

# 論文内容の要旨

申請者氏名      Rubwad Mathuranyanon

小胞体内腔への構造異常蛋白質は小胞体ストレスとも呼ばれ、さまざまな障害を細胞にもたらすことが知られている。そこで真核生物細胞では総じて、小胞体ストレスに応じて積極的にトランスクリプトームが変動する。この現象を Unfolded protein response (UPR) と呼ぶ。UPR における細胞内シグナル伝達の起点は、小胞体ストレスを感知するセンサータンパク質であり、それらは小胞体膜貫通タンパク質として存在する。I 型膜貫通タンパク質である Ire1 は、全真核生物に保存されたセンサータンパク質であり、酵母を含む真菌類においては、小胞体ストレスに応じて小胞体内在性分子シャペロンなどを含む数多くのタンパク質の発現を転写レベルで誘導する。申請者の研究目的は、Ire1 が小胞体に応じてのみ活性化すること、すなわち応答の正確性を保証するメカニズムを明らかにすることである。Ire1 の小胞体内腔ドメインの中央部は密に折り畳まれており (Core 領域)、そこに変性タンパク質が捕捉されることにより、Ire1 は活性化することが知られている。しかし一方、Ire1 の N 末端には約 80 アミノ酸残基長の折り畳みが緩い領域、すなわち天然変性領域 (N-terminal intrinsically disordered region; NIDR) が存在すると予測されており、その機能は不明であった。そこで申請者は、NIDR がどのように働き、Ire1 の活性制御にどのように関与するのかを明らかにすることを目指した。

申請者の研究では、主として出芽酵母を材料とし、さまざまな Ire1 変異体を *IRE1* 遺伝子欠失細胞にて発現させ、その表現型を調べるというアプローチが用いられている。その結果、野生型 Ire1 は非ストレス条件下ではほとんど UPR 惹起活性を示さなかったのに対し、NIDR を欠失させた変異型 Ire1 は、非ストレス条件下でも、弱いながらも有意に野生型 Ire1 よりも高い活性を示した。すなわち、NIDR には Ire1 の活性を抑制する働きがあると考えられる。なお、NIDR 欠失変異型 Ire1 発現細胞は野生型 Ire1 発現細胞よりも増殖が遅く、非ストレス条件下での NIDR による Ire1 の活性抑制は、生理的に意義のある現象であると言える。

NIDR を他の天然変性ペプチドに置き換えた場合も Ire1 の活性は抑制されており、NIDR が Ire1 活性抑制能を示すためには特定のアミノ酸配列は必須ではないと考えられる。しかし一方、強い Ire1 抑制活性を示す天然変性ペプチドと弱くしか働かない天然変性ペプチドに明確にクラス分けでき、ペプチド鎖の何らかの性状が Ire1 抑制活性の強弱に関わっていると推察された。そして、Core 領域と天然変性ペプチドとの物理的相互作用を酵母ツーハイブリッドアッセイや in vitro アッセイにて調べることにより、高い Ire1 抑制活性を示す天然変性ペプチドは、構造異常タンパク質として Core 領域に捕捉されやすいことが分かった。

これらの知見を通じ、申請者は NIDR がどのように機能するかについてのモデルを確立した。非ストレス条件下では、NIDR が Core 領域と分子内相互作用し、Ire1 の活性化が抑えられる。一方、小胞体ストレス条件下では、小胞体内腔に大量の変性タンパク質が蓄積するが、それらは NIDR と競合し、NIDR に置き換わって Core 領域に結合して Ire1 を活性化へと導く。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名      Rubwad Mathuranyanon

細胞は環境要因や内的要因(遺伝子変異など)に起因するさまざまなストレスを受け、それに対する防衛応答としてトランスクリプトームを変動させる。ストレス応答における細胞内情報伝達の起点となるセンサータンパク質も多様なものが知られているが、あるセンサータンパク質がどのようなメカニズムで特定のストレスに応じて活性化し、また、他のストレスが負荷された場合や非ストレス時には活性化しないのかという疑問については、分子生物学的に興味深い問いだと考えられるが、明確な答えが得られている事例はほとんど無い。

申請者の研究は、小胞体ストレス、およびそれに対する防衛応答である Unfolded protein response (UPR)に着目し、そのセンサータンパク質である Ire1 の活性制御機構にアプローチすることにより、前段落で記した課題に迫ろうとするものである。Ire1は真核生物全般に保存された I 型膜貫通タンパク質である。Ire1 は小胞体内腔には密に折り畳まれたドメインを有し(Core 領域)、そのドメインが小胞体内腔に蓄積した変性タンパク質を捕捉することにより、Ire1 は強い UPR 惹起活性を呈することが知られている。一方、Coreドメインに隣接する N 末端領域の機能は全く不明であり、申請者の研究は主としてその領域に着目するものである。

先行研究により、Ire1 の N 末端領域は折り畳みが緩いと予測されており、N 末天然変性領域(N-terminal intrinsically disordered region; NIDR)と呼ばれている。従来のタンパク質科学は主として密に折り畳まれたペプチド鎖を研究対象としているが(構造解析なども含めて)、近年の国内外の多数の研究者的研究によりタンパク質の天然変性領域もこれまでには知られていなかった機能が存在することが明らかにされつつあり、申請者の研究は「タンパク質の天然変性領域」という新しい研究分野にも貢献するものである。

そして申請者の研究は、主として出芽酵母を用い、また、大腸菌にて発現・精製した組換えタンパク質を用いた *in vitro* 実験なども通じて、NIDR がどのように機能するのかについて、分子モデルを確立するに至った。すなわち、非ストレス条件下では、NIDR が Core 領域と分子内相互作用し、Ire1 の活性化が抑えられる。一方、小胞体ストレス条件下では、小胞体内腔に大量の変性タンパク質が蓄積するが、それらは NIDR と競合し、NIDR に置き換わって Core 領域に結合して Ire1 を活性化へと導く。このモデルでは、Ire1 は自身の活性化においてアンタゴニストとなる配列を分子内に有することになり、新たなタンパク質活性制御メカニズムとしても興味深いと考えている。

以上のように、本論文はストレスセンサータンパク質のストレス感知機構および活性制御機構について従来には知られてなかった新規なモデルを呈示するもので、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。