



Title	Stress-associated Endoplasmic Reticulum Protein 1 (SERP1) /Ribosome-associated Membrane Protein 4 (RAMP4) Stabilizes Membrane Proteins during Stress and Facilitates Subsequent Glycosylation
Author(s)	山口, 淳
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42790
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	山 口 淳 やま ぐち あつし
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 6 3 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 6 月 2 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Stress-associated Endoplasmic Reticulum Protein 1 (SERP1) /Ribo- some-associated Membrane Protein 4 (RAMP4) Stabilizes Mem- brane Proteins during Stress and Facilitates Subsequent Glycosylation. (ストレス関連小胞体蛋白 SERP1/リボソーム関連蛋白 RAMP 4 はス トレス下で膜蛋白を安定化し、その後の糖鎖付加を促進する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠 山 正 彌 (副査) 教 授 谷 口 直 之 教 授 米 田 悦 啓

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】神経細胞は低酸素ストレスに対して脆弱であるが、アストログリア細胞を初めとするグリア細胞は抵抗性があることが知られている。これまで、我々のグループは、cycloheximide を低酸素ストレス前に投与しておくとしてアストログリア細胞の抵抗性が減弱すること等から、ストレス応答機構には新たな蛋白合成が必要であることを報告している。そこで、本研究では、アストログリアの低酸素ストレスに対する応答機構を明らかにするために、アストログリア細胞の初代培養を用いて、DD (differential display) 法にて低酸素で誘導される遺伝子の検索を行った。

【方法ならびに成績】

1) SERP1/RAMP 4 の単離

ラット胎児より、アストログリア細胞の初代培養を作製し、低酸素に暴露した後、mRNA を抽出し、cDNA を作製した。その cDNA を用いて DD 法を行い、低酸素特異的に誘導される遺伝子を見出し、ノザンブロッティング法により、実際低酸素で誘導されるかを確認した。

その結果、既に低酸素で誘導されると報告されている、解糖系酵素、シャペロン等の他に、既知ではあるが低酸素で誘導されるとは報告がない遺伝子や、新規遺伝子 2 個 (SERP 1, YH2) を認めた。

SERP 1 は、ノザンブロッティングでは、約 2 kbp 付近に低酸素で誘導されるバンドとして認められ、全身臓器の分布を調べたところ、脳、肝臓、精巣をはじめとするほぼ全身に分布を認めた。ラット脳ライブラリーのスクリーニングの結果、全長をクローニングし、SERP 1 は 66 アミノ酸からなり、C 末端付近に 1 回膜貫通領域を持つ微小な蛋白であることが判明した。EST 検索により、ヒト、線虫、酵母 (YSY 6 ; 既知遺伝子) に相同体を認めた。(酵母 YSY 6 は、小胞体の蛋白輸送チャネルである Sec61complex と関連する蛋白として報告されている。) SERP 1 は後に、他の研究グループが単離して解析を進めていた、RAMP 4 と同一であることが判明した。

2) SERP1/RAMP4の機能解析

SERP 1 /RAMP 4 の誘導を調べたところ、低酸素ストレス以外にも、A23187 (カルシウムイオノフォア) や TM (tunicamycin) 刺激のように、小胞体にアンファールドな蛋白を蓄積させる、いわゆる '小胞体ストレス' にて誘導された。

ラットの脳梗塞モデルを使って in situ hybridization を行ったところ、梗塞巣周囲領域に誘導を認めた。また、SERP 1 /RAMP 4 の細胞内局在を調べたところ小胞体に局在した。

以上より、(1) 小胞体に局在すること、(2) 低酸素ストレス以外にもいわゆる小胞体ストレスで誘導されること、(3) 小胞体の蛋白輸送チャネル Sec61complex と関連する酵母の YSY 6 とホモロジーが高いことから、次の、2 点を中心に解析を進めた。

(1) 小胞体蛋白輸送チャネル Sec61 や他の蛋白と相互作用するのか？ (2) ストレス時に小胞体に蓄積したアンフォールドな蛋白の分解経路あるいは安定化に働くのか？

その結果、SERP 1 /RAMP 4 は、メタボリックラベリング法による解析の結果、ストレス下で膜蛋白の分解を防ぐ機能があり、免疫共沈法による解析の結果、SERP 1 /RAMP 4 と小胞体の蛋白輸送チャネル Sec61complex やカルネキシンは免疫共沈された。また、SERP 1 /RAMP 4 はストレス (tunicamycin) 後に、膜蛋白の糖鎖付加を促進することが判明した。

以上から、SERP 1 /RAMP 4 は、小胞体の蛋白輸送チャネル Sec61complex や、小胞体シャペロンであるカルネキシンと相互作用し、ストレス時に小胞体に蓄積するアンフォールドな蛋白を安定化し、その後のリフォールディング (糖付加) を促進することが示唆された。

【総括】

アストログリア細胞の初代培養細胞を用いて、DD 法にて低酸素で誘導される遺伝子の検索を行った。その結果見出した SERP 1 /RAMP 4 は、小胞体に局在し、小胞体の蛋白輸送チャネル Sec61complex やカルネキシンと相互作用し、ストレス下で小胞体の膜蛋白を安定化し、その後の糖鎖付加を促進することを解明した。

論文審査の結果の要旨

この研究は、アストログリア細胞の低酸素ストレスに対する応答機構を、differential display 法を用いて研究し、低酸素で誘導される新規タンパク SERP 1 をクローニングし、その機能解析を行った研究である。

SERP 1 は、小胞体に局在し、小胞体の蛋白輸送チャネル Sec61complex や小胞体内のシャペロンであるカルネキシンと相互作用し、小胞体内に Unfolded なタンパクを蓄積させるような、いわゆる小胞体ストレスで誘導され、ストレス下で小胞体の膜蛋白を安定化し、その後の糖鎖付加を促進する作用があり、小胞体内の膜タンパクの、ストレス下での品質管理 (QUALITY CONTROL) に関与している事が示唆される。

最近の報告では、多くの神経変性疾患には、変性タンパク質の蓄積が認められており、この研究で行われているような、ストレス下での小胞体内の Unfolded なタンパク質の品質管理の機構については、まだ、不明な点が多く、今後の研究の発展が期待され、学位の授与に値するものと考えられる。