

脳組織における細胞種特異的な小胞体ストレス応答機構の解明
～ 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS および BBF2H7 の機能解析 ～

近藤 慎一

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
推薦教員 塩坂 貞夫 教授

提出年月日 平成 19 年 9 月 28 日

目次

要旨	- 3
まえがき	- 5
はじめに	- 6
第 1 章 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS の機能解析	- 8
1-1 節 序論	- 9
1-2 節 材料と方法	- 13
1-3 節 結果	- 18
1-4 節 考察	- 32
1-5 節 参考文献	- 34
第 2 章 小胞体膜貫通型転写因子 BBF2H7 の機能解析	- 37
2-1 節 序論	- 38
2-2 節 材料と方法	- 41
2-3 節 結果	- 45
2-4 節 考察	- 59
2-5 節 略語	- 63
2-6 節 参考文献	- 64
おわりに	- 70
あとがき	- 71
謝辞	- 73

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

推薦教員	塩坂 貞夫 教授		
氏名	近藤 慎一	提出	平成 19 年 9 月 28 日
題目	脳組織における細胞種特異的な小胞体ストレス応答機構の解明 ～ 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS および BBF2H7 の機能解析 ～		

要旨

【背景】

哺乳動物の体細胞は、数百種類にのぼる細胞から構成され、それぞれ多彩な形態および機能をもつ。それらが有する細胞内小器官も同様に、細胞の機能に応じて発達程度は多様化している。小胞体も例外ではなく、細胞の分化やタンパク合成・分泌の生理的条件により変化し、決して画一的な構造物ではない。細胞種毎の小胞体の発達程度の違いをみると、小胞体にかかる仕事量は細胞種ごとにかなり異なっていると想像できる。

小胞体において構造異常を起こしたタンパク質、いわゆるミスフォールデッドタンパク質が過剰に蓄積した状態、または小胞体の処理能力を超えた仕事量が小胞体に負荷されているような状態のことを、小胞体ストレスとよぶ。小胞体ストレスからの防御機構として、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる応答機構が細胞には存在する。真核生物において、この防御システムは PERK・IRE1・ATF6 という3つのタンパク質が小胞体ストレス トランスデューサーとして機能する経路から成り立っており、それらがすべての細胞に画一的に備わっていると考えられている。しかし、このような画一的な防御システムで、細胞種毎のストレスの程度の違いに十分に対応できるのであろうか？

神経変性疾患における神経細胞死について小胞体ストレスが関与しているとする報告は多数あったものの、PERK・IRE1・ATF6 といった従来からの既存の分子の解析が中心であったため、研究分野として行き詰った感があった。このような状況を打開する、新たな独創的な研究が求められていた。

【結果 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS の機能解析】

大脳皮質の初代培養系に小胞体ストレスを負荷すると、神経細胞は全ての細胞が死滅するのに対してアストロサイトは生き残るという現象に、私は注目した。そして、アストロサイトに発現する転写因子 OASIS の同定に成功した。OASIS は、basic leucine zipper (bZIP)ドメインを持つ、小胞体に局在する膜貫通型の CREB/ATF ファミリーに属する転写因子である。OASIS は、小胞体ストレスに反応して膜内切断される。切断された OASIS の N 末端部分は、bZIP ドメインを含み、核に移行し、転写因子として小胞体ストレス応答配列 (ER stress-responsive element : ERSE) や CRE 配列 (cyclic AMP-responsive element : CRE) を活性化し、小胞体シャペロン BiP を発現誘導する。

興味深いことに、OASIS は中枢神経系細胞の中で、アストロサイトにおいてのみ小胞体ストレスによって発現誘導が見られたが、実験した他の細胞では OASIS の発現誘導は検出されなかった。また、OASIS の siRNA の処置により、アストロサイトは小胞体ストレス感受性が高まり、細胞死を起こしやすいことから、OASIS がアストロサイトの細胞死抑制に寄与していることを明らかにした。

【結果 小胞体膜貫通型転写因子 BBF2H7 の機能解析】

私の OASIS の報告を契機に、他の OASIS ファミリー分子(CREB-H、AibZIP、Luman)も小胞体ストレス トランスデューサーとして機能することが明らかにされた。OASIS ファミリー分子は、すべて 型の膜貫通タンパク質で小胞体に局在する。私は、データベース検索により新規の OASIS ファミリー分子 BBF2H7 を見出したので、機能解析を行った。

BBF2H7 は、構造的に OASIS と相同性が高い分子で、bZIP ドメインおよび膜貫通ドメインを保持し、小胞体膜を貫通し小胞体ストレスに反応して膜内切断を受ける。切断された断片は核内に移行することを、免疫蛍光法を用いて明らかにした。興味深いことに、BBF2H7 蛋白質は、通常の状態では発現がみられないが、小胞体ストレス時においてのみ翻訳レベルでの急激な発現上昇がみられた。このことは、BBF2H7 は UPR 経路の後期においてのみ機能することを示唆する。しかもこの翻訳レベルでの誘導は、PERK-eIF2 α 経路によらないことを、PERK 欠損 MEF 細胞等を用いることで明らかにした。

小胞体ストレスに応答して切断された BBF2H7 のN末端部分は核内に移行し、CRE サイトに直接結合して標的遺伝子の転写を活性化する能力があることを、レポーターアッセイおよび電気泳動移動度シフト解析により明らかにした。

in vivo において、BBF2H7 タンパク質は、中大脳動脈永久閉塞モデルマウスの脳梗塞ペヌンブラ領域において神経細胞に強く発現することが免疫組織化学により明らかとなった。さらに、神経芽細胞種の細胞株において、BBF2H7 の過剰発現は小胞体ストレスにより誘導される細胞死を抑制し、siRNA 処置した BBF2H7 ノックダウン細胞では小胞体ストレスにより誘導される細胞死が亢進した。これらの結果は、BBF2H7 は神経細胞において小胞体ストレス トランスデューサーとして機能し、脳虚血時等に生じる異常タンパク質蓄積の回避に重要な役割を担っていることが示唆された。

【考察】

アストロサイトで機能する OASIS、神経細胞で機能する BBF2H7 の発見を通じて、世界に先駆けて「脳組織における小胞体ストレス応答の細胞種特異性」という概念の提言につながった。この概念は、神経変性疾患の発症メカニズムの解明の突破口になりうる可能性があり、学術的に意義のある独創的な研究が出来たと考えている。

まえがき

私は、2007 年この博士論文を提出する。私は、人類が遺伝子を自由に扱える時代に生きている。

2007 年のノーベル医学生理学賞は、特定の遺伝子の機能を失わせた「ノックアウトマウス(knockout mice)」の作成に成功した3氏に贈られた。ヒトゲノムは、既に 2003 年の時点で全て解読されている。

“生命の神秘”の解明に向けて、人類はどんどん進んでいるように見える。私もその中の一員に加わってみたいと思った。この論文を、そのような気持ちで書いた。

はじめに

哺乳動物の体細胞は、数百種類にのぼる細胞から構成され、それぞれ多彩な形態および機能をもつ。それらが有する細胞内小器官も同様に、細胞の機能に応じて発達程度は多様化している。小胞体(endoplasmic reticulum)も例外ではなく、細胞の分化やタンパク合成・分泌の生理的条件により変化し、決して画一的な構造物ではない。膵臓の外分泌細胞・胃底腺の主細胞など蛋白合成の盛んな細胞では、粗面小胞体が著しく発達している。細胞種毎の小胞体の発達程度の違いをみると、小胞体にかかる仕事量は細胞種ごとにかなり異なっていると想像できる。

小胞体において構造異常を起こしたタンパク質、いわゆるミスフォールデッドタンパク質が過剰に蓄積した状態、または小胞体の処理能力を超えた仕事量が小胞体に負荷されているような状態のことを、小胞体ストレスとよぶ。小胞体ストレスからの防御機構として、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる応答機構が細胞には存在する。真核生物において、この防御システムはPERK・IRE1・ATF6という3つのタンパク質が小胞体ストレス トランスデューサーとして機能する経路から成り立っており、それらがすべての細胞に画一的に備わっていると考えられている。しかし、このような画一的な防御システムで、細胞種毎のストレスの程度の違いに十分に対応できるのであろうか？

産生タンパク質の量が多く、小胞体ストレスに陥りやすい細胞では、上記3つの応答経路を基本形として、さらにオプションとして 応答経路を通常よりも増強する、別の経路を用意する、といった方法で対応しているらしい(1, 2, 5, 6)。 の例としてPERK経路の増強があげられる。すなわちPERKは、基本的にユビキタスに発現しているが、他の臓器にくらべて特に膵臓で高い発現を示す(5)。PERK ノックアウトマウスでは、膵臓の 細胞に細胞死が起こり糖尿病を発症する(2, 6)。膵臓は生理的な条件下で小胞体ストレスが起こっている臓器であり、PERK の発現量を増やすことで細胞を手厚く保護していると考えられる。また、 の例としては IRE1 経路がある。IRE1 は、消化管の上皮細胞で高発現しており、IRE1 ノックアウトマウスでは、胃や腸の粘膜上皮で小胞体ストレスが亢進し、大腸炎が生じやすくなる(1)。これは、IRE1 という新たな分子を用意することで、小胞体ストレスに曝されやすい細胞の防御機構を強化しているのであろう。

アルツハイマー病やパーキンソン病など神経変性疾患に共通する病因は、ミスフォールデッドタンパク質の過剰な蓄積であるとの考えが、遺伝性神経変性疾患の病

因遺伝子の解析が進むにつれて有力になってきた。そして、ミスフォールデッドタンパク質の蓄積が細胞死を誘発するメカニズムとして、小胞体が注目されている。神経変性疾患では、ミスフォールデッドタンパク質が小胞体内腔に蓄積して、アポトーシスが起こることで神経変性がおこるのではないかと考えられている。

しかしながら、神経変性疾患における神経細胞死について小胞体ストレスが関与しているとする報告は多数あったものの、PERK・IRE1・ATF6 といった従来からの既存の分子の解析が中心であったため、研究分野として行き詰った感があった。このような状況を打開する、新たな独創的な研究が求められていた。

そのような状況の中、私は、小胞体ストレス応答を既存の分子に捕らわれず、純粋に目の前で起こった現象を解析する中で、新しい分子の同定に成功した。まず、抵抗性のあるグリア細胞に注目する中で、新規の小胞体ストレス トランスデューサー OASIS を同定した(3)。さらに、神経細胞の小胞体ストレス トランスデューサーの同定にも試み、BBF2H7 を同定するに至った(4)。この2つの報告により、小胞体ストレス研究において、“細胞腫特異性”という新たな方向性を示すことができたと考えている。

本博士論文において、第1章で OASIS を、第2章で BBF2H7 について報告する。

(参考文献)

1. Bertolotti, A. et al. 2001. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest.* 107:585-93.
2. Harding, H. et al. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell.* 6:1099-1108.
3. Kondo, S. et al. 2005. OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signaling in astrocytes. *Nat. Cell Biol.* 7:186-194.
4. Kondo, S. et al. 2007. BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol Cell Biol.* 27:1716-1729.
5. Sood, R. et al. 2000. Pancreatic eukaryotic initiation factor-2alpha kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J.* 346 Pt 2:281-293.
6. Zhang, P. et al. 2002. The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol Cell Biol.* 22:3864-3874.

第 1 章

～ 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS の機能解析 ～

1-1 節 序論

1-1-1) はじめに

細胞の小胞体において構造異常を起こしたタンパク質、いわゆるミスフォールデッドタンパク質が過剰に蓄積した状態、または小胞体の処理能力を超えた仕事量が小胞体に負荷されているような状態のことを、小胞体ストレスとよぶ。小胞体ストレスからの防御機構として、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる応答機構が細胞には存在する(7, 9, 20) (図 1-1)。真核生物において、この防御システムは PERK・IRE1・ATF6 という3つのタンパク質が小胞体ストレス トランスデューサーとして機能する経路から成り立っており、これら3つのタンパク質が中心的な役割を果たしている。

これらのセンサーが小胞体ストレスを感知しその情報を細胞質や核に伝達することで、転写誘導・翻訳抑制等が行われる。興味深いことに、これら3つのセンサーは、すべて小胞体1回膜貫通タンパク質であるが、それぞれ異なったメカニズムで下流の分子にシグナルを伝達している。IRE1 は、内腔領域で小胞体ストレスを感知すると、細胞質側に存在するキナーゼドメインによるリン酸化とホモダイマー形成により活性型となる。活性型 IRE1 の RNase ドメインは、転写因子である XBP1 の前駆体 mRNA をスプライシングすることで成熟 mRNA に変換する。成熟 mRNA から翻訳された活性型 XBP1 は、basic leucine-zipper (bZIP)ドメインを有し、転写因子 NF- κ B を伴って標的遺伝子の ERSE (ER stress response element) に結合することで UPR 関連遺伝子の転写を誘導する。この標的遺伝子には、小胞体分子シャペロンである GRP78/BiP や GRP94、XBP1 自身が含まれる(2, 23, 24, 27, 28)。ATF6 は、膜貫通タンパク質であるが、小胞体ストレスに反応して S1P(site-1)プロテアーゼおよび S2P(site-2)プロテアーゼによって切断される (22, 25)。切断された ATF6 の N 末端は核に移行し、XBP1 と同様の方法で ERSE に直接結合することで、小胞体シャペロン等の転写を誘導する。ATF6 は XBP1 の転写も誘導するので、UPR はポジティブフィードバックを形成している(26)。PERK は、内腔領域で小胞体ストレスを感知するとオリゴマーを形成することでキナーゼドメインが活性化され、翻訳開始因子である eIF2 をリン酸化し翻訳の開始を阻止する。この翻訳抑制は、小胞体で処理すべきタンパク質の量を抑えることを意味し、小胞体の負荷を軽減する役割を果たす。加えて、eIF2 のリン酸化は ATF4 mRNA の本来の ORF による翻訳を逆に促進する。産生された ATF4 は AARE (amino acid response element) や CRE (cyclic AMP-responsive element)を介して標的遺伝子の転写を誘導する。これらのシグナルは細胞の生存に寄与している(8)。

一方で、小胞体ストレスが過剰な場合あるいは長時間持続する場合には、細胞はアポトーシスを起こす。この小胞体ストレスによるアポトーシスを担う分子として、転写因子 CHOP、caspase12、IRE1-ASK1-JNK を介する経路などが知られている(10, 13)。小胞体ストレス後に細胞が生存し続けることができるか否かは、UPR のサバイバル側の応答(転写誘導、翻訳抑制、小胞体関連分解)とアポトーシス側の応答のバランスによって決定されと考えられている。

1-1-2) アストロサイトで機能する OASIS の同定

同じ強さの小胞体ストレスを負荷しても細胞種ごとに感受性がかなり異なる。このような奇妙な現象を小胞体ストレス応答機構の研究を進める過程で、私は何度か目の当たりにしてきた。例えば、大脳皮質の初代培養系に小胞体ストレスを負荷すると、神経細胞は短期間のうちに全ての細胞が死滅するのに対し、アストロサイト(星状膠細胞)は生き残る。アストロサイトは、小胞体ストレスを誘導する虚血や低酸素状態に対して耐性があり、そのような環境でも細胞増殖することも可能であるという特異性を有している(16)。私は、PERK・IRE1・ATF6 がアストロサイトと他の神経系細胞間で発現量に顕著な差はみられないことを確認した。これは何を意味するのか？「アストロサイトには、他の神経系細胞にはない別の経路が用意されており、それが小胞体ストレス抵抗性を生み出すのではないか」と考えた。そこで、PERK・IRE1・ATF6 に似た構造を持つ新規の分子がアストロサイトには備わっていると考え、これらの分子に類似する構造をもつ分子のデータベース検索を行った。その結果、アストロサイトの長期間培養で発現することが報告されていた OASIS(old astrocyte specifically induced substance) という分子を見出した。

OASIS は、アストロサイトの長期間培養時に特異的に誘導される遺伝子として同定された (5, 15)。OASIS は、構造的には、膜貫通ドメインと bZIP(basic leucine zipper)ドメインを保持する転写因子であり、CREB/ATF (cyclic AMP responsive element binding protein / activating transcription factor)ファミリーの1つである。成体マウスの脳において、OASIS mRNA は、反応性アストロサイト(reactive astrocytes)にのみ特異的に発現誘導されるので(11)、この遺伝子は、脳障害時に誘導されることが予想される。また、胎生期には、軟骨・歯胚に発現誘導が見られ(12)、骨形成への関与も示唆されている。しかしながら、OASIS の生理的な役割や OASIS によって転写が促進される標的遺伝子などは、何もわかっていない。

私は、小胞体に局在する転写因子 OASIS が、アストロサイトで機能する新規の小胞体ストレスセンサーであり、小胞体ストレスからアストロサイトを保護する役割を担って

いることを報告する。

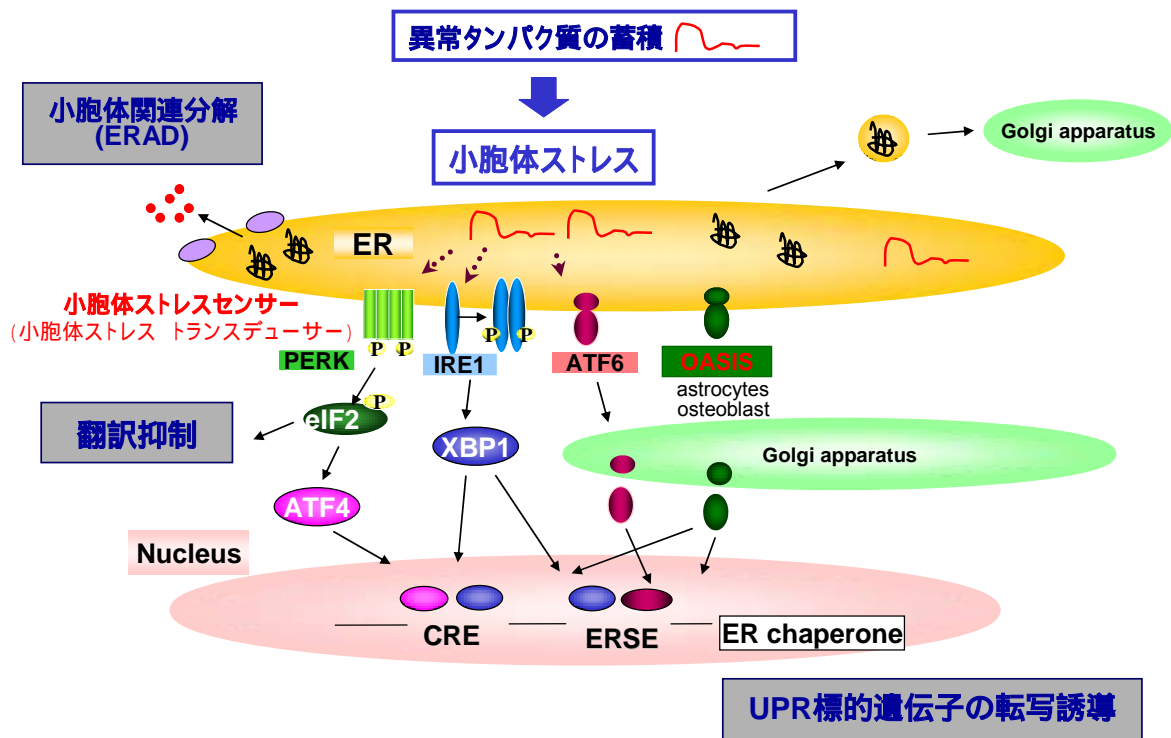


図 1-1 小胞体ストレス応答の全体像 (OASIS の同定 : 2005 年時点)

小胞体において構造異常を起こしたタンパク質、いわゆるミスフォールデッドタンパク質が過剰に蓄積した状態、または小胞体の仕事処理能力を超えた仕事量が小胞体に負荷されているような状態のことを、小胞体ストレスとよぶ。小胞体ストレスからの防御機構として、小胞体ストレス応答または unfolded protein response (UPR) と呼ばれる応答機構が細胞には存在する。UPR には、翻訳抑制、UPR 標的遺伝子(小胞体分子シャペロン等)の転写誘導、小胞体関連分解の 3 つの機能がある。UPR を担う分子として、PERK・IRE1・ATF6 が小胞体ストレスセンサー(本研究では一般的に用いられている、小胞体ストレス トランスデューサーと表記する)として機能している。

私は、新規の小胞体ストレス トランスデューサー **OASIS** を見出したので、本研究において機能解析を行った。

1-2 節 材料と方法

1-2-1) プラスミド、トランスフェクション、ウエスタンブロッティング

FLAG タグしたマウス OASIS の cDNA (11) は、pCDNA3.1 +.に挿入した。OASIS の欠失変異体である del56-OASIS、FLAG-OASIS (374)、OASIS (P392L, R423A, L426V)は、PCR によって作成した。全長型 ATF6、ATF6(373)、XBP-1、pGL3-short BiP promoter (-132)-luc、は、京都大学の森和俊博士より提供いただいた。pGL2-long BiP promoter (-366)-luc は、それぞれ Yoshihiro Omori 博士 (東京大学) から提供いただいた。

C6 グリオーマ細胞と HEK293T 細胞に対する発現ベクターのトランスフェクションは、Lipofectamine および Lipofectamine 2000 (Gibco BRL)を用いて行った。構成的に OASIS を発現する細胞は、G418(Gibco BRL)を用いて選択を行った。

マルトース結合タンパク質を融合したリコンビナント OASIS(アミノ酸 17-253)に對してウサギ抗血清を上昇させ、ProtOn kit1 (Multiple Peptide Systems)を用いてアフィニティ精製した。抗 FLAG 抗体(Eastman Kodak Company)・抗 KDEL 抗体・抗 calnexin 抗体・抗 HSP60 抗体 (StressGen Biotechnologies)・抗 PARP 抗体(Cell Signaling TECHNOLOGY)・抗 CHOP 抗体 (GADD153, Santa Cruz Biotechnology)・抗 actin 抗体(CHEMICON)は購入した。抗 ATF6 抗体は、森和俊博士より提供いただいた。

OASIS のウエスタンブロッティングは、(3) に記載されているように hot SDS で細胞を溶解した。サンプルのタンパク濃度は Lowry assay (DC protein assay, Bio-Rad) によって計測し、タンパク量を等しくそろえて 10%SDS ポリアクリルアミドゲルに負荷し、ウエスタンブロッティングに展開した。

1-2-2) 細胞成分分画

15cm dish で 70%コンフルエント状態にある構成的に OASIS を発現する細胞株に對し、1 μ M のサブシガルジンを 12h 負荷した。細胞を回収し、ホモジナイザーを用いて破壊し 600G で 10 分遠心すると、核成分がペレットに回収される。上澄みをさらに 3,000 G で 10 分遠心すると、ミトコンドリア成分がペレットに回収される。上澄みをさらに 100,000 G で 1 時間遠心すると、小胞体膜成分がペレットに回収される。それを

SDS-PAGE を用いて展開し、抗 OASIS 抗体やその他の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

1-2-3) ノザンブロッティングおよび RT-PCR

ノザンブロッティングおよび RT-PCR は、過去に記載されている方法により行った(6)。RT-PCR は、それぞれ以下のプライマーを用いた。

OASIS-5', 5' -ATGGACGCCGTCTTGGAACCTT-3'
OASIS-3', 5' -CTCAGCCTTGGTGAGGGGGAG-3';
BiP-5', 5' -GAAAGGATGGTCAATGACGCCGAG-3'
BiP-3', 5' -GTCTTCAATGTCTGCATCCTGGTGG-3';
XBP1-5', 5' -ACACGCTTGGGGATGAATGC-3'
XBP1-3', 5' -CCATGGGAAGATGTTCTGGG-3';
 β -actin-5', 5' -TCCTCCCTGGAGAAGAGCTAC-3'
 β -actin-3', 5' -TCCTGCTTGCTGATCCACAT-3';
GRP94-5', 5' -TACTATGCCAGTCAGAAGAAAACG-3'
GRP94-3', 5' -CATCCTTTCTATCCTGTCTCCATA-3';
ATF6-5', 5' -GGATTTGATGCCTTGGGAGTCAGAC-3'
ATF6-3', 5' -ATTTTTTTCTTTGGAGTCAGTCCAT-3';
CHOP-5', 5' -ACAGTCATGGCAGCTGAGTCTCTGCCTTTC-3'
CHOP-3', 5' -CAGACAGGAGGTGATGCCAACAGTTCATGC-3';
PDI-5', 5' -TCCAGCTGTGCGGCTTATTA-3'
PDI-3', 5' -TTCTCAGCTGTCAGCTCGTCTG-3';
LYRIC-5', 5' -TTGAGTGCAGGTGAGGAGAAGTGGAAC-3'
LYRIC-3', 5' -TGCATTCCAGTCTGAGCTAGGATCAG-3';
D9UIA10-5', 5' -CCTTTTATTACTGATATTGACATGGGGAAG-3'
D9UIA10-3', 5' -GGCTTTNGGATTAANTTTCCAANGGAC-3';
protease16-5', 5' -AGTAAACCTTGAACCTCCAGGTCCTCTTAC-3'
protease16-3', 5' -ATGCGGTCCACAAAACCTTGGGATTG-3'

1-2-4) ルシフェラーゼ・アッセイ(レポーター・アッセイ)

C6 グリオーマ細胞を 24-well プレートに撒き、ホタル・ルシフェラーゼをもつレポーター・プラスミド 0.2 μ g、SV40 エンハンサー・プロモータを持つウミシイタケ・ルシフェラーゼをもつ基準プラスミド pRL-SV40(Promega)0.02 μ g、タンパク質発現プラスミド 0.1

μg を同時遺伝子導入した。46 時間後に 200ul の Passive Lysis Buffer (Promega)を用いて細胞を溶解した。細胞回収の 16 時間前に、小胞体ストレスの誘導のために 1μM サブシガルジンを加えた。ホタル・ルシフェラーゼおよびウミシイタケ・ルシフェラーゼの活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) および luminometer (Berthold Technologies)を用いて測定した。相対活性は、ホタル・ルシフェラーゼ活性とウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の比を用いた。

1-2-5) クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation assays)

10cm dish で 80%コンフルエント状態にある C6 グリオーマ細胞に対して、1μM のサブシガルジンを2h または 4h 負荷した。タンパク質 DNA 間のクロスリンクは、ホルムアルデヒドを(最終濃度 1%)を 15 分間負荷する。クロスリンクの停止は、1.5M グリシン(最終濃度)0.15 M を加える。PBS で洗浄後、細胞を回収する。クロマチンの断片化は、キット(Upstate Biotech Inc., Lake Placid, NY)の推奨どおりに、5 秒のソニケーションと 10 秒の氷冷を 24 回行うことで、約 100bp-400bp となる。全量の 5%は、input 分画とし、残りを免疫沈降のステップに進めた。クロマチンを 5ul の抗 OASIS 抗体および抗 H3 抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc.)を用いて 4 ° C で一晩インキュベートした。免疫沈降で回収した産物をプロテインアーゼ K (6 h at 65 ° C)で脱クロスリンクさせた。DNA は、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿で精製した。input 分画および免疫沈降産物から精製された DNA は、PCR で 35 回サイクルで増幅し、5%アクリルアミドゲルに展開した。内在性ラット BiP プロモーターの配列は以下のとおりで、PCR 産物は 225bp である。

5'-CATTGGCGGCCGTTAAGAATGACCAG-3' (forward)

5'-AGTATCGAGCGCGCCGGTC-3' (reverse)

1-2-6) 電気泳動移動度シフト (electrophoretic mobility shift assay : EMSA)

TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) を用いて、確認すべき遺伝子を in vitro 翻訳した。二本鎖オリゴヌクレオチドは、[γ -³²P]dATP (3000 Ci/mmol; Amersham) および T4 polynucleotide kinase (Promega)を用いて放射性ラベルした。2ul の翻訳生成物に、オリゴヌクレオチド(0.1 pmol; 9,000 cpm) を加え、binding buffer (4% glycerol, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.05 mg/ml poly (dl-dC)-poly(dl-dC))内で、4 1時間インキュベートさせた。サンプルは、running buffer (0.5 × TBE (Tris/Boric acid/EDTA)) 内で、非変性ポリアクリルアミドゲル上に 200 V 4 100 分電気泳動した。使用したオリゴヌクレオチドの配列は以下のとおり。

5'-CAGCTGGGGGGGCGGAGCAGTGACGTTTATTGCGGAGGGG-3' (CRE-wt),
5'-CAGCTGGGGGGGCGGAGCctgtcgactcATTGCGGAGGGG-3' (CRE-mt)
スーパーシフト実験時は、オリゴヌクレオチドと反応させる前に、翻訳生成物と各種抗体を4 1時間反応された。

1-2-7) 細胞死実験

細胞死の数は、形態変化の観察および培養メディウム中に放出された LDH 活性により測定した(1)。TUNEL は、DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega)を用いて行い、蛍光顕微鏡を用いて解析を行った。

1-2-8) BBF2H7 のノックダウン

OASIS に対するハイブリダイズさせた二本鎖 siRNA は、Dharmacon (Lafayette, CO)より購入した。OASIS siRNA の配列は以下のとおりである。

OASIS-K2 siRNA ;

5' -GCUUCCUGGACUUGGGAGAdTdT-3' (sense)

5' -UCUCCCAAGUCCAGGAAGCdTdT-3' (antisense)

OASIS-K9 siRNA ;

5' -GAGCACAGCUACUCCCUGAdTdT-3' (sense)

5' -UCAGGGAGUAGCUGUGCUCdTdT-3' (antisense);

OASIS-K13 siRNA ;

5' -GAAAUAGAGCCAGUUUCUCAdTdT-3' (sense)

5' -UGAGAAACUGGCUCAUUUCdTdT-3' (antisense);

OASIS-K26 siRNA,

5' -GAGACAUUAUCAUCAGAGAdTdT-3' (sense)

5' -UCUCUGAUGUAUAUGUCUCdTdT-3' (antisense)

BLAST 検索により、この配列が OASIS 以外には相同性がないことを確認した。lamin A/C siRNA (QIAGEN, Valencia, CA)はコントロールとして使用した。24 ウエルプレートにおいて SK-N-SH 細胞が 60%コンフルエンスの状態で、HyperFect transfection reagent (QIAGEN) を用いて、0.8 ug の siRNA をトランスフェクトした。トランスフェクト処置 24 ~ 36 時間後に、小胞体ストレスを負荷した。

1-2-9) 低温損傷、免疫組織化学、in situ ハイブリダイゼーション

成体雄 ICR マウスに対して、ペントバルビタール麻酔投与下において、液体窒素

で冷却しておいたリード・プローブを頭蓋に1分間接触させる低温損傷刺激を行った。損傷刺激の7日経過後にマウス脳を解剖し、低温槽において脳組織を 12mm の切片に切り出した。その切片を、in situ ハイブリダイゼーションや免疫組織化学に用いた。in situ ハイブリダイゼーションや免疫組織化学は、(5)に記載されているとおりの方法で行った

1-3 節 結果

1-3-1) OASIS は、小胞体に局在する新規の bZIP ドメインをもつ転写因子であり、小胞体ストレスに反応して切断される。

アストロサイト特異的な UPR シグナルを担う新規の小胞体ストレスセンサーの同定を目指して、私は、他の小胞体ストレスセンサーのホモロジーデータベースサーチを行った。結果として、膜貫通ドメインと bZIP ドメインを有する CREB / ATF ファミリーの 1 つである OASIS を見出した。OASIS は、ATF6 の構造とよく似ており、ATF6 も膜貫通ドメインと bZIP ドメインを有している。私は、OASIS がアストロサイト特異的な新規の小胞体ストレスセンサーではないかと考え、機能解析を行った(5, 15)。

OASIS の全体的な構造は ATF6 と類似している(図 1-2A)。OASIS は小胞体内腔側に RSLI というアミノ酸配列をもっているが、これはゴルジ体に存在するプロテアーゼ S1P(Site-1 protease)が切断するコンセンサス配列 RxxL に適合している (4, 21) (図 1-2B)。このことは、OASIS が ATF6 や SREBP-2 と同様に、制御された膜内切断 (regulated intramembrane proteolysis : RIP)を受けている可能性を示唆する(4, 21)。RIP は、膜タンパク質の切断による活性化機構であり、細菌から高等生物まで広く存在し、細胞膜や小胞体から核へシグナルを伝達する重要な生理機構として位置づけられている。

内在性 OASIS タンパク質の発現の検討を目的として、アストロサイト初代培養に対して小胞体ストレス誘発剤であるサブシガルジン ($1\mu\text{M}$) (小胞体 Ca^{2+} -ATPase の阻害剤)または $3\mu\text{g/ml}$ ツニカマイシン(N 結合型糖鎖付加阻害剤)を 15 時間負荷した後、抗 OASIS 抗体を用いてウエスタンブロットで検討した。これらの薬剤を付加しない通常の状態では、OASIS は 80kDa タンパク質として発現した(図 1-2C)。小胞体ストレスを負荷すると、80kDa バンドに加えて 50 kDa 付近に新しいバンドが発生した(p50OASIS)。この結果は、OASIS は、小胞体ストレスに反応して切断されることを意味する。同様の結果は、アストロサイト由来の C6 グリオーマ細胞においても検出された(図 1-3A)。興味深いことに、OASIS タンパク質の全量(80 kDa + 50 kDa タンパク質)は増加した。しかしながら、OASIS のレベルは、MEF においては顕著に少なく、神経芽細胞腫である Neuro 2A では、ほとんど検出できなかった。

構成的に全長型 OASIS を発現する C6 グリオーマ細胞腫においても、p50OASIS はサブシガルジンの処理によって検出された(図 1-3B)。S1P サイトと S2P サイトの両方に

変異を入れた OASIS の発現ベクターをトランスフェクションすると、p50OASIS は検出されなかった(図 1-3C)。この結果は、OASIS は ATF6 と同様に、小胞体ストレスに反応して S1P および S2P によって切断されることを示唆する。

構成的に OASIS を発現する C6 グリオーマ細胞に対して、抗 OASIS 抗体を用いた免疫細胞化学を行うと、小胞体ストレスを負荷していない場合では、核の回りに網状に染色された(図 1-2D)。その染色パターンは、小胞体分子シャペロン BiP や GRP94 を認識する抗 KDEL 抗体による染色と共局在した。細胞にサブシガルジンを負荷すると、OASIS の免疫反応性は核に集積し、BiP や GRP94 とは共局在しなくなった。この結果から、OASIS は小胞体ストレスによって切断され、切断断片である p50OASIS は核に移行することが明らかとなった。免疫細胞化学に加えて、分画実験においても、全長型 OASIS と p50OASIS は、それぞれ小胞体と核の分画から検出された(図 1-3D)。

1-3-2) OASIS の mRNA は、アストロサイトにおいて小胞体ストレス特異的に発現誘導される。

次に、種々の小胞体ストレス誘発剤負荷により、時間の経過とともに C6 細胞の OASIS mRNA 量が変化するのかノザンブロッティングを用いて検討した。ツニカマイシン負荷前は、低レベルの OASIS mRNA が検出できた(図 1-2E)。シグナルは、処置後 6 時間後に増加し、12 時間には高レベルになった。サブシガルジン負荷時も同様に OASIS mRNA の発現は上昇した。しかしながら、200 nM スタウロsporin (UPR を活性化しない) 負荷では、OASIS mRNA の発現上昇は見られなかった。これらの結果は OASIS の発現誘導は、UPR 経路によって制御されていることを示唆する。

さらに、種々の細胞(マウスのアストロサイト初代培養、神経芽細胞、SK-N-SH 細胞、HEK293T 細胞、MEF 細胞)において、小胞体ストレス負荷後に OASIS mRNA が発現誘導されるのか検討した。検討した細胞の中では、アストロサイト初代培養のみが C6 グリオーマ細胞と同様に OASIS mRNA の発現誘導が見られた(図 1-2F)。

OASIS は、膵臓、前立腺、骨芽細胞に発現しているとする報告もあるので、OASIS mRNA の発現誘導がアストロサイト特異的であるか否かは、更なる研究が必要である。ATF6 mRNA は、すべての細胞で発現が見られた。これは、ATF6 はユビキタスに機能するが、OASIS は細胞種特異的な機能を持つことが示唆される(図 1-3E)。

1-3-3) OASIS は、BiP mRNA の転写を促進する

OASIS の核に移行した N 末端部分(p50OASIS)は bZIP ドメインを含むので、転写因子として標的遺伝子のプロモータ領域に直接結合し、転写を活性化している可能性がある。そこで、OASIS の転写因子としての機能を検討するために、ルシフェラーゼ遺伝子のすぐ上流にヒトの BiP のプロモータ領域(-366 to + 52)を持つコンストラクト(pGL2-long BiP promoter (-366)-luc)を用いたレポーターアッセイを行った。この BiP プロモータ領域には CRE-like 配列と直列につながった 3 つの ERSE 配列が存在する。

空ベクターをトランスフェクションした C6 グリオーマ細胞をサブシガルジンで処理すると、約 2 倍のレポーターの活性が検出された(図 1-4B)。通常の状態において、全長型 OASIS (OASIS (full))を遺伝子導入すると、全長型 ATF6 (ATF6 (full))を遺伝子導入した場合と同様にレポーター遺伝子の転写は活性化した。このレポーター転写の増加は、OASIS や ATF6 は一過的に過剰発現させると、構成的に切断されることによるものと考えられる(図 1-4A)。OASIS (full) または ATF6 (full)を遺伝子導入した細胞のレポーター活性は、サブシガルジンを負荷により増強した。この結果は、OASIS は小胞体ストレスにより切断され、切断断片である p50OASIS が BiP のプロモーターを活性化することを示唆する。

OASIS の N 末端断片の発現ベクターである OASIS(374)を HEK293T 細胞に遺伝子導入すると、内在性の BiP mRNA の発現が増加した(図 1-4C)。空ベクターを遺伝子導入したコントロール細胞に比べて、全長型 OASIS を構成的に発現させた細胞では、小胞体ストレスに応答して BiP mRNA の高発現が見られた(図 1-4D)。

次に、クロマチン免疫沈降法(chromatin immunoprecipitation assays)を用いて、C6 グリオーマ細胞にサブシガルジンを負荷した時に、OASIS が BiP プロモータ領域(-25 ~ -249)に直接結合するのかを検討した(図 1-4E)。ストレスを与えていない細胞では、OASIS の BiP プロモータへの結合は検出できなかった。しかしながら、結合はサブシガルジン負荷 2 時間後に検出され、さらに強い結合が 4 時間後に検出された(図 1-4E)。対照的に、同じプロモータ領域においてヒストン H3 の結合は、サブシガルジン負荷した前後では差は見られなかった。これらの結果から、内在性の OASIS は、小胞体ストレスに反応して BiP のプロモータ領域に結合することが明らかとなった。

1-3-4) OASIS は、BiP プロモータの CRE と ERSE を活性化する

OASIS が、CRE または ERSE サイトのどちらを活性化しているのか検証するために、レポーター・コンストラクトの CRE と ERSE サイトのどちらか一方もしくは両方に変異を入れた(pGL3-middle BiP promoter (-304)-luc) (図 1-5A)。ERSE の変異型プロモータ

では、OASIS (374)の過剰発現によるレポーター活性の減少は野生型プロモータと比較して約 20%で、抑制効果は比較的小さい。CRE サイトの変異型では約 50%以上抑制されており、ERSE の変異型より強い効果を示した。この結果は、OASIS は CRE および ERSE サイトの両方を活性化し、特に CRE サイトを優先的に転写アクチベータとして活性化していることが明らかとなった。対照的に、ATF6 (373)の過剰発現の場合には、CRE サイトの変異型はプロモータの活性にほとんど影響を与えず、ERSE サイトの変異型はプロモータの活性を完全に抑制した。この結果は、ATF6 は ERSE を特異的に標的としていると報告されている過去の知見(27)と一致した。空ベクターや OASIS (del56) では、すべてのレポーターコンストラクトに対して活性化は見られなかった。

図 1-5B に示すように、アストロサイト初代培養に対してサブシガルジンを負荷した時に、CRE サイトにのみ変異を入れて ERSE サイトは野生型のままである場合は、CRE サイトおよび ERSE サイトの両方が野生型のままである場合と比較して、約 35%減少した。さらに、電気泳動移動度シフト解析(electrophoretic mobility shift assay (EMSA))を用いて、OASIS が BiP プロモータの CRE サイトに結合できることを確認した(**図 1-5C**)。対照的に、OASIS は、ERSE プロンプトへの結合は検出できなかった。この理由は不明だが、OASIS の ERSE に対する結合は非常に弱いのか、アストロサイトの他の核成分が必要なのかもしれない。

OASIS の UPR シグナリングにおける必要性をさらに検討するために、二本鎖 RNA による RNA 干渉実験(double-stranded RNA-mediated interference experiments)を行った。その結果、OASIS siRNA の 2 種類の配列(OASIS-K13, OASIS-K26) が、OASIS mRNA を特異的な標的として、効果的に分解していることを確認した(**図 1-6A**)。C6 グリオーマ細胞に対して OASIS siRNA (OASIS-K13)を処置すると、OASIS の発現レベルは著しく減少した(**図 1-6**, **図 1-7A**)。OASIS siRNA を細胞に処置すると、BiP mRNA の発現量は、サブシガルジン負荷 6 時間後ではコントロール細胞と比べて差は見出せないが、12 時間後以降では、50%程度の低下が見られた(**図 1-7A**)。このことは、OASIS は、小胞体ストレス時、特に UPR 経路の後期において、BiP の誘導に重要な役割を担っていることが示された。この結果は、小胞体ストレス時における OASIS mRNA の転写誘導に関係しているのかもしれない。さらに、アストロサイトにおいて ATF6(**図 1-3E**)が発現していることを確認した。よって、OASIS ノックダウンによる BiP mRNA の半分は、他に UPR 経路が正常だったことによるのかもしれない。OASIS siRNA 処置した細胞において、BiP 以外に小胞体ストレス時の発現誘導が低下した遺伝子としては、protein disulphide isomerase (PDI)が若干の低下を示した(**図 1-7B**)。

1-3-5) 小胞体ストレスにより誘導されるアポトーシスは、OASIS により抑制される

BiPは、ストレスを受けた細胞において、細胞の保護的な役割を担っていることが知られている(17, 18, 29)。よって、OASISも小胞体ストレスから細胞を保護する役割を担っている可能性が考えられる。OASISが小胞体ストレスにより誘導される細胞死を抑制するのを確認するために、全長型OASISを構成的に発現するC6細胞に対してサブシガルジン負荷した。親株C6グリオーマと空ベクターを恒常的に導入した細胞では、アポトーシスによる細胞死がかなり誘導された(図 1-7C,D 図 1-8A)。対照的に、OASISを遺伝子導入した細胞では、小胞体ストレスによる細胞死に対して強い抵抗性を示した。OASISを遺伝子導入した細胞では、他の小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンでも小胞体でも抵抗性を示した。代わりに、OASIS siRNAで細胞を処置した場合、小胞体ストレスによる細胞死は亢進した(図 1-7E, 図 1-8B)。神経芽細胞腫 Neuro 2AやMEF細胞をOASIS siRNAで細胞を処置した場合は、小胞体ストレスによる耐性に変化は見えなかった(図 1-7F)。

これらの結果から、OASISは小胞体ストレスからアストロサイトを保護する機能をもつこと、しかし神経芽細胞腫や線維芽細胞ではその機能がないことが明らかとなった。詳細なメカニズムは明らかではないが、OASISによるBiPを含むUPR経路の活性化が考えられる。他の可能性としては、OASISは、別の抗アポトーシス遺伝子群の発現を上昇させているのかもしれない。

1-3-6) 損傷脳におけるOASISの発現

損傷脳において、反応性アストロサイト(reactive astrocyte)はOASIS mRNAを発現する(5, 11)。この論文から、OASISは、損傷脳の反応性アストロサイト内でUPRシグナリングを活性化している可能性がある。

in vivoにおけるOASISの機能を解析するために、OASISとその標的遺伝子の発現を低温損傷脳において検討した。損傷脳の脳皮質において、OASIS mRNAとタンパク質の発現レベルは増加しており、切断された断片も検出された(図 1-9A,B)。次に、in situ ハイブリダイゼーションと免疫組織化学によって、低温損傷脳におけるOASISの発現を検討したところ、損傷後7日の壊死性組織の周辺にOASIS発現細胞が検出された(図 1-9E,G)。そして、その発現パターンを検討したところ、OASIS mRNAが存在する細胞は、グリア線維性酸性タンパク質(glial fibrillary acidic protein : GFAP)の免疫反応性と似た分布となった(図 1-9H-J)。この発現パターンをよく観察すると、OASIS mRNAを発現している細胞は、損傷部位から近位の反応性アストロサイト(proximal reactive astrocyte)で、それらはGFAPの免疫反応性の弱いことが知られて

いる(19)。一方、遠位の反応性アストロサイト(distal reactive astrocytes)は、強い GFAP 免疫反応性を示すが、それらの細胞には OASIS mRNA の発現は少なかった。

in situ ハイブリダイゼーション法により、OASIS mRNA を発現する多くの反応性アストロサイトは、BiP mRNA を発現していた(図 1-9K-M)。免疫組織化学により、BiP の免疫反応性がある反応性アストロサイトにおいて、OASIS タンパク質発現の共局在が観察されたので、OASIS タンパク質は主に小胞体に局在することを示唆する(図 1-9N-P)。しかしながら、反応性アストロサイトにおいて OASIS の N 末断片が核に集積するのは検出できなかった。in vivo において少量の核に移行した OASIS の N 末断片を検出することは、免疫組織化学の技術では難しかったためと思われる。

反応性アストロサイトにおける OASIS の発現は、損傷脳における UPR の活性化と関連性がある。しかしながら、in vivo における OASIS の機能を明らかにするためには、OASIS ノックアウトマウスを用いた更なる研究が必要である。

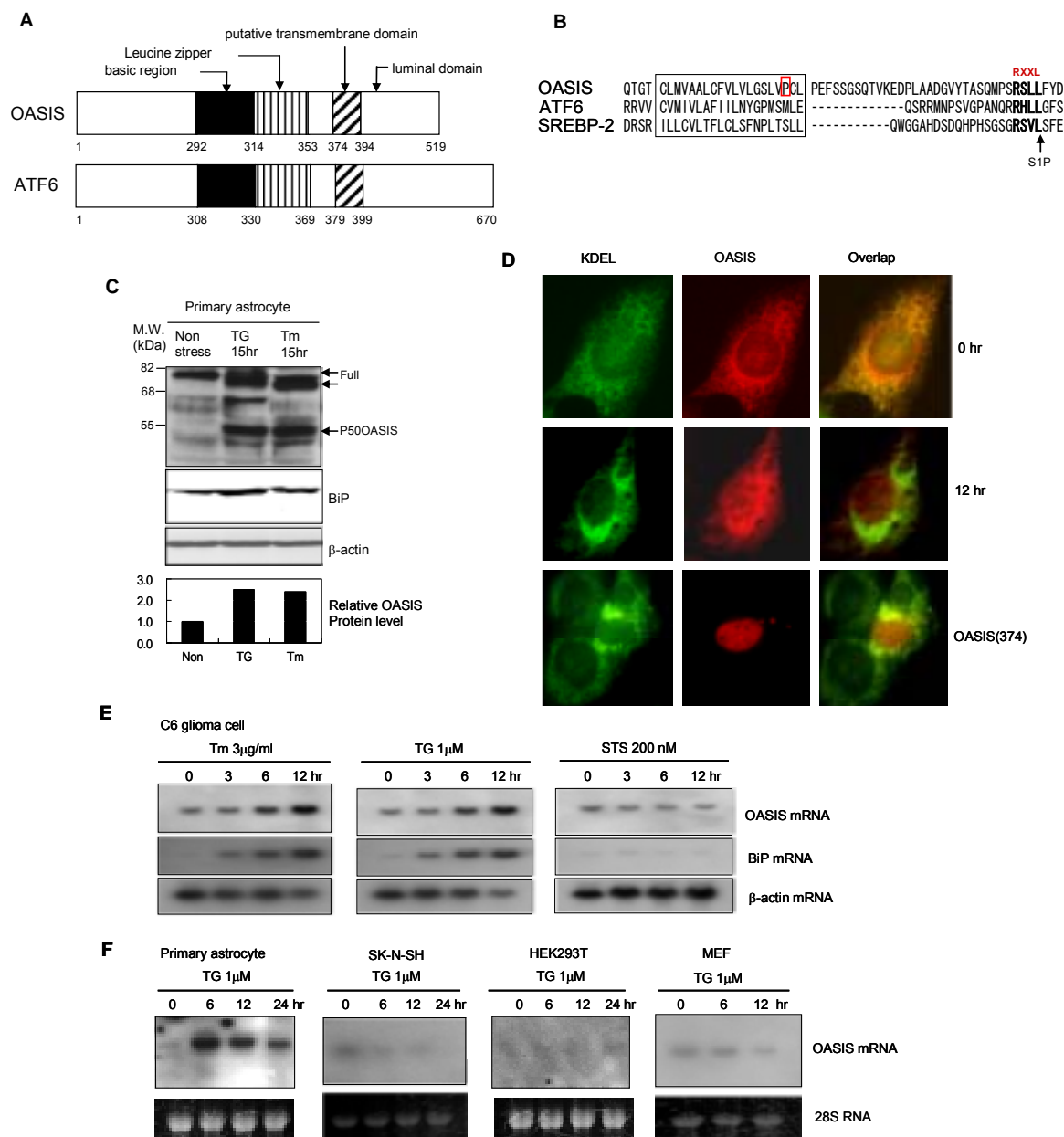


図 1-2 OASIS は、アストロサイトにおいて小胞体ストレスに反応して誘導され、膜内切断を受ける。

(A) 予想されるヒト OASIS および ATF6 の構造。Basic 領域、leucine-zipper、推定上の膜貫通領域、内腔部分(luminal domain)を示す。

(B) ヒト OASIS、ATF6、SREBP-2 の膜貫通領域におけるアミノ酸配列の比較。S1P サイト(RxxL; 赤字で強調)のコンセンサス配列を示す。OASIS の膜貫通領域にあるプロリン残基(赤のボックス)は、推定上の S2P 認識領域である。黒字のボックスは、膜貫通領域の位置を示す。

(C) アストロサイト初代培養における内在性 OASIS の発現。細胞を 1 μ M サブシカルジン (TG) or 3 μ g/ml tunicamycin (Tm) を 15 時間負荷した後、抗 OASIS 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。50 kDa バンド (p50OASIS) は、小胞体ストレスを負荷した細胞で検出された。*(アスタリスク)は、部分的な N グリコシル化または完全にグリコシル化されない OASIS を示す。抗 KDEL 抗体は、BiP を認識している。下段: OASIS タンパク質(全長型 OASIS+p50OASIS)発現の定量解析は、バンドの強度より決定した。

(D) OASIS の細胞内局在。OASIS を構造的に遺伝子導入した C6 グリオーマ細胞において、1 μ M サブシカルジンを 12 時間負荷する場合と負荷しない場合に対して、抗 OASIS 抗体と抗 KDEL 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。OASIS の免疫反応性は、通常の状態では KDEL とオーバーラップする。しかし小胞体ストレス負荷後は、核に集積した。下段: OASIS の N 末断片の発現ベクター OASIS(374)では、通常の状態では核に局在する。

(E) OASIS mRNA は、小胞体ストレス特異的に発現誘導される。C6 グリオーマ細胞に対して、tunicamycin (Tm, 3 μ g/ml)、サブシカルジン (TG, 1 μ M)、staurosporine (STS, 200 nM) を示した時間負荷した。全 RNA 量をそれぞれの培養から回収し、OASIS、BiP、 β -actin mRNA のプローブでノザンブロットを行った。

(F) 種々の細胞に対して、示した時間 1 μ M サブシカルジンを負荷した時の OASIS mRNA の発現(ノザンブロット)。OASIS mRNA は、アストロサイト初代培養において小胞体ストレス時に急激な発現上昇が見られた。しかし、他の細胞では発現誘導は見られなかった。28S リボソーム RNA は、全 RNA 量が同一であることを示す。

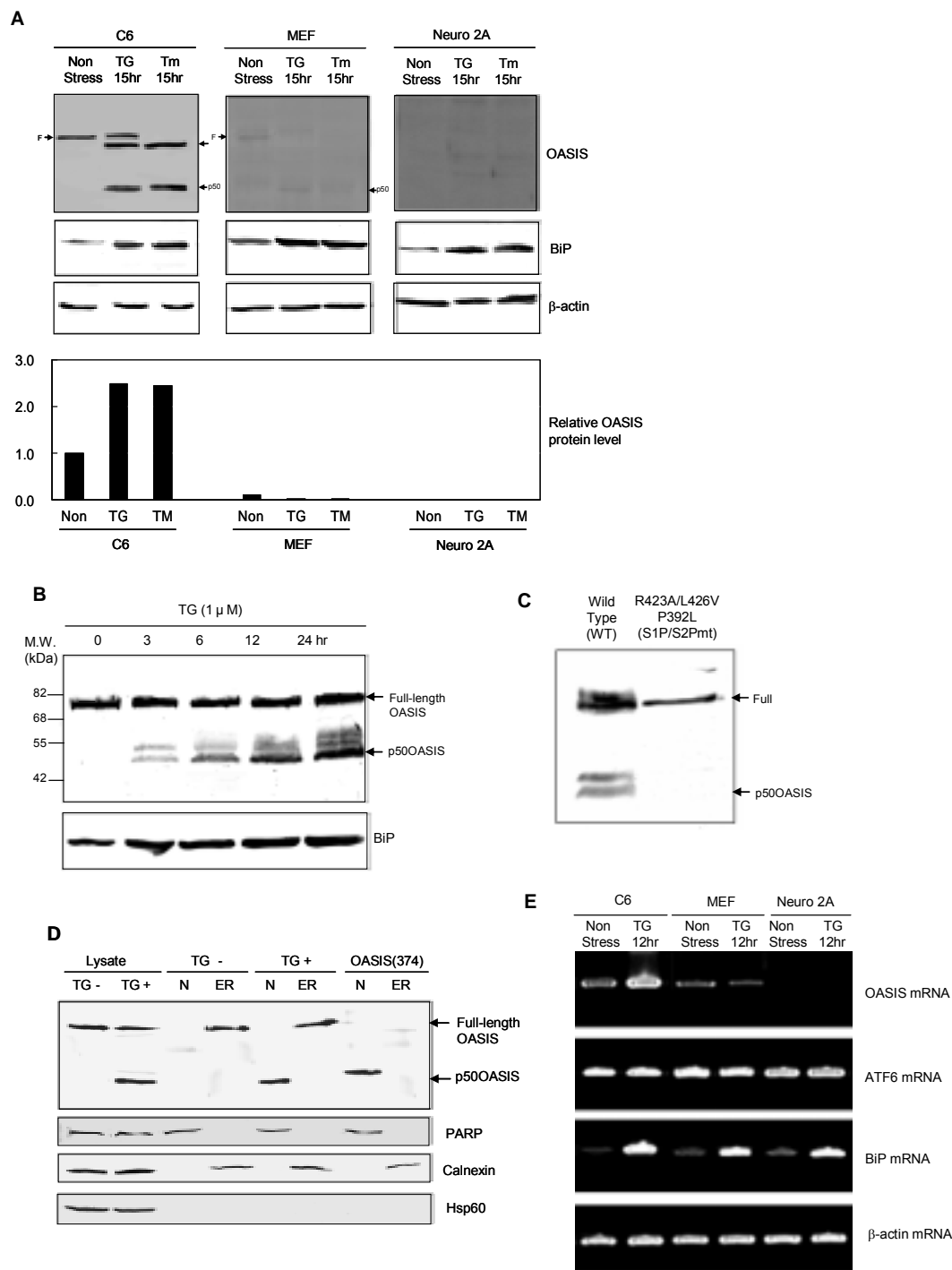


図 1-3 OASIS の生化学的な特性と発現

(A) C6 グリオーマ細胞、MEF 細胞、神経芽細胞腫(Neuro 2A)における OASIS の発現。注意：OASIS は、C6 グリオーマ細胞で強い発現を示す。OASIS タンパク質の全量 (全長型 OASIS + p50OASIS)は、小胞体ストレスに反応して増加する(下段)。対照的に、MEF および Neuro 2A において、非常に低い。F:全長型 OASIS, p50: p50OASIS。アスタリスクは、部分的な N グリコシル化または完全にグリコシル化されない OASIS を示す。

(B) 全長型 OASIS を構成的に発現させた C6 グリオーマ細胞における OASIS の切断。全長型 OASIS と切断断片(p50OASIS)を矢印で示した。

(C) OASIS の S1P および S2P 認識サイトに変異を入れると、C6 グリオーマ細胞における切断プロセスが変化する。FLAG タグした野生型 OASIS 発現ベクター、または S1P および S2P 認識サイトの両方に変異を入れた発現ベクター (OASIS (R423A/L426V, P392L)) を C6 グリオーマ細胞に遺伝子導入した。24 時間後、細胞に 1 μM サブシカルジンを 4 時間負荷し、細胞を回収して抗 FLAG 抗体でウェスタンブロッティングを行った。

(D) 全長型 OASIS と N 末端断片の細胞内分布。OASIS 構成発現細胞株に 1 μM サブシカルジンを 12 時間負荷し、細胞内分画を行った。PARP、calnexin、Hsp60 は、それぞれ核、小胞体、ミトコンドリアのマーカである。

(E) 種々の細胞における ATF6 mRNA と OASIS mRNA の発現。細胞を 1 μM サブシカルジン で 12 時間処置し、それぞれの遺伝子毎に RT-PCR を行った。ATF6mRNA は、すべての細胞において同レベル発現していた。対照的に、OASIS mRNA は小胞体ストレスに反応して C6 グリオーマ細胞において発現誘導が見られたが、MEF 細胞や Neuro 2A 細胞では発現誘導が見られないか、または非常に低レベルの発現であった。

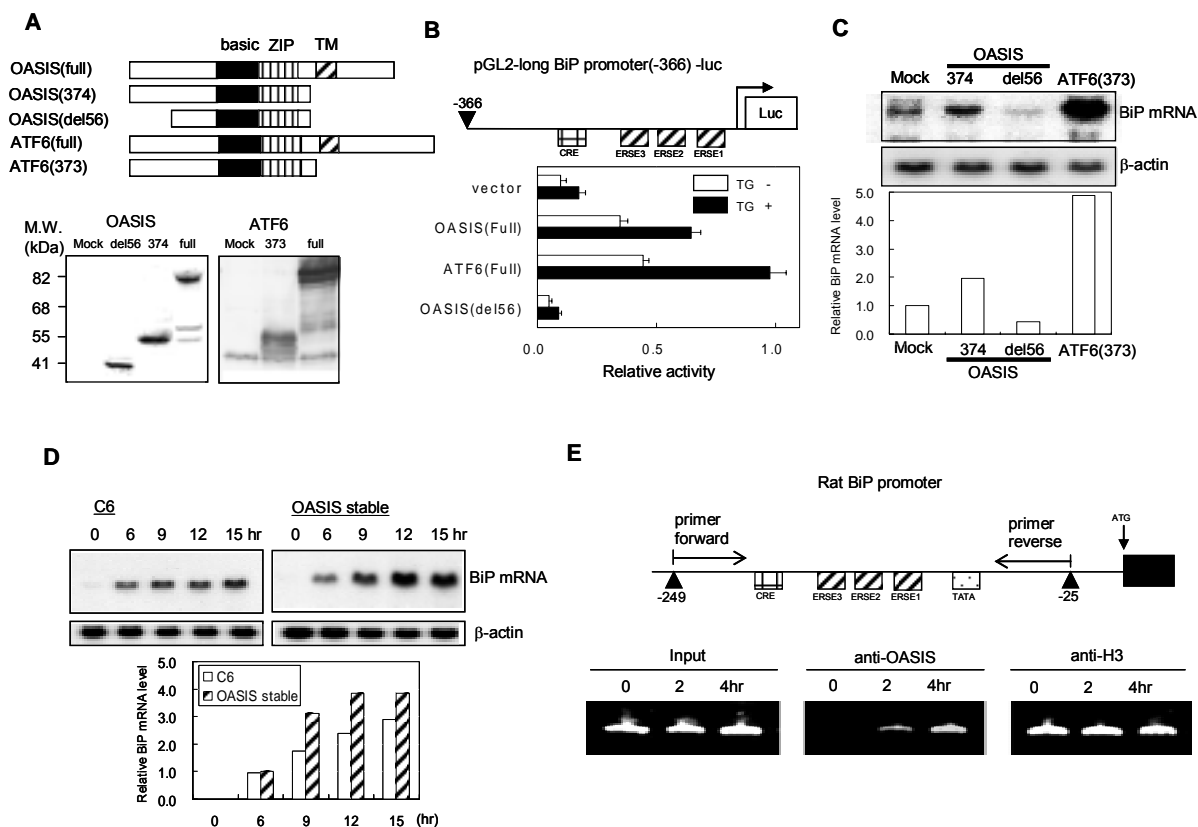


図 1-4 OASIS による BiP プロモーターの活性化

(A) 全長型 OASIS(OASIS (full)), C 末端欠損型 OASIS(OASIS (374)), ドミナント-ネガティブ型 OASIS(OASIS (del56)), 全長型 ATF6(ATF6 (full)), C 末端欠損型 ATF6(ATF(373)). basic 領域(basic)、leucine zipper(ZIP)、膜貫通領域(TM)は、示したとおりである。下段：それぞれのコンストラクトの発現量の比較。C6 グリオーマ細胞に遺伝子導入した細胞の溶解液を抗 OASIS 抗体(左)もしくは抗 ATF6 抗体(右)でウエスタンブロットを行った。

(B) レポーターアッセイ：C6 グリオーマ細胞に、レポーターコンストラクト(reporter plasmid pGL2-long BiP promoter (-366)-luc)と左側に示したコンストラクトを遺伝子導入した。相対的なルシフェラーゼ活性は、16 時間の $1 \mu\text{M}$ サブシカルジン (TG)を負荷する場合()と、負荷しない場合()を測定した。Error bar は、標準偏差を示す。n=4。上段にレポーターコンストラクトの構造を示す。

(C)、(D) BiP mRNA のノザンブロットティング。(C): HEK293T 細胞に対して発現プラスミドを一過的に遺伝子導入した場合。(D): 空ベクターを恒常的に遺伝子導入された C6 細胞株と、OASIS を構成的に発現している C6 細胞株に図に示す時間 $1 \mu\text{M}$ サブシカルジンを負荷した場合。全 RNA を BiP mRNA のレベルの検証のため抽出した。下段：BiP mRNA の発現レベルの定量分析。

(E) OASIS は、in vivo において、ER stress に反応して BiP のプロモーターに結合する。上段：ラット BiP プロモーターのクロマチン免疫沈降実験(ChIP)で用いたプライマーのセットを示した。下段：C6 グリオーマ細胞を示した時間 $1 \mu\text{M}$ サブシカルジンで処理した後、ホルムアルデヒドでクロスリンクを行い、上部に示すように抗体を用いてクロマチンの免疫沈降を行った。精製後、免疫沈降産物または入力 DNA を、上段に示すプライマーを用いて PCR を行った。入力 DNA と抗 OASIS 抗体もしくは抗ヒストン H3 抗体を用いた免疫沈降産物の DNA に対する PCR 産物は、5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

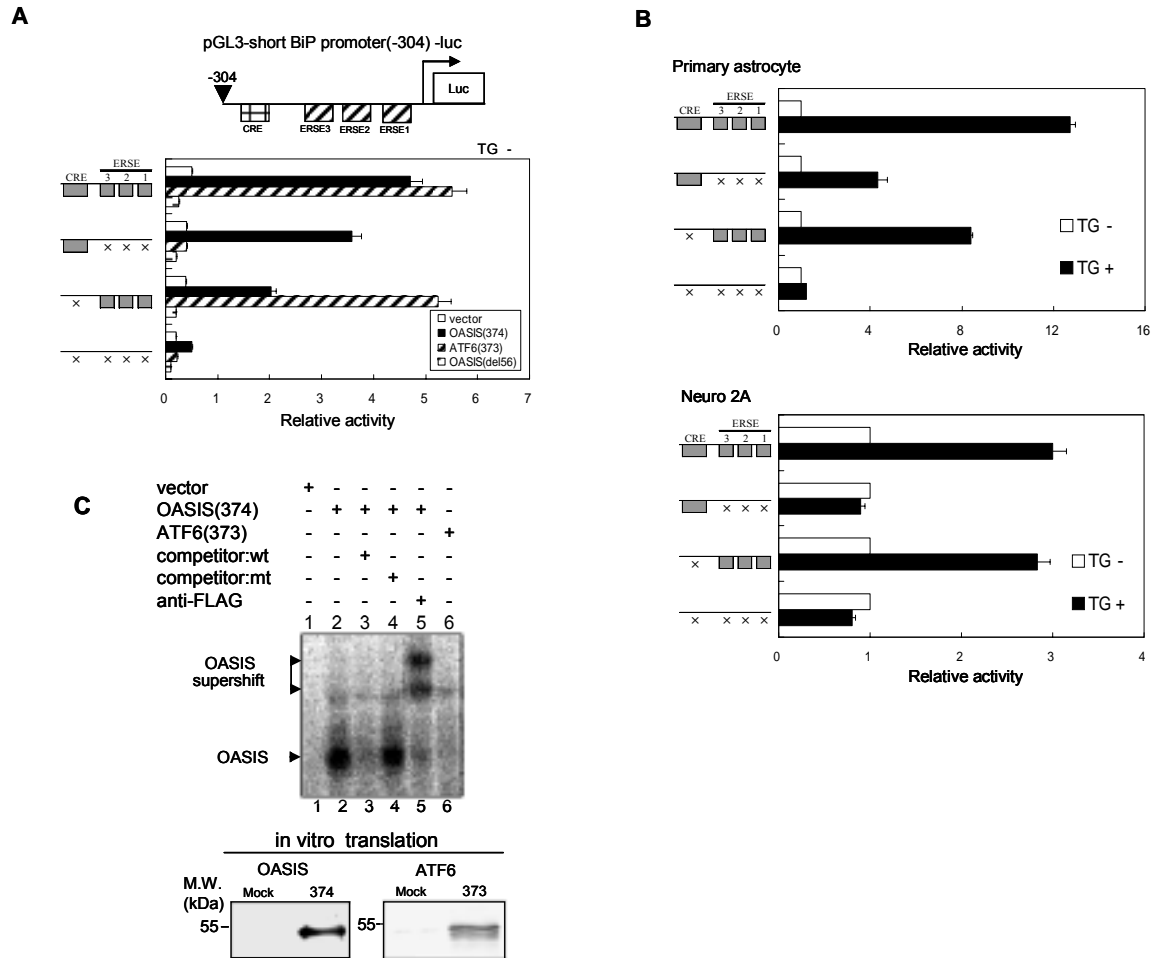


図 1-5 CRE サイトおよび ERSE サイトにおける OASIS の効果

(A) BiP プロモーターの CRE および ERSE1-3 に変異を入れた。無処置または変異プロモータは、pGL3-Basic vector (pGL3-middle BiP promoter (-304)-luc)に挿入されている。(左) 無処置または変異コンストラクトの模式図を示す。発現プラスミドを遺伝子導入したレポーターアッセイの相対活性を示す。

(B) アストロサイト初代培養 (上段)と Neuro 2A (下段)におけるレポーターアッセイ。細胞に各種レポーターコンストラクトを遺伝子導入し、その後 5 時間後に、16 時間のサブシカルジン (TG)負荷した場合と負荷しない場合のレポーターアッセイの相対活性。それぞれのサンプルの相対活性は、サブシカルジンを処置しない場合を 1 として示した。

(C) OASIS の CRE 配列に対する直接結合。32P ラベルした BiP プロモータの CRE 配列と FLAG-OASIS (374)を in vitro 翻訳した生成物をインキュベートした。100 倍量のラベルされていない CRE 配列で競合し (lane3)、抗 FLAG 抗体でスーパーシフトした (lane5)。下段のパネルは、in vitro 翻訳した OASIS (374) と ATF6 (373)のウエスタンブロッティングを示す。

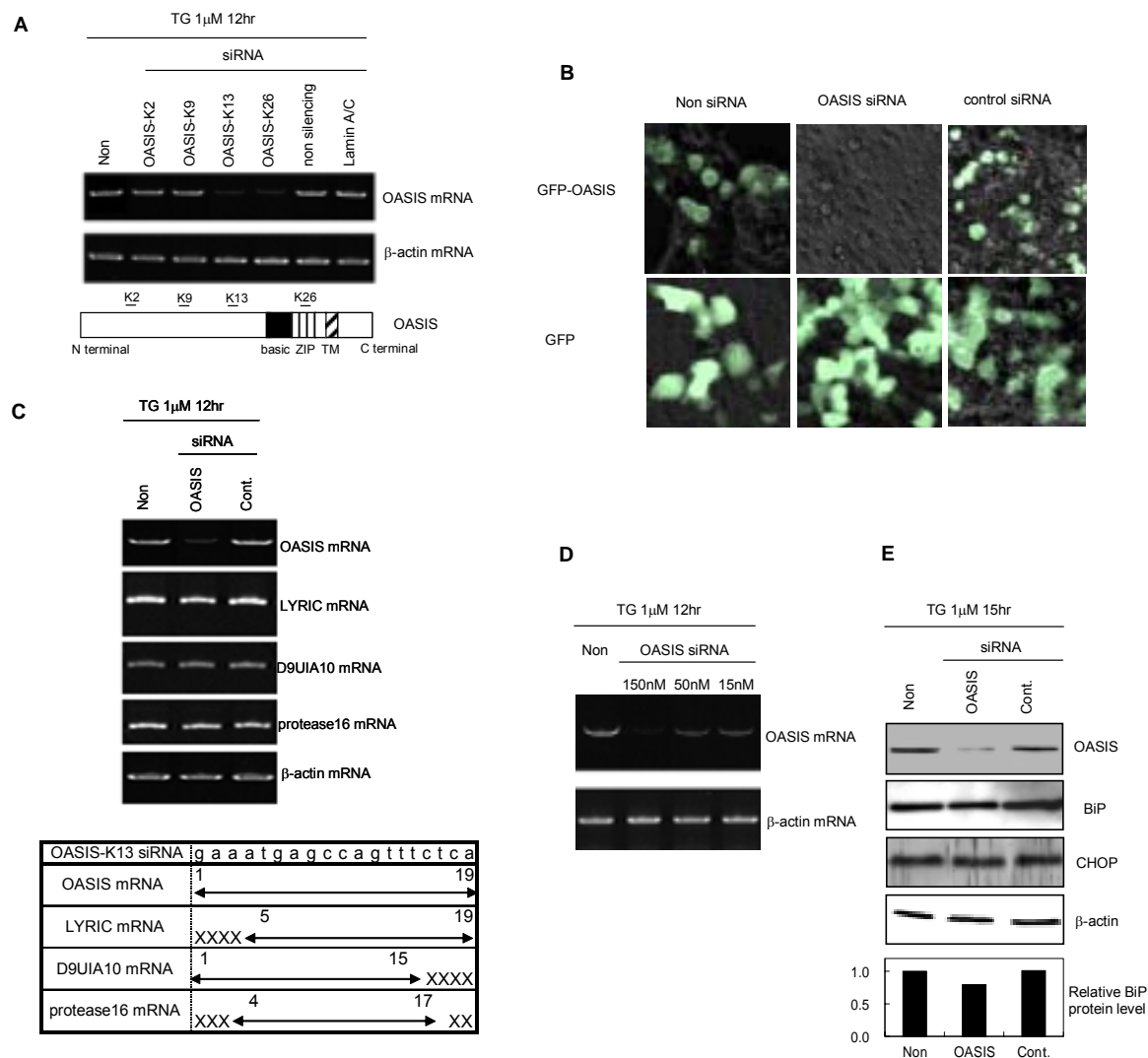


図 1-6 siRNA に対するコントロール実験

(A) 種々の siRNA による OASIS mRNA ノックダウンの効果。C6 グリオーマ細胞に対して siRNA を 36 時間処置し、その後 12 時間 1 μ M サブシカルジン (TG) を負荷した。全 RNA を抽出し、OASIS mRNA の発現レベルの確認のため RT-PCR を行った。下段：OASIS mRNA におけるそれぞれの siRNA の標的配列を示す。

(B) HEK293T 細胞に対して、GFP タグ OASIS 発現ベクターと OASIS siRNA または non-silencing siRNA (control siRNA) を同時に遺伝子導入した。Non-siRNA は、siRNA 処置していないという意味である。遺伝子導入 30 時間後、蛍光顕微鏡により細胞を観察した。注意：OASIS siRNA 処理により、GFP-OASIS の発現は見えなくなったが、コントロール siRNA では GFP-OASIS の発現に変化はなかった。

(C) OASIS siRNA は、OASIS に似た配列を持つ他の遺伝子をノックダウンしない。データベースサーチにより、OASIS-K13 siRNA 配列に相同性の高い 3 つの遺伝子を見出したが、それらの mRNA は OASIS-K13 siRNA 処置によって変化しないことが RT-PCR 解析によりわかった。

(D) 低濃度の OASIS siRNA による OASIS mRNA のノックダウンの効果。C6 グリオーマ細胞に対して OASIS siRNA を示した濃度で処理した。OASIS siRNA は、低い濃度でも効果が確認できた。

(E) OASIS またはコントロール siRNA 処理した細胞における各タンパク質の発現。細胞に OASIS siRNA を処置した場合、OASIS のタンパク質レベルは低下し、小胞体ストレス時の BiP の発現誘導が低下した。しかし、CHOP タンパク質に変化はなかった。

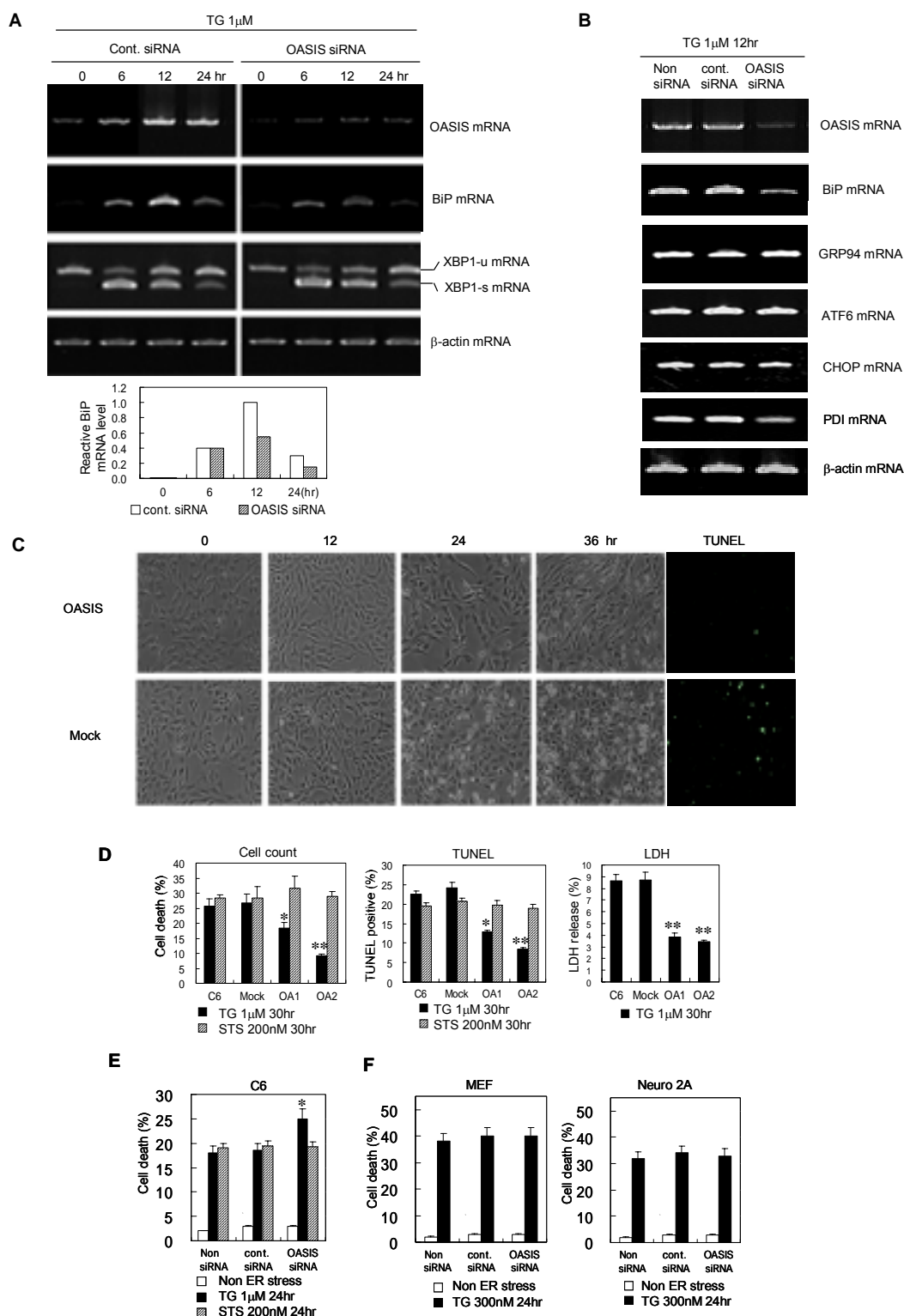


図 1-7 OASIS は UPR 経路と小胞体ストレス誘導性の細胞死に対する保護作用に寄与する。

(A) OASIS siRNA (OASIS-K13)処理した C6 グリオーマ細胞では、小胞体ストレス後の BiP mRNA の発現誘導は減少する。細胞に siRNA を処置した 36 時間後、示した時間 1 μ M サブシカルジン (TG)を負荷した。RT-PCR を示した遺伝子に対して行った。OASIS siRNA により、OASIS mRNA の発現は効果的に減少した。下段：BiP mRNA 発現の定量的な解析。小胞体ストレス 12 時間および 24 時間後において、BiP mRNA の発現レベルは OASIS siRNA 処置した細胞で減少した。

(B) OASIS siRNA 処置における種々の遺伝子の発現。C6 グリオーマ細胞に siRNA を処置し、その後で 1 μ M サブシカルジン を 12 時間負荷した。BiP および PDI mRNA 発現は優位に減少したが、他の遺伝子に変化はみられなかった。

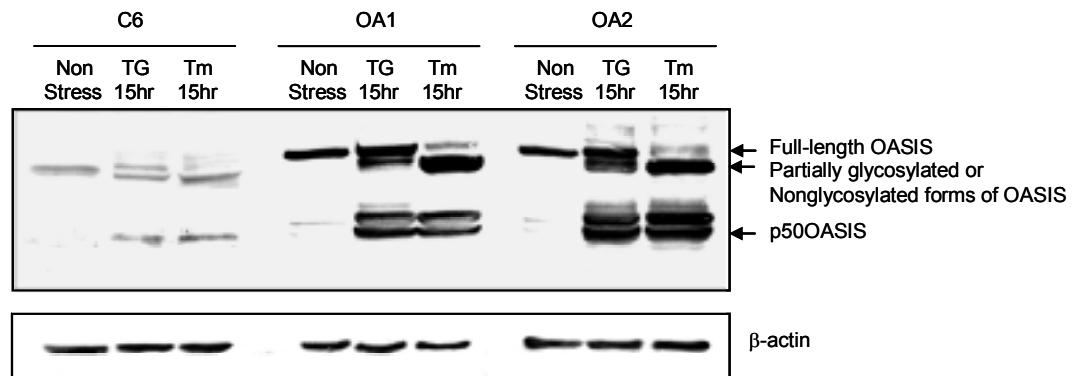
(C) 親株 C6 グリオーマ細胞(C6)、全長型 OASIS を構成的に発現する細胞(OA1,OA2)、空ベクターを恒常的に導入した細胞(Mock)に対して、図に示した時間 1 μ M のサブシカルジンを負荷した。Mock と OASIS 構成的発現細胞(OA2)の代表的な位相差顕微鏡像。右のパネルは、1 μ M のサブシカルジンを 36 時間負荷した後の TUNEL 染色を示す。OASIS 構成的発現細胞は、空ベクター導入細胞に比べて、細胞死は遅くなり抑制された。

(D) サブシカルジン または staurosporine で 30 時間負荷した後の細胞死の定量的解析を行った。細胞死は、細胞の形態(細胞が円形に萎縮した状態を細胞死としてカウントした)、TUNEL 陽性細胞株、放出された LDH 活性によって決定された (n=4、*p<0.05、**p<0.01)。

(E) OASIS siRNA を処置した C6 グリオーマ細胞に対する細胞死実験。サブシカルジン または staurosporine を 24 時間処置した。

(F) OASIS siRNA を処置した MEF 細胞および神経芽細胞腫 Neuro 2A に対する細胞死実験。

A



B

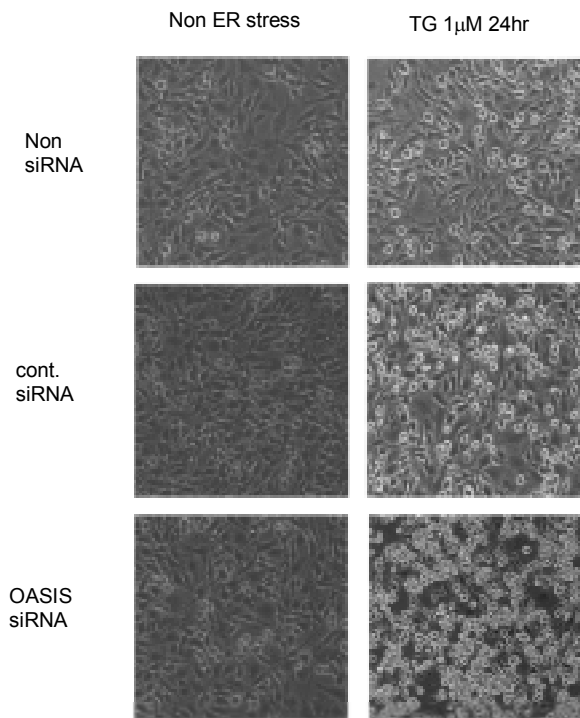


図 1-8 OASIS の発現と細胞死アッセイ

(A) OASIS 構成的発現株(OA1、OA2)は、生理的なレベルである(C6)よりも OASIS の発現量はかなり多い。

(B) 代表的な明視野像。OASIS siRNA を処置した細胞では、未処置やコントロール siRNA 処置細胞に比べて、小胞体ストレスによる細胞死が起こりやすい。

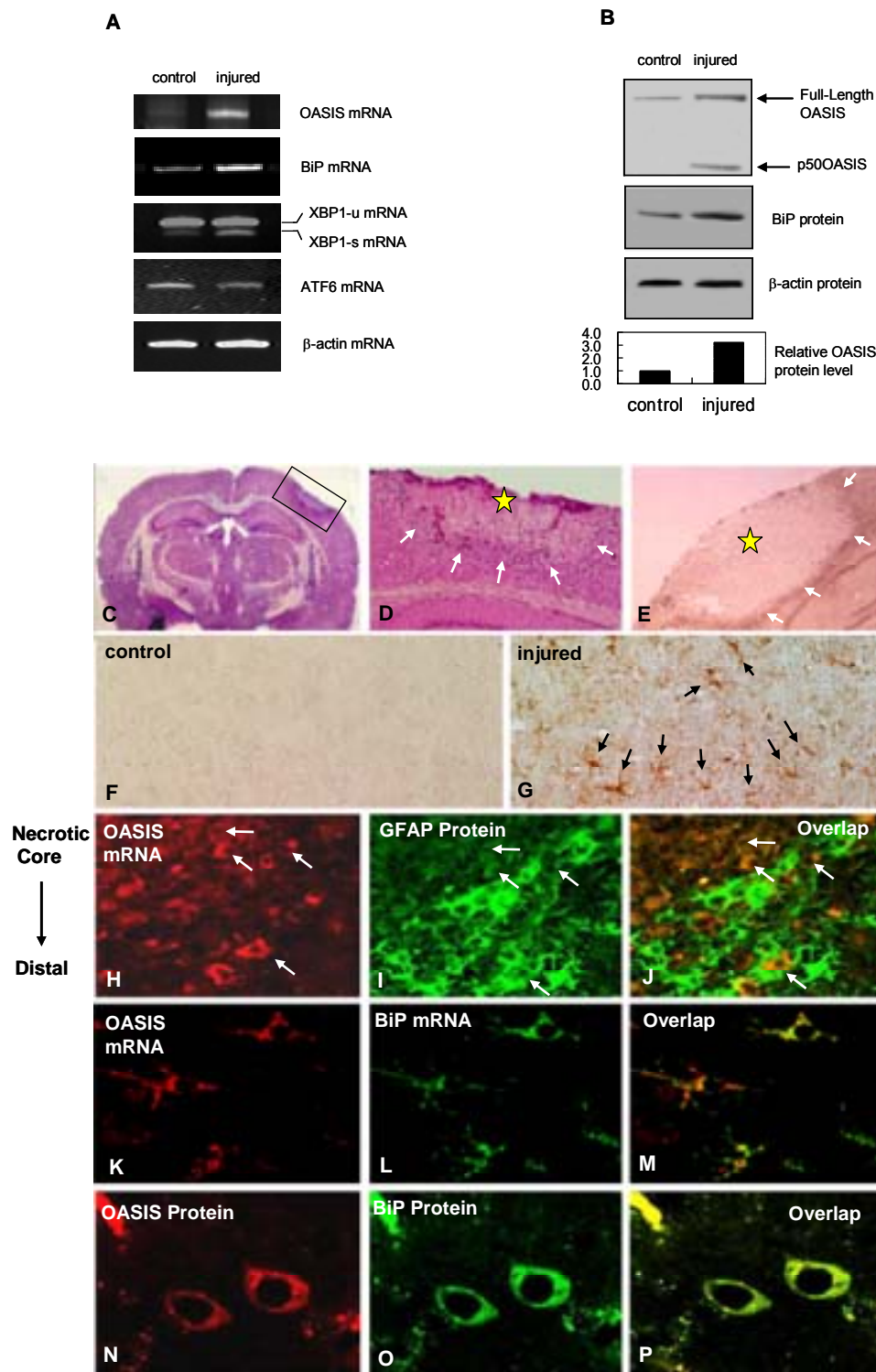


図 1-9 大脳皮質における低温損傷後の OASIS の発現

(A) 損傷脳における OASIS、BiP、XBP1、ATF6、 β -actin mRNA の発現。損傷脳において 7 日後、コントロール領域と損傷領域を採取し、RNA を抽出した後、RT-PCR を行った。

(B) 損傷脳における OASIS、BiP、XBP1、 β -actin タンパク質の発現。下段：OASIS タンパク質発現 (Full-length OASIS + p50OASIS) のコントロール領域と損傷領域における定量解析。

(C), (D) 低温損傷マウス脳 (H.E. stain、損傷 7 日後) の光学顕微鏡写真。右脳大脳皮質に低温損傷を加えた (第 1-2 章 材料と方法参照)。D は、C のボックスを拡大した部分を示す。損傷は、再現性よく、ネクロシス様の状態になる病巣部 (印) と周囲には反応性アストロサイト (reactive astrocytes) (矢印) の集積がみられる。

(E) OASIS mRNA の in situ ハイブリダイゼーション組織化学。OASIS mRNA (矢印) は、ネクロシス様の状態にある病巣部 (印) の周囲に検出される。

(F), (G) コントロール領域 (F) および損傷領域における OASIS タンパク質の免疫組織化学。(注意) OASIS は、損傷領域における反応性アストロサイト (reactive astrocytes) に発現が見られた。


(H-J) OASIS mRNA の in situ ハイブリダイゼーションと GFAP の免疫組織化学の混合染色。OASIS mRNA の発現は、ネクロシス様の病巣部近位にある細胞で、主に観察された。これらの細胞は、GFAP 染色反応が中程度の近位反応性アストロサイト (Proximal reactive astrocyte; Ridet et al., 1997) である。矢印は、OASIS mRNA と GFAP タンパク質が二重標識された細胞を示している。一方で、ネクロシス様の病巣から遠位にある細胞は、GFAP の強い免疫反応性を示す遠位反応性アストロサイト (Distal reactive astrocytes) である。これら遠位反応性アストロサイトでは、OASIS mRNA の発現はほとんど見られない。

(K-M) 損傷脳における OASIS mRNA と BiP mRNA の in situ ハイブリダイゼーションにおける二重染色。

(N-P) OASIS と BiP タンパク質の二重標識免疫組織化学。OASIS の免疫組織化学は、主に細胞質で検出され、BiP の免疫組織化学と著しくオーバーラップした。

1-4 節 考察

本研究において、OASIS が哺乳動物細胞の UPR において、小胞体ストレス トランスデューサーであることを明らかにした。

OASIS が小胞体ストレス トランスデューサーであるとしたのは、以下の結果による。第一に、OASIS は小胞体ストレスに反応して膜内切断を受ける。第二に、bZIP ドメインを含む OASIS の N 末端断片は核に移行する。第三に、内在性の OASIS は小胞体ストレスに反応して BiP プロモーターの ERSE サイトおよび CRE サイトを活性化する。第四に、OASIS は内存性 BiP の転写を活性化する。最後に、OASIS のノックダウン細胞では、UPR の後期における BiP mRNA の誘導レベルが低下した。アストロサイトにおける OASIS による UPR の活性化のメカニズムは、 1-10 に示すとおりである。

CREB-H および BBF2H7 は、bZIP および膜貫通ドメインを保持し小胞体に局在する OASIS によく似た構造をもつ転写因子であるが、機能はほとんどわかっていない(14)。これらの転写因子も、OASIS や ATF6 と同様に、小胞体ストレスに反応して制御された膜内切断 (regulated intramembrane proteolysis : RIP) によって活性化されているかもしれない。これらの転写因子の膜内切断メカニズムや標的遺伝子を明らかにすることは、UPR の新規経路や細胞腫特異的な小胞体ストレス応答の発見に寄与するものと考えられる。

1-5 節 参考文献

1. **Bruce, A.J., Malfroy, B., & Baudry, M.** 1996. β -Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**: 2312-2316.
2. **Calton, M. et al.** 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**: 92-96.
3. **Erickson, A.H. & Blobel, G.** 1979. Early events in the biosynthesis of the lysosomal enzyme Cathepsin D. *J. Biol. Chem.* **254**: 11771-11774.
4. **Espenshade, P.J., Cheng, D., Goldstein, J.L., & Brown, M.S.** 1999. Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **274**: 22795-22804.
5. **Honma, Y., et al.** 1999. Identification of a novel gene, OASIS, which encodes for a putative CREB/ATF family transcription factor in the long-term cultured astrocytes and gliotic tissue. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **69**: 93-103.
6. **Imaizumi, K., et al.** 1997. Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. *J. Biol. Chem.* **272**: 18842-18848.
7. **Kaufman, R.J.** 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J.Clin. Invest.* **110**: 1389-1398.
8. **Luo, S., Baumeister, P., Yang, S., Abcouwer, S.F., & Lee, A.S.** 2003. Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *J. Biol. Chem.* **278**: 37375-37385.
9. **Mori, K.** 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**: 451-454.
10. **Nakagawa, T., et al.** 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific

apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**: 98-103.

11. **Nikaido, T., et al.** 2002. Expression of OASIS, a CREB/ATF family transcription factor, in CNS lesion and its transcriptional activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.***108**: 129-138.
12. **Nikaido, T., et al.** 2001. Expression of the novel transcription factor OASIS, which belongs to the CREB/ATF family, in mouse embryo with special reference to bone development. *Histochem.Cell Biol.* **116**: 141-148.
13. **Nishitoh, H., et al.** 2002. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.***16**: 1345-1355.
14. **Omori, Y., et al.** 2001. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res.***29**: 2154-2162.
15. **Omori, Y., et al.** 2002. OASIS is a transcriptional activator of CREB/ATF family with a transmembrane domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**: 470-477.
16. **Pechan, P.A., Chowdhury, K., & Seifert, W.** 1992. Free radicals induce gene expression of NGF and bFGF in rat astrocyte culture. *Neuroreport* **3**: 469-472.
17. **Rao, R.V., et al.** 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett.* **514**: 122-128.
18. **Reddy, R.K., et al.** 2003. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J. Biol. Chem.* **278**: 20915-20924.
19. **Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., & Gage, F.H.** 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends. Neurosci.* **20**: 570-577.
20. **Ron, D.** 2002. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J.Clin. Invest.* **110**: 1383-1388.

21. **Sakai, J., et al.** 1998. Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol. Cell* **2**: 505-514.
22. **Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., & Prywes, R.** 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* **3**: 99-111.
23. **Tirasophon, W., Welihinda, A.A., & Kaufman, R.J.** 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.***12**: 1812-1824.
24. **Wang,X.Z., et al.** 1998. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* **17**: 5708-5717.
25. **Ye, J., et al.** 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* **6**: 1355-1364.
26. **Yoshida, H., et al.** 2003. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell* **4**: 265-271.
27. **Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K.** 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J.Biol.Chem.***273**: 33741-33749.
28. **Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K.** 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**: 881-891.
29. **Yu, Z., Luo, H., Fu, W., & Mattson, M.P.** 1999. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp. Neurol.* **155**: 302-314.

第 2 章

～ 小胞体膜貫通型転写因子 BBF2H7 の機能解析 ～

2-1 節 序論

2-1-1) アストロサイトで発現する新規小胞体ストレス トランスデューサー OASIS の同定

第1章に示したとおり、私は、アストロサイトが他の細胞に比べて、小胞体ストレスに強い抵抗性を示すことに注目する中で、OASIS(old astrocyte specifically induced substance) という分子を見出した。そして、OASIS がアストロサイトにおいて、新規の小胞体ストレス トランスデューサーとして機能していることを報告した(16)。

OASIS は、basic leucine zipper (bZIP)ドメインを持つ、小胞体に局在する膜貫通型の cyclic AMP-responsive element-binding protein (CREB)/ATF ファミリーに属する転写因子である。OASIS は、小胞体ストレスに反応して膜内切断される。切断された OASIS の N 末端部分は、bZIP ドメインを含み、核に移行し、転写因子として小胞体ストレス 応答 配 列 (ER stress-responsive element : ERSE) や CRE 配 列 (cyclic AMP-responsive element : CRE) を活性化し、小胞体シャペロン BiP を発現誘導する。興味深いことに、OASIS は中枢神経系細胞の中で、アストロサイトにおいてのみ小胞体ストレスによって発現誘導が見られたが、実験した他の細胞では OASIS の発現誘導は検出されなかった。また、OASIS の siRNA の処理により、アストロサイトは小胞体ストレス感受性が高まり、細胞死を起こしやすいことから、OASIS がアストロサイトの細胞死抑制に寄与していることを明らかにした(16)。

OASIS の解析を通して、「細胞種特異的な小胞体ストレス応答機構」という新しい概念を、世界に先駆けて提示することができたと考えている。

2-1-2) OASIS 同定以降、他の OASIS ファミリー分子も小胞体ストレス トランスデューサーであるとする報告が続いた

ヒトでは、55 種類以上の bZIP 転写因子が存在することが明らかとなっている(26)。コイルドコイル部分の相同性の比較により、これらの bZIP 転写因子は、16 種のファミリーに分類できる。これらの中で、OASIS/CREB3L1、CREB-H/CREB3L3、AibZIP (androgen-induced bZIP)/Tisp40/CREB4/CREB3L4、Luman/LZIP/CREB3 が、OASIS ファミリーとして分類されている。OASIS ファミリー分子は、すべて II 型の膜貫通タンパク質で、小胞体に局在する。

OASIS の機能を報告した後、他の OASIS ファミリー分子も小胞体ストレス トランスデューサーとして UPR のサブ経路を担っているとする論文が立て続けに報告された。CREB-H は、肝細胞特異的な bZIP 転写因子で、CREB/ATF ファミリーに属する(27)。小胞体ストレスに応答して、CREB-H は制御された膜内切断(regulated intramembrane proteolysis (RIP)) を受けて活性化し、serum amyloid P-component (SAP) や C-reactive protein (CRP) といった急性相応答(acute phase response (ARP))遺伝子の発現に必要であることが報告された(39)。また、AlbZIP/Tisp40/CREB4/CREB3L4 は、前立腺/精巣に特異的に発現しており、膜内切断によって活性化し、unfolded protein response 配列(UPRE)に直接結合する能力を持つことが報告された(24, 31)。さらに、Luman も、小胞体ストレスに応答して切断されること、また ERSE を介して Herp の転写を促進することが明らかとなった(19)。

2-1-3) 新規 OASIS ファミリー分子 BBF2H7 の発見

本研究において、データベース検索により、BBF2H7 (BBF2 human homolog on chromosome 7)/CREB3L2 (cAMP responsive element binding protein 3-like 2)が新規の OASIS ファミリー分子であることを見出した。BBF2H7 は、low grade fibromyxoid sarcoma (低悪性線維粘液性肉腫)の組織において、染色体転座により、FUS (fusion) 遺伝子と C 末端部分で融合している遺伝子として 2003 年に同定された分子である(32)。しかしながら、BBF2H7 の生理的な機能はまったく分かっていなかった。そこで、本研究において、BBF2H7 の生理的機能および小胞体ストレスに対する応答を明らかにすることを目的とした(図 2-1)。

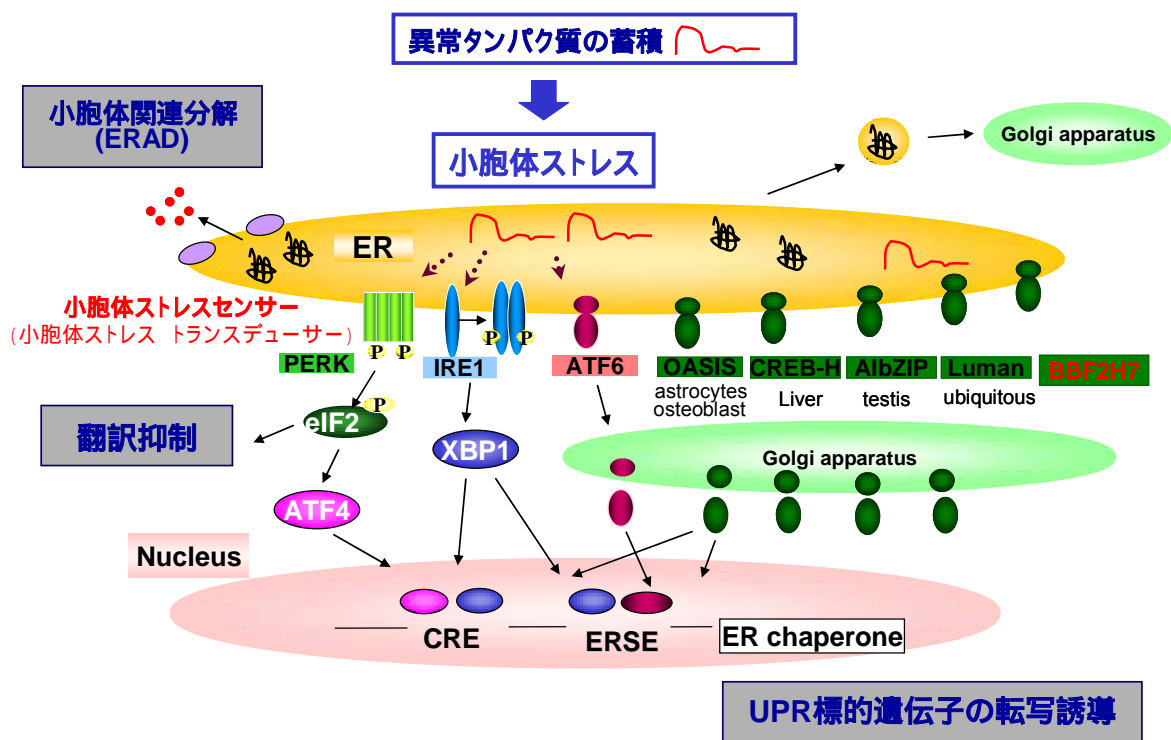


図 2-1 小胞体ストレス応答の全体像 (BBF2H7 の同定 : 2007 年時点)

小胞体において構造異常を起こしたタンパク質、いわゆるミスフォールデッドタンパク質が過剰に蓄積した状態、または小胞体の仕事処理能力を超えた仕事量が小胞体に負荷されているような状態のことを、小胞体ストレスとよぶ。小胞体ストレスからの防御機構として、小胞体ストレス応答または unfolded protein response (UPR) と呼ばれる応答機構が細胞には存在する。UPR には、翻訳抑制、UPR 標的遺伝子(小胞体分子シャペロン等)の転写誘導、小胞体関連分解の3つの機能がある。UPR を担う分子として、PERK・IRE1・ATF6 が小胞体ストレス トランスデューサーとして機能している。

最近、OASIS がアストロサイトにおいて、新規の小胞体ストレス トランスデューサーとして機能していることを報告した(第 1 章に記載)。この報告を契機に、他の OASIS ファミリー分子 (CREB-H、AlbZIP、Luman) も小胞体ストレス トランスデューサーとして機能することが明らかにされた。OASIS ファミリー分子は、すべて型の膜貫通タンパク質で小胞体に局在する。

本研究では、新規の OASIS ファミリー分子 **BBF2H7** を見出し、その機能解析を行った。

2-2 節 材料と方法

2-2-1) 細胞培養、培地、細胞死実験

C6 (rat glioma)細胞、HEK293T 細胞、HeLa 細胞、MEF (野生型)細胞、MEF (PERK 欠損型)細胞は、10%ウシ胎仔血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。SK-N-SH 細胞(ヒト神経芽細胞)は、10%ウシ胎仔血清を含む -modified Eagle's medium (-MEM; MP Biomedicals, Irvine, CA)で培養した。小胞体ストレス誘導剤として、ツニカマイシン(tunicamycin)、サブシガルジン(thapsigargin)、ブレフェルジン A (brefeldin A)を使用した(すべて、Sigma, St Louis, MO, USA)。プロテアソーム阻害剤として MG132 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)、ミトコンドリアからの細胞死刺激剤として staurosporine (Sigma)、翻訳抑制剤として cycloheximide (Sigma)、転写抑制剤として Actinomycin D (Sigma)を用いた。アミノ酸飢餓の誘導は、培地を Hanks' balanced salt solution (HBSS; Invitrogen)に交換した。細胞死実験では、24 時間サブシガルジンを負荷した後、形態変化を基準に細胞死数を計測した。

2-2-2) プラスミド、遺伝子導入、抗体、ウェスタンブロッティング

pcDNA(3.1+)-Flag-mouse BBF2H7 プラスミドは、MEF 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR で BBF2H7 cDNA を作製し、全長(1566bp)BBF2H7cDNA を EcoRI および XhoI サイトに挿入した。PCR を用いて BBF2H7 に変異または欠損を入れることで、Flag-BBF2H7-376, Flag-BBF2H7R427A, L430V, R427V/L430V を作製した。ATF6-373 発現ベクターおよび CRE-ERSE レポーター (pGL3-short BiP promoter(-304)-luc) は、京都大学 森和俊教授から譲与頂いた。OASIS-FL、OASIS-374、変異型 pGL3-short BiP promoter (-304)-luc は以前作成した (16)。C6 グリオーマ、HEK293T、SK-N-SH 細胞には、Lipofectamine 2000 (Gibco BRL)を用いてプラスミドの遺伝子導入を行った。maltose binding protein (MBP) と BBF2H7 (amino acids 1-292)を融合させたリコンビナントタンパク質に対する抗血清を、GST と BBF2H7 (amino acids 1-292)を融合させたリコンビナントタンパク質を用いた HiTrap NHS-activated HP Column (Amersham Biosciences)によって精製することで、抗 BBF2H7 抗体を作成した。抗 OASIS 抗体は、以前作成した(16)。抗 FLAG 抗体 (Eastman Kodak Company)、抗 KDEL 抗体 (StressGen Biotechnologies)、抗 calnexin 抗体 (StressGen Biotechnologies)、抗 CHOP 抗体 (GADD153, Santa Cruz Biotechnology)、抗 ATF4 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 phospho eIF2 抗体 (StressGen Biotechnologies)、抗 anti-actin 抗体 (CHEMICON)は、購入した。抗 ATF6

抗体は、京都大学 森和俊教授から譲与頂いた。BBF2H7 のウエスタンブロッティングは、以前記述した hot SDS を用いて細胞を溶解し(7)、7.5-12.5% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。サンプルのタンパク濃度は Lowry assay (DC protein assay, Bio-Rad)を用いて計測し、同量のサンプルをウエスタンブロッティングに展開した。

2-2-3) ノザンブロッティングおよび RT-PCR

全 RNA は、QIAGEN RNA kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて組織から抽出した。ノザンブロッティングおよび RT-PCR 法は、以前論文に報告したとりの方法で行った(14)。BBF2H7 のノザンブロッティングに対するプローブは、bZIP ドメインを除いた 1020 bp (NM_178661: nucleotides 1441-2460)の cDNA 部分を用いた。RT-PCR で用いたプライマーの遺伝子配列は以下のとおりである。

human/mouse/rat-BBF2H7-5', 5'-CCTTTCCTCTCAGAGAAGAG-3',
human/mouse/rat-BBF2H7-3', 5'-TGGCTGTGATGGTCAGAGTGACAG-3';
human-XBP1-5', 5'-CAGCGCTTGGGGATGGATGC-3',
human-XBP1-3', 5'-CCATGGGGAGATGTTCTGGA-3';
mouse-XBP1-5', 5'-ACACGCTTGGGAATGGACAC-3'、
rat-XBP1-5', 5'-ACACGCTTGGGGATGGATGC-3'、
mouse/rat-XBP1-3', 5'-CCATGGGAAGATGTTCTGGG-3';
human-BiP-5', 5'-GTTTGCTGAGGAAGACAAAAAGCTC-3'、
human-BiP-3', 5'-CACTTCCATAGAGTTTGCTGATAATTG-3';
human-CHOP-5', 5'-GTCCAGCTGGGAGCTGGAAG-3'、
human-CHOP-3', 5'-CTGACTGGAATCTGGAGAG-3';
human-PDI-5', 5'-AAGGGCAAGATCCTGTTCATC-3',
human-PDI-3', 5'-GGCTCATCAGGTGGGGCTTGA-3';
human/mouse/rat- β -actin-5', 5'-TCCTCCCTGGAGAAGAGCTAC-3',
human/mouse/rat- β -actin-3', 5'-TCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'

2-2-4) 免疫蛍光

HeLa 細胞を 60-mm ディッシュにおいて CELLocate Coverslips (Eppendorf, Hamburg, Germany)上で培養し、4% paraformaldehyde で固定、0.3% Triton X-100 で透過処理を行う。マウス抗 BBF2H7 ポリクローナル抗体を 1:50 希釈して 4 で一晩免疫反応を行う。小胞体のマーカーとしては、ウサギ抗 calnexin ポリクローナル抗体を 1:100 希釈して用いた。二次抗体としては、fluorescein-conjugated goat anti-rabbit

IgG 抗体および alexa-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体を用いた。発色させた細胞は、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った (LSM 510; Carl Zeiss, Jena, Germany)。

2-2-5) ルシフェラーゼ アッセイ

24 ウエル上の C6 グリオーマ細胞に対して、0.2 μ g のホタルルシフェラーゼ遺伝子をもつレポータープラスミド、0.02 μ g のウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子をもつレポータープラスミドを遺伝子導入した。同時に、0.1 μ g の BBF2H7-FL、BBF2H7-376、OASIS-FL、OASIS-374 発現プラスミドを遺伝子導入した。46 時間後 200 μ l の Passive Lysis Buffer (Promega)を用いて、細胞を溶解した。小胞体ストレスの負荷は、細胞回収時の 16 時間前に 1 μ M のサブシガルジンを加えた。ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼの活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて測定した。相対活性は、ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼの活性の相対値とした。

2-2-6) 電気泳動移動度シフト解析(electrophoretic mobility shift assay: EMSA)

TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) を用いて、確認すべき遺伝子を in vitro 翻訳した。二本鎖オリゴヌクレオチドは、[-32P]dATP (3000 Ci/mmol; Amersham) および T4 polynucleotide kinase (Promega)を用いて放射性ラベルした。2 μ l の翻訳生成物に、オリゴヌクレオチド(0.1 pmol; 9,000 cpm) と HeLa 核抽出液 (Promega)を加え、binding buffer (4% glycerol, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.05 mg/ml poly (dl-dC)-poly(dl-dC))内で、4 1 時間インキュベートさせた。サンプルは、running buffer (0.5 \times TBE (Tris/Boric acid/EDTA))内で、非変性ポリアクリルアミドゲル上に 200 V 4 100 分電気泳動した。使用したオリゴヌクレオチドの配列は以下のとおり。

5'-CAGCTGGGGGGGCGGAGCAGTGACGTTTATTGCGGAGGGG-3' (CRE-wt),

5'-CAGCTGGGGGGGCGGAGCctgtcgaactcATTGCGGAGGGG-3' (CRE-mt),

5'-CAGGGCCTTCACCAATCGGCGGCCTCCACGACGGGGCTGG-3' (ERSE-wt),

5'-CAGGGCCTTCagtgaCGGCGGCCTgagatACGGGGCTGG-3' (ERSE-mt)

スーパーシフト実験時は、オリゴヌクレオチドと反応させる前に、翻訳生成物と各種抗体を 4 1 時間反応された。

2-2-7) 永久局所脳虚血 (Permanent focal cerebral ischemia)

24-34g のオス成獣 C57BL/6J マウス(Japan SLC)を実験に用いた。2.0% isoflurane を

用いて全身麻酔を行った。麻酔中、体温は、heating pad を用いて 37.0 °C から 37.5 °C を保持した。左中脳動脈(left middle cerebral artery : MCA)の閉塞は、以前記述したとおりに行った(8, 9)。簡潔に記述すると、シリコン樹脂(Xantopren; Bayer Dental, Osaka, Japan)で覆われた 8-0 nylon monofilament (Ethicon, Somerville, NJ)を用いて、左中脳動脈(left middle cerebral artery : MCA)の閉塞を行った。

2-2-8) 組織学および免疫組織化学

MCA 閉塞 24 時間後、マウスを sodium pentobarbital で麻酔し 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer で還流固定を行った。脳を採取し、4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer で 12 時間浸漬固定後、25%ショ糖に 24 時間置換し、OCT (Optimal Cutting Temperature)で凍結包埋した。クリオスタットを用いて 10 μ m の厚さに薄切し、hematoxylin-eosin 染色もしくはマウス抗 BBF2H7 抗体もしくは抗 MAP2(microtubule-associated protein 2)抗体(SIGMA)を用いて、免疫組織化学を行った。

2-2-9) BBF2H7 のノックダウン

BBF2H7 に対するハイブリダイズさせた二本鎖 siRNA は、Dharmacon (Lafayette, CO)より購入した。human-BBF2H7 siRNA の配列は以下のとおりである。

5' - GAGUCUUGUUCAACUGAGAdTdT-3' (sense)

5' - UCUCAGUUGAACAAAGACUCdTdT-3' (antisense)

BLAST 検索により、この配列が BBF2H7 以外には相同性がないことを確認した。lamin A/C siRNA (QIAGEN, Valencia, CA)はコントロールとして使用した。24 ウエルプレートにおいて SK-N-SH 細胞が 60%コンフルエンスの状態、HyperFect transfection reagent (QIAGEN) を用いて、75 ng の siRNA をトランスフェクトした。トランスフェクト処置 36 時間後に、小胞体ストレスを負荷した。

2-3 節 結果

2-3-1) BBF2H7 は、bZIP ドメインを有する新規の小胞体膜貫通型転写因子で OASIS ファミリーに属し、小胞体ストレスに応答して誘導され、切断を受ける。

新規の小胞体ストレス トランスデューサーを見出すために、OASIS と相同性の高い遺伝子をデータベース検索した。その結果、BBF2H7 (BBF2 human homolog on chromosome 7)を見出した。BBF2H7 の名は、ショウジョウバエの Bbf-2 遺伝子に相同性が高く、ヒト7番染色体上に存在する遺伝子であることに由来する(32)。BBF2H7 の全体的な構造は、OASIS や ATF6 と類似している(図 2-2A)。BBF2H7 は、ヘリックス膜貫通領域となることが予測される疎水性領域を保持し、細胞質領域には basic leucine zipper (bZIP)モチーフを有している。BBF2H7 の bZIP モチーフは、OASIS ファミリー分子(OASIS、CREB-H、AlbZIP、Luman)と高い相同性を示す。特に、OASIS が、BBF2H7 と最も高い相同性を示す(アミノ酸一致 51%)(図 2-2B)。CREB-H (BBF2H7 とアミノ酸一致 42%)、AlbZIP (アミノ酸一致 34%)、および Luman (アミノ酸一致 37%)は、OASIS ファミリーの中で、別のサブグループを形成している。

OASIS、CREB-H、AlbZIP、ATF6 は、小胞体ストレスに反応して膜内切断を受けることが報告されている (16, 23, 24, 31, 38, 39)。図 2-2C に、マウス BBF2H7、OASIS、ATF6 の膜貫通部分とその近傍領域のアミノ酸配列を比較した。BBF2H7 の小胞体内腔側にあると推定される部分には、RNLL というアミノ酸配列があり(アミノ酸 427 番目-430 番目、図 2-2C)、これはゴルジ体の膜に局在するセリンプロテアーゼである S1P が切断する配列 RxxL と一致している。このことは、BBF2H7 も OASIS や ATF6 と同様に制御された膜内切断(regulated intramembrane proteolysis : RIP)を受ける可能性を示唆する(23, 38)。

BBF2H7 の発現をタンパク質レベルで検出するために、小胞体ストレス誘発剤であるサブシガルジン(1 μ M)(小胞体 Ca²⁺-ATPase の阻害剤)を負荷したC6グリオーマ細胞を用いて、抗 BBF2H7 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。サブシガルジンがない状態では、BBF2H7 タンパク質は検出されなかった(図 2-2D)。サブシガルジンを負荷すると、85 kDa のバンド(full-length BBF2H7)と 60kDa のバンド(p60BBF2H7)が検出された。p60BBF2H7 タンパク質の発現量は、全長型 BBF2H7(full-length BBF2H7)よりもかなり少ない。これは、切断された BBF2H7 (p60BBF2H7)は、タンパク質としての安定性が低く、容易に分解されるためと考えられる。そこで、切断された BBF2H7 が分解されやすいのかを検討するために、C6グリオ

ーマ細胞に対して、小胞体ストレス誘発剤に加えてプロテアソーム阻害剤である MG132 を負荷した(図 2-2E)。プロテアソーム分解を阻害したことにより、強い 60 kDa バンドが検出された。C6 グリオーマ細胞に対して MG132 のみを加えた場合、弱い全長型 BBF2H7 と強い p60BBF2H7 の発現が検出された。これは、プロテアソーム阻害は、小胞体ストレスを誘発するためと考えられる(4)。C6 グリオーマ細胞に対して、アポトーシス誘発剤であるスタウロスポリン(この薬剤は、小胞体ストレスは誘発しない)を負荷した場合は、BBF2H7 タンパク質は検出できなかった。これらの結果から、BBF2H7 タンパク質は、小胞体ストレスに反応して、発現誘導され切断を受け、そして切断された BBF2H7 は容易に分解されやすいことが明らかとなった。

BBF2H7 の S1P に切断サイトに変異を挿入した発現ベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入し、小胞体ストレス誘発剤の brefeldin A(小胞体からゴルジ体への細胞内輸送の阻害剤)を負荷すると、S1P で切断された BBF2H7 が検出されなくなった(図 2-2F)。このことは、BBF2H7 は他の OASIS ファミリー分子や ATF6 と同様に、小胞体ストレスに反応して S1P によって切断されることを示すものである。

BBF2H7 の細胞内局在を検出するために、免疫蛍光法を用いた。HeLa 細胞に BBF2H7 cDNA を遺伝子導入した細胞では、抗 BBF2H7 抗体によって核周辺が網様に検出された(図 2-3)。この染色パターンは、小胞体膜に局在することが知られている calnexin と共局在した。細胞にサブシガルジンを負荷すると、BBF2H7 の免疫反応性は、核に集積し、calnexin との共局在は劇的に減少した。細胞に、プロテアソーム阻害剤 MG132 を処置した場合も、MG132 は小胞体ストレスを誘発するので(4)、BBF2H7 の免疫反応性は、核に集積し calnexin との共局在は減少した。膜貫通部分と細胞質部分を欠損させた BBF2H7 の発現ベクター(BBF2H7-376)を HeLa 細胞に遺伝子導入すると、免疫反応性は核に集積した。これらの結果より、BBF2H7 は小胞体ストレスに反応して誘導され切断を受け、切断された断片(p60BBF2H7)は核に移動することが明らかとなった。この現象は、他の OASIS ファミリー分子や ATF6 と同様である。これらの結果より、BBF2H7 が新規のストレス トランスデューサーであることが明らかとなった。

2-3-2) BBF2H7 タンパク質は、小胞体ストレスに反応して翻訳レベルで強く発現誘導される。

BBF2H7 が、タンパク質レベルおよび mRNA レベルで、どのような細胞で発現するかを検討するために、C6 グリオーマ細胞、HEK293T 細胞、MEF 細胞に対して、ウエスタンブロットングおよび RT-PCR 解析を行った。検討したすべての細胞において、小胞体ストレスを負荷することにより、全長型および切断された BBF2H7 タンパク質は、

10 倍以上の急激な発現量の増加が見られた(図 2-4A)。一方で、BBF2H7 mRNA は、小胞体ストレスに反応して発現量は増加するものの、その増加は2倍程度であり、タンパク質の増加率に比べてはるかに小さい(図 2-4B)。BBF2H7 のタンパク質と mRNA に見られた発現上昇レベルのこのような乖離は、小胞体ストレス時における activating transcription factor 4 (ATF4)に似ている。ストレス時に翻訳開始因子 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2)がリン酸化されると、通常のタンパク質の翻訳が抑制されるのとは反対に、ATF4 は翻訳が増強されることが知られている。ATF4 は、転写因子として統合されたストレス応答(integrated stress response (ISR))を活性化し、細胞の生存に寄与する分子の転写を促進することが知られている(10, 20)。

BBF2H7 タンパク質の発現上昇が ATF4 と同様に転写後によるものなのか検討するために、MEF 細胞に対して小胞体ストレスと共に翻訳抑制剤 cycloheximide (CHX)または転写抑制剤 Actinomycin D (ActD)を6時間負荷した。期待どおりに、サブシガルジンと転写抑制剤 ActD を加えても BBF2H7 タンパク質は発現上昇が見られた。これは ATF4 と同様のパターンである(図 2-5A)。一方で、過去に報告されたとおり、CHOP タンパク質では発現上昇が見られない(10)。また、サブシガルジンと翻訳抑制剤 CHX を同時に負荷した場合は、BBF2H7、ATF4、CHOP のすべてにおいて、タンパク質の発現上昇は見られなかった。これらの結果は、ATF4 と同様に、BBF2H7 は小胞体ストレス時に翻訳レベルで発現誘導されていることを示すものである。

次に、BBF2H7 タンパク質が、ATF4 と同様に PERK-eIF2 経路によって発現誘導されているのかを検討するために、野生型 MEF 細胞と PERK 欠損 MEF 細胞に対してウエスタンブロットを行った。PERK 欠損 MEF 細胞にサブシガルジンを負荷した場合、ATF4 と CHOP では発現誘導が検出されなかったにもかかわらず、予想に反して、BBF2H7 タンパク質は、野生型 MEF 細胞と同様に PERK 欠損 MEF 細胞でも発現誘導が見られた(図 2-5B)。この結果は、BBF2H7 タンパク質の発現誘導は、主要な小胞体ストレストランスデューサーである PERK とは無関係であることを示唆するものである。

次に、eIF2 のリン酸化が BBF2H7 の小胞体ストレス時の翻訳に必要なのかを検討するために、eIF2 がリン酸化される種々のストレスを C6 グリオーマ細胞に負荷し、BBF2H7 タンパク質の発現をウエスタンブロットで検討した(図 2-5C)。アミノ酸飢餓やラパマイシン処理により、eIF2 はリン酸化されたにもかかわらず、BBF2H7 タンパク質の発現誘導は検出されなかった。これらの結果は、BBF2H7 タンパク質は、小胞体ストレス特異的に急激に発現誘導されるが、それは PERK-eIF2 経路を介したものではないことを示唆する。

BBF2H7 タンパク質の小胞体ストレス時の発現誘導は、翻訳レベルの誘導ではなく、タンパク質の安定性の増加によるものである可能性が残っている。そこで、小胞体ストレスを負荷した時に、BBF2H7 タンパク質の分解する割合が変化するのか検討した。小胞体ストレス誘発剤を 12 時間処理し BBF2H7 タンパク質を発現させた後、翻訳抑制剤を負荷し、経時的に BBF2H7 タンパク質の発現量の減少をウエスタンブロットにより検討した。翻訳抑制剤と同時に小胞体ストレス誘発剤を負荷しても、BBF2H7 タンパク質の発現量の減少スピードに変化はなかった(図 2-5D)。この結果は、OASIS タンパク質と同様に、BBF2H7 タンパク質は小胞体ストレスにおいてもタンパク質の安定性は変化しないこと、小胞体ストレス時における BBF2H7 タンパク質の発現上昇は、翻訳の上昇によるものであって、分解の抑制によるものではないことを示唆するものである。

2-3-3) BBF2H7 は、CRE サイトに直接結合することで、標的遺伝子の転写を促進する能力をもつ。

bZIP ドメインを含む BBF2H7 の N 末端部分は小胞体ストレスに反応して核内に移行するので、OASIS や ATF4 のように cyclic AMP-responsive element (CRE) サイトに直接結合するか、または ATF6 や XBP1 のように ER stress-response element (ERSE) サイトに直接結合することで、BBF2H7 も UPR の標的遺伝子の転写を活性化する可能性がある。BBF2H7 が CRE サイトや ERSE サイトを活性化できるのか検討するために、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に、CRE サイトおよび 3 つの ERSE サイトが直列につながっているヒト BIP プロモータ領域を接続したレポーターコンストラクトに対して、BBF2H7 の効果を検討した。使用したレポーターコンストラクトは、CRE-ERSE レポーターと呼ぶことにする。全長型 BBF2H7(BBF2H7-FL)は、OASIS のケース同様に、小胞体ストレスによって、CRE-ERSE レポーターのルシフェラーゼ遺伝子の発現を活性化した(図 2-6A)。しかしながら、活性化のレベルは OASIS に比べて BBF2H7 の方が、約 30% 程度弱い。

次に、BBF2H7 の CRE-ERSE レポーターに対する効果が CRE サイトと ERSE サイトのどちらに対しての効果なのか検討するために、CRE サイトまたは ERSE サイトに変異を入れた CRE-ERSE レポーターを用いて検討した(図 2-6B)。ERSE サイトに変異を入れた場合、BBF2H7-376 の過剰発現によるレポーターの活性化は約 40%減少した。CRE サイトに変異を入れた場合には、レポーターの活性化は 60%以上減少した。この結果は、BBF2H7 は CRE サイトおよび ERSE サイトの両方を標的にしている可能性があるが、OASIS と同様に、CRE サイトに対してより優先的に転写活性があることを示すものである。

CRE および ERSE サイトに対する作用を確かめるために、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) (電気泳動移動度シフト解析/ゲルシフト法)を、BiP プロモータの CRE および ERSE 配列に対して行った(図 2-6C)。EMSA の結果、BBF2H7 は CRE プロープには結合するが、ERSE プロープには結合しないことが明らかとなった。BBF2H7 の ERSE への結合が検出できなかった理由は不明であるが、ERSE への結合が非常に弱いからか、もしくは ERSE への結合には他の核内分子が必要なのかかもしれない。これらの結果から、BBF2H7 は、プロモーター領域に CRE 配列をもつような小胞体ストレス反応性遺伝子の転写誘導に寄与している可能性が示唆された。

2-3-4) In vivo において、BBF2H7 タンパク質は、マウス永久局所脳虚血モデルにおいて急激に発現誘導される。

成獣マウス組織における BBF2H7 mRNA の発現パターンを確認するために、19 の組織および器官から全 RNA を抽出し、RT-PCR を行った。BBF2H7 mRNA は、多くの器官および組織から検出された(図 2-7A)。その中で、脳に注目した。その理由は、C6 グリオーマ細胞で強い発現が見られたこと(図 2-2D)、さらに、低温損傷を与えた脳の反応性アストロサイトに OASIS が発現していたことから(16)、BBF2H7 も反応性アストロサイトにおいて誘導される可能性が考えられるからである。マウス永久局所脳虚血モデルを用いて in vivo における BBF2H7 の発現を検討することにした。虚血は、小胞体内に未成熟なタンパク質を蓄積させ、小胞体ストレスを誘発するからである(5, 13, 22)。また、脳虚血は低酸素を起こし、低酸素は小胞体ストレスを誘発する(17, 33)。成獣雄マウスの左中大脳動脈(middle cerebral artery: MCA)永久閉塞することで、脳虚血を作り出すことにした。左中大脳動脈を24時間閉塞すると、大脳皮質および線条体に脳梗塞が見られた(図 2-7B、2-7C 左側)。抗 BBF2H7 抗体を用いた免疫組織化学解析を行うと、BBF2H7 タンパク質は、線条体における脳虚血障害の周辺領域(このような周辺領域をペヌンブラ領域という)に発現が見られた(図 2-7E)。大脳皮質のペヌンブラ領域には、BBF2H7 の発現は見られなかった。このような結果となった理由として、線条体は血流の供給が中大脳動脈に制約されているため(12)、大脳皮質に比べて線条体により強い虚血が起こり、その結果 BBF2H7 の発現が線条体のペヌンブラ領域のみに検出できたと考えられる。BBF2H7 の発現は、虚血を起こしていない右側の脳や、通常の状態の脳では検出されなかった。また、BBF2H7 は、神経細胞のマーカーである MAP2 と共局在した(図 2-7F-H)。これは、神経細胞が BBF2H7 を発現していることを示唆する。アストロサイトのマーカーであるグリア線維性酸性タンパク質(glial fibrillary acidic protein : GFAP)との共局在は、検出できなかった。この理由は不明であるが、GFAPを発現する反応性アストロサイトの増殖は、虚血損傷後2日以降といわれている。

よって、BBF2H7 を発現するアストロサイトを検出するのは難しかったのかもしれない。

2-3-5) BBF2H7 は、神経細胞を小胞体ストレスにより誘導される細胞死から保護する。

BBF2H7 が虚血脳障害を受けた神経細胞において発現していることを示した(図 2-7E-H)。そこで、この生理的な意味を解明したいと考えた。神経細胞内における小胞体ストレス時の BBF2H7 の生理的な機能を明らかにするために、ヒト神経芽細胞腫の培養細胞株である SK-N-SH 細胞に対して、GFP と共に空ベクター(Mock)、全長型 BBF2H7(BBF2H7-FL)、活性型の N 末断片 BBF2H7(BBF2H7-376)を遺伝子導入し、サプシガルジンを 24 時間処置した時の細胞の生存率を検討した。期待したとおり、全長型 BBF2H7 もしくは N 末断片 BBF2H7(BBF2H7-376)の過剰発現は、小胞体ストレスにより誘導される細胞死を抑制した(図 2-8A)。どのようなメカニズムで、BBF2H7 の過剰発現が細胞死を抑制したのかを明らかにするために、BiP の発現量を比較検討した。なぜなら、BBF2H7 は、BiP の CRE-ERSE レポーターのルシフェラーゼの発現を活性化したからである(図 2-6A)。しかしながら予想に反して、SK-N-SH 細胞において BBF2H7 を過剰発現させても、BiP mRNA と BiP タンパク質の発現量は変化しなかった(図 2-8B)。BBF2H7 が CRE-ERSE レポーターを活性化するにもかかわらず、BBF2H7 を過剰発現させた SK-N-SH 細胞では内在性 BiP の発現誘導が検出できなかった不一致の理由は不明であるが、内在性 BiP の誘導には他の因子が必要なのかもしれない。他の可能性としては、CRE 配列をプロモーター領域にもち、かつ小胞体ストレスにより誘導される細胞死を抑制する機能をもつ別の遺伝子を、BBF2H7 は転写誘導しているのかもしれない。

次に、神経細胞における内在性 BBF2H7 の生理的な機能を明らかにするために、BBF2H7 を siRNA 法によりノックダウンさせた SK-N-SH 細胞に対して、サプシガルジンを処置し 24 時間後の細胞生存率を検討した。過剰発現とは反対に、BBF2H7 をノックダウンすることにより、細胞の小胞体ストレスに対する感受性は亢進した(図 2-8C)。どのようなメカニズムで BBF2H7 のノックダウンが細胞死を亢進させたのかを明らかにするために、SK-N-SH 細胞において BiP、XBP-1、CHOP、PDI の遺伝子発現をタンパク質または mRNA レベルで比較検討した。これらの遺伝子の発現量に差は検出できなかったが、BBF2H7 を siRNA 処置した細胞では XBP-1 の mRNA のスプライシングが亢進していた(図 2-8D)。この理由は不明であるが、BBF2H7 のノックダウンにより、標的遺伝子の転写が抑制され、それが小胞体ストレスに対する感受性を亢進させ、結果として XBP-1 の mRNA のスプライシングが亢進したものと考えられる。これらの結果を総合すると、BBF2H7 は、ある小胞体ストレス反応性の遺伝子の転写を調節することに

より、小胞体ストレスから誘導される細胞死から、神経細胞を保護しているものと考えられる。

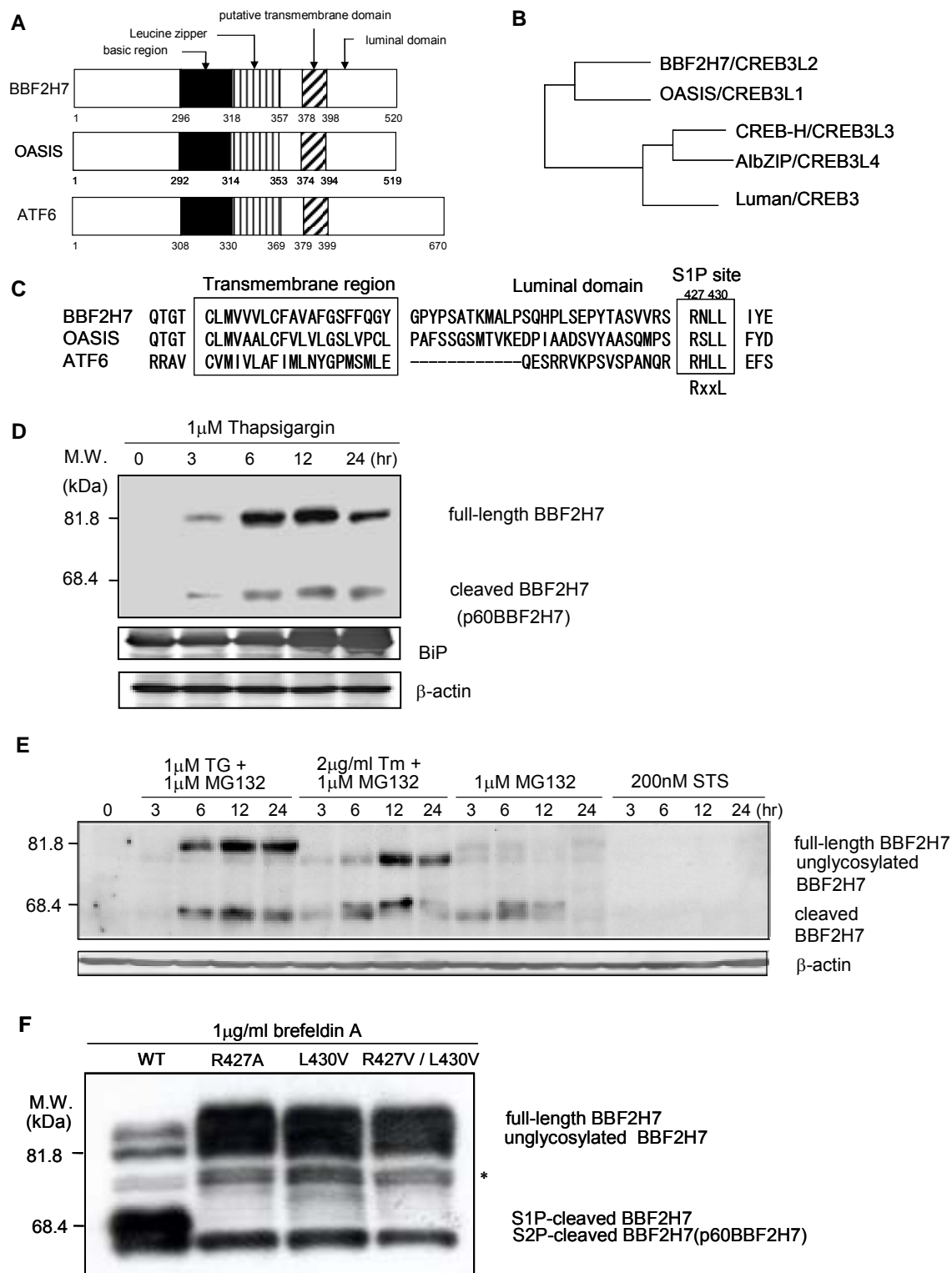


図 2-2 小胞体ストレスに応答して、BBF2H7 タンパク質は誘導され膜内切断を受ける。

(A) 予測されるヒト BBF2H7、OASIS、ATF6 の構造。

(B) BBF2H7 の系統樹。BBF2H7 遺伝子は、OASIS、CREB-H、AlbiZIP、Luman と相関性がある。タンパク質間の関係は、アミノ酸の一致によって推測した。

(C) マウス BBF2H7、OASIS、ATF6 の膜貫通領域におけるアミノ酸配列の比較。右のボックスは、S1P サイト (RxxL) のコンセンサス配列を示す。左のボックスは、膜貫通部位の位置を示す。

(D) C 6 グリオーマ細胞における内在性 BBF2H7 の発現。細胞を 1 μM サブシガルジン (thapsigargin : TG) を示した時間負荷した後、細胞を回収し、抗 BBF2H7 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。85kDa バンド (full-length BBF2H7) と弱い 60 kDa バンド (p60BBF2H7) が小胞体ストレスを負荷した細胞で検出された。抗 KDEL 抗体は、BiP を認識している。全タンパク質を等量にそろえて、泳動した。

(E) 小胞体ストレス、プロテアソーム阻害剤、ミトコンドリアからの細胞死刺激のリン酸化酵素阻害剤を負荷した時の C 6 グリオーマ細胞における内在性 BBF2H7 の発現。細胞に対して、1 μM TG、2 μg/ml tunicamycin (Tm) (N-glycosylation inhibitor)、1 μM MG132、200 nM Staurosporine (STS) の組み合わせを、示した時間負荷した後、細胞を回収し、抗 BBF2H7 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。分解を阻害したことにより、60 kDa バンド (p60BBF2H7) が強く検出された。BBF2H7 の糖鎖付加を阻害すると、全長型 BBF2H7 は速く泳動した。

(F) BBF2H7 の S1P 認識サイトに変異を入れると、切断パターンが変化する。HEK293T 細胞に対して、Flag-tagged 野生型 BBF2H7 (WT) または S1P 変異型 BBF2H7 (R427A、L430V、R427A/L430V) を遺伝子導入した。24 時間後、細胞に 1 μg/ml brefeldin A を 1 時間処置した後、細胞を回収し、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。S1P サイトに変異を入れると、S1P 切断バンドが消えることに注意。しかしながら、S2P 切断 BBF2H7 (=p60BBF2H7) は S1P 切断とは無関係に検出できた。

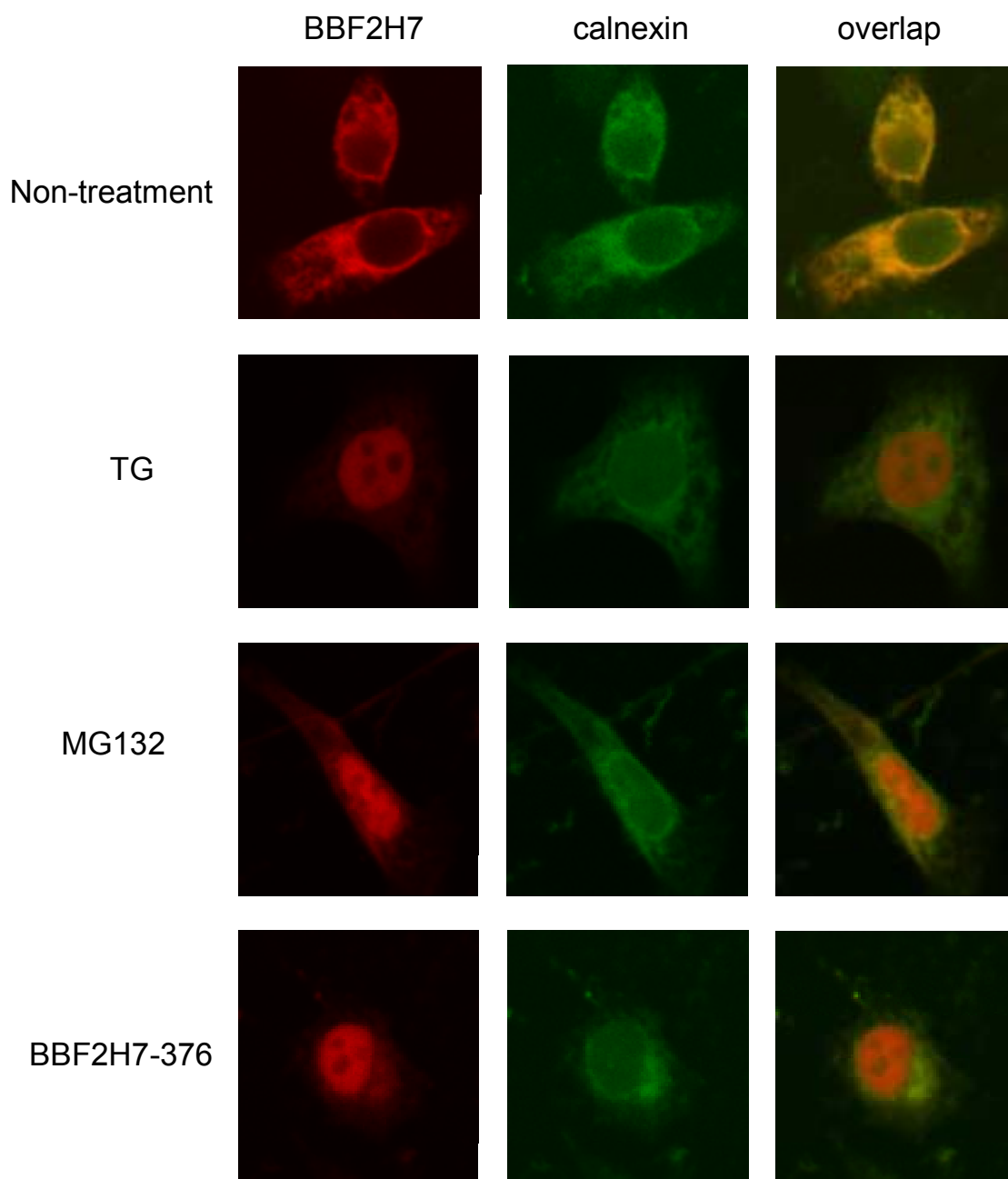


図 2-3 BBF2H7 の細胞内局在

HeLa 細胞に BBF2H7 を遺伝子導入し、1 μ M thapsigargin (TG) または 10 μ M MG132 を 6 時間負荷し、抗 BBF2H7 抗体および抗 calnexin 抗体を用いて免疫染色を行った。

注意：BBF2H7 の免疫反応性は、通常の状態では calnexin とオーバーラップする。しかし、小胞体ストレスやプロテアソーム阻害により、BBF2H7 の染色は核に移行する。下のパネルでは、膜貫通部分および内腔側を欠損させた活性型 BBF2H7(BBF2H7-376)は、通常の状態では核に局在する。

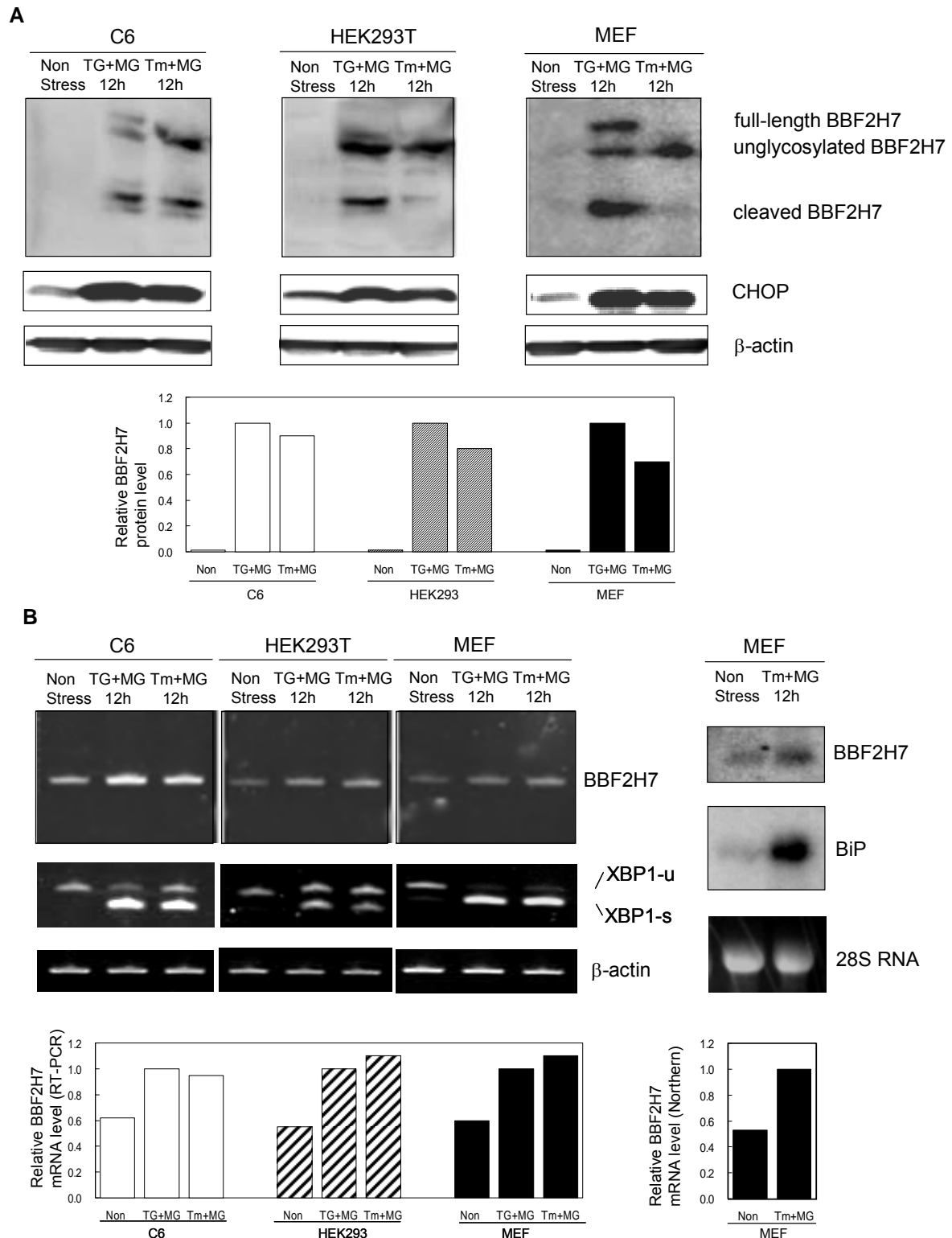


図 2-4 BBF2H7 は、さまざまな細胞で小胞体ストレスで発現誘導される。

(A) C6 グリオーマ細胞、HEK293T 細胞、MEF 細胞に対して、小胞体ストレスおよびプロテアソーム阻害剤を負荷した時の内在性 BBF2H7 タンパク質の発現。細胞に、300nM thapsigargin (TG)、1 μg/ml tunicamycin (Tm)、3 μM MG132 を 12 時間負荷し、細胞を回収して、抗 BBF2H7 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。下段：BBF2H7 タンパク質発現の定量解析

(B) C6 グリオーマ細胞、HEK293T 細胞、MEF 細胞に対して、小胞体ストレスおよびプロテアソーム阻害剤を負荷した時の内在性 BBF2H7 mRNA の弱い発現誘導。(左側) 細胞を 300 nM TG、1 μg/ml Tm、3 μM MG132 で 12 時間処置し、RT-PCR 解析を行った。下段：BBF2H7 mRNA の定量解析。(右側) MEF 細胞を 1 μg/ml Tm および 3 μM MG132 を 12 時間負荷した後、ノザンブロット解析を行った。下段：BBF2H7 mRNA の定量解析。

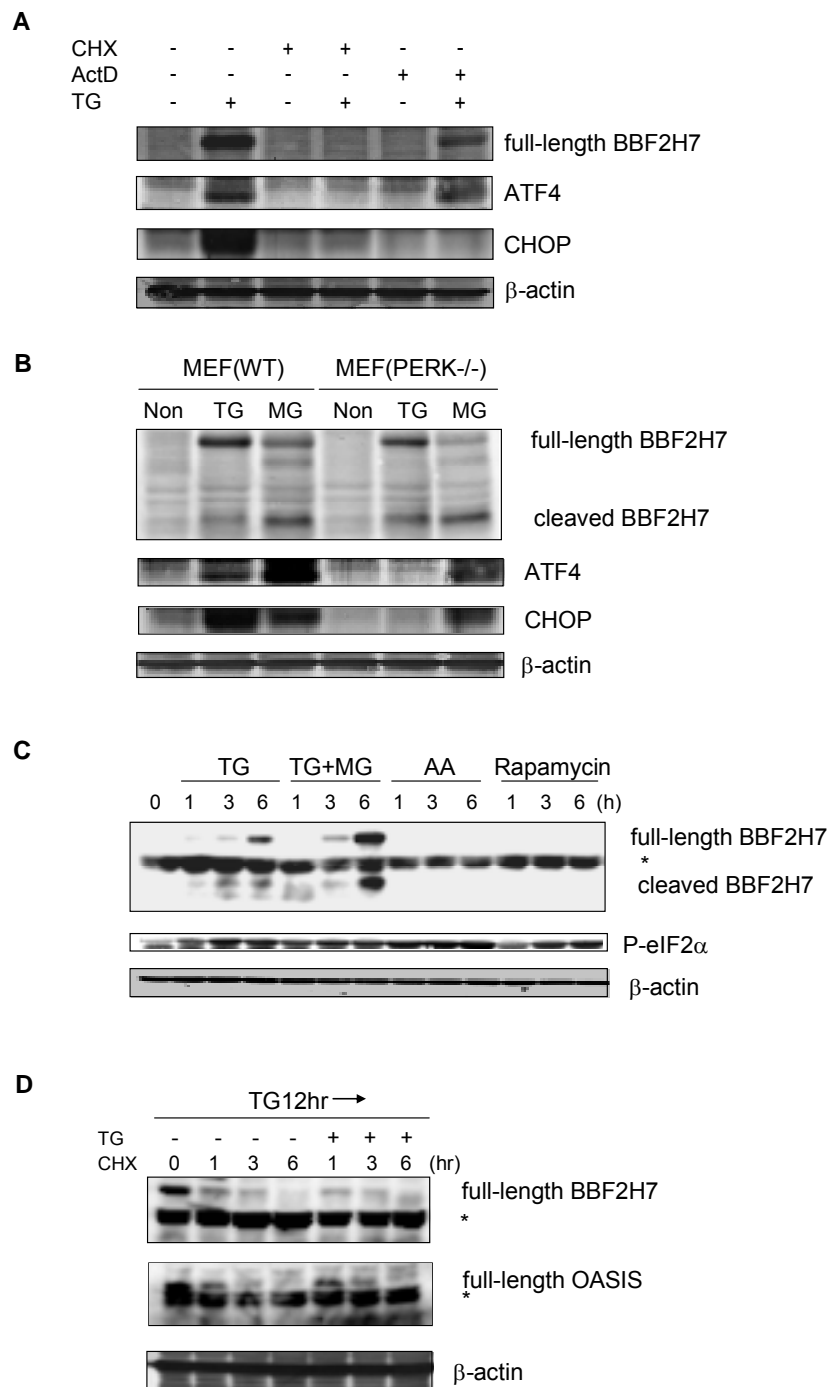


図 2-5 BBF2H7 は小胞体ストレス時に翻訳レベルで顕著に誘導される。しかしそれは PERK-eIF2 α 経路によらない。

(A) 転写誘導は、BBF2H7 タンパク質の増加に必須なステップではない。MEF 細胞に、翻訳抑制剤として 1 μ g/ml cycloheximide (CHX) または転写抑制剤として 5 μ g/ml Actinomycin D (ActD) を、小胞体ストレス 1 μ M TG と共に 6 時間負荷した。BBF2H7、ATF4、CHOP および β -actin の発現レベルをウエスタンブロッティングで検討した。注意：BBF2H7 および ATF4 タンパク質は、TG および ActD の負荷で発現誘導された。しかし CHOP は誘導されなかった。

(B) 野生型 MEF 細胞および PERK 欠損 MEF 細胞において、1 μ M thapsigargin (TG) または 10 μ M MG132 (MG) を 6 時間またはストレスを加えなかった (Non)。BBF2H7、ATF4、CHOP および β -actin の発現レベルをウエスタンブロッティングで検討した。注意：PERK 欠損細胞において、BBF2H7 は TG 処置で発現誘導が見られた。しかし ATF4 や CHOP では発現誘導が見られなかった。

(C) C 6 グリオーマ細胞に対して、1 μ M TG、1 μ M TG + 10 μ M MG132 (TG+MG)、アミノ酸飢餓 amino acid starvation (AA)、10 μ M Rapamycin を示す時間負荷した。BBF2H7、リン酸化 eIF2、 β -actin の発現レベルをウエスタンブロッティングで検討した。* は、非特異的なバンドを意味する。

(D) C 6 グリオーマ細胞に対して、12 時間 1 μ M TG を負荷し BBF2H7 タンパク質を合成した後、翻訳抑制剤 1 μ g/ml cycloheximide (CHX) を示した時間負荷した。翻訳抑制剤と同時に 1 μ M TG を負荷する場合と負荷しない場合を比較検討した。BBF2H7、OASIS、 β -actin の発現レベルをウエスタンブロッティングで検討した。* は、非特異的なバンドを意味する。注意：BBF2H7 の分解の割合は、OASIS と同様に、小胞体ストレスに依存しない。

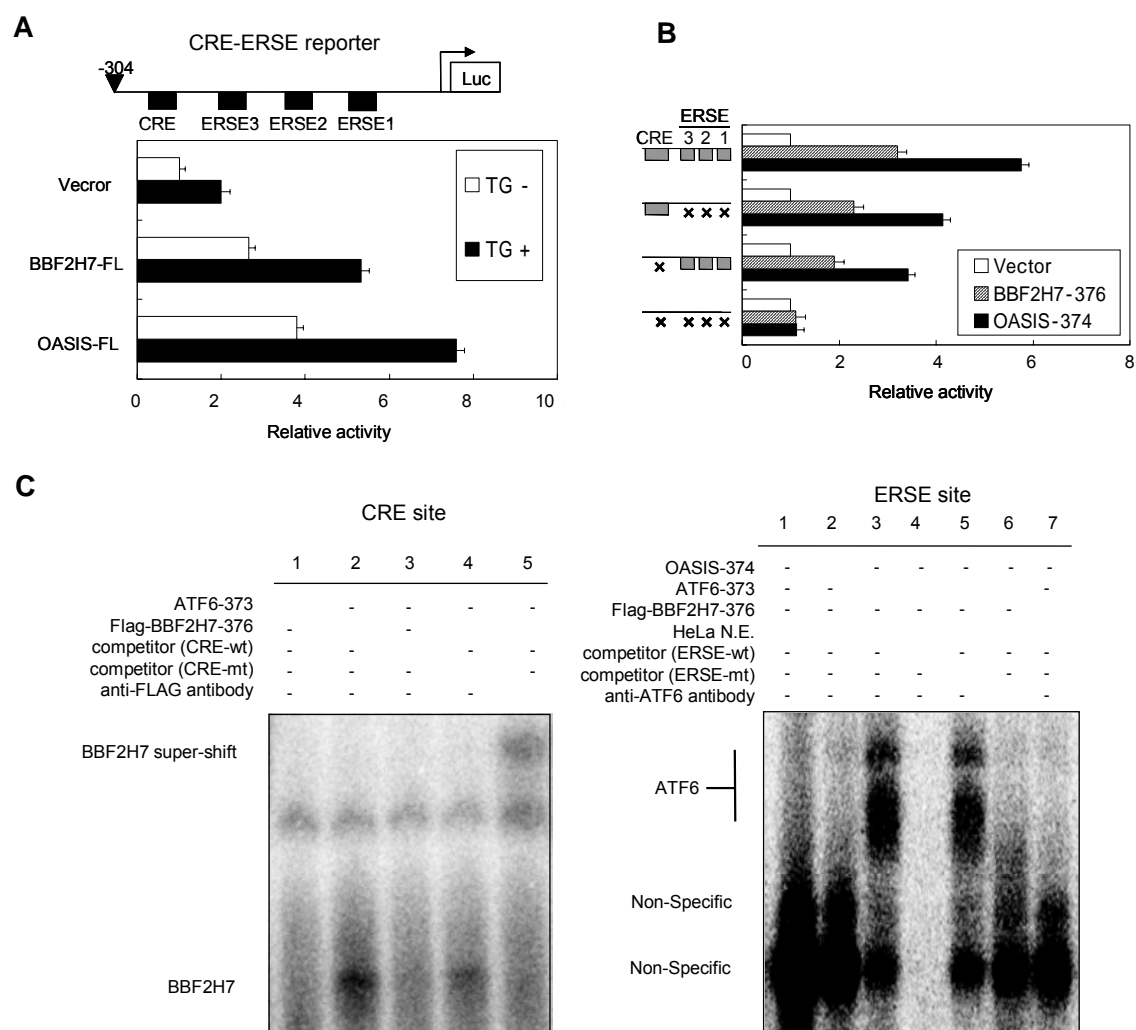


図 2-6 BBF2H7 の CRE サイトおよび ERSE サイトに対する効果

(A) レポーターアッセイ。C6 グリオーマ細胞に、CRE-RESE レポータープラスミドと同時に、左側に示したコンストラクト (Vector、BBF2H7-FL、OASIS-FL) を遺伝子導入した。相対的ルシフェラーゼ活性は、16 時間の小胞体ストレスを負荷する場合と(■)、負荷しない場合(□)を測定した。Error bar は標準偏差を示す。n=4。上段に、レポーターコンストラクトの模式図を示す。

(B) レポーターアッセイ。CRE-ERSE レポーターの CRE サイトおよび ERSE サイトに変異を入れたコンストラクトを用いた(15)。左側に野生型または変異型のコンストラクトを示した。棒グラフは、C6 グリオーマ細胞に示したコンストラクトを遺伝子導入した後のレポーターアッセイの相対活性を示す。相対活性は、空ベクター(Vector)を遺伝子導入した時を 1 とした相対値を示した。

(C) CRE および ERSE サイトに対する電気泳動移動度シフト解析 (electrophoretic mobility shift assay : EMSA)

(左側) CRE サイトに対する BBF2H7 の直接結合。BiP プロモーターの CRE シーケンスを ^{32}P ラベルし、in vitro 翻訳した Flag-BBF2H7-376 とインキュベートした。注意：ラベルなしの CRE シーケンスを 100 倍加えると結合は消失し(レーン 3)、抗 FLAG 抗体と共にインキュベートするとスーパーシフトが検出された(レーン 5)。

(右側) ERSE サイトに対する BBF2H7 の直接結合。BiP プロモーターの ERSE シーケンスを ^{32}P ラベルし、in vitro 翻訳した Flag-BBF2H7-376 とインキュベートした。注意：ATF6 は、HeLa 細胞の核抽出液を加えると ERSE に結合する(レーン 3)。しかし、OASIS(レーン 2)も BBF2H7(レーン 7)も ERSE には結合しない。

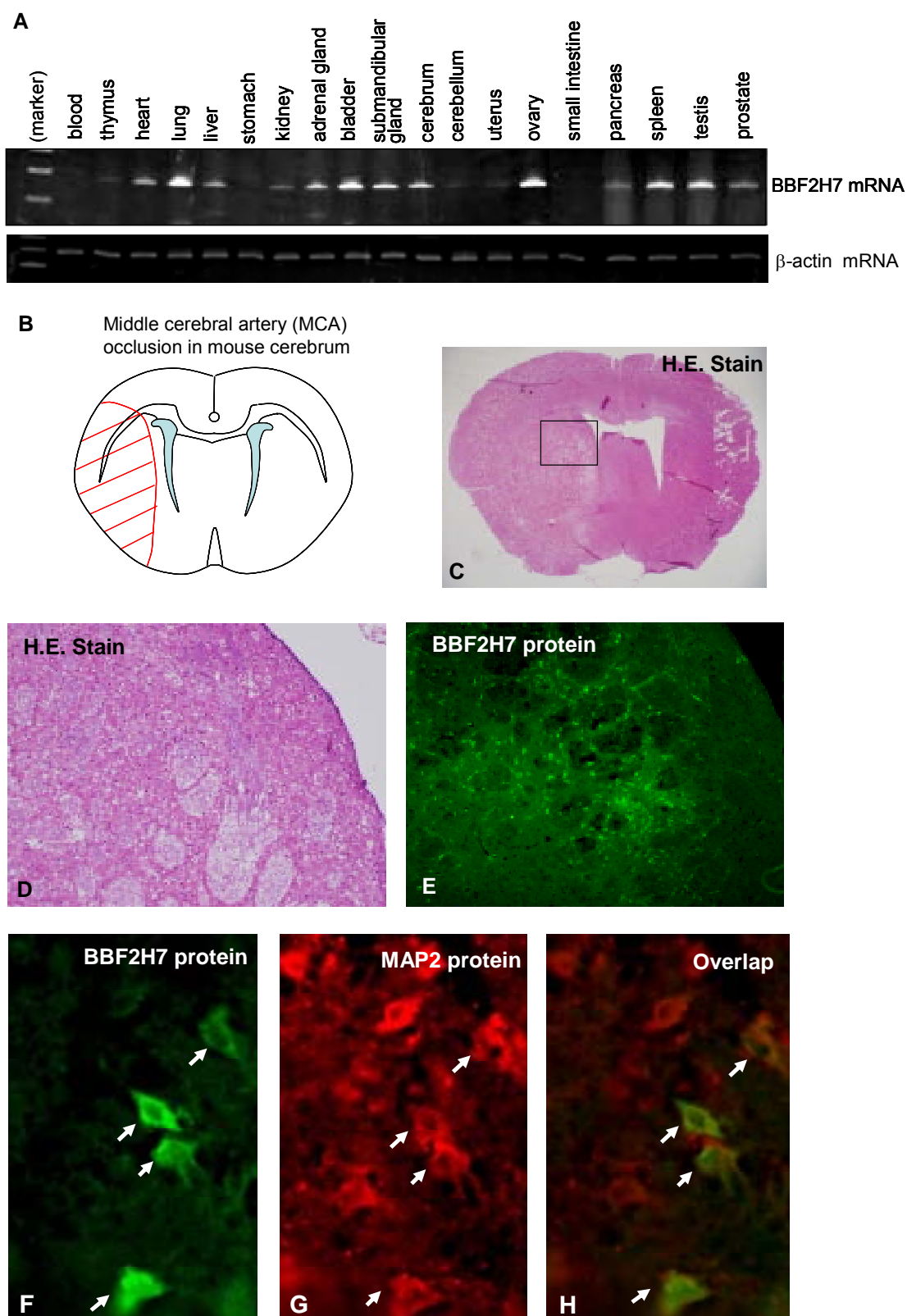


図 2-7 BBF2 遺伝子の発現解析

- (A) 成獣マウスから RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った。
- (B) マウス大脳における永久中大脳動脈(MCA)閉塞の模式図。赤の斜線は、虚血障害領域を示す。
- (C) 永久 MCA 閉塞 24 時間後の脳冠状切片に対するヘマトキシリン-エオジン染色。注意：図(B)で示すとおり、脳の虚血領域（左側）のみ障害が見られる。
- (D) 図(C)における四角枠の強拡大
- (E) 永久 MCA 閉塞 24 時間後の脳冠状切片に対する、BBF2H7 の免疫組織化学。注意：BBF2H7 のポジティブ細胞は、線条体の脳梗塞部位の周辺領域のみ検出された。
- (F-H) 図(E)の強拡大における BBF2H7 と MAP2 の免疫組織化学

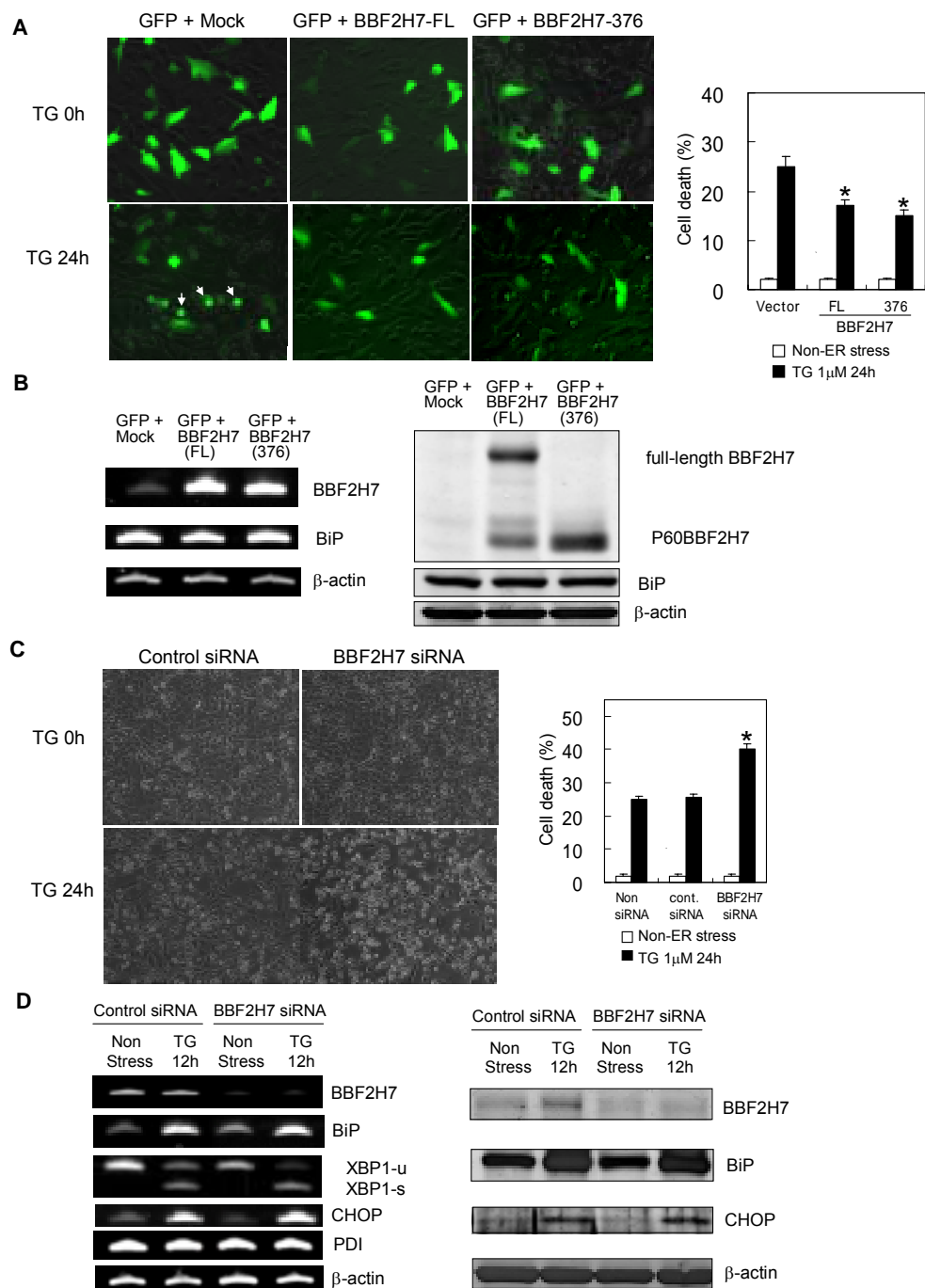


図 2-8 BBF2H7 の発現レベルは、小胞体ストレスにより誘導される神経細胞死を調節する。

(A) BBF2H7 の過剰発現は、小胞体ストレスにより誘導される神経死から細胞を保護する。
 (左側) SK-N-SH 細胞に空ベクター(Mock)、全長型 BBF2H7(BBF2H7-FL)、N 末断片 BBF2H7(BBF2H7-376)を pEGFP ベクターと共に遺伝子導入した。遺伝子導入 36 時間後、細胞に対して 1 μM サブシガルジン (TG) を示した時間負荷した。形態変化は、GFP の蛍光検出により観察した。縮むような細胞死の形 (矢印) を示す形態変化は、BBF2H7 を遺伝子導入した細胞では減少した。
 (右側) サブシガルジン処理 24 時間後の細胞死の定量解析。細胞死は、形態変化 (円形もしくは縮んだ細胞を細胞死としてカウント) により判定した。Error bar は標準偏差を示す。n=4。*p<0.05 (Student's t-test)。
 (B) SK-N-SH 細胞に空ベクター(Mock)、全長型 BBF2H7(BBF2H7-FL)、N 末断片 BBF2H7(BBF2H7-376)を pEGFP ベクターと共に遺伝子導入した。遺伝子導入 36 時間後、
 (左側) 全 RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った。
 (右側) 抽出した全タンパク質に対して、ウエスタンブロッティングを行った。注意: BBF2H7 を遺伝子導入しても、BiP の発現量は変化しない。
 (C) BBF2H7 の siRNA 処理は、小胞体ストレスにより誘導される細胞死を亢進する。
 (左側) 代表的な明視野像。SK-N-SH 細胞に対して siRNA を 36 時間処置し、示した時間 1 μM サブシガルジン (TG) を負荷した。
 (右側) サブシガルジン処置 24 時間後の細胞死の定量解析。細胞死は、形態変化 (円形もしくは縮んだ細胞を細胞死としてカウント) により判定した。Error bar は標準偏差を示す。n=4。*p<0.05 (Student's t-test)。
 (D) SK-N-SH 細胞に対して siRNA を 36 時間処置し、示した時間 1 μM サブシガルジン (TG) を負荷した。
 (左側) 示した遺伝子の RT-PCR 解析
 (右側) 示した遺伝子のウエスタンブロッティング解析。注意: サブシガルジン (TG) を 12 時間負荷した時、コントロール siRNA 処理細胞に対して、BBF2H7 細胞を処置した細胞では、XBP-1 mRNA のスプライシングが亢進した(XBP1-s)。

2-4 節 考察

本研究によって、BBF2H7 が、小胞体ストレス トランスデューサーであることを明らかにした。BBF2H7 が、小胞体ストレス トランスデューサーであるとしたのは、以下の実験による。第一に、BBF2H7 は小胞体膜貫通タンパク質であって、小胞体ストレスにตอบสนองして膜内切断を受ける。BBF2H7 は、小胞体内腔側において S1P のコンセンサス配列 RxxL を有しており、OASIS や ATF6 と同様のメカニズムで切断されることが示唆された。第二に、切断された bZIP ドメインを含む BBF2H7 の N 末端部分は、核に移行する。第三に、BBF2H7 タンパク質は、小胞体ストレスにตอบสนองして翻訳レベルで発現誘導される。最後に、BBF2H7 の N 末端部分は、CRE サイトに直接結合し小胞体ストレスに対する抵抗性のある標的遺伝子の転写を促進する能力をもつことを明らかにした(図 2-9)。

本研究において、BBF2H7 は小胞体ストレスにตอบสนองして翻訳レベルで発現誘導が見られること、しかしそれは、PERK-eIF2 経路ではないことを明らかにした(図 2-5)。一般的に、小胞体ストレスが発生した場合、活性化された PERK は翻訳開始因子 eIF2 をリン酸化し、翻訳を抑制する。小胞体内腔におけるタンパク質のフォールディング能力を超えた状況において、この急激で可逆的な mRNA の翻訳制御によってタンパク合成が抑制される。逆説的に、eIF2 のリン酸化は、5'-非翻訳領域 (untranslated region : UTR) に上流翻訳開始枠(upstream open-reading frames: uORFs) を有する mRNA に対して、選択的翻訳を増加させる。一番よく解析されている例は、ATF4 mRNA のリン酸化 eIF2 依存的な翻訳である(10, 20)。ヒト、マウス、ラットの BBF2H7 の 5'-UTR には多数の AUG 開始コドンが存在しそれらは uORF になりうる候補であるが、図 2-5 で示したとおり、BBF2H7 の翻訳は PERK-eIF2 経路は無関係である。BBF2H7 翻訳の上昇のメカニズムは明らかにできなかったが、一つの可能性として internal ribosome entry site (IRES)がある。IRES は、キャップ非依存的翻訳開始を促進する配列で、BiP も IRES 活性を保持することが報告されている(21, 35)。また、小胞体ストレス時に翻訳レベルで誘導される human inhibitor of apoptosis protein 2 (HIAP2) も IRES 配列によることが報告されている(37)。IRES を含む 5'-UTR は、UTR の長さ、AUG の数、%GC 含有量で、共通の傾向がある(2)。興味深いことに、BBF2H7 の 5'-UTR は、これらの条件に適合している。近い将来、BBF2H7 の 5'-UTR が、IRES 活性を有する否か解析したいと思っている。小胞体ストレス時の BBF2H7 タンパク質の翻訳レベルでの誘導が、どのようなメカニズムでなされているのかは、さらなる研究が必要である。

報告された小胞体ストレス トランスデューサーの中で、BBF2H7 は翻訳レベルで発現誘導される最初の分子である。一般的に、IRE1、PERK、ATF6、OASIS のような小胞体ストレス トランスデューサーは、通常の状態においてタンパク質レベルで発現している。それゆえ、小胞体ストレスを即座に感知し、信号を小胞体から細胞質や核に伝達することができる。しかしながら、BBF2H7 タンパク質は通常の状態では発現していないため、初期の小胞体ストレスを感知することはできない。小胞体ストレスに応答して BBF2H7 タンパク質が翻訳された後になってはじめて、BBF2H7 は小胞体ストレス トランスデューサーとして機能することができる。このユニークな制御は、BBF2H7 は UPR 経路の後期においてのみ機能することを示唆する。

局所虚血の脳障害において、BBF2H7 タンパク質は、ペヌンブラ領域の神経細胞においてのみ急激な発現誘導が見られた(図 2-7E-H)。しかしながら、*in vitro* の実験では、アストロサイト由来の C6 グリオーマ細胞において BBF2H7 は強い発現が見られた。この BBF2H7 の発現パターンは、oxygen-regulated protein 150 kDa (ORP150) に類似している。ORP150 は、培養アストロサイトに対して、低酸素ストレスを負荷した時に発現誘導される分子として同定された(18)。ORP150 は、小胞体分子シャペロンであり、脳虚血後において神経細胞で優先的に発現誘導される(34)。以前の報告と本研究の結果から、脳障害の初期においては、反応性アストロサイトはまだ増殖しないが、神経細胞は生理的な危機的状况から細胞を保護するために BBF2H7 と ORP150 を発現誘導することを示している。対照的に、小胞体ストレス トランスデューサーである OASIS は、脳障害の神経細胞では発現は検出できず、反応性アストロサイト特異的である(16)。これら小胞体ストレス トランスデューサーの細胞種特異的な発現制御のメカニズムを明らかにすることは、脳障害や神経変性疾患の発症メカニズムの解析に役立つであろう。

本研究において、BBF2H7 の標的遺伝子を明らかにすることは出来なかった。明らかになったことは、標的遺伝子はプロモーター領域に CRE 配列を持ち(図 2-6)、小胞体ストレスに対する感受性を抑制する機能を有することである(図 2-8A、2-8C)。標的遺伝子として一番可能性が高いのは、CRE 配列を持ち小胞体ストレスを抑制する機能をもつ BiP であるが、SK-N-SH 細胞において BBF2H7 を過剰発現させた場合(図 2-8B)もしくは BBF2H7 をロックダウンさせた場合(図 2-8D)、BiP の発現量に差は見られなかった。このような状況を説明するものとして、以下の三つが考えられる。第一に、BBF2H7 の標的遺伝子は BiP であるが、BBF2H7 の過剰発現で内在性の BiP を誘導するには、他の因子が必要なのかもしれない。第二に、BBF2H7 の標的遺伝子は BiP であるが、神経細胞において BiP の誘導には XBP1、ATF6、ATF4 のような他の多くの UPR 転写因子が担っているため、BBF2H7 をロックダウンした細胞において BiP の発現

の低下が確認できなかったのかもしれない。BBF2H7 と他の転写因子の欠損をいろいろ組み合わせることが、BiP 誘導における役割を明らかにするためには必要であろう。第三に、BBF2H7 の標的は BiP ではないが、標的遺伝子のプロモーター領域には CRE 配列があり、小胞体ストレスにより誘導される細胞死を抑制する機能をもつ。BBF2H7 の標的遺伝子を明白にするためには、マイクロアレイによる解析や BBF2H7 欠損マウスの解析など更なる解析が必要である。

OASIS ファミリー分子の中では、CREB-H ノックダウン胎仔と AibZIP 欠損マウスが既に報告されている。E14.5 における CREB-H ノックダウン胎仔の病理組織学的な解析では、形態的な異常は検出できなかったが、CREB-H は、S1P および S2P で切断され、N 末端は核に移行し serum amyloid P-component (SAP) および C-reactive protein (CRP) 遺伝子の転写を促進する(39)。AibZIP 欠損マウスは、予想される割合で生まれ、健康的で、通常と同じ寿命を示す。AibZIP 欠損マウスの精細管には、すべてのステージの細胞が存在しているが、減数分裂/減数分裂後の生殖細胞ではアポトーシスが増加する(1)。最近になって、AibZIP 欠損マウスの精巣において、精巣上体における精子の核が、異常に弛緩していることが報告された(25)。OASIS ファミリー分子の欠損マウスの表現形は、IRE1 や PERK といった主要な小胞体ストレス トランスデューサーの欠損マウスの表現形に比べて、マイルドな異常を示す(11, 36)。これら最近の報告から考えられることは、OASIS ファミリー分子は、主要な小胞体ストレス トランスデューサー経路の補助的な役割を担っているのかもしれない。

結論として、本研究によって、新規の OASIS ファミリー分子である BBF2H7 は、新規の小胞体ストレス トランスデューサーであり、小胞体ストレスに応答して翻訳レベルで顕著に誘導されることが明らかとなった。BBF2H7 タンパク質は、虚血後の障害を受けた神経細胞において発現誘導される。さらに、BBF2H7 は、小胞体ストレスにより誘導される細胞死から神経細胞を保護している。BBF2H7 の更なる解析により、小胞体ストレス関連疾患の治療法開発への貢献が期待される。

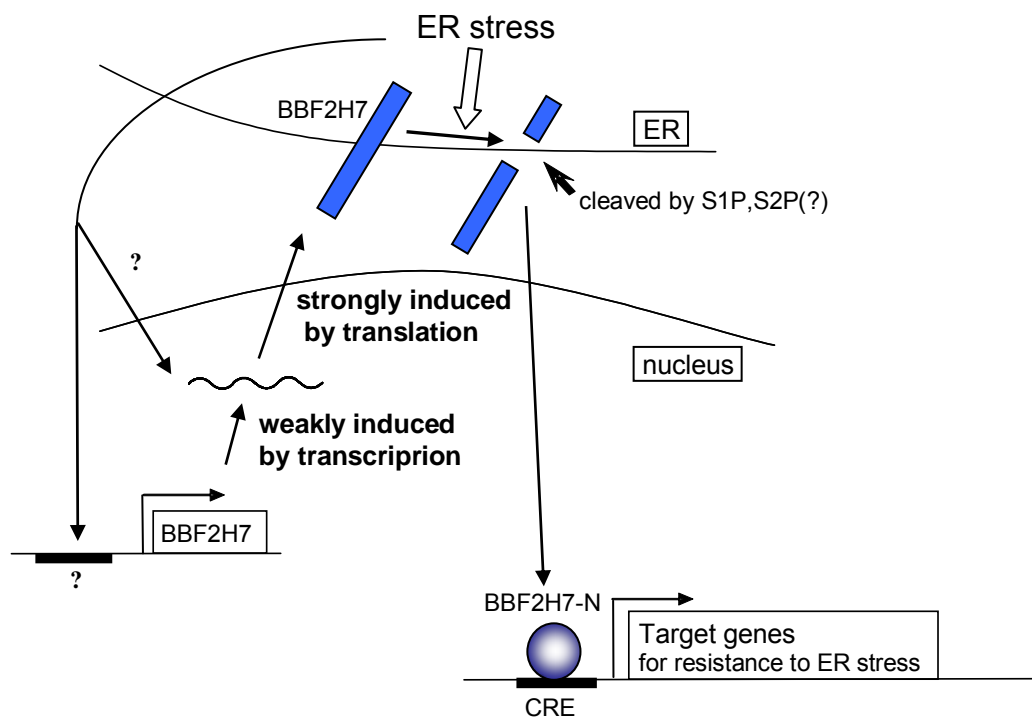


図 2-9 UPR における BBF2H7 の予測される役割

BBF2H7 は、小胞体ストレス時に転写レベルで弱く誘導され、翻訳レベルで強く誘導される。翻訳された BBF2H7 は、小胞体ストレスにตอบสนองして S1P により膜内切断を受ける。さらに S2P により切断されるものと考えられる。切断された細胞質側の N 末端部分は核に移行し、CRE サイトに直接結合することで、小胞体ストレス抵抗性遺伝子の転写を活性化する。

2-5 章 略語

使用した略語は、以下のとおりである。

bZIP, basic leucine zipper; ER, endoplasmic reticulum; UPR, unfolded protein response; OASIS, old astrocyte specifically induced substance; BBF-2, box B-binding factor-2; BBF2H7, BBF2 human homolog on chromosome 7; CREB, cyclic AMP-response element-binding protein; ATF, activating transcription factor; ATF6, activating transcription factor 6; IRE1, inositol requiring 1; PERK, PKR-like endoplasmic reticulum kinase; AibZIP, androgen-induced bZIP; CRE, cyclic AMP-responsive element; ERSE, endoplasmic reticulum stress response element; eIF2, eukaryotic initiation factor-2; FUS, fusion; EDEM, endoplasmic reticulum degradation-enhancing -mannosidase-like protein; RIP, regulated intramembrane proteolysis; S1P, Site-1 protease; S2P, Site-2 protease; BiP, immunoglobulin heavy chain-binding protein; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MAP2, microtubule-associated protein 2; uORFs, upstream open-reading frames; IRES, internal ribosome entry site; ERAD, ER-associated degradation.

2-6 節 参考文献

1. **Adham, I. M., T. J. Eck, K. Mierau, N. Muller, M. A. Sallam, I. Paprotta, S. Schubert, S. Hoyer-Fender, and W. Engel.** 2005. Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* **25**:7657–7664.
2. **Baird S.D., M. Turcotte, R. G. Korneluk, and M. Holcik.** 2006. Searching for IRES. *RNA.* **12**:1755–1785.
3. **Bertolotti, A., X. Wang, I. Novoa, R. Jungreis, K. Schlessinger, J.H. Cho, A.B. West, and D. Ron.** 2001 Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest.* **107**:585-93.
4. **Bush, K. T., A. L. Goldberg, and S. K. Nigam.** 1997. Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J. Biol. Chem.* **272**:9086–9092.
5. **DeGracia, D. J., and H. L. Montie.** 2004. Cerebral ischemia and the unfolded protein response. *J. Neurochem.* **91**:1–8.
6. **DenBoer, L. M., P. W. Hardy-Smith, M. R. Hogan, G. P. Cockram, T. E. Audas, and R. Lu.** 2005. Luman is capable of binding and activating transcription from the unfolded protein response element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**:113–119.
7. **Erickson, A. H. and G. Blobel.** 1979. Early events in the biosynthesis of the lysosomal enzyme Cathepsin D. *J. Biol. Chem.* **254**:11771–11774.
8. **Hara, H., R. M. Friedlander, V. Gagliardini, C. Ayata, K. Fink, Z. Huang, M. Shimizu-Sasamata, J. Yuan, and M. A. Moskowitz.** 1997. Inhibition of

- interleukin 1 β converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:2007–2012.
9. **Hara, H., P. L. Huang, N. Panahian, M. C. Fishman, and M. A. Moskowitz.** 1996. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* **16**:605–611.
 10. **Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, and D. Ron.** 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell.* **6**:1099–1108.
 11. **Harding, H. P., H. Zeng, Y. Zhang, R. Jungries, P. Chung, H. Plesken, D. D. Sabatini, and D. Ron.** 2001. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell* **7**:1153–1163.
 12. **Hossmann, K. A.** 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* **36**:557–565.
 13. **Hu, B. R., S. Janelidze, M. D. Ginsberg, R. Busto, M. Perez-Pinzon, T. J. Sick, B. K. Siesjo, and C. L. Liu.** 2001. Protein aggregation after focal brain ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood. Flow Metab.* **21**:865–875.
 14. **Imaizumi, K., M. Tsuda, Y. Imai, A. Wanaka, T. Takagi, and M. Tohyama.** 1997. Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. *J. Biol. Chem.* **272**:18842–18848.
 15. **Kaufman, R. J.** 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest.* **110**:1389–1398.
 16. **Kondo, S., T. Murakami, K. Tatsumi, M. Ogata, S. Kanemoto, K. Otori, K.**

- Iseki, A. Wanaka, and K. Imaizumi.** 2005. OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signaling in astrocytes. *Nat. Cell Biol.* **7**:186–194.
17. **Koumenis C., C. Naczki, M. Koritzinsky, S. Rastani, A. Diehl, N. Sonenberg, A. Koromilas, and B. G. Wouters.** 2002. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . *Mol. Cell. Biol.* **22**:7405–7416.
 18. **Kuwabara, K, M. Matsumoto, J. Ikeda, O. Hori, S. Ogawa, Y. Maeda, K. Kitagawa, N. Imuta, T. Kinoshita, D. M. Stern, H. Yanagi, and T. Kamada.** 1996. Purification and characterization of a novel stress protein, the 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain. *J. Biol. Chem.* **271**:5025–5032.
 19. **Liang G., T. E. Audas, Y. Li, G. P. Cockram, J. D. Dean, A. C. Martyn, K. Kokame, and R. Lu.** 2006. Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element. *Mol. Cell. Biol.* **26**:7999–8010.
 20. **Lu, P. D., H. P. Harding, and D. Ron.** 2004. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell. Biol.* **167**:27–33.
 21. **Macejak, D. G., and P. Sarnow.** 1991. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* **353**:90–94.
 22. **Mouw, G., J. L. Zechel, J. Gamboa, W. D. Lust, W. R. Selman, and R. A. Ratcheson.** 2003. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *Neuroreport*. **14**:183–186.
 23. **Murakami, T., S. Kondo, M. Ogata, S. Kanemoto, A. Saito, A. Wanaka, and K.**

- Imaizumi.** 2006. Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. *J. Neurochem.* **96**:1090–1100.
24. **Nagamori, I., N. Yabuta, T. Fujii, H. Tanaka, K. Yomogida, Y. Nishimune, and H. Nojima.** 2005. Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway. *Genes Cells.* **10**:575–594.
25. **Nagamori I., K. Yomogida, M. Ikawa, M. Okabe, N. Yabuta, and H. Nojima.** 2006. The testes-specific bZip type transcription factor Tisp40 plays a role in ER stress responses and chromatin packaging during spermiogenesis. *Genes Cells.* **11**:1161–1171.
26. **Newman, J. R., and A. E. Keating.** 2003. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science* **300**:2097–2101.
27. **Omori, Y., J. Imai, M. Watanabe, T. Komatsu, Y. Suzuki, K. Kataoka, S. Watanabe, A. Tanigami, and S. Sugano.** 2001. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res.* **29**:2154–2162.
28. **Raggo, C., N. Rapin, J. Stirling, P. Gobeil, E. Smith-Windsor, P. O'Hare, and V. Misra.** 2002. Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis. *Mol. Cell Biol.* **22**:5639–5649.
29. **Ron, D.** 2002. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* **110**:1383–1388.
30. **Sood, R., A.C. Porter, K. Ma, L.A. Quilliam, and R.C. Wek.** 2000. Pancreatic eukaryotic initiation factor-2alpha kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in

- response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J.* **346** Pt 2:281–293.
31. **Stirling J. and P. O'Hare.** 2006. CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol. Biol Cell.* **17**:413–426.
 32. **Storlazzi, C. T., F. Mertens, A. Nascimento, M. Isaksson, J. Wejde, O. Brosjo, N. Mandahl, and I. Panagopoulos.** 2003. Fusion of the FUS and BBF2H7 genes in low grade fibromyxoid sarcoma. *Hum. Mol. Genet.* **12**:2349–2358.
 33. **Tajiri S., S. Oyadomari, S. Yan, M. Morioka, T. Gotoh, J. I. Hamada, Y. Ushio, and M. Mori.** 2004. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ.* **11**:403–415.
 34. **Tamatani, M., T. Matsuyama, A. Yamaguchi, N. Mitsuda, Y. Tsukamoto, M. Taniguchi, Y. H. Che, K. Ozawa, O. Hori, H. Nishimura, A. Yamashita, M. Okabe, H. Yanagi, D. M. Stern, S. Ogawa, and M. Tohyama.** 2001. ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death. *Nat. Med.* **7**:317–323.
 35. **Thoma, C., G. Bergamini, B. Galy, P. Hundsdoerfer, and M. W. Hentze.** 2004. Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP. *Mol. Cell* **15**:925–935.
 36. **Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding, and D. Ron.** 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**:664–666.
 37. **Warnakulasuriyarachchi, D., S. Cerquozzi, H. H. Cheung, and M. Holcik.** 2004. Translational induction of the inhibitor of apoptosis protein HIAP2 during endoplasmic reticulum stress attenuates cell death and is mediated via an inducible

- internal ribosome entry site element. *J. Biol. Chem.* **279**:17148–17157.
38. **Ye, J., R. B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U. P. Dave, R. Prywes, M. S. Brown, and J. L. Goldstein.** 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell.* **6**:1355–1364.
39. **Zhang, K., X. Shen, J. Wu, K. Sakaki, T. Saunders, D. T. Rutkowski, S. H. Back, and R. J. Kaufman.** 2006. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* **124**:587–599.
40. **Zhang, P., B. McGrath, S. Li, A. Frank, F. Zambito, J. Reinert, M. Gannon, K. Ma, K. McNaughton, and D.R. Cavener.** 2002 The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol Cell Biol.* **22**:3864–3874.

おわりに

～OASIS/BBF2H7 論文の意義と小胞体ストレス研究の今後について～

OASIS 論文および BBF2H7 論文の意義

OASIS の報告により、「小胞体ストレス応答の細胞種特異性」という新しい概念を提示できた。これにより、小胞体ストレス研究の新たな可能性や方向性を示すことができたと考えている。

さらに、OASIS、BBF2H7 が中枢神経系においてそれぞれアストロサイト、ニューロンで機能することを明らかにしたことで、世界に先駆けて「脳組織における小胞体ストレス応答の細胞種特異性」という概念の提言につながった。この概念は、神経変性疾患の発症メカニズムの解明の突破口になりうる可能性があり、学術的に意義のある独創的な研究が出来たと考えている。OASIS や BBF2H7 のノックアウトマウスと、変異型アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 発現マウスや変異型 α -シヌクレイン発現マウスと掛け合わせることで、アルツハイマー病やパーキンソン病における小胞体ストレスの関与の更なる解明が期待できよう。

小胞体ストレス研究の今後について

医学/生物学の研究は、今後、ノックアウトマウスの表現型の解析が主流となるであろう。今後というよりも、2007 年現在の時点で既にそのような状況にあるといえる。それでは、ノックアウトマウスの *in vivo* 解析において、小胞体ストレス研究はどのように進めていくべきであろうか？ 私なりの考えを簡潔に述べたい。

“小胞体ストレス応答はすべての細胞種で同一ではない”という前提のもとに、解析を進めることが必要であろう。小胞体ストレス関連分子は多数あり、それらは細胞種によって発現レベルは異なるだろうし、機能未知な遺伝子が今後新たに小胞体ストレス関連分子として同定されてくる可能性もある。また、小胞体ストレスマーカーとしてよく用いられる XBP-1 mRNA スプライシングが、すべての細胞において生理的なレベルの小胞体ストレスでも同様におこるのかはわからない。よって、分子マーカーとは異なった、別のアプローチからの解析も *in vivo* 解析では必要であろう。

“小胞体ストレスは、小胞体を電子顕微鏡で観察することで検討する”というのが直接的であり、かつ確実であると私は思う。実際に、電子顕微鏡を用いることで、PERK ノックアウトマウスや XBP1 ノックアウトマウスでは、それぞれ膵臓 細胞、膵臓腺房細胞において小胞体の膨張が観察されている。*in vivo* 解析においては、分子マーカーだけではなく、全体像が見える形態学的な解析が今後さらに重要になってくるであろう。

あとがき

雑感 ～本研究をふりかえって～

OASIS、BBF2H7 という分子を解析する中で私が感じたことを、最後にすこし書いてみたい。

私は、BBF2H7 の標的遺伝子を明らかにすることができなかった。なぜ出来なかったのか。それは、2007 年現在の顕微鏡では、転写因子が DNA のどの配列に結合しているかを明らかにすることができないからである。細胞の分子生物学(第4版)によれば、「クロマチン免疫沈降法により、生細胞の中で遺伝子調節タンパクの結合する DNA 部位を特定する」とあるが、クロマチン免疫沈降法は間接的な方法にすぎない。この方法では、結合部位の候補を特定することは可能かもしれないが、それはあくまで必要条件とはなりうるが、十分条件とはなりえない。

100 年前の話をしたい。スペインのカハール(Cajal)はニューロン説を、イタリアのゴルジ(Golgi)は網状説を立てて、相反するこれらの説をお互い頑としてゆずらなかつた。1906 年のノーベル医学生理学賞は、この両者に与えられた。当時、どちらが正しいのかを証明する方法がなかった。そして、1950 年頃までニューロン説と網状説が長く論争の的になっていた。しかし、電子顕微鏡の登場により、カハールのニューロン説が正しいことが明らかとなった。電子顕微鏡という十分条件を満たす実験方法を人類が手にすることにより、初めて確定的なことが言えたのである。

今の時代、分子生物学が万能のような風潮がある。しかし、分子生物学でも出来ること出来ないことの明確な境界があるはずだが、そこが曖昧になっていると思う。細かな間接データをいくら集めても、それは必要条件の組み合わせでしかなく、決定的な十分条件とはなりえない。現在の電子顕微鏡の解像度では、残念ながら転写因子が DNA のどの配列に結合しているかを明らかにすることはできない。よって、転写因子の標的遺伝子について確定的なことは言えないのである。非常に有名で、毎週のように何らかの報告がされている分子に癌抑制遺伝子 p53 があるが、結局のところ、転写因子 p53 の標的遺伝子について確定的なことはわかっていない。p53 が DNA のどの配列に結合しているかの写真が取れるような時代になって初めて、p53 の機能が確定的になるのである。

19 世紀前半に、ライヘルトという解剖学者が、「哺乳類のキヌタ骨、ツチ骨は、爬虫

類の顎関節に由来する」ことを明らかにした。おもしろいことに彼は、あらゆる生物が細胞から出来ているという細胞説も、ダーウィンの進化論も信じていなかった。今でいうなら DNA を絶対に認めない生物学者、というような感じだろう。しかし、彼はさまざまな動物の胎児を解剖し、自分の観察力を信じる中で、上記の発見にたどりついた。

カハールやライヘルトを例にとったが、私も出来ることなら後世に残るような仕事をしたいと思っている。そして、そのためには、流行にとられることなく、本物の観察力や洞察力を身につけたいと思っている。現代の実験手法の限界を知りつつ、しかしその中でできる最高の観察力および洞察力を身につけることを目標としたい。

謝辞

奈良先端科学技術大学院大学での3年間、素晴らしい環境と機会を与えて頂きました奈良先端科学技術大学院大学の塩坂貞夫教授に深く感謝致します。

直接の研究を6年間にわたり、丁寧に、熱心に、そして暖かくご指導頂き、研究の楽しさ、感動など多くのことを教えて頂きました宮崎大学医学部・解剖学講座・分子細胞生物学分野の今泉和則教授に心より感謝申し上げます。

実験を始め多くのことを教えてくださった宮崎大学医学部・解剖学講座・分子細胞生物学分野の吉永一也准教授を始め、講座メンバーの皆様に篤く御礼申し上げます。

共同研究者として、実験を助けて頂きました、岐阜薬科大学・薬効解析学研究室の原英彰教授に感謝申し上げます。

最後に、父と母に心から感謝申し上げます。