

論 文 内 容 要 旨

The endoplasmic reticulum stress transducer
OASIS is involved in the terminal differentiation of
goblet cells in the large intestine.

(大腸杯細胞の最終分化における小胞体ストレスセンサーOASISの役割)

Journal of Biological Chemistry, 287(11) : 8144-8153, 2012.

主指導教員：今泉 和則 教授

(基礎生命科学部門 分子細胞情報学)

副指導教員：浅野 知一郎 教授

(基礎生命科学部門 医化学)

副指導教員：内匠 透 シニア・チームリーダー

(理化学研究所脳科学総合研究センター精神生物学研究チーム)

浅田 梨絵

(医歯薬学総合研究科創生医科学専攻)

タンパク質の多くは、小胞体で合成され正しい形に折り畳まれることで正常な機能を獲得する。細胞内外からの各種ストレスや大量の分泌タンパク質の合成は、小胞体機能を攪乱し不完全なタンパク質が小胞体内に大量に生み出される。このような状態を小胞体ストレスという。細胞にとって小胞体機能異常はきわめて重篤な事態で、直ちに小胞体膜上に存在する小胞体ストレスセンサーを起点とした防御機構である小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response; UPR) を活性化する。近年、UPR は防御機構としてだけでなく、特定の細胞の分化・成熟にも重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。当研究室で同定した転写因子 *old astrocyte specifically induced substance* (OASIS) は、小胞体膜貫通型転写因子であり、小胞体ストレスに応答して膜内切断を受け、bZIP ドメインを持つ N 末端側が核内に移行して標的遺伝子の転写を誘導する。OASIS は骨芽細胞やアストロサイトの分化に必須であることが明らかとなっているが、その他の組織における役割は不明である。生体内における OASIS の役割をより詳細に解明することを目的として本研究を行った。

全身の組織における OASIS の発現分布を RT-PCR によって解析すると、大腸においてきわめて強く発現していることが明らかとなった。大腸における OASIS 発現細胞を同定するために *in situ hybridization* を行うと、大腸粘膜上皮の陰窩底に存在する未成熟な杯細胞に強いシグナルが観察された。次に OASIS 欠損マウスの大腸粘膜における組織学的解析を行った。その結果、大腸粘膜の上皮構造及び吸収上皮細胞の形態に異常は認められなかったが、粘液を豊富に含んだ成熟杯細胞の数が野生型マウスと比較して著しく減少していた。粘液を染色する *Periodic Acid-Schiff* (PAS) 染色を行うと PAS 陽性細胞数や染色面積が減少しており、反対に粘液をほとんど含有しない未成熟杯細胞が増加していた。超微形態学的解析において、野生型マウスの杯細胞では整然と敷き詰められた大きな粘液小胞が細胞質中に数多く存在していたが、OASIS 欠損マウスでは不整形の粘液小胞が観察され、粘液小胞数も減少していた。以上より OASIS は大腸杯細胞の分化やそれに伴う粘液小胞の形成に関与することが示唆された。

大腸粘膜上皮の細胞は多能性幹細胞から吸収上皮細胞系と分泌細胞系に分化する。杯細胞は分泌細胞系から転写因子 *Growth factor-independent 1* (GFI1) により分化が制御されていると考えられている。OASIS 欠損マウスでは杯細胞のどの分化段階に異常を来しているのかを明らかにするために RT-PCR を用いて各分化段階におけるマーカー遺伝子の発現量を野生型と OASIS 欠損マウスで比較した。その結果、分泌系前駆細胞から杯細胞前駆細胞へ分化を決定づける遺伝子群の発現量は野生型と OASIS 欠損マウスで変化がなく、初期分化は正常であることが示唆された。しかし杯細胞前駆細胞のマーカー遺伝子である *Trefoil factor 3* (*Tff3*) の発現量が OASIS 欠損マウスで有意に増加し、一方で、*Mucin2* (*Muc2*) をはじめとした複数の成熟杯細胞マーカー遺伝子の発現量が軒並み OASIS 欠損マウスで減少していた。従って OASIS 欠損マウスでは杯細胞前駆細胞から成熟杯細胞への最終分化過程に異常があることが明らかとなった。

杯細胞の最終分化と OASIS の関連性をより詳細に解明するため、培養細胞を用いて杯細胞分化過程における OASIS の活性化レベルを検討した。ヒト結腸癌細胞 LS174T は酪酸ナトリウムで処理することで成熟杯細胞へと分化誘導することができる。LS174T を酪酸ナトリウムで処理し、その後の OASIS の発現をウェスタンブロットによって経時的に解析すると酪酸ナトリウム処理後 6 時間から OASIS の発現及び膜内切断が亢進しており、OASIS が杯細胞の分化過程において活性化していることが明らかとなった。更に OASIS の活性化と同調して小胞体ストレスマーカー遺伝子群の発現量が微量ではあるが有意に上昇しており、軽度の小胞体ストレスが発生していることが示唆された。siRNA を用いて *Oasis* をノックダウン(KD)した LS174T に酪酸ナトリウムで分化誘導を行い、経時的に成熟杯細胞マーカー遺伝子である *Muc2* や *Anterior gradient 2 (Agr2)* の発現量を調べると酪酸ナトリウム処理時間と共に増加していた発現量が *Oasis* KD によって抑制された。一方で小胞体ストレスマーカー遺伝子群の発現量は *Oasis* を KD してもコントロールと同様に上昇しており、OASIS の活性化に先行して小胞体ストレスが発生していることが示された。

本研究から OASIS は大腸杯細胞の分化過程で発生する軽微な小胞体ストレスに応答して活性化し、杯細胞前駆細胞から成熟杯細胞への最終分化を進めることが明らかとなった。OASIS は杯細胞以外の分泌機能を有する骨芽細胞やアストロサイトでも発現している。物質を分泌する細胞では分化過程で分泌装置が発達し、分泌機能を修得する。今回の解析では OASIS の転写ターゲットは明らかに出来なかったが、小胞体機能の増強や小胞輸送系に関わる遺伝子である可能性が高い。また OASIS の活性化の引き金となる軽微な小胞体ストレスは、分泌タンパク質の合成を開始した結果生じる小胞体への負担が原因になったものと推察された。