結反応の仕組みは現在まで不明であった。この特徴的なスプライシング反応は小胞体ストレス時に特異的に観察される機構であり、転写因子の翻訳に必須である。よって、小胞体ストレスに対する応答経路を理解する上で、このスプライシング機構の解明は重要である。

申請者は、XBP1u mRNA スプライシング反応を *in vitro* にて再構成し、この再構成系を用いて XBP1u mRNA スプライシングにおける連結反応の特徴を明らかにした。まず申請者は、ほ乳類細胞質抽出液を用いて、*in vitro* にて XBP1u mRNA スプライシング反応を再構成することに成功した。この系をもちいて申請者は XBP1u mRNA スプライシングに関わる RNA ligase の部分精製を行い、連結反応は 1 つのタンパク質ではなく、複数の因子が関わっている事を明らかにした。また申請者は、この XBP1u mRNA 切断断片の連結反応は酵母における HAC1 mRNA スプライシング機構と異なった反応で行われていることを示した。以上の結果より、申請者は *in vitro* 再構成系をもちいた解析によって、この特殊な XBP1u mRNA スプライシング機構の特徴を明らかにした。

以上のように、本論文は、XBP1u mRNA スプライシング機構を解析するための有用な *in vitro* 再構成系を構築しただけでなく、XBP1u mRNA スプライシング機構の特徴を新たに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。