

## 論文内容要旨

The endoplasmic reticulum stress transducer BBF2H7 suppresses apoptosis by activating the ATF5-MCL1 pathway in growth plate cartilage.

(小胞体ストレスセンサーBBF2H7は成長軟骨において ATF5-MCL1 経路を活性化させアポトーシスを抑制する)

The Journal of Biological Chemistry, 287(43):36190-36200,2012.

主指導教員：越智 光夫 教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹 教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

副指導教員：下瀬 省二 准教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

泉 聡太郎

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

小胞体はタンパク質の合成、折り畳みや修飾を担うオルガネラである。しかし、細胞が様々な異常環境に曝されると、その均衡のとれた小胞体の働きに破綻を来し、折り畳みが不完全なタンパク質が小胞体内に大量に蓄積しはじめる。細胞はこの様な異常状態(小胞体ストレス)を感知する小胞体ストレスセンサーを有しており、異常タンパク質の修復や分解を行うシステムを用いて小胞体内の環境を整え、細胞傷害から身を守っている。このシステムを小胞体ストレス応答と呼ぶ。小胞体ストレス応答は、近年、糖尿病、アルツハイマー病、大腸炎などの病態に関与していることが報告されており病態解明に向けて注目されている。主要な小胞体ストレスセンサーとして、IRE1、PERK、ATF6 があり、全身のすべての細胞に発現していると考えられている。我々は、過去に新たな小胞体ストレスセンサーとして、OASIS family を同定している。OASIS family とは、OASIS、CREBH、AlbZIP、Luman、そして BBF2H7 である。そのうちの一つである BBF2H7 は、小胞体膜上に局在し、1 回膜貫通型のタンパク質で小胞体ストレスによって膜内切断を受け、DNA 結合領域である bZIP ドメインを含む N 末断片が核内に移行し、転写因子として機能する。この BBF2H7 は、成長軟骨の増殖軟骨細胞層に強く発現している。また、過去に作成された *Bbf2h7* 欠損マウスは、胎生致死となるが胎生期において、軟骨形成不全を認める。この成長軟骨の低形成は軟骨細胞数の減少が大きな要因であった。

そこで、本研究はこの軟骨細胞数が減少する表現型に着目し、その分子機構の解明を目的に研究を実施した。

まず、細胞数の減少が積極的な細胞死の亢進である可能性を考えアポトーシスを検出する TUNEL 染色を *Bbf2h7* 欠損マウスの成長軟骨を用いて実験した。その結果、関節周辺の TUNEL 染色を行うと野生型マウスと比較して、アポトーシスが亢進していることが明らかとなった。そこで、次に BBF2H7 欠損マウスの骨端部でアポトーシスが亢進している原因を検討した。軟骨細胞における BBF2H7 の転写ターゲットとして、過去に malignant glioma で報告されていた ATF5 に着目した。ATF5 は、抗アポトーシス作用を持つことが報告されている。軟骨細胞で、BBF2H7 が直接 ATF5 を転写誘導するか確認することとした。初代培養細胞において、*Atf5* の発現は *Bbf2h7* 欠損軟骨細胞では、有意に低値であった。次に、ルシフェラーゼ遺伝子を用い、レポーター・アッセイを行った。BBF2H7 は *Atf5* 遺伝子の 5' 上流に存在する CRE (cyclic AMP response element) 配列に作用して、*Atf5* の転写を誘導することが知られている。野生型の CRE 配列に mutation を入れたコンストラクトでは、*Atf5* は誘導されなかった。また同様に、*Bbf2h7* 欠損マウス由来の初代培養細胞でも、*Atf5* の発現は低値であった。しかし、*Bbf2h7* 欠損マウス由来の軟骨細胞に、BBF2H7 を細胞に導入すると *Atf5* の発現は有意に上昇した。さらに、*Bbf2h7* 欠損マウス由来細胞に *Atf5* を導入することで、その下流の Bcl2 ファミリーの 1 つである *Mcl1* の発現が有意に上昇した。以上より BBF2H7 が直接、抗アポトーシス作用を持つ、

ATF5-MCL1 経路を活性化させていた。

また、興味深いことに、*Bbf2h7* 欠損マウスから得た初代培養軟骨細胞を小胞体ストレス誘発剤で処理すると、野生型軟骨細胞と比較して TUNEL 陽性細胞が増加するが、*Atf5* をアデノウイルスベクターを用いて細胞内に導入することで、同様の刺激を加えても TUNEL 陽性細胞数は野生型と同等レベルまで減少された。しかし、小胞体ストレスを生じないアポトーシス誘発剤であるスタウロスポリンやエトポシドで処理しても、TUNEL 陽性細胞数に 2 群間で差は認められなかった。このことは、BBF2H7-ATF5-MCL1 経路は、小胞体ストレス誘導性アポトーシスに対して抑制的に働くことを示唆している。

以上の結果より、*Bbf2h7* 欠損マウスで観察された、成長軟骨周囲の軟骨細胞数の減少およびアポトーシス増加のメカニズムを以下のように考察した。軟骨細胞分化において、軟骨細胞は大量の細胞外基質を分泌し、その際生じる小胞体ストレスに対し、BBF2H7 はその下流である ATF5-MCL1 経路を活性化させることで、小胞体ストレス誘発性アポトーシスを抑制していることが示唆された。*Bbf2h7* 欠損マウスの表現型は、致死性骨異形成症の病態と似ており、今回明らかにした分子メカニズムは、致死性骨異形成症の今後新たな治療標的となりうることを示唆している。(1704 字)

【2000 字以内】