

戦略的創造研究推進事業  
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題

「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」

研究期間：平成16年12月 1日～  
平成19年 3月31日

吉田 秀郎  
(京都大学、助教授)

## 1. 研究課題名

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

## 2. 研究実施の概要

小胞体やゴルジ体などの細胞小器官と核との間では密接な情報の伝達が行われており、必要なとき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。先行研究では小胞体と核の間の情報伝達機構（小胞体ストレス応答）の基本機構を明らかにしたが、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）の研究を行った。

### (1) 細胞質スプライシングの研究

抗体産生細胞の分化のように大量の分泌タンパク質を産生するようになると、小胞体の機能が不足するため細胞は小胞体ストレス応答機構を活性化して小胞体の機能を強化しようとする。小胞体ストレス応答を制御する経路は現在のところ3つ知られているが、そのうちのひとつである IRE1 経路は、小胞体ストレス依存的に起こるスプライシングによって制御されている。小胞体膜上に存在する小胞体ストレスのセンサー型 RNase である IRE1 によって、転写因子をコードする XBP1 の前駆体 mRNA がスプライシングされて成熟型 mRNA となり、そこから活性型転写因子 pXBP1(S)が翻訳され、小胞体の機能を担う遺伝子の転写を誘導する。興味深いことに、IRE1 による XBP1 mRNA のスプライシングは、従来知られている核スプライシングとはまったく異なる非従来型のスプライシングであることがわかった。そこで本研究では、以下の3つの観点からこの非従来型のスプライシングについて解析を行った。

#### a. XBP1 mRNA のスプライシングは細胞質で起こるか

スプライシングが起こる場所を特定するために、スプライシングに関わる因子の細胞内局在性を調べた。まず IRE1 について調べたところ、IRE1 の触媒ドメインには核排出シグナルが存在し細胞質に局在することがわかった。また、IRE1 によって切断された XBP1 mRNA をつなぐ RNA ligase について調べたところ、その活性も細胞質に局在していることを見いだした。更に、スプライシングの基質である XBP1 の前駆体 mRNA に関しても、細胞質（特に小胞体膜上）に局在することを明らかにした。これらの結果から、XBP1 の非従来型スプライシングは細胞質で起こる細胞質スプライシングであると結論した。

#### b. XBP1 mRNA のスプライシングはなぜ細胞質で起こる必要があるのか

XBP1 の前駆体 mRNA について調べたところ、前駆体 mRNA でありながら活発に翻訳されていることがわかった。その翻訳産物の pXBP1(U)について解析したところ、このタンパク質には転写活性化領域のかわりに核排出シグナル・分解促進因子・pXBP1(S)との結合領域が存在しており、また小胞体ストレスからの回復期に発現が上昇し、更に過剰発現すると pXBP1(S)の分解が促進されることから、pXBP1(U)は小胞体ストレス応答のシャットダウンをするネガティブフィードバック因子であると考えられる。すなわち、小胞体ストレスに応じて、XBP1 mRNA をスプライシングすることで、ネガティブな因子とポジティブな因子の発現を切り換えているわけである。この切換を細胞質スプライシングによって行うことで、ネガティブな因子を翻訳している mRNA を直接スプライシングしてポジティブな因子を翻訳するように迅速に切り換えられることが、細胞質スプライシングの生物学的意義ではないかと考えている（核スプライシングでは、細胞質に輸送した mRNA はスプライシングできないため、新たに転写し直す必要がある）。

#### c. 細胞質スプライシングに関与する因子の探索

IRE1 以外のスプライシング因子を同定するため、酵母細胞で XBP1 mRNA と IRE1 を発現させて細胞質スプライシング反応を再構築し、そこへヒト cDNA ライブラリーを導入してスプライシング反応を促進する因子を検索した。その結果単離した CSRF-1 について現在更に解析を進めている。

## (2) ゴルジ体ストレス応答の研究

分泌の盛んな細胞では、小胞体ばかりでなくゴルジ体も発達していることから、ゴルジ体においてもその機能が不足すると、そのシグナルが核に伝えられてゴルジ体の機能を担う遺伝子の転写が誘導されると考えられる。しかしながら、これまでに知られている小胞体ストレス応答機構では、ゴルジ体の機能制御を説明することはできない。そこで、ゴルジ体には独自の応答機構（ゴルジ体ストレス応答）が存在するのではないかと考え、その研究に着手した。

ゴルジ体の機能を不足させるための処理をいろいろと検討した結果、ゴルジ体の pH を中和する薬剤（monensin や nigericin）が有望であることがわかった。そこで monensin で処理したときに転写が誘導される遺伝子を microarray 解析によって検索したところ、数多くのゴルジ体関連遺伝子が同定された。この中には、糖鎖修飾酵素や脂質合成酵素、タンパク質のプロセッシングを行うもの、小胞輸送に関与するもの、ゴルジ体の構図尾遺児に関わるものなどがあつた。Northern blot 解析を行ったところ、確かに monensin 処理によって発現が誘導され、小胞体ストレスによっては影響を受けないことを確認した。これらの標的遺伝子のうち、脂質の合成に関与する HMGCR 遺伝子のプロモーターを解析した結果、従来知られているエンハンサー（Sterol regulatory element）とは異なる領域（25 塩基）が転写誘導を制御していることを見いだしている。今後は、転写制御に関わるエンハンサーのコンセンサス配列を決定し、他の標的遺伝子も同じエンハンサーで制御されているかどうか調べ、またエンハンサー配列に結合する因子を検索することによって、転写誘導を制御する因子を同定しようと考えている。

## 3. 研究構想

真核細胞には小胞体やゴルジ体などの細胞小器官が存在し、それぞれ特化した機能を担っている。これらの小器官の機能や存在量は厳密に制御されており、発生・分化や環境変化などによって特定の小器官の機能が不足すると、その小器官の機能・存在量だけが増強されてくることが知られている。小器官を形成するための遺伝子は大部分が核に存在することから、核と細胞小器官との間で密接に情報をやりとりすることによって、このような制御を行っていると考えられるが、その分子の実体についてはほとんど明らかになっていなかった。3 年間のさきがけ研究によって、核と小胞体間の情報伝達による小胞体機能の制御（小胞体ストレス応答）の分子機構の基本部分を明らかにすることができた。さきがけ研究を進める過程で、2 つの興味深い現象を見だし、発展研究ではこの 2 つのテーマについて研究を進めることとした。

第一のテーマは、小胞体ストレス応答における細胞質スプライシングの解析である。小胞体ストレス応答の主要経路である IRE1 経路は、転写因子 XBP1 の mRNA が小胞体ストレス時に非従来型のスプライシングを受けることによって制御されている。このスプライシング機構はフレームスイッチスプライシングと呼ばれ、従来の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）とは全く異なるものである。フレームスイッチスプライシングは核ではなく、細胞質で起こると想像していたが、確実な証明をまだしていなかった。そこで発展研究では、(1) XBP1 のフレームスイッチスプライシングは本当に細胞質で起こるのか（細胞質スプライシングであるのかどうか）、(2) なぜ細胞質で起こる必要があるのか、その生物学的意義について、(3) フレームスイッチスプライシングにはどのような因子が関与しているかについて解析を進めることとした。

第二のテーマは、ゴルジ体ストレス応答の解析である。分泌の盛んな細胞では、小胞体やゴルジ体が著しく発達することが知られているが、小胞体ストレスを細胞に与えてもゴルジ体の機能は強化されないし、逆にゴルジ体の機能が不足するような処理（ゴルジ体ストレス）をしても小胞体の機能は強化されない。このことは、小胞体ストレス応答機構とは独立に、核とゴルジ体の情報伝達機構（ゴルジ体ストレス応答機構）が存在し、ゴルジ体の機能を制御していることを示唆している。そこで発展研究では、ゴルジ体ストレスを与えたときに発現が誘導される遺伝子（特に、ゴルジ体の機能を担う遺伝子）を検索し、その転写誘導機構を詳細に解析することによって、ゴルジ体ストレス応答機構が確かに存

在することを証明し、その分子機構を明らかにすることを試みた。

#### 4. 研究実施内容

##### (1)実施の内容

##### a. 細胞質スプライシングの解析 (背景)

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) による構造異常タンパク質の分解処理」があげられる。通常は小胞体シャペロンと ERAD 因子によって新生タンパク質が処理されているが、抗体産生細胞の分化などのように大量の分泌タンパク質を産生するようになった場合、既存量のシャペロンや ERAD 因子では処理できなくなり、その結果立体構造の異常なタンパク質が小胞体に蓄積し、最終的には細胞死を引き起こす (小胞体ストレス) (図 1)。このような危機的な状況を回避するために、細胞は小胞体ストレス応答機構を活性化して、小胞体シャペロンや ERAD 因子の発現を転写レベルで誘導し、構造異常タンパク質を処理しようとする (小胞体ストレス応答)。高等動物の小胞体ストレス応答経路としては、現在のところ 3 つの経路が知られており、そのうちのひとつである IRE1 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。

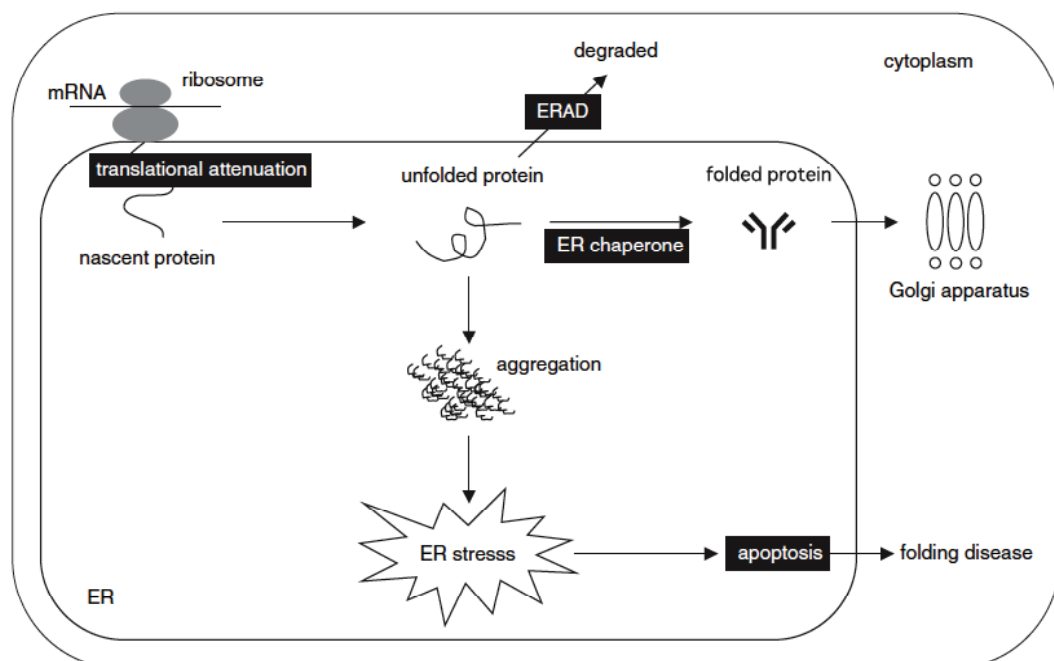


図 1 小胞体ストレス応答の概念図

IRE1 経路は、小胞体の膜上に存在するセンサー型 RNase である IRE1 が転写因子 XBP1 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 (図 2)。平常時においては XBP1 mRNA はスプライシングされていない前駆体 mRNA の状態であり、DNA 結合領域と転写活性化領域が異なる open reading frame (ORF) にコードされているため、前駆体 mRNA から翻訳されるタンパク質 pXBP1(U) は転写を誘導することはできない。小胞体ストレス時には、小胞体ストレスセンサーである IRE1 が活性化され、XBP1 mRNA のフレームスイッチスプライシングが起こることで 26 塩基のイントロンが切り出され、その結果 (26 が 3 の倍数でないためにフレームシフトが起こることで) DNA 結合領域と転写活性化領域の両方を持つタンパク質 pXBP1(S) が翻訳される。pXBP1(S) は小胞体シャペロンや ERAD 因子遺伝子の転写を誘導することで小胞体の機能を強化し、小胞体ストレスを解消する。興味深いことに、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）とはまったく異なった新規のスプライシング機構（フレームスイッチスプライシング）であった。そこでこの研究では、XBP1 のフレームスイッチスプライシングに注目し以下の解析を行った。

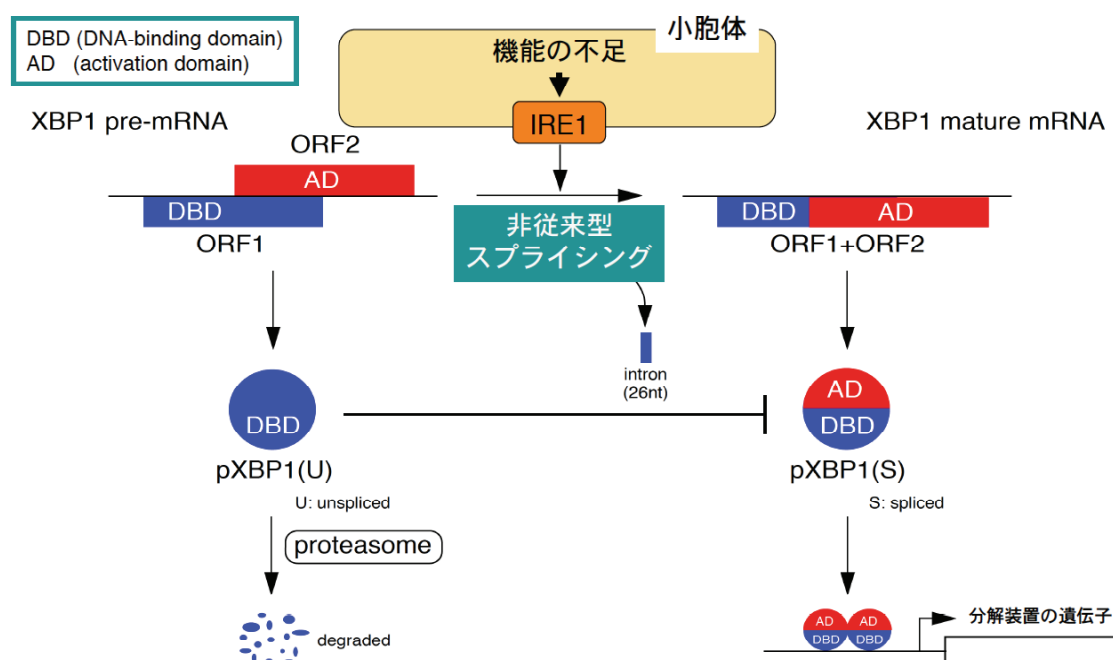


図2 XBP mRNA のスプライシング

#### i. XBP1 のフレームスイッチスプライシングが細胞質で起こることの証明

XBP1 mRNA のフレームスイッチスプライシングは、RNase である IRE1 によって切断され、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、細胞質に局在することがわかった。RNA ligase の遺伝子はまだ未同定であるため、その活性の細胞内局在性を調べたところ、やはり核ではなくて細胞質に局在することがわかった。更に、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、特に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。以上の結果から、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（論文準備中）。

#### ii. 細胞質でスプライシングが起こることの生物学的意義

スプライシングが核で起こる場合と細胞質で起こる場合では、大きな違いがひとつ存在する。核スプライシングの場合、細胞質に輸送して翻訳に用いている mRNA をスプライシングすることはできないので、環境変化に応答してスプライシングをしようとする、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あれば、翻訳に用いている mRNA をそのままスプライシングして、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（図3）。しかし、これまで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全くわかっていなかった。

解析の結果、pXBP1(U)には pXBP1(S)と結合する領域、核排出シグナル及び分解促進領域が存在しており、また、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がわかった。更に、pXBP1(U)を過剰発現すると pXBP1(S)の分解が促進されることもわかった。これらの結果から、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が明らかとなった（文献2）。

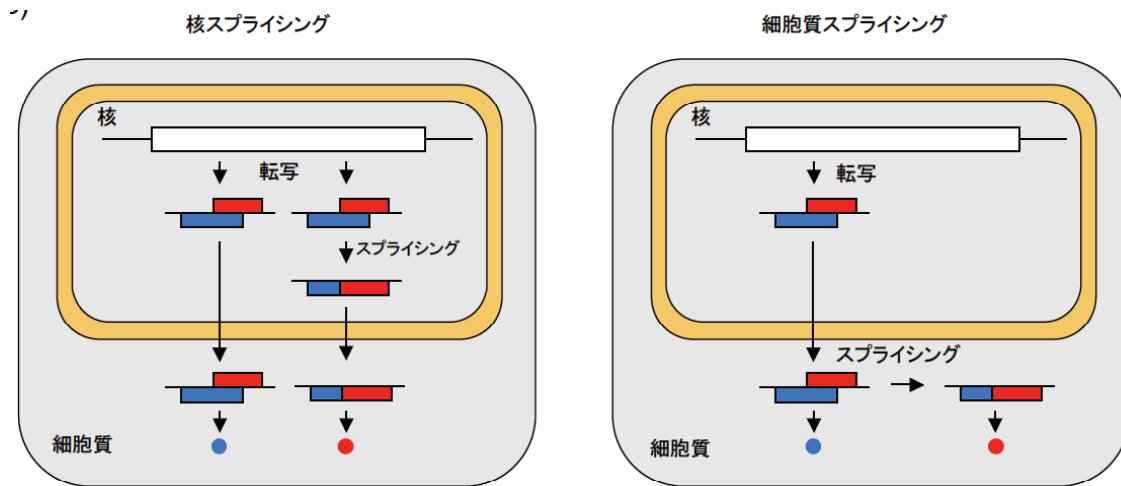


図3 細胞質スプライシングの生物学的意義

### iii. 細胞質スプライシングに関与する因子の検索

XBP1 mRNAの細胞質スプライシングに関わる因子は、RNaseであるIRE1しか同定されておらず、RNA ligaseもまだ未同定である。そこで、酵母細胞にXBP1 mRNAやIRE1を発現させることで細胞質スプライシングを再構成し、そこへヒトcDNA libraryを導入して細胞質スプライシングが促進されるかどうかを指標に、細胞質スプライシングに関与する因子を検索することを試みた。検索の結果、ubiquitin ligase領域を有するタンパク質CSRF-1(Cytoplasmic Splicing Regulating Factor-1)を同定した。細胞中でCSRF-1を過剰発現するとpXBP1(S)の発現量が増加し、RNA干渉法でCSRF-1の発現を抑制するとpXBP1(S)の発現量が減少する。CSRF-1のubiquitin ligase領域は活性には重要でないことも見いだしている。現在、CSRF-1の作用機序の解析を進めている。また、検索方法も改良中であり、更に検索を行う予定である。

### b. ゴルジ体ストレス応答の解析

#### (背景)

分泌の盛んな細胞と盛んでない細胞では、ゴルジ体の発達度に大きな違いがある。また、授乳している母親マウスの乳腺細胞ではゴルジ体が著しく発達しているが、仔マウスを離して授乳を止めるとゴルジ体は速やかに退縮し、仔マウスに戻すとまた発達してくることが知られている(Clermont et al., (1993), Rambourg et al., (1993))。これらのことから、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、その分子機構を解析することを試みた。

#### i. ゴルジ体ストレスを付加する方法の検討

ゴルジ体の機能を不足させることで、ゴルジ体ストレス応答を惹起できるのではないかと考え、いくつかの方法を検討した。ゴルジ体の機能としては、糖鎖の修飾、タンパク質のプロセシング、脂質の添加などがあるが、これらの機能を阻害する薬剤をいくつか試している。具体的には、alpha-mannosidaseIの阻害剤であるdeoxymannojirimycinやalpha-mannosidaseIIの阻害剤であるswainsonine、trans-GolgiのpH（かなり強い酸性を示す）を中和してゴルジ体の機能を低下させるnigericinやmonensinについて検討した。また、ゴルジ体にGFPやインフルエンザウイルスのHAタンパク質などを大量に停留させることも試みた。検討の結果、小胞体ストレスを惹起せず、またゴルジ体に明瞭な形態変化を与えるnigericinとmonensinを用いることにした。



## ii. monensin 処理によって発現が誘導される遺伝子の検索

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 (あるいは未処理) し、RNA を抽出して microarray 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ったが、これらのうちには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。具体的には、ゴルジ体の構造維持に関わるもの (1 個)、糖鎖修飾に関わるもの (7 個)、脂質合成に関わるもの (35 個)、小胞輸送に関わるもの (8 個)、タンパク質分解に関与するもの (8 個) が含まれていた。これらの遺伝子の一部をクローニングし、Northern blot を行った結果、多くのものは monensin 処理や nigericin 処理によって転写が誘導されることを確認している。monensin 処理によって発現が誘導されたものがすべてゴルジ体ストレス応答によって転写誘導を受けているのかどうかについては検討の余地があるが、ゴルジ体の機能に関わる遺伝子が数多く単離されたことから、ゴルジ体ストレス応答による転写誘導を反映しているものが少なからず存在していると考えている (図 4)。

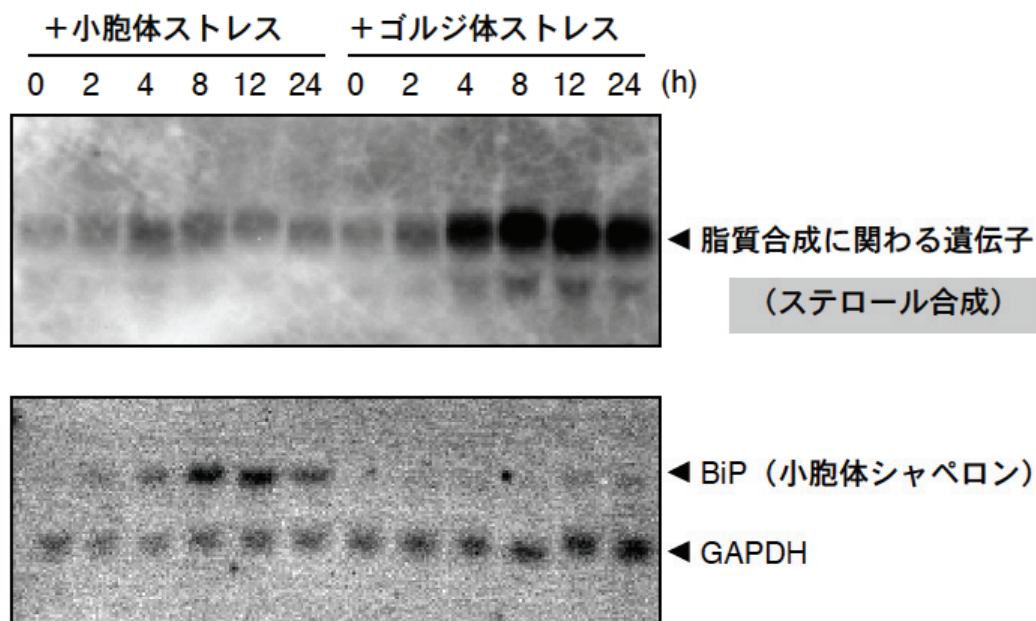


図 4 monensin による HMGCR 遺伝子の発現誘導

ヒト HeLa 細胞を、小胞体ストレス誘導剤の thapsigargin、あるいはゴルジ体の機能を不足させる薬剤 monensin で処理し、経時的に RNA を抽出して Northern blot を行った。upper panel は HMGCR 遺伝子、lower panel は小胞体ストレスで誘導される遺伝子 BiP と loading control の GAPDH 遺伝子を検出している。

## iii. monensin 処理による転写誘導機構の解析

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ている。これらの標的遺伝子のひとつである HMGCR のプロモーターを解析した結果、現在 25 塩基までエンハンサー配列を限局化することができた。このエンハンサー配列は、HMGCR 遺伝子のエンハンサーとして従来知られている SRE(sterol response element)とは全く異なっている。今後は、更にエンハンサー配列を限局してそのコンセンサス配列を明らかにし、この配列が他の標的遺伝子でも働いているのか、またこの配列に結合する転写因子を単離することで、ゴルジ体ストレス依存的な転写誘導の分子機構に迫りたいと考えている。

糖鎖の修飾に関わる遺伝子や小胞輸送に関わる遺伝子、タンパク質分解に関わる遺伝子、ゴルジ体の構造維持に関わる遺伝子についてもプロモーターを既に単離したので、順次プロモーター

ター解析を行っていく予定である。

## (2)得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

### a. 細胞質スプライシングの研究成果

発展研究の結果、XBP1 のフレームスイッチスプライシングが細胞質で起こることを明らかにし、またその生物学的意義を明確にすることによって、細胞質スプライシングという新しい研究分野を切り開くことができたと考えている。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、この研究分野を大きく発展させていくことを期待している。以下、各研究成果について詳述する。

#### i. XBP1 mRNA のフレームスイッチスプライシングは細胞質で起こる

XBP1 のフレームスイッチスプライシングは酵母の HAC1 mRNA と高等動物の XBP1 の2例しか知られておらず、まだまだ解析が進んでいないのが現状である。HAC1 mRNA のフレームスイッチスプライシングの場合、以前は核で起こると考えられていたが (Kawahara et al., 1997, MBC; Goffin et al., 2006, MBC)、最近では細胞質で起こると考えられるようになってきた (Chapman et al., 1997, Curr. Biol.)。XBP1 の場合も細胞質で起こるのではないかと論文が出始めているが (Back et al., 2006; Iwawaki et al., 2006)、まだ完全な証明には至っていない。発展研究での解析結果については現在論文を準備中であり、どのように評価されるかは未知数であるが、細胞質で起こるという考えをかなり確実にすることができたと考えている。最終的な証明は、スプライシングに関わる因子群が確かに細胞質に存在することを明らかにする必要があるだろう。

#### ii. 環境変化に対して迅速に対応できることが細胞質スプライシングの生物学的意義である

「スプライシングが核で起ころうが、細胞質で起ころうが大差ないのではないかと」いうのがこれまでの受け取られ方であったが、発展研究での解析の結果、細胞質スプライシングの場合には前駆体 mRNA にも機能のあるタンパク質がコードされており、環境変化に応じてスプライシングをしたりしなかったりすることで発現するタンパク質の性質を迅速に切り換えていることが明らかとなった。これにより、細胞質スプライシングの生物学的重要性を(単に機構が物珍しいと言うだけでなく)明確にすることができたと考えている。pXBP1(U)に機能があることは別のグループによっても確認されており (Tirosh et al., 2006, JBC)、この考え方に大きな間違いはないと考えている。

#### iii. 細胞質スプライシングに関与する因子の探索

XBP1 の細胞質スプライシングに関与する因子としては、現在のところ IRE1 しか知られていない。切断された RNA をつなぐ RNA ligase の同定を、いろいろな研究室が試みているが、まだ単離には至っていない。HAC1 の場合、tRNA ligase である Rlg1p が、RNA ligase であることがわかっているが、高等動物には Rlg1p のホモログが存在しないこと、また tRNA のプロセッシング機構が酵母と高等動物で大幅に異なることから、XBP1 のスプライシングに関与する RNA ligase が tRNA ligase であるかどうか不明である。発展研究では、RNA ligase に焦点を絞ることはせず、スプライシングに関与する因子を広く探索することを行った。その結果単離した CSRF-1 が細胞質スプライシングにどの程度重要な因子であるかは未知数であり、どのような作用機序でスプライシングに関与しているのかを明らかにすることが肝要であると考えている。このような因子は他にも複数存在すると思われるので、スクリーニング系を改良しつつ、更に検索を進めたいと考えている。このような因子群を同定していくことで、細胞質スプライシングという研究分野を大きく発展させることができると考えている。

### b. ゴルジ体ストレス応答の研究成果

ゴルジ体ストレス応答に関する報告はこれまで一切なく、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。このようにきわめて先



駆的・冒険的な研究テーマであるが、そこには「核とオルガネラ間の情報伝達」に関わる基本原理が潜んでいるのではないかと期待している。小胞体ストレス応答の研究も、初期の段階ではその生物学的意義が不明確であったが、分子機構を明らかにしていく過程でその重要性が認識されるようになっていった経緯がある。ゴルジ体は小胞体よりも複雑な構造を持ち、そもそもその機能についてもまだまだ未知の部分が多い。これまでに行われてきたゴルジ体の研究では、その機能・存在量の調節といった観点からの解析はほとんどなかったが、私の得意とする転写制御からの新しい切り口を加えることで、ゴルジ体研究の本流に少しでも影響を与えることができると考えている。

しかしながら、研究はまだ端緒についたばかりであり、問題点も数多い。果たして **nigericin** や **monensin** で処理することが、本当にゴルジ体ストレス応答を観察することになっているのかどうか、100%確実な証拠はない。但し、これらの薬剤処理によってゴルジ体の機能に関わる遺伝子の発現が誘導されていることから、大きく目的とはずれてはいないのではないかと考えて研究を進めている。これらの遺伝子の発現が、**nigericin** とは異なる作用機序のゴルジ体機能阻害処理によっても誘導されることを見いだすことが肝要と考えている。また、転写制御に関わる因子（特にゴルジ体ストレス応答のセンサー分子）を同定し、その分子機構を明らかにしていくことによって、ゴルジ体ストレス応答が本当に存在することの最終的な証明ができ、またその生物学的意義をより明確にできるのではないかと考えている。

今回同定した **HMGCR** 遺伝子のプロモーター上のエンハンサー配列は、既知のエンハンサー配列とは異っており、ゴルジ体ストレス応答に特異的なエンハンサーであることを期待している（もちろん単なる **monensin** 応答エレメントである危険性もはらんでいる）。このエンハンサー配列が、他の標的遺伝子にも共通してみられるのかどうか、早急に検討を進めたい。

## 5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

### (1) 細胞質スプライシングの研究

研究開始当時はほとんど類似研究の報告はなかったが、国際学会で発表し、また文献2を公表すると、類似の研究をしていた研究者からもいくつか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勃興すると思われるが、本研究の研究成果はその基盤を築くものであり、また関与する因子を同定するというテーマは、今後この分野の中心的課題のひとつとなるものであると考える。

### (2) ゴルジ体ストレス応答の研究

類似研究の報告は一切ない。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、先駆的かつ冒険的な発展研究である。

## 6. 研究実施体制

| 氏 名  | 所 属  | 役 職 | 研究項目                                   | 参加時期                         |
|------|------|-----|----------------------------------------|------------------------------|
| 吉田秀郎 | 京都大学 | 助教授 | ゴルジ体ストレス応答<br>の解析<br>細胞質スプライシング<br>の解析 | 平成 16 年 12 月～<br>平成 19 年 3 月 |
| 奥雅弥  | 京都大学 | 院生  | ゴルジ体ストレス応答<br>の解析                      | 平成 16 年 12 月～<br>平成 19 年 3 月 |

## 7. 研究期間中の主な活動

### (1) ワークショップ・シンポジウム等

| 年月日                  | 名称                        | 場所       | 参加人数    | 概要                      |
|----------------------|---------------------------|----------|---------|-------------------------|
| 平成 16 年<br>12 月 13 日 | 第 42 回日本生物物理学会シンポジウム      | 京都国際会議場  | 約 100 名 | 京都大学ウイルス研究所 秋山芳展助教授と共催  |
| 平成 18 年<br>12 月 6 日  | 日本分子生物学会フォーラム 2006 シンポジウム | 名古屋国際会議場 | 約 100 名 | 名古屋大学大学院理学研究科遠藤斗志也教授と共催 |

### (2) 招聘した研究者等

| 氏 名（所属、役職） | 招聘の目的 | 滞在先 | 滞在期間 |
|------------|-------|-----|------|
|            |       |     |      |
|            |       |     |      |

## 8. 発展研究による主な研究成果

### (1) 論文発表（英文論文 9 件 邦文論文 4 件）

- ① Yoshida, H. (2007) ER stress and diseases. **FEBS J.** 274, 630-658.
- ② \*Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006) pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. **J. Cell Biol.** 172, 565-575. (\* Corresponding author ; selected for minireview)
- ③ Yoshida, H., Nakanaka, S., and Mori, K. (2006) XBP1 is critical to protection of cells from endoplasmic reticulum stress. **Cell Struct. Funct.** 31, 117-125.
- ④ Yoshida, H. (2007) Unconventional splicing of XBP1 mRNA in the unfolded protein response. **Antioxid Redox Signal.**, in press.
- ⑤ Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R. J., Nagata, K., and Mori, K. (2006) Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. **J. Cell Biol.** 172, 383-393.
6. Huang, Z., M., Tan, T., Yoshida, H., Mori, K., Ma, Y., and Yen, T.S. (2005) Activation of hepatitis B virus S promoter by a cell type-restricted IRE1-dependent pathway induced by endoplasmic reticulum stress. **Mol. Cell. Biol.** 25, 7522-7533
7. Nakanaka, S., Okada, T., Yoshida, H. and Mori, K. (2006) A role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. **Mol. Cell. Biol.** 27, 1027-1043.
8. Nakanaka, S., Yoshida, H., Sato, R. and \*Mori, K. (2006) Analysis of ATF6 activation in site-2 protease-deficient Chinese hamster ovary cells. **Cell structure and Function**, 31, 109-116.
9. Nakanaka, S., Yoshida, H., and Mori, K. (2006) Reduction of disulfide bridges in the luminal domain of ATF6 in response to glucose starvation. **Cell Struct. Funct.** 31, 127-134.

10. 吉田秀郎 「細胞質で起こる mRNA スプライシング」  
蛋白質核酸酵素 第 51 巻 (2006) 863-870.
11. 吉田秀郎 「細胞質スプライシング」  
生化学 第 78 巻 (2006) 778.
12. 吉田秀郎 「小胞体ストレスと細胞分化の接点」  
実験医学 第 23 巻 (2005) 2772-2777.
13. 吉田秀郎 「フレームスイッチスプライシング」  
分子細胞生物学辞典 (第 2 版) (2007) 印刷中.

## (2)口頭発表

### ①学会

国内 4 件, 海外 2 件

### ②その他

国内 8 件, 海外 0 件

## (3)特許出願 (本研究に係わり、JST から出願したものとで研究機関から出願したもの)

| 出願元  | 国内 (件数) | 海外 (件数) |
|------|---------|---------|
| JST  | 0       | 0       |
| 研究機関 | 0       | 0       |
| 計    | 0       | 0       |

## (4)その他特記事項

平成17年9月9日 「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」 科学新聞

## 9. 結び

私は、学位取得直後に HSP 研究所で森和俊氏 (現京大理学部教授) とともにこの仕事を始めてから 13 年間「核とオルガネラのコミュニケーション」の仕事を続けています。始めた頃は高等動物の小胞体ストレス応答の分子機構に関してはほとんどわかっておらず、そもそも小胞体ストレスという訳語さえない時代でした。学会で発表しても手応えはなく、研究を続けることすら危ぶまれる状態でした。2000 年には日本で研究を続けることを断念し、酵母の小胞体ストレス応答の重鎮である Mary-Jane Gething 教授の下で細々と高等動物の小胞体ストレス応答の研究を続けておりました。その後森教授から要請があり帰朝しましたが状況は改善されず、紆余曲折を経て遂に無給の研修員になりました。しかし、悲壮感にくれていたような記憶は全くありません。留学するときに恩師である由良隆 HSP 研究所長 (当時) から頂いた「吉田君、就職なんかしないでいいよ。研究ができることが一番だよ」という言葉が脳裏に焼き付いていたからでしょうか。

経済的限界が近づき、そろそろ Gething 研に戻ろうかとしていたところ、奇跡的にもさがけ研究 (「情報と細胞機能」領域: 関谷剛男領域総括) に採用していただき、そこから研究人生が大きく展開することになりました。3 年間のさがけ研究によって安定した研究をさせていただいた結果、「小胞体ストレス応答」について基本的な部分を明らかにすることができました。望外にも、さらに発展研究に採用していただき、「細胞質スプライシング」と「ゴルジ体ストレス応答」という通常の研究費システムではサポートされないよう

な冒険的なテーマで研究を続けさせていただくことができました。その結果、細胞質スプライシングに関しては、その基本的な概念について論文として報告するところまでたどり着きました。ゴルジ体ストレスに関しては当初予想されたとおり暗中模索を続けていますが、研究の端緒をつかむことができたのではないかと考えています。

振り返ってみると、学生の頃から HSP 研究所、Gething 研、さきがけ研究、発展研究とずっと学問的な理想論のみを追って研究を進めることができたと感じています。ともすれば安易に結果の出る重箱の隅をつつくような研究や、簡単に注目を集めることのできる流行の研究をしてしまうところですが（経済的にもその方が楽）、幸運にもそのような流れに吞まれることなく、自分で見つけたユニークな現象について本質的・学問的・先駆的な研究を続けることができました。これは私が強い意志を持っていたからではなく、すばらしい **Mentor** の方々に恵まれたおかげです。特に、さきがけ研究・発展研究の5年間にお世話になった関谷総括の YMWH 精神（何事もやってみなくちゃわからんよ、という純粹に学問的な創造精神）に大いに育てていただいたと感謝しています。領域会議はこの精神に共感するアドバイザーの方々、またこの精神で研究を進めている研究者の方々の集まりであり、領域会議に参加することで私もこの精神にどっぷりと浸ることができました。現実的なアドバイスをもらえることももちろん大事ですが、研究者としての方向性を揺るぎないものにすることができたことがこの5年間で私が得た最大の収穫です。

この5年間、研究者としての立場にも大きな変化がありました。無給の研修員から一転してさきがけ研究員になり、独立したテーマ・研究費で一人研究に専念した後、母校である京大理学部ポジションを得、小さいながらも研究室を主宰するところまでたどり着きました。一緒に研究をする学生もやってきましたので、こんどは私が **Mentor** とならなければなりません。さきがけ研究・発展研究で得た研究成果・研究設備もちろん重要ですが、研究者として成長させていただいたことが（まだまだいたらないところばかりですが）、研究室の舵取りをしていく際に必要不可欠な資産となっていることを日々痛感しているところです。

これで私も「さきがけ研究」から卒業です。これからは、研究室内外でさきがけ精神を広め、同じころざしを持つ研究者を育てていきたいと思います。また、もし卒業生として「さきがけプロジェクト」にお手伝いできることがありましたら、非力ですが御協力させていただきたいと存じます。

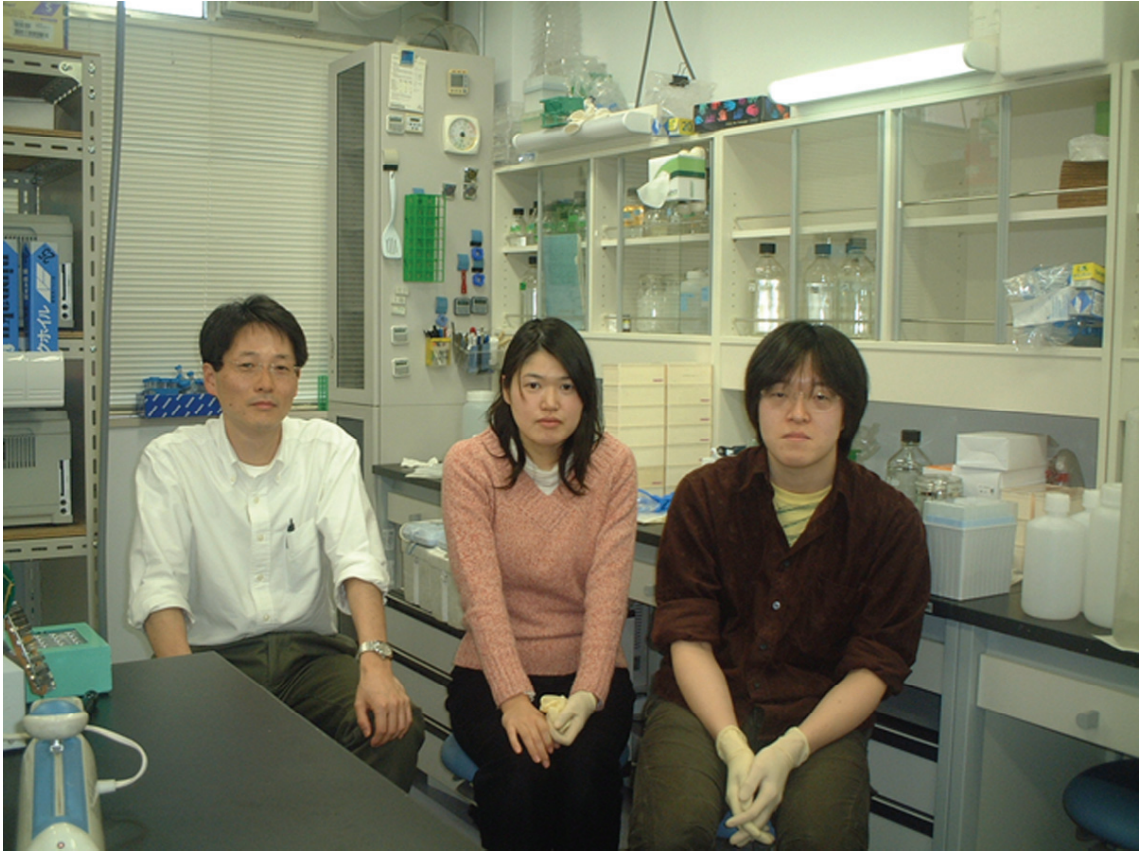


図5 現在主宰する研究室のメンバー  
左から、吉田秀郎、上村彩、奥正弥