

論文内容の要旨

氏名 佐藤 亮介
 学位の種類 博士(薬学)
 学位記番号 薬第98号
 学位授与の日付 平成24年3月22日
 学位授与の要件 学位規程第5条第1項該当
 学位論文題目 MAPキナーゼシグナル依存的なRNA結合タンパク質Nrd1による細胞運命制御機構の解明

論文審査委員 (主査) 教授 杉 浦 麗 子
 (副主査) 教授 西 田 升 三
 (副主査) 教授 川 畑 篤 史

細胞は細胞外刺激、環境ストレス、内因性シグナル等の種々のシグナルに応答し、遺伝子発現を厳密に制御することにより細胞機能を維持している。また、細胞は増殖、分化、ストレス応答、老化、増殖停止、アポトーシスが厳密かつダイナミックに制御されることにより、個体としての恒常性が保たれている。この厳密に制御されている細胞運命の破綻は、がんなどの様々な疾病の引き金となることが知られている。そのため、細胞運命を制御しているシグナル伝達機構の解明は非常に重要であり、これまで数多くの研究がなされてきた。

特に MAPキナーゼ (MAPK) はすべての真核生物に存在し、細胞増殖、分化、ストレス応答、炎症、アポトーシスといった様々な生命現象を制御する重要なシグナル伝達分子である (Widmann *et al.*, *Physiol. Rev.* 1999)。また、MAPK 自身は下流に存在する転写因子などの標的因子をリン酸化することにより、これらの転写因子の活性や局在を制御し、転写レベルで遺伝子発現を調節している。近年、RNA 結合タンパク質が MAPK、あるいは MAPK phosphatase や MAPK の下流に位置する転写因子のような MAPK のコンポーネントの mRNA に結合し、mRNA の安定化や翻訳調節といった転写後制御により MAPK シグナル伝達経路を制御していることが明らかとなってきている (Mata *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 2005)。また、MAPK が RNA 結合タンパク質をリン酸化し、その RNA 結合能を制御するという報告も蓄積されつつある (Habelbah *et al.*, *Nat. Cell Biol.* 2001; Sugiura *et al.*, *Nature* 2003; Rodríguez-Gabriel *et al.*, *EMBO J.* 2003)。

分裂酵母 (*S. pombe*) は哺乳動物細胞と極めて近い細胞内システムを有する単細胞生物モデル系であり、細胞増殖や分化、ストレス応答といった高度に保存された生命現象の分子機構を明らかにする上で極めて有用である。さらに、分裂酵母には Ras、Rho、Cキナーゼ、MAPK、TOR (target of Rapamycin) といった数多くの薬物の標的分子や疾病に関連するシグナル伝達分子のホモログが高度に保存されている。

私は、分裂酵母の細胞質分裂に必須である myosin II essential light chain をコードする *cdc4* の変異細胞 (McCollum *et al.*, *J. Cell Biol.* 1995) を用いた遺伝学的スクリーニングを行った結果、RRM (RNA Recognition Motif) 型 RNA 結合タンパク質 Nrd1 をコ

ードする遺伝子を同定した。驚くべきことに、Nrd1 は減数分裂を負に制御する因子としても同定されている (Tsukahara *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1998, Jeong *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004)。このことから、Nrd1 は細胞質分裂と減数分裂という二つの生理機能を制御している可能性が示唆された。さらに affinity capillary electrophoresis mobility shift assay を用いた *in vitro* 結合実験を行った結果、Nrd1 は Cdc4 mRNA と結合することを明らかにした。興味深いことに、細胞増殖期において Nrd1 はヒト ERK MAPK のホモログであり細胞増殖シグナルの重要な制御因子である Pmk1 MAPK により直接リン酸化され、さらにこのリン酸化が Nrd1 の RNA 結合能力を負に制御していることを明らかにした。また、Nrd1 の Pmk1 MAP キナーゼによるリン酸化は細胞周期依存的に制御されており、細胞周期依存的な Nrd1 のリン酸化を介して Cdc4 mRNA の安定性が制御されていることを証明した。一方、Nrd1 は減数分裂期においては Pmk1 MAPK ではなく、分化や減数分裂を制御する Spk1 MAPK シグナルによりリン酸化を受けることが示唆された (未発表データ)。以上のことから、MAP キナーゼによるリン酸化依存的な RNA 結合タンパク質 Nrd1 による細胞質分裂と減数分裂の制御メカニズムについて明らかにした。

ストレス応答シグナル伝達経路は、細胞の自己防御システムにおいて重要な役割を果たしており、環境ストレスに対応して生体が生存するための機構として知られている。特に、MAPK シグナルは種々の環境ストレスにより活性化され、MAPK シグナルが異常になると環境ストレスに対する耐性機構に不具合が生じ、細胞がストレスに対して脆弱となる。従って、MAPK シグナルはストレス応答において中心的な役割を担っていると考えられる。細胞が酸化、遺伝毒性、高浸透圧、heat shock といった環境ストレスに暴露されると、細胞質にストレス顆粒 (Stress Granules: SGs) と呼ばれる膜に覆われていない構造体が形成される。SGs は哺乳細胞だけでなく、分裂酵母や出芽酵母、原生動物や後生動物にも存在することがすでに明らかとなっている。近年、分裂酵母においても SGs に局在するいくつかの因子が見つかってきており、複数の KH ドメインを有する KH 型 RNA 結合タンパク質 Vgl1 はその一つである (Wen *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2010)。また、PKA シグナルが SGs の制御に関与していることも

報告されている (Nilsson *et al.*, *RNA* 2011)。しかしながら、分裂酵母の SG 制御因子の報告は少なく、ストレス応答における SGs の生理学的意義についての理解は不十分である。

私は Nrd1 が熱ストレス、重ヒ酸ストレス、酸化ストレス、高浸透圧ストレスといった環境ストレス条件下において SGs に局在することを発見した。興味深いことに、環境ストレス条件下において、Nrd1 はリン酸化依存的に SGs に局在することが分かった。すなわち、Nrd1 は MAPK シグナル依存的に SGs への局在化が制御されていることが示唆された。また、Nrd1 はリン酸化依存的に Cpc2 (分裂酵母の RACK1: Receptor for Activated C Kinase 1) と結合し、Cpc2 は重ヒ酸ストレスにおける Nrd1 の SGs 局在化を制御する因子であることを明らかにした。さらに、*nrd1* KO 細胞では SGs 形成が遅延しており、Nrd1 過剰発現細胞では非ストレス条件下においても SGs が形成された。加えて、*nrd1* KO 細胞は持続ストレスに耐性を示し、一過性ストレスに感受性を示した。つまり、Nrd1 は SGs の形成を制御することで、ストレス耐性において重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究では、MAPK シグナルによる RNA 結合タンパク質やその標的 mRNA の制御機構とその重要性について明らかにすることで、遺伝子発現制御を介した細胞質分裂や減数分裂、ストレス応答といった細胞運命の制御機構について示した。さらに、細胞周期や細胞外刺激に応じて、複数の異なる MAPK が RNA 結合タンパク質をリン酸化することで細胞運命が制御されていることを明らかにした。MAPK シグナル伝達経路に関わる RNA 結合タンパク質の存在は、創薬の観点からも魅力的な標的分子であり、今後、RNA 結合タンパク質やその標的 mRNA を標的とした分子標的治療薬の開発が展開されていくと予想される。また、Nrd1 のように減数分裂や分化を制御している RNA 結合タンパク質の制御メカニズムを解明することは、iPS 細胞や ES 細胞の分化誘導法の開発や細胞移植に用いるドナー細胞の供給や創薬、再生医療における新しい技術の開拓に貢献できると考えられる。本研究で得られた知見を基盤とした研究が推進されることで、新薬開発などの臨床研究に応用されることを期待したい。

論文審査結果の要旨

MAP キナーゼシグナル伝達経路は真核生物に高度に保存されており、細胞増殖や分化、遺伝子発現、細胞死、ストレス応答といった細胞運命を制御している極めて重要なシグナル伝達経路の一つである。MAP キナーゼは、その下流に存在する様々な標的転写因子をリン酸化し、非常に多くの遺伝子発現を転写調節することで、細胞運命を制御することが明らかにされている。しかしながら、近年、MAP キナーゼが RNA 結合タンパク質を標的としている例が生物種を超えて相次いで報告されているが、その制御機構についての理解は未だ十分ではない。一方で、ストレス応答シグナル伝達経路は、細胞や自己防御システムにおいて重要な役割を果たしており、環境ストレスに対応して生体が生存するための機構として知られている。近年、細胞が環境ストレスに暴露されると、細胞質にストレス顆粒 (Stress Granules: SGs) と呼ばれる非膜性の構造体が形成されることが報告されている。SGs は哺乳細胞だけでなく、酵母や原生動物、後生動物にも存在することがすでに明らかとなっている。しかしながら、ストレス応答シグナルと SGs との関係は明らかにされておらず、SGs が形成されるの生理学的意義についての理解は不十分である。

申請者はシグナル伝達や RNA メタボリズム、翻訳マシナリーが高度に保存されており、遺伝学という強力なアプローチが展開できる分裂酵母 (*S. pombe*) をモデル生物とし、MAP キナーゼシグナル伝達経路による RNA メタボリズムといった転写後制御を介した細胞運命の分子機構を解明してきた。分裂酵母はヒトと共通した多くの疾病関連遺伝子や薬物標的分子をもつことから、シグナル伝達や遺伝子発現制御の異常が引き起こすがんや自己免疫疾患、神経変性疾患などの疾病や病態のメカニズムを分子レベルで解明するモデルとして極めて優れたモデル生物である。従って、本博士論文で得られた知見は、創薬や医療等に大きく貢献すると期待される。

第1章では、申請者は高度に保存された RNA 結合タンパク質である Nrd1 が細胞周期特異的に myosin II essential light chain である Cdc4 の mRNA を安定化するという、RNA 結合タンパク質による細胞質分裂の制御機構を明らかにした。さらに、Nrd1 の RNA 結合能が複数の MAP キナーゼシグナル依存的に制御されていることを証明した。その過程で、RNA 結合タンパク質と標的 mRNA の結合を *in vitro* で定量的に測定する目的で、キャピラリー電気泳動を利用した革新的な分析化学的手法を開発し、この成果は学術雑誌 *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 誌にて掲載されている。また、以上の成果から、申請者は *Molecular*

Biology of the Cell という世界的に権威ある学術雑誌に筆頭著者として掲載された。さらに、申請者は文部科学省新学術領域における『若手研究者発表会』や『2008年分子生物学会ワークショップ口頭発表(細胞周期セッション)』など、数多くの学会発表に採択されており、上記の研究成果が、生命科学の分野でも極めて重要な発見であり、国内外を問わず、注目を集めていることを裏付けている。

第2章では、RNA 結合タンパク質 Nrd1 が環境ストレス条件下において SGs に局在することを見出すとともに、この SG 局在化が MAPK によるリン酸化依存的に制御されていることを明らかにした。しかも、Nrd1 のパートナータンパク質である足場タンパク質 Cpc2 (ヒトの RACK1 ホモログ) が、Nrd1 とリン酸化依存的に結合することにより、Nrd1 の SG 局在化を促進しているという知見が得られた。さらに、Nrd1 は SG 形成を制御することで環境ストレス耐性に関与したことから、Nrd1 は SGs の新たな構成因子として環境ストレスに応答するための重要な役割を担っていることを明らかにした。この成果から申請者は、学術雑誌 *PLoS ONE* に筆頭著者として掲載された。

近年、MAPK は転写因子のみならず、様々な RNA 結合タンパク質をリン酸化し、RNA 結合能力を調節することにより遺伝子発現に影響を与えると同時に、それぞれの RNA タンパク質は様々な MAPK コンポーネントの mRNA と結合することでその安定性や翻訳を制御していることが報告されつつある。従って、これら2つの制御機構から、新たに RNA 結合タンパク質による MAPK 経路のフィードバック制御機構が提唱されている。申請者はこれらの報告をまとめ、学術的重要性やその意義について考察を行うことで、和文著書として蛋白質核酸酵素誌に、欧文総説として *Journal of Signal Transduction* 誌に掲載されている。

申請者は分裂酵母モデル生物として、MAPK シグナル伝達経路に焦点を当て、MAPK による RNA 結合タンパク質 Nrd1 を介した細胞運命制御機構を明らかにしてきた。さらに、Nrd1 は MAPK シグナル依存的に SGs に局在し、ストレス応答やストレス耐性において重要な因子であることを証明してきた。これらの研究成果から、申請者は3報の原著論文を発表しており、博士後期課程学位の要件を満たしている。また、1報の和文著書、1報の欧文総説を発表しており、研究成果をまとめる能力を有している。以上の理由から、博士後期課程学位論文として価値をもつものとする。