

奨励賞受賞者研究紹介

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

Cell type-specific ER stress response in the brain

近藤 慎一

(宮崎大学医学部 解剖学講座 分子細胞生物学分野)

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よ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^{1),2)}。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セン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(図1)。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？

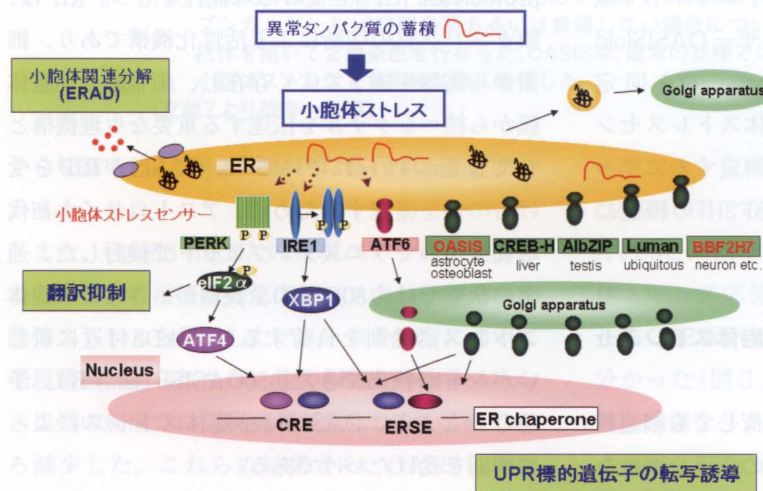


図1 小胞体ストレス応答の全体像(我々は、OASISとBBF2H7を同定した。)

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、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、①翻訳抑制、②UPR標的遺伝子(小胞体分子シャペロン等)の転写誘導、③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として機能している。

我々は2005年に、OASISがアストロサイトにおいて、新規の小胞体ストレスセンサーとして機能していることを報告した。この報告を契機に、他のOASISファミリー分子(CREB-H、AlbZIP、Luman)も小胞体ストレスセン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II型の膜貫通タンパク質で小胞体に局在する。

さらに、我々は2007年に、新規のOASISファミリー分子BBF2H7が神経細胞で小胞体ストレスセンサーとして機能することを明らかにした。

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、ミスフォールディング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³⁾。そして、構造異常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^{4),5),6)}。神経変性疾患では、構造異常タンパク質が小胞体内腔に蓄積して、アポトーシスが起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、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、我々は、小胞体ストレス応答を既存の分子に捕らわれず、純粹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。アストロサイト(星状膠細胞)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、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 OASIS(old astrocyte specifically induced substance)を同定した⁷⁾。さらに、神経細胞の小胞体ストレスセンサーの同定にも試み、BBF2H7を同定するに至った⁸⁾。本稿では、OASISおよびBBF2H7の機能について紹介したい。

2. アストロサイトで機能する小胞体ストレスセンサー OASIS

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、我々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、アストロサイトは生き残る。我々は、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。

我々は、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という分子を見出した⁹⁾。OASISは、構造的には膜貫通ドメインとbZIPドメインを有するCREB/ATFファミリーの1つであるが、その機能は全く未知であった。

OASISは、ATF6とよく似た構造を持つII型の小胞体膜貫通型タンパク質である(図2A)。アミノ酸配列を見ると、小胞体内腔側にゴルジ体中存在するプロテアーゼS1P(Site-1 protease)認識配列を、膜貫通部分にプロテアーゼS2P認識配列をもつので、OASISはATF6やSREBP-2と同様に、制御された膜内切断(regulated intramembrane proteolysis: RIP)を受ける可能性をもつ。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、細胞膜や小胞体膜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¹⁰⁾。OASISがRIPを受けるのかを確認するために、アストロサイト初代培養を用いてウエスタンブロットで検討した。通常の状態では約80kDaの全長型が、さらに小胞体ストレス誘発剤を負荷すると50 kDa付近に新しいバンドが検出できた(p50OASIS)(図2B)。予想したとおり、OASISは小胞体ストレスによって切断を受けたわけである。

次に、全長型OASISとp50OASIS断片の細胞内局在をC6グリオーマ細胞を用いて免疫組織化学的に検討した。ストレスを与えていないC6グリオーマ細胞では、OASISは核周辺に局在し小胞体のマーカーKDELと一致した(図2C)。小胞体ストレス誘発剤を12時間細胞に投与すると、OASISは核に集積した。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小胞体膜

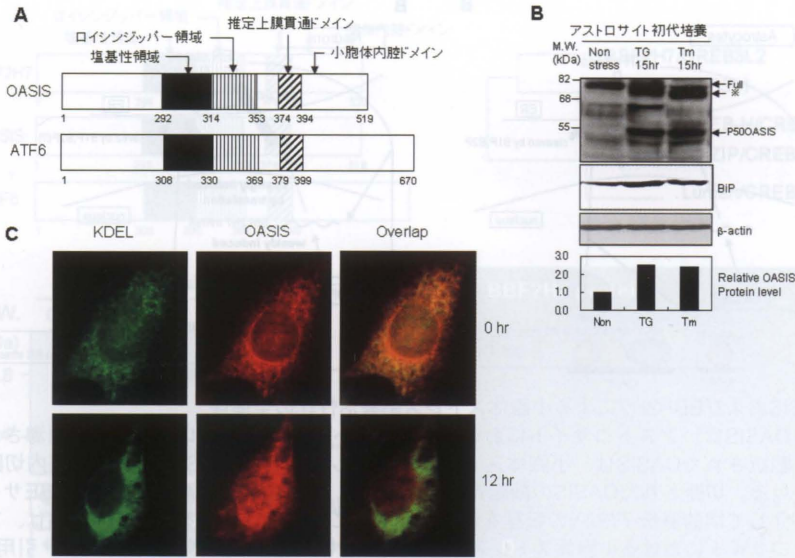


図2 OASISはアストロサイトにおいて小胞体ストレスにตอบสนองして膜内切断を受ける
 (A) ヒトOASISとATF6のドメイン構造の比較
 (B) アストロサイト初代培養における内在性OASISタンパク質の発現。1 μMサブシガルジン(TG)または3 μg/mlツニカマイシン(Tm)を15時間負荷した後、細胞を回収し、抗OASIS抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。小胞体ストレスを負荷すると50kDaのバンド(p50OASIS)が検出された。*は、OASISのN結合型糖鎖付加が一部または全部阻害されたバンドを示す。BiPは、抗KDEL抗体を用いて検出した。OASISタンパク質の定量は、バンドの濃さから計算した。
 (C) OASISの細胞内局在。構成的にOASISを発現するC6グリオーマ細胞に対して、1 μMサブシガルジンを12時間負荷あるいは負荷しない場合について、抗OASIS抗体と抗KDEL抗体を用いて2重染色を行なった。OASISは、通常の状態ではKDELと完全に一致したが、小胞体ストレスを負荷後は核に集積した。
 (文献7より改変、引用)

から切断され、N末断片は核に移行することがわかった。

また、OASIS mRNAの発現パターンを検討したところ、脳損傷時の反応性アストロサイトや小胞体ストレスを負荷したアストロサイトにおいて発現誘導が見られたが、他の細胞や小胞体ストレス以外の刺激では発現誘導が見られないか、むしろ減少した。これらの結果から、OASISは細胞種特異的な小胞体ストレス応答機構を担っている可能性が示唆された。

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、小胞体分子シャペロンBiPのプロモータに対するレポータアッセイ、ゲルシフトアッセイ、および

クロマチン免疫沈降法等を行なった。その結果、OASISがBiPの転写を促進する能力があることはATF6と同様であったが、そのメカニズムは小胞体ストレス応答配列(ERSE)を介してよりも、むしろCRE配列に直接結合することによって分かった(図3A=次頁参照)。興味深いことに、低温損傷を与えたマウス脳で、反応性アストロサイトがOASIS mRNAとBiP mRNAを強く発現することが確認できた。

小胞体分子シャペロンBiPは、小胞体ストレス時の細胞死を抑制する¹¹⁾。OASISがBiPの転写を促進する機能があるならば、OASISの過剰発現は小胞体ストレスからのアポトーシスを抑制するはずである。実際に、全長型OASISを構成的に過剰発現する細胞は、通常のC6グリオーマ細胞と比べ小胞体ストレスに対して強い抵抗性を

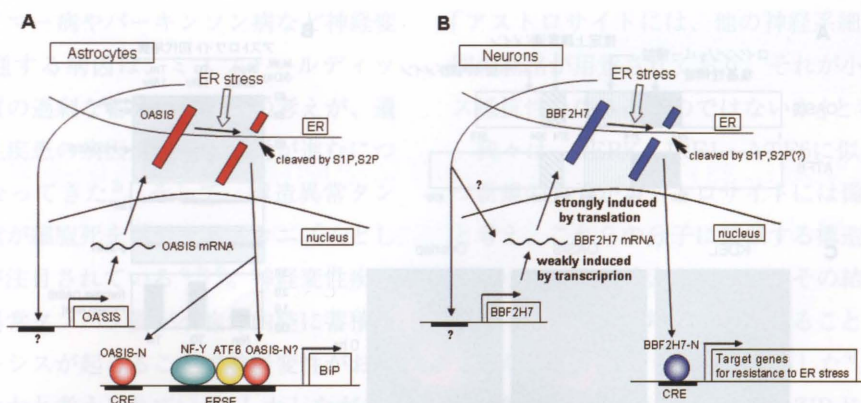


図3 OASISおよびBBF2H7による小胞体ストレス応答活性化の全体像

- (A) OASISは、アストロサイトにおいて小胞体ストレス時に転写レベルで発現誘導される。翻訳されたOASISは、小胞体ストレスにตอบสนองしてS1PおよびS2Pによって膜内切断を受ける。切断されたOASISの細胞質側のN末端は、核に移行し、CREおよびERSEサイトを介して標的遺伝子(BiP)の転写を活性化する。このOASISによるシグナル経路は、アストロサイトにおける小胞体ストレスによる細胞死を抑制する。(文献7より改変、引用)
- (B) 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。in vivoにおいて、BBF2H7は神経細胞に発現する。(文献8より改変、引用)

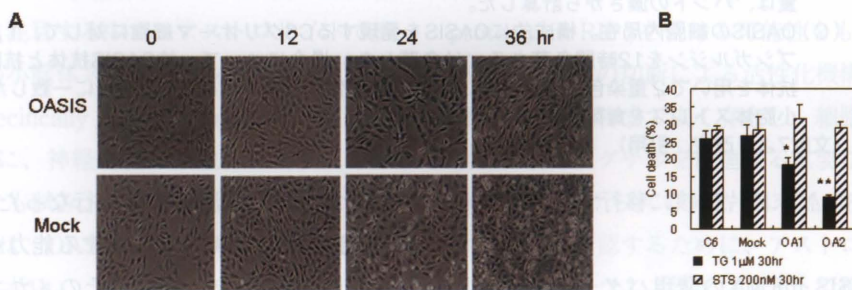


図4 OASISは小胞体ストレスによる細胞死を抑制する

- (A) 全長型OASIS (OASIS) あるいは空ベクター (Mock) を遺伝子導入したC6グリオーマ細胞株に対して、 $1\mu\text{M}$ サブシガルジンを負荷した時の明視野像。OASISの高発現により細胞死が抑制された。
- (B) 全長型OASIS (OA1,OA2) あるいは空ベクター (Mock) を遺伝子導入したC6グリオーマ細胞株に対して、サブシガルジンまたはスタウロスポリンを30時間負荷した時の細胞死の定量解析。細胞死は細胞の形態から判定した。(文献7より改変、引用)

示した(図4 A, B)。反対にOASISをRNAiでノックダウンすると細胞死は亢進した。小胞体ストレス以外の刺激(スタウロスポリンなど)では、このOASISのアポトーシス抑制効果は見られなかった。アストロサイトが脳の保護機能を担うためには小胞体ストレスに抵抗性を示す必要があり、OASISがその役割を担っている可能性がある。

3. ニューロンで機能する小胞体ストレスセンサー BBF2H7

我々がOASISの機能を報告した後、他のOASISファミリー分子(CREB-H、AibZIP、Luman)も小胞体ストレスセンサーとして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(図1 = 828頁)。OASISファミリー分

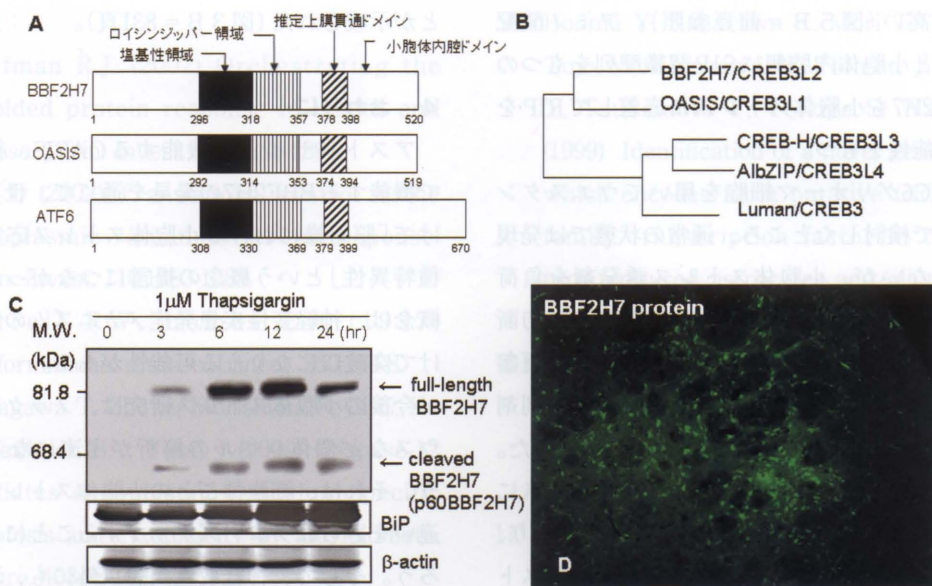


図5 BBF2H7タンパク質は、小胞体ストレスに反応して誘導され膜内切断を受ける。in vivoにおいてBBF2H7タンパク質は、ストレスを受けた神経細胞に発現する。

- (A) ヒトBBF2H7、OASISとATF6のドメイン構造の比較
 - (B) OASISファミリー分子の系統樹。BBF2H7遺伝子は、OASIS、CREB-H、AlbZIP、Lumanと相同性がある。タンパク質間の関係は、bZIPドメインにおけるアミノ酸の一致によって推測した。
 - (C) C6グリオーマ細胞における内在性BBF2H7の発現。1 μMサプシガルジン(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。BiPは、抗KDEL抗体を用いて検出した。
 - (D) 永久中大脳動脈閉塞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タンパク質は、線条体の脳梗塞部位の周辺領域に局在する神経細胞内にのみ検出された。
- (文献8より改変、引用)

子は、すべてII型の小胞体膜貫通タンパク質であり、OASISと相同性の高いbZIPドメインをもつ転写因子である。CREB-Hは、肝細胞特異的に発現しており、小胞体ストレスに応答して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¹²⁾。また、AlbZIPは、前立腺/精巣に特異的に発現しており、RIP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^{13), 14)}。さらに、Lumanも、小胞体ストレスに応答して切断され、ERSEを介してHerpの転写を促進することが明らかとなった¹⁵⁾。

我々は、新規の小胞体ストレスセンサーを見出

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、新規のOASISファミリー分子であるBBF2H7 (BBF2 human homolog on chromosome 7)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¹⁶⁾。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。

BBF2H7は、OASISやATF6とよく似た構造を持つII型の小胞体膜貫通型タンパク質である(図5A)。BBF2H7のbZIPドメインは、OASISファミリー分子(OASIS、CREB-H、AlbZIP、Luman)と高い相同性を示し、特にOASISと最も

相同性が高い(図5B = 前頁参照)。アミノ酸配列を見ると小胞体内腔側にS1P認識配列をもつので、BBF2H7も小胞体ストレスに应答してRIPを受ける可能性をもつ。

そこでC6グリオーマ細胞を用いてウエスタンブロットで検討したところ、通常の状態では発現が見られないが、小胞体ストレス誘発剤を負荷すると約85kDaの全長型および約60kDaの切断断片(p60BBF2H7)が検出された(図5C = 前頁参照)。小胞体ストレス誘発剤と同時に転写抑制剤(Actinomycin D)を加えても同様の結果となった。これは、BBF2H7タンパク質は小胞体ストレスに反応して切断を受けるが、他の分子とは異なり、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翻訳レベルで急激な発現誘導されることを意味する。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。

小胞体ストレスに应答して切断されたBBF2H7のN末端部分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。さらに核内に移行すると、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ゲルシフトアッセイにより明らかにした(図3B = 831頁)。

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(図5D = 前頁参照)。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センサーとして機能し、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(図3B = 831頁)。

4. おわりに

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、神経変性疾患発症メカニズムの解明に向けて突破口になりうる可能性がある。

今後の小胞体ストレス研究は、ノックアウトマウスなど個体レベルの解析が主流になるであろう。それは、細胞種ごとの小胞体ストレス応答の違いをさらにクローズアップすることになるであろう。そして、神経変性疾患以外にも、現在ではまったく想像もできなかった疾患に対する小胞体ストレスの関与が明らかになることも期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、御指導・御鞭撻を賜りまし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深甚なる謝意を表します。ここで紹介した研究は、奈良県立医科大学解剖学第二講座和中明生教授、辰巳晃子博士、山形大学医学部伊関憲博士、岐阜薬科大学生体機能分子学講座原英彰教授、および宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物学分野ラボメンバーをはじめとする多くの研究者との共同研究により行われたものであり、感謝の意を表したいと思います。本研究は、文部科学省研究費、日本学術振興会科学研究費、上原記念生命科学財団研究助成金からの援助を頂きました。

引用文献：

- 1) Kaufman R.J. (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J.Clin. Invest.* 110:1389-1398.
- 2) Ron D (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J.Clin. Invest.* 110:1383-1388.
- 3) Carrell RW, Lomas DA (1997) Conformational disease. *Lancet.* 350:134-8.
- 4) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 403:98-103.
- 5) Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* 16:1345-55.
- 6) Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105:891-902.
- 7) 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 signaling in astrocytes. *Nat. Cell Biol.* 7:186-194.
- 8) Kondo S, Saito A, Hino S, Murakami T, Ogata M, Kanemoto S, Nara S, Yamashita A, Yoshinaga K, Hara H, Imaizumi K. (2007) BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol Cell Biol.* 27:1716-29.
- 9) Honma Y, Kanazawa K, Mori T, Tanno Y, Tojo M, Kiyosawa H, Takeda J, Nikaido T, Tsukamoto T, Yokoya S, Wanaka A. (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. *69:93-103.*
- 10) Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell.* 100:391-8.
- 11) 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, Tohyama M (1999) *Nat Cell Biol.* 1:479-85.
- 12) Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. (2006) Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124:587-599.
- 13) Nagamori I, Yabuta N, Fujii T, Tanaka H, Yomogida K, Nishimune Y, Nojima H. (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.
- 14) Stirling J, O'Hare. P(2006) CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol. Biol Cell.* 17:413-426.
- 15) Liang G, Audas TE, Li Y, Cockram GP, Dean JD, Martyn AC, Kokame K, Lu R (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.

- 16) Storlazzi, CT, Mertens F, Nascimento A, Isaksson M, Wejde J, Brosjo O, Mandahl N, Panagopoulos I. (2003) Fusion of the FUS and BBF2H7 genes in low grade fibromyxoid sarcoma. *Hum. Mol. Genet.* 12:2349-2358.