

審査の結果の要旨

氏名 山守 なつみ

熱ストレス応答は生物間で広く保存された基本的な細胞応答であり、熱ストレスのみならず、化学的ストレス（エタノール、重金属等）、物理的ストレス（X線、紫外線、浸透圧等）、酸化的ストレス、など様々なストレスにより誘導され、また病態にも深く関わるということが知られている。熱ストレス応答およびその結果生体が獲得する熱ストレス耐性は、線虫をモデル生物として盛んに研究が行われており、熱ストレス時に変性タンパク質の蓄積により活性化する転写因子 HSF-1 を介する経路と、インスリンシグナルの下流で機能する転写因子 DAF-16 を介する経路の二つの熱ストレス応答経路が知られている。一方、興味深いことに、高度不飽和脂肪酸(PUFA)を欠乏した *fat-3* 変異体は熱耐性を示すことが報告されている。この熱耐性は PUFA を添加することにより減弱することから、*fat-3* 変異体では PUFA 欠乏により何らかの熱ストレス応答シグナルが生じていることが示唆されていた。当研究室ではこれまでに、PUFA 欠乏時と熱ストレス時に顕著に発現上昇する遺伝子 *tbb-6* を見出し、*tbb-6* をレポーター遺伝子としたゲノムワイドな RNAi スクリーニングから、PUFA 欠乏時と熱ストレス時に MTK-1/SEK-3/PMK-3 からなる新規シグナル経路が働くことを見出している。さらに、この経路が熱耐性に重要な機能を担っていること、既知の熱ストレス応答経路である HSF-1 や DAF-16 とは独立に働くことを明らかにした。しかしながら、熱ストレス時に MAPK 経路を介してどのように熱耐性を獲得するかは不明であった。そこで、本研究において山守は、MAPK 経路の下流で熱ストレス耐性を獲得するメカニズムの解明を目指した。

これまでに、MAP2K である SEK-3 恒常活性化体を導入した *tbb-6* レポーター線虫に対する RNAi スクリーニングにより、熱ストレス時および PUFA 欠乏時の *tbb-6* 発現上昇に関わる 89 遺伝子(MAP キナーゼ分子除く)を見出している。そこで、山守は SEK-3 恒常活性化体を導入した系統に対し、これら各遺伝子を発現抑制することにより、MAPK 経路の下流で機能する分子の探索を行った。その結果、50 遺伝子が MAPK 経路の下流で機能することがわかった。これらの遺伝子の中には、転写因子として機能すると考えられる 3 遺伝子(*cebp-1*, *elt-2*, *nhr-67*)が含まれていた。そこで、この 3 遺伝子が熱耐性に関わるか検討を行ったところ、各遺伝子の RNAi により有意に熱耐性が減弱した。以上から、熱ストレス時に MAPK 経路の下流で *cebp-1*, *elt-2* および *nhr-67* といった転写因子が機能することで熱耐性を獲得することがわかった。山守は、この中で欠損変異体で発生過程における顕著な表現型を見せない、*cebp-1* に着目して解析を行った。

cebp-1 欠損変異体を用いて解析を行ったところ、熱ストレス時の *tbb-6* の発現が顕著に抑制され、熱耐性も有意に減弱した。また、*cebp-1* 変異体に対して *pmk-3* を発現抑制しても、*pmk-3* を単独で発現抑制した場合と同程度の熱耐性を示し、熱耐性の相加的な減弱は見られなかった。以上の結果から、熱ストレス時に *cebp-1* が MAPK 経路と同一経路で熱耐性に関わる分子である事が示唆された。

cebp-1 の哺乳動物におけるホモログである C/EBP β はリン酸化を受けることにより、その局在や転写活性が制御される。そこで、線虫においても *cebp-1* がリン酸化を介した制御を受けるか検討を行った。哺乳動物でリン酸化を受けるセリンに対応する 184 番目のセリンと 250 番目のセリンをそれぞれアラニンに置換した変異コンストラクトを *cebp-1* 変異体に導入した。その結果、*cebp-1(S184A)* を導入した個体では熱ストレス時の *tbb-6* の発現が回復したが、*cebp-1(S250A)* を導入した個体では回復しなかった。これより、熱ストレス時の *tbb-6* 発現上昇には *cebp-1* の S250 のリン酸化が必要であることが示唆された。

次に、熱ストレス時に MAPK 経路および *cebp-1* 依存的に発現が変化し、熱耐性の獲得に関与する遺伝子の同定を試みた。まず、熱ストレス時に *pmk-3* 依存的に発現変動する遺伝子をマイクロアレイ解析により探索した。その結果、熱ストレス時に *pmk-3* 依存的に発現上昇する遺伝子として 327 遺伝子を同定した。さらにその中から *cebp-1* 依存的に発現上昇し、かつ熱耐性に関わる遺伝子を探索したところ、*F11F1.1*、*C05B5.8*、*M03A1.8*、*F33H12.7*、*ckb-2* の 5 遺伝子を同定した。これらの遺伝子を発現抑制すると、熱耐性が有意に減弱した。以上の結果から、これらの遺伝子が熱耐性に必要であることがわかった。*cebp-1* 下流遺伝子である *ckb-2* は、膜リン脂質 PC の生合成に関わる酵素である事から、リン脂質生合成系と MAP キナーゼ経路の関連が示唆された。PC の合成経路として、ホスファチジルエタノールアミン(PE)のメチル化を介する経路も存在する。そこで、この合成経路に関わる酵素(*sams-1*、*pmt-1*)を発現抑制し PC の生合成を抑制したところ、MAPK 経路依存的に *tbb-6* が発現上昇する事が分かった。これより、PC 合成が抑制され、生体膜環境が変化することにより MAPK 経路が活性化することが示唆された。

本研究において山守は、熱ストレス時に MTK-1/SEK-3/PMK-3 から成る MAPK 経路の下流で転写因子 *cebp-1* を介して遺伝子発現が変化することにより、線虫は熱耐性を獲得するという全く新しい熱ストレス耐性獲得機構を見出した。MAPK 経路の下流で発現上昇し、熱耐性に関わる遺伝子として同定した 5 遺伝子がどのように熱耐性に関わるかは、現在不明であるが、*F11F1.1* は *hsp-70* ファミリーに属する分子であり、分子シャペロンとして機能していると考えられる。Hsp ファミリーの中には生体膜と相互作用して生体膜の物理化学的性質を変化させる分子が存在しており、*F11F1.1* も生体膜の構造を安定化させることで熱ストレス耐性に寄与している可能性がある。更に、*ckb-2* はコリンキナーゼをコードしており、コリンをリン酸化してホスホコリンを合成する。この酵素は主要な生体膜リン脂質である PC 合成経路の初発酵素であり、熱ストレス時に PC 合成を亢進させて膜環境を変えることにより、熱耐性を獲得している可能性が新たに見出された。今回同定した分子の多くは哺乳動物にも保存されており、同様の熱耐性獲得機構が哺乳動物にも保存されている可能性も高く、今後の発展が大いに期待できる。よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。