

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790238  
 研究課題名 (和文) 神経変性疾患における小胞体ストレス誘導性オートファジーの分子生物学的解析  
 研究課題名 (英文) Molecular biological analysis for ER stress-induced autophagy in the neurodegenerative disorder  
 研究代表者  
 日野 真一郎 (SHINICHIRO HINO)  
 宮崎大学・医学部・助教  
 研究者番号：00372699

研究成果の概要：神経変性疾患における小胞体ストレス応答とオートファジーの関連性から、小胞体ストレスによりオートファジーが誘導されることを見出した。この新規タンパク質分解経路の制御による脳内異常タンパク質除去の可能性を見極めるために、小胞体ストレス誘導性オートファジーによるタンパク質分解機構について検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：小胞体ストレス、オートファジー、分子生物学、神経変性疾患

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 小胞体で起こるタンパク質折り畳みが、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。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が誘導され、小胞体内腔に蓄積した異常タンパク質を折り畳むことで細胞死から防御する。各種神経変性疾患ではこの防御機構が破綻して、異常タン

パク質の蓄積を招き、神経細胞死につながる事が明らかになった。このように小胞体ストレスが各種の神経変性疾患の発症に深く関連することが数多く報告され、小胞体ストレスの重要性が注目されている。

(2) 神経変性疾患にみられる細胞内の現象として、オートファジー (自己成分消化システム) が亢進することが報告されている。オートファジーは、すべての真核細胞に存在する

主要な自己成分消化システムである。オートファジーは、日常的な細胞の代謝回転に貢献しているが、状況に応じて著しく誘導され、飢餓時の栄養源確保やオルガネラの量的調節に働く。

(3)筆者らは、神経変性疾患における小胞体ストレス応答とオートファジーの関連性から、小胞体ストレスによりオートファジーが誘導されることを見出した。しかしながら、その詳細な作用機構や生体内での役割は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

(1)本研究では、小胞体ストレス誘導性オートファジーによるタンパク質分解メカニズムの解析を行うとともに、この新規タンパク質分解経路の制御による脳内異常タンパク質除去の可能性を検討することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1)野生株マウス胚線維芽細胞 (MEF)、IRE1  $\alpha$   $\beta$  ノックアウトMEFなどの培養細胞に GFP-LC3をトランスフェクションし、小胞体ストレス誘導剤あるいは各種阻害剤添加時の細胞内シグナリングをウエスタンブロットや蛍光顕微鏡にて解析した。

(2)野生株 MEF、ATG5 ノックアウト MEF に小胞体ストレス誘導剤添加後、12、24、36 時間後にヘキスト染色を行い、生細胞とアポトーシス細胞を計測し、細胞死を起こした比率を定量化した。

(3)GFP-LC3をトランスフェクションした神経

芽細胞腫SK-N-SH細胞などの培養細胞に1時間 ER-Trackerで処理し、小胞体ストレス誘導剤添加後1分ごとにタイムラプスにて観察した。

(4)小胞体ストレス誘導性オートファジーの *in vivo* における役割を解析するために、小胞体内腔でタンパク質の異常蓄積が認められる BBF2H7 欠損マウスの軟骨細胞を電子顕微鏡にて観察した。

## 4. 研究成果

(1) Unfolded Protein Response (UPR) の主要な小胞体ストレスセンサーは、IRE1、PERK、ATF6 の 3 種である。どのセンサーが小胞体ストレス誘導オートファジーシグナルに関与しているかを解析した。IRE1 ノックアウト MEF においては、小胞体ストレスを負荷しても GFP-LC3 のドット面積の増加が見られないことから、小胞体ストレス誘導性オートファジーには、小胞体ストレスセンサーのうちの PERK や ATF6 ではなく、IRE1 が必要であることが明らかとなった。さらに JNK 阻害剤を細胞に作用させた場合、TRAF2 のドミナントネガティブを GFP-LC3 と共に細胞にトランスフェクションした場合ともに、小胞体ストレスによる GFP-LC3 ドット面積の上昇は抑制された。これらの結果より、小胞体ストレスによるオートファジーは、IRE1 から、TRAF2、JNK を介している可能性が強く示唆された。このことから神経変性疾患でみられる異常タンパク質除去のためには、IRE1-TRAF2-JNK の経路の制御法開発が重要と考えられた。

(2)オートファジー不全株である ATG5 ノックアウト MEF に小胞体ストレスを負荷することで、より多くの細胞死を起こした。したがって、オートファジーは小胞体ストレスから細胞を保護する役目を持つことから、各種神経

変性疾患でみられる小胞体ストレス防御機構の破綻による神経細胞死に対して、オートファジーが保護的に作用する可能性を有することが示唆された。

(3) 小胞体ストレス誘導剤サブシガルギンを用いたタイムラプスによる解析から、小胞体ストレスによるオートファゴソームは細胞質内をはげしく移動することが観察され、このオートファゴソームは小胞体マーカーと全く一致しないことが明らかとなった。この結果は、種々の小胞体ストレス誘導剤や培養細胞を用いた解析からも同様に確認することができた。したがって、小胞体ストレス誘導性のオートファジーは小胞体内腔の異常タンパク質の分解ではなく、細胞質内でのタンパク質分解に機能することが考えられた。

(4) 筆者らは、小胞体内腔でタンパク質の異常蓄積が認められるBBF2H7(小胞体ストレスセンサー)欠損マウスの樹立に成功した。このマウスの軟骨細胞ではII型コラーゲンの発現時期に対応して小胞体ストレス応答がみられることから、*in vivo*での小胞体ストレス誘導性オートファジーによるタンパク質分解の基質特異性を検討した。電子顕微鏡による観察からは、オートファジーによって分解される小胞体内腔の異常タンパク質は認められなかった。したがって、小胞体ストレス誘導性オートファジーの制御は、小胞体の外に蓄積するポリグルタミン蛋白質などにより発症する神経変性疾患に対して有効である可能性が考えられた。

## 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4件)

①齋藤敦\*、日野真一郎\*、村上智彦、金本聡自、近藤慎一、齋藤 正寛、西村理行、米田俊之、古市達哉、池川志郎、伊川正人、岡部勝、今泉和則 : Regulation of ER stress response by BBF2H7/Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nature Cell Biology*, 2009 in press、査読有

(\*These authors contributed equally to this work)

②近藤慎一、齋藤敦、日野真一郎、村上智彦、緒方麻衣子、金本聡自、奈良諭、山下明紀、吉永一也、原英彰、今泉和則 : BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Molecular and Cellular Biology*, 7 巻、1716-1729、2007、査読有

③日野真一郎、近藤慎一、関屋裕史、齋藤敦、金本聡自、村上智彦、千原一泰、青木悠里、中森雅之、高橋正紀、今泉和則 : Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 16 巻、2834-2843、2007、査読有

④村上智彦、日野真一郎、齋藤敦、今泉和則 : Endoplasmic reticulum stress response in dendrites of cultured primary neurons. *Neuroscience*, 146 巻、1-8、2007、査読有

[学会発表] (計7件)

①齋藤敦、日野真一郎、今泉和則 : 新規小胞体ストレスセンサーBBF2H7 欠損マウスにお

ける軟骨形成異常. 第 114 回日本解剖学会全国学術集会. 2009 年 3 月 28 日, 岡山.

②齋藤敦、日野真一郎、今泉和則：新規小胞体ストレスセンサーBBF2H7 欠損による軟骨形成異常. 特定領域研究 2008 年度「タンパク質の社会」班会議. 2008 年 11 月 24 日、沖縄.

③日野真一郎、齋藤敦、今泉和則：軟骨形成と小胞体ストレストランスデューサーBBF2H7. 第 3 回臨床ストレス応答学会大会. 2008 年 11 月 15 日、秋田.

④齋藤敦、日野真一郎、今泉和則：新規小胞体ストレスセンサーBBF2H7 欠損による軟骨形成異常. 第 26 回日本骨代謝学会学術集会. 2008 年 10 月 29 日、大阪.

⑤日野真一郎、齋藤敦、今泉和則：小胞体ストレスセンサーBBF2H7 遺伝子欠損マウスの解析. 日本解剖学会第 64 回九州支部学術集会. 2008 年 10 月 25 日、福岡.

⑥日野真一郎、齋藤敦、近藤慎一、今泉和則：小胞体ストレスセンサーBBF2H7 欠損マウスの生体内機能解析. 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2008 年 3 月 29 日、大分.

⑦日野真一郎、齋藤敦、近藤慎一、今泉和則：小胞体ストレスセンサーBBF2H7 の機能解析. 第 2 回臨床ストレス応答学会大会. 2007 年 11 月 30 日、福岡.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日野 真一郎 (SHINICHIRO HINO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00372699