# 論文内容の要旨

申請者氏名　　河　原　郁　美

環境要因によって変性タンパク質が小胞体内腔に蓄積することを小胞体ストレスと呼ぶ。この小胞体ストレスに対して Unfolded Protein Response (UPR)という生体応答が知られている。UPR を引き起こす小胞体ストレスセンサーとして、出芽酵母では Ire1p、高等真核生物では IRE1 が同定されている。Ire1p/IRE1 は小胞体膜貫通型タンパク質である。そのうち細胞質側の RNase ドメインは、UPR 関連転写因子 ***HAC1/XBP1*** の mRNA を部位特異的に切断し、スプライシングを誘導する。先行研究から、***HAC1/XBP1*** mRNA 上に 2 カ所存在する Ire1p/IRE1 切断部位には、それぞれ 5'-C(-3)NG(-1)NNG(+3)N-3' で表されるコンセンサス配列が存在し、G(-1)の 3' 末端側が切断部位であることが示されている。***HAC1*** mRNA にはコンセンサス配列を含む部位が 10 ヶ所あるが、Ire1p はスプライシング部位しか切断しないため、Ire1p の基質認識には配列認識を越えた高次構造認識の存在が示唆される。そこで本研究では、Ire1p による基質認識様式を決定するために、生化学的な手法と核磁気共鳴法を用いて ***HAC1*** mRNA の切断機構の解析を行った。

はじめに、タンパク質分解酵素による限定分解を行い、切断活性を保持した安定な RNase ドメイン(994-1115)を同定した。詳細な切断機構の解明のため、同定した RNase ドメインを用いて ***in vitro*** 基質切断実験を行った。その結果、Ire1p は 7 塩基のコンセンサス配列のみで部位特異的な切断を行う事が示された。加えて変異体基質の解析から、保存残基 G(-1)は切断に必須である事が分かった。また保存残基 C(-3), G(+3)は、2 塩基間の相補的な配列関係を保持する事で塩基置換が可能であり、この残基間の塩基対形成が示唆された。そこで、G(+3)のみを $^{15}$N 安定同位体標識し、$^{1}$H-$^{15}$N HSQC スペクトル上でイミノプロトンシグナルの同定を行った。その結果、***HAC1/XBP1*** 両コンセンサス配列において G(+3)由来のイミノプロトンシグナルを同定した。観測された化学シフト値から、このイミノプロトンシグナルは G(+3)-C(-3)塩基対によるものであると考えられた。また、この実験を行うにあたって、長鎖 RNA の任意のグアノシンを効率よく安定同位体標識する方法を開発した。

以上の結果から、Ire1p が切断部位として認識する基質 mRNA は、コンセンサス配列中の C(-3), G(+3)間で塩基対を形成し、2 残基目に G(-1)を持つテトラループを形成していると考えられる。この様式のテトラループは ***HAC1*** mRNA のスプライシング部位でのみ形成可能であり、その他のコンセンサス配列を含む部位では形成出来ない。さらに、IRE1α が切断する ***XBP1*** mRNA 以外の 4 種の mRNA の全てでこの様式のテトラループが形成可能であることから、Ire1p/IRE1 の基質認識機構は共通しており、2 残基目に G(-1)を持つテトラループの形成が重要な役割を果たすと考えられる。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名　　河　原　郁　美

Ire1p は小胞体内に蓄積する変性タンパク質のセンサーであり、酵母における小胞体ストレス応答（UPR）において主要な役割を果たしている。Ire1p は UPR 関連転写因子 ***HAC1*** の mRNA を部位特異的に切断することでスプライシングに寄与する。Ire1p が切断可能なコンセンサス配列は ***HAC1*** mRNA に 10 カ所存在するが、スプライシングを受ける 2 カ所以外では切断されない。本論文では、Ire1p による ***HAC1*** mRNA の切断機構の詳細を明らかにするために、Ire1p の RNase ドメインの同定、基質 ***HAC1*** mRNA の NMR 構造解析、RNase ドメインとの NMR 相互作用解析、切断実験による基質 mRNA コンセンサス配列の再検討、部位特異的安定同位体標識法の開発、NMR による基質 mRNA の塩基対形成の検証、などが行われている。

本論文の成果は以下の通りである。タンパク質分解酵素による限定分解から、切断活性を保持した安定な RNase ドメインを同定し、大腸菌による大量発現精製系の確立に成功した。切断反応産物の質量分析や NMR 解析から、この RNase ドメインが全長 Ire1p と同じ切断機構を持つことを確認した。基質 ***HAC1*** mRNA の NMR 構造解析から、コンセンサス配列 7 塩基以外が、右巻き 2 重らせんからなるステム構造を持つことを明らかにした。NMR 相互作用解析から、RNase ドメインが基質 mRNA のステム領域とは相互作用しないこと、コンセンサス配列 7 塩基近傍で相互作用していることを明らかにした。切断に必要なコンセンサス配列の再検討から、7 塩基のコンセンサス配列のみで部位特異的な切断が可能であること、保存残基 G(-1)は切断に必須であること、保存残基 C(-3)および G(+3)は 2 塩基間の相補的関係の保持が必須であり、塩基置換が可能であることを明らかにした。この C(-3)と G(+3)の相補的関係から、塩基対形成が示唆されたため、G(+3)のみを $^{15}$N 安定同位体標識する新規手法を開発し、NMR による G(+3)-C(-3)塩基対形成の検証に成功した。これらの結果から、基質 mRNA は、コンセンサス配列中の C(-3)-G(+3)間で塩基対を形成し、2 残基目に G(-1)を持つテトラループを形成し、Ire1p によって切断部位として認識されると帰結した。この基質 mRNA の特徴は、最近発見された IRE1$\alpha$ の新たな基質 mRNA においても見いだされており、本論文で提案している基質 mRNA 認識切断機構は、酵母 Ire1p だけでなく高等真核生物 IRE1 においても保存されている一般的な機構であると考えられる。

以上のように、本論文は小胞体ストレス応答において重要な役割を果たす Ire1p の RNase ドメインによる基質 mRNA 認識切断機構を NMR や生化学的なデータから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。