



小胞体ストレス応答の制御によるコンフォメーション病治療戦略の開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-06-21 キーワード (Ja): 小胞体ストレス, コンフォメーション病, 神経変性疾患, 小胞体ストレスセンター キーワード (En): unfolded protein response 作成者: 近藤, 慎一 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10458/2276">http://hdl.handle.net/10458/2276</a>

## 84. 小胞体ストレス応答の制御によるコンフォメーション病治療戦略の開発

近藤 慎一

**Key words** : 小胞体ストレス, コンフォメーション病, 神経変性疾患, 小胞体ストレスセンサー, **unfolded protein response**

宮崎大学医学部解剖学講座  
分子細胞生物学分野

### 緒言

異常タンパク質が細胞内に蓄積すると種々の老年性疾患を発症する (コンフォメーション病)。細胞の老化を促進し細胞死を誘発するからである。コンフォメーション病にはアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患も含まれる。これら神経変性疾患の発症に小胞体ストレスが密接に関わることが最近明らかにされている<sup>1-4)</sup>。小胞体ストレスから回避できればコンフォメーション病の治療に直結する。本研究は異常タンパク質蓄積による細胞障害およびそれに対する生体防御機構のメカニズムを解明し、それを踏まえてコンフォメーション病に代表される老年病に対する先駆的治療法開発につなげることを目的とする。

小胞体分子シャペロン BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein) を細胞内に強制発現させておくと、小胞体ストレスから保護されることが知られている。小胞体ストレス誘導性神経細胞死から救済するために小胞体分子シャペロン BiP を誘導する化合物の開発を試み、新規低分子化合物 BIX (BiP inducer X) を見いだした。本研究ではこの化合物の薬効を細胞レベルおよび動物レベルで詳細に解析することで、薬物の作用機序を解明するとともに神経変性疾患治療薬としての可能性を検討した。さらに、小胞体ストレス応答の全容解明は神経変性疾患の治療法開発に重要と考え、新規の小胞体ストレスセンサーの同定を試みた。その結果、BBF2H7 を発見し機能解析を行ったので合わせて報告する。

### 方法および結果

#### 1. 化合物 BIX の発見と薬効解析

約 20,000 種類のケミカルライブラリーから BiP プロモーター活性を上昇させる化合物をレポーターアッセイによりスクリーニングした。その結果、5 つの候補化合

物を見いだすことに成功した。そのうち、レポーター活性を最も上昇させる機能をもつ BIX (Fig.1) について検討を加えた。

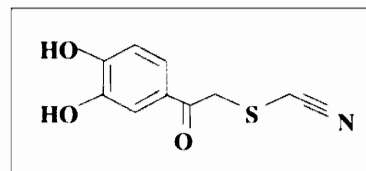


Fig. 1. Chemical structure of BIX.

SK-N-SH 神経芽細胞の培養上清に BIX を投与し、12 時間後に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン (Tunicamycin : Tm) を 0.5  $\mu$ g/ml の濃度で添加した。Tm により誘導される細胞死の程度を溶媒のみを投与した時と比較した。その結果、BIX を投与した細胞では Tm 誘導性の神経細胞死に対して抵抗性が亢進していた。この結果から BIX は小胞体ストレスから回避し、細胞に保護的に作用することがわかった。

マウス脳室内に BIX を持続注入しておき、その後中大脳動脈を永久血紮して脳梗塞を誘発させた。BIX を投与しなかったマウスと比べ、BIX 投与群では明らかに梗塞巣の領域が減少し、脳損傷を軽減させた (Fig.2)。つまり、BIX は *in vivo* においても神経細胞死を抑制する機能があることがわかった。

化合物 BIX は小胞体分子シャペロン BiP を転写レベルで発現上昇させる活性があることがわかった。BiP 遺伝子のプロモーター領域には小胞体ストレス応答エレメント (endoplasmic reticulum stress responsive element : ERSE) とサイクリック AMP 応答エレメント (cyclic-AMP response element : CRE) が存在することが知られている。今回の解析では BIX による BiP プロモーターの活性上昇は ERSE を介している可能性

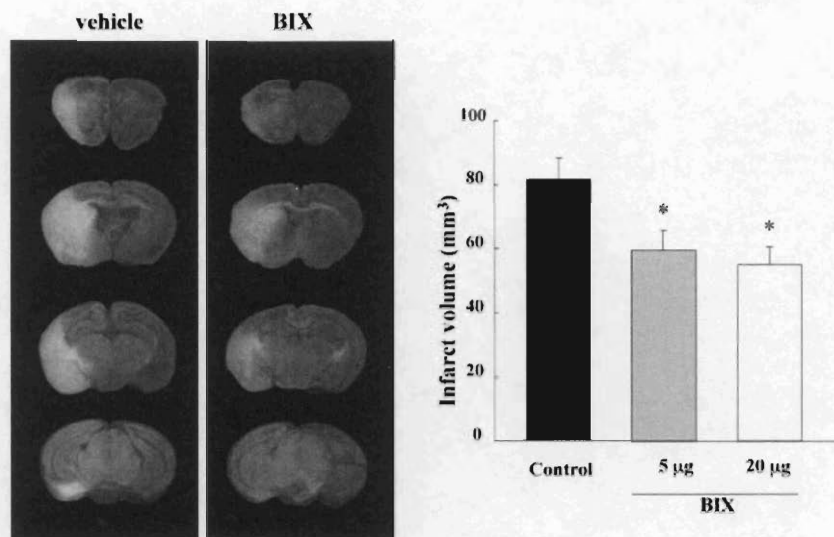


Fig. 2. BIX suppresses neuronal death after brain ischemia.

A ; BIX or vehicle was administered to brain ventricle of mice. After 30 min following drug administration, mice were operated for the permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO). Another 24 h after surgery, the brains of mice were subjected to 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. B ; Quantitative analysis of infarct area volume of MCAO mice was shown. Data are the means  $\pm$  S.D.. Significant differences between BIX and vehicle were indicated as asterisks (\* :  $p < 0.05$ , T-test).  $n = 11$  or  $12$ .

が考えられた。しかし、どのような機序で BIX が ERSE を活性化しているかは謎のままである。今後は BIX の直接のターゲット分子を明らかにし、作用機序を明確にする必要があると思われる。

## 2. 新規小胞体ストレスセンサーの同定

異常な構造を持つタンパク質が小胞体内に蓄積する状態を小胞体ストレスという。小胞体ストレスに対して細胞は、Unfolded Protein Response (UPR) とよばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって異常タンパク質蓄積による小胞体の破綻を回避しようとする。UPR シグナリングの中心的な役割を担っているのが IRE1 (insulin response element1), PERK (RNA-activated protein kinase:PKR-like ER kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) という 3 つの小胞体ストレストランスデューサーで、小胞体ストレスを感知しその情報を細胞質や核に伝達している。これら分子はすべての細胞で発現し、小胞体ストレス応答に関わる。今回新たに、新規の小胞体ストレストランスデューサー BBF2H7 [BBF2 (homosapiens mRNA for basic transcription factor 2) human homolog on chromosome 7] を同定した<sup>5)</sup>。

BBF2H7 は、構造的に ATF6 と同一性が高い cAMP responsive element binding protein:CREB/ATF ファミリーに属する転写因子の 1 つで、bZIP (basic leucine zipper) ドメインおよび膜貫通ドメインを保持し、小

胞体膜を貫通している。ウェスタンブロットティングの結果、BBF2H7 は、小胞体ストレスに反応して膜内切断を受けることがわかった。免疫染色により、膜内切断された bZIP ドメインを有する細胞質側の N 末断片は、核内にすみやかに移行する像が観察された。すなわち、BBF2H7 は通常時は全長型として小胞体に局在するが、小胞体ストレスが負荷されると膜近傍で切断され、切断された断片が核に移行することがわかった。

核に移行する BBF2H7 の断片には bZIP ドメインが含まれる。つまり核内で転写因子として機能している可能性がある。レポーターアッセイやゲルシフトアッセイの結果、BBF2H7 は CRE に作用することで、標的遺伝子の転写を活性化する機能を有することがわかった。興味深いことに、BBF2H7 タンパク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る。このことは、BBF2H7 が UPR シグナリングにおける後期においてのみ機能する可能性を示唆する。

BBF2H7 の生理学的機能を知る目的で、BBF2H7 を強発現する細胞に小胞体ストレスを負荷し、細胞死に対する影響を調べた。BBF2H7 を強発現する細胞ではコントロール細胞に比べてストレス抵抗性が高まっていた。逆に siRNA (small interfering RNA) により BBF2H7 をノックダウンさせると小胞体ストレスに対

する感受性が高まり、コントロールよりも明らかに細胞死が促進した。次に *in vivo* における BBF2H7 の役割を調べる目的で中大脳動脈永久閉塞モデルマウスを用いて虚血後の BBF2H7 の発現を免疫組織学的に検討した。BBF2H7 タンパク質は、脳梗塞ペヌンプラ領域において虚血 12 時間目ごろから神経細胞に強く発現していた。ペヌンプラ領域は虚血後の遅発性神経細胞死が起こる領域のことを指す。 *In vitro* の実験結果と合わせて考えると、BBF2H7 は小胞体分子シャペロン群を発現させることで脳虚血時に起こる異常タンパク質蓄積に基づく神経細胞死から回避するために働いている可能性が示唆された。

### 考 察

化合物 BIX は培養細胞のみならず *in vivo* の実験でも脳神経細胞のアポトーシスから救済できることが本研究で明らかになった。脳虚血以外の神経変性疾患モデルにおいても同様の効果が得られるか否かを検討するとともに、脳内へのドラッグデリバリーに関しても今後は詳細に検討する必要があると思われる。新規に発見した小胞体ストレスセンサーBBF2H7 は神経細胞死に対して保護的に働く可能性が示された。しかし、本研究では BBF2H7 のターゲット遺伝子の同定には至らなかった。ターゲット遺伝子を見つけ出すことによつて BBF2H7 の生体内での働きを明らかにしていきたい。

本研究の共同研究者は、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である。また、本研究の遂行にあたり援助いただいた上原記念生命科学財団に深謝致します。

### 文 献

- 1) 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. : Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.*, 1 : 479-485, 1999.
- 2) Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. & Takahashi, R. : An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*, 105 : 891-902, 2001.
- 3) Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. & Yuan, J. : Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature*, 403 : 98-103, 2000.
- 4) Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. & Ichijo, H. : ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.*, 16 : 1345-1355, 2002.
- 5) Kondo, S., Saito, A., Hino, S-I., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Nara, S., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Hara, H. & Imaizumi, K. : BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol. Cell. Biol.*, 27 : 1716-1729, 2007.