

## 自然免疫関連受容体 Toll-like receptor とヒストン脱アセチル化酵素 Sirtuin 1 の 小胞体ストレスによる遺伝子発現制御機構の解明

分子機能薬学専攻 遺伝子機能応用学分野 島崎 省吾

小胞体はタンパク質の品質管理や細胞内カルシウムの制御、脂質膜の生合成などにおいて重要な役割を果たす細胞内小器官である。小胞体はその多岐にわたる機能ゆえに小胞体内環境は非常に繊細であり、これまでに様々な細胞内外からの刺激がミスフォールドタンパク質の蓄積を誘導し、いわゆる小胞体ストレスという状態に陥らせることが示されている。生体はこのような細胞内外からの刺激に対して小胞体ストレス応答 (unfolded protein response : UPR) を誘導し、恒常性を維持しようとする。近年、小胞体ストレスが様々な疾患の発症に関わることが示唆され、実際にそれぞれの疾患において小胞体ストレスマーカーの発現上昇が認められている。さらに、小胞体ストレスを標的とした創薬研究が発展してきたことで、様々な疾患への応用が期待される。したがって、どのような刺激で小胞体ストレスが引き起こされ、また、UPR がどのように標的遺伝子を制御するかについて理解することは小胞体ストレスを標的とした創薬を目指す上で極めて重要である。そこで本研究では、疾患の病態形成に関わる遺伝子発現制御機構における小胞体ストレス応答の関与を明らかにすることを究極の目的として、第1に、様々な炎症性疾患との関与がそれぞれ示されている toll-like receptor (TLR) シグナリングと UPR の相互作用について、第2に、様々なシグナル伝達経路の抑制因子として報告されている NAD<sup>+</sup> 依存的ヒストン脱アセチル化酵素 sirtuin1 (SIRT1) と UPR の関係について、第3に、嚢胞性線維症という遺伝性疾患の慢性炎症病態に関与する TLR2 の発現上昇と UPR について検討を行った。

1) 様々な炎症性疾患との関与がそれぞれ報告されている TLR シグナリングと UPR の相互作用を解明するために、UPR による TLR の発現および機能の制御を検討した。その結果、小胞体ストレスが TLR2 の発現を増加させることを *in vitro* および *in vivo* で示した。また、小胞体ストレスが TLR2 依存的な炎症性サイトカインの産生を増強することを示した。さらに、小胞体ストレス誘導性 TLR2 発現上昇に UPR 関連転写因子である ATF4 の重要性を示した。最近の知見として、TLR2 を含む TLR シグナリングが XBP1 の活性化と XBP1 を介した炎症性サイトカイン産生を誘導することが示されていることから、UPR と TLR シグナリングの相互作用はお互いを正に制御する機構であること、および炎症性疾患においてはこの相互作用が炎症反応を増悪することが示唆された。

2) シグナル伝達経路の制御因子として報告されている  $\text{NAD}^+$  依存的ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 と UPR の関係を解明するために、小胞体ストレスによる SIRT1 発現制御に着目して、種々の検討を行った。その結果、小胞体ストレスが SIRT1 タンパク質の発現を増加させることを *in vitro* および *in vivo* で示した。また、小胞体ストレスが SIRT1 の発現を XBP1 を介した転写活性化により増加させることを示した。興味深いことに、小胞体ストレスによって誘導された SIRT1 は UPR の 3 経路の活性化に関与し、結果として小胞体ストレス誘導性細胞死を促進することが示唆された。これらの結果より、UPR において SIRT1 発現上昇を介したポジティブフィードバック機構が存在することが示唆された。

3) ミスフォールドタンパク質の蓄積と TLR2 の発現上昇が既に報告されている嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis : CF) に着目し、本疾患における UPR の関与を明らかにすることを目的に種々の検討を行った。本研究では、原因タンパク質である cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) が変異し、ミスフォールドタンパク質 ( $\Delta\text{F508-CFTR}$ ) が産生される CF 細胞を用いた。まず、CF 細胞における小胞体ストレスの有無を検討した。その結果、予想に反して、CF 細胞における小胞体ストレスマーカーの発現は非 CF 細胞のそれと比較して違いが認められなかったことから、CF 細胞においては小胞体ストレスが起こっていないことが示された。次に、 $\Delta\text{F508-CFTR}$  が小胞体に保持される膜タンパク質である点に鑑み、膜タンパク質切断による遺伝子制御法である regulated intramembrane proteolysis (RIP) に着目した。その結果、CF 細胞においては  $\Delta\text{F508-CFTR}$  の C 末端を含む断片が恒常的に発現することを見出した。興味深いことに、この CFTR C 末端断片の発現はキモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤により減少し、主に膜画分に局在する塩基性タンパク質であったことから、本断片がプロテアーゼ依存的に生じることが示唆された。最後に、本断片が既存の RIP と同様に遺伝子を制御する可能性について検討したが、CF 細胞に存在する CFTR C 末端断片は少なくとも TLR2 の発現には影響を与えないことが示唆された。

以上、本研究は小胞体ストレス応答の標的遺伝子として新たに TLR2 と SIRT1 を同定し、両分子における UPR との間のポジティブフィードバックの存在を示すことで、UPR の新たなシグナル伝達経路を明らかにした。これらの知見は、小胞体ストレスが関与する疾患発症の分子メカニズム解明および小胞体ストレスを標的とした創薬における重要な基礎的知見である。