



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

小胞体ストレス誘導性 Cation transport regulator homolog 1 の発現制御および機能の解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-08-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 野村, 雄紀 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56207

氏名（本籍）	野村 雄紀（岐阜県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位授与番号	甲第 37 号
学位授与日付	平成 29 年 3 月 25 日
専攻	創薬科学専攻
学位論文題目	小胞体ストレス誘導性 Cation transport regulator homolog 1 の 発現制御および機能の解析 (Characterization of the expression and function of an ER stress-inducible cation transport regulator homolog 1)
学位論文審査委員	(主査) 教授 赤 尾 幸 博 (副査) 教授 丹 羽 雅 之 (副査) 教授 森 田 洋 子 (副査) 准 教授 大 橋 憲 太 郎

論文内容の要旨

小胞体は真核細胞に存在する細胞内小器官の一つであり、膜蛋白質や分泌蛋白質の適切な折りたたみや翻訳後修飾を行っている。小胞体の内部環境が悪化し、内腔に折りたたみ不全蛋白質が蓄積すると、小胞体にストレスが生じる。この時、蛋白質恒常性を保つために様々な遺伝子の発現が誘導され、ストレスに対応するが、一方、ストレス状態が持続すると、細胞死を誘導する。小胞体ストレスはパーキンソン病・アルツハイマー病などの神経変性疾患の原因の一つであると考えられている。

Cation transport regulator homolog 1 (Chac1) は小胞体ストレスによって誘導される遺伝子の一つであり、これまでに、種々のストレス条件下において転写が上昇することやその上昇に関わるプロモーター上の応答配列について我々を含め報告されている。また、Chac1 蛋白質は γ -glutamyl cyclotransferase 活性を持ち、細胞内酸化還元状態の維持に関わる主要な物質であるグルタチオンを分解する機能を有することが報告されている。しかし、Chac1 蛋白質の翻訳および翻訳後の調節機構に関しての知見は少なく、本研究ではこれらについての解析を行った。

Chac1 の翻訳制御については Chac1 mRNA の蛋白質コード領域上流の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) に着目した。この領域中には mRNA の翻訳を促進する Kozak 様配列が含まれている。そこで、この領域が Chac1 の翻訳に寄与するかどうかを検討するために、5' UTR 全長、並びに、Kozak 様配列のみを含む、または、含まない Chac1 発現コンストラクトを作製した。次いで、これらコンストラクトをヒト胎児腎臓細胞 (HEK293) に強制発現させたところ、Kozak 様配列依存的に Chac1 蛋白質の発現は上昇することが分かった。さらに、Kozak 様配列がない場合、フルサイズの Chac1 (30 kDa) に加えて、低分子量の Chac1 (Δ Chac1, 17 kDa) が発現し、翻訳開始点下流の 2 番目のメチオニンから翻訳されることを明らかにした。

Chac1 の翻訳後制御については、これまでの本研究室からの報告を元に、ユビキチン (Ub) 化された蛋白質を分解するユビキチン-プロテアソームシステムに焦点を当てて解析を行った。Chac1 発現コンストラクトを HEK293 細胞に強制発現させ、ユビキチン-プロテアソームシステムの阻害剤である MG132

で処理すると、Chac1 発現は上昇した。また、HEK293 細胞における内因性 Chac1 蛋白質も MG132 処理により発現量が上昇することを明らかにした。従って、Chac1 はユビキチン-プロテアソームシステムによって発現を調節されていることが分かった。

Chac1 がユビキチン-プロテアソームシステムによって調節されていることから、Ub を Chac1 と共発現させると、Chac1 分解が亢進するのではないかと考えた。しかし、予想に反し、Chac1 は Ub との共発現によって Ub 化されるにもかかわらず、発現量は上昇した。これらの結果から、ユビキチン-プロテアソームシステムで分解される際に不可欠な蛋白質の Ub 化が Chac1 においては安定化にも寄与していることが示唆された。そこで、Chac1 の Ub 化部位の同定を試みた。一般的に、Ub は標的となる蛋白質のリジン残基に結合する。Chac1 のアミノ酸配列には 5 つのリジンが存在することから、それらをアルギニンに置換した発現コンストラクト Chac1 (K0) を作製した。そして、Ub 共発現、MG132 処理による蛋白質発現を解析したところ、Chac1 (K0) でもこれらの処理により Ub 化され、発現量は上昇した。一方、Ub は標的蛋白質の N 末端にも結合することが報告されている。

そこで Chac1 の N 末端領域の Ub 化を阻害するために N 末端に Myc タグを付加させた、または、N 末端側を欠損させたコンストラクトを作製し、Ub 共発現や MG132 処理の効果を検証した。結果として、どの変異型 Chac1 もこれらの処理により、蛋白質の発現量は上昇した。すなわち、Chac1 の Ub 化部位はリジン残基や N 末端側以外の領域であることが示唆された。

最後に、Chac1 のグルタチオン分解活性について検討を加えた。Chac1 と ΔChac1 を HEK293 細胞に強制発現し、細胞内グルタチオン量を測定した。これまでの報告通り、Chac1 は有意に細胞内グルタチオン量を減少させた。しかしながら、ΔChac1 を発現させた細胞では有意な減少は見られなかった。ΔChac1 には酵素活性部位が含まれているので、N 末端領域を含めた Chac1 全体の構造はグルタチオン分解活性に重要であることが示唆された。

以上の結果より、Chac1 の翻訳および翻訳後調節についての有意義な知見が得られた。神経変性疾患をはじめとする幾つかの病態では小胞体ストレスの誘導とともに、酸化還元状態の異常が報告されている。従って、各種疾患における Chac1 発現の変化とグルタチオン枯渇に起因する酸化ストレスの関連を解明することが、さらなる病態理解および治療法開発に繋がるものと期待される。

論文審査結果の要旨

本論文は、小胞体ストレス誘導性因子 Cation transport regulator homolog 1 (Chac1) の転写、翻訳および翻訳後制御に関する成果をまとめたものである。

本研究で着目した小胞体ストレスは、パーキンソン病・アルツハイマー病などの神経変性疾患のみならず、癌、糖尿病をはじめとする多くの疾患の発症・進行に関わることが報告されている。Chac1 遺伝子発現については、小胞体ストレスが関連する種々の炎症・病態モデルにおいて上昇していることが報告されているが、その転写調節機構は十分解明がなされていない。そこで申請者は、マウス Chac1 プロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作製・解析することにより、Chac1 5'-flanking region の CREB/ATF に加えて AARE が重要な機能を果たすことを明らかにした。

次いで申請者は、Chac1 タンパク質の翻訳および翻訳後の制御について検討を行った。Chac1 タンパク質の翻訳においては、5' 非翻訳領域、とりわけ翻訳開始点直前にある Kozak 様配列の重要性を

明らかにした。また、生成された Chac1 タンパク質はプロテアソーム系により速やかに分解される不安定なタンパク質であることを示した。一方、この Chac1 タンパク質はユビキチンと共発現することで安定化に導かれることを見出した。そこで、一般的なユビキチン結合部位であるリジン残基を含まない Chac1(K0)コンストラクトを作製し、免疫沈降法により検討することで、Chac1 タンパク質のユビキチン化はリジン残基を介さないことを示した。ユビキチン化によるプロテアソームでの分解とタンパク質安定性という両方向性の制御を受けることが報告されている因子は極僅かであることから、今後、本知見に基づいて Chac1 ユビキチン化酵素の同定およびそのユビキチン化様式の解明が期待される。

最後に、本研究の過程で見出した低分子量型 Chac1(Δ Chac1)を強制発現させ、全長型 Chac1 とのグルタチオン分解活性を比較した。その結果 Δ Chac1 は、活性中心部位を含むものの全長型 Chac1 のようにグルタチオン分解活性を有しないことが明らかとなった。

以上のように、本論文では Chac1 の転写、翻訳および翻訳後制御について解析し、新たな知見を得た。グルタチオン分解酵素である Chac1 は、各種病態において小胞体ストレス、酸化ストレス、プロテアソーム系異常が密接に関連することを示唆しており、今後 Chac1 を標的とした薬剤の開発等にも繋がるものと考えられることから、博士論文として価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨

野村氏の学位論文は、これまで行ってきたChac1遺伝子に関する一連の研究内容をまとめ、審査付き論文として公表済みの論文に基づいていることから、本論文が学位論文として完成された内容であることを確認した。

また、公聴会において、学位論文の内容に関する事項、すなわち、小胞体ストレス誘導性因子 cation transport regulator homolog 1の転写、翻訳および翻訳後の発現制御、細胞内グルタチオンの分解活性の解析、小胞体ストレス・酸化ストレスおよびプロテアソーム系異常に伴う疾患の解明に対する今後の研究の方向性などに関して諮問を行った。申請者からは十分な内容の回答が得られたので、博士（薬科学）の学位に適するものと判断し、最終試験に合格したと判定した。

論文リスト

1. Nomura Yuki, Hirata Yoko, Kiuchi Kazutoshi, Oh-hashii Kentaro. “Translational and post-translational regulation of mouse cation transport regulator homolog 1.” *Scientific Reports* **6**, 28016 (2016) 【Impact Factor: 5.228】