

## 審査の結果の要旨

氏名 築茂由則

本研究は糖尿病、神経変成疾患、癌など多くの病態と深い関与が指摘されている小胞体ストレス応答の分子機構について明らかにするため、ストレス応答に主要な役割を果たす ATF6 の活性化を調べる系において、抑制的に働く新たな制御因子として NUCB1 の発見と機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. NUCB1 は小胞体ストレス下において発現が誘導されることを RT-PCR、Western-blotting により明らかにした。さらにプロモーター解析を行った結果、ヒトとマウス間で保存されている ER ストレス応答配列 ERSE II を同定した。ERSE II を含むプロモーター領域を Luciferase 遺伝子につないだ plasmid を用いて Luciferase assay を行った所、小胞体ストレス誘導剤 Tunicamycin 処理により活性が増強され、ERSE II に点変異を導入した場合はその活性が著しく減少したことから ERSE II は NUCB1 の発現誘導におけるシスエレメントとして機能しうることが示された。
2. 小胞体ストレス応答における NUCB1 の機能を調べるため、一過性発現の系において、ストレス応答のマーカー遺伝子である小胞体局在の分子シャペロン GRP78 の発現への影響をそのプロモーターを用いた Luciferase assay と Western-blotting により評価した。その結果 NUCB1 を過剰発現させた場合では、明らかに GRP78 の発現が抑制されることが示された。
3. GRP78 の発現誘導において重要な小胞体膜結合型転写因子 ATF6 の活性化に対する NUCB1 の影響について Western-blotting により調べた。小胞体ストレス依存的に認められた ATF6 の活性化へのプロセッシングは、NUCB1 の過剰発現により抑制され、反対に siRNA を用いて NUCB1 の発現を抑制した場合は ATF6 の活性化バンドが増加した。よって NUCB1 は ATF6 のプロセッシングを抑制していることが示唆された。

4. 免疫染色により NUCB1、ATF6、ならびに ATF6 プロセッシング酵素 SIP が小胞体ストレス下においてゴルジ体に共局在することを示した。また、ATF6 と SIP がストレス依存的に結合することを発見し、NUCB1 を発現させた場合ではその結合が抑制されることが免疫沈降法により示された。
5. 免疫染色によりストレス下での ATF6 の局在変化への NUCB1 の影響を調べた。ATF6 はストレス誘導剤 DTT 処理 20min 後にゴルジ体へ移行し 40min 後ではさらに核移行も見られたが NUCB1 を過剰発現させた場合では 40min 後においてもゴルジ局在を示す割合が多かった。よって NUCB1 はゴルジ体で ATF6 の活性化を抑制していることが示唆された。
6. 過去の文献において報告されていた NUCB1 のゴルジ体局在と細胞外分泌を制御するメカニズムとして N 末端に存在する小胞体シグナルペプチドの切断の有無が重要であることを、切断の起こらない変異型 NUCB1 を作製することで明らかにした。切断の有無は野生型と変異型を *in vitro* にて転写、翻訳させた産物とシグナルペプチダーゼを含むマイクロソーム画分とを反応させたサンプルも用いて Western-blotting を行い、分子量の違いにより示した。切断されない変異体ではゴルジ体に局在し、培養上清中への分泌が認められないことから、N 末端シグナルペプチドの切断型 NUCB1 は分泌され、非切断型 NUCB1 がゴルジ体に残れることが示唆された。

以上、本論文は小胞体ストレスにより発現が誘導される遺伝子 NUCB1 の機能解析を行った結果、小胞体ストレス応答に重要な転写因子 ATF6 の活性化を抑制する因子として働くことを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった ATF6 の負の制御機構を明らかにすることで複雑な小胞体ストレス応答の分子機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。