

# 論文内容の要旨

申請者氏名 畑 竜也

小胞体は、分泌タンパク質の折り畳みなどを担うオルガネラであり、タンパク質の翻訳後修飾を行うため、ジスルフィド結合形成酵素や糖鎖付加酵素を有する。小胞体の機能不全は、小胞体への構造異常タンパク質蓄積の原因や結果となり、小胞体ストレスと呼ばれている。それに対する細胞防衛応答が小胞体ストレス応答であり、小胞体で機能するタンパク質が転写レベルで発現誘導される。真核生物全般に保存された *Ire1* は、小胞体ストレス応答を担う小胞体膜貫通タンパク質であり、RNase 活性を有する。出芽酵母 (*S. cerevisiae*) では、小胞体ストレスに応じて活性化した *Ire1* は、転写因子をコードする *HAC1* mRNA をスプライシングにより成熟させる。

出芽酵母はこれまで、小胞体ストレス応答のモデル生物として使われてきており、*Ire1* の活性化機構の解明など、数多くの研究成果が報告されてきた。実験室にて出芽酵母細胞に小胞体ストレス応答を惹起させる際には、薬剤を用い、ジスルフィド結合形成や糖鎖付加を阻害することが多い。これらは強力な小胞体ストレスとなり、*HAC1* mRNA は高効率でスプライシングされる。一方、*Ire1* 遺伝子破壊酵母株は非ストレス状態でも僅かながら増殖遅延を示すことなどから、非ストレス状態、あるいは弱いストレス状態においても、*Ire1*-*HAC1* 経路が生理的意義を有すると推察される。そこで申請者は、そのような状況における *Ire1* の機能にアプローチする研究を進めた。

申請者はまず、*HAC1* mRNA スプライシングを、その程度が極めて低い場合にも、定量的に評価する方法を確立した。従来は、総 RNA サンプルに対して、非スプライシング型とスプライシング型の双方を増幅するプライマーを用いた RT-PCR を行い、その産物 DNA の量比によってスプライシング効率を見積もっていたが、しかし、スプライシング型 *HAC1* mRNA 量が低い場合、スプライシング効率は定量限界以下となった。申請者の開発した手法では、スプライシング型だけが RT-PCR 増幅され、リアルタイム PCR 法にて、その定量を行うことが可能である。

次いで申請者は、この手法を用い、高温で出芽酵母細胞を培養した場合、*HAC1* mRNA スプライシングが弱いながらも亢進することを見いだした。*Ire1* 遺伝子破壊株や *HAC1* 遺伝子破壊株は高温感受性を示す。よって、申請者の研究により、*Ire1* や *HAC1* 依存的な小胞体ストレス応答経路の高温耐性への寄与が示されたのである。

なお、強力な小胞体ストレスでは、*Ire1* は大きな多量体を形成して活性化するが、一方、*Ire1* 二量体も低効率ながらも *HAC1* mRNA スプライシングができると推察されている。申請者は、*Ire1* の RNase 領域に改変を加えることにより、「二量体状態では非活性だが、多量体化すると *HAC1* mRNA スプライシングが可能となる」という *Ire1* 変異体を得た。そして、それを用いることにより、非ストレス状態では *Ire1* は多量体化しておらず、二量体として活性を呈しているであろうことが示された。

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 畑 竜也

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の高次構造形成、そして膜脂質の生合成が行われる細胞内小器官である。小胞体の機能不全は小胞体ストレスと総称され、折り畳み不全タンパク質の小胞体への蓄積を伴う。これは細胞にとって有害であり、小胞体ストレス状態を避けるため（あるいは小胞体ストレス状態から回復するため）、細胞は小胞体ストレス応答を引き起こす。

小胞体ストレス応答の存在は1980年代末に明らかにされており、次いで、1990年代から2000年代にかけて、主には出芽酵母細胞や哺乳類細胞を用いた研究によって、Ire1を含めて小胞体ストレス応答に関わる因子が同定され、それらの作用メカニズムについての分子生物学的理解も深まった。一方、近年では、それらがどのような生理的意義を有するのかという問いに答えるための研究も進められている。例えば、外部から人為的にストレスを与えなくても、動物では発生過程における様々な局面で小胞体ストレス応答が必要とされることが明らかにされている。しかし、他の生物では、自然界で遭遇するであろうどのような場面で小胞体ストレス状態になり、小胞体ストレス応答が惹起するのかという視点に立った研究は少なく、申請者の研究は、出芽酵母をモデルとして、それに迫ろうとするものである。

従来の研究では多くの場合、人為的に強力な小胞体ストレスを与え、そこで引き起こされる事象を解析するというアプローチが取られてきた。しかし、自然界でのストレス刺激は微弱なことが多いと想定される。そこで申請者はまず、小胞体ストレス応答が弱い場合でも、それを効率良く検出できる手法を開発した。次いで申請者は、その手法を用いて、高温での増殖に小胞体ストレス応答が寄与することを見いだした。Ire1の活性制御メカニズムは複雑であり、申請者は、Ire1分子がどのような状態で微弱な小胞体ストレス応答を惹起しているのかについての理解を深めるための研究も進めた。申請者が得た知見は、出芽酵母だけでなく、哺乳動物を含めた高等真核生物にも当てはめることができると期待される。

以上のように、本論文は小胞体ストレス応答の新たな意義を明らかにし、「弱い小胞体ストレス状態」という生理学的に重要であろう局面に関する理解を深めることに貢献し、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。

やむを得ない事由[ 図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他（ ） ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】