



Title	Saccharomyces cerevisiae KAR2 (BiP) gene expression is induced by loss of cytosolic HSP70/Ssa 1 p through a heat shock element-mediated pathway.
Author(s)	岡, 正啓
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40026">https://hdl.handle.net/11094/40026</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">こちら</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	お 岡 まさ 正 ひろ 啓
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 9 6 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Saccharomyces cerevisiae KAR 2 (BiP) gene expression is induced by loss of cytosolic HSP70/Ssa 1 p through a heat shock element - mediated pathway. (出芽酵母の KAR 2 遺伝子の発現は細胞質中の HSP70/Ssa 1 p の減少により heat shock element を介する経路で誘導される。)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 米田 悦啓  (副査) 教 授 内山 安男      教 授 田中亀代次

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

HSP70は、原核生物から真核生物に至る多様な細胞内で見いだされている代表的な分子シャペロンである。出芽酵母の HSP70ファミリーは細胞質、小胞体、ミトコンドリアに分布し、それぞれのオルガネラ内でそのシャペロン活性により、タンパク質の膜通過、フォールディング、およびアセンブリー等様々な細胞機能に関与していることが知られている。しかし、それらの異なるオルガネラに局在する HSP70間の関係についてはいまだ報告がない。我々は細胞質中に局在する HSP70である Ssa 1 p の減少に伴い、小胞体に局在する HSP70である Kar 2 p の発現が誘導されることを見いだした。この現象は、細胞質と小胞体の相互作用の観点からも興味深い。どのような機構によりこの現象がおきるのか、そして、その現象の意義は何なのかを検討した。

### 【方法ならびに成績】

出芽酵母では SSA 1 と相同性の高い複数の SSA 遺伝子群が存在しており、それらの機能は重複していると考えられている。そこで染色体上の SSA 遺伝子群が破壊されており、プラスミド上の GAL 1 プロモーター下流の SSA 1 によりレスキューされている株、MO10を用いた以下の実験を行った。グルコース培地中で MO10株を培養し、SSA 1 の転写を OFF にすると KAR 2 の発現が増加すること分かった。KAR 2 遺伝子の発現はプロモーターの特徴的な 3 つの領域により制御されていることが知られている。それらは、上流より 1) Heat Shock Element (HSE), 2) GC-rich region, 3) Unfolded Protein Response Element (UPRE) に分けられる。どの領域が Ssa 1 p の減少に反応して KAR 2 の発現を誘導するのに必要なかを調べる目的で、それぞれの領域を欠失させた KAR 2 プロモーターを大腸菌  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) に融合させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現を MO10株より誘導した株で調べた。その結果、野生型プロモーター、もしくは GC-rich region, UPRE を delete したプロモーターの下流に lacZ をつないだ融合遺伝子を導入した株は Ssa 1 p の減少に伴い  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇が認められた。唯一、HSE を delete した場合、Ssa 1 p の減少に伴う  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇がみられなかった。次に、KAR 2 HSE, SSA 1 HSE, もしくは UPRE を上流プロモーター部位につないだ lacZ の融合遺伝子 (HSE-lacZ, UPRE-lacZ) を作製し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ・アッセイを行った。その結果、KAR 2 HSE 及び SSA 1 HSE を上流につないだ lacZ を持つ株において Ssa 1 p の減少に伴う  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇が認められた。このことから、

HSE が Ssa 1 p の減少に伴う KAR 2 遺伝子の活性化に必要そして充分であることが確認された。以上の結果は細胞質中の Ssa 1 p が HSE を介する経路で小胞体内の Kar 2 p の発現を制御していることを示す。

更に我々は、SSA 1 の温度感受性変異株に HSE-lacZ を導入し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ・アッセイを行った。その結果、変異株の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は制限温度である 37 度で 30 分後には野生型対照株の約 4 倍、3 時間後には約 6 倍になっていた。このことから、HSE を介する転写機構の活性化は細胞質中の Ssa 1 p の量的な欠損のみではなく質的な変化によってもひきおこされることが示された。これらの現象は同時に Ssa 1 p の self-regulation の機構を示唆するものである。

#### 【総括】

細胞質に局在する HSP70/Ssa 1 p の減少にともなう小胞体の HSP70/KAR 2 の発現の誘導は KAR 2 プロモーター上の HSE を介しておこる現象であった。この結果より、小胞体内腔の環境変化（ストレス）に対する KAR 2 p の誘導に関して、既知の UPRE を介する経路以外に、主に細胞質の HSP70 がセンサーとなり Kar 2 p が誘導される経路が存在する可能性が示唆された。細胞はこれら二つの経路を利用して小胞体内の Kar 2 p のレベルを環境変化に合わせてコントロールしているようである。

### 論文審査の結果の要旨

HSP70 は、原核生物から真核生物に至る多様な細胞内で見いだされている代表的な分子シャペロンである。出芽酵母の HSP70 ファミリーは細胞質、小胞体、ミトコンドリアに分布し、それぞれのオルガネラ内でそのシャペロン活性により様々な細胞機能に関与していることが知られている。しかし、それらの異なるオルガネラに局在する HSP70 間の相互作用、及び、それらの発現制御については不明な点が多い。本研究は、細胞質 HSP70 (Ssa 1 p) の減少に伴う小胞体 HSP70 (Kar 2 p) の発現誘導という現象に注目しその機構を解析したものである。その結果、Ssa 1 p の減少に伴う KAR 2 遺伝子の発現誘導に関与する KAR 2 プロモーター上の領域は Heat Shock Element (HSE) であることが証明された。更に、SSA 1 の温度感受性変異株を用いた解析により HSE を介する転写機構の活性化は細胞質中の Ssa 1 p の量的な欠損のみではなく質的な変化によってもひきおこされる可能性が示された。以上の研究成果は環境変化（ストレス）に対する小胞体内腔の KAR 2 p の発現制御に関して既知の Unfolded Protein Response Element (UPRE) を介する経路以外に、主に細胞質の HSP70 がセンサーとなり Kar 2 p が誘導される経路が存在する可能性を示唆するもので、真核生物に於ける HSP70 の発現制御機構の解明に向け重要な知見をもたらした。よって本研究は学位を授与するに値すると思われる。