
小胞体機能異常による神経細胞死の
分子メカニズム解明とその制御法開発

(14208093)

平成 14 年度～平成 16 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (A) (2)) 研究成果報告書

平成 17 年 3 月

研究代表者 今泉和則
宮崎大学 医学部 教授

はしがき

この小冊子は、平成14年度～平成16年度の3年間に渡り、文部科学省研究費補助金（基盤研究（A）（2））によって行われた「小胞体機能異常による神経細胞死の分子メカニズム解明とその制御法開発」に関する研究成果の報告書であります。神経難病を含め数多くの変性疾患で異常タンパク質が細胞内に蓄積し、小胞体機能を障害して様々な病態形成を引き起こすことが知られています。しかし、神経細胞死に至るまでの詳細な分子機構はまだ十分解明されていません。このような疾患の治療法開発のためには、小胞体の機能異常から起こる神経細胞死とそれに抵抗しようとする生体防御機構の全貌解明が不可欠です。我々は、1）小胞体ストレスの際にみられるストレスからの回避応答と、2）細胞死を引き起こす分子の同定およびそのシグナル経路の解明を目指しました。その結果、ストレスに対し、細胞を生存させるために必須の分子 OASIS の同定に成功し、この分子の機能制御により細胞死をコントロールできることを証明しました。一方、死のシグナルの起点分子として小胞体局在性のカスパーを見出し、本分子の発現を抑制することで細胞死を救済することに成功しました。以上の2つの研究成果は、神経難病の撲滅に向けた新たな根本治療法開発に大きな礎になるものであります。今後はより臨床に近い研究として発展させ、ヒトに適応できる化合物の開発を目指したいと考えています。本研究は文部科学省の科学研究費による援助により執り行われたものであり、ここに心より御礼申し上げます次第であります。

平成17年3月

宮崎大学医学部解剖学第一講座

教授 今泉和則

研究組織

研究代表者：今泉和則（宮崎大学医学部教授）

共同研究者

本研究は、宮崎大学医学部解剖学第一講座および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をはじめ多くの方々との緊密な連携のもとに推進されたものであり、ここにご氏名を記して感謝の意を表します。（敬称は略）

宮崎大学医学部第一解剖学講座

近藤慎一、緒方麻衣子、金本聡自

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、奥村雅代、村上智彦、山下明紀、森川恵介

大阪大学大学院医学系研究科ポストゲノム疾患解析学講座

遠山正彌、片山泰一、人見淳一

大阪大学大学院医学系研究科精神医学講座

工藤 喬

奈良県立医科大学解剖学第二講座

和中明夫、辰巳晃子

山形大学医学部

伊関 憲

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	15,100	4,530	19,630
平成15年度	11,700	3,510	15,210
平成16年度	6,900	2,070	8,970
総計	33,700	10,110	43,810

1. 研究の背景および目的

小胞体で起こるタンパク質の折り畳みが、細胞内外からの各種ストレスにより攪乱される状態を小胞体ストレスという。正常な細胞では小胞体ストレスが負荷されると防御機構である Unfolded Protein Response (UPR) が活性化し、小胞体分子シャペロンの誘導が起こって細胞死から回避しようとする。アルツハイマー病や脳虚血ではこの回避機構が正常に作動せず、神経細胞死にいたると指摘する報告が相次いでおり、多くの研究者が小胞体ストレスの分子機構に注目を寄せている。しかしながら、折り畳み異常なタンパク質が小胞体内に蓄積したのち、どのような機序で細胞死にまで至るのか、その全貌は解明されていない。本研究課題では、小胞体ストレスによって誘導される細胞死を人為的に制御する戦略開発を最終目標に、小胞体ストレスからアポトーシスに至る経路とストレスから回避する生存シグナルの全貌解明を目指した。

2. 研究内容

1) 小胞体ストレスから回避するための生体防御機構の解明：

小胞体ストレスの際に発現誘導する遺伝子を網羅的に検索した。具体的には、小胞体ストレス存在下、および非存在下に置かれた細胞から RNA を抽出し、ジーンチップ法あるいは PCR-Selected subtraction 法などにより遺伝子スクリーニングを行った。さらに取得できた誘導型遺伝子の構造、発現、タンパク質機能の解析を行った。特に本実験の過程で取得できたアストロサイト特異的小胞体ストレスセンサー OASIS の機能を細胞生物学的および動物工学的に解析した。

2) 小胞体から発信される細胞死シグナルの解析

カスパー 1 2 は小胞体に局在するシステインプロテアーゼで小胞体ストレスの際に切断活性化して細胞死シグナルを細胞質や核に伝える。カスパー 1 2 がどのようなメカニズムで活性化し、そのシグナルを如何にして下流分子に伝えていくかを理解することは細胞死実行を制御する上で重要である。本研究ではカスパー 1 2 に直接結合する、あるいはプロカスパーを切断して活性化フォームを形成させるのに重要な分子を同定することによって、カスパー 1 2 の活性化から引き起こされる神経細胞死のシグナル伝達機構を解析した。さらにヒトではカスパー 1 2 は存在しない。ヒトの小胞体ストレスの際に細胞死を実行するカスパーの同定も試みた。

3. 研究成果、考察、展望

1) 新規小胞体局在性ストレスタンパク質の同定

PCR-Selected subtraction 法を用いた遺伝子スクリーニングにより小胞体ストレス時に発現誘導する遺伝子の探索を行った。その結果、発現上昇する遺伝

子として 14 種類を同定した。そのうちから新規遺伝子 MDG1/ERdj4 の解析を行った。この遺伝子がコードする蛋白質は N 末端側に J ドメインを有しており、ヒートショック蛋白質群の活性制御に関与すること、細胞に MDG1/ERdj4 を発現させておくと小胞体ストレスに対して抵抗性を示すようになることがわかった。以上の結果から、MDG1/ERdj4 は小胞体ストレスに応答して発現誘導し、GRP78 /BiP と協調して異常タンパク質の折り畳みを促進し、細胞傷害から保護する役割を

果たしている可能性が示唆された。

2) アストロサイト特異的小胞体ストレスセンサー OASIS の発見

アストロサイトが小胞体ストレスに対し、神経細胞よりも圧倒的に強いという現象に注目した。なぜならアストロサイトでは神経細胞には備わっていないストレス応答の情報伝達系が存在する可能性があるからである。小胞体ストレス応答の鍵分子は、IRE1、ATF6、PERK である。これは全ての細胞にユビキタスに発現しているが、アストロサイトにはこれら既存のストレスセンサー以外にアストロサイト固有のストレスセンサーが存在し、そのセンサーからの情報伝達系がアストロサイトの小胞体ストレス抵抗性を生み出す根源であると考えた。そして大規模なデータベースサーチを行いアストロサイト特異的小胞体ストレスセンサー OASIS の同定に成功した。機能解析の結果、OASIS は、1) 小胞体ストレスの際に脳内のアストロサイトで機能すること、2) 異常タンパク質の蓄積を感知し、シグナルと細胞質や核内に伝達するストレストランスジューサーの機能を有すること、3) 核に移行した OASIS は転写因子として、CRE および ERSE 配列に結合し、小胞体分子シャペロン BiP の発現を誘導すること、4) OASIS は、ER ストレスからの細胞死を抑制することなどを明らかにした。本研究成果から、OASIS はアストロサイトのストレス抵抗性を引き起こす分子であることが明らかになり、本遺伝子を神経細胞内で活性化できれば神経変性疾患でみられる神経細胞死から救済する新しい戦略開発にもつなげられると期待される。

3) 新規の小胞体ストレスセンサーの発見

OASIS 以外にも新規の小胞体ストレスセンサーとして 4 つの候補分子の取得に成功した (BBF2、AlbZIP、CREB-H、Luman)。現在、それらタンパク質の機能解析中である。さらにそれら因子の活性制御機構を解明することで細胞死抑制方法を開発したいと考えている。

4) 小胞体から発信される死のシグナル

two-hybrid 法で、カスパー 1 2 と結合する因子をスクリーニングし、5 つの候補分子を見出した。その中で RanBPM という分子に注目して解析を行った。その結果、プロドメインが切断され、活性化したカスパー 1 2 と RanBPM が核内で結合することが明らかとなった。これはカスパー 1 2 が核内で基質分子

を切断するとき RanBPM が補助因子として働く可能性を示唆する。

5) 小胞体ストレスの際に活性化するヒトカスパー 4

げっ歯類では、小胞体機能異常の際に活性化する分子としてカスパー 1 2 が知られていたが、ヒトのカスパー 1 2 は存在しない。ヒトにおける機能的なホモログを見出すため、マウスカスパー 1 2 と構造的に似た分子を探索した。その結果、ヒトカスパー 4 が構造的にマウスカスパー 1 2 とよく似ており、しかも小胞体ストレス依存的に活性化することも明らかになった。RNAi によってカスパー 4 の発現をノックダウンすると、小胞体ストレスから生じる細胞死を抑制した。以上の結果は、ヒトカスパー 4 がマウスカスパー 1 2 の機能的ホモログであることを示唆するとともに、本分子を制御することで、神経変性疾患の際に起こる細胞死を抑制できる戦略開発に応用できる可能性が示された。

6) 病態と小胞体ストレス

小胞体ストレス時におけるアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) の分泌量の変化を検討した。正常な動物細胞に小胞体ストレスを負荷すると分泌 $A\beta$ 量は減少したが、アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリンを導入した細胞ではその減少の程度が弱かった。つまり、小胞体ストレスは $A\beta$ 分泌に密接に関わり、プレセニリン変異は見かけ上、 $A\beta$ の産生亢進を促すことが明らかとなった。

7) 小胞体ストレスにより活性化するオートファジー

小胞体ストレスとオートファジーの関係を調べた。電子顕微鏡による観察、GFP-LC3 を用いた光学顕微鏡観察、さらには生化学的な解析により、小胞体ストレス後にオートファジーが活性化されていることが明らかとなった。おそらく異常タンパク質の分解にオートファジーのシステムが関わっているものと考えられる。

4. 研究発表

1) 論文

原著論文

1. Kondo, S., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Tatsumi, K., Wanaka, A., & Imaizumi, K. (2005). OASIS, a CREB/ATF family member, modulates the UPR signaling in astrocytes. *Nature Cell Biology* 7, 186-194.

2. Higashide, S., Morikawa, K., Okumura, M., Kondo, S., Ogata, M., Murakami, T., Yamashita, A., Kanemoto, S., Manabe, T., & Imaizumi, K. (2004) Identification of regulatory cis-acting elements for alternative splicing

of presenilin-2 exon 5 under hypoxic stress conditions. *Journal of Neurochemistry*, *Journal of Neurochemistry*, 91, 1191–1198.

3. Imaizumi, K., Benito, A., Kiryu-Seo, S., Gonzalez, V., Inohara, N., Leiberman, A., P., Kiyama, H., & Nunez, G. (2004) Critical role for DP5/Harakiri, a Bcl-2 homology domain 3-only Bcl-2 family member, in axotomy-induced neuronal cell death. *Journal of Neuroscience*, 24, 3721–3725.

4. Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., & Tohyama, M. (2004). Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Ab-induced cell death. *Journal of Cell Biology*, 165, 347–356.

5. Imaizumi, K. & Tohyama, M. (2004). Endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *J Chem Neuroanat.* 28(1-2), 49–50.

6. Kondo, S., Yamamoto, N., Murakami, T., Okumura, M., Mayeda, A. & Imaizumi, K. (2004). Tra2b, SF2/ASF, and SRp30c modulate the function of an exonic splicing enhancer in exon 10 of tau pre-mRNA. *Genes to Cells*, 9, 121–130.

7. Katayama T, Imaizumi K., Manabe T, Hitomi J, Kudo T, & Tohyama M. (2004). Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J. Chem. Neuroanat.* 28(1-2), 67–78.

8. Smith, M. J., Sharples, R. A., Evin, G., McLean, C. A., Dean, B., Pavey, G., Fantino, E., Cotton, R. G., Imaizumi, K., Masters, C. L., Cappai, R., & Culvenor, J. G. (2004). Expression of truncated presenilin 2 splice variant in Alzheimer's disease, bipolar disorder, and schizophrenia brain cortex. *Brain Res Mol Brain Res.* 127, 128–35.

9. Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, Honda A, Imaizumi K, & Tohyama M. (2004). Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neuroscience Letters* 357, 127–130.

10. Katayama T, Imaizumi K, Yoneda T, Taniguchi M, Honda A, Manabe T, Hitomi

- J, Oono K, Baba K, Miyata S, Matsuzaki S, Takatsuji K, & Tohyama M. (2004). Role of ARF4L in recycling between endosomes and the plasma membrane. *Cell Mol Neurobiol.* 24, 137–147.
11. Oono K, Yoneda T, Manabe T, Yamagishi S, Matsuda S, Hitomi J, Miyata S, Mizuno T, Imaizumi K, Katayama T, & Tohyama M. (2004). JAB1 participates in unfolded protein responses by association and dissociation with IRE1. *Neurochem Int.* 45, 765–772.
12. Miyaso, H., Okumura, M., Kondo, S., Higashide, S., Miyajima, H., & Imaizumi, K. (2003). An intronic splicing enhancer element in SMN pre-mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 15825–15831.
13. Kurisu, J., Honma, A., Miyajima, H., Kondo, S., Okumura, M., & Imaizumi, K. (2003) MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress. *Genes to Cells*, 8, 189–202.
14. Manabe, T., Katayama, T., Sato, N., Gomi, F., Hitomi, J., Yanagita, T., Kudo, T., Honda, A., Mori, Y., Matsuzaki, S., Imaizumi, K., Mayeda, A. & Tohyama, M. (2003). Induced HMG1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease. *Cell Death and Differentiation*, 10, 698–708.
15. Miyajima, H., Miyaso, H., Okumura, M., Kurisu, J. & Imaizumi, K. (2002). Identification of Cis-acting elements for the regulation of SMN exon 7 splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 23271–23277.
16. Yasuda Y, Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Yatera M, Okochi M, Yamamori H, Matsumoto N, Kida T, Fukumori A, Okumura M, Tohyama M, & Takeda M. (2002). FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 313–318.
17. Manabe, T., Katayama, T., Sato, N., Kudo, T., Matsuzaki, S., Imaizumi, K., & Tohyama, M. (2002). The cytosolic inclusion bodies that consist of splice variants that lack exon of the presenilin-2 gene differ obviously from Hirano bodies observed in the brain from sporadic cases of Alzheimer's

disease patients. *Neuroscience Letters*, 328, 198-200.

総説

1. 今泉和則, 遠山正彌. 細胞種特異的小胞体ストレス応答ーアストロサイトに発現する新規小胞体ストレスセンサーOASIS. *日本薬理学雑誌*, 124, 383-390, 2004
2. 今泉和則, アルツハイマー病と神経細胞死. *実験医学増刊号*, 22, 1653-1659, 2004.
3. 今泉和則, 小胞体ストレスとアルツハイマー病. *脳* 21, 7, 129-136, 2004.
4. 今泉和則, 遠山正彌. アルツハイマー病研究の最前線と治療への挑戦. *脳* 21, 7, 108-112, 2004.
5. 今泉和則, 小胞体ストレス応答の全貌解明を目指して. *神経化学* 7, 129-136, 2004.
6. 今泉和則, アルツハイマー病と小胞体ストレス. *Medical Science Digest* 29, 86-88, 2003.
7. 今泉和則, アルツハイマー病と小胞体ストレス. *細胞工学* 21, 382-388, 2002.
8. 今泉和則, 小胞体ストレスと神経細胞死. *脳* 21 5, 116-120, 2002.
9. 今泉和則, 培養交感神経細胞のアポトーシスとその制御因子. *自律神経* 39, 61-68, 2002.
10. 工藤喬, 今泉和則, 片山泰一, 遠山正彌, 武田雅俊. 小胞体ストレスと神経細胞死. *BIO CLINICA*, 17, 42-46, 2002.
11. 工藤喬, 今泉和則, 片山泰一, 遠山正彌, 武田雅俊. Alzheimer 病ー発症機序の解明 ER ストレス. *CLINICAL NEUROSCIENCE*, 20, 647-649, 2002.

著書

1. Yamamoto, N., Kondo, S., Yoshino, S., Okumura, M. & Imaizumi, K., Aberrant splicing of Tau transcripts in Frontotemporal Dementia with Parkinsonism linked to Chromosome17. *Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders*. Basel, Karger, PP205-214, 2004.
2. 今泉和則, 遠山正彌 編, *分子神経解剖学*, 金芳堂, アルツハイマー病における神経細胞死, 2004.

2) 学会発表

1. Imaizumi, K. Endoplasmic reticulum stress and neuronal death in Alzheimer disease. 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. Osaka, 2004
2. Imaizumi, K. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. 16th International Congress of the IFAA Kyoto, 2004
3. 今泉和則, 千里ライフサイエンスセミナー; アルツハイマー病研究の最前線と治療への挑戦, オーバービュー, 小胞体ストレスとアルツハイマー病 大阪, 2004.
4. 今泉和則, 遠山正彌. ニューロンとグリアにおける小胞体ストレス応答の違いと細胞死制御のメカニズム. 第77回日本薬理学会, 大阪, 2004 (シンポジウム)
5. 山下明紀、的場瑞枝、緒方麻衣子、今泉和則 : ER ストレスに対する BBF2H7 の機能解析、第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004.
6. 森川 恵介、緒方麻衣子、水島昇、浦野文彦、David Ron、今泉和則 : 小胞体ストレスセンサーIRE1a を介して活性化するオートファジー、第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004.
7. 緒方麻衣子、森川恵介、水島昇、David Ron、今泉和則 : 小胞体ストレスによって活性化されるオートファジー、第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004.

8. 村上智彦 近藤慎一 今泉和則 : OASIS, an ER stress transducer in astrocytes, is processed in response to ER stress by the same proteases that process ATF6. 第27回日本分子生物学学会、神戸、2004.
9. S.Kanemoto, M.Ogata, K.Morikawa, S.Kondo, T.Murakami, N.Mizushima, S.J.Marciniak, D.Ron, F.Urano, K.Imaizumi: Autophagy Is Activated during Endoplasmic Reticulum Stress, The American Society for Cell Biology 44th Annual Meeting. Washington, DC., 2004.
10. Okumura, M., Kudo, T., Araki, W. and Imaizumi, K. : ER stress influences the production of amyloid beta peptides. The American Society for Cell Biology 44th Annual Meeting. Washington, DC., 2004.
11. T. Murakami, S. Kondo, K. Imaizumi.: OASIS, AN ASTROCYTE-SPECIFIC ER STRESS SENSOR, IS PROCESSED BY THE SAME PROTEASES THAT PROCESS ATF6. Society for Neuroscience Washington, DC, 2004.
12. Maiko Ogata, Keisuke Morikawa, Noboru Mizushima, David Ron, Sadao Shiosaka and Kazunori Imaizumi. Autophagy is activated by ER stress. Society for Neuroscience 34th annual meeting. San Diego. 2004.
13. 近藤慎一, 村上智彦, 和中明生, 今泉和則 : 新規小胞体ストレスセンサー—OASISの機能解析, 第47回日本神経化学会, 大阪, 2004.
14. Okumura, M., Kudo, T., Araki, W. and Imaizumi, K. : ER stress influences the production of amyloid beta peptides. Neuro 2004. Osaka, 2004.
15. Kondo S, Murakami T, Wanaka A, Imaizumi K: The regulation of unfolded protein response by OASIS, a transmembrane bZIP transcription factor, in astrocytes , UK Biochemical Society "BioScience2004" , Glasgow, 2004.
16. 今泉和則. 小胞体膜上で制御される細胞の生と死. 第46回日本神経化学会, 新潟, 2003 (シンポジウム)
17. 近藤慎一, 伊関憲, 和中明生, 今泉和則: グリア細胞特異的 ER ストレス

センサーOASISの機能解析, 第46回日本神経化学, 新潟, 2003.

18. 近藤慎一, 村上智彦, 和中明生, 今泉和則: アストロサイト特異的な Unfolded Protein Response を制御する膜貫通タンパク質 OASIS, 第26回日本分子生物学会, 神戸, 2003.
19. 奥村雅代, 森川 恵介, 近藤 慎一, 山本 憲明, 今泉 和則: tau exon10 のスプライシングを制御する ESE と Tra2 β 、SF2/ASF、SRp30c. 第26回日本分子生物学会, 神戸, 2003.
20. Kondo S, Yamamoto N, Okumura M, Imaizumi K: Regulatory mechanisms of tau pre-mRNA splicing in FTDP-17, FASEB (The Federation of American Societies for Experimental Biology) "Experimental Biology 2003", San Diego. 2003.
21. Okumura, M., Morikawa, K., Kondo, S., Yamamoto, N., and Imaizumi, K.: Tra2, SF2/ASF, and SRp30c modulate the function of an exonic splicing enhancer in exon 10 of tau pre-mRNA. The New Frontier of RNA Science "RNA 2003 Kyoto" Kyoto 2003.
22. 今泉和則. スプライシング障害と神経難病ータウおよびSMNの異常スプライシング. 第45回日本神経化学会, 北海道, 2002 (シンポジウム)
23. Imaizumi, K. Aberrant splicing of tau transcripts in FTDP-17. International symposium "Molecular neurobiology of Alzheimer disease and related disorders". Osaka, 2002
24. Imaizumi, K., Miyajima, H., Miyaso, H., & Okumura, M. Identification of a cis-acting element for the regulation of SMN exon 7 splicing. 32th annual meeting · Society for neuroscience, Orland, USA, 2002.

3) 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

出願番号: 2003-205902、発明の名称: 「小胞体局在転写因子 OASIS 及びその遺伝子の用途」、発明者: 今泉和則、近藤慎一、和中明生、特許出願人: 科学技術振興事業団、平成15年8月5日出願