

審査の結果の要旨

氏名 平田 祐介

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質には飽和脂肪酸から高度不飽和脂肪酸(PUF A, polyunsaturated fatty acid)まで様々な脂肪酸が結合している。膜リン脂質の脂肪酸組成は生体膜環境を規定する主要な因子であり、膜の流動性や膜タンパク質の適切な機能発現に重要と考えられている。一方で生体膜環境は環境温度などの外的要因によっても影響を受けており、生体は膜環境変化に応答することで、外的環境へ適応していると考えられる。このような生体応答は、バクテリアにおいては一部その機構が明らかになっているものの、多細胞動物においては不明な点が多く残されている。平田は修士課程において、PUF A 合成系を欠損する線虫(*C. elegans* の脂肪酸不飽和化酵素 *fat-3* および *fat-1* の二重変異体。以下、PUF A 欠乏株と呼ぶ。)における遺伝子発現解析を行ない、PUF A 欠乏依存的に著しく発現上昇する遺伝子 *upd-1*(Upregulated gene under PUF A-Depleted condition 1)を同定した。さらに、この遺伝子をレポーターとし、PUF A 欠乏状態から *upd-1* 発現に至るシグナル伝達に関わる分子を網羅的 RNAi スクリーニングにより探索した結果、MAPK 経路を構成するキナーゼ分子群 *mtk-1*(MAP3K)、*mkk-4.2*(MAP2K)、*pmk-3*(MAPK)を同定した。このことから、膜環境変化(PUF A 欠乏)を感知する機構により MAPK 経路(MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路)が活性化し、何らかの生体応答が起こっていることが示唆された。そこで、博士課程において平田は、MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路活性化の生理的意義、および MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路の上流で生体膜環境を感知する機構の解明を目指した。

PUF A 欠乏株は、運動能の低下、成長遅延、様々なストレスへの感受性の亢進を示すことが報告されている。このような表現型は、PUF A 欠乏による生体機能低下を反映したものであると考えられる。一方で興味深い事に、この変異体は、熱ストレスに対する耐性を獲得していることも知られている(Nandakumar *et al.*, *PLoS GENETICS*, 2008)。平田は、この表現型は何らかの細胞内シグナルの活性化によって引き起こされたものと考え、MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路との関連を調べた。Wild-type および PUF A 欠乏株を、成虫期において通常培養温度(20°C)から致死温度(35°C)へと移行させ、経時的に生存率を記録した。その結果、PUF A 欠乏株では、Wild-type と比較して顕著な熱耐性の増大が認められた。この熱耐性の増大は、*mkk-4.2*(MAP2K)を欠損することで著しく抑制された。これらの結果から、PUF A 欠乏状態における熱耐性増大には、MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路の活性化が大きく寄与していることが示唆された。

線虫は、通常培養温度(20°C)から致死性のない高温環境(30°C)で数時間培養すると、致死温度(35°C)に対して耐性を示すことが知られている(獲得熱耐性)。そこで、MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路が獲得熱耐性に関与するかを調べたところ、Wild-type と比較して、*mtk-1*、*mkk-4.2*、*pmk-3* の変異体は獲得熱耐性が著しく減弱することを見出した。一方、通常培養温度から直ちに致死温度に曝したときの生存(内因性熱耐性)には Wild-type と MAPK 経路の変異体で差はみられなかった。また、この MAPK 経路が、熱ストレス時においても *upd-1* の発現誘導に関わるかどうかを調べた所、Wild-type で *upd-1* は顕著に誘導されたが、MAPK 経路の変異体では全く誘導されなかった。以上の結果から、MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路は熱ストレスによって活性化し、高温環境への適応(獲得熱耐性)に重要な役割を果たすことが示唆された。

熱ストレス応答に重要な因子として、*daf-16*(インスリンシグナルの下流で負に制御されるフォークヘ

ド型転写因子)、*hsf-1*(熱ショック転写因子)の2つの転写因子がこれまでに知られている。これらの転写因子は熱ストレス時に活性化され、熱ショックタンパク質などの熱ストレス応答に関わる遺伝子の転写誘導を引き起こす。MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路が、これらの転写因子を介して機能しているかどうかを遺伝学的に検証するため、*mkk-4.2* 変異体と *daf-16*、*hsf-1* 変異体の交配を行ない、獲得熱耐性の解析を行なった。その結果、*daf-16*、*hsf-1* のいずれの場合も、*mkk-4.2* との交配により獲得熱耐性が相加的に減弱しており、熱ストレス応答において、MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路は既知の熱ストレス応答経路とは独立に機能することが示された。

これまでに行った網羅的 RNAi スクリーニングから、PUF A 欠乏時の *upd-1* 発現上昇に関わる遺伝子を MAPK 分子以外に 102 遺伝子同定している。この中には、熱ストレス時の *upd-1* の発現上昇に関わる遺伝子、および MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路の上流で機能する遺伝子が含まれると考えられる。そこで、これら 102 遺伝子について、まず熱ストレス時の *upd-1* の発現上昇に関わる遺伝子があるかを、*upd-1::GFP* の発現を指標として調べた。その結果、66 遺伝子が熱ストレス時の *upd-1* の発現上昇にも関係していた。さらに、この 66 遺伝子について遺伝学的上下関係の解析を行なうべく、*mkk-4.2* を欠損した *upd-1::GFP* トランスジェニック体に対して、MKK-4.2 恒常活性体を発現させ、恒常的に *upd-1::GFP* の発現上昇が起こる系統を作成した。この系統に *mkk-4.2* の下流で働く *pmk-3* を RNAi すると、*upd-1::GFP* の発現は抑制されたが、*mkk-4.2* の上流で働く *mtk-1* の RNAi では抑制されなかった。そこでこの系統に対し、スクリーニングで得られた 102 遺伝子の RNAi を行い *mkk-4.2* との遺伝学的上下関係を調べた。その結果、*mkk-4.2* より上流に位置する膜タンパク質として、FLR (Fluoride Resistant)-1、FLR-3、FLR-4 を同定した。これらは細胞膜上に局在しており、複合体を形成することも示唆されている。以上の結果から、PUFA 欠乏時および熱ストレス時には、細胞膜上に局在する FLR 分子群 (FLR-1, FLR-3, FLR-4) が MTK-1-MKK-4.2-PMK-3 経路の上流で機能し、*upd-1* 発現誘導を引き起こしていることが示唆された。

本研究において平田は、PUF A 欠乏時の遺伝子発現誘導に関わる MAPK 経路が、PUF A 欠乏時の熱耐性の表現型に重要であることを明らかにした。また、PUF A 欠乏のみならず、熱ストレスによってもこの MAPK 経路を介した遺伝子発現誘導がおこることを見だし、獲得熱耐性という熱ストレスの適応応答に、この経路が重要であることを示した。さらに、この MAPK 経路は、*daf-16* や *hsf-1* が関わる既知の熱ストレス応答経路とは独立した経路であることが示唆された。以上のように、平田は熱ストレスの適応応答に重要な新規の細胞内シグナル伝達経路を解明した。

また、熱ストレスによる遺伝子発現誘導において MAPK 経路の上流で機能する分子として、膜タンパク質分子群、FLR-1, FLR-3, FLR-4 を同定した。FLR-1 は電位非依存性のナトリウムイオンチャネルファミリーに属し、その中には、物理的な刺激をシグナルに変換する受容体として機能する分子も知られている。また、FLR-3、FLR-4 はそれぞれ 2 回、3 回膜貫通領域を有するユニークな Ser/Thr キナーゼ様分子であり、これら FLR 分子群は PUF A 欠乏や熱ストレスといった生体膜環境の変化に応じて、下流の MAPK 経路を活性化する分子実体の有力な候補であると考えられる。

本研究は、特定の膜環境変化を認識してシグナルを伝達する仕組みが多細胞動物にも備わっていることを明確に示すものであり、生体膜環境変化に対する応答に関わる分子実体を明らかとし、分子メカニズム解明の糸口を提示したという点で、非常に意義深いものである。よって、本研究の成果は、博士(薬学)に充分値するものと判断した。