

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570210

研究課題名（和文） 筋芽細胞最終分化における小胞体ストレス応答シグナルの役割

研究課題名（英文） Role of endoplasmic reticulum stress signaling in terminal differentiation of myoblasts

研究代表者

森島 信裕 (MORISHIMA NOBUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・専任研究員

研究者番号：40182232

研究成果の概要（和文）：

マウス筋芽細胞株において活性化型ATF6を強制発現させると、活性化型ATF6は核に局在し、筋芽細胞のアポトーシスを引き起こした。活性化型 ATF6 の効果はその転写調節活性に依存しており、ATF6 によってその発現が上昇する WW ドメイン結合タンパク質 1(WBP1)がアポトーシス誘導活性を持つことが分かった。WBP1 の発現上昇はアポトーシス抑制タンパク質 Mcl-1 を特異的に減少させ、アポトーシスを誘導することが示された。これらの現象は小胞体ストレス誘導剤による筋芽細胞のアポトーシスにおいても再現された。

研究成果の概要（英文）：

Overexpression of active ATF6 induces apoptosis in myoblast cells. ATF6 up-regulated WW domain binding protein 1 (WBP1), which was found to be proapoptotic. Overexpression of active ATF6 or WBP1 caused a specific decrease in an antiapoptotic protein, myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1). Cells treated with ER stressors underwent apoptosis and exhibited an up-regulation of WBP1 and decreased Mcl-1. These results suggest that ATF6 mediates apoptosis via specific reduction of Mcl-1 levels through the up-regulation of WBP1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞分化、アポトーシス、筋芽細胞、小胞体ストレス、カスパーゼ、ATF6、WBP1, Mc1-1

1. 研究開始当初の背景

筋分化において未分化細胞が筋芽細胞になることが決定される機構の解明は哺乳類の細胞分化決定機構研究において先導的な役割を果たしてきた。MyoD を初めとする筋特異的転写因子の発見と解析によって未分化細胞が筋芽細胞に変換する過程を調節する仕組みの大筋が理解されたと考えられている。それに反して、筋芽細胞が融合して筋管や筋繊維になり、同時に筋芽細胞のアポトーシスも起こる最終分化過程の理解は遅れている。

私たちは以前、マウス胚の正常な骨格筋・筋繊維形成過程において小胞体ストレス応答が起きていることを見出した。小胞体ストレスは細胞ストレスの一種で、小胞体内腔を通過していく分泌タンパク質や膜タンパク質の構造形成にトラブルが起き、構造異常タンパク質が内腔に蓄積した状態を言う。小胞体ストレスは小胞体に対する負荷となり細胞にダメージを与えるが、これを軽減するために小胞体膜上にあるストレスセンサーが活性化して小胞体ストレス応答を起こす。

マウス胚の骨格筋・筋繊維形成の開始時期（胎齢 13.5 日）にある筋芽細胞の大半において CHOP/GADD153 の一過的な発現上昇やカスパーゼ 12 の活性化を私たちは検出した。CHOP/GADD153、カスパーゼ 12 はそれぞれ小胞体ストレス応答の結果活性化する転写因子、アポトーシス実行を担うプロテアーゼファミリーメンバーの一つである。カスパーゼ 12 は小胞体ストレスが生じる

と前駆体が自己プロセッシングを起こして活性化する。CHOP/GADD153、カスパーゼ 12 に関する結果は大半の筋芽細胞で小胞体ストレス応答が起こっていることを示しており、筋最終分化過程における筋芽細胞のアポトーシスのきっかけが小胞体ストレスであることを示唆している。

2. 研究の目的

筋最終分化過程で検出された小胞体ストレス応答がどのようにして筋芽細胞の細胞運命決定に関わっているかを探ることがこの研究課題の目的である。小胞体ストレス応答は三つの主経路 (PERK 経路、ATF6 経路、IRE1 経路) を含んでおり、タンパク質合成量低下による構造形成負荷の軽減、シャペロンによる構造異常タンパク質の修復、プロテアソームによる構造異常タンパク質の分解を通してストレス軽減をすることが明らかになっている。筋分化過程では、主経路の一つを担っている小胞体ストレスセンサータンパク質 ATF6 が特異的に活性化することを私たちは見出した (Nakanishi et al. J. Cell Biol. 169, 555-560 (2005))。そこで、ATF6 が特異的に活性化するとどのような効果が現れるのか、特に細胞がどのようにしてアポトーシスを起こすのかという点に焦点を当て、小胞体ストレス応答経路による細胞運命制御の仕組みを知ることを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

筋分化過程にとって重要であることが示

唆されている小胞体ストレスセンサーATF6の強制発現を筋芽細胞において行い、遺伝子発現調節やアポトーシス誘導に対する効果を調べた。従来の小胞体ストレス応答研究では ATF6 経路のみが単独で機能した場合の効果については調べられた例が無かった。

「活性化型 ATF6 の発現」

活性化型 ATF6 (小胞体膜局在型 ATF6 前駆体が特異的なプロテアーゼによってプロセスされた後の断片に相当する。核移行能を持ち、転写因子として機能する) を発現するマウス筋芽細胞株を用意し、ATF6 活性がどのシグナル系を活性化し、アポトーシス誘導や筋分化に対してどのような効果を与えるかを解析した。誘導発現を可能にするプロモーターの下流に活性化型 ATF6 cDNA を配置したプラスミドを構築し、これをトランスフェクションで筋芽細胞に入れて発現レベルを段階的に調節できる定常発現細胞株を作製した。また、活性化型 ATF6 cDNA を CMV プロモーターの下流に配したプラスミドを一過性のトランスフェクションまたはエレクトロポレーションによって導入した筋芽細胞も用いた。

「活性化型 ATF6 による遺伝子発現調節の解析」

ATF6 の発現上昇によって変化する遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。この解析によって発現が大きく変化する可能性があると思われる遺伝子については、リアルタイム PCR による解析も併せて行った。

ATF6 の作用で遺伝子発現が大きく変わる遺伝子群 (DA (downstream of active ATF6) 遺伝子群と名付けた) を一過性トランスフェクションによって筋芽細胞に導入し、強制発

現によるアポトーシス誘導効果の有無について検討した。また、RNAi を利用して筋芽細胞の DA 遺伝子をノックダウンした上で、活性化型 ATF6 を強制発現させ、アポトーシス誘導の効率に変化が起きるかどうかを検討した。

4. 研究成果

「活性化型 ATF6 発現の効果」

マウス筋芽細胞株において活性化型 (転写因子型) ATF6 を強制発現させる条件を確立し、細胞の生死に与える影響を解析した。筋芽細胞において ATF6 を強制発現させた時の ATF6 タンパク質レベルは、他のタンパク質について同じベクターを用いて発現を行った場合に比べて格段に低いことが分かった。ATF6 に各種のタグを付けて発現させることを試みた結果、緑色蛍光タンパク質 (GFP) タグを ATF6 の N 末端側に付加することで安定性が増大することを見出した。誘導発現型及び一過性発現型の活性化型 ATF6 (GFP 融合体) とともに核局在を示し、筋芽細胞の細胞死を引き起こすことが明らかになった。

活性化型 ATF6 の発現により、小胞体上ではカスパーゼ 12 が活性化し、さらにカスパーゼカスケード下流に位置するカスパーゼ 9、-3 が活性化してタンパク質を切断し、細胞死を引き起こしていることを確認した。Bcl-xL の共発現はこの ATF6 依存性の細胞死を抑制した。これらの結果はここで見られる細胞死がアポトーシスであること、カスパーゼファミリーと Bcl-2 ファミリーによってそれぞれ正負に制御されていることを支持する。

ATF6 の発現によりアポトーシスを起こした細胞中では、細胞防御に働く小胞体特異的分子シャペロン、BiP の増加が見られた。BiP は活性化型 ATF6 によって発現上昇を起こすことが知られている。遺伝子導入された筋芽

細胞の中には活性化型 ATF6 の発現が低レベルで起こっている細胞が含まれており、その場合にはアポトーシスが起きない。しかし、そのような生細胞中においても BiP の増加は検出された。従って、ATF6 は低レベルで発現されている場合には、以前から知られていたように細胞防御に働くが、しかし発現が高レベルになるとアポトーシス誘導の機能が発揮されるようになることが示唆された。すなわち、ATF6 機能の二面性は量的なコントロールによって生じていると解釈された。GFP タグの無い ATF6 の発現レベルが低いことは、ATF6 の量が一般的なタンパク質に比べて厳密にコントロールされていることを示唆しているのかもしれない。

また、活性化型 ATF6 (GFP 誘導体) の発現は、増殖条件下では誘導発現、一過性発現ともに可能であったが、分化誘導条件下では達成できなかった。これは、分化誘導条件下において活性化型 ATF6 の安定性がさらに低下するためであると考えられる。分化誘導条件下で活性化型 ATF6 を強制発現させるには、安定化の工夫が必要であろう。例えばプロテアソーム阻害剤を添加すれば ATF6 の安定性は増すことが分かったが、一方で細胞の他の機能に影響を与えてしまうため、実験系の確立ができなかった。

活性化型 ATF6 に含まれている DNA 結合ドメインのみから成る断片は優性阻害的に転写活性を抑制することが既に知られている。この優性阻害型 ATF6 断片を活性化型 ATF6 と共発現させたと、アポトーシス誘導が阻害された。従って、活性化型 ATF6 のアポトーシス誘導活性はその転写調節機能に依存していることが示唆された。

「活性化型 ATF6 による転写調節」

活性化型 ATF6 の働きによって発現が誘

導される遺伝子の探索を DNA マイクロアレイ解析によって行なった。活性化型 ATF6 cDNA をエレクトロポレーションにより筋芽細胞に導入した後、全 RNA を得た。RNA から cDNA、さらに cRNA を試験管内で合成し、DNA チップとハイブリダイズさせて発現パターンを解析を行った。

活性化型 ATF6 を導入した筋芽細胞とベクターを導入した筋芽細胞から調製した試料の発現パターンを比べて、ATF6 に依存した発現誘導が顕著な 44 の DA 遺伝子を同定した。44 遺伝子の中には、小胞体ストレス応答で発現上昇し、細胞防御に関わることが知られているもの、細胞防御やアポトーシス以外の現象に関与すると考えられるものが多く含まれていた。それ以外に機能未知の遺伝子が七つ含まれていた。これらの cDNA を CMV プロモーターの制御下で筋芽細胞に発現させ、細胞死を引き起こすかどうかを検討した。その結果、WW ドメイン結合タンパク質 1 (WBP1) 遺伝子の産物が筋芽細胞においてアポトーシス誘導活性を示すことを見出した。

「WBP1 の機能解析」

WBP1 の細胞内機能はこれまで解明されていない。活性化型 ATF6 は WBP1 の転写を 2.5 倍以上増加させた。WBP1 タンパク質は生細胞中ではウエスタンブロットによる検出限界程度しか存在しないが、活性化型 ATF6 の強制発現や小胞体ストレス誘導剤 (ツニカマイシン、タプシガルジン) によってアポトーシスが引き起こされるときに顕著に増加した。従って、小胞体ストレスによって活性化される ATF6 は WBP1 の発現誘導を介してアポトーシスを起こすことが示唆された。

WBP1 遺伝子に対する shRNA (小ヘアピン

RNA)を作製してそのノックダウンを行ったところ、活性化型 ATF6 を強制発現させた時のアポトーシス誘導効率が有意に低下した。このことは ATF6 によるアポトーシス誘導経路において、ATF6 の下流で WBP1 が機能していることを支持する。WBP1 に GFP タグを付けたものを筋芽細胞で発現させたところ、このタンパク質が小胞体膜上に局在することが分かった

「小胞体ストレスによるアポトーシス誘導経路」

ATF6 の単独強制発現によって WBP1 が出現し、アポトーシスが誘導される。小胞体ストレス誘導剤によって筋芽細胞をアポトーシスに導くと、同様に WBP1 の出現が見られた。このとき、アポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2 ファミリータンパク質の中で Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) が特異的に消失することを見出した。アポトーシス抑制能を持つ Bcl-2 や Bcl-xL の量に変化は見られなかった。Mcl-1 レベルの特異的な減少は、活性化型 ATF6 の強制発現、WBP1 の強制発現、小胞体ストレス誘導剤の添加、いずれの場合にも共通して見られた。ただし、ATF6 の強制発現によって Mcl-1 の転写量は影響を受けないことが確認された。従って、Mcl-1 の減少はおそらくユビキチン・プロテアソーム系による分解が Mcl-1 特異的に昂進するためではないかと考えられる。WBP1 が小胞体膜上に局在することを考慮すると、WBP1 が小胞体膜上にある Mcl-1 に直接または間接的に作用して、その安定性を下げている可能性が出てきた。

以上の結果から、1) 活性化型 ATF6 はアポトーシスを引き起こすこと、2) 活性化

型 ATF6 の効果はその転写調節活性によること、3) アポトーシス誘導に関わる ATF6 の標的が WBP1 であること、4) 活性化型 ATF6 量の増加→WBP1 の転写上昇→Mcl-1 の減少というアポトーシス誘導経路が存在することを明らかにし、5) アポトーシスの開始にとって Mcl-1 の減少が決定的であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① 森島信裕、中西慶子、中野明彦、 Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein 1. The Journal of Biological Chemistry、査読有、Vol. 286、2011年、pp. 35227-35235.

② 森島信裕、中西慶子、中野明彦、 Reply to Hu *et al.*: Mcl-1 reduction due to caspase-dependent cleavage during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. The Journal of Biological Chemistry、査読無、Vol. 286、2011年、1e25.

[学会発表] (計4件)

① 森島信裕、中西慶子、中野明彦、 ATF6 mediates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis with reduction of an anti-apoptotic protein, Mcl-1. 第34回日本分子生物学会年会、2011. 12. 16. パシフィコ横浜 (神奈川県)

② 中西慶子、中野明彦、森島信裕、
Endoplasmic reticulum (ER) stress induces
ER membrane deformation as a possible
defense mechanism. 第33回日本分子生物
学会年会・第83回日本生化学会大会合同大
会、2010.12.7. 神戸コンベンションセンタ
ー (兵庫県)

③ 中西慶子、中野明彦、森島信裕、小胞体
ストレスは小胞体膜構造変化を誘導する、第
62回日本細胞生物学会大会、2010.5.21.
大阪国際会議場 (大阪府)

④ 中西慶子、中野明彦、森島信裕、Vesicle
formation from endoplasmic reticulum (ER)
during cellular stress. 第32回日本分子生
物学会年会、2009.12.12. パシフィコ横浜
(神奈川県)

[図書] (計2件)

① 森島信裕、羊土社、実験医学別冊 細胞
死実験プロトコール、2011. pp. 119-131.

② 森島信裕、羊土社、実験医学増刊 細胞
死研究総集編、2010. pp. 109-115.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森島 信裕 (MORISHIMA NOBUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究
室・専任研究員

研究者番号：40182232

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし