

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 4 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800049

研究課題名（和文）

小胞体ストレス応答による神経の分化及び機能制御機構の解析

研究課題名（英文）

The analysis of the differentiation and function of the cells in central nervous system regulated by endoplasmic reticulum stress response.

研究代表者

齋藤 敦 (SAITO ATSUSHI)

広島大学・大学院 医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30580394

研究成果の概要（和文）：

小胞体ストレスセンサーOASIS もしくはBBF2H7 が欠損することで、神経前駆細胞からアストロサイト及び神経細胞への分化・成熟が遅延していることを明らかにした。さらに転写因子である OASIS 及び BBF2H7 の中枢神経系における標的遺伝子を同定することを試み、OASIS の中枢神経系における直接的な標的遺伝子を同定することに成功した。また、OASIS と OASIS の標的遺伝子によるアストロサイト分化誘導は、DNA 脱メチル化を伴うエピジェネティックな制御機構を介していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We revealed that the differentiation of neural precursor cells into astrocytes or neurons was delayed by OASIS or BBF2H7 deficiency. We tried to identify the target genes of transcription factors OASIS and BBF2H7. Consequently, we identified the direct target genes of OASIS in central nervous system. Further, we revealed that the acceleration of the differentiation of neural precursor cells into astrocytes by the signaling from OASIS mediated the epigenetic regulation which promoted the demethylation of the promoter region of astrocyte-specific marker genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：小胞体ストレス、OASIS、転写因子、エピジェネティクス、アストロサイト、分化・成熟

1. 研究開始当初の背景

近年、小胞体ストレス応答は細胞の危機的状態から回避するためだけのシステムではなく、特定の細胞の分化・成熟にも重要な役割を演じ

ていることが証明されている。申請者が発見した新規小胞体ストレスセンサーOASIS 及びBBF2H7 は神経幹細胞からアストロサイト或いは神経細胞への分化に重要な役割を担っていることを明らかにしている。神経幹細胞から各種細

胞への正常な分化は神経ネットワークの形成において極めて重要であり、これらの異常が各種の精神疾患発症に関与する可能性は数多く報告されている。小胞体ストレス応答の破綻及び小胞体機能異常が様々な精神疾患の発症に直結することもヒトの遺伝子機能解析やマウスモデルを用いた研究から明らかにされ、小胞体ストレス応答は疾患研究の一つの大きな領域を占めるに至っている。

2. 研究の目的

小胞体ストレス応答による細胞分化制御の分子機構解明を目指し、神経系における小胞体ストレス応答パラダイムの詳細なシグナル系統図を完成させる。具体的には転写因子である小胞体ストレスセンサーOASIS および BBF2H7 の中枢神経系における標的遺伝子の同定を試み、小胞体機能によって制御される中枢神経系細胞の分化・成熟メカニズムを明らかにする。この成果は創薬に結びつくリード化合物のスクリーニング系の構築や、小胞体機能異常およびそれによって引き起こされる神経ネットワーク形成異常に起因する精神疾患の治療法確立の実現へと応用する。

3. 研究の方法

小胞体ストレスセンサーとして機能する OASIS 及び BBF2H7 の神経系における役割を明らかにするため、胎生期 14.5 日目のマウスより神経前駆細胞を採取し、適切な薬剤を添加することによって培養 Dish 上でアストロサイトもしくは神経細胞へと分化させ、各分化マーカーの発現レベルを野生型細胞と OASIS もしくは BBF2H7 欠損細胞とで比較した。さらに転写因子である OASIS および BBF2H7 の中枢神経系における標的遺伝子を同定することを試み、初代培養神経前駆細胞を用いて野生型マウスと遺伝子欠損マウスにおける遺伝子発現レベルをマイクロアレイプロファイリングによる網羅的解析によって比較検討した。ピックアップした候補遺伝子については、各センサータンパクを過剰発現させることで、候補遺伝子の発現レベルが回復することを RT-PCR、ウェスタンブロットティングでチェックした。また、各センサータンパクから候補遺伝子へと連なるシグナル経路と、これらのシグナル経路が中枢神経系細胞の分化・成熟を制御している詳細な分子メカニズムを、ウェスタンブロットティング、RT-PCR、免疫染色、DNA メチレーションアッセイなどを駆使して解析した。

また、小胞体ストレスセンサーOASIS および BBF2H7 がどのような小胞体内環境に曝されたときに活性化および分解するのかをウェスタンブロットティングや RT-PCR、Tet-off システ

ムを利用した遺伝子発現系の構築によって検討した。ピックアップした各センサータンパクの活性化および分解に関わる候補遺伝子に関しては、siRNA を用いたノックダウン実験によって遺伝子発現を抑制し、各センサータンパクの活性化および分解に与える影響を検討した。

4. 研究成果

OASIS もしくは BBF2H7 が欠損することで、神経前駆細胞からアストロサイト及び神経細胞への分化・成熟が遅延していることを明らかにした。さらに転写因子である OASIS および BBF2H7 の中枢神経系における標的遺伝子を同定することを試みた結果、OASIS の中枢神経系における直接的な標的遺伝子を同定することに成功した。さらに、この標的遺伝子を OASIS 欠損神経前駆細胞に導入することで、神経前駆細胞からアストロサイトへの分化遅延は改善された。また、OASIS と OASIS の標的遺伝子によるアストロサイト分化誘導は、DNA 脱メチル化を伴うエピジェネティックな制御機構を介していることを明らかにした。実際に OASIS 欠損神経前駆細胞では、アストロサイト特異的なマーカー遺伝子のプロモーター領域における DNA 脱メチル化が遅延しており、遺伝子発現が抑制されていた。しかしながら OASIS 欠損神経前駆細胞に OASIS もしくは同定した OASIS の標的遺伝子を導入することで、DNA 脱メチル化が促進されることを見出した。以上の結果より、OASIS から発信される小胞体ストレス応答シグナルが、アストロサイトマーカー遺伝子のプロモーター領域における DNA 脱メチル化を解して神経前駆細胞からアストロサイトへの分化・成熟を制御していることを明らかにすることができた。

さらに OASIS および BBF2H7 の活性化機構を解明するために、両分子の生化学的特性について解析した。その結果、(1) OASIS および BBF2H7 は常にプロテアゾームによる分解を受けている。(2) 小胞体ストレスが負荷されると、OASIS および BBF2H7 は分解から回避し、安定化する。(3) 安定化した OASIS および BBF2H7 はすみやかにゴルジ装置に輸送され、プロテアーゼ S1P および S2P による膜内切断を受ける。(4) E3 ユビキチンライゲースである HRD1 が OASIS および BBF2H7 のプロテアゾーム分解に関与するということが明らかとなった。これらの成果によって OASIS の中枢神経系における機能の一端を明らかにすることができた。本研究結果は小胞体ストレス応答シグナルが神経系細胞の分化・成熟を担う新たな役割を有している可能性を示唆しており、複雑な小胞体ストレス応答機構の解明に、大きな進展をもたらすことが期待でき

る。今後は神経系細胞の分化遅延による神経ネットワーク形成機構の異常について重点的に解析を行うことで精神疾患発症との関連性を明らかにし、精神疾患の新たな治療基盤構築を目指す。

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6件)

(1) Asada R, Saito A, Kawasaki N, Kanemoto S, Iwamoto H, Oki M, Miyagi H, Izumi S, Imaizumi K.: The endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in the terminal differentiation of goblet cells in the large intestine. *Journal of Biological Chemistry*, 287: 8144-8153, 2012. 査読有.

DOI:10.1074/jbc.M111.332593

(2) Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T, Cavener DR, Imaizumi K.: ER stress response mediated by the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 4809-4818, 2011. 査読有.

DOI:10.1074/jbc.M110.152900

(3) Asada R, Kanemoto S, Kondo S, Saito A, Imaizumi K.: The signaling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. *Journal of Biochemistry*, 149: 507-518, 2011. 査読有.

DOI:10.193/jb/mvr041

(4) Kondo S, Saito A, Asada R, Kanemoto S, Imaizumi K.: Physiological unfolded protein response regulated by OASIS family members, transmembrane bZIP transcription factors. *IUBMB Life*, 63: 233-239, 2011. 査読有.

DOI:10.1002/iub.433

(5) Hino S-I, Kondo S, Yoshinaga K, Saito A, Murakami T, Kanemoto S, Sekiya H, Chihara K, Aikawa Y, Hara H, Kudo T, Sekimoto T, Funamoto T, Chosa E, Imaizumi K.: Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 28: 131-138, 2010. 査読有.

DOI:10.1007/s00774-009-0117-z

(6) Sekiya H, Murakami T, Saito A, Hino S-I, Tsumagari K, Ochiai K, Imaizumi K.: Effects of the bisphosphonate risedronate on osteopenia in OASIS-deficient mice.

Journal of Bone and Mineral Metabolism, 28: 384-394, 2010. 査読有.

DOI:10.1007/s00774-009-0142-y

[学会発表] (計25件)

(1) 齋藤敦、佐野坂司、中島欽一、今泉和則: The role of ER stress transducer OASIS in astrocyte differentiation. 第43回広島神経医科学研究会, 広島, 1/30, 2012.

(2) 近藤慎一、齋藤敦、金本聡自、川崎範隆、浅田梨絵、今泉和則: 小胞体ストレスセンサーOASISおよびBBF2H7の活性化機構の解析. 第43回広島神経医科学研究会, 広島, 1/30, 2012.

(3) 浅田梨絵、川崎範隆、齋藤敦、近藤慎一、金本聡自、今泉和則: The endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in the terminal differentiation of goblet cells in the large intestine. 第43回日本分子生物学会年会, 横浜, 12/13, 2011.

(4) 浅田梨絵、齋藤敦、今泉和則: 小胞体ストレスセンサーOASISによる大腸粘膜細胞の分化制御. 2011年度特定領域研究「タンパク質の社会」全体班会議, 大分, 11/22, 2011.

(5) Saito A, Kondo S, Kanemoto S, Sanosaka T, Nakashima K, Wanaka A, Imaizumi K.: The role of an ER-resident transmembrane transcription factor OASIS in astrocyte differentiation. The 41th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington D.C., U.S.A, 11/15, 2011.

(6) 浅田梨絵、齋藤敦、今泉和則: 小胞体ストレスセンサーOASISによる大腸粘膜杯細胞の分化機構. 第6回小胞体ストレス研究会, 岡山, 10/28, 2011.

(7) 近藤慎一、齋藤敦、金本聡自、川崎範隆、浅田梨絵、今泉和則: 小胞体ストレスセンサーOASISおよびBBF2H7の活性化機構の解析. 第6回小胞体ストレス研究会, 岡山, 10/28, 2011.

(8) 齋藤敦、浅田梨絵、佐野坂司、中島欽一、今泉和則: 小胞体ストレスセンサー群によるアストロサイト分化制御の分子機

構. 第 16 回グリア研究会, 名古屋, 10/22, 2011.

(9) 齋藤敦、佐野坂司、中島欽一、今泉和則 : The role of an ER-resident transmembrane transcription factor OASIS in astrocyte differentiation. 第 54 回日本神経化学学会大会シンポジウム, 石川, 9/28, 2011.

(10) 近藤慎一、齋藤敦、浅田梨絵、金本聡自、今泉和則 : 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS および BFF2H7 の活性化機能の解析. 第 84 回日本生化学学会大会, 京都, 9/23, 2011.

(11) 齋藤敦、近藤慎一、金本聡自、今泉和則 : 小胞体局在膜貫通型転写因子 OASIS のアストロサイト分化における役割. 第 84 回日本生化学学会大会シンポジウム, 京都, 9/22, 2011.

(12) 齋藤敦、佐野坂司、中島欽一、今泉和則 : CREB/ATF transcription factors regulate astrocyte differentiation by fine-tuning the Gcm1 expression. 2011 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ, 神戸, 8/23, 2011.

(13) 齋藤敦、今泉和則 : 小胞体ストレスセンサー群によるアストロサイト分化制御の分子機構. 第 13 回 ORIGIN 神経科学研究会夏のワークショップ 2011, 芦屋, 8/21, 2011.

(14) 金本聡自、齋藤敦、近藤慎一、今泉和則 : 小胞体ストレスセンサー BFF2H7 は ATF5-MCL1 経路を活性化することで軟骨細胞のアポトーシスを制御する. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 7/30, 2011.

(15) 齋藤敦、近藤慎一、金本聡自、浅田梨絵、今泉和則 : 骨芽細胞分化における PERK-eIF2 α -ATF4 経路を介した小胞体ストレス応答の役割. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 7/28, 2011.

(16) 近藤慎一、齋藤敦、浅田梨絵、金本聡自、今泉和則 : 小胞体ストレスセンサー OASIS および BFF2H7 の活性化機構. 第 52 回日本生化学学会大会中国・四国支部総会, 広島, 5/13, 2011.

(17) 浅田梨絵、齋藤敦、近藤慎一、金本聡自、今泉和則 : 転写因子 OASIS による大腸粘膜における杯細胞の分化制御. 第 52 回日本生化学学会大会中国・四国支部総会, 広島, 5/13, 2011.

(18) 齋藤敦、佐野坂司、中島欽一、今泉

和則 : 転写因子 OASIS を介した小胞体ストレス応答によるアストロサイト分化制御. 第 52 回日本生化学学会大会中国・四国支部総会, 広島, 5/13, 2011.

(19) 齋藤敦、佐野坂司、中島欽一、和中明生、今泉和則 : The role of ER stress transducer OASIS in astrocyte differentiation. 第 116 回日本解剖学会総会全国学術集会, 誌上開催, 3/28, 2011.

(20) 齋藤敦、佐野坂司、中島欽一、和中明生、今泉和則 : アストロサイト分化における小胞体ストレスセンサー OASIS の役割. 第 42 回広島神経医科学研究会, 広島, 1/28, 2011.

(21) Saito A, Ochiai K, Murakami T, Sanosaka T, Nakashima K, Wanaka A, Imaizumi K. : The role of ER stress transducer OASIS in astrocyte differentiation. The 3rd international symposium on protein community, Nara, 9/14, 2010.

(22) 齋藤敦、今泉和則 : アストロサイトの分化における小胞体ストレスセンサー OASIS の役割. 第 12 回 ORIGIN 夏の神経科学ワークショップ, 京都, 9/5, 2010.

(23) 齋藤敦、落合希実子、村上智彦、佐野坂司、中島欽一、和中明生、今泉和則 : The role of endoplasmic reticulum stress response in astrocyte differentiation. 第 53 回日本神経化学学会大会, 神戸, 9/2, 2010.

(24) 落合希実子、齋藤敦、今泉和則 : 骨芽細胞分化における PERK-ATF4 経路を介した小胞体ストレス応答の役割. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 7/21, 2010.

(25) Saito A, Ochiai K, Murakami T, Sanosaka T, Nakashima K, Wanaka A, Imaizumi K. : The role of ER stress response in astrocyte differentiation. Abstracts of papers presented at the 2010 meeting on Molecular Chaperones & Stress Responses, N.Y., U.S.A., 5/7, 2010.

[その他]
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/imaizumi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 敦 (SAITO ATSUSHI)

広島大学・大学院 医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：30580394

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：