

小胞体ストレス応答を介した骨軟骨形成制御

今泉和則

未分化間葉系幹細胞から分化・成熟する骨芽細胞や軟骨細胞は、細胞外基質を大量に合成し細胞外に放出する典型的な分泌細胞である。これら細胞が機能を果たすためには、大量に合成されたタンパク質を品質管理し、スムーズに細胞外に分泌するマシーナリーを分化過程において獲得する必要がある。このシステム形成に小胞体ストレス応答系が使われている。小胞体ストレス応答は、基本的には小胞体に蓄積した異常タンパク質を排除し、細胞の危機から救う防御システムとして機能するが、それ以外に生体内では細胞の分化・成熟に積極的に関わる生理機能を発揮することが最近わかってきた。一方、小胞体ストレス応答に関連する遺伝子の欠損や変異は重篤な骨格形成障害を招く。骨軟骨における発生・分化や代謝のダイナミクスを理解する上で、さらには骨系統疾患の病態を解明するためにも小胞体を視点とした研究の重要性が高まっている。

1. はじめに

骨格系は細胞(骨芽細胞, 破骨細胞, 骨細胞, 軟骨細胞)と、細胞が作り出した豊富な細胞外基質から構成される。細胞外基質には、コラーゲンを主成分とするタンパク質ならびにミネラル(ハイドロキシアパタイト)が含まれ頑強な構造を形成している。個体の発生・成長期だけでなく、成長が終わった後も細胞は基質タンパクを産生・分泌し続け、細胞外基質は常に新しい組織に置換されている。このように骨格はダイナミックに細胞と物質の代謝を盛んに行う典型的な分泌組織である。そのため物質合成、タンパク質品質管理、細胞内輸送など物質を産生し分泌するための秩序立てた厳密な制御が必要となる。

小胞体は新しく合成されたタンパク質を適正に折りたたみ立体構造を形成して、品質の保証されたもののみを分泌系に送り出す役割を有する。処理できる上限を上回るほどの大量のタンパク質が合成される状況や、遺伝子変異や翻

訳後修飾などにより構造異常のタンパク質が小胞体に送り込まれる状況が生み出されると、小胞体の恒常性が崩れ小胞体にタンパク質が蓄積するようになる。この状態を小胞体ストレスと呼び、長時間にわたるストレスは細胞に傷害を与える。最近、このようなトキシックな作用以外に、小胞体ストレスは未分化細胞から分泌系細胞への分化に重要な役割を果たしていることが分かってきた。本稿では、小胞体ストレスとその応答システムが誘導する骨および軟骨形成の分子機構について概説する。

2. 小胞体ストレスとその応答システム

膜結合型タンパク質あるいは分泌型タンパク質は小胞体内に一旦運び込まれ、様々な修飾を受けて機能をもったタンパク質に成熟していく。低酸素、低グルコース、カルシウム濃度変化などの細胞を取り巻く環境変化、あるいは変異遺伝子から翻訳された異常タンパク質の産生、さらには大量のタンパク質合成などによりタンパク質の正常な成熟が阻害されると小胞体内に不良タンパク質(unfolded proteins)が蓄積し細胞にダメージを与える(小胞体ストレス)。過度にストレスが発生する場合、あるいは長時間継続する場合、細胞はアポトーシスを起こし死に至る¹⁻³⁾。細胞は小胞体の機能異常に対抗するための防御システムを備えている。この応答系は小胞体ストレス応答、あるいはunfolded protein response (UPR, 図1)と呼ばれ、酵母から

広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子細胞情報学
(〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3)

Regulation of osteogenesis and chondrogenesis by unfolded protein response

Kazunori Imaizumi (Department of Biochemistry, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan)

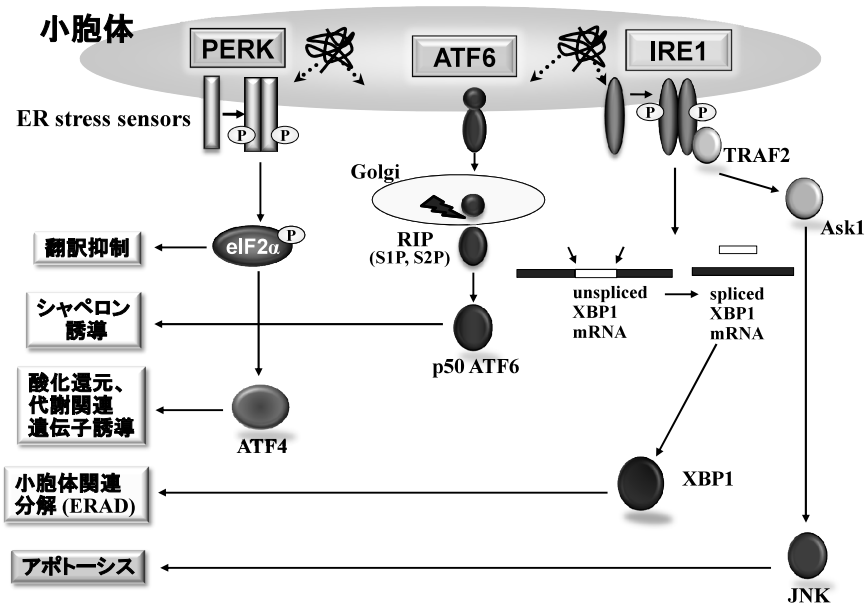


図1 哺乳細胞における小胞体ストレス応答 (unfolded protein response, UPR)

3種の小胞体ストレスセンサーはいずれも小胞体膜を貫通し、小胞体内腔ドメインと細胞質ドメインを有する。PERKは膜貫通型のキナーゼである。小胞体ストレスを感知すると活性化してeIF2 α をリン酸化し翻訳を阻害する。逆にuORFを有する一部の遺伝子に対しては翻訳を促進する。その結果、転写因子ATF4が誘導され、抗酸化作用のあるアミノ酸合成を促進する。ATF6は小胞体ストレスに応答してゴルジ装置に輸送され、そこで膜内切断 (regulated intramembrane proteolysis, RIP) を受ける。切断されたN-末端断片 (p50ATF6) は核に移行して分子シャペロンを転写レベルで誘導する。IRE1には細胞質側のC-末端にRNaseドメインがあり、小胞体ストレス依存的に活性化して転写因子XBP1のpre mRNAから26 ntを切り出し、成熟型mRNAを産生する。このmRNAから翻訳されたXBP1タンパクは核に移行してERADに関連した遺伝子群の転写を誘導する。またIRE1のC-末端側にはTRAF2が結合し、Ask1を活性化する。Ask1はJNKを活性化してアポトーシスを誘導する。

哺乳細胞に至るまで真核細胞に広く保存されている⁴⁻⁶⁾。

小胞体内腔に蓄積した異常タンパク質を感知し、シグナルを核や細胞質に伝える分子が小胞体ストレスセンサーである。哺乳細胞では3種のセンサーPERK⁷⁾、IRE1^{8,9)}、ATF6^{10,11)}が存在する。以下に各センサーの構造と機能について述べる。

(1) PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase)

PERKは小胞体膜貫通型キナーゼであり、小胞体ストレス下でオリゴマー化して自己リン酸化する。活性化型PERKは翻訳開始因子であるeukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α)を直接リン酸化することでcapに依存した翻訳を阻害する。これにより小胞体内に運び込まれるタンパク質を減少させ、変性タンパク質のさらなる蓄積を防ぐ⁷⁾。一方で、リン酸化したeIF2 α は、uORFs (small upstream open reading frame)をもつ遺伝子の翻訳を促進する^{12,13)}。このシステムで翻訳量が増える遺伝子には転写因子ATF4が含まれる。ATF4の転写ターゲットには、活性酸素に拮抗する働きのあるアミノ酸を産生するアミノ酸合成酵素などがある。ATF4には細胞死を促進する転写因子CHOP (C/EBP homologous protein)を転写誘導する活性もあり、

PERK-eIF2 α -ATF4経路は細胞生存と細胞死誘導のバイナリスイッチとしてストレス後の細胞の運命を決定する役割を担っている。

(2) IRE1 (Inositol requiring 1)

IRE1もPERKと同様、小胞体膜貫通型キナーゼである。細胞質側のC-末端にはRNaseドメインがある^{8,9)}。異常タンパク質を感知したIRE1は自己リン酸化により立体構造が変化し、その結果、C末端のRNaseドメインが活性化して、基質であるXBP1 (X-box binding protein 1) mRNAをスプライシングする。26塩基がスプライスアウトされたXBP1 mRNA (spliced form)は読み枠が変化し、このmRNAから転写因子として機能する活性型XBP1タンパク質が産生される¹⁴⁻¹⁶⁾。XBP1の標的遺伝子は、小胞体内に蓄積した異常タンパク質を、細胞質に引き出して、ユビキチン-プロテアゾーム系で分解する機構、すなわち小胞体関連分解 (ER-associated degradation, ERAD)に関わる遺伝子や、分子シャペロン、酸化還元酵素、さらには膜生合成に関わる酵素などである¹⁷⁻²⁰⁾。このようにIRE1-XBP1経路は、異常タンパク質を小胞体から排除・分解し、小胞体の恒常性を還元させる働きがある。重度の小胞体ストレ

スが負荷されると、IRE1の細胞質側ドメインにはTRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2)が結合し、Ask1 (apoptosis-signaling kinase 1)が活性化される^{8,21}。活性化したAsk1はJNK (c-Jun-N-terminal protein kinase)を活性化してアポトーシスを誘導する。

(3) ATF6 (Activating transcription factor 6)

ATF6は膜貫通領域とbZIP (basic leucine zipper)ドメインをもつCREB/ATFファミリーに属する膜結合型転写因子である^{22,23}。ATF6は通常のコンディションでは、小胞体内腔側ドメインのシステイン残基がジスルフィド結合を介して分子間結合したダイマーあるいはオリゴマーの状態が存在する。小胞体ストレスが負荷されると、ジスルフィド結合は還元されATF6はモノマーとなる²⁴。モノマー化したATF6はCOPII小胞によりゴルジ装置に運ばれてプロテアーゼS1P (site-1 protease)およびS2Pにより段階的に膜内切断を受ける²⁵。切断された断片には転写活性化ドメインとDNA結合能を有するbZIPドメインが含まれ、核に移行して転写因子として機能する。ATF6はER stress response element (ERSE)に結合してBiP (immunoglobulin heavy chain-binding protein)などの小胞体分子シャペロンを転写誘導し、その結果、小胞体に蓄積した異常タンパク質の折りたたみを促進して小胞体ストレスから細胞を保護する。またATF6は*XBPI*も転写誘導し、IRE1経路を活性化する働きもある¹⁵。

3. 新たな小胞体ストレスセンサーの発見

小胞体ストレスセンサーのATF6に構造的に類似する膜貫通型転写因子が五つ発見されている (OASISファミリー)。Luman/CREB3^{26,27}、OASIS/CREB3L1²⁸、BBF2H7/CREB3L2²⁹、CREBH/CREB3L3³⁰、CREB4/AibZIP/CREB3L4^{31,32}である (図2)。これらはいずれも膜貫通部位、bZIPドメイン、転写活性化ドメインを持つ。活性化機構もATF6と同様で、ゴルジ装置でS1PおよびS2Pにより切断されて、切断された断片が核内に移行して転写因子として機能する。ATF6と構造的に異なる点は、bZIPドメインのN-末端側に隣接する約30個のアミノ酸残基からなる共通のドメインを有することである^{33,34}。このドメインの機能については分かっていないが、ターゲットとなるDNA配列への結合調節に働いているのかもしれない。五つのセンサー分子は、PERK、IRE1、ATF6がユビキタスに発現しているのとは異なり、それぞれが特徴的な組織分布を示す。また、ターゲットとする遺伝子配列がそれぞれ異なることから、これらの新たな小胞体ストレスセンサーは組織・細胞特異的なUPR応答に関わっている可能性がある。Lumanは免疫系に強く発現し、中でも樹状細胞の分化・成熟に働く可能性が示唆されている³⁵⁻³⁷。またCREBHは肝細胞に優勢的に発現しており、急性期炎症応

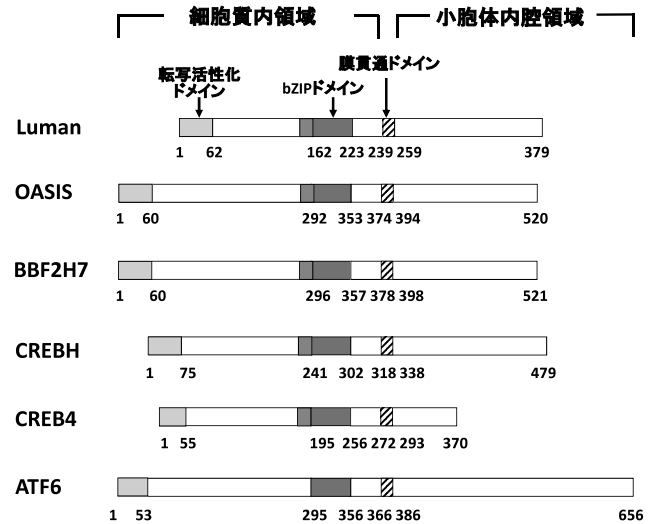


図2 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS ファミリーの構造

OASISファミリーはII型の膜貫通型タンパク質である。ATF6と構造的に類似し、転写活性化ドメイン、bZIPドメインおよび膜貫通ドメインを有する。OASISファミリーには、bZIPドメインのN-末端側に約30アミノ酸残基からなるユニークなドメインが共通にあり、ATF6にはそれが含まれていない。このドメインの機能については明らかにされていないが、ターゲットとなるDNA配列への結合調節に働いているのかもしれない。

答の際に発現する*C-reactive protein (CRP)*や*serumu amyloid P-component (SAP)*の発現を誘導することから、肝細胞における炎症応答に関わることが明らかにされている³⁸。CREB4はヒトでは前立腺に優勢的に発現し^{39,40}、マウスでは精巣や消化管などに発現している³¹。その詳細な機能についてはよくわかっていないが、ノックアウトマウスの解析から精子形成にかかわることが示唆されている^{41,42}。表1にOASISファミリー分子の発現部位、転写ターゲット、ノックアウトマウスの表現型などをまとめた。筆者らは新たなセンサー分子群のうちOASISとBBF2H7の発見に成功し、それらが骨や軟骨の形成に重要な役割を果たしていることを見出した。

4. 小胞体ストレスセンサー OASIS による骨形成促進の分子機構

(1) OASISは骨芽細胞に発現する

OASIS (old astrocyte specifically induced substance)は長期培養したアストロサイトに強く発現することで見出された転写因子である⁴³。組織分布を詳細に解析すると、中枢神経のアストロサイト以外に、骨組織、消化管、唾液腺などで強く発現している。骨組織内では、骨芽細胞のみで発現が確認され、他の骨構成細胞 (骨細胞、破骨細胞)には全く発現していない⁴⁴。骨芽細胞は、未分化幹葉系幹細胞から分化して成熟し、I型コラーゲンを主成分とする骨基質の産生を行う。また、骨芽細胞が産生するアルカリホスファターゼ (ALP)は石灰化抑制因子ピロリン酸を分解す

表1 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS ファミリーの機能的特徴

	発現細胞/組織	ターゲット配列	ターゲット遺伝子	ER ストレス依存的な膜内切断	機能	ノックアウトマウスの表現型	文献
Luman	各種組織 (mRNA), TGN ^a , 単球, 樹状細胞 (protein)	ERSE-II, UPRE-like	Herp, EDEM	-	抗アポトーシス作用, 樹状細胞分化	not reported	35-37
OASIS	骨芽細胞, アストロサイト, 腸管, 唾液腺, etc.	CRE-like	Col1a1	+	骨芽細胞分化, 骨形成, 脳傷害保護	骨形成不全, 骨量低下, 骨折, 成長遅延	44, 45, 52
BBF2H7	軟骨細胞, 肺, 脾臓, 精巣, 神経細胞	CRE-like	Sec23a	+	軟骨細胞分化, COPII 小胞形成	軟骨形成不全, 粗面小胞体の異常な拡張	51
CREBH	肝臓, 腸管, 胃	CRE, box-B, ATF6-site, ERSE-I, II	CRP, SAP, hepcidin	+	急性期炎症反応誘導, イオンホメオスターシス	肉眼所見に変化なし/発生異常なし, 急性期炎症反応およびイオンホメオスターシスの異常	38, 74
CREB4	前立腺, 膵臓, 脳 (human), 精巣, 消化管 (mouse)	UPRE	RAMP4, EDEM?	-	精子形成	精子細胞のアポトーシス	41, 42

a, 三叉神経節神経細胞

ることで石灰化を誘導する。このように、骨のマトリックス構築には、成熟した骨芽細胞の働きが必須であり、OASIS は骨芽細胞におけるマトリックスの産生や分泌に関与する可能性がある。

(2) 骨形成不全を起こす OASIS 欠損マウス

OASIS 欠損マウスは胎生致死になることはなく、メンデルの法則に従って生まれてくる。しかし、野生型と比較して体格が小さく生後の成長もやや劣っていた。骨格のレントゲン撮影を行ったところ、全身の骨組織で緻密質および海綿質とも骨量が著しく減少し、大腿骨や踵骨にはしばしば骨折が観察された。小動物用 X 線 CT スキャナ (マイクロ CT) を用いて大腿骨の内部構造を観察すると、骨梁はやせ細っており重度の骨形成不全であることが判明した (図 3A-C)。OASIS が欠損したことによる骨芽細胞の機能障害が骨形成不全の原因であることを確認するため、骨芽細胞にのみ OASIS を発現するトランスジェニックマウスを作成し、OASIS 欠損マウスと交配させた⁴⁵⁾。その結果、OASIS 欠損でみられた骨形成不全は見事にレスキューでき、骨芽細胞における OASIS 欠損が骨形成不全の直接的な原因であることが確認できた。ここで注目すべきは、骨の病変は消失したが、体格が小さい表現型が回復しなかった点である。末梢血の成長ホルモンのレベル、およびその下流で発現する Insulin-like growth factor (IGF)-1 の血中レベルが OASIS 欠損マウスで低下するが、OASIS を骨芽細

胞に発現させても両者の血中濃度はレスキューできなかった。このことから、OASIS 欠損マウスでみられる骨格の低形成 (成長遅延) は骨芽細胞非依存的なメカニズムで生じていることがわかった。詳細に検討する必要はあるが、OASIS は脳下垂体にも発現しており、成長ホルモンの分泌に影響を与えている可能性がある。現在、さらに解析を進めているところである。

(3) OASIS の転写ターゲットは I 型コラーゲン

OASIS は転写因子であるので、骨芽細胞における転写ターゲットを明らかにできれば、OASIS 欠損マウスでみられる骨形成不全のメカニズムが解明できる。そこで、マウスの骨組織を使って野生型と OASIS 欠損マウス間で各種遺伝子の発現パターンを比較した。Runx2⁴⁶⁾や Osterix⁴⁷⁾などの骨芽細胞の初期分化に必須の遺伝子や小胞体ストレス応答に関連した PERK, ATF4, XBP1, ATF6 などの遺伝子発現には変化が認められなかった。ところが、骨の主成分である I 型コラーゲン遺伝子 (Col1a1, Col1a2) の発現が著しく低下していることがわかった。I 型コラーゲン遺伝子の上流 2.3 kbp までが骨芽細胞での発現を制御するプロモーター領域であることが知られている (図 3D)^{48,49)}。この領域の遺伝子配列を検索すると、-1584~-1591 nt の部位は OASIS が結合可能な cyclic AMP response element (CRE) に極めて類似した配列であることに気付いた。プロモーター解析やゲルシフトアッセイ、さ

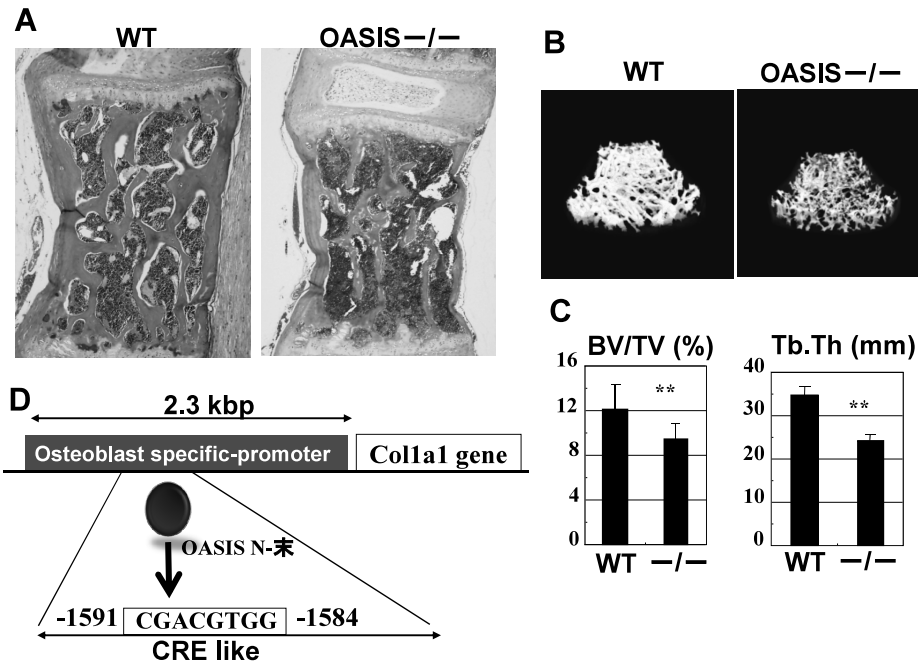


図3 OASIS欠損マウスの表現型と転写ターゲット

A; 椎骨断面のヘマトキシリン・エオジン染色. OASIS欠損マウスでは皮質骨および骨梁とも骨量が低下し菲薄化している. B; 大腿骨の μ CT画像. C; 骨形態計測. 左, 骨容積/組織容積(%). 右, 骨梁の厚さ(mm). いずれもOASIS欠損マウスで低下している. D; I型コラーゲン遺伝子上流の構造とOASISの結合部位(CRE-like配列).

らにはChIPアッセイにより, OASISが直接このCRE-like配列に結合しI型コラーゲン遺伝子の転写活性化を起こすことを証明した.

OASIS欠損マウスでは骨形成不全が観察されるとともに, 骨芽細胞の粗面小胞体が異常に拡張している. I型コラーゲンの発現を低下させてもこのような粗面小胞体の拡張は観察されない. OASISのターゲットにI型コラーゲン以外の遺伝子があり, それが小胞体膜の制御や小胞体から分泌経路への物質輸送に働いているのかもしれない.

5. 骨芽細胞が未分化間葉系幹細胞から分化成熟する際に小胞体ストレスが起こる

OASISが転写因子として機能し骨形成を促進するためには, 膜内切断されて膜から切り離され核内に移行する必要がある⁵⁰⁻⁵². OASISの膜内切断は小胞体ストレスによって誘導されるので, 骨芽細胞内でどこかのタイミングで小胞体ストレスが生じていなければならない. 頭蓋骨から未熟な骨芽細胞を採取し, bone morphogenetic protein 2(BMP2)で刺激し成熟骨芽細胞に分化させる実験系を用いて, 分化過程でのOASISの活性化と小胞体ストレス応答を調べた. BMP2投与後5日目には, 未熟な骨芽細胞はALPやI型コラーゲンを分泌する成熟骨芽細胞に分化する. このときOASISの発現はBMP2添加前に比べ著しく上昇し, しかも膜内切断が亢進していた. 小胞体ストレスのマーカーに

なる*BiP*, *CHOP*, *ATF4*, *EDEM*の転写レベルは軽度ではあるが有意に上昇しており, 予想どおり骨芽細胞の分化の過程で小胞体ストレスが起こっていることが証明できた. しかし, 小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現上昇は, ツニカマイシンやサブシガルジンなどの小胞体ストレス誘発剤によるものと比べるとごく軽度である. おそらく細胞死を引き起こすほどのストレスではなく, 小胞体の恒常性を保ちながらUPRシグナルを活性化する程度の弱いストレスであると思われる.

それでは骨芽細胞の分化の段階でなぜ軽度の小胞体ストレスが生じたのだろうか? 未分化状態では基質タンパク質は産生されていない. しかし, 骨芽細胞へと分化が進むにつれて骨基質の産生・分泌が開始する. このような状況においては小胞体にタンパク質が次から次へと送り込まれ, 小胞体でのフォールディング・キャパシティーを上回ってしまう. その結果, フォールディングされない不良タンパク質が徐々に蓄積して小胞体ストレスを招くと考えられる. これと同じような現象が, Bリンパ球がプラズマ細胞に分化していく過程においてもみられる. プラズマ細胞は抗体を産生する分泌細胞であり, 大量の物質を産生し分泌するという点で骨芽細胞と共通している¹⁹. 最近, 筆者らは, ムチンを主成分とする粘液を大量に分泌する杯細胞の分化成熟の過程でも軽度の小胞体ストレスが起こることも見出している (unpublished data). 以上のように, 軽

度の小胞体ストレスは未分化細胞が分泌機能を獲得する過程で生理的な現象として起こり（生理的小胞体ストレス, physiological ER stress), ストレスを感知したセンサー分子からシグナルが発信されて, 未熟な細胞を分泌細胞へと分化させるのである。

次に, この生理的小胞体ストレスが起こるタイミングは骨芽細胞分化のどのステージだろうか? 未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞へと分化させるマスター転写因子 Runx2 の欠損細胞を用いて小胞体ストレスの発生と OASIS の活性化を調べてみた。すると, Runx2 欠損細胞では BMP2 を添加しても小胞体ストレスは発生せず, OASIS の活性化も起こらなかった。つまり生理的小胞体ストレスとそれに引き続く OASIS の活性化は, Runx2 の下流で起こる事象なのである。従って小胞体ストレスは分化のデターミナントとして働くのではない。骨芽細胞への分化が決定されたあと, 細胞を成熟させていく過程において機能しているのである。

6. 小胞体ストレス応答関連遺伝子と骨芽細胞分化

小胞体ストレス応答に関連する CREB/ATF 転写因子である ATF4 が骨芽細胞の最終分化に関わる可能性が Karsenty らのグループから報告された⁵³⁾。彼らは X 染色体遺伝疾患で精神遅滞を伴う骨格形成異常を特徴とする Coffin-Lowry 症候群の原因遺伝子 RSK2 (ribosomal serine/threonine kinase 2) のリン酸化基質のひとつとして ATF4

を同定した。ATF4 と RSK2 のノックアウトマウスを作成してみると, いずれも I 型コラーゲンの産生低下を伴う骨形成不全を示した。ATF4 ノックアウトマウスの骨組織を使って骨芽細胞分化に関わる遺伝子の発現を調べたところ, 初期分化に関わる *Runx2* や *Osterix* の発現に変化はみられなかったが, 成熟骨芽細胞で発現するはずのオステオカルシン (*Ocn*) や bone sialoprotein (*Bsp*) の発現が激減していた。つまり ATF4 は成熟骨芽細胞への分化に密接に関わることが強く示唆されたのである。

小胞体ストレスの際に PERK-eIF2 α 経路の活性化によって ATF4 の翻訳が亢進し, ターゲット遺伝子 (アミノ酸代謝や酸化ストレスに関わる遺伝子など) の転写を促進することが知られている (図 1)。骨芽細胞の分化に ATF4 が寄与していることからその上流の PERK-eIF2 α 経路の骨形成や骨芽細胞分化への関与が疑われる。遺伝子欠損マウスの解析等から PERK は生体では膵臓のランゲルハンス島 β 細胞におけるインスリン分泌に重要な働きをしており, PERK 機能が低下すると糖尿病が発症することが良く知られている^{54,55)}。興味深いことに PERK 欠損マウスでは, 糖尿病以外に, 全身の骨組織で骨量が著しく減少する重度の骨形成不全が生じている⁵⁶⁾。PERK を欠損した骨芽細胞では, I 型コラーゲンを含む分泌タンパク質が小胞体からゴルジ装置へ輸送されず, 小胞体に大量に貯留してしまう。従って細胞外マトリックスの分泌障害が骨形成不全の直接的な原因であると考えられている。

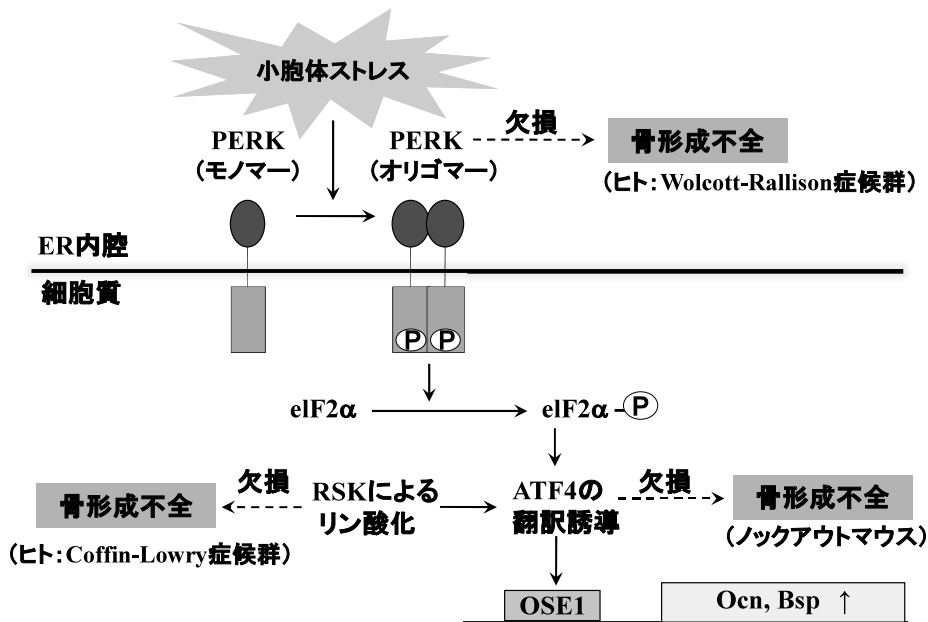


図 4 PERK-eIF2 α -ATF4 経路と骨形成

PERK からの一連のシグナル経路は, 骨基質であるオステオカルシン (*Ocn*) や骨シアロプロテイン (*Bsp*) の転写を誘導し, 骨形成を促進する。OSE1; osteoblast-specific element 1 (ATF4 binding site)。点線は各遺伝子の欠損により引き起こされるヒト疾患あるいは遺伝子欠損マウスの表現型を示す。

次に、PERK から ATF4 にいたる一連の経路が骨芽細胞の分化に寄与していることを確認するために、筆者らは PERK 欠損骨芽細胞を使って ATF4 の下流で転写誘導する *Ocn* や *Bsp* の発現を調べてみた⁵⁷⁾。すると、PERK 欠損細胞では *Ocn* や *Bsp* 遺伝子の発現が著しく低下していた。また、PERK 欠損細胞では *Ocn* や *Bsp* 遺伝子のプロモーター領域に共通に存在する osteoblast-specific element 1 (OSE1) に、ATF4 が結合していないこともわかった。PERK 欠損細胞に ATF4 遺伝子を導入すると、*Ocn* や *Bsp* 遺伝子の発現がレスキューでき、それと同時に骨芽細胞の骨形成能も回復した。以上の結果から、骨芽細胞の分化の過程で PERK-eIF2 α -ATF4 経路が活性化して骨形成の促進に寄与していることが明らかとなった (図 4)。

7. XBP1 を介する骨芽細胞の分化

骨芽細胞の分化のステージで小胞体ストレスが生じていることから、骨芽細胞に発現している全ての小胞体ストレスセンサーが同時に活性化して、それらの下流シグナルを誘導している可能性がある。PERK 経路も OASIS 経路もそうであったように、IRE1-XBP1 経路も活性化しているのでしょうか？ 慶應義塾大学のグループは、IRE1 および XBP1 欠損細胞を使って BMP2 によって誘導される骨芽細胞分化への影響を調べた⁵⁸⁾。その結果、いずれの細胞とも ALP 活性の減少と I 型コラーゲンおよび *Ocn* の発現

低下が観察され、成熟骨芽細胞への分化が抑制されていることを明らかにした。また彼らは XBP1 の転写ターゲットが骨芽細胞分化に必須の役割を担っている *Osterix* であることも証明している。XBP1 はこの他にも、小胞体膜の合成に関わる遺伝子を転写誘導して細胞内で大量に産生される基質タンパク質の小胞体へのオーバーロードに対抗する働きがある。従って、IRE1-XBP1 経路は、骨芽細胞分化に必須の遺伝子を活性化して成熟骨芽細胞へと分化を進めながら、大量に合成されるタンパク質のフォールディング・キャパシティーを高め、それらを効率的に分泌系へと輸送する役割を担っていると考えられる。

以上、小胞体ストレス応答を介する骨芽細胞分化の分子機構を図 5 にまとめた。

8. 小胞体機能障害による骨疾患

骨芽細胞は骨基質を大量に合成し分泌する細胞である。産生されたタンパク質は小胞体で複雑かつ緻密な分子機構により品質管理されている。例えば、骨芽細胞で産生される I 型コラーゲンは $\alpha(I)$ 鎖 2 本と、 $\alpha(II)$ 鎖 1 本の 3 本鎖から成る巨大な三重らせん構造をとるが、小胞体内の様々な分子が働いて複雑なフォールディングを経て組み立てられる⁵⁹⁾。しかし、このようなタンパク質品質管理のシステムに障害が起こると重篤な骨疾患を招く。コラーゲン遺伝子の変異はコラーゲンタンパク質の正常な組み立てを妨害し不良コラーゲンの産生分泌を起こすか、あるいは産生量そのものを低下させて骨形成不全を起こす⁶⁰⁾。また、I 型コラーゲンは小胞体内でプロリン残基が水酸化 (prolyl 3-hydroxylation) されて成熟したコラーゲンのらせん構造が形成されるが、これに関わる *prolyl 3-hydroxylase* の欠損により骨形成不全症になることも報告されている^{61,62)}。従って、I 型コラーゲンの品質管理は骨形成に必要な不可欠なシステムなのである。小胞体ストレス応答関連分子の異常においても骨形成不全が起こる。小胞体ストレスセンサー PERK の遺伝子変異によりインスリン依存性糖尿病、成長遅延、骨格形成不全を特徴とする Wolcott-Rallison 症候群が発症する⁶³⁾。さらには上述したように ATF4 のリン酸化キナーゼである RSK 遺伝子の変異で Coffin-Lowry 症候群が発症する⁶⁴⁾。以上のように、骨芽細胞内での小胞体ストレス応答シグナル経路の障害が骨疾患に直結することからも、このシグナル経路が骨形成にいかに重要であるかがよくわかる。

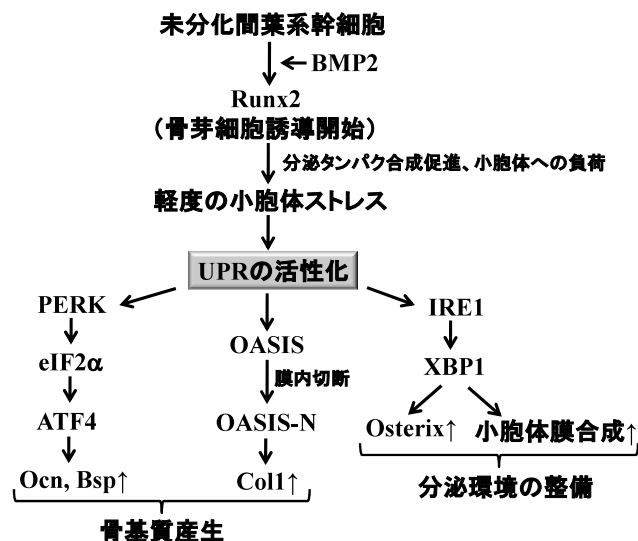


図 5 小胞体ストレス応答を介する骨芽細胞分化の分子機構
未分化間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化する過程で、過剰のタンパク質が合成されて小胞体に負荷をかける。その結果、軽度な(細胞死を誘導しない程度の)小胞体ストレスが生じ、UPR (unfolded protein response) が発動する。PERK および OASIS 経路は最終的には骨基質の転写を誘導し、骨基質の合成をさらに活発化させる。IRE1 経路は骨芽細胞の分化に必須の転写因子 *Osterix* を誘導するとともに、小胞体膜の合成を促進し、骨芽細胞が産生する大量の骨基質タンパク質のフォールディング・キャパシティーを増大させ分泌環境を整備する。

9. 軟骨形成における小胞体ストレスセンサー BBF2H7 の役割

(1) 軟骨形成障害を起こす BBF2H7 欠損マウス

BBF2H7 (B-box binding transcription factor 2 human homologue to chromosome 7) は構造的に OASIS に極めて類似し

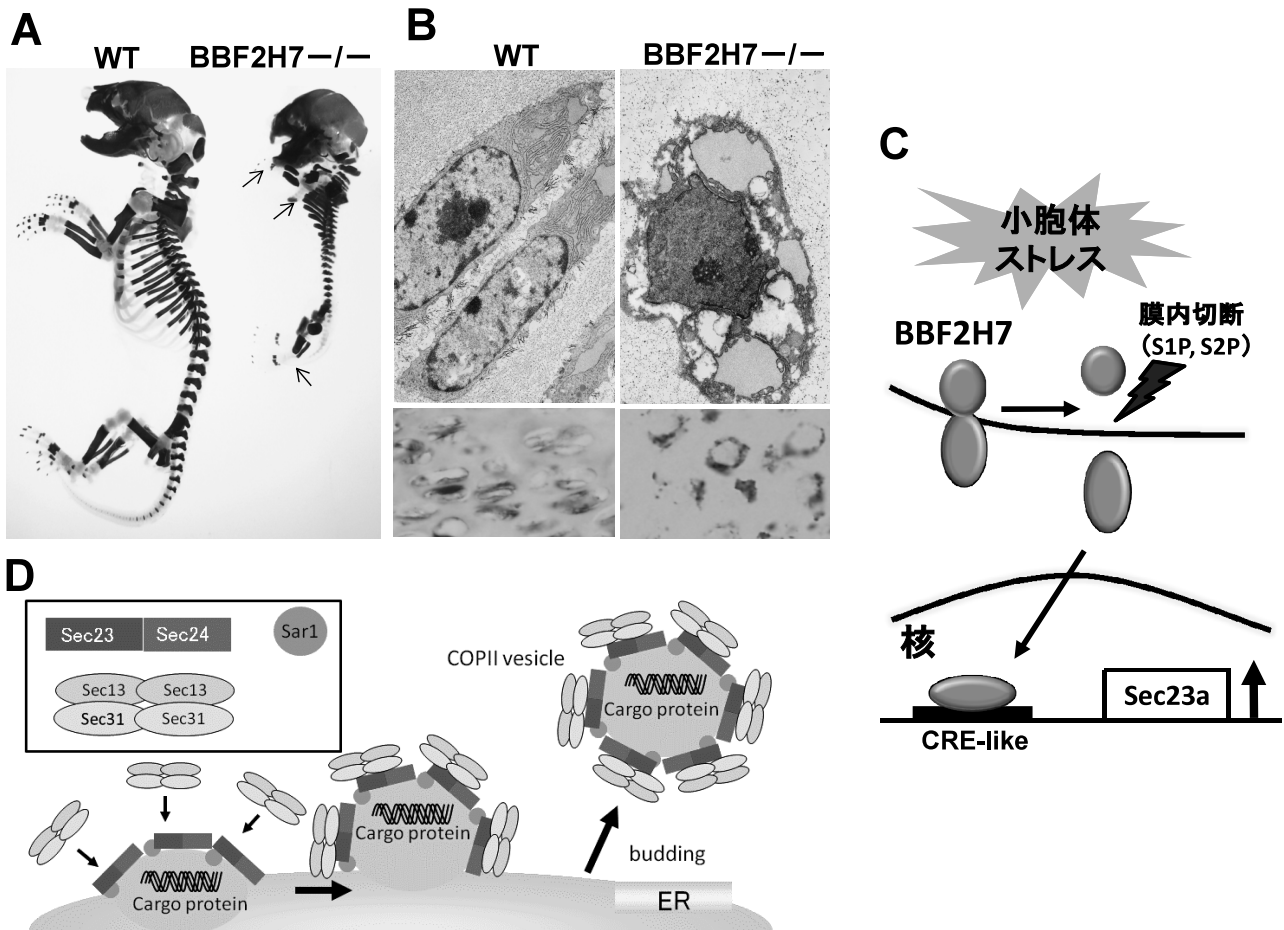


図6 小胞体ストレスセンサー BBF2H7 欠損マウスの表現型と軟骨形成における役割

A; BBF2H7 欠損マウスの骨格標本 (アリザリンレッド・アルシアンブルー染色). 遺伝子欠損マウスでは骨格が小さく, 特に軟骨 (矢印) 部分の形成がほとんどない. B; 軟骨細胞の電子顕微鏡写真 (上) と II 型コラーゲンの免疫染色 (下). BBF2H7 欠損軟骨細胞では, 粗面小胞体が異常に拡張し, その内部に分泌基質が大量に貯留している. II 型コラーゲンは細胞外に分泌されず, 細胞内に蓄積している. C; BBF2H7 の活性化と機能. BBF2H7 は小胞体ストレスに反応して膜内切断を受け, 切断された断片が核内へ移行する. 核内では Sec23a プロモーター内の CRE (cyclic AMP response element) 類似配列に結合して転写を促進する. D; small G protein である Sar1 によって活性化した Sec23a は, Sec24 と結合してヘテロダイマーを形成する. このヘテロダイマーにコートタンパク質の Sec13/Sec31 のヘテロ 4 量体がリクルートされ COPII 小胞が形成される. 内部に分泌タンパク質を搭載して小胞体膜が発芽し, COPII 小胞は小胞体からゴルジ装置に向かって輸送される.

た膜貫通型の転写因子である²⁹⁾(図2). OASIS と同様に小胞体ストレスに反応して膜内切断を受ける. OASIS と異なる点は発現部位である. BBF2H7 の組織局在を調べてみると, 最も強く発現しているのが成長軟骨の軟骨細胞で, その他に肺, 脾臓, 生殖腺, 神経系などにも発現している. 骨組織には全く発現しない. BBF2H7 の生理機能を明らかにする目的で遺伝子欠損マウスを作成した⁶⁵⁾. マウスは胎生致死ではないが, 胸郭の発達が悪く呼吸ができないため生後すぐに死んでしまう. 骨格は全体的に小さく, 特に手足が非常に短い. 下顎の発達も悪く舌が口腔内に納まらないで外部に出たままの状態である. 以上の所見から BBF2H7 遺伝子欠損マウスは全身の骨格形成に異常があることがわかった. アリザリンレッド・アルシアンブルー染色で骨格の染色を施してみると, 骨は形成されているが,

アルシアンブルーで染まる軟骨の部分が極めて乏しかった (図6A). 病理組織学的に解析すると長骨の成長軟骨の発達が著しく悪く, 特に増殖軟骨層で顕著であった. この部位の軟骨細胞を観察すると, 細胞質は大きく膨れ上がり, その中には大小様々な空胞が多数認められた. 電子顕微鏡解析の結果, この空胞は異常に拡張した粗面小胞体であった (図6B). また, 小胞体の内部には II 型コラーゲンや COMP (cartilage oligomeric matrix protein) などの軟骨基質が大量に蓄積し, 細胞外への分泌が抑制されていることもわかった (図6B). このように, BBF2H7 欠損マウスでみられた軟骨形成不全は, 軟骨基質の分泌障害が原因であった.

(2) BBF2H7は小胞体-ゴルジ装置間輸送に必須の *Sec23a* を転写誘導する

野生型マウスと BBF2H7 欠損マウスの軟骨における遺伝子発現プロファイリング解析を行った結果、COPII 小胞のコンポーネントである *Sec23a* が BBF2H7 欠損細胞で著しく発現低下していることがわかった。プロモーター解析等から BBF2H7 は *Sec23a* のプロモーター領域に直接作用して転写を誘導することも確認した (図 6C)。Sec23a は Sec24 とともに小胞体膜に集積し、Sec13/Sec31 のヘテロ 4 量体をリクルートし、小胞体膜の発芽を誘導する (図 6D)^{66,67}。発芽した小胞は COPII 小胞と呼ばれ、内部には分泌タンパク質を搭載している。COPII 小胞はシスゴルジとドッキングすることで搭載タンパク質をゴルジ装置に送り届ける。最近、Sec23a は、骨格形成異常、大泉門閉鎖不全、顔面形成異常などの症状を起こす Cranio-lenticulo-sutural dysplasia という疾患の原因遺伝子であることが報告された^{68,69}。興味深いことに、患者の線維芽細胞をみると小胞体が異常に拡張し内部には分泌物が貯留しており、BBF2H7 欠損軟骨細胞に極めて類似した形態変化を示す。

(3) 軟骨の分化の過程で小胞体ストレスが起こり BBF2H7-*Sec23a* 経路が活性化する

軟骨でも骨芽細胞と同じように発生の過程で小胞体ストレスが起こっているのであろうか？ 筆者らはマウス胎児の肋軟骨にある未分化間葉系幹細胞を含む組織を採取し、そのままの状態、BMP2、アスコルビン酸、 β -グリセロフォスフェート存在下で長期間培養した (マイクロマスカルチャー)。この培養系では徐々に成熟軟骨細胞への分化が始まり、軟骨基質分泌が培養開始後 4 日目ごろからみられるようになる。BBF2H7 と *Sec23* は軟骨基質分泌開始の時期と同調するように発現誘導されていた。膜内切断を受けた BBF2H7 N-末端断片が過剰量観察されたことから小胞体ストレスが軟骨分化の際にも生じていることもわかった。さらに初代培養軟骨細胞に人為的に小胞体ストレスを負荷すると BBF2H7 の発現誘導と膜内切断が起こり、さらにそれと同調して *Sec23a* の発現誘導が観察された。これらの結果により、軟骨細胞の分化の際に小胞体ストレスが起こり、それに応答して活性化した BBF2H7 が小胞体-ゴルジ装置間輸送に必須の *Sec23a* を誘導することが明らかになった。軟骨細胞が大量の軟骨基質を分泌するには、分泌物を小胞体からゴルジ装置、あるいは細胞膜までスムーズに運搬する必要がある。未分化状態から成熟軟骨細胞に成長していく過程でこのような機能を獲得していくことは必然であり、BBF2H7-*Sec23a* 経路の活性化は一連の分泌マシーナリーの発達には欠かせないのである。

10. S1P 欠損マウスでは軟骨形成不全を起こす

ATF6 や BBF2H7 などの小胞体膜貫通型転写因子はゴル

ジ装置内で S1P と S2P により 2 段階切断を受け膜から切り離されて転写因子として機能するようになる^{25,34,70}。軟骨特異的 S1P 欠損マウスが作成されている⁷¹。このマウスの表現型は BBF2H7 の表現型に良く似ており、軟骨形成異常と軟骨細胞内における分泌タンパク質の蓄積が起こる。S1P が欠損することで、BBF2H7 の膜内切断が阻害されて活性型に変換できないため、BBF2H7 が欠損したのと同じような表現型になったものと推察される。BBF2H7 欠損細胞では見られなかった変化としては、増殖軟骨および肥大軟骨層の軟骨細胞にアポトーシスが数多く観察されたことである。ATF6 は小胞体ストレスに応答して *BiP* をはじめとする分子シャペロンを転写レベルで誘導し異常タンパク質を排除して細胞死から保護する。S1P の欠損により ATF6 も活性化されないため、軟骨分化の過程で起こる小胞体ストレスから回避できず軟骨細胞が細胞死を起こした可能性がある。軟骨には BBF2H7 や ATF6 以外にも S1P で活性化する小胞体ストレスセンサー *Luman* も発現している (unpublished data)。Luman の活性化障害も S1P 欠損マウスの軟骨でみられる表現型の一因として排除できない。いずれにしても軟骨の発生・分化の過程には小胞体ストレスが発生し、そのストレスに応答したシグナル経路 (S1P による膜内切断も含む) が軟骨細胞の分化・成熟と軟骨組織の正常な形成に必須の役割を果たしていることは間違いない。PERK や IRE1 経路の軟骨形成における働きについても詳細な解析が必要である。

11. おわりに

骨格系の基質となるタンパク質を産生する細胞は未分化間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞や軟骨細胞である。これらの細胞は分化の過程で未分化状態では持たない分泌細胞としてのさまざまな機能を獲得し、最終的に“professional”な分泌細胞に転換していく (図 7)。この細胞機能獲得の起点となるのは小胞体ストレスであり、それを感知したセンサーから発信されるシグナルは、分泌細胞へと分化を進める上で必要な転写因子を活性化したり、分泌マシーナリーを整えたり、分泌物の大量合成を誘導する。小胞体を起点とする細胞分化は、骨芽細胞や軟骨細胞に限られたものではなく、プラズマ細胞^{19,72}、膵臓 β 細胞⁷³、消化管粘膜上皮の杯細胞 (unpublished data) などにも共通するメカニズムになっており、さらに他の細胞にも波及する勢いをみせている。これまで小胞体ストレス応答は、異常タンパク質を排除し、細胞の危機を救うシステムとして捉えられていたが、今回紹介したように、生体内では細胞の分化・成熟に積極的に働き生体の機能制御に積極的に関わることがわかってきた。小胞体からのシグナリングシステムがもたらす生体機能制御の仕組みがさらに拡大していくことが予想される。

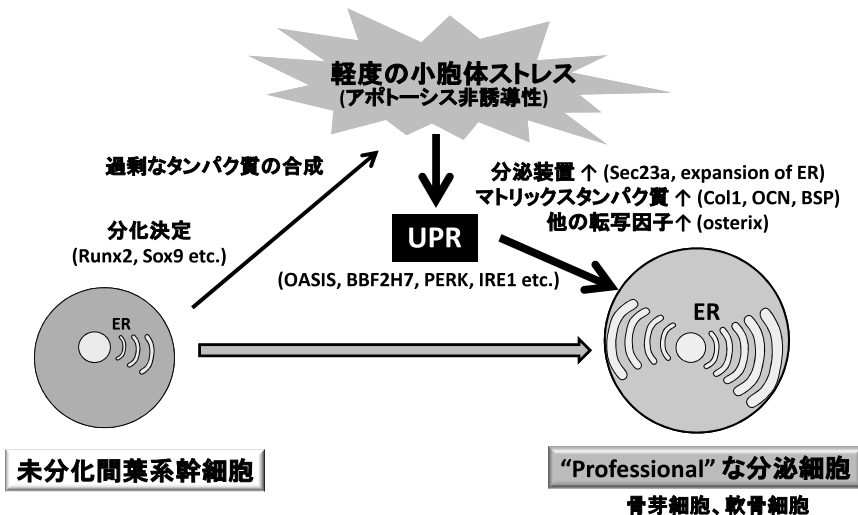


図7 UPRと細胞分化

未分化間葉系幹細胞は、転写因子 Runx2 や Sox9 によりそれぞれ骨芽細胞および軟骨細胞への分化が決定される。分化の進行に伴って物質の合成が活発化し、小胞体の処理能力を上回るタンパク質が小胞体内腔に運び込まれ、細胞は軽度の小胞体ストレス状態に陥る（アポトーシスを起こさない程度の軽度なもの）。細胞はタンパク質のフォールディング能力や分泌機能を高めるために、OASIS や BBF2H7 あるいは PERK, IRE1 を起点とした UPR を発動する。UPR の活性化は、小胞体膜合成を伴う小胞体キャパシティーの増大、分泌装置の機能充進、分化促進に関わる転写因子の誘導、さらには、骨マトリックスの合成促進などを引き起こす。細胞はやがて、大量のタンパク質を合成・分泌できる“professional”な分泌細胞としての機能を獲得する。このような UPR を使って分化を起こす細胞としては、他にプラズマ細胞、膵臓ランゲルハンス島β細胞や消化管粘膜杯細胞などがある。

謝辞

ここで紹介しました研究は、広島大学医歯薬学総合研究科分子細胞情報学のメンバー全員と、筆者の前所属である宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物学分野の村上智彦博士および日野真一郎博士との共同研究です。また大阪大学歯学部生化学講座米田俊之教授、西村理行准教授、理化学研究所ゲノム医科学研究センター骨関節疾患研究チーム池川志郎博士、奈良県立医科大学解剖学第二講座和申明生教授、大阪大学微生物研究所遺伝情報実験センター遺伝子機能解析分野岡部勝教授をはじめとする多くの研究者のご指導をいただきました。ご協力いただきました全ての共同研究者の方々に感謝の意を表します。

文 献

- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., & Yuan, J. (2000) *Nature*, 403, 98–103.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., & Tohyama, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 13935–13940.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., & Tohyama, M. (2004) *J. Cell Biol.*, 165, 347–356.
- Schroder, M. & Kaufman, R.J. (2005) *Mut. Res.*, 569, 29–63.
- Ron, D. (2002) *J. Clin. Invest.*, 110, 1383–1388.
- Kaufman, R.J. (2002) *J. Clin. Invest.*, 101, 1389–1398.
- Harding, H.P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999) *Nature*, 397, 271–274.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., & Ron, D. (2000) *Science*, 287, 664–666.
- Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., & Kaufman, R.J. (2000) *Genes Dev.*, 14, 2725–2736.
- Li, M., Baumeister, P., Roy, B., Phan, T., Foti, D., Luo, S., & Lee, A.S. (2000) *Mol. Cell Biol.*, 20, 5096–5106.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 33741–33749.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., & Ron, D. (2000) *Mol. Cell*, 5, 897–904.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000) *Mol. Cell*, 6, 1099–1108.
- Shen, X., Ellis, R.E., Lee, K., Liu, C.Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D.M., Mori, K., & Kaufman, R.J. (2001) *Cell*, 107, 893–903.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001) *Cell*, 107, 881–891.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., & Ron, D. (2002) *Nature*, 415, 92–96.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., & Glimcher, L.H. (2003) *Mol. Cell Biol.*, 23, 7448–7459.
- Liu, Y., Adachi, M., Zhao, S., Hareyama, M., Koong, A.C., Luo, D., Rando, T.A., Imai, K., & Shinomura, Y. (2009) *Cell*

- Death Differ.*, 16, 847–857.
- 19) Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J.W., Calame, K., Glimcher, L.H., & Staudt, L.M. (2004) *Immunity*, 21, 81–93.
 - 20) Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., & Brewer, J.W. (2004) *J. Cell Biol.*, 167, 35–41.
 - 21) Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., & Ichijo, H. (2002) *Genes Dev.*, 16, 1345–1355.
 - 22) Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 33741–33749.
 - 23) Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1999) *Mol. Biol. Cell.*, 10, 3787–3799.
 - 24) Nadanaka, S., Okada, T., Yoshida, H., & Mori, K. (2007) *Mol. Cell Biol.*, 27, 1027–1043.
 - 25) Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., & Goldstein, J.L. (2000) *Mol. Cell*, 6, 1355–1364.
 - 26) DenBoer, L.M., Hardy-Smith, P.W., Hogan, M.R., Cockram, G.P., Audas, T.E., & Lu, R. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 113–119.
 - 27) Liang, G., Audas, T.E., Li, Y., Cockram, G.P., Dean, J.D., Martyn, A.C., Kokame, K., & Lu, R. (2006) *Mol. Cell Biol.*, 26, 7999–8010.
 - 28) Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A., & Imaizumi, K. (2005) *Nat. Cell Biol.*, 7, 186–194.
 - 29) Kondo, S., Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Nara, S., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Hara, H., & Imaizumi, K. (2007) *Mol. Cell Biol.*, 27, 1716–1729.
 - 30) Omori, Y., Imai, J., Watanabe, M., Komatsu, T., Suzuki, Y., Kataoka, K., Watanabe, S., Tanigami, A., & Sugano, S. (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29, 2154–2162.
 - 31) Nagamori, I., Yabuta, N., Fujii, T., Tanaka, H., Yomogida, K., Nishimune, Y., & Nojima, H. (2005) *Genes Cells*, 10, 575–594.
 - 32) Stirling, J. & O'hare, P. (2006) *Mol. Biol. Cell*, 17, 413–426.
 - 33) Kondo, S., Saito, A., Asada, R., Kanemoto, S., & Imaizumi, K. (2011) *IUBMB Life*, 63, 233–239.
 - 34) Asada, R., Kanemoto, S., Kondo, S., Saito, A., & Imaizumi, K. (2011) *J. Biochem.*, 149, 507–518.
 - 35) Ko, J., Jang, S.W., Kim, Y.S., Kim, I.S., Sung, H.J., Kim, H. H., Park, J.Y., Lee, Y.H., Kim, J., & Na, D.S. (2004) *FASEB J.*, 18, 890–892.
 - 36) Lu, R. & Misra, V. (2000) *J. Virol.*, 74, 934–943.
 - 37) Eleveld-Trancikova, D., Sanecka, A., van Hout-Kuijjer, M.A., Looman, M.W.G., Hendriks, I.A.M., Jansen, B.J.H., & Adema, G.J. (2010) *Mol. Immunol.*, 47, 1963–1973.
 - 38) Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D.T., Back, S.H., & Kaufman, R.J. (2006) *Cell*, 124, 587–599.
 - 39) Cao, G., Ni, X., Jiang, M., Ma, Y., Cheng, H., Guo, L., Ji, C., Gu, S., Xie, Y., & Mao, Y. (2002) *J. Hum. Genet.*, 47, 373–376.
 - 40) Qi, H., Fillion, C., Labrie, Y., Grenier, J., Fournier, A., Berger, L., El-Alfy, M., & Labrie, C. (2002) *Cancer Res.*, 62, 721–733.
 - 41) Nagamori, I., Yomogida, K., Ikawa, M., Okabe, M., Yabuta, N., & Nojima, H. (2006) *Genes Cells*, 11, 1161–1171.
 - 42) Adham, I.M., Eck, T.J., Mierau, K., Müller, N., Sallam, M.A., Paprotta, I., Schubert, S., Hoyer-Fender, S., & Engel, W. (2005) *Mol. Cell Biol.*, 25, 7657–7664.
 - 43) Honma, Y., Kanazawa, K., Mori, T., Tanno, Y., Tojo, M., Kiyosawa, H., Takeda, J., Nikaido, T., Tsukamoto, T., Yokoya, S., & Wanaka, A. (1999) *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 69, 93–103.
 - 44) Murakami, T., Saito, A., Hino, S., Kondo, S., Kanemoto, S., Chihara, K., Sekiya, H., Tsumagari, K., Ochiai, K., Yoshinaga, K., Saitoh, M., Nishimura, R., Yoneda, T., Kou, I., Furuichi, T., Ikegawa, S., Ikawa, M., Okabe, M., Wanaka, A., & Imaizumi, K. (2009) *Nat. Cell Biol.*, 11, 1205–1211.
 - 45) Murakami, T., Hino, S., Nishimura, R., Yoneda, T., Wanaka, A., & Imaizumi, K. (2011) *Bone*, 48, 514–523.
 - 46) Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., & Kishimoto, T. (1997) *Cell*, 89, 755–764.
 - 47) Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., & de Crombrugge, B. (2002) *Cell*, 108, 17–29.
 - 48) Rossert, J., Eberspaecher, H., & de Crombrugge, B. (1995) *J. Cell Biol.*, 129, 1421–1432.
 - 49) Rossert, J.A., Chen, S.S., Eberspaecher, H., Smith, C.N., & de Crombrugge, B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 6, 1027–1031.
 - 50) Murakami, T., Kondo, S., Ogata, M., Kanemoto, S., Saito, A., Wanaka, A., & Imaizumi, K. (2006) *J. Neurochem.*, 96, 1090–1100.
 - 51) Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Kondo, S., & Imaizumi, K. (2007) *Antioxid Redox Signal.*, 9, 563–571.
 - 52) Chihara, K., Saito, A., Murakami, T., Hino, S., Aoki, Y., Sekiya, H., Aikawa, Y., Wanaka, A., & Imaizumi, K. (2009) *J. Neurochem.*, 110, 956–965.
 - 53) Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H.C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T.M., Hanauer, A., & Karsenty, G. (2004) *Cell*, 117, 387–398.
 - 54) Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D., & Ron, D. (2001) *Mol. Cell*, 7, 1153–1163.
 - 55) Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, E.A., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H.P., Goodman, A.G., Harant, H., Garrison, J.L., Taunton, J., Katze, M.G., & Ron, D. (2006) *Cell*, 126, 727–739.
 - 56) Wei, J., Sheng, X., Feng, D., McGrath, B., & Cavener, D.R. (2008) *J. Cell Physiol.*, 217, 693–707.
 - 57) Saito, A., Ochiai, K., Kondo, S., Tsumagari, K., Murakami, T., Cavener, D.R., & Imaizumi, K. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 4809–4818.
 - 58) Tohmonda, T., Miyauchi, Y., Ghosh, R., Yoda, M., Uchikawa, S., Takito, J., Morioka, H., Nakamura, M., Iwawaki, T., Chiba, K., Toyama, Y., Urano, F., & Horiuchi, K. (2011) *EMBO Rep.*, 12, 451–457.
 - 59) Viguet-Carrin, S., Garnero, P., & Delmas, P.D. (2006) *Osteoporos Int.*, 17, 319–336.
 - 60) Marini, J.C., Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., San Antonio, J.D., Milgrom, S., Hyland, J.C., Körkkö, J., Prockop, D. J., De Paepe, A., Coucke, P., Symoens, S., Glorieux, F.H., Roughley, P.J., Lund, A.M., Kuurila-Svahn, K., Hartikka, H., Cohn, D.H., Krakow, D., Mottes, M., Schwarze, U., Chen, D., Yang, K., Kuslich, C., Troendle, J., Dalgleish, R., & Byers, P. H. (2007) *Hum. Mutat.*, 28, 209–221.
 - 61) Morello, R., Bertin, T.K., Chen, Y., Hicks, J., Tonachini, L.,

- Monticone, M., Castagnola, P., Rauch, F., Glorieux, F.H., Vranka, J., Bächinger, H.P., Pace, J.M., Schwarze, U., Byers, P.H., Weis, M., Fernandes, R.J., Eyre, D.R., Yao, Z., Boyce, B. F., & Lee, B. (2006) *Cell*, **127**, 291–304.
- 62) Cabral, W.A., Chang, W., Barnes, A.M., Weis, M., Scott, M. A., Leikin, S., Makareeva, E., Kuznetsova, N.V., Rosenbaum, K.N., Tiffit, C.J., Bulas, D.I., Kozma, C., Smith, P.A., Eyre, D. R., & Marini, J.C. (2007) *Nat. Genet.*, **39**, 359–365.
- 63) Delépine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G.M., & Julier, C. (2000) *Nat. Genet.*, **25**, 406–409.
- 64) Storlazzi, C.T., Mertens, F., Nascimento, A., Isaksson, M., Wejde, J., Brosjo, O., Mandahl, N., & Panagopoulos, I. (2003) *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2349–2358.
- 65) Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Kanemoto, S., Kondo, S., Saitoh, M., Nishimura, R., Yoneda, T., Furuichi, T., Ikegawa, S., Ikawa, M., Okabe, M., & Imaizumi, K. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1197–1204.
- 66) Paccaud, J.P., Reith, W., Carpentier, J.L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R., & Orci, L. (1996) *Mol. Biol. Cell*, **7**, 1535–1546.
- 67) Fromme, J.C., Orci, L., & Schekman, R. (2008) *Trends Cell Biol.*, **18**, 330–336.
- 68) Boyadjiev, S.A., Fromme, J.C., Ben, J., Chong, S.S., Nauta, C., Hur, D.J., Zhang, G., Hamamoto, S., Schekman, R., Ravazzola, M., Orci, L., & Eyaid, W. (2006) *Nat. Genet.*, **38**, 1192–1197.
- 69) Fromme, J.C., Ravazzola, M., Hamamoto, S., Al-Balwi, M., Eyaid, W., Boyadjiev, S.A., Cosson, P., Schekman, R., & Orci, L. (2007) *Dev. Cell*, **13**, 623–634.
- 70) Bailey, D. & O'Hare, P. (2007) *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 2305–2321.
- 71) Patra, D., Xing, X., Davies, S., Bryan, J., Franz, C., Hunziker, E.B., & Sandell, L.J. (2007) *J. Cell Biol.*, **179**, 687–700.
- 72) Todd, D.J., McHeyzer-Williams, L.J., Kowal, C., Lee, A.H., Volpe, B.T., Diamond, B., McHeyzer-Williams, M.G., & Glimcher, L.H. (2006) *J. Exp. Med.*, **206**, 2151–2159.
- 73) Zhang, P., McGrath, B., Li, S., Frank, A., Zambito, F., Reinert, J., Gannon, M., Ma, K., McNaughton, K., & Cavener, D.R. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 3864–3874.
- 74) Vecchi, C., Montosi, G., Zhang, K., Lamberti, I., Duncan, S.A., Kaufman, R.J., & Pietrangelo, A. (2009) *Science*, **325**, 877–880.
-