

Title	Characterization of mouse $lre1\alpha$: cloning, mRNA localization in the brain and functional analysis in a neural cell line
Author(s)	Miyoshi, Ko
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/43697
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	三好 耕
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16801 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Characterization of mouse Ire1 α : cloning, mRNA localization in the brain and functional analysis in a neural cell line (マウス Ire1 α の特性: クローニング、脳における mRNA の分布、神経系細胞系統での機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 武田 雅俊 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

細胞内カルシウム濃度の攪乱、栄養因子の枯渇、酸化刺激等の負荷により、合成されたタンパクの小胞体での折り畳みが障害され、折り畳みが不完全なタンパク (unfolded protein) が蓄積した状態を小胞体ストレスと呼ぶ。このストレスは、小胞体に局在するセンサー分子により感知され、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる系により、折り畳みを促進する GRP78、GRP94、calreticulin 等の小胞体分子シャペロン群の転写、翻訳が活性化される。

我々は以前に、家族性アルツハイマー病に関連するプレセニン1変異体が、小胞体ストレスセンサー分子 Ire1 α のリン酸化に影響を及ぼすことにより、小胞体ストレス下での UPR の活性化を減弱させることを報告した。現在、Ire1 α の *in vivo* での発現に関してはほとんど知られていない。このため、我々は Ire1 α のマウスホモログをクローニングし、マウス脳における発現を検討した。さらに、Ire1 α が家族性アルツハイマー病患者脳における病原的なメカニズムに関与する可能性を検討するため、その dominant-negative form を用いて、小胞体ストレス下での UPR の活性化が減弱される結果増強される細胞死の評価を行った。

【方法ならびに成績】

マウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングして、Ire1 α のマウスホモログをクローニングした。マウス Ire1 α は977個のアミノ酸から構成され、ヒト Ire1 α と92%の相同性を有していた。RT-PCR 法により、Ire1 α はマウスの全ての組織に発現しており、肺、胸腺、肝において比較的高い発現がみられ、また発生段階に沿って脳内での発現が増加することが示された。また、*in situ* hybridization 法により脳内での発現分布を検討した結果、皮質、海馬、嗅球等の神経細胞にシグナルが認められた。皮質神経細胞では全ての部位でシグナルの強度は同程度であった。海馬では CA1-3の錐体細胞および歯状回の顆粒細胞に同程度の発現が認められた。嗅球では僧帽細胞および顆粒細胞に比較的低いシグナルが認められた。プルキンエ細胞や脳幹神経細胞を含む脳内の他の神経細胞にも弱いシグナルが検知された。稀突起膠細胞や星状膠細胞ではシグナルは認められなかった。

次に、マウス Ire1 α から kinase ドメインおよび RNase ドメインを削除した dominant-negative form を細胞に導入することにより、小胞体ストレス下での UPR を負に制御させる実験を行った。まず、マウスの神経芽細胞腫の

細胞株である Neuro2a 細胞に、空の発現ベクター、マウスの野生型 Irel α 、dominant-negative form を各々導入した細胞系統を作成した。これらに小胞体ストレスを惹起する薬剤である tunicamycin や A23187を加えたところ、dominant-negative form を導入した系統の細胞では、GRP78mRNA の発現誘導が他の系統に比べて低く、UPR が負に制御されていることが確認された。さらに、この系統では小胞体ストレス下で他に比べて有意に増強された細胞死が観察された。この時の形態学的な変化をヘキスト染色さらには電顕で観察したところ、細胞質の減少、核の断片化、クロマチンの凝集等のアポトーシスに特徴的な像を呈し、生化学的には caspase-3活性の上昇や cytochrome-c のミトコンドリアから細胞質への放出を認めた。以上の結果は、UPR が正常に機能しない条件下で小胞体ストレスにより引き起こされる細胞死には、アポトーシスが関与していることを示唆するものである。

【総括】

小胞体ストレスセンサー分子 Irel α のマウスホモログをクローニングし、in vivo での発現解析を行い、検索したマウス全臓器で同分子が発現していること、および in situ hybridization 法により、脳内での発現は皮質、海馬、嗅球等の神経細胞優位であることを示した。更に、マウス Irel α の dominant-negative form を神経系培養細胞に導入して Irel α の機能を阻害することにより、小胞体ストレス下での UPR の活性化が減弱されること、およびその結果増強される細胞死にはアポトーシスが関与していることを、生化学的、形態学的に明らかにした。これらの結果は、家族性を含むアルツハイマー病患者の脳でみられる神経細胞特異的なアポトーシスに、攪乱された小胞体ストレス反応が関与している可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

家族性アルツハイマー病に関連するプレセニリン1変異体が、小胞体ストレスセンサー分子 Irel α の活性化に影響を及ぼすとの知見を背景に行われた本研究により、Irel α がマウス脳でニューロン優位に発現していること、またその機能の阻害によりストレス下での unfolded protein response が負に制御される結果増強される細胞死には、アポトーシスが関与していることが明らかになった。

本研究は、アルツハイマー病患者の脳でみられる神経細胞特異的なアポトーシスに、攪乱された小胞体ストレス反応が関与している可能性を示唆した。今後、Irel α についての遺伝子改変動物の作成および解析が、アルツハイマー病や他の神経変性疾患の発症メカニズムの理解に寄与すると思われる。以上のように、本研究は、神経変性疾患に小胞体ストレスの側面からアプローチしうる可能性を提示した点で画期的であり、その功績は大きく、学位の授与に値すると思われる。