

第34回かなえ医薬振興財団助成金  
受賞者研究業績集

(第34集)

財団法人 かなえ医薬振興財団

2007. 9. 1

# 小胞体ストレス可視化モデル動物の開発

宮崎大学医学部 解剖学講座分子細胞生物学分野

近藤 慎一

## Summary

The endoplasmic reticulum (ER) is an organelle in which secretory and transmembrane proteins are folded or processed, and is susceptible to various stresses that provoke the accumulation of unfolded proteins in the ER lumen. Recently, ER stress has been reported to be linked to neuronal death in various neurodegenerative diseases. Neurons contain the ER not only in the soma, but also in the dendrites, thus presenting a different case to non-neuronal cells and cell lines. The ER in the dendrites has potential functions in local protein synthesis and sorting of synthesized proteins to postsynaptic membranes. It raises the possibility that ER stress and ER stress response could occur locally in the dendrites. Here we showed that ER stress sensors, IRE1, PERK, and ATF6 exist in the ER of both soma and dendrites in primary neurons, and that under ER stress conditions, GRP78/BiP was induced and eIF2 $\alpha$  was phosphorylated. Furthermore, XBP1 mRNA was localized in the proximal dendrites where IRE1 was rapidly phosphorylated in response to ER stress. These results indicate that the ER in dendrites could respond to ER stress and retain the capacity of protein quality control.

## 1. はじめに

神経変性疾患の発症に小胞体ストレスが密接に関与することが *in vitro* レベルの解析により指摘されている。神経変性疾患患者脳内で実際に小胞体ストレスが起こり、発症の原因になる神経細胞死を引き起こしているか *in vivo* レベルでは明らかにされていない。さらに小胞体ストレスが動物の脳でいつ、どの神経細胞に起こり、どの程度のダメージを与えているかも全く解明されていない。従って、病気の治療法を開発するためにも細胞レベルの研究から一歩踏み込み、生体内で小胞体ストレスがどのように時空間的制御を受け神経細胞の生死に影響を与えるのかを解明する必要がある。

神経の過剰興奮はシナプスを介してターゲット側神経細胞に興奮性毒性を引き起こす。またシナプス近傍には小胞体が存在し、刺激に応じてタンパク質のソーティング、分泌が行われていることも知られている。神経の過剰興奮の際にシナプス局所で小胞体ストレスが起こっているのかどうか興味深い。アルツハイマー病などは、シナプス仮説というものが提唱されるようになり、シナプスの機能異常から神経細胞の dysfunction→細胞死→病気という発症機序が想定されるようになってきた。このようにシナプス局所での小胞体ストレス応答を検知することはアルツハイマー病の病態解明につながるとともに、脳環境の変化に対するストレス応答と神経細胞の活動との関連性の理解にもつながる。そこで本研究課題では小胞体ストレスに暴露された培養神経細胞内で小胞体ストレスが起こりえるのか、起こるとすればどのような応答機構が活性化するのかを検討し、その成果をもとに *in vivo* イメージングツールの開発を目指した。

## 2. 方法

### 1) 海馬初代培養

ddy マウス胎仔 (E18) より海馬を摘出しパパイン処理後、ポリエチレンイミンコートをしたカバーガラス上にて培養した。本実験に用いた海馬初代培養は樹状突起が形成された培養一週間以上したものをを用いた。小胞体ストレス誘導剤として糖鎖付加阻害剤である tunicamycin (3  $\mu$ g/ml) を用いた。

### 2) 遺伝子導入

小胞体ストレスセンサーの細胞質側の末端に GFP を融合した IRE1-GFP, PERK-GFP, GFP-ATF6 の発現ベクターを作成した。これらのベクターを用いて神経細胞に lipofection により遺伝子導入を行い、導入後 24 から 48 時間後に観察した。

### 3) 免疫染色

カバーガラス上で培養した神経細胞を 4 %PFA 固定後、0.1% Triton X-100/PBS にて処理した。その後、1 次抗体 (anti-GRP78/Bip, anti-eIF2 $\alpha$ , anti-KDEL, anti-IRE1-P) を 4°C (over night)、二次抗体 (FITC, alexia) を室温一時間インキュベートし、蛍光顕微鏡及び共焦点顕微鏡において観察した。

## 3. 結果

### 1) 初代培養神経細胞の樹状突起内における小胞体ストレス応答

小胞体ストレスのマーカーとして小胞体分子シャペロン BiP/GRP78 の誘導と、翻訳調節因子のひとつである eIF2 $\alpha$  のリン酸化 (リン酸化 eIF2 $\alpha$ ) ]がよく用いられている。そこで初代培養した神経細胞の培養上清に小胞体ストレスを誘導する薬剤 (ツニカマイシン (Tm)) を添加し、神経細胞体および樹状突起における BiP/GRP78 とリン酸化 eIF2 $\alpha$  の応答性を免疫染色によって調べた。その結果、小胞体ストレスによって神経細胞体ならびに樹状突起内において GRP78/Bip およびリン酸化 eIF2 $\alpha$  の免疫反応性が上昇していることが明らかになった (図 1, 2)。BiP/GRP78 の免疫反応は抗 KDEL 抗体のそれと完全に一致することから、細胞体および樹状突起に存在する小胞体においてストレス応答が活性化していることもわかった (data not shown)。これらの結果は、神経細胞が小胞体ストレスを受けると、細胞体のみならず樹状突起上の小胞体、あるいはシナプス局所においても小胞体ストレス応答を起こすことを示唆している。

### 2) 樹状突起内におけるストレスシグナルの解析

樹状突起上で小胞体ストレス応答が活性化していることから、小胞体ストレスセンサー (ATF6, IRE1, PERK) も樹状突起中に存在することが予想される。これらのセンサーは神経細胞にも存在していることが知られているが、発現量が極めて低レベルのため内在性のタンパクを免疫染色で検出するのは難しいと判断し、GFP と融合させたリコンビナント ATF6、IRE1、あるいは PERK を発現するベクターを構築し、神経細胞に導入した後共焦点顕微鏡にてそれら分子の局在を観察した。その結果、いずれのセンサーとも神経細胞の細胞体に存在する小胞体だけではなく樹状突起内の小胞体にも存在することがわかった (図 3)。次にセンサーの活性化がストレス依存的に生じるかを調べる目的で、センサーのひとつである IRE1 のリン酸化レベルの変化、つまり活性化の有無を調べた。神経細胞に IRE1 を導入し小胞体ストレスを加えた後 IRE1 リン酸化抗体による

免疫染色を行った。正常状態下では IRE1 のリン酸化は見られなかったが、小胞体ストレス負荷後、細胞体周辺だけではなく樹状突起上でもリン酸化 IRE1 レベルの亢進が観察された (図 4)。以上の結果は神経細胞体のみならず樹状突起内の小胞体においても小胞体ストレス応答が生じており、応答シグナルを活性化していることを強く示唆している。

#### 4. まとめ

今回の解析により、神経細胞体のみならず樹状突起内に小胞体が存在し、各領域で独自にストレスに応答して小胞体センサー分子の活性化ならびに下流シグナルの伝達が行われていることが明らかになった。本研究では培養神経細胞中で小胞体ストレスセンサーの活性化する像を捉えることができた。しかし、ここに示した方法を個体レベルに移していくことは困難で、本研究課題の最終目標であるモデル動物の開発までには現時点において到達していない。今後 FRET などにより小胞体ストレスをイメージングできるシステムを開発し、それを動物レベルに移していきたいと考えている。

最近、神経変性疾患の発症に小胞体ストレスが関わることを示唆されているが、*in vivo* における小胞体ストレスの時間的および空間的な制御については解明されていない。アルツハイマー病などではシナプス仮説が提唱されており、樹状突起内におけるストレスが神経細胞の傷害を導く可能性が示唆されている。樹状突起局所でストレス応答の鍵分子が存在していることは、生理的に起こるシナプス局所でのストレスが小胞体ストレスという状態に変換され、その結果神経細胞に傷害をきたしてアルツハイマー病などの病態を形成させている可能性もある。今後は生きた脳で樹状突起あるいはシナプスでの小胞体ストレスのイメージングができるシステムを開発し、神経変性疾患発症における小胞体ストレスの役割をさらに詳細に検討する必要がある。

#### 5. 図説明

##### **Figure. 1. GRP78/BiP is induced in the dendrites in response to ER stress.**

Primary cultures of hippocampal neurons were treated with 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tunicamycin (Tm) for indicated times and then stained with anti-GRP78/BiP (one of ER chaperones which are induced on the UPR) and anti-MAP2 (neuron or dendrite marker). Note immunoreactivities of GRP78/BiP are elevated not only in the soma, but also in the dendrites dependent of times under ER stress.

##### **Figure. 2. eIF2 $\alpha$ -phosphorylation is induced in the dendrites in response to ER stress.**

Primary cultures of hippocampal neurons were treated with 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tunicamycin (Tm) for indicated times and then stained with anti-eIF2  $\alpha$ -phosphorylation (anti-eIF2  $\alpha$ -P) and anti-MAP2. Note immunoreactivities of eIF2  $\alpha$ -phosphorylation are elevated not only in the soma, but also in the dendrites dependent of times under ER stress.

##### **Figure. 3. Each ER stress sensor localizes in both the soma and dendrites.**

A. Scheme of GFP fusion constructs encoding each ER stress sensor.

B. Primary cultures of hippocampal neurons were transfected with the expression vectors for GFP-ATF6, IRE1 and PERK, and then stained with anti-MAP2. Note autofluorescence of each GFP fusion protein

overlaps with immunoreactivities of MAP-2. Images observed by laser confocal microscope were represented.

**Figure. 4. IRE1 is activated in the dendrites in response to ER stress.**

Primary cultures of hippocampal neurons, which were transfected with the expression vector for IRE1-GFP, were stained with anti-phosphorylated forms of IRE1 (anti-IRE1-P).

Note IRE1 is autophosphorylated not only in the soma, but also in the dendrites in response to ER stress.

Right panels are closeup of white boxes by using the confocal microscope.

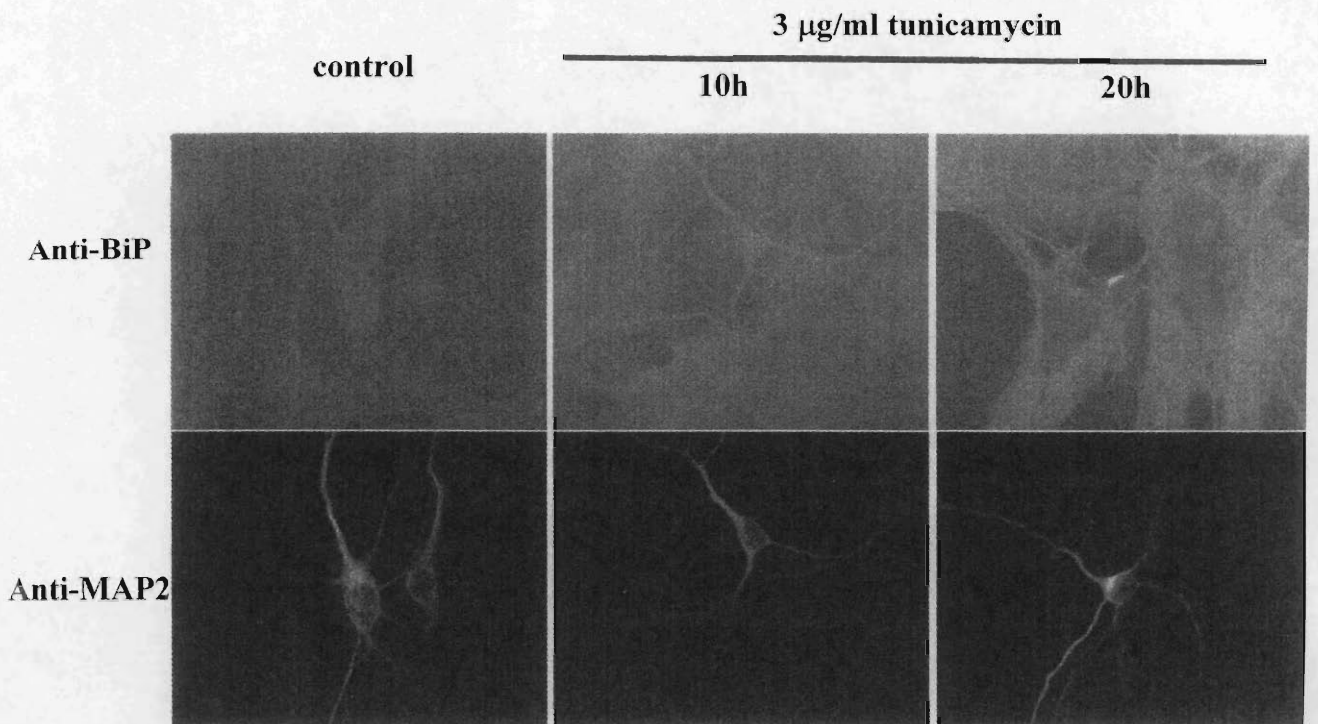


图 1

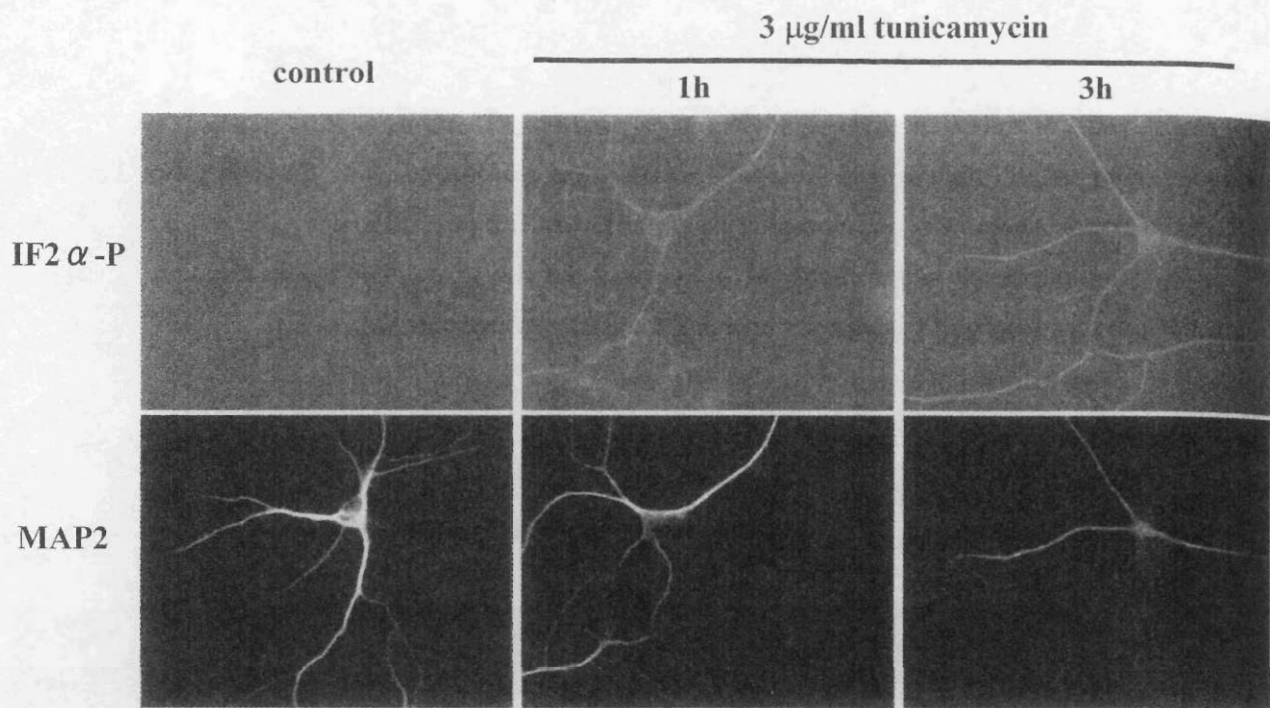


图 2

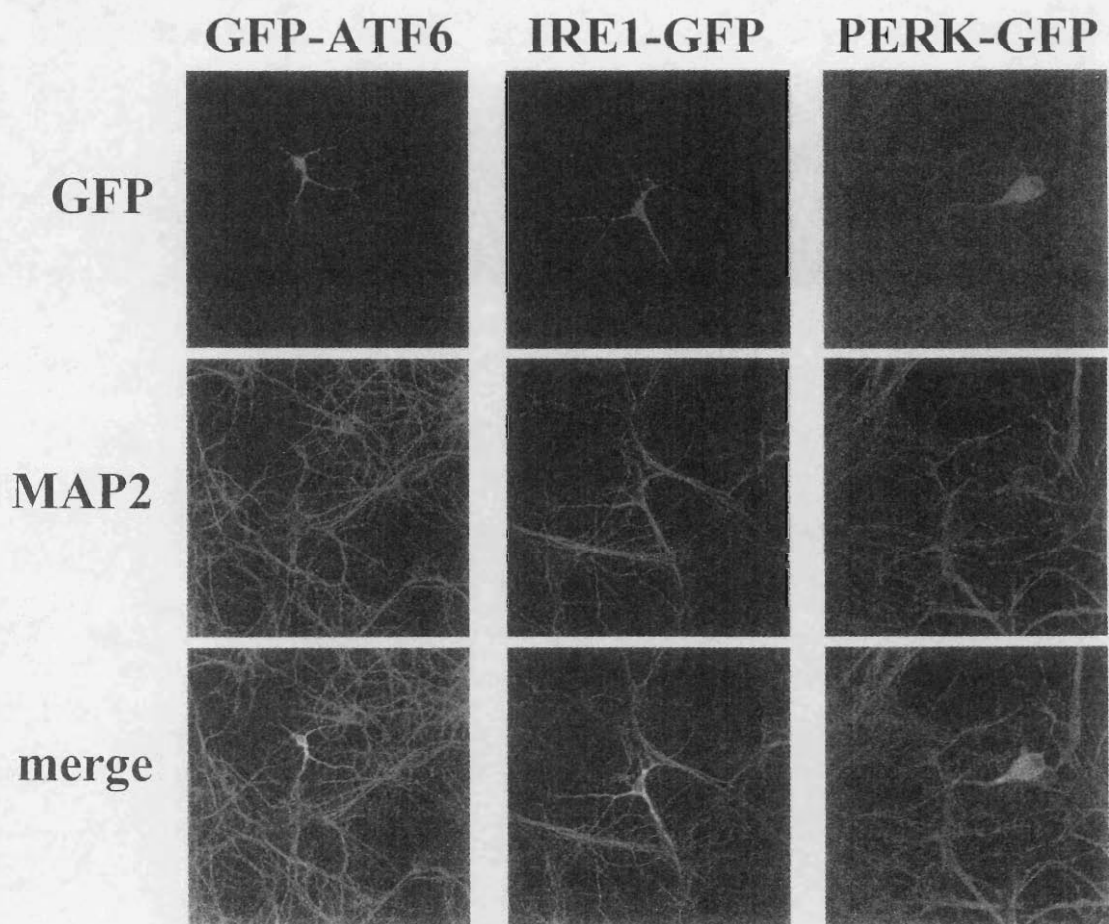


图 3

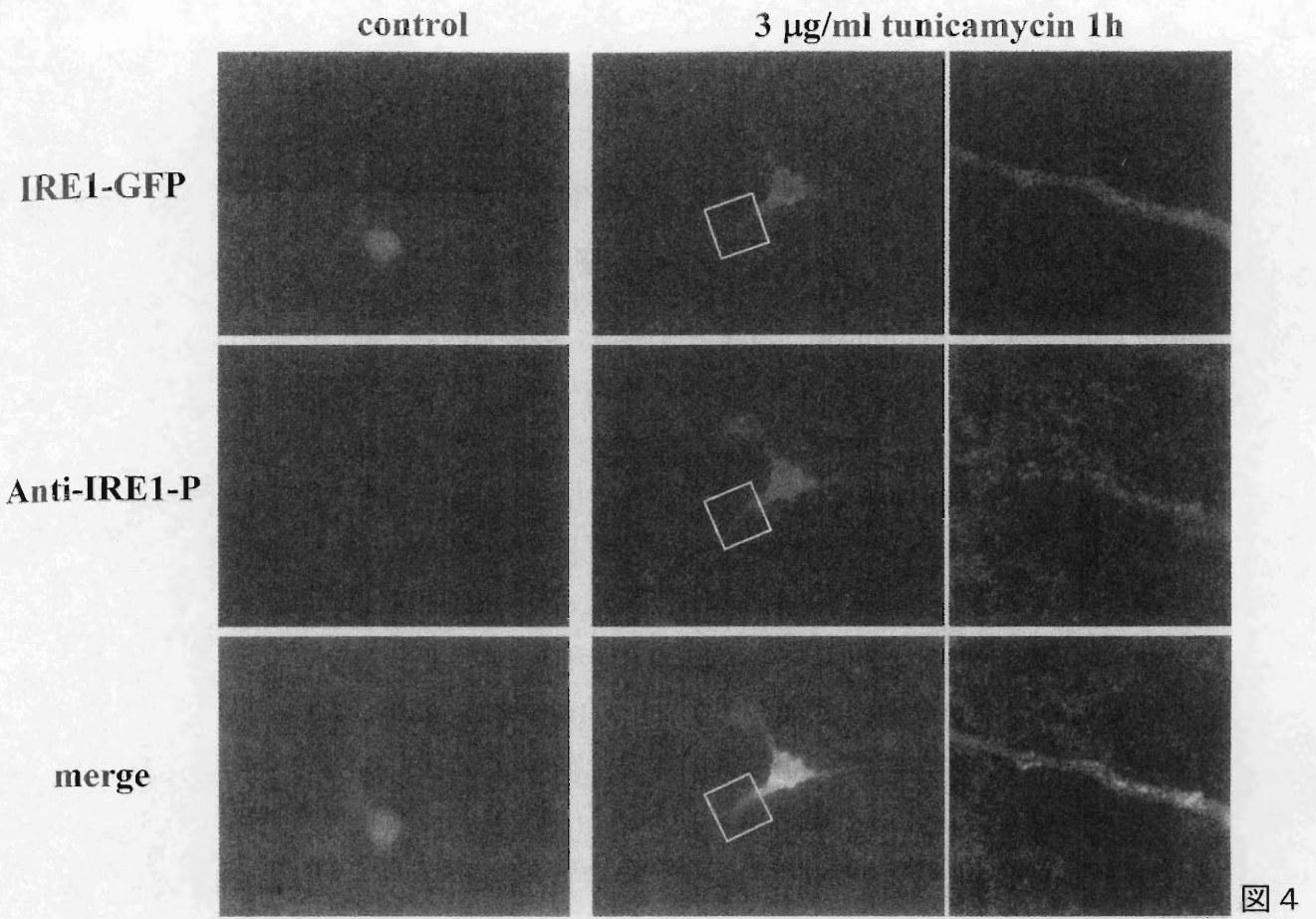


图 4