

所属 (主指導教員)	細胞構造学講座 (塩坂 貞夫)		
氏名	村上 智彦	提出	平成 19 年 12 月 19 日
題目	膜貫通型転写因子 OASIS の膜内切断機構の解析及び 神経細胞の樹状突起における小胞体ストレス応答の解析		

要旨

[研究背景と目的]

小胞体は分泌タンパク質や膜貫通型タンパク質を合成する重要な細胞小器官である。細胞内外からの様々な刺激やストレスにより小胞体内でのタンパク質の折り畳みや修飾が障害され、小胞体内腔に折り畳み不全の異常タンパク質がたまる状態を小胞体ストレスという。細胞にとって小胞体ストレスは細胞死につながる重大な問題であり、直ちにストレスから回避するための防御システムを活性化させる。これがいわゆる小胞体ストレス応答あるいはunfolded protein response (UPR)といわれる応答機構である。小胞体ストレス応答において中心的役割を担っている分子としてIRE1・PERK・ATF6の3つの小胞体ストレスセンサーが報告されている。これらのセンサーは小胞体にて内腔のストレスを感知し、その情報を核・細胞質に伝え、UPRのターゲット遺伝子の転写を活性化させることで細胞死を回避させる。この小胞体ストレスは神経変性疾患の発症に密接に関与することが報告されている。例えばアルツハイマー病では変異プレセニリンが小胞体ストレス応答を障害すること、若年性パーキンソン病の原因遺伝子Parkinの機能障害によるPael受容体の分解障害から小胞体ストレスを引き起こすことなどである。しかしながら、神経系における小胞体ストレス応答の詳細はよくわかっていない。そこで神経系細胞における小胞体ストレス応答機構に着目し、二つのテーマについて実験を行った。一つ目として、アストロサイトの小胞体ストレス応答に着目した。アストロサイトではその特異的な小胞体ストレストランスデューサーであるOASISが存在する。膜貫通型転写因子OASISは小胞体ストレス依存的に切断され、細胞質側の断片が転写因子として核に移行、小胞体分子シャペロンの一つであるGRP78/BiPの転写を活性化するが、その詳細な切断機構は解明されていなかった。そこでOASISの切断機構について解析を行った。二つ目のテーマとして、神経細胞の樹状突起内の小胞体における小胞体ストレス応答に着目した。神経の過剰興奮はシナプスを介してターゲット側神経細胞に興奮性毒性を引き起こす。シナプス近傍には小胞体が存在し刺激に応じてタンパク質のソーティングや分泌が行われており、神経の過剰興奮の際にシナプス局所で小胞体ストレスが生じている可能性があることから、樹状突起内の小胞体ストレス応答について解析した。

[結果と考察]

OASISの切断機構を解析するため、膜内切断を受ける膜貫通型転写因子であるATF6, SREBP-2の膜貫通ドメインとその周辺の領域の配列をOASISと比較した。その結果、OASISはSite-1 protease (S1P)によって切断されるコンセンサス配列RxxLに一致する配列を、膜貫通ドメインのC末端側にSite-2 protease (S2P)によって認識されるプロリン残基を含んでいた。このことは、OASISはATF6同様小胞体ストレス依存的にゴルジ体に存在するS1PとS2Pによって切断される可能性を示唆する。S1PあるいはS2Pによる切断に必要な配列に変異を入れた変異OASISを細胞に導入したところ、変異OASISは小胞体ストレス下でゴルジ体に移行するが、それぞれSite-1あるいはSite-2の切断を受けなかった。また細胞に野生型OASISとS1PあるいはS2Pの発現ベクターの共導入実験を行ったところ、OASISの切断が増加し、不活性型S1P, S2Pでは切断が増加しなかった。これらの結果は、ATF6と同様のメカニズムでS1PとS2PがOASISを活性化させる膜内切断に必要であることを示唆する。更に、OASISがその内腔ドメインにゴルジ体移行シグナルを含むかを実験するために、各種OASISのC末端欠失変異体を作製し、小胞体ストレス時のゴルジ体移行の実験を行った。全てのC末端欠失変異OASISは野生型同様に切断され、ゴルジ体移行の阻害も認められなかった。これらの結果は、OASISはATF6の場合と異なりその内腔ドメインにゴルジ体移行シグナルの重要な配列を持たないことが示す。以上のことより、OASISは小胞体ストレス下、ATF6とは異なるメカニズムでゴルジ体に移行し、S1P, S2Pによって二段階に切断されることが明らかとなった。

二つ目として、樹状突起の小胞体にて小胞体ストレスやUPRが起こるかを調べるために、海馬神経細胞の初代培養を使って研究を行った。小胞体ストレス応答系の下流(標的)分子であるGRP78/BiP, リン酸化eIF2 α (eIF2 α -P)が小胞体ストレス下で樹状突起でも応答するかを確認するため免疫染色を行った。その結果、小胞体ストレス負荷により、樹状突起内においてGRP78/BiP, eIF2 α -Pの免疫反応性が上昇することが確認された。次に樹状突起上で小胞体ストレス応答が機能するのであれば、小胞体ストレスセンサー(ATF6, IRE1, PERK)が存在するはずである。これらのセンサーのGFP融合発現ベクターを作製し、神経細胞に導入後、共焦点顕微鏡にて観察を行った。その結果、各センサーが神経細胞の細胞体の小胞体だけではなく樹状突起内の小胞体にも存在することがわかった。更にこれらのセンサーは樹状突起上で活性化するのかIRE1に着目して調べた。神経細胞にIRE1を導入し小胞体ストレスを加えて抗IRE1リン酸化抗体による免疫染色を行い、蛍光顕微鏡により観察した。その結果ストレスなしではIRE1のリン酸化はほとんど検出されなかったが、小胞体ストレス負荷後、リン酸化が細胞体周辺だけではなく樹状突起上でも検出された。次にリン酸化IRE1はXBP1 mRNAをスプライシングすることより、導入したXBP1 mRNAが樹状突起に存在しうるかをin situハイブリダイゼーションにより調べた。その結果、XBP1 mRNAが近位樹状突起に存在することがわかった。これらの結果より、樹状突起の小胞体は小胞体ストレスに反応でき、タンパク質の品質管理の能力を保持することが示唆された。

博士論文番号：0581020

膜貫通型転写因子 OASIS の膜内切断機構の解析及び
神経細胞の樹状突起における小胞体ストレス応答の解析

村上 智彦
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座
(塩坂 貞夫 教授)

平成19年12月19日提出

研究背景

生命最小の単位である細胞は遺伝子情報を基にタンパク質を合成及び分解し様々な生命活動を行う。遺伝子である DNA 情報は mRNA に置き換えられ、その mRNA の情報がリボソームによってアミノ酸 (ポリペプチド) に変換される。ポリペプチドがタンパク質としての機能を発揮するためには糖鎖付加などの修飾や分子シャペロンによる折り畳みの補助を受けることが重要である。正常に合成されたタンパク質は各固有の機能を発揮し、その後適宜分解されることでタンパク質としての一生を全うする。このようなタンパク質の合成から分解の繰り返しが生命活動とも言えよう。

真核生物において小胞体は分泌タンパク質や膜貫通型タンパク質を合成する重要な細胞小器官である。小胞体は粗面小胞体と滑面小胞体に分けられ、特に粗面小胞体は小胞体膜上にリボソームが結合し盛んに新規タンパク質合成を行っている。小胞体内腔には糖鎖付加などを行う様々な修飾酵素やタンパク質の折り畳みを補助する小胞体分子シャペロンが存在し、タンパク質の折り畳みを促進する。小胞体で正常に折り畳まれたタンパク質はゴルジ体に運ばれ、その後細胞外に分泌されるかあるいは膜タンパク質として細胞膜に輸送される。小胞体ではこのようにタンパク質合成が行われるが全ての新規合成タンパク質が正常に折り畳まれるわけではない。折り畳みの異常な不良タンパク質もある割合で合成される。このような折り畳み不全の異常タンパク質は小胞体からゴルジ体には輸送されず、小胞体内腔に留まる。これは小胞体においてタンパク質の品質管理が行われており異常タンパク質を選択的に認識しゴルジ体への輸送を阻止しているためである (Ellgaard et al., 2003)。

小胞体は細胞内外からの様々な刺激やストレスを受ける。例えば、栄養飢餓、タンパク質の糖鎖修飾阻害、変異タンパク質の発現、カルシウムホメオスタシスの攪乱、低酸素状態、ウイルス感染などである。このようなストレスは小胞体内でのタンパク質の折り畳みや修飾を障害し、内腔に折り畳み不全の異常タンパク質を蓄積させる。小胞体内腔に折り畳み不全の異常タンパク質が蓄積することを小胞体ストレスという。細胞にとって小胞体ストレスは細胞死につながる要因であり、直ちにストレスから回避するための防御システムを活性化させる。これがいわゆる小胞体ストレス応答あるいは **unfolded protein response (UPR)** といわれる応答機構である (図 1) (Kaufman, 2002; Ron, 2002; Mori, 2000)。哺乳類の細胞において小胞体ストレス応答の中心的役割を担っている分子として **inositol-requiring 1 (IRE1)**, **PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)**, **activating transcription factor 6 (ATF6)** の 3 つの小胞体ストレスセンサーが報告されている。これらのセンサータンパク質は小胞体にて内腔のストレスを感知し、

その情報を核や細胞質に伝え、大きく下記の 3 つの経路を持って小胞体ストレスを回避させようとする。①余分なタンパク質の合成を抑制するための翻訳抑制、②小胞体のタンパク質折り畳み能力の強化を行うための小胞体分子シャペロンの誘導、③小胞体内腔の異常タンパク質を細胞質に逆輸送してユビキチン-プロテアソーム系で分解するための小胞体関連分解 (endoplasmic reticulum (ER) associated degradation, ERAD) である。しかし、過剰あるいは長時間小胞体ストレスが負荷されると、細胞は小胞体ストレスを回避できずアポトーシス様の細胞死を起こす。小胞体ストレスの際に細胞死を誘導する分子あるいは経路としてカスパーゼ 12、IRE1 - Apoptosis Signal regulating Kinase (ASK1) - c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路、CHOP/GADD153 が知られている。カスパーゼ 12 は正常時には小胞体に局在するが、小胞体ストレスが負荷されると切断され活性化し、アポトーシスシグナルを促進する。カスパーゼ 12 はマウスで発見されたが、ヒトではカスパーゼ 12 は発現していない。最近、ヒトではカスパーゼ 4 がマウスのカスパーゼ 12 と同じ働きをしている可能性が示されている (Hitomi et al., 2004)。IRE1-ASK1-JNK 経路は小胞体ストレスが過剰に負荷された時、JNK が活性化し、細胞死シグナルを促進する。JNK の活性化には IRE1-TRAF2-ASK1 の結合が小胞体ストレス依存的に生じることが重要である (Nishitoh et al., 2002)。CHOP/GADD153 は ATF6 及び PERK-eIF2 α の経路より誘導される転写因子である。CHOP ノックアウト細胞では小胞体ストレスによる細胞死が抑制されることより、小胞体ストレスによって引き起こされる細胞死に必須の因子であると考えられている (Zinszner et al., 1998)。

近年、この小胞体ストレスがいくつかの神経変性疾患の発症に関与することが指摘されている (Lindholm et al., 2006)。神経変性疾患とは脳神経疾患の中で中枢神経のある特定の神経細胞群が徐々に死滅していく疾患をいう。神経変性疾患の多くは有効な治療法が未だ確立されていない。神経変性疾患にみられる神経細胞死の原因解明は疾患の治療法を確立するために極めて重要である。現在までに神経細胞死が起こるメカニズムについて様々な報告がされている。複数の神経変性疾患に共通の病変である細胞内外の異常タンパク質の蓄積が疾患発症や神経細胞死に重要であるとされる。例えばアルツハイマー病のアミロイド β タンパク質、パーキンソン病の α -シヌクレイン、ポリグルタミン病のポリグルタミンなどである。異常タンパク質の蓄積は遺伝子の変異やタンパク質の合成と分解のバランスが崩れることで起き、その蓄積の過程で神経細胞に様々な障害を与えるとされる。この神経細胞の障害に小胞体ストレスが密接に関連することが報告されている (図 2)。

・アルツハイマー病

アルツハイマー病は認知機能の低下を伴う進行性の神経変性疾患である。アルツハイマー病患者脳では、老人斑の構成成分であるアミロイド β タンパク質 (A β) が細胞内外に過剰に蓄積する。

A β を神経系細胞に添加すると細胞死を起こす。この細胞死にはカスパーゼ 12 ノックアウトマウスの解析によりカスパーゼ 12 が関与することが報告されている。カスパーゼ 12 は小胞体ストレス依存的に活性化することより、A β による細胞内カルシウムイオン代謝異常が原因で小胞体ストレスを起こし細胞死を誘導している可能性がある (Guo et al., 1997; Nakagawa et al., 2000)。アルツハイマー病患者脳においてはマウスのカスパーゼ 12 と同様の働きをするとされるカスパーゼ 4 が増加している (Hitomi et al., 2004)。

家族性アルツハイマー病の主要な原因遺伝子としてプレセニリン (presenilin, PS) 1, 2 が知られている。変異PSはA β の産生に影響を及ぼすだけではなく、それ自体が細胞に様々な障害を与えることが報告されている (Guo et al., 1997)。細胞に変異PS1 を発現させると、カルシウムホメオスタシスの異常や小胞体ストレスに対する脆弱性を示す。変異PS1 はIRE1 に結合し、IRE1 の活性化を阻害する。その結果、IRE1 からのシグナルが減弱し、小胞体シャペロンであるGRP78/BiP の転写が低下する。つまり変異PS1 は小胞体ストレスから回避するストレス応答を障害するのである (Katayama et al., 1999; Imaizumi et al., 2001)。また、孤発性アルツハイマー病患者脳内ではPS2 のエクソン5を欠損した変異PS2 (PS2V) が高頻度に発現しており、変異PS1 と同様に小胞体ストレス応答を障害することが示されている (Sato et al., 2001)。これらに加え、実際のアルツハイマー病患者脳においてGRP78/BiPやPERKの活性化レベルが上昇していることも報告されている (Hoozemans et al., 2005)。

最近の研究では、チオール-ジスルフィド交換反応を触媒し、ジスルフィド結合の形成と転位反応を促進するジスルフィドイソメラーゼ (PDI) のS-ニトロシル化がアルツハイマー病やパーキンソン病などを引き起こす一因になる可能性が示されている (Uehara et al., 2006)。S-ニトロシル化は、タンパク質機能に重要なシステインのチオール基に一酸化窒素 (NO) を転移させる反応である。NO が誘導する PDI の S-ニトロシル化は PDI の酵素活性を阻害し、小胞体ストレスを引き起こす。実際、孤発性パーキンソン病およびアルツハイマー病患者脳では PDI の S-ニトロシル化が検出されている。

・パーキンソン病

パーキンソン病は黒質緻密部のドーパミンニューロンが選択的に変性脱落し、運動障害を生じる神経変性疾患である。パーキンソン病では変性神経細胞内に α -シヌクレインを主成分とするレビー小体と呼ばれる封入体が認められる。遺伝

性パーキンソン病原因遺伝子としては α -シヌクレイン, Parkin, UCH-L1 などが知られている。

Parkin の変異による疾患は常染色体性劣性遺伝であり、Parkin の機能低下が疾患発症に関わると考えられる。Parkin はユビキチン-プロテアソーム系の E3 リガーゼに属する。Parkin の遺伝子変異によってその E3 リガーゼとしての機能が低下あるいは消失し、分解されるべき基質タンパク質が蓄積し、細胞機能低下や細胞死に至ることが考えられる。Parkin の基質とされるタンパク質としては、Pael 受容体, Synphilin-1, CDCrel など挙げられる。その中でも Pael 受容体は折り畳み不全になりやすく、折り畳み不全の Pael 受容体は本来 Parkin によってユビキチン化され、ERAD 系にて分解される。Parkin を欠損する患者脳では Pael 受容体の分解阻害が起き、折り畳み不全の Pael 受容体が小胞体に蓄積、小胞体ストレスにつながる。実際、Pael 受容体を過剰発現させた培養細胞では小胞体ストレスに対して脆弱であり、この脆弱性は野生型 Parkin の過剰発現により抑制されたが、変異 Parkin の過剰発現では抑制されない (Imai et al., 2001)。

・ポリグルタミン病

ハンチントン病, 球脊髄性筋萎縮症, 脊髄小脳変性症などの神経変性疾患ではそれぞれの原因遺伝子内で CAG 配列が異常に伸張し、グルタミン鎖をコードするようになる。その結果、ポリグルタミンを含む部分が細胞質あるいは核内に蓄積して封入体を形成し、神経機能障害や神経細胞死を引き起こす。CAG の異常伸張により生じる疾患を総称してポリグルタミン病と呼ぶ。

ポリグルタミンを含む封入体は核内あるいは細胞質で形成され、転写調節機構及びタンパク質処理機構へ影響を及ぼすと考えられている。ポリグルタミンを培養細胞に過剰発現させると、大量のポリグルタミンの処理によりプロテアソーム活性は徐々に減弱する。プロテアソーム活性の低下により異常タンパク質の分解が遅滞し、それらが神経細胞に毒性を与える。プロテアソーム活性の低下は ERAD の障害につながり小胞体ストレスを引き起こす。ASK1 欠損細胞ではポリグルタミンによる細胞死が抑制されることから、ポリグルタミンの過剰発現による神経細胞死には、小胞体ストレスからの IRE1-ASK1-JNK 経路が関与する (Nishitoh et al., 2002)。

以上のように、小胞体ストレスは神経変性疾患の発症に関与すると考えられている。しかしながら、いずれの研究においても小胞体ストレスが脳内でいつ、どこで、どのように起こり、疾患発症にどの程度関与するかは明らかではなく、また神経細胞あるいは中枢神経系における小胞体ストレス応答の詳細もよくわかっていない。そこで第1章ではグリア細胞 (アストロサイト) おける小胞体ス

トレス応答、第2章では神経細胞（樹状突起）における小胞体ストレス応答について研究を行なった。

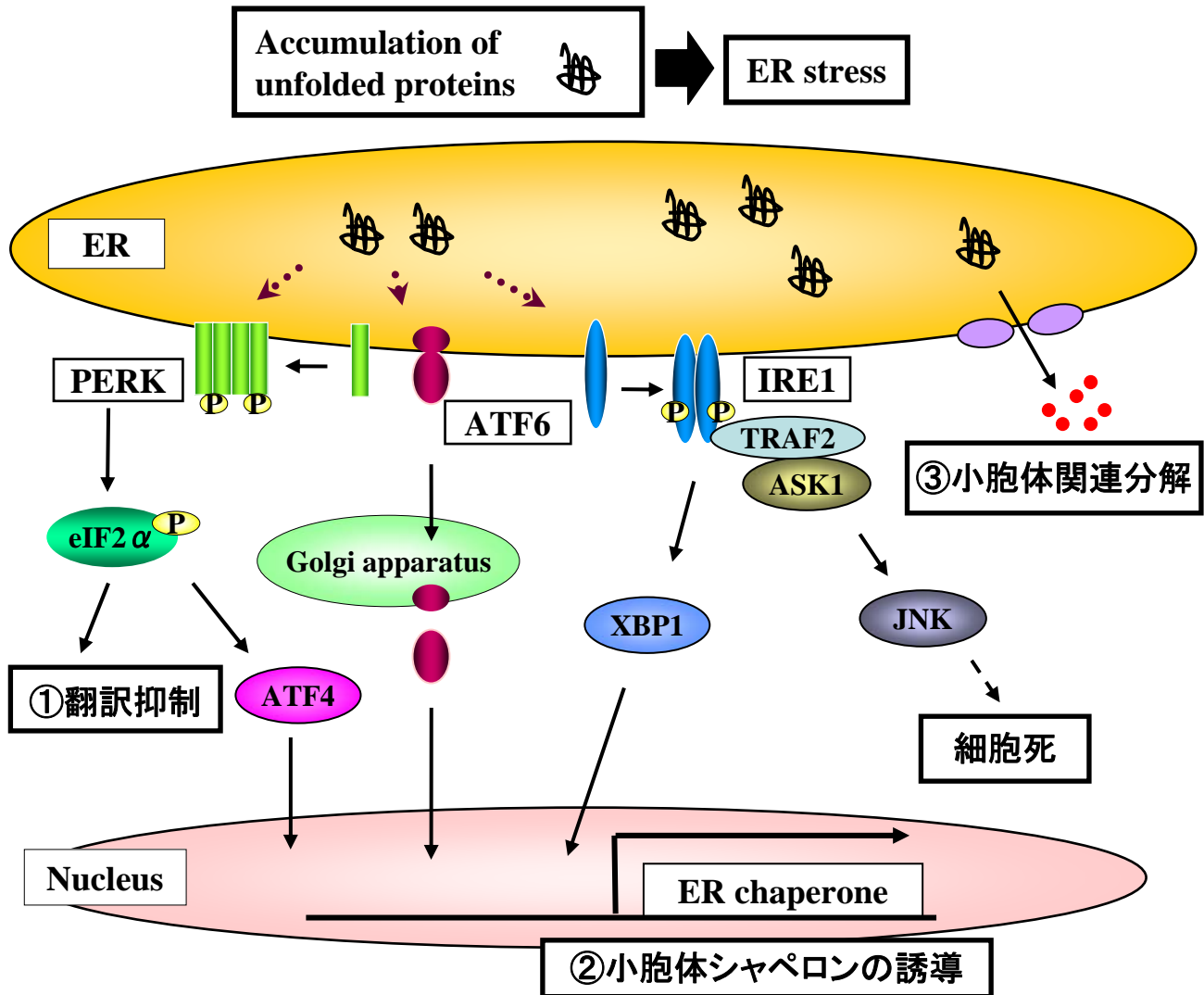


図1. 小胞体ストレス応答

小胞体膜上には小胞体ストレスセンサーであるIRE1, PERK, ATF6が存在する。小胞体ストレス状態になると、IRE1はホモダイマーを、PERKはオリゴマーを形成し活性化する。ATF6はゴルジ体に輸送され、膜内切断を受け、切断断片が核に移行する。PERKはeIF2 α をリン酸化しタンパク質の翻訳抑制を行う。リン酸化されたeIF2 α はATF4の翻訳を促進、ATF4は抗酸化ストレス関連の遺伝子やCHOPの転写を誘導する。ATF6の切断断片は転写因子として分子シャペロンの転写を促進する。IRE1はXBP1のpre-mRNAを切断し、活性型のXBP1 mRNAに変換する。活性型XBP1は核に輸送され分子シャペロンやERAD関連分子群の転写を促進する。また、IRE1にはTRAF2とASK1が結合し、JNKを活性化する。

疾患	関連タンパク質	参考文献
アルツハイマー病	アミロイドβ プレセニン1 プレセニン2	Nakagawa et al., 2000 Katayama et al., 1999 Sato et al., 2001
若年性パーキンソン病	Pael受容体	Imai et al., 2001
ポリグルタミン病	ポリグルタミン	Nishitoh et al., 2002
筋萎縮性側索硬化症	SOD1	Wootz et al., 2004

図2. 小胞体ストレスが関連する神経変性疾患

第 1 章

膜貫通型転写因子 OASIS の膜内切断機構の解析

序論

真核細胞において小胞体は内腔に折り畳み不全のタンパク質を蓄積させる様々なストレスに曝される。小胞体内腔に折り畳み不全の異常タンパク質が蓄積することを小胞体ストレスという。細胞にとって小胞体ストレスは細胞死につながる要因であり、細胞は生存するためにタンパク質の折り畳みを促すGRP78/BiPのような小胞体シャペロンをコードする遺伝子の転写を増やすことで折り畳み不全のタンパク質の蓄積を処理し、小胞体ストレスを回避する。このシステムを小胞体ストレス応答あるいはunfolded protein response (UPR) (Kaufman, 2002; Ron, 2002; Mori, 2000) と呼ぶ (図1)。哺乳類の細胞において小胞体ストレス応答の中心的役割を担っている小胞体ストレスセンサーはIRE1, PERK, ATF6の3つが知られている。これらセンサータンパク質は正常時小胞体膜上に存在する。小胞体ストレス状態になると、IRE1はホモダイマーを、PERKはオリゴマーを形成し活性化する。ATF6は小胞体ストレス依存的に小胞体からゴルジ体に輸送され、ゴルジ体に存在するプロテアーゼによって膜内切断を受け、細胞質側の切断断片が転写因子として核に移行する。PERKはeIF2 α をリン酸化しタンパク質の翻訳抑制を行う。リン酸化されたeIF2 α はATF4の翻訳を促進、ATF4は抗酸化ストレス関連の遺伝子やCHOPの転写を誘導する。ATF6の切断断片は転写因子として分子シャペロンの転写を促進する。IRE1はX-box binding protein 1 (XBP1) のpre-mRNAを切断し、活性型のXBP1 mRNAに変換する。翻訳された活性型XBP1は核に輸送され分子シャペロンやERAD関連分子群の転写を促進する。しかし、過剰あるいは長期間の小胞体ストレスはカスパーゼ 12とカスパーゼ 3, IRE1-ASK1-JNK経路, CHOP (Nakagawa et al., 2000; Urano et al., 2000; Nishitoh et al., 2002; Zinszner et al., 1998) の活性化につながり、細胞死を引き起こす。

これらの小胞体ストレスセンサーはユビキタスに発現しているが、神経細胞に比べ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強い抵抗性を示す。これはアストロサイトには、少なくとも神経細胞にはない小胞体ストレスセンサーが存在する可能性を示唆している。最近、アストロサイトの小胞体ストレス抵抗性が高い現象に、ATF6と相同性の高いOASIS (old astrocyte specifically induced substance) (図 3B) という神経組織においてアストロサイト特異的に発現している小胞体ストレストランスデューサーが関わっていることがわかった (Kondo et al., 2005)。OASISはアストロサイトの長期培養時に特異的に誘導される遺伝子として同定された分子で、脳損傷時に反応性アストロサイトで発現誘導され、膜貫通ドメインとbasic leucine zipper (bZIP) ドメインを有するcAMP response-element binding protein (CREB)/ATF ファミリーの1つ

である。この膜貫通型転写因子OASISは通常全長型の状態で小胞体に局在し、小胞体ストレス依存的に切断され、切断されたbZIPを含む細胞質側の断片が転写因子として核に移行、ER stress responsive element (ERSE) と cyclic AMP responsive element (CRE) を介して小胞体分子シャペロンの一つである BiP/GRP78の転写を誘導する。つまり、小胞体ストレスセンサーであるIRE1, PERK, ATF6はユビキタスに発現しているが、OASISは細胞種特異的に発現しており、このOASISの発現が神経細胞に比べアストロサイトの小胞体ストレス抵抗性を向上させている一つの因子であると考えられる。

膜内切断 Regulated intramembrane proteolysis (RIP) とは分化、脂質代謝、小胞体ストレス応答などの様々な細胞の処理を調節するシグナルの迅速な応答を可能にするためのメカニズムである (Brown et al., 2000)。もっともよく解析されている膜内切断タンパク質はsterol regulatory element binding protein 2 (SREBP-2) と呼ばれる転写因子で、SREBPファミリーに属しコレステロールと脂肪酸代謝に関係する遺伝子を調節している (Brown et al., 1999)。ステロール枯渇に応じて SCAP (SREBP cleavage activating protein) はSREBPを小胞体からゴルジ体に移行させる (Sakai et al., 1998a; DeBose-Boyd et al., 1999; Nohturfft et al., 2000)。ゴルジ体での最初の切断はサブチリシンファミリーの膜結合型セリンプロテアーゼであるSite-1 プロテアーゼ (Site-1 protease, S1P) によって行われる (Sakai et al., 1998b)。S1PはRXX(L/K)のコンセンサス配列のロイシンの後ろで切断し、タンパク質を二つに切断する (Duncan et al., 1997; Espenshade et al., 1999)。S1Pによる切断はSCAPによるSREBPのゴルジ体への移行に依存する。S1PによるSREBPの切断に続いてN末端側のタンパク質はSite-2 プロテアーゼ (Site-2 protease, S2P) によって膜貫通領域内で切断される (Rawson et al., 1997; Duncan et al., 1998)。切断されたN末端の断片は核に移行し、sterol-regulating elementを含むプロモーターに結合し転写を活性化させる (Brown et al., 1999; Duncan et al., 1998)。

ATF6はII型の膜貫通型タンパク質であり細胞外 (小胞体内腔側) ドメインにS1Pによって切断されるコンセンサス配列を持っている (Yoshida et al., 1998)。正常時、ATF6は小胞体に局在するが、細胞が小胞体ストレスに曝されるとATF6は小胞体からゴルジ体に移行し、S1PとS2Pによって二段階に切断される (Ye et al., 2000; Shen et al., 2002)。切断されたbZIPを含むN末端側の断片は核に移行し、ERSE配列に結合して小胞体シャペロンの転写を促進する。OASISは小胞体ストレスに応じて膜貫通領域付近にて二段階に切断される (Kondo et al., 2005)。しかしながら、OASISが小胞体ストレス依存的に切断され活性化するメカニズムは明らかではない。そこでOASISの切断機構について解析を行った。

材料と方法

1. プラスミド

FLAGタグ付きmouse OASIS cDNAはpcDNA3.1 (+) に挿入 (pcFLAG-OASIS) し各実験に使用した。全ての変異OASISプラスミドはpcFLAG-OASISをテンプレートに下記のプライマー (各fwd, rev) を用いたPCRにて作製した。

OASIS-L426V-fwd CTAGTGTTCTACGATGATGGGGCAGG;

OASIS-R423A-rev GCTTGCGGAAGGCATCTGACTGG;

OASIS-P392L-fwd CTGCATTCTCTTCCGGCTCAATGACTGTGA;

OASIS-P392L-rev GAAGGCAGAGCACAAGGGAGCCCA;

OASIS-TGA-fwd TGACAGGGATCTGGGCCCAACA;

OASIS-400-rev GCCGGAAGAGAATGCAGGAAG;

OASIS-426-rev CAGTAGGCTTCGGGAAGGCATCTGA;

OASIS-463-rev GGGCCTCTGCTCTGCTGGAC;

OASIS-482-rev CAAGTACTTGGTGGTCTCATGGATG

Myc-S1PとHSV-S2Pの発現ベクターはAmerican Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) より購入した。Myc-S1P (S414A) とHSV-S2P (H171F) のプラスミドはそれぞれMyc-S1PとHSV-S2Pをテンプレートに下記のプライマー (各fwd, rev) を用いたPCRにて作製した。

S1P-S414A-fwd GACCGCTGTCGCTTCCCCAGTGGTTG;

S1P-S414A-rev CCTGAGAGTGCCCGGCAGCCCCCTTTC;

S2P-H171F-fwd GAAATTGGACATGGGATAGCAGCTATTAG;

S2P-H171F-rev AAATACAACACCACTAATGAGAACTGCC.

全てのPCRはPlatinum *pf*x DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて製品マニュアルに従って行い、PCR産物はBKLキット (Takara, Ohtsu, Japan) を用いて平滑末端化反応を行った後ライゲーションした。作製したプラスミドはシーケンス解析を行い目的の配列であることを確認した。

2. 細胞培養及び小胞体ストレス負荷

C6グリオーマ細胞とHeLa細胞は10%ウシ胎仔血清を付加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞は10%ウシ胎仔血清を添加した Ham's F12 mediumで培養した。

細胞は小胞体ストレス誘導剤を負荷する二日前に60-mmディッシュに 1×10^5 細胞数でまき、ウエスタンブロッティング解析に用いた。小胞体ストレス応答を調べる全ての実験において細胞の過増殖によるストレスを避けるために70-80%の細胞密集度で実験を行った。また、それぞれのディッシュのコンディ

シオンを揃える為に小胞体ストレス誘導剤を負荷する1時間以上前に新しい培養液に交換した。小胞体ストレス誘導剤としてtunicamycin, thapsigargin, brefeldin A (全てSigma, St Louis, MO, USA) を使った。コントロールは培養液交換だけを行った。

3. トランスフェクション

各プラスミドはLipofectamineあるいはLipofectamine 2000 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) を用いて製品マニュアルに従って各細胞にトランスフェクションした。恒常的にOASISあるいはOASIS変異体のプラスミドをトランスフェクションしたC6グリオーマ細胞は1.0mg/ml G418 (Gibco BRL) によるセレクションにより樹立した。

4. ウェスタンブロッティングと抗体

ウェスタンブロッティング用細胞溶解液は0.9% sodium dodecyl sulfate (SDS), 15 mM EDTA, 8 mM メチオニン, プロテアーゼインヒビターカクテル (MBL, Nagoya, Japan) を100°Cで10分間ボイルし、氷上にて5分間冷却後0.3% sodium dodecyl sulfate, 33 mM Tris/acetate, pH 8.5, 1.7% Triton X-100 になるように100mM Tris/acetate, pH 8.5, 5% Triton X-100を加え細胞溶解液とした (Erickson et al., 1979)。細胞溶解は氷上で1時間行い、この後15000rpmで5分遠心し上清を回収した。上清にSDSサンプルバッファーを加え、100°Cで5分間ボイル後、氷上にて冷却しウェスタンブロッティング用サンプルとした。サンプルは等量のタンパク量を10% SDS-polyacrylamide ゲルにて電気泳動し、PVDFメンブレンに転写した。転写後のメンブレンはMembrane blocking agent (GE Healthcare, UK) を用いて室温1時間ブロッキング後、各一次抗体を反応させた。

ウサギ抗OASIS血清はマルトース結合タンパク質を融合させた組み換えタンパク質OASIS (アミノ酸 17-253) を用いProtOn kit1 (Multiple Peptide Systems, San Diego, CA, USA) にてアフィニティー精製した。抗FLAG M2 抗体 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA), 抗KDEL抗体 (StressGen Biotechnologies, Collegeville, PA, USA), 抗Myc抗体 (MBL, Nagoya, Japan), 抗HSV抗体 (Novagen, Darmstadt, Germany) はそれぞれ購入した。OASISの糖鎖付加を確認するために、細胞溶解液上清はendoglycosidase H (Endo H) (Roche, Indianapolis, IN, USA) を用いて製品マニュアルに従った条件にて37°Cで16時間処理後、ウェスタンブロッティングのサンプルとした。FLAG-OASISとGRP78/BiPとの結合解析はShen et al., 2002に記載されている通りに行った。

5. 免疫染色

HeLa細胞はCELLocate Coverslips (Eppendorf, Hamburg, Germany) を底に沈めた60-mmディッシュにて培養した。カバーガラス上の細胞は4% パラフォルムアルデヒドを用いて4°C, 30分で固定し、PBS (-) で洗浄後0.3% Triton X-100入りPBS (-) にて5分間透過処理した。ウサギ抗FLAGポリクローナル抗体 (Sigma) は500倍希釈で4°C、overnightで用いた。ゴルジ体マーカーであるマウス抗GM130モノクローナル抗体 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) は50倍希釈で使用した。一次抗体を可視化するためにalexa標識ヤギ抗ウサギIgG抗体、fluorescein標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA) を用いて2時間 室温で反応させた。染色した細胞は共焦点顕微鏡 (LSM 510; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察した。

6. リポーターアッセイ

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むGRP78/BiP reporterプラスミドであるpGL3-GRP78/BiP promoter (Kondo et al. 2005) (0.2 ug)、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を持つコントロールプラスミド pRL-SV40 (Promega, Madison, WI, USA) (0.02 ug) を24wellプレートの細胞にトランスフェクションした。12時間後培地交換し、1時間後 1 μ M thapsigarginを負荷し12時間後回収した。回収した細胞はPassive Lysis Buffer (Promega) にて溶解した。ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性はDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) と luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) を用いて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割合で定義した。数値は三つの独立した実験の測定結果の平均とした。

結果

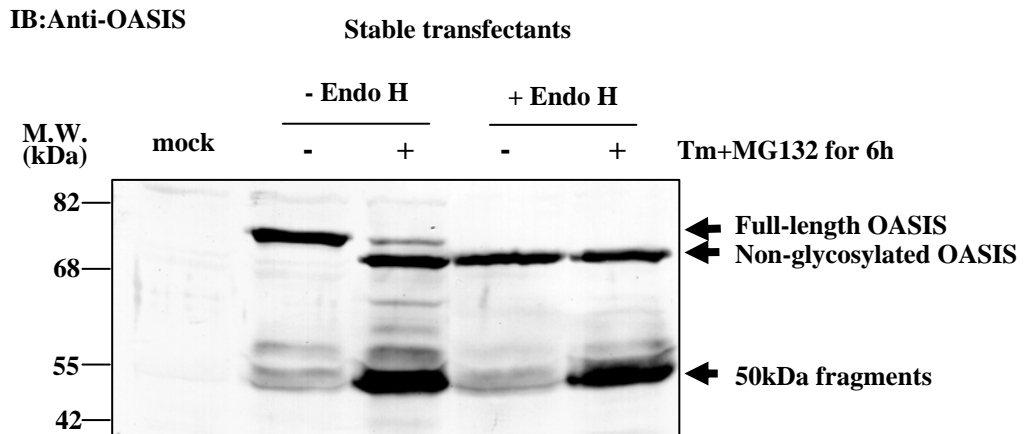
1. 膜貫通型転写因子 OASIS は翻訳後修飾を受ける

OASISの分子量はそのアミノ酸配列から計算すると約50kDaである。しかし、OASISを恒常的にトランスフェクションした細胞の溶解物から抗OASIS抗体を用いて検出されるウエスタンブロッティングの結果はOASISが約80kDaの分子量であり、計算上の分子量より大きい (図 3A)。これはOASISが翻訳後修飾を受けることを示している。そこで、OASISがアスパラギン (N) 結合型糖鎖を含むかどうかを調べた。N結合型糖鎖付加を阻害することで小胞体ストレスを誘導させるtunicamycinを細胞に処理すると、処理後6時間において期待されるようにより分子量の低いバンドを約70 kDaで検出した。更に、糖鎖である炭化水素側鎖を取り除くためこれらの細胞溶解物をendoglycosidase H (Endo H) にて処置すると80 kDaのバンドが消え新たに70 kDaのバンドが現れた。これらの結果より、OASISの翻訳後修飾の一つはN結合型糖鎖修飾を受けることであり、分子量の増加の要因であることがわかった。更にOASISがEndo Hで消化されることはOASISがオリゴ糖修飾の起こるゴルジ体に移動していないこと、つまり小胞体に留まっていることを示す。これらの結論は細胞内にあるOASISのほとんどが通常小胞体に局在しているという以前の結果を支持する (Kondo et al. 2005)。Tunicamycin 負荷はOASISの糖鎖付加阻害に加え、小胞体ストレス時に認められるおよそ50 kDaの新しいバンドを発現させる (図 3A)。

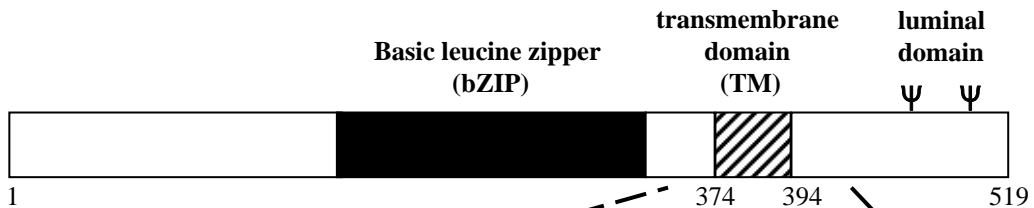
2. OASISは小胞体ストレスに応答して切断される

ヒトOASIS, ATF6, sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) の膜貫通ドメインとその周辺の領域の配列の比較を図 3B, Cに示す。小胞体内腔部分においてATF6やSREBP-2と同様、OASISはゴルジ体の膜貫通型プロテアーゼであるSite-1 プロテアーゼ (S1P) によって切断されるコンセンサス配列RXXLに一致するRSL配列を含む (Sakai et al. 1998b; Espenshade et al. 1999)。OASISは小胞体ストレス誘導剤であるtunicamycin (図 4A) やthapsigargin (図 4B) を細胞に処理することで膜貫通ドメインにて切断される。OASISを恒常的にトランスフェクションした細胞に加え、C6グリオーマ細胞の内在性のOASISもまた小胞体ストレス依存的に切断される (図 4C)。それ故、OASISはATF6と同じくゴルジ体に存在するプロテアーゼであるS1PとS2Pによって小胞体ストレスに応答して膜貫通領域で切断される可能性がある。この可能性を更に裏付けるために、細胞にbrefeldin Aを処理した時OASISが切断されるかどうか実験を行った。ゴルジ体に存在する活性型S1Pは brefeldin A処理により小胞体に流入しATF6やSREBP-2を切断する。brefeldin Aの処理後1時間からOASISの80 kDaのバンドが消滅し、処理

A



B



C

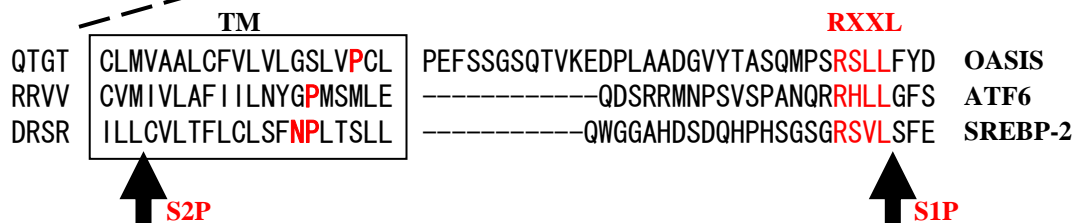


図3. OASISは糖鎖付加による翻訳後修飾を受け、Site-1とSite-2プロテアーゼ (S1PとS2P) の切断サイトを持つ

(A) OASISは糖鎖付加される。pcDNA3.1 (+) (mock)あるいはタグをしていないOASISを恒常的に発現させたC6グリオーマ細胞を用いたOASISのウエスタンブローディング。3 μg/ml tunicamycin (Tm)と活性化したOASISのN末端側断片の分解を抑えるために5 μM MG132の存在下、あるいは非存在下で6時間培養し、それから細胞を溶解させ、その溶解物をendoglycosidase H (Endo H)で処理するもの処理しないものを調製した。50 kDaの断片は小胞体ストレス負荷後蓄積するOASISのN末端側の断片を示す。

(B) ヒトOASISの予測されるペプチドの特徴。basic region, leucine-zipper (bZIP), 想定される膜貫通ドメイン (transmembrane domain, TM), 小胞体内腔ドメイン (luminal domain) が示されている。ψ は可能性のある糖鎖付加サイトを示す。

(C) OASISと activating transcription factor 6 (ATF6) と sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP-2) の膜貫通領域とその周辺のアミノ酸配列の比較。S1Pサイト (RXXL; 赤で囲まれている) のコンセンサス配列がこれらタンパク質内に保存されている。矢印はそれぞれのタンパク質で推定されるS1PとS2Pの切断サイトを指す。四角は膜貫通ドメイン (transmembrane domain, TM) の位置を示す。

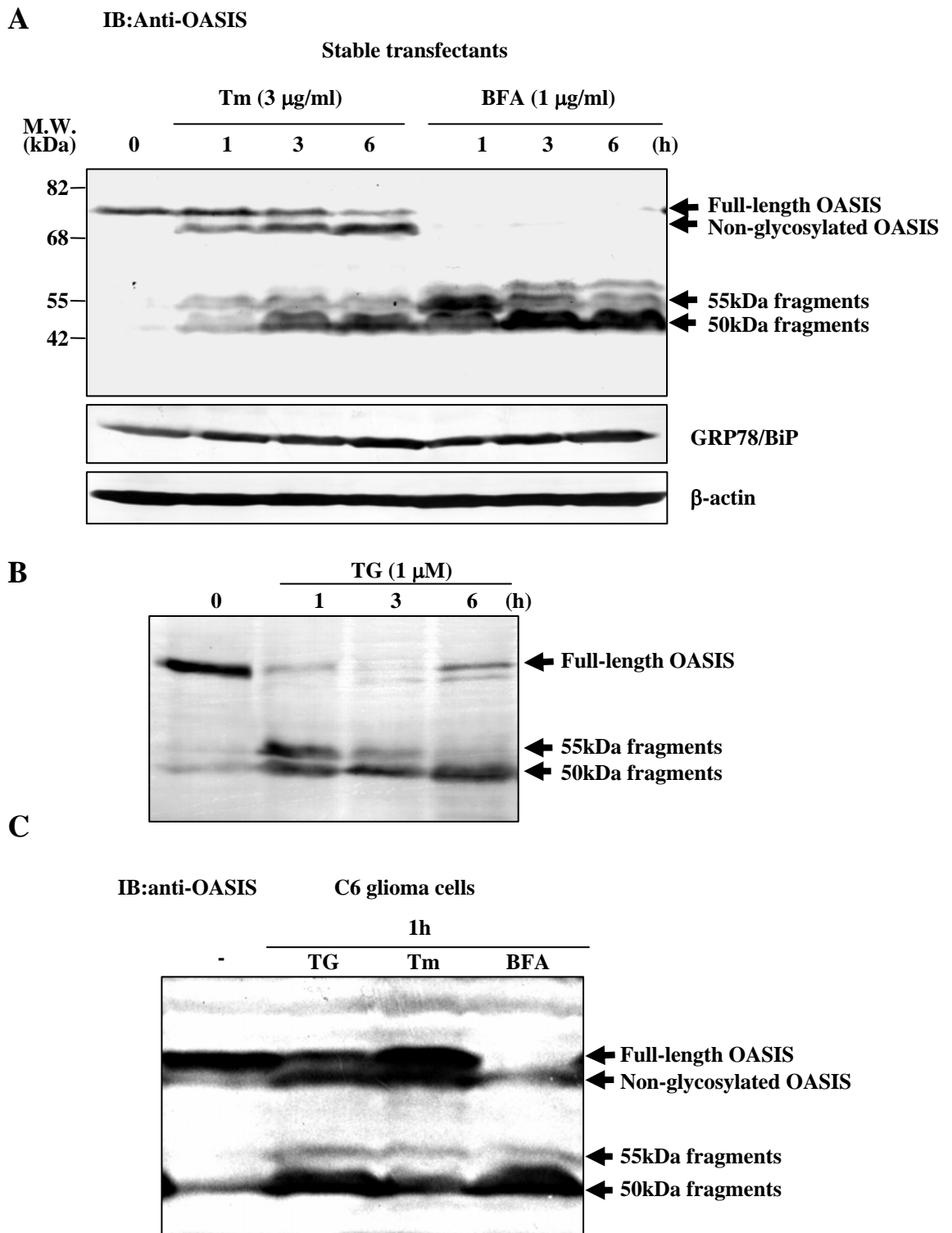


図4. 小胞体ストレスに反応するOASIS

(A, B) 全長型OASISを恒常的に発現させたC6細胞を3 μ g/ml tunicamycin (Tm), 1 μ g/ml brefeldin A (BFA) あるいは1 μ M thapsigargin (TG) と5 μ M MG132で表示した時間処理した。細胞溶解物は抗OASIS抗体とGRP78/BiPを認識する抗KDEL抗体でウエスタンブロッティングを行った。50 kDaバンドは小胞体ストレス後徐々に蓄積するN末端側のOASISの断片を示す。55 kDaの断片は小胞体ストレス後一時的に蓄積し、それから徐々に減少する。

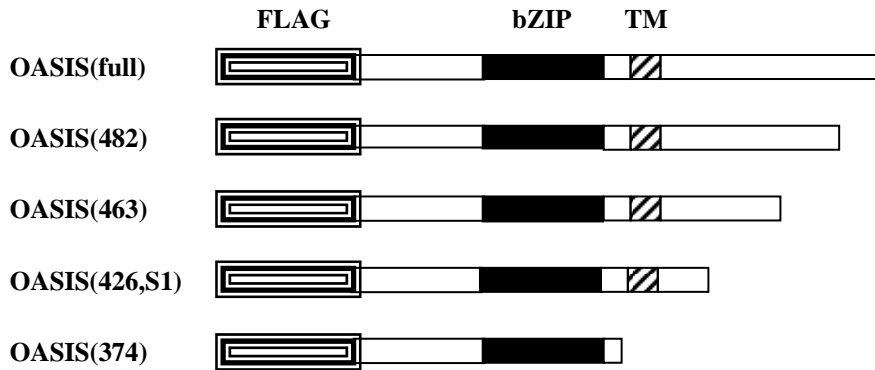
(C) 1 μ M thapsigargin (TG), 3 μ g/ml tunicamycin (Tm), 1 μ g/ml brefeldin A (BFA) を表示した時間処理したC6グリオーマ細胞を溶解し、ECL kit (Amersham Biosciences) を用いたウエスタンブロッティングによって解析した。各薬剤を処理後、OASISの50 kDaの断片が蓄積することに気付く。

後6時間を通してOASISの50 kDaと55 kDaの断片の特異的な蓄積が検出された(図 4A)。55 kDaのバンドは早く現れ50 kDaのバンドは徐々に蓄積し、brefeldin Aを6時間処理すると切断されたほとんどの断片は50 kDaのバンドとして検出された。このことは55 kDaのバンドがはじめに生じ、続いて50 kDaのバンドが生じること、またゴルジ体に局在する酵素が小胞体に局在するOASISの切断を担っていることを示唆している。55 kDaと50 kDaのバンドがそれぞれS1PとS2Pによって切断された断片であるかどうかを検証するために、図 5Aに示すようにN末端側にFLAGタグしたOASISのC末端側の各種欠失OASISを作製し、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS) ゲルでの電気泳動の移動度を比較した。S1PサイトからC末端まで欠失させたOASIS (426) の発現ベクターをC6グリオーマ細胞にトランスフェクションし、それからthapsigarginにて刺激した。ウエスタンブロッティングの結果、二つのバンドが55 kDaと50 kDaのバンドに相当する分子量にて検出された(図 5B)。更に、膜貫通ドメインと内腔ドメインを欠失した変異体であるOASIS (374) を発現させた細胞の溶解液のウエスタンブロッティングより、OASIS (374) はthapsigargin存在の下50 kDaのポリペプチドとして検出された(図 5B)。OASIS (482) とOASIS (463) は50 kDaと55 kDaのバンドを含む三本のバンドが検出された。従って、55 kDaのバンドはS1Pサイト (426) で切断された断片由来であり、50 kDaのバンドは膜貫通ドメイン内で切断された断片由来であると想定された。

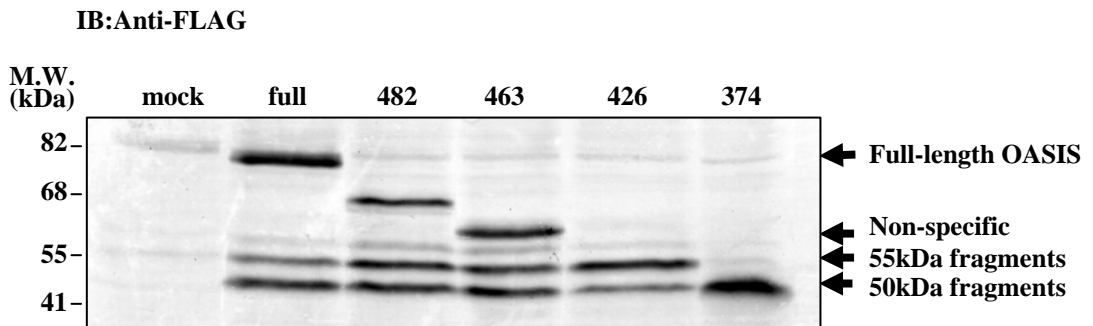
3. OASISはSite-1およびSite-2プロテアーゼによって切断される

RXXLモチーフの変異はSREBPとATF6の切断を阻害することが報告されている(Duncan et al. 1997; Ye et al. 2000)。OASIS内のRXXL配列(RSLL, 423-426番目残基)がS1P切断サイトに相当するかどうかを決定するために、モチーフ内のアルギニン残基をアラニン(R423A)に、あるいはロイシンをバリン(L426V)に置換したOASIS変異体を作製した。OASIS (R423A) とOASIS (L426V) をトランスフェクションしThapsigarginを処理した細胞において、55 kDa型のOASISが消滅し、50 kDa型のOASISは蓄積していた(図 5C)。言うまでもなくR423AとL426Vの二箇所変異を持ったOASISをトランスフェクションした細胞も同じ切断パターンを示した。このように、RXXLモチーフはOASISの55 kDa断片の産生にとって必須であり、50 kDaの断片にとっては必須ではない。R423Aを持った全ての変異体の全長型は野生型OASISあるいはR423Aの変異を持たない変異体と比較して低い移動度を示している(図 5C)。tunicamycinで細胞を処理した時、R423Aを持つOASIS変異体の糖鎖付加されていないOASISは他のR423Aの変異を持たない変異体のそれと比べてより低い移動度で現れるため、移動度の変化の理由は明らかでないが、R423A変異体はOASISの糖鎖修飾の影響ではないと考

A



B



C

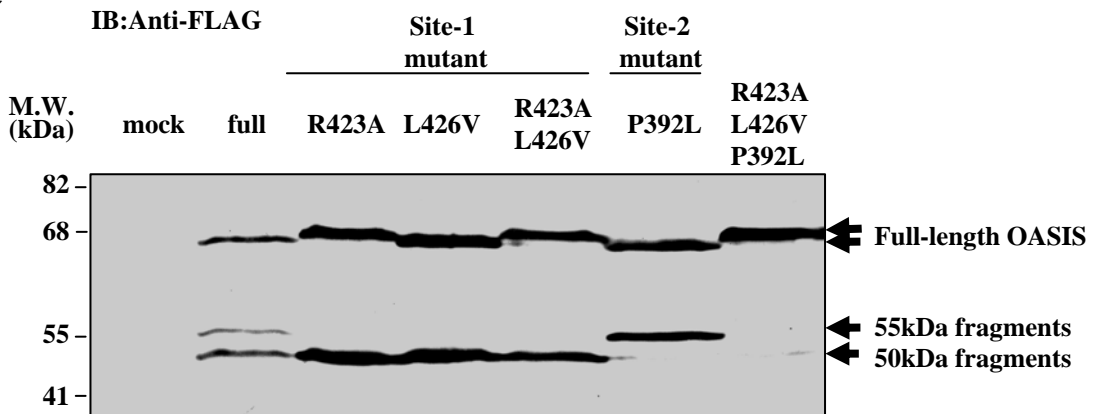


図5. OASISの欠失変異体および点変異体を発現するベクターの構築とこれら変異体のウエスタンブロットティング

(A) OASISとその変異体の構築図。各タンパク質はN末端側にFLAGエピトープで標識されている。basic leucine zipper (bZIP) と膜貫通ドメイン (transmembrane, TM) を表示している。

(B) 各変異体のウエスタンブロットティング。表示した発現ベクターをC6グリオーマ細胞に導入した。30時間後、1 μ M thapsigarginで1時間処理し、それから溶解物を抗FLAG抗体でウエスタンブロットティングを行った。

(C) OASISのSite-1とSite-2プロテアーゼ (S1PとS2P) 認識サイトの変異は導入したC6グリオーマ細胞内でOASISの切断過程を変える。FLAGタグ付き野生型OASIS (wild) あるいはS1Pサイト変異体 (Site-1 変異体) [OASIS (R423A, L426V, R423A/L426V)], S2Pサイト変異体 (Site-2 変異体) [OASIS (P392L)] あるいはS1PとS2Pサイト両方の変異体 [OASIS (P392L, R423A, L426V)] をコードする発現ベクターをC6グリオーマ細胞に導入した。30時間後、1 μ M thapsigarginにて細胞を1時間処理し、ウエスタンブロットティングを行った。

えられる。次に、OASISの50 kDaの断片を生じさせる二つ目の切断を解析した。SREBPやATF6にとってこのプロテアーゼはS2Pと判明している。SREBPにおいて膜貫通ドメインにあるアスパラギンとプロリン残基が必要とされているが、S2P切断に対して必須の特定のアミノ酸は判明していない (Rawson et al. 1997; Ye et al. 2000)。これらの残基はSREBPにおいては隣接しており、ATF6においては二つのアミノ酸によって分割されている。OASISはアスパラギンを含んでいないが、膜貫通ドメイン内にあるC末端側にプロリン残基を含む (図 3C)。プロリン残基の場所はSREBPとATF6における場所と相同している。それ故、S2Pに対する想定される認識サイトにおいてP392L変異体を持つFLAGタグ付きOASISをコードするcDNAの発現ベクターを作成した。その結果、S2Pサイト変異を持つOASISをトランスフェクションした細胞では、50 kDa型が検出されず、55 kDa型が蓄積した (図 5C)。更に、S1PとS2Pサイト両方に変異を持つOASIS (P392L, R423A, L426V) をコードするcDNAの発現ベクターをトランスフェクションした時、50 kDaと55 kDa型両方が完全に消滅した。CMVプロモーターによるOASISの大量発現する細胞が異常な経路によってタンパク質を処理している可能性もあるので、OASIS Site-1変異体 (R423A, L426V) とSite-2変異体 (P392L) を弱い発現レベルで恒常的に発現する細胞株を作製し、これらの細胞を使って、ウエスタンブロッティング及びリポーターアッセイを行った。OASIS Site-1変異体を発現している細胞において50 kDaの断片が小胞体ストレス下で生じた (図 6A)。これは一時的な強制発現実験における状況と類似していた。更に、リポーターアッセイの結果、OASISのWTとSite-1変異体を恒常的に発現させた細胞はmockをトランスフェクションしたもの比べて小胞体ストレス後のGRP78/BiPプロモーターの活性化レベルがより高かった (図 6B)。しかし、Site-2変異体を恒常的に発現する細胞ではmockをトランスフェクションしたもの比べて小胞体ストレス後のGRP78/BiPプロモーターの活性化レベルは変わらなかった。これらの結果はS2Pのみによる切断がOASISの転写因子機能を発揮するために重要であり、SREBPやATF6と比べOASISのS1Pによる切断はOASISの活性化に必須ではない可能性を示している。brefeldin A処理後の野生型OASISのウエスタンブロッティングは55 kDaの断片は50 kDaの断片と比べ、より迅速に生じることを明らかにした (図 4A)。これは野生型OASISが実質的に小胞体ストレスに応じてS1PとS2Pによって連続的に切断されていることを示している。これらをまとめると、中間の55 kDa型はS1Pによって切断された断片であり、続いて50 kDa型はS2Pによって切断された断片であると考えられる。S1PとS2PがOASISの切断過程に関与しているという仮説を更に検証するために、Mycタグ付きS1PあるいはHSVタグ付きS2P、あるいはこれらのプロテアーゼの不活性型フォーム [活性化サイトのセリンをアラニンに置換した不活性型S1P (S414A) (Sakai et al. 1998b) と亜鉛

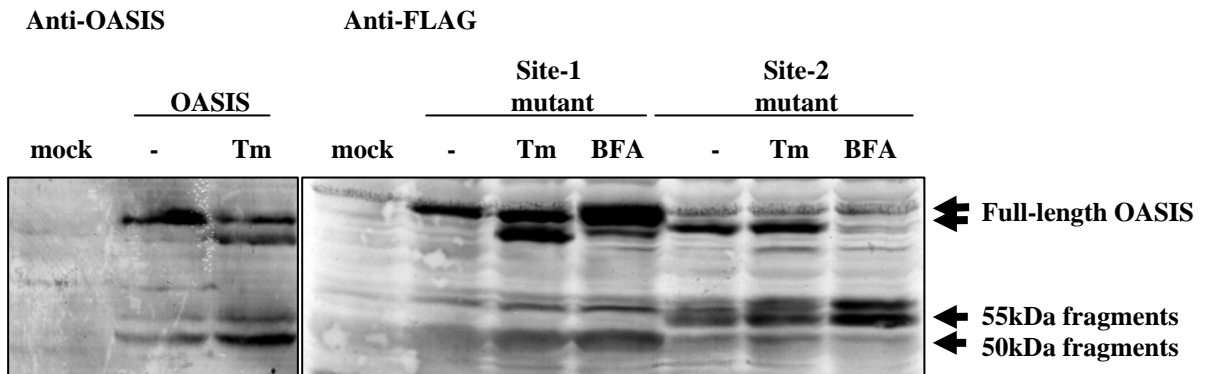
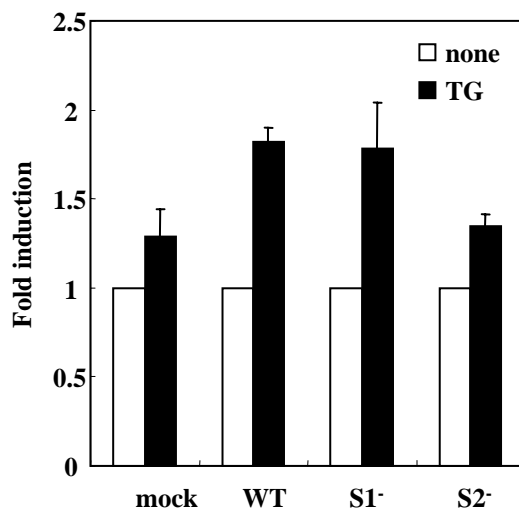
A**B**

図6. OASIS変異体を恒常的に発現するC6グリオーマ細胞を用いたウエスタンブロッティングとリポーターアッセイ

(A) 恒常的に遺伝子発現した細胞を用いたウエスタンブロッティング。3 $\mu\text{g/ml}$ tunicamycin (Tm) あるいは1 $\mu\text{g/ml}$ brefeldin A (BFA) 負荷あるいは負荷せずに1時間細胞を培養し、それからその細胞溶解物を各抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

(B) pcDNA3.1 (+) (mock), OASIS WT (WT), Site-1変異体 (S1-) とSite-2変異体 (S2-) を恒常的に発現したC6細胞における小胞体ストレス時のGRP78/BiPプロモーター活性の上昇。データは三つの独立した実験からの増加率で示した。

結合部位で重要なヒスチジンをフェニルアラニンに置換したS2P (H171F) (Rawson et al. 1997)] を作製し、FLAGタグ付きOASISと共に細胞にトランスフェクションした。OASISを発現する細胞をthapsigarginで処理した時、55と50 kDaのバンド両方がその細胞溶解物にて観察された。thapsigargin存在下で野生型S1Pを共発現させた時、55 kDaのバンドは強く蓄積した (図 7A)。しかし、変異S1Pを発現させた細胞溶解物では55 kDaの断片の蓄積が増加しなかった。また、OASISと野生型S2Pの共トランスフェクションでは50 kDaの断片が増加した。一方、変異S2Pは50 kDaの断片を増加させることができなかった (図 7B)。続いてS1PがOASISの切断に必要なかどうか試すために、小胞体ストレス下のOASISの切断においてS1P阻害剤であるAEBSFの影響を調べた (Okada et al., 2003)。細胞にThapsigarginあるいはbrefeldin Aを処理した時、55 kDaの切断はAEBSFによって阻害され、50 kDaの断片は阻害されなかった (図 7C)。これらの結果はOASISの55 kDaの断片はS1Pによって切断され、50 kDaの断片は小胞体ストレス下でS1Pとは独立した方法で切断されうることを示している。これらの結果は先に述べたデータを指示しており、OASISは小胞体ストレスに応じて事実上S1PとS2Pによって連続的に切断され、SREBPやATF6と比べOASISのS1Pの切断はS2Pの切断にとって必ずしも必要ではないと結論付けた。

4. 切断されるOASISの細胞内局在

S1Pはゴルジ体内の内腔側に活性化サイトを持つ膜貫通型セリンプロテアーゼであり、一方S2Pは稀な複数回膜貫通の疎水性の亜鉛金属プロテアーゼである (Brown et al. 2000)。ATF6は小胞体からゴルジ体に移行し、そこでS1PとS2Pによって切断されることが証明されている (Ye et al. 2000; Shen et al. 2002; Okada et al. 2003)。上記のデータで示したように、OASISもS1PとS2Pによって切断される。この結論は、OASISは切断されるために小胞体からゴルジ体に移動する必要があると予測させる。それ故、小胞体ストレス後のOASISの細胞内局在を検証した。通常の状態、OASISは小胞体であると証明されている核周辺の構造に局在している (図 8) (Kondo et al. 2005)。つまり、OASISは通常小胞体に局在している。thapsigargin処理4時間後、OASISの免疫反応性はゴルジ体マーカーであるGM130と重なるゴルジ体様の点状の構造と核で観察された。膜貫通と内腔ドメインを欠く欠失変異体であるOASIS (374) をC6グリオーマ細胞にトランスフェクションした時、その免疫反応性はthapsigargin処理後4時間にて核にのみ蓄積していた (図 8)。このことはOASISがまず小胞体ストレスに応じてゴルジ体に移行し、それから断片が核に移行することを示している。次に、S1PサイトであるRXXLモチーフ内の変異であるR423A/L426Vを持つOASIS変異体の発現ベクターをトランスフェクションした細胞では、免疫反応性はゴルジ体と核にて観

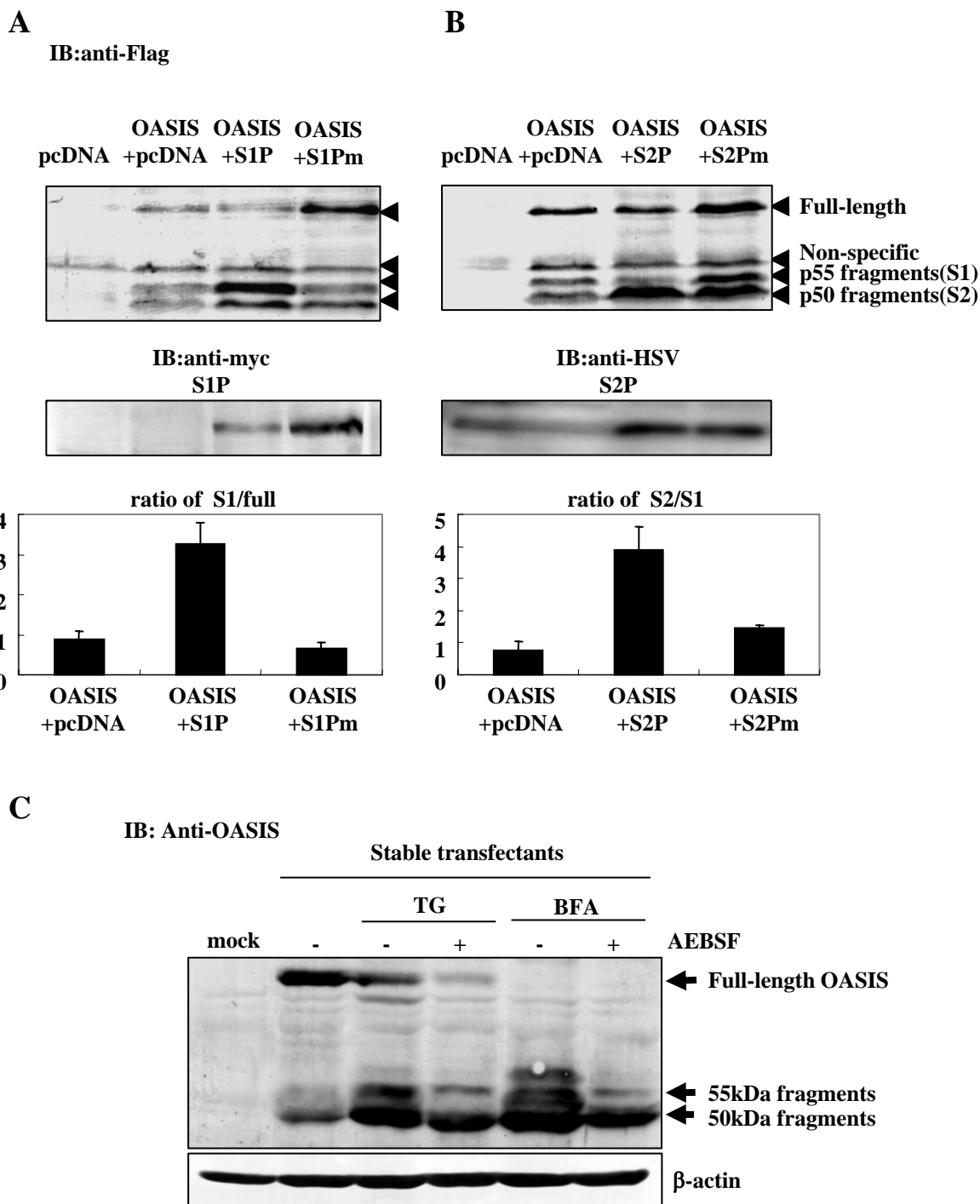


図7. Chinese hamster ovary (CHO) 細胞でのOASISの切断過程におけるSite-1 プロテアーゼ (S1P) あるいはSite-2 プロテアーゼ (S2P) の影響

表示しているようにFLAGタグOASISと共に、Mycタグ野生型S1Pあるいは不活性S1P (S414A) (A), あるいはHSVタグ野生型S2Pあるいは不活性S2P (H171F) (B) をCHO細胞に共導入した。30時間後に、 $1 \mu\text{M}$ thapsigarginにて細胞を1時間処理した。細胞を溶解し、抗OASIS抗体, 抗Myc, 抗HSV抗体を用いて免疫ブロットを行った。野生型S1Pを導入した細胞は55 kDaの断片の蓄積を、野生型S2Pを導入した細胞は50 kDaの断片の蓄積を示した。しかし、S1PとS2Pの不活性型変異体はどちらも小胞体ストレス後のOASISの切断に影響はなかった。中央のパネルはMyc-S1P (A) とHSV-S2P (B) のウエスタンブロッティングを示す。下のパネルはS1PとS2Pによって切断される断片の定量解析を示す (n=4)。

(C) OASISの切断におけるAEBSFの影響。OASISを恒常的にトランスフェクションした細胞に $500 \mu\text{M}$ AEBSF (Calbiochem) を一時間前処理して、そしてそれからAEBSFを取り除かずに $1 \mu\text{M}$ thapsigargin (TG) あるいは $1 \mu\text{g/mL}$ brefeldin A (BFA)、と $5 \mu\text{M}$ MG132を1時間負荷した。そしてそれから細胞を溶解し、溶解物は抗OASIS抗体によるウエスタンブロッティングに用いた。

察された。図 5Cで示しているように、S1Pサイト内の変異体は55 kDaの断片が完全に消滅するが、50 kDaの断片は蓄積させた。つまり、OASISはS1Pの切断なしに核に移行する。このことは、もしOASISがS1Pによって切断されないのであれば、OASISは小胞体ストレスに応じてゴルジ体に移行後、潜在的にS2Pだけで切断され、切断されたN末端の断片が核に移行することを主張している。対照的に、S2Pの切断を阻害するP392L変異を持つOASIS発現ベクターをトランスフェクションした細胞において、免疫反応性は小胞体とゴルジ体にて観察された (図 8)。更に、S1PとS2Pの認識サイトに変異を持つOASIS (P392L, R423A, L426V) をコードするcDNAの発現ベクターをトランスフェクションした時、その免疫反応性もまた小胞体とゴルジ体にて観察された (図 8)。このことは、S2Pによる切断は核へのOASISの移行にとって必須であり、全長型OASISははじめS1PとS2Pの切断なしにゴルジ体に移行し、それからゴルジ体にてOASISはS1PとS2Pによって連続的な切断を受けることを示している。

5. OASISの内腔ドメインはゴルジ体移行シグナルを含まない

ATF6の内腔ドメインは小胞体内腔にてGRP78/BiPと相互作用し、折り畳み不全タンパク質の蓄積に対しセンサーとして機能することが報告されている(Shen et al., 2002)。それ故、OASISも免疫沈降法によって潜在的にGRP78/BiPと相互作用するかどうかを調べた。通常状態の下、強制発現させたOASISとGRP78/BiPとの重要な相互作用を検出した。しかし、小胞体ストレス負荷後OASISからGRP78/BiPの解離を検出できなかった (図 9)。おそらく、実験系がOASISの強制発現で行われているので、OASISからのGRP78/BiPの解離の検出が成功できなかった可能性がある。それ故、OASISが実際に小胞体内の折り畳み不全タンパク質の蓄積に対するセンサーとしての機能があるかどうかを結論づけるには更なる実験が必要である。

ATF6では小胞体ストレス下小胞体からゴルジ体に移行するために、その内腔ドメインに重要なアミノ酸配列を含むことが報告されている (Chen et al., 2002; Shen et al., 2002)。OASISもまたその内腔ドメインにゴルジ体移行シグナルを含むかどうかを実験するために、図 5Aに示すような一連のOASIS欠失変異体が小胞体ストレス下にゴルジ体に移行するかどうかを実験した。OASIS欠失変異体を使った実験ではOASISが小胞体ストレス依存的に小胞体からゴルジ体に移行するのではなく、ATF6の内腔ドメインと比較してOASISの内腔ドメインは小胞体ストレス下でそのゴルジ体移行に必要なかどうかを調べるために行った。S1PサイトからC末端側までを欠失させたOASIS (426) を含む全ての欠失変異体は切断の過程やゴルジ体への移行は野生型と比べ変動しなかった (図 10A)。更に、OASISがその内腔ドメインにゴルジ体移行シグナルの重要な配列を持たないことを確

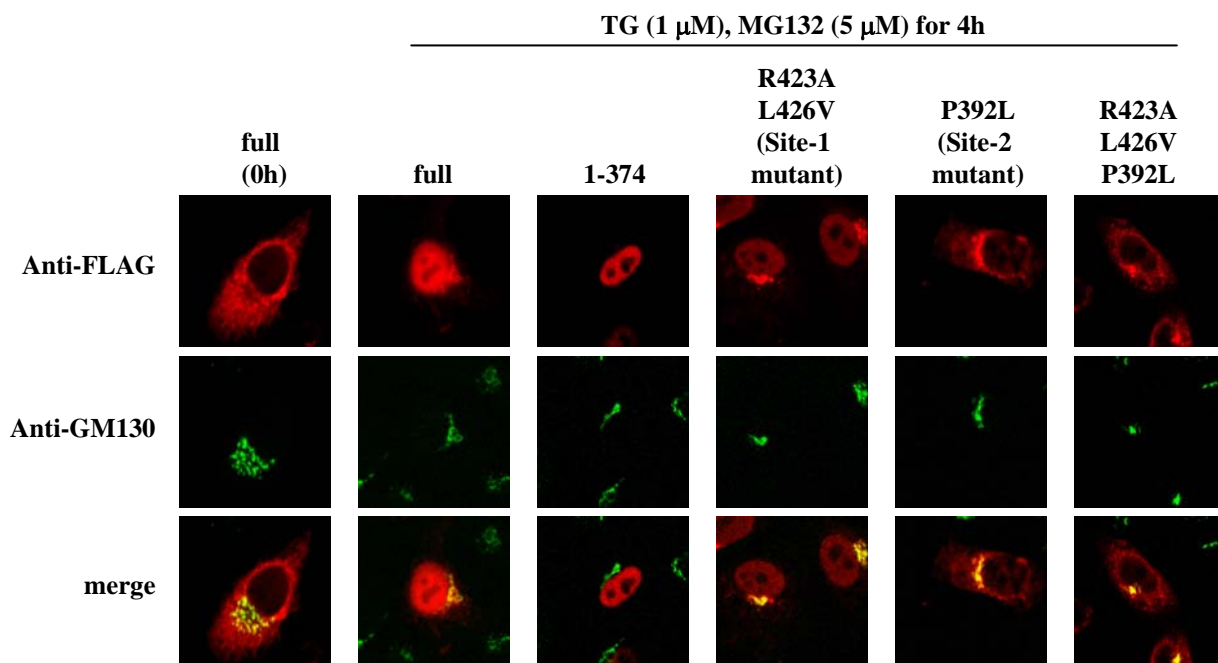


図8. HeLa細胞におけるOASIS点変異体の免疫染色

抗FLAGと抗GM130抗体を用いた各OASIS発現細胞の二重染色。細胞を固定し、抗FLAG抗体と抗GM130抗体を用い二重染色し、それから共焦点顕微鏡によって解析した。野生型OASISの免疫反応性は通常時ゴルジ体マーカーであるGM130と重ならない。しかし、小胞体ストレス後、野生型OASISのシグナルはゴルジ体と核に蓄積した。OASIS (374) は核に局在した。S1Pサイト変異 (R423A, L426V) をもつOASISは小胞体ストレス後ゴルジ体と核に局在した。対照的に、S2Pサイト変異 (P392L) そしてS1PとS2P両サイト変異 (R423A, L426V, P392L) をもつOASISは小胞体ストレス後小胞体とゴルジ体に局在し、核には局在しなかった。

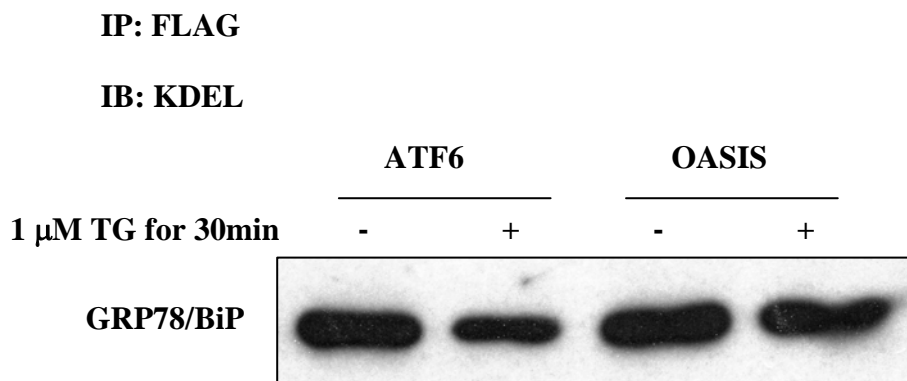
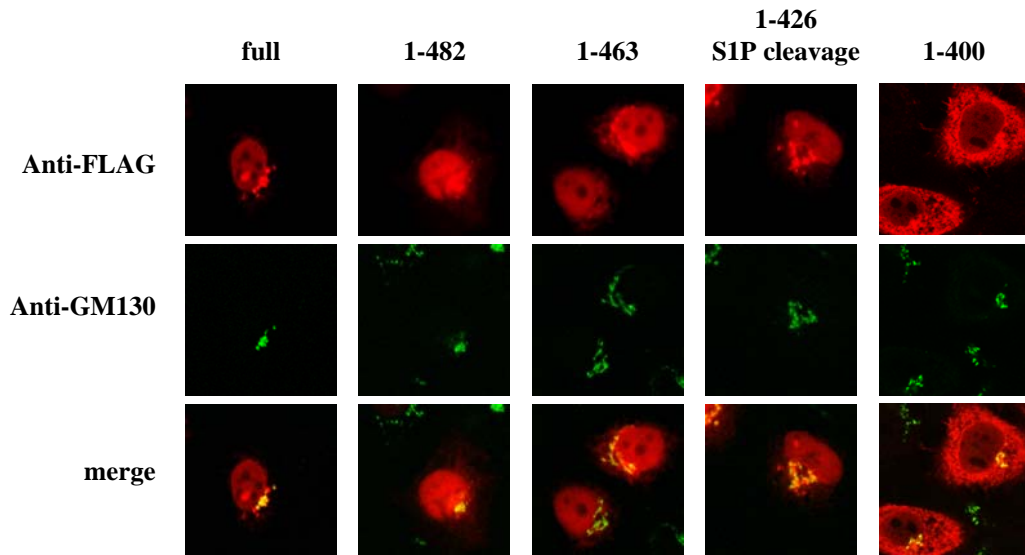
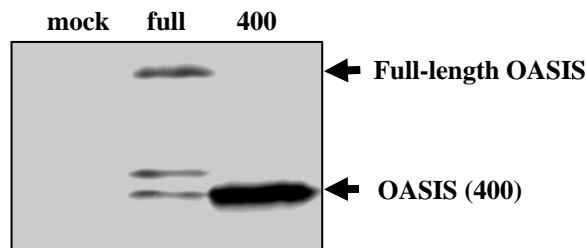


図9. FLAG-OASISとGRP78/BiPとの結合

C6グリオーマ細胞にFLAG-ATF6あるいはFLAG-OASISをトランスフェクションし、30時間後、1 μ M thapsigargin (TG) で30分処理するあるいは処理しない細胞を用意した。その後、細胞溶解物を抗FLAG M2 抗体にて免疫沈降し、SDS-page後抗KDEL抗体にて免疫プロットした。FLAG-ATF6はTG処理にてGRP78/BiPとの結合の解離が認められるがFLAG-OASISはGRP78/BiPとの解離が認められない。

ATG (1 μ M), MG132 (5 μ M) for 4h**B**

IB;Anti-FLAG

**図10. HeLa細胞におけるOASIS欠失変異体の免疫染色**

(A) OASISとその各種変異体の細胞内局在を示す抗FLAG抗体を用いた間接免疫蛍光法。小胞体ストレス下内腔ドメイン欠失OASISの各免疫反応はゴルジ体と核に局在している。

(B) FLAGタグOASIS (400) ベクターを導入した細胞からの細胞溶解物のウエスタンブロッティング。表示した発現ベクターをC6細胞に導入した。30時間後、細胞を1 μ M thapsigargin (TG) 存在下で1時間培養し、それから溶解物を抗FLAG抗体にてウエスタンブロッティングを行った。

認するために、内腔ドメインを欠失するOASIS (400) 作製し、小胞体ストレス下でのOASIS (400) の細胞内局在を調査した。OASIS (400) の免疫反応性は小胞体ストレス環境で小胞体、ゴルジ体そして核にて観察された (図 10A)。OASIS (400) のウェスタンブロッティングはシングルバンドを示しており (図 10B)、それ故この変異体は切断されていない。OASIS (400) が核に存在する理由は分からないが、少なくともOASIS (400) はゴルジ体に局在できる。これまでのデータとまとめると、OASISはその内腔ドメインにゴルジ体局在のための重要な配列を持たないことを示している。

考察

これまで、CREB/ATFファミリーのbZIPを持つ転写因子であるOASISはアストロサイトにて発現している新規の小胞体ストレストランスデューサーとして判明してきた (Kondo et al. 2005)。機能解析により、OASISは小胞体ストレス環境下、膜貫通領域にて切断され、その切断されたN末端ドメインが核に移行する。核移行したN末端ドメインは転写因子としてERSEやCRE配列活性化させてGRP78/BiPのようなターゲット遺伝子の転写を活性化させていることが示された。しかし、小胞体ストレス下でのOASISの活性化に関与するメカニズムは不明なままであった。従って、この研究においては小胞体ストレス後のOASISの切断と移行システムを解析した。本研究の結果はOASISが小胞体ストレスに応じてS1PとS2Pによって切断されることを示した。ATF6, SREBPそしてLuman (Freiman et al., 1997; Raggio et al. 2002) のような他のいくつかの膜結合型bZIP転写因子もまたS1P認識モチーフを含み、そして実際これらの分子はS1P, S2PによるRIPにて切断されることが証明されている。これらのbZIP転写因子の中で、SREBPとLumanは小胞体ストレスでは切断されない (Raggio et al. 2002)。一方、ATF6とOASISは小胞体ストレスに応じて切断される。切断システムにおけるこれらの違いは小胞体ストレス後に小胞体からゴルジ体に変化する局在のためと考えられる。つまり、ATF6とOASISはそのS1Pサイトで切断される前にゴルジ体に移行する。このことは、小胞体ストレスに応じてこれらの分子がゴルジ体に移行するための特異的なメカニズムが存在している可能性を生じさせる。SREBPにとって、SCAPタンパク質はステロールによる活性化に不可欠である。SCAPはS1P切断のための準備としてゴルジ体にSREBPを送り届ける (Sakai et al. 1998a; DeBose-Boyd et al. 1999; Nohturfft et al. 2000)。SCAPの膜付着ドメインの一部にはステロール感知領域が含まれる (Nohturfft et al. 2000; Nohturfft et al. 1999)。そしてステロール存在下、SREBPをゴルジ体を送り届けるSCAPの能力は抑制される。ATF6では同様の調節的な役目を持つ補助的なタンパク質は発見されていない。通常状態において、ATF6はその内腔ドメインでGRP78/BiPと結合している (Shen et al. 2002)。更に、ATF6はその内腔ドメインにゴルジ体移行シグナルを含む。それは、GRP78/BiPの結合がゴルジ体移行シグナルを阻害することを示している (Shen et al. 2002)。しかし、小胞体からゴルジ体へ移行するためにATF6内腔のゴルジ体移行シグナルに連結する因子は発見されていない。OASISもまた小胞体ストレスに応じて切断される。従って内腔ドメインを欠失させた様々な変異体を使って、OASISが内腔ドメインにゴルジ体移行シグナルを含むかどうかを検証した。しかし、全ての欠失変異体は切断の過程とゴルジ体移行は変化がなかった。このことはOASISの小胞体内腔側ドメインがゴルジ体移行のための重要

な配列を持たないことを示している。これらの結果はOASISの活性化に必要なメカニズムはATF6とは異なることを示しており、小胞体ストレスに応じてOASISがゴルジ体に移行する他のシステムの存在、例えばOASISの細胞質側ドメインと相互作用する特異的な因子がOASISをゴルジ体を送り届けるようなシステムも考えられる。最近の報告では、ATF6はその内腔側のシステイン残基によるジスルフィド結合を形成することで通常ダイマー化しており、ATF6の活性化にはゴルジ体移行だけではなく、ATF6内腔側のジスルフィド結合の解離によるATF6モノマー化が重要であることが示されている (Nadanaka et al., 2006)。OASISの内腔側ドメインにはジスルフィド結合を形成する可能性のあるシステイン残基は含まれておらずこのことからOASISとATF6との活性化機構の違いが垣間見られる。OASISを小胞体からゴルジ体に移行させる役目を持つOASISに結合するタンパク質の存在の検証を含め、小胞体ストレスに応じて活性化するOASISの詳細なメカニズムについては更に検証が必要であろう。

まとめると、本研究の結果はOASISがS1PとS2PによるRIPによって制御される転写因子のひとつであることを示している。更に、RIPによるOASISの切断はゴルジ体への移行によって誘発される(図11)。しかし、OASISのゴルジ体局在に関与する結合タンパク質の検証を含め、OASISの移行メカニズムの詳細は不明なままである。OASISのゴルジ体移行の方法を解明することは、アストロサイトにおいて小胞体ストレス応答がどのように制御されてストレス抵抗性を向上させているのかを理解するのに役立つであろう。

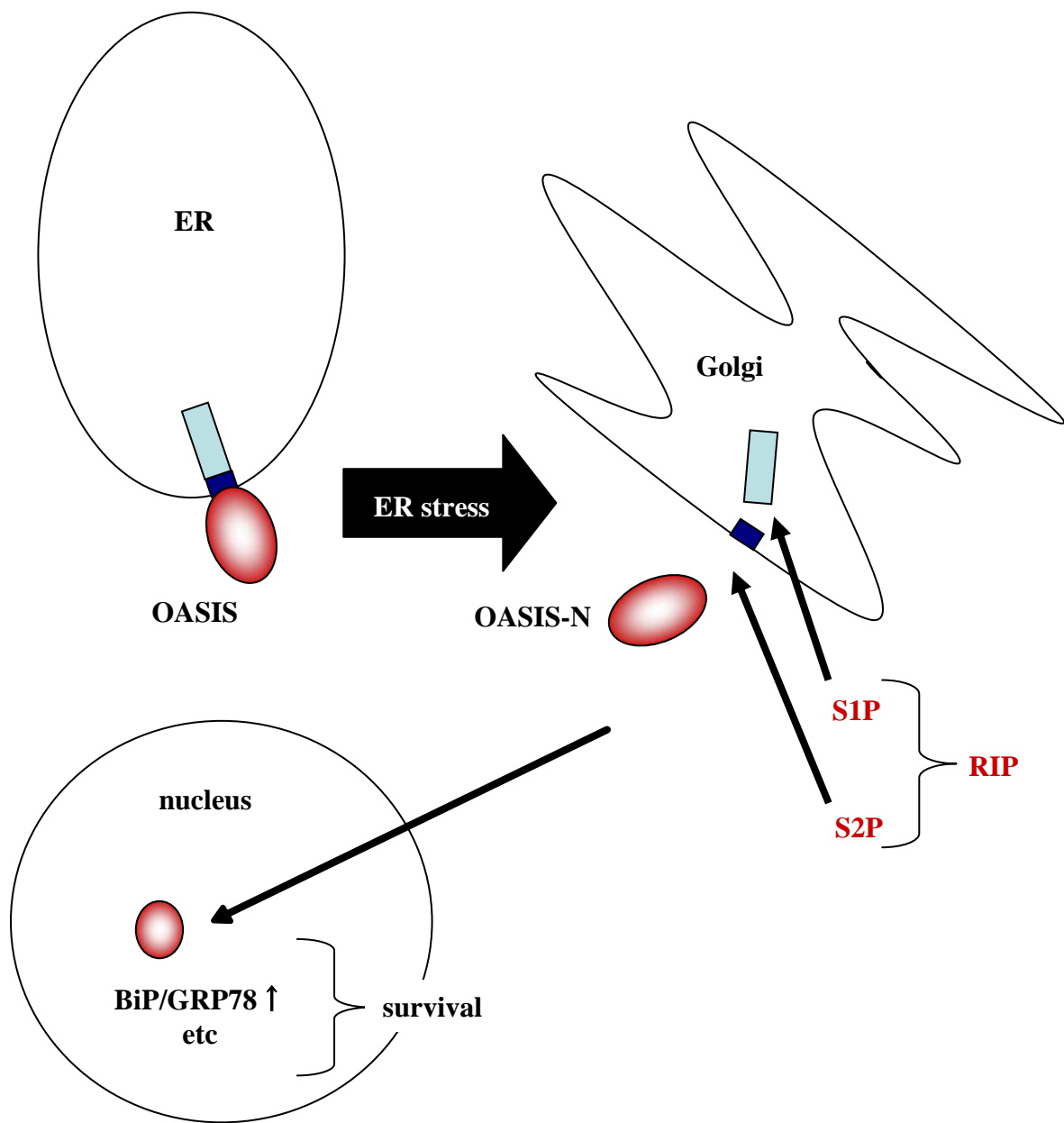


図11. アストロサイトの小胞体ストレス応答におけるOASISの切断機構

第2章

神経細胞の樹状突起における小胞体ストレス応答の解析

序論

小胞体は膜貫通型や分泌型タンパク質の適切な組み立てや局在を担う重要な細胞小器官である。タンパク質の糖鎖付加の阻害、変異タンパク質の発現、カルシウムホメオスタシスの攪乱など、生理的なあるいは薬理的なストレスの下、折り畳み不全のタンパク質が小胞体内腔に蓄積する。もしストレスが過剰あるいは長期間であれば、カスパーゼ 12 及びカスパーゼ 3, ASK1-JNK 経路の活性化を含むアポトーシス様の細胞死が起こる (Nakagawa et al., 2000; Urano et al., 2000; Nishitoh et al., 2002)。しかし、真核細胞はまず適応、生存するために小胞体ストレス応答を行うことによって小胞体ストレスを回避しようとする (Mori, 2000; Kaufman, 2002; Schroder et al., 2005)。小胞体ストレスセンサーは小胞体ストレス応答のシグナル変換の重要な役割を担っている。哺乳類の細胞では小胞体ストレスセンサーとして IRE1, PERK, ATF6 の三つの分子がよく知られており、これらの分子は小胞体内腔の折り畳み不全タンパク質の存在を感知する。小胞体ストレスから細胞を守るために、小胞体シャペロンをコードする小胞体ストレス応答のターゲット遺伝子の転写増加は折り畳み不全タンパク質の正しい組み立てを促進する。近年、小胞体ストレスがアルツハイマー病やパーキンソン病など様々な神経変性疾患における神経細胞死に関連するという報告がされている (Katayama et al., 1999; Imaizumi et al., 2001; Imai et al., 2001)。しかし、小胞体ストレスが実際患者脳内の神経細胞にて起こっているのかどうか不明である。神経変性疾患における小胞体ストレスと神経細胞死の関連を証明するには個々の神経細胞における小胞体ストレスを可視化することが重要であろう。神経細胞は細胞体だけでなく樹状突起内にも小胞体を含む。樹状突起内の小胞体は局所的タンパク合成能力を持っているが (Torre et al., 1996; Ju et al., 2004)、小胞体ストレスと小胞体ストレス応答が樹状突起内で起こるかどうか定かではない。神経の過剰興奮はシナプスを介してターゲット側神経細胞に興奮性毒性を引き起こす。シナプス近傍の小胞体では刺激に応じてカルシウムの流出、タンパク質のソーティングや分泌が行われており、神経の過剰興奮の際に樹状突起のシナプス近傍の小胞体で小胞体ストレスが生じている可能性がある。アルツハイマー病などではシナプスの機能異常から神経細胞の障害、更には神経細胞死を起こして、発症につながるというシナプス仮説が提唱されており (Terry et al., 1991)、小胞体ストレスがシナプス機能を修飾して病態形成に関わっていることも十分考えられる。従って、樹状突起内で小胞体ストレスあるいはその応答を検知し、それらの存在を明らかにできればアルツハイマー病の病態解明につながる事が期待できる。

本研究では、樹状突起における小胞体ストレスおよびその応答を検討するた

め、神経初代培養における小胞体ストレスセンサーの局在を調べた。更に小胞体ストレス下、小胞体ストレス応答のシグナル経路の一つであり、進化の過程でもっとも保存されている経路であるIRE1-XBP1経路の活性化が樹状突起上でも起こりうるかの検討を行った。

材料と方法

1. 神経初代培養

マウスはNihon SLC, Shizuoka, JapanよりddYマウスを購入した。海馬神経初代培養はマウスの胎生18日目胎仔の海馬より採取した。解離した海馬組織の細胞分散用酵素液として、10mlのPBS (-) にDL-Cysteine HCl (sigma) 2mg, BSA 2mg, D-グルコース 50mgを37°Cで溶かし、そこに90 unitsのパパイン (Sigma, St. Louis, MO, USA)を加えほぼ透明になったところで更に50 μ l DNase Iを加えフィルター滅菌し細胞分散用酵素液とした。この細胞分散用酵素液にて海馬組織を37°Cで20分間処理し分散させ、細胞はポリエチレンイミン (Sigma) にてコーティングしたカバーガラス上にまいた。培養液はNeurobasal mediumに最終濃度が2% B27と0.5mM L-glutamineになるようにB27とL-glutamineを添加したものをを用い、1日おきに培溶液を換えた (全てInvitrogen, Carlsbad, CA, USA)。グリア細胞の増殖を抑えるために4-5日間5-Fluoro-2'-deoxyuridineとuridine (10 μ M) を培養液に添加した。細胞をまいて7日後、TransFectin Lipid Reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を使って製品マニュアルに従いトランスフェクションした。小胞体ストレス誘導剤としてtunicamycin (Sigma, St Louis, MO, USA) を使った。コントロールは培養液交換だけを行った。

2. プラスミド

GFP融合プラスミドはpc-FLAG-human ATF6 (Ron Prywes博士(Columbia University, New York, NY, USA) より快く提供して頂いた), pc-human IRE1- α (浦野文彦博士 (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA) より快く提供して頂いた), pUB6-mouse PERK-Myc (David Ron博士 (New York University School of Medicine, New York, NY, USA) より快く提供して頂いた) をテンプレートとしてPCRを用いて作製した。GFP融合によるタンパクの局在阻害を避けるために、各タンパク質の細胞質側の端にGFPを融合した。非翻訳領域 Untranslated region (UTR) を含むMouse XBP1 cDNAは海馬神経初代培養から回収したRNAの逆転写産物からPCRにより得た。全てのプラスミドはpcDNA3.1 (+) (Invitrogen) に導入した。

3. ウェスタンブロッティングと抗体

ウェスタンブロッティング用細胞溶解液は0.9% sodium dodecyl sulfate (SDS), 15 mM EDTA, 8 mM methionineとプロテアーゼインヒビターカクテルを100°Cで10分間ボイルし、冷却後0.3% sodium dodecyl sulfate, 33 mM Tris/acetate, pH 8.5, 1.7% Triton X-100 になるように100mM Tris/acetate, pH 8.5, 5% Triton X-100を加え細

胞溶解液とした (Erickson and Blobel 1979)。細胞溶解は氷上で1時間行い、この後15000rpmで5分遠心し上清を回収した。上清にSDSサンプルバッファーを加え、100°Cで5分間ボイル後、氷上にて冷却しウエスタングロテイング用サンプルとした。サンプルは等量のタンパク量を10% SDS-polyacrylamide ゲルにて電気泳動し、PVDFメンブレンに転写した。転写後のメンブレンはMembrane blocking agent (GE Healthcare, UK) を用いて室温1時間ブロッキング後、各一次抗体を反応させた。使用した抗体は抗KDEL抗体 (StressGen Biotechnologies, Collegeville, PA, USA), 抗リン酸化型eIF2 α 抗体 (anti-eIF2 α -P) (StressGen), 抗 β -actin抗体 (Sigma)である。リン酸化型eIF2 α の検出用細胞溶解液にはホスファターゼインヒビター (Sigma) を加えた。ウエスタングロテイングの数量化はScion Image software (Scion, Frederick, MD, USA) を用いて行った。

4. 免疫染色

神経細胞の免疫染色のために細胞は4% パラフォルムアルデヒドにて4°Cで20分間固定し、0.1% Triton X-100を含むPBS (-) に4°C、20分で透過処理した。3% BSAを含むPBS (-) にてブロッキングを行い、一次抗体としてマウス抗MAP2モノクローナル抗体 (Sigma), 抗リン酸化型eIF2 α 抗体, 抗GRP78/BiP抗体 (MBL, Nagoya, Japan), 抗KDEL抗体, 抗リン酸化型IRE1 α 抗体 (浦野文彦博士 (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA) より快く提供して頂いた) を用いて行った。一次抗体を視覚化するために二次抗体としてalexa標識ヤギ抗ウサギIgG抗体, alexa標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), fluorescein標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA)を使用した。抗体希釈液として3% BSAを含むPBS (-) を用いた。染色した細胞は蛍光顕微鏡あるいは共焦点顕微鏡 (Leica DMIRE2, Wetzlar, Germany) にて観察した。蛍光強度の解析には蛍光顕微鏡 (Eclipse TE2000-U) (Nikon, Kanagawa, Japan) にて撮影した画像を使ってLumina Vision software (Mitani Corporation, Fukui, Japan) で蛍光強度の数値化を行った。樹状突起の蛍光強度を数量化するためにImage-Pro Plus softwareのLine Profile (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) を用いた。

5. *In situ* ハイブリダイゼーション

IRE1によってスプライシングされる領域以降からpolyA シグナルまでのbZIPを含まないXBP1 プロンプ (1266 bp) はpc-XBP1プラスミドをテンプレートとし下記のプライマーを用いたPCRにて作製した。

mouse XBP1-in situ-fwd CAGCAGGTGCAGGCCAGTTGTC

mouse XBP1-in situ-rev GCAAGGGTAGTTTTAAATAAATGGAG

XBP1 プローブはpGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) に挿入した。Digoxigenin標識アンチセンスとセンスプローブはDIG RNA labeling mix (Roche, Basel, Switzerland) を用いて線形化したプラスミドから合成した。*In situ* ハイブリダイゼーションはMori et al., 2000に記述されているように行った。

結果

哺乳類細胞の細胞は小胞体ストレス状態になると生存するために小胞体ストレス応答を行い、その結果小胞体のタンパク質の折り畳みを促進させるためにGRP78/BiPのような小胞体シャペロンを増加させ、また翻訳抑制のためにeukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α) がリン酸化される (Ron, 2002)。このことよりGRP78/BiPの増加やeIF2 α のリン酸化を調べることで、小胞体ストレス応答が活性化しているかどうかあるいは小胞体内腔のストレスの基本的な指標となる。樹状突起内で小胞体ストレスや小胞体ストレス応答が生じるかどうかを検証するために、まず小胞体ストレス負荷後の海馬神経初代培養を用いて抗GRP78/BiP抗体および抗リン酸化型eukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α -P) 抗体による免疫染色を解析した。N結合型糖鎖修飾阻害剤であるtunicamycinを小胞体ストレス誘導剤として使った。GRP78/BiPの免疫反応性は小胞体ストレス下でMAP2免疫反応性と重なる神経細胞にて上昇した (図 12A)。免疫反応性の上昇は樹状突起でも認められた。更に、樹状突起の蛍光強度の定量分析によりGRP78/BiPの蛍光強度が樹状突起、少なくとも細胞体から90 μ m以内で上昇していることがわかった (図 12A, B)。初代培養の溶解物を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、GRP78/BiPタンパク質の総量もまた小胞体ストレス下で増加していることがわかった (図 12C)。リン酸化型eIF2 α の免疫反応性もまたGRP78/BiPの場合と同様に細胞体だけでなく樹状突起においても上昇していた (図 13A, B)。そしてリン酸化型eIF2 α タンパク質の総量もまた増加していた (図 13C)。これらの結果は小胞体ストレスとその応答は神経細胞の細胞体と樹状突起の両方で起こりうることを示唆している。小胞体ストレス負荷により樹状突起にて小胞体ストレス応答の下流シグナルが活性化するので、小胞体ストレスセンサーが樹状突起に局在する可能性がある。そこで、神経初代培養にて三つのよく知られた小胞体ストレスセンサーであるIRE1, PERK, ATF6の細胞内局在を調べた。これらの分子は発現量が少なく、内在性の免疫染色が難しい。それ故、神経細胞にGFP融合小胞体ストレスセンサーをトランスフェクションし、共焦点顕微鏡を使ってこれら小胞体ストレスセンサーの局在を検討した。その結果、各GFP融合小胞体ストレスセンサーの強い自己蛍光が細胞体で観察された (図 14)。加えて、MAP2陽性神経突起内でもGFP由来の蛍光が検出された。このことはGFP由来の蛍光を含むこれら神経突起は樹状突起であり、小胞体ストレスセンサーは樹状突起に局在する能力を持っていることを示している。各小胞体ストレスセンサーが樹状突起の小胞体に分配されるかを確認するために、GFP融合小胞体ストレスセンサーをトランスフェクションした神経細胞において小胞体マーカーとして使われる抗KDEL抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、各センサーのGFPシグナル

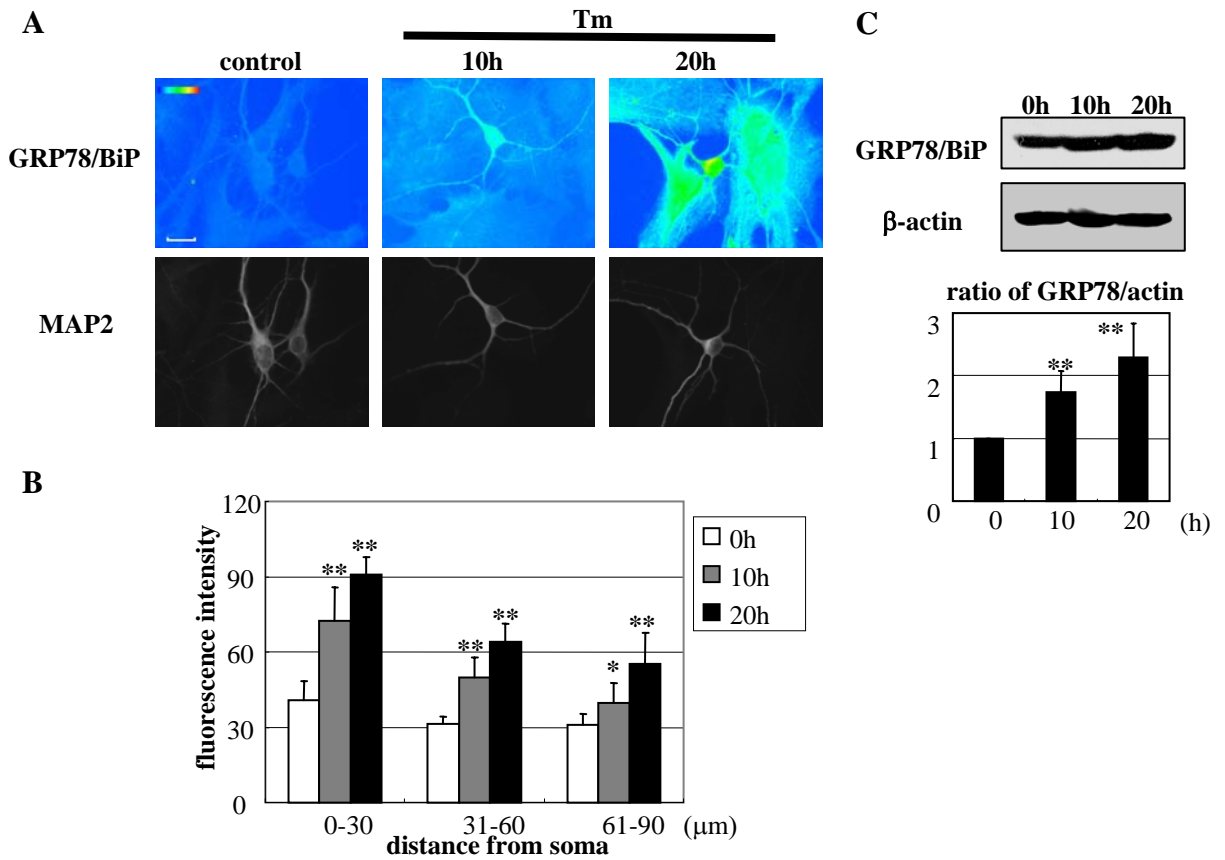


図12. 小胞体ストレスに応答して樹状突起内でGRP78/BiPは増加する

(A) 海馬神経初代培養を表示した時間3 μg/ml tunicamycin (Tm) で処理し、そしてそれから抗 GRP78/BiP (UPRにおいて増加する小胞体シャペロンの一つ) 抗体、そして抗MAP-2 (神経細胞あるいは樹状突起マーカー) 抗体で免疫染色した。GRP78/BiPの免疫反応性は小胞体ストレス後時間依存的に細胞体だけでなく樹状突起においても上昇する。(scale bar = 20μm)

(B) Image-Pro softwareを使った樹状突起に対する蛍光強度の定量解析 (n=10)。アスタリスクはコントロールからの統計的有意差を示している (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's *t*-test)。

(C) 表示している時間3 μg/ml Tmで処理した初代培養からの細胞溶解物のウエスタンブロッティング。中間のパネルはコントロールとして用いたβ-actinのウエスタンブロッティングを示す。下のパネルは4つの独立した実験からのプロットの定量解析を示す。アスタリスクはコントロールからの統計的有意差を示している (** $P < 0.01$, Student's *t*-test)。

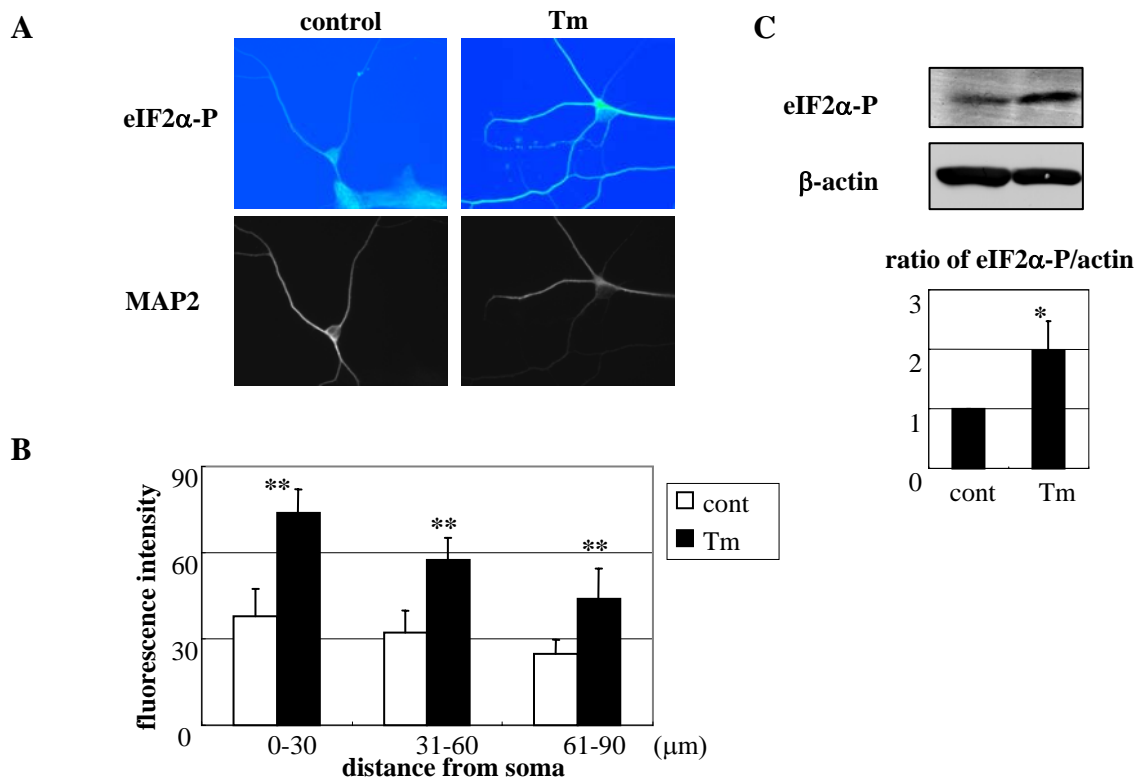


図13. 小胞体ストレスに応じて樹状突起内でeIF2αはリン酸化される

(A) 海馬神経初代培養を三時間3 μg/ml Tmで処理し、それから抗リン酸化eIF2α抗体 (anti-eIF2α-P) と抗MAP2抗体にて免疫染色した。

(B) 樹状突起におけるリン酸化eIF2αの蛍光強度の定量解析 ($n=10$)。アスタリスクはコントロールからの統計的有意差を示している (** $P<0.01$, Student's t -test)。

(C) 3 μg/ml Tmで3時間処理した初代培養からの細胞溶解液のウェスタンブロッティング。下のパネルは4つの独立した実験からのプロットの定量解析を示す。アスタリスクはコントロールからの統計的有意差を示している (* $P<0.05$, Student's t -test)。

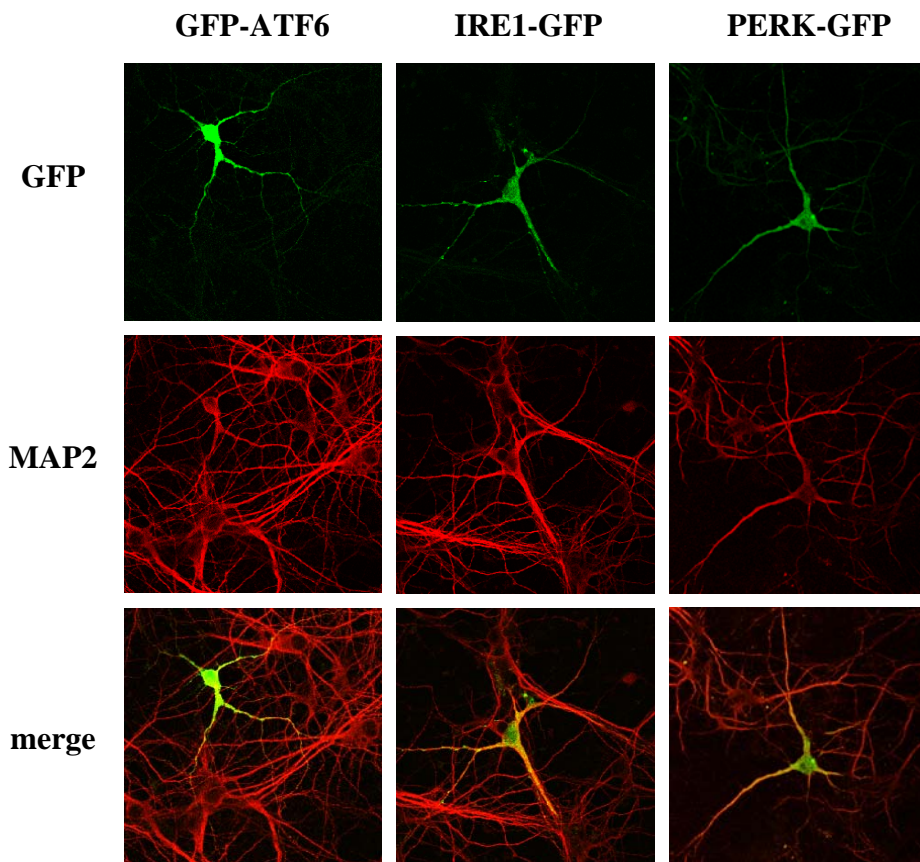


図14. 各小胞体ストレスセンサーは細胞体だけではなく樹状突起にも局在する
 海馬神経細胞の初代培養にGFP-ATF6, IRE1そしてPERKの発現ベクターを導入し、それから抗MAP2
 抗体で染色した。各GFP融合タンパク質の自己蛍光はMAP2の免疫反応と重なる。画像は共焦点顕
 微鏡を用いて取得した。

は細胞体と樹状突起の小胞体マーカーの免疫反応性と重なった (図 15A, B)。これらのデータは小胞体ストレスセンサーが初代神経細胞の樹状突起の小胞体に局在できうることを示している。次に、樹状突起内の小胞体ストレスセンサーが活性化するかどうかを調べるために、IRE1に着目した。なぜならばIRE1シグナルは進化を通してもっとも保存されており、またIRE1のリン酸化型すなわち、活性化型は抗リン酸化IRE1 (IRE1-P) 抗体を使うことで容易に検出できるからである。そこでIRE1-GFPの発現ベクターをトランスフェクションした初代神経細胞を用いて免疫染色を行った (図 16A)。通常時、IRE1-GFPを発現する神経細胞内の抗IRE1-P抗体の免疫反応性は比較的低いパーセントの神経細胞にて観察された。対照的に、小胞体ストレス下、IRE1-GFPを発現する神経細胞のおよそ50%にて免疫反応性が細胞体と樹状突起にて観察された (図 16B)。このことはIRE1が細胞体と同様に樹状突起内でもリン酸化され活性化されることを示している。しかし、現状のデータからIRE1が細胞体でリン酸化され、それから樹状突起に移行する可能性を完全には除外できない。小胞体ストレス下でIRE1のリン酸化が全ての神経細胞にて観察できない詳細な理由は分からないが、一つの可能性としてはtunicamycin処理後1時間ではいくつかの神経細胞にて過剰発現のIRE1がまだ完全には活性化していない、あるいは少なくとも抗IRE1-P抗体によって検出できるリン酸化レベルに達していないのであろう。IRE1はRNase L ドメインを細胞質領域に含み、小胞体ストレスに応じてRNase L ドメインを活性化させる。RNase L ドメインはXBP1 mRNAのスプライシングに必要であり (Yoshida et al., 2001)、このスプライシングは非神経細胞では細胞質で起こる (Back et al., 2006)。従って、樹状突起内のIRE1からのシグナルが変換されるためには、XBP1 mRNAが樹状突起内に存在することが必要とされる。神経細胞においてCAMKII mRNAなどのいくつかのmRNAはシス作用樹状突起ターゲティングエレメントを含む (Mori et al., 2000)。これらのmRNAは核から樹状突起に移行し局所的タンパク質合成にて翻訳される (Sutton and Schuman, 2005)。それ故、XBP1 mRNAは樹状突起に存在し、このmRNAは小胞体ストレスに応じて樹状突起のIRE1によって局所的にスプライシングされるのではないかという仮説を立てた (図 17)。もしXBP1 mRNAが樹状突起にてスプライシングされるなら、スプライシングされたmRNAは活性型XBP1に翻訳される。なぜならば一式の翻訳装置は樹状突起の細胞質に存在するからである。この仮説を検証するために、XBP1 mRNAの細胞内局在を調べた。3'UTRを含むXBP1発現ベクターを初代神経細胞にトランスフェクションし、XBP1 mRNAに対する*in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。その結果、XBP1 mRNAのシグナルは細胞体だけでなく近位樹状突起においても観察された (図 16C)。この結果と樹状突起のIRE1の活性化をまとめると、少なくともIRE1-XBP1経路を含む小胞体ストレス応答が小胞

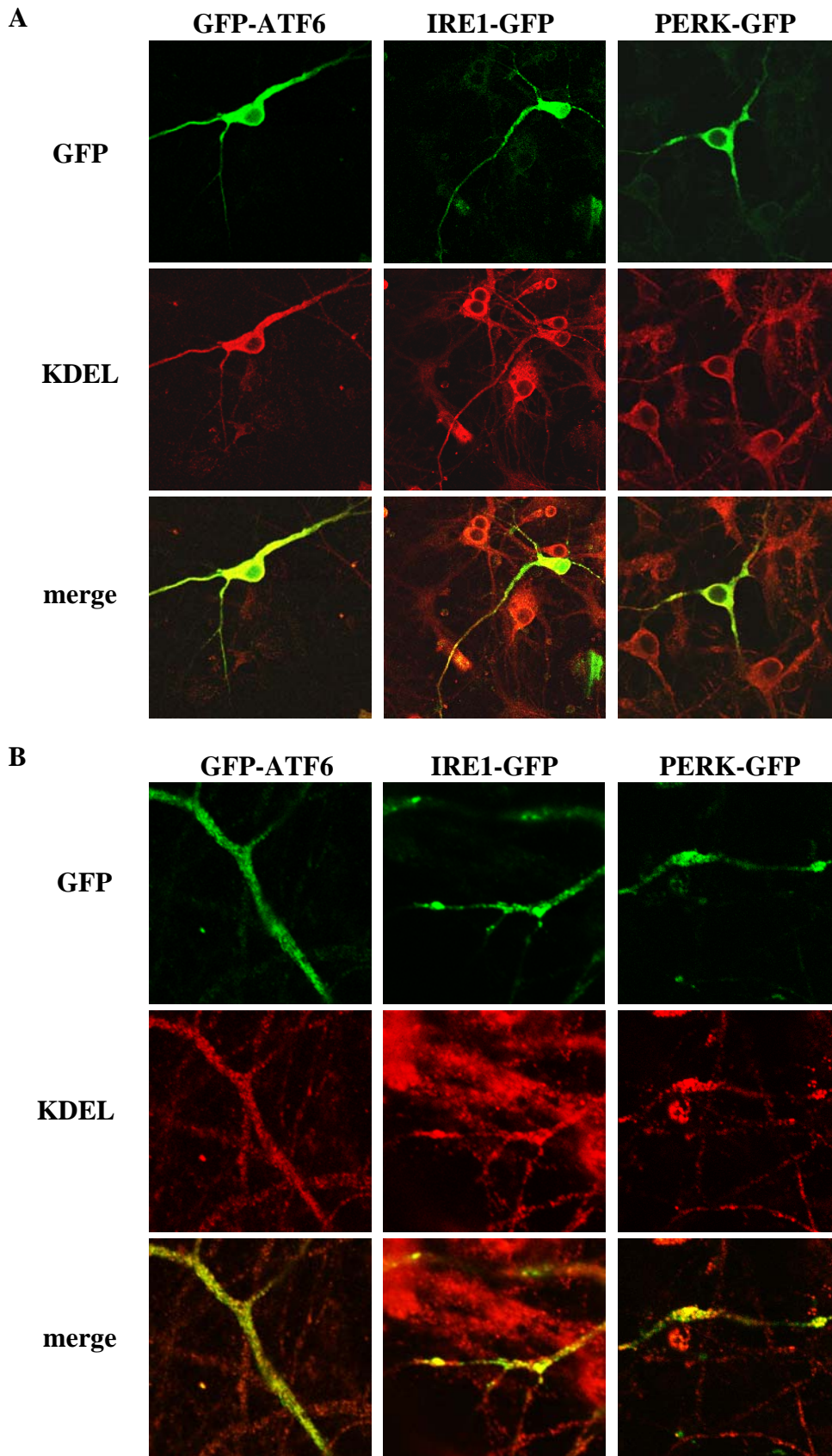


図15. 各小胞体ストレスセンサーは樹状突起の小胞体に局在する
 (A) 海馬神経の初代培養を抗KDEL抗体(小胞体マーカー)にて免疫染色した。各GFP融合タンパク質の自己蛍光はKDELの免疫反応と重なる。
 (B) 樹状突起の拡大図。

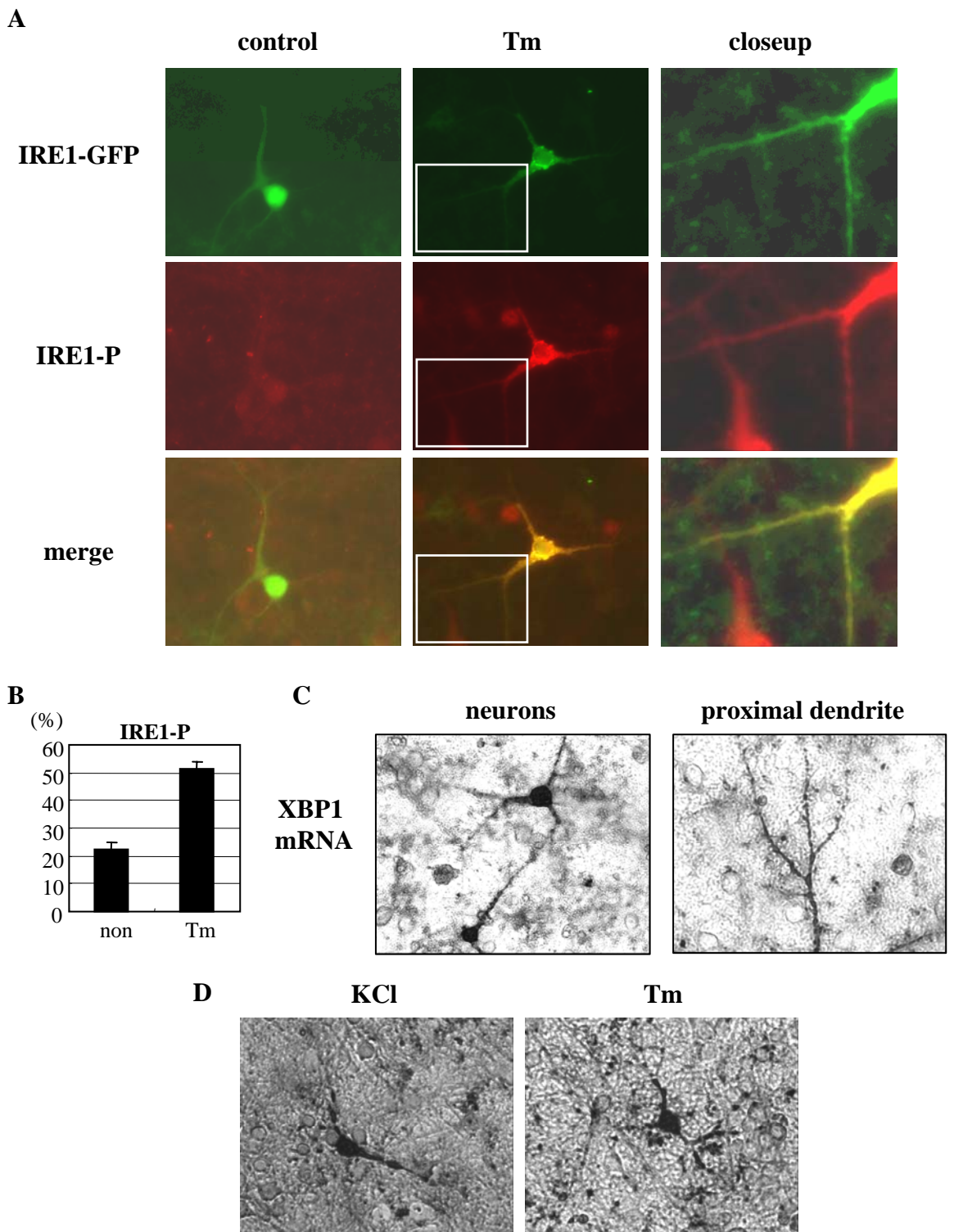


図16. IRE1は小胞体ストレスに応じて樹状突起にて活性化される

(A) IRE1-GFP発現ベクターを導入した海馬神経初代培養を1時間3 $\mu\text{g/ml}$ tunicamycin (Tm) にて処理し、抗リン酸化IRE1抗体 (anti-IRE1-P) で免疫染色した。IRE1は小胞体ストレスに反応して細胞体だけではなく樹状突起でも自己リン酸化される。右のパネルは白い四角の拡大図である。

(B) 三つの独立した実験からのIRE1-GFP導入神経細胞におけるIRE1-P陽性細胞の割合を示す (総細胞数: control, 45細胞; Tm, 37細胞)。

(C) pc-XBP1を導入した神経細胞におけるXBP1 mRNAの細胞内局在の*In situ* ハイブリダイゼーション解析。XBP1 mRNAは細胞体と近位樹状突起にて観察される。

(D) pc-XBP1を導入した神経細胞を25 mM KCl 3時間処理し、それから12時間通常培養液にて培養した後の*In situ* ハイブリダイゼーション解析および3 $\mu\text{g/ml}$ Tm 3時間処理後の*In situ* ハイブリダイゼーション解析。それぞれXBP1 mRNAの局在は変化しない。

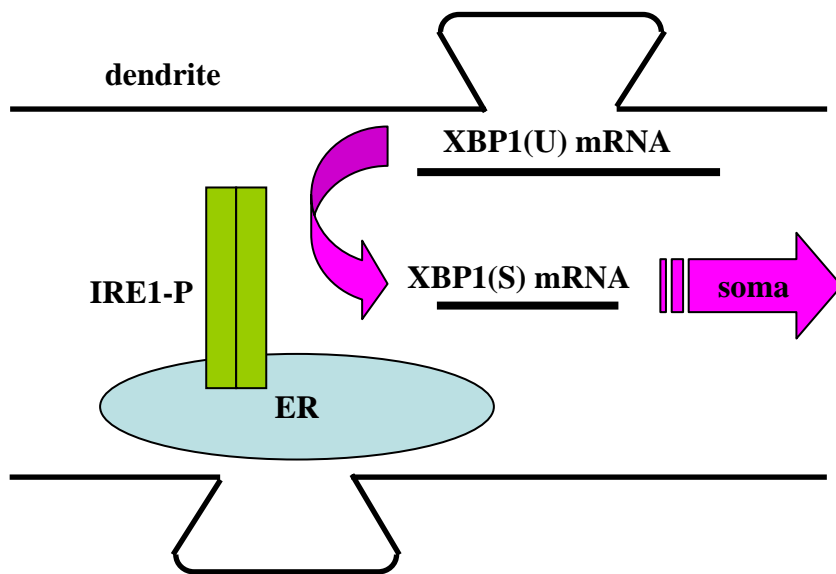


図17. 提案される樹状突起におけるIRE1-XBP1シグナルの概略図

XBP1 (U) mRNAとXBP1 (S) mRNAはXBP1 mRNAのそれぞれスプライシングされていない型とスプライシングされた型のXBP1 mRNAを表す。

体ストレスに応答して近位樹状突起で局所的に活性化しうることを示している。CAMKII mRNAの場合、このmRNAは25 mM KCl処理による脱分極後樹状突起に移行する (Mori et al., 2000)。XBP1 mRNAが樹状突起に脱分極あるいは小胞体ストレスに応じて移行するかどうか調べるために、それぞれの刺激後のXBP1 mRNAの局在を調べた。しかし、脱分極や小胞体ストレスどちらもXBP1 mRNAの樹状突起への移行の増加を検出できなかった (図 16D)。

考察

これまでの研究において、樹状突起の小胞体はタンパク質合成とシグナル変換のために開放されるカルシウムイオンの細胞内保管場所としての役割を持つ。樹状突起内でのタンパク質合成の概念は、樹状突起がeIF2やGRP78/BiPなどの翻訳機構、組み立て、糖鎖修飾の要素を含み、また小胞体—ゴルジ体輸送経路を保有することからも指示される (Gardioli et al., 1999; Horton et al., 2003)。神経細胞において、小胞体で合成される神経伝達物質受容体をコードするmRNAを含む多くのmRNAが樹状突起内に局在しており (Miyashiro et al., 1994; Eberwine et al., 2002)、また細胞内膜性構造体、つまり分泌経路を含む粗面小胞体とゴルジ体は樹状突起に伸張できる (Torre et al., 1996)。局所的タンパク質合成に適応するため、樹状突起内で小胞体ストレス応答のような合成されたタンパク質の品質管理をするシステムが必要であると考えられる。本研究において小胞体ストレス応答機構が樹状突起にて存在でき、小胞体ストレスに応じて活性化できることを示した。これは品質管理システムが神経細胞の樹状突起に存在し、小胞体ストレス下で折り畳み不全タンパク質を処理する能力をもつことを示す初めての報告である。樹状突起の小胞体にて小胞体ストレスや小胞体ストレス応答が起こるかどうかを検証するために、海馬神経細胞の初代培養を用いた。GRP78/BiPとリン酸化eIF2 α が小胞体ストレスに応じて樹状突起にて増加することを見出した。このことは、樹状突起の小胞体はシナプスの機能や神経の可塑性に必要な局所的タンパク質合成の機能を維持するためにタンパク質の品質管理能力を保持しうることを示している (Sutton et al., 2005)。各小胞体ストレスセンサーもまた樹状突起に存在できることがわかった。これらのデータは、神経細胞は細胞レベルだけでなく樹状突起レベルあるいはより局所的レベルにおいてさえストレスを局所的に感知し小胞体ストレス応答を活性化することでストレスに適応できる可能性を想像させる。実際、IRE1が存在し小胞体ストレスに応じて活性化できる近位樹状突起にXBP1 mRNAが局在していた。XBP1 mRNAの局在については最近他のグループからも報告され、発達段階のマウス脳においてXBP1 mRNAが神経突起内に存在することが*in situ* ハイブリダイゼーションにより示されている (Hayashi et al., 2007)。樹状突起におけるXBP1 mRNAの局在は興味深い。XBP1 mRNAの配列内で、知られたシス作用樹状突起ターゲティングエレメントを見つけることができなかった。樹状突起内のXBP1 mRNAの局在のメカニズム解明には更なる研究が必要であろう。IRE1はまたその細胞質側領域にキナーゼドメインを含み、小胞体ストレスに応じてそのキナーゼドメインを活性化する。このキナーゼドメインはASK1-JNK経路の活性化に必要である。JNKは免疫染色の解析によりMAP2陽性の樹状突起内に局在することが報告されて

いる (Bjorkblom et al., 2005)。このことより、上記で示したようにIRE1は樹状突起にてリン酸化され活性化できるためIRE1-JNK経路が小胞体ストレスに応じて樹状突起で活性化することは十分考えられる。

シノラブディス・エレガンスにおいて、樹状突起のポストシナプスに定着し、central nervous system (CNS) の興奮性のシグナルの多くを調節するAMPA型グルタミン受容体の小胞体からの輸出は小胞体ストレス応答によって制御されている (Shim et al., 2004)。更に最近の報告において、N-methyl-D-aspartate (NMDA) を皮質神経培養に処置するとIRE1が活性化され、それに続きXBP1 mRNAのスプライシングが起きCHOP mRNAが増加することが示された (Uehara et al., 2006)。NMDA型グルタミン受容体はポストシナプス膜に存在するグルタミン依存性イオンチャネルで、そのカルシウムイオンの透過性はシナプスの可塑性の特徴の基礎をなす。これらの報告は樹状突起内の小胞体ストレス応答がグルタミン受容体の制御によってシナプスの機能と結び付けられることや、NMDA受容体を通して過剰なカルシウムイオン流入が起こることで小胞体ストレスにつながり神経細胞死に至る可能性を指し示しており、小胞体ストレスとその応答が樹状突起にて起こるといふ本研究の結論を支持している。

本研究において、樹状突起の小胞体は小胞体ストレスに応答でき、タンパク質の品質管理の能力を保持していることを提唱する。折り畳み不全あるいは異常な折り畳みタンパク質が樹状突起の小胞体に蓄積した時、タンパク質の折り畳みを促進するために小胞体ストレス応答のシグナルが樹状突起から核に伝わるであろう。しかし、樹状突起における品質管理が神経細胞の生存にどのくらい大切かは不明なままである。またこの研究におけるタンパク質の過剰発現が本来の局在に影響を及ぼしている可能性もある。神経細胞における更なる小胞体ストレス応答の可視化が細胞体と樹状突起の小胞体における品質管理の存在とその重要性を明らかにするであろう。

総括

今回、第1章ではアストロサイトにおける小胞体ストレス応答として OASIS に着目し、OASIS が S1P と S2P による二段階切断によって制御される転写因子のひとつであること、OASIS の切断は小胞体からゴルジ体への移行によって誘発されることを明らかにした。また、第2章では神経細胞の樹状突起における小胞体ストレス応答に着目し、樹状突起の小胞体も細胞体の小胞体同様小胞体ストレスに応答し、タンパク質の品質管理の能力を保持する可能性を示した。

神経変性疾患における神経細胞死のメカニズムは未だ解明されていない点が多い。例えばアルツハイマー病では $A\beta$ が発症に密接に関連することが以前から考えられてきたが、 $A\beta$ の蓄積だけでは神経細胞死のメカニズムを全て説明することはできない。患者脳ではおそらく加齢やストレスに伴う様々な危険因子が $A\beta$ と関連しながら神経細胞死を徐々に進行させていると思われる。小胞体ストレスも危険因子の一つであろう。小胞体ストレスと疾患の関連が注目される中、小胞体ストレス応答関連分子をターゲットにした創薬研究も行なわれている (Kudo et al., 2008; Boyce et al., 2005)。今回の OASIS というアストロサイト特異的な小胞体ストレストランスデューサーの解析により、OASIS の活性化に必要なプロテアーゼは S1P, S2P であり、これらプロテアーゼはユビキタスに発現していることから、OASIS を神経細胞に導入できれば OASIS は神経細胞内で活性化できることが伺える。つまり上記の創薬研究に加え、OASIS を神経細胞に導入することで小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制できる可能性が開かれた。また、樹状突起内の小胞体が小胞体ストレス応答つまりタンパク質の品質管理の能力を持つ事は神経の過剰興奮の際にシナプス局所で小胞体ストレスが生じる可能性を示し、更にアルツハイマー病などのシナプスの機能異常から発症につながるというシナプス仮説においても小胞体ストレスが関与する可能性を示している。

神経系細胞における小胞体ストレス応答機構の全容解明が成されれば、神経変性疾患の病態解明と治療法確立につながることを期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、様々なアドバイスや機会を与えてくださったバイオサイエンス研究科細胞構造学講座の塩坂貞夫教授に深く感謝申し上げます。また研究の基礎からだけではなく研究の姿勢から直接ご指導し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今泉和則教授に心より感謝申し上げます。更に、研究だけでなく様々なサポートをしてくだされたバイオサイエンス研究科細胞構造学講座の石川保幸助教・駒井章治助教・田村英紀助教、宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物分野の吉永一也准教授・近藤慎一助教・日野真一郎助教及び講座の皆様感謝申し上げます。共同研究者として様々なアドバイスをしてくだされた奈良県立医科大学第二解剖分子機能形態学講座和中明生教授に感謝いたします。最後に、私を常に応援してくれた両親に感謝いたします。

参考文献

- Back, S. H., Lee, K., Vink, E., and Kaufman, R. J. (2006). Cytoplasmic IRE1alpha mediated XBP1 mRNA splicing in the absence of nuclear processing and ER stress. *J Biol Chem* 281, 18691–18706.
- Bjorkblom, B., Ostman, N., Hongisto, V., Komarovski, V., Filen, J. J., Nyman, T. A., Kallunki, T., Courtney, M. J., and Coffey, E. T. (2005). Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *J Neurosci* 25, 6350–6361.
- Boyce, M., Bryant, K. F., Jousse, C., Long, K., Harding, H. P., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Ma, D., Coen, D. M., Ron, D., and Yuan, J. (2005) A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935 – 939.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 11 041–11 048.
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B. and Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391–398.
- Chen, X., Shen, J., and Prywes, R. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J. Biol. Chem.* 277, 13045–13052.
- DeBose-Boyd, R. A., Brown, M. S., Li, W. P., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., and Espenshade, P. J. (1999). Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* 99, 703–712.
- Duncan, E. A., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Sakai, J. (1997). Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 272, 12778–12785.

- Duncan, E. A., Dave, U. P., Sakai, J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1998). Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J. Biol. Chem.* 273, 17801–17809.
- Eberwine, J., Belt, B., Kacharina, J. E., and Miyashiro, K. (2002). Analysis of subcellularly localized mRNAs using in situ hybridization, mRNA amplification, and expression profiling. *Neurochem* 27, 1065–1077.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 181-191.
- Erickson, A. H., and Blobel, G. (1979). Early events in the biosynthesis of the lysosomal enzyme cathepsin D. *J. Biol. Chem.* 254, 11771–11774.
- Espenshade, P. J., Cheng, D., Goldstein, J. L., and 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.
- Freiman, R. N., and Herr, W. (1997). Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. *Genes Dev.* 11, 3122–3127.
- Gardiol, A., Racca, C., and Triller, A. (1999). Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *J Neurosci* 19, 168–179.
- Guo, Q., Sopher, B. L., Furukawa, K., Pham, D. G., Robinson, N., Martin, G. M., and Mattson, M. P. (1997). Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 17, 4212-4222.
- Hayashi, A., Kasahara, T., Iwamoto, K., Ishiwata, M., Kametani, M., Kakiuchi, C., Furuichi, T., and Kato, T. (2007). The Role of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-induced XBP1 Splicing during Brain Development. *J Biol Chem* 282, 34525-34534.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T.,

Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., and Tohyama, M. (2004). Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol.* 165, 347-356.

Hoozemans, J. J., Veerhuis, R., Van Haastert, E. S., Rozemuller, J. M., Baas, F., Eikelenboom, P., and Scheper, W. (2005). The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 110, 165–172.

Horton, A. C., and Ehlers, M. D. (2003). Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. *J Neurosci* 23, 6188–6199.

Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., and Takahashi, R. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105, 891–902.

Imaizumi, K., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001). Presenilin and the UPR. *Nat Cell Biol* 3, E104.

Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Garner, C. C., Tsien, R. Y., Ellisman, M. H., and Malenka, R. C. (2004). Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci* 7, 244–253.

Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., St George-Hyslop, P., Takeda, M., and Tohyama, M. (1999). Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 1, 479–485.

Kaufman, R. J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J.Clin. Invest.* 110, 1389–1398.

Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A., and Imaizumi, K. (2005). OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat Cell Biol.* 7, 186–194.

Kudo, T., Kanemoto, S., Hara, H., Morimoto, N., Morihara, T., Kimura, R., Tabira, T., Imaizumi, K., and Takeda, M. (2008). A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death and Differentiation* 15, 364-375.

Lindholm, D., Wootz, H., and Korhonen, L. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation* 13, 385–392.

Miyashiro, K., Dichter, M., and Eberwine, J. (1994). On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: implications for neuronal functioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10800–10804.

Mori, K. (2000). Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101, 451–454.

Mori, Y., Imaizumi, K., Katayama, T., Yoneda, T., and Tohyama, M. (2000). Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci* 3, 1079–1084.

Nadanaka, S., Okada, T., Yoshida, H., and Mori, K. (2006). Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 27, 1027-1043.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98–103.

Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* 16, 1345-1355.

Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Espenshade, P. J. (2000). Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* 102, 315–323.

Nohturfft, A., DeBose-Boyd, R. A., Scheek, S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S.

(1999). Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 11235–11240.

Okada, T., Haze, K., Nadanaka, S., Yoshida, H., Seidah, N. G., Hirano, Y., Sato, R., Negishi, M., and Mori, K. (2003). A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J. Biol. Chem.* 278, 31024–31032.

Raggo, C., Rapin, N., Stirling, J., Gobeil, P., Smith-Windsor, E., O'Hare, P., and Misra, V. (2002). Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5639–5649.

Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997) Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol. Cell* 1, 47–57.

Ron, D. (2002). Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest.* 110, 1383–1388.

Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1998a). Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J. Biol. Chem.* 273, 5785–5793.

Sakai, J., Rawson, R. B., Espenshade, P. J., Cheng, D., Seegmiller, A. C., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1998b). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol. Cell* 2, 505–514.

Sato, N., Imaizumi, K., Manabe, T., Taniguchi, M., Hitomi, J., Katayama, T., Yoneda, T., Morihara, T., Yasuda, Y., Takagi, T., Kudo, T., Tsuda, T., Itoyama, Y., Makifuchi, T., Fraser, P. E., St George-Hyslop, P., and Tohyama, M. (2001). Increased production of beta-amyloid and vulnerability to endoplasmic reticulum stress by an aberrant spliced form of presenilin 2. *J Biol Chem* 276, 2108-2114.

Schroder, M., Kaufman, R. J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mut Res* 569, 29–63.

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and 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.

Shim, J., Umemura, T., Nothstein, E., and Rongo, C. (2004). The unfolded protein response regulates glutamate receptor export from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 15, 4818–4828.

Sutton, M. A., and Schuman, E. M. (2005). Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J Neurobiol* 64, 116–131.

Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30, 572–580.

Torre, E. R., and Steward, O. (1996). Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 16, 5967–5978.

Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z. Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y., and Lipton, S. A. (2006). S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441, 513–517.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666.

Wootz, H., Hansson, I., Korhonen, L., Näpänkangas, U., and Lindholm, D. (2004). Caspase-12 cleavage and increased oxidative stress during motoneuron degeneration in transgenic mouse model of ALS. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 281–286.

Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S.,

and Goldstein, J. L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355–1364.

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and 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.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and 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.

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12, 982-995.