

小胞体ストレス応答遺伝子の機能と誘導機構

学位論文内容の要旨

小胞体ストレス（小胞体機能の障害に伴い、成熟不全蛋白質が小胞体に蓄積する）に対して細胞は様々な防御機構を作動させる。1) リボソームでの蛋白質合成の抑制, 2) 小胞体シャペロンによる蛋白質の修復, 3) 小胞体から細胞質への排出とユビキチン-プロテアソーム系による分解（小胞体関連分解: ER-associated degradation, ERAD）がある。小胞体ストレスが関与すると考えられる疾患はとして、アルツハイマー病やパーキンソン病、ポリグルタミン病などの神経変性疾患の他、脳虚血、双極性うつ病、糖尿病、リウマチなどがある。これらの疾患の原因解明と治療には小胞体ストレス応答機構の解明が重要と考えられる。そこで、小胞体ストレス応答遺伝子の機能と誘導機構の解明を本研究の目的とした。

1. 小胞体ストレスによる MnSOD の誘導と NF- κ B・AP-1 の活性化

小胞体ストレスによって活性化した小胞体ストレスセンサーIRE1 は TRAF2 と結合し、JNK を活性化することが報告されている。そこで、同じ TRAF2 の下流に存在する NF- κ B も小胞体ストレスによって活性化されるか検討した。小胞体ストレスによって NF- κ B が活性化し、IRE1 のドミナントネガティブ体によってその NF- κ B の活性化が抑制されることが判明した。また、TRAF2 のドミナントネガティブ体も小胞体ストレスによる NF- κ B の活性化を抑制した。これらの結果より、NF- κ B は小胞体ストレスによって活性化し、その活性化シグナルは IRE1 と TRAF2 を介して伝達されることが示された。さらに、このシグナル伝達経路による MnSOD の誘導を見出した。この MnSOD の誘導は IRE1 のドミナントネガティブ体によって抑制された。また、小胞体ストレスは IRE1 を介して JNK の下流の AP-1 も活性化することが示されたことから、小胞体ストレスによる MnSOD の誘導には IRE1 を介した NF- κ B や AP-1 の活性化が関与する可能性が示唆された。

2. ヒト ERAD 関連遺伝子 (HRD1, SEL1) の同定と機能解析

酵母の ERAD に関与する小胞体膜分子として Hrd1p と Hrd3p がある。Hrd1p はユビキチンリガーゼ (E3) として基質蛋白質のユビキチン化に働き、RING-finger ドメインを有

している。一方、Hrd3p は Hrd1p の活性調節や安定化に関与する分子として報告されている。そこで、Hrd1p と Hrd3p のヒトホモログの同定を行い、それらの誘導機構と機能について解析した。アミノ酸の相同性、ドメイン構造および局在予測を用いて探索した結果、Hrd1p の候補として KIAA1810 を、Hrd3p の候補として SEL1 を同定した。ヒト HRD1 は完全長をクローニングし、これらの遺伝子について実際に小胞体に発現するか確認したところ、確かに小胞体に局在することが示された。また、SEL1 と HRD1 は細胞内で相互作用することが示された。さらに小胞体ストレス誘導試薬によって HRD1 と SEL1 は誘導されたことから、酵母の特徴が保存されていることが明らかになった。さらに、HRD1 は E3 活性を有することが示された。そこで、HRD1 の E3 活性によって小胞体ストレスが抑制されるか検討した結果、HRD1 は E3 活性依存的に小胞体ストレスによるアポトーシス抑制することが判明した。

3. 小胞体ストレスによる HRD1, SEL1 の誘導と IRE1-XBP1, ATF6 系の関与

HRD1 と SEL1 はいずれの小胞体ストレス応答系を介して誘導されるか IRE1-XBP1 および ATF6 の関与について解析した。その結果、HRD1 は IRE1-XBP1 の経路によって誘導されるが、SEL1 は ATF6 によって誘導される可能性が示唆され、誘導経路に特異性があることが判明した。さらに、HRD1 と SEL1 の誘導に関与する *cis*-エレメントの同定を行った。HRD1 のプロモーター領域には小胞体ストレス応答に関与する ERSE 配列が二つ存在し、そのうち一つは ERSE のコンセンサス配列に完全に一致していた。一方、SEL1 は ERSE に類似した配列が存在したが、完全な ERSE は見られなかった。そこで、HRD1 や SEL1 のプロモーター領域の各種変異体を用いて解析した結果、HRD1 は ERSE 配列が転写促進に重要であったのに対し、SEL1 は ERSE 様の配列に加え、その近傍の CGTGG という配列が関与することが判明した。さらに ATF6 および XBP1 の過剰発現に対するこれらのエレメントの応答性は、小胞体ストレスに対する応答と一致していた。

4. HRD1 による APP 分解と A β 産生抑制

アルツハイマー病における老人斑の主成分である β -アミロイドの前駆体蛋白質 APP が HRD1 による分解を受けるか検討を行なった。免疫沈降した結果、APP と HRD1 蛋白質は HRD1 の C 末端にある proline-rich ドメインを介して結合することを見出した。また、HRD1 を高発現した 293 細胞株において、強制発現した APP 蛋白質量の明らかな発現低下が見られた。さらに、A β の産生量に対する HRD1 の影響を検討した結果、A β (1-40), (1-42) は共に HRD1 の高発現細胞株においてその産生量が低下することが示された。さらに、ATF6 と XBP1 による UPR 活性化によって APP が分解されることが判明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 助教授 川 原 裕 之
副 査 助教授 大 熊 康 修

学 位 論 文 題 名

小胞体ストレス応答遺伝子の機能と誘導機構

小胞体の機能が障害されると、成熟が不完全な蛋白質が小胞体に蓄積する。この状態を小胞体ストレスと言い、これに対して細胞は様々な防御機構を作動させる。1) リボソームでの蛋白質合成の抑制, 2) 小胞体シャペロンによる蛋白質の修復, 3) 小胞体から細胞質への排出とユビキチン - プロテアソーム系による分解 (小胞体関連分解: ER-associated degradation, ERAD) がある。

小胞体ストレスが関与すると考えられる疾患は様々な報告があり、アルツハイマー病やパーキンソン病、ポリグルタミン病などの神経変性疾患の他、脳虚血、双極性うつ病、糖尿病、リウマチなどがある。これらの疾患の原因解明と治療には小胞体ストレス応答機構の解明が重要と考えられる。そこで、小胞体ストレス応答遺伝子の機能と誘導機構の解明を本研究の目的とした。

申請者は、小胞体ストレスによる NF- κ B の活性化に機構について解析した。その結果、小胞体ストレスによって NF- κ B が活性化し、その活性化は小胞体ストレスセンサーIRE1 を介することを新たに発見した。また、IRE1 と TRAF2 が結合し、小胞体ストレスによる NF- κ B の活性化は IRE1-TRAF2 の結合を介して伝達されることを示した。

つぎに、このシグナル伝達経路によって誘導される遺伝子として MnSOD を申請者は発見した。小胞体ストレスによる MnSOD の誘導に IRE1 が関与すること、さらに、小胞体ストレスは IRE1 を介して TRAF2 の下流の AP-1 も活性化することを示めた。以上の通り申請者は、小胞体ストレスによる IRE1 を介した NF- κ B や AP-1 の活性と、その経路によって誘導される遺伝子として MnSOD を示した。

つぎに申請者は、小胞体ストレス防御応答の一つ ERAD の解析を行った。酵母の

ERAD 関連分子 Hrd1p と Hrd3p のヒトホモログとして、アミノ酸の相同性、ドメイン構造および局在予測を用いて探索した結果、新規に HRD1 をクローニングし、SEL1 (Hrd3p) を同定した。さらに、これらの遺伝子について、実際に小胞体に発現することを示し、SEL1 と HRD1 が細胞内で相互作用することを明らかにした。また、小胞体ストレス誘導試薬によって HRD1 と SEL1 は誘導されることを示し、酵母のホモログであることを明らかにした。さらに申請者は、HRD1 は E3 活性を有することを示し、HRD1 が E3 活性依存的に小胞体ストレスによるアポトーシス抑制することを見出した。

申請者らはさらに HRD1 と SEL1 の小胞体ストレスによる誘導機構について解析した。始めに、IRE1-XBP1 および ATF6 いずれの小胞体ストレス応答系を介して誘導されるか検討した。その結果、HRD1 は IRE1-XBP1 の経路によって誘導されるが、SEL1 は ATF6 によって誘導される可能性を示し、誘導経路に特異性があることを明らかにした。さらに、HRD1 と SEL1 の誘導に関与する *cis*-エレメントの同定を行い、HRD1 のプロモーター領域には小胞体ストレス応答に関与する ERSE 配列が存在し、SEL1 は ERSE に類似した配列が存在することを明らかにした。また、SEL1 の誘導には CGTGG 配列も重要であることがわかった。これらのことから申請者は、XBP1 に対する応答には ERSE が重要であり、ATF6 の応答には ERSE 以外の CGTGG 配列も関与することを示し、これらの配列差が小胞体ストレスに対する誘導経路の差を生むことを明らかにした。

最後に申請者は、アルツハイマー病における老人斑の主成分である β -アミロイドの前駆体蛋白質 APP が HRD1 による分解を受けるか検討を行なった。その結果、APP と HRD1 蛋白質は HRD1 の C 末端にある proline-rich ドメインを介して結合することを見出した。また、HRD1 を高発現した 293 細胞株において、強制発現した APP 蛋白質が減少することを見出した。さらに、A β (1-40), (1-42) は共に HRD1 の高発現細胞株においてその産生量が低下することを示した。加えて、ATF6 と XBP1 による UPR 活性化によって APP が分解されることを見出した。

以上の通り、申請者は小胞体ストレス防御機構として新規のシグナル伝達経路 IRE1 を介した NF- κ B の活性化を見出した。また、ERAD に注目し、新規遺伝子として HRD1 をクローニングした。さらに HRD1 の誘導機構を解明し、HRD1 が小胞体ストレス防御作用を有すること、APP を分解することによって A β の産生を低下させることを発見した。よって、申請者は博士(薬学)の学位を受領するに十分な資質を有するものであることを認めた。