

研究課題別 事後評価結果

1. 研究課題名： センサー型転写因子とセンサー型RNaseIによる生体防御ネットワークの解明

2. 研究代表者： 吉田 秀郎（京都大学 大学院理学研究科 准教授）

3. 研究内容及び成果

3-1. 研究内容の概要

小胞体やゴルジ体等の細胞小器官と核の間では、密接な情報の交換が行われており、必要な時に必要な量の小器官が存在するように厳密な調節が行われている。本研究では、1)小胞体ストレス応答を制御する細胞質スプライシングの研究、2)ゴルジ体と核の間の情報伝達機構(ゴルジ体ストレス応答)に課題を大別して研究を行った。

以下、成果の概要を示す。

1)細胞質スプライシング

小胞体は分泌タンパク質の合成を司る細胞小器官であり、その主要な機能として「小胞体シャペロンによる新生タンパク質の立体構造形成」と「小胞体タンパク質分解機構(ERAD; Endoplasmic Reticulum Associated Degradation)による構造異常タンパク質の分解処理」が挙げられる。

高等動物の小胞体ストレス応答経路は、現在のところ3つが知られており、そのうちのひとつであるIRE1(Inositol-REquiring 1)経路は小胞体シャペロンやERAD因子の転写誘導を制御する主要な経路である。

IRE1経路は、小胞体の膜上に存在するセンサー型のリボヌクレアーゼ(RNase)であるIRE1が、転写因子XBP1(X-box binding protein 1)のmRNAをスプライシングすることによって制御されている。IRE1によるXBP1 mRNAのスプライシングは、従来知られているスプライソソームによるスプライシング(核スプライシング)とは全く異なった新規の機構(フレームスイッチスプライシング)であるため、本研究ではXBP1のフレームスイッチスプライシングに注目し解析を行った。

XBP1 mRNAのフレームスイッチスプライシングはIRE1によって切断、RNA ligaseによって結合することによって反応が進行する。そこで、IRE1のRNase領域の細胞内局在性を調べたところ、RNase領域には核排出シグナルが存在し、細胞質に局在するとともに、RNA ligaseの活性についても、細胞質に局在することがわかった。さらに、スプライシングの基質であるXBP1 mRNAの局在性を調べたところ、核ではなく細胞質に存在しており、かなりの部分が小胞体膜に結合した状態で存在することを明らかにした。以上の結果が

ら、XBP1のフレームスイッチスプライシングは細胞質で起こると結論した。

また、核スプライシングと細胞質スプライシングの間には大きな違いが存在する。核スプライシングでは、環境変化にตอบสนองしてスプライシングを行う場合、細胞質で翻訳に用いているmRNAをスプライシングすることは出来ないため、新たにmRNAを転写する必要がある。一方、細胞質スプライシングでは翻訳に用いているmRNAをそのままスプライシングし、別のタンパク質をコードするように迅速かつ無駄なく変化させることができる。しかし、スプライシングされる前のXBP1 mRNAにコードされているタンパク質pXBP1(U)がどのような機能を持っているのかについては、これまで全くわかっていなかった。

タンパク質pXBP1(U)には、活性型転写因子pXBP1(S)と結合する領域、核排出シグナルおよび分解促進領域が存在しており、小胞体ストレスから細胞が回復する時期にpXBP1(U)の発現が誘導されることを見出した。さらに、pXBP1(U)を過剰発現するとpXBP1(S)の分解が促進されることも判明した。

以上の結果から、pXBP1(U)は小胞体ストレスからの回復期に不要になったpXBP1(S)の分解を促進する因子であると結論した。すなわち、小胞体ストレス応答にはネガティブフィードバックの機構が存在し、細胞質スプライシングによってpXBP1(U)とpXBP1(S)の発現を迅速に切り換えることで小胞体ストレス応答を巧妙に制御していることを明らかにした。

2) ゴルジ体ストレス応答

分泌の盛んな細胞と盛んでない細胞の間には、ゴルジ体の発達度に大きな違いがある。このことから、必要に応じてゴルジ体の量が調節される機構(ゴルジ体ストレス応答機構)が存在すると考え、その分子機構の解析を試みた。

ゴルジ体の機能を欠損させることで、ゴルジ体ストレス応答が誘導されるかどうかを調べたが、小胞体ストレスは誘導されなかった。そこで、ゴルジ体に明瞭な形態変化を与えるnigericinとmonensinを用いた。

ゴルジ体ストレスによって転写が誘導される遺伝子を検索するため、ヒト細胞(HeLa)をmonensinで処理し、RNAを抽出してマイクロアレイ解析を行った。22575個の遺伝子について解析したところ、monensin処理によって2倍以上の発現誘導が見られる遺伝子が204個存在した。このうち約100個の遺伝子は機能が予測できるものであり、ゴルジ体の機能に関与すると思われるものが数多く含まれていた。これらの遺伝子の一部をクローニングしてノーザンブロットを行った結果、多くの遺伝子はmonensin処理やnigericin処理によって転写が誘導されることが確認された。

ゴルジ体ストレスによる転写誘導機構を解析するために、上記の遺伝子についてプロ

モーター解析を行うことにより、転写誘導を制御しているエンハンサー配列を決定することを試みた。標的遺伝子の一つであるHMGCR(3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-Coenzyme A Reductase)のプロモーターを解析した結果、エンハンサー配列を25塩基まで絞り込むことが出来た。このエンハンサー配列は、従来HMGCR遺伝子のエンハンサーとして知られているSRE(sterol response element)とは全く異なっていた。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

小胞体内の異常タンパク質を検出するIRE1(小胞体膜局在型RNase)に依存的な小胞体ストレス活性化転写因子XBP1 mRNAのスプライシングは、小胞体ストレス応答のキーマカニズムである。このスプライシング反応が従来の核スプライシング反応と異なり、細胞質で進行することを明らかにするとともに、小胞体ストレス迅速に対処するためにスプライシングが細胞質で行われるという生理学的意義を明らかにした。今後、スプライシング反応に関わる因子を同定していくことで、この研究分野が大きく発展していくことを期待する。さらに、タンパク質レベルでの相互作用やそれらの機能解析まで進めた成果を期待したい。

また、ゴルジ体ストレス応答という新概念を提起した。これまでゴルジ体ストレス応答に関する報告は一切なく、そもそもゴルジ体ストレス応答というものが存在するのかどうかについても確たる証拠はない。このように極めて先駆的・挑戦的な研究テーマであるが、「核とオルガネラ間の情報交換」に関わる基本原理が潜んでいることを示唆した成果は独創的な提案である。

さらに、極めて費用対効果の良い研究成果と言える。

本研究開始当時は類似研究の報告はほとんどなかったが、研究成果の公表に伴って、類似研究を進めていた研究者から独立に報告がなされるようになってきた。今後、細胞質スプライシングという研究分野が大きく発展すると思われるが、本研究の研究成果はその基盤を築くものであり、また関与する因子の同定は、この分野の中心的課題の一つとなるものと考えられる。今後、多くの質の高い論文発表を期待する。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

細胞質スプライシング研究は、この領域を開拓してきたという貢献があり、独自の方向性で研究業績を上げてきた点を高く評価したい。

また、ゴルジ体ストレス応答研究は類似研究の報告が一切ない。本研究はさきがけ研究での成果を踏まえ、全く新しい生命現象を捉えようとする、先駆的かつ挑戦的な研究である。今

後の大きな発展が期待される。

4-3. その他の特記事項(受賞歴等)

平成 15 年度 日本生化学会奨励賞

平成 17 年 9 月 9 日 科学新聞「センサー型転写因子とセンサー型 RNase による生体防御
ネットワークの解明」