

## 博士論文審査報告書

氏名 小森 亮太  
学位の種類 博士（理学）  
学位記番号 博理第123号  
学位授与報告番号 甲第372号  
学位授与年月日 令和2年3月24日  
学位授与の要件 学位規則第4条1項該当  
論文題目 小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答の解析  
論文審査委員 (主査) 教授 阪口雅郎  
(副査) 教授 吉田秀郎  
(副査) 教授 樋口芳樹  
(副査) 准教授 斉藤美知子

(京都薬科大学薬学部)

### 1. 論文内容の要旨

細胞にはゴルジ体などの細胞小器官が存在しているが、その存在量は需要に応じて厳密に制御されており、必要な時には必要な細胞小器官だけが必要なだけ増強される。このような細胞小器官の量的調節機構は細胞が自律的に機能するために必須の機構であり、その研究は細胞生物学の根本的命題の一つである。小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答は、それぞれ小胞体とゴルジ体の量的調節機構である。本研究では、小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答に関する研究を行った。

これまでの研究から、哺乳類の小胞体ストレス応答の分子機構が明らかにされ、その生理的機能も知られていたが、生理的機能に関しては神経変性疾患や糖尿病など疾患に関連したものであり、内的な要因によって活性化されるものだけが知られていた。そこで本研究では、これまで全く解析が行われていなかった紫外線A波による小胞体ストレス応答の活性化を調べた。解析の結果、夏期の東京で日常的に照射を受ける量の紫外線A波によって小胞体ストレス応答のATF6経路とIRE1経路、PERK経路のすべてが活性化されること、抗酸化剤処理によって紫外線A波による小胞体ストレス応答の活性化が減弱されることがわかった。以上の結果は、小胞体ストレス応答が疾患などの異常な状態だけでなく、日常のかつ外的な環境要因によっても活性化される生体防御機構であることを示している。

哺乳類のゴルジ体ストレス応答には、TFE3経路とCREB3経路、HSP47経路が存在することが知られていたが、ゴルジ体でのプロテオグリカン型糖鎖修飾酵素の量を調節する機構（プロテオグリカン経路）は知られていなかった。マイクロアレイ解析及びRNA seq解析を行った結果、HS6ST1やNDST2、GLCE、B3GAT3などのプロテオグリカン型糖鎖修飾酵素遺伝子の転写が誘導されることがわかった。このことは、哺乳類細胞にプロテオグリカン経路が確かに存在していることを示唆している。次に、これらの標的遺伝子のプロモーター領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子に繋いだレポーターをヒトHeLa細胞に導入し、細胞にプロテオグリカン型ゴルジ体ストレスを与えたところ、ルシフェラーゼの発現が誘導された。このことは、単離したプロモーター領域に目的のエンハンサー配列が存在することを示している。そこで、これらのプロモーター領域の欠失変異体及び点変異体を作製して同様の解析を行った結果、転写誘導に必要なエンハンサー配列を2種類同定し、それら

を PGSE-A 及び PGSE-B と命名した。既知の転写因子の結合配列を集めたデータベースである JASPER を検索したところ、PGSE-A に結合する転写因子の候補として KLF family のタンパク質 17 種類を見出した。これら 17 種類の KLF family タンパク質を個別に HeLa 細胞に導入したところ、KLF2 と KLF4 が特に強い転写誘導活性を示すことがわかった。興味深いことに、KLF2 遺伝子と KLF4 遺伝子の転写はプロテオグリカン型ゴルジ体ストレスによって誘導されることも見出した。これらのことは、KLF2 や KLF4 が PGSE-A からの転写誘導を制御する転写因子の有力な候補であることを示している。以上の結果は、哺乳類細胞にゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路が存在することを明らかにするとともに、その基本機構を解明したものである。

## 2. 論文審査結果

本研究は、小胞体ストレス応答が外的な要因によって日常的に活性化する状況を探索するとともに、これまで未知であったゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路の存在を明らかにし、その分子機構を解明することを目的としている。解析の結果、生理的な紫外線 A 波の照射によって真皮細胞で小胞体ストレス応答が活性化されること、また抗酸化剤処理によってこの活性化を減弱することを見出した。更に、最先端の分子生物学的な方法を駆使することによってプロテオグリカン経路の標的遺伝子やエンハンサー配列、転写因子の候補を同定した。以上の結果は、小胞体ストレス応答が日常的に外的要因によっても活性化されていること、また哺乳類細胞に確かにプロテオグリカン経路が存在することを証明し、その基本機構を解明するものである。

細胞小器官の量的調節機構は細胞生物学の重要な研究課題の一つであり、小胞体の量的調節機構である小胞体ストレス応答の研究は、毎年のようにノーベル賞の候補として話題にのぼる。本研究は、小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答の新たな局面を明らかにしたものであり、学術的にきわめて重要なものであるとともに、これらのストレス応答が関与する様々な疾患の医科学研究に貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、令和 2 年 1 月 28 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

## 博士論文審査報告書

論文題目： 小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答の解析

申請者： 小森亮太

### 1. 論文内容の要旨

細胞にはゴルジ体などの細胞小器官が存在しているが、その存在量は需要に応じて厳密に制御されており、必要な時には必要な細胞小器官だけが必要なだけ増強される。このような細胞小器官の量的調節機構は細胞が自律的に機能するために必須の機構であり、その研究は細胞生物学の根本的命題の一つである。小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答は、それぞれ小胞体とゴルジ体の量的調節機構である。本研究では、小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答に関する研究を行った。

これまでの研究から、哺乳類の小胞体ストレス応答の分子機構が明らかにされ、その生理的機能も知られていたが、生理的機能に関しては神経変性疾患や糖尿病など疾患に関連したものであり、内的な要因によって活性化されるものだけが知られていた。そこで本研究では、これまで全く解析が行われていなかった紫外線A波による小胞体ストレス応答の活性化を調べた。解析の結果、夏期の東京で日常的に照射を受ける量の紫外線A波によって小胞体ストレス応答のATF6経路とIRE1経路、PERK経路のすべてが活性化されること、抗酸化剤処理によって紫外線A波による小胞体ストレス応答の活性化が減弱されることがわかった。以上の結果は、小胞体ストレス応答が疾患などの異常な状態だけでなく、日常のかつ外的な環境要因によっても活性化される生体防御機構であることを示している。

哺乳類のゴルジ体ストレス応答には、TFE3経路とCREB3経路、HSP47経路が存在することが知られていたが、ゴルジ体でのプロテオグリカン型糖鎖修飾酵素の量を調節する機構（プロテオグリカン経路）は知られていなかった。マイクロレイ解析及びRNA seq解析を行った結果、HS6ST1やNDST2、GLCE、B3GAT3などのプロテオグリカン型糖鎖修飾酵素遺伝子の転写が誘導されることがわかった。このことは、哺乳類細胞にプロテオグリカン経路が確かに存在していることを示唆している。次に、これらの標的遺伝子のプロモーター領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子に繋いだレポーターをヒトHeLa細胞に導入し、細胞にプロテオグリカン型ゴルジ体ストレスを与えたところ、ルシフェラーゼの発現が誘導された。このことは、単離したプロモーター領域に目的のエンハンサー配列が存在することを示している。そこで、これらのプロモーター領域の欠失変異体及び点変異体を作製して同様の解析を行った結果、転写誘導に必要なエンハンサー配列を2種類同定し、それらをPGSE-A及びPGSE-Bと命名した。既知の転写因子の結合配列を集めたデータベースであるJASPERを検索したところ、PGSE-Aに結合する転写因子の候補としてKLF familyのタンパク質17種類を見出した。これら17種類のKLF familyタンパク質を個別にHeLa細胞に導入したところ、KLF2とKLF4が特に強い転写誘導活性を示すことがわかった。興味深いことに、KLF2遺伝子とKLF4遺伝子の転写はプロテオグリカン型ゴルジ体ストレスによって誘導されることも見出した。これらのことは、KLF2やKLF4がPGSE-Aからの転写誘導を制御する転写因子の有力な候補であることを示している。以上の結果は、哺乳類細胞にゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路が存在することを明らかにするとともに、その基本機構を解明したものである。

## 2. 論文審査結果

本研究は、小胞体ストレス応答が外的な要因によって日常的に活性化する状況を探索するとともに、これまで未知であったゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路の存在を明らかにし、その分子機構を解明することを目的としている。解析の結果、生理的な紫外線A波の照射によって真皮細胞で小胞体ストレス応答が活性化されること、また抗酸化剤処理によってこの活性化を減弱することを見出した。更に、最先端の分子生物学的な方法を駆使することによってプロテオグリカン経路の標的遺伝子やエンハンサー配列、転写因子の候補を同定した。以上の結果は、小胞体ストレス応答が日常的に外的要因によっても活性化されていること、また哺乳類細胞に確かにプロテオグリカン経路が存在することを証明し、その基本機構を解明するものである。

細胞小器官の量的調節機構は細胞生物学の重要な研究課題の一つであり、小胞体の量的調節機構である小胞体ストレス応答の研究は、毎年のようにノーベル賞の候補として話題にのぼる。本研究は、小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答の新たな局面を明らかにしたものであり、学術的にきわめて重要なものであるとともに、これらのストレス応答が関与する様々な疾患の医科学的研究に貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。  
また、令和2年1月28日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：阪口雅郎



副査：吉田秀郎



：樋口芳樹



：斉藤美知子



(京都薬科大学薬学部・准教授)