

## 研究題目 ATF6 経路を軸とした脳特異的な小胞体ストレス応答の解析

### 研究組織

研究代表者：堀 修（金沢大学 医薬保健研究域医学系）

共同研究者：親泊 政一（徳島大学 先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

我々は、これまでに ATF6 $\alpha$  及び ATF6 $\beta$  ノックアウト(KO)マウスの解析から、脳特異的な小胞体ストレス応答機構として ATF6 経路の重要性を見出している。本研究では、転写因子 ATF6 $\beta$  の下流に存在する標的遺伝子の同定と、特に神経障害下における ATF6 $\beta$  の重要性について初代神経細胞、及びマウス病態モデル（カイニン酸投与モデル）を用いて検討した。

#### [1-2]研究の方法・経過

- ① RNA-Seq：通常飼育下の野生型(WT)及び ATF6 $\beta$  KO マウスの海馬から mRNA を抽出し、RNA-seq により発現レベルの異なる遺伝子を網羅的に解析し、ATF6 $\beta$  の下流遺伝子を同定した。
- ② 初代神経細胞を用いた実験：次に、野生型(WT)及び ATF6 $\beta$  KO マウスから海馬神経細胞を単離し、細胞内 Ca 濃度、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシン及びタプシガルギン処理後に誘導される細胞死の程度を測定した。
- ③ マウスを用いた実験：野生型(WT)及び ATF6 $\beta$  KO マウスを用いて、*in vivo* 小胞体ストレスモデルと考えられるカイニン酸投与モデルマウスを作製し、海馬神経細胞死を評価した。

(WT マウス脳の 50%程度)。一方、GRP78をはじめ複数の小胞体ストレス関連遺伝子の発現が WT マウスに比し ATF6 $\beta$  KO マウスにおいて増加していた。このことは、ATF6 $\beta$  KO マウスの脳においては、CRT の発現が減少しているため、通常飼育下でも小胞体ストレスの状態にあることを示唆するものである。

- ② 初代神経細胞を用いた実験：まず、ATF6 $\beta$  KO マウス由来神経細胞で、小胞体内の Ca 濃度が低下し、細胞質内の Ca 濃度が上昇していることを明らかにした。次に、同神経細胞は WT マウス由来神経細胞に比し小胞体ストレスに対して脆弱になること、CRT の過剰発現によりその脆弱性が改善することを明らかにした（図1）。

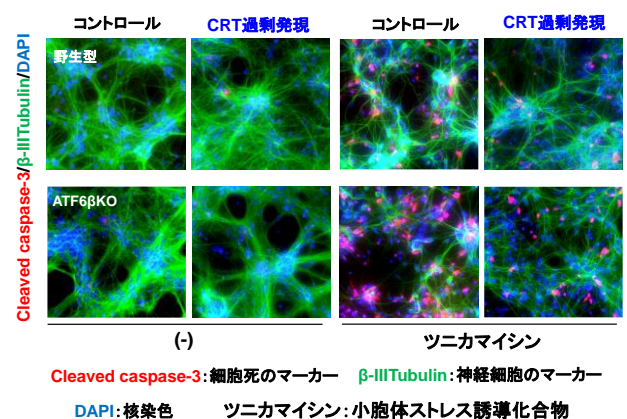


図1 CRTによる小胞体ストレス由来神経細胞死の抑制

### 【2】研究成果

#### [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

- ① RNA-Seq：ATF6 $\beta$  KO マウスの脳において、小胞体の Ca 恒常性維持に重要な分子シャペロン カルレティキュリン(CRT)の発現が特異的に減少していることが明らかになった
- ③ マウスを用いた実験：グルタミン酸受容体のアゴニストであるカイニン酸をマウスの海馬 CA3 領域に注入することで小胞体ストレス由来神経細胞死を誘導するモデルを作製した。ニッスル染色、cleaved caspase3

に対する免疫組織化学を用いて神経細胞死を評価したところ、ATF6 $\beta$  KO マウスでは、WT マウスに比し、より多くの細胞で神経細胞死が認められた (図2)。更に、CRT ヘテロ KO マウスでもカイニン酸投与後の神経細胞死の増強が認められた。一方、Ca 制御化合物 2-APB の投与により同神経細胞死は軽減した。これらのことから、ATF6 $\beta$  KO マウスでは、CRT の減少により Ca 恒常性が維持されず、小胞体ストレスに対してより脆弱になることが示唆された。

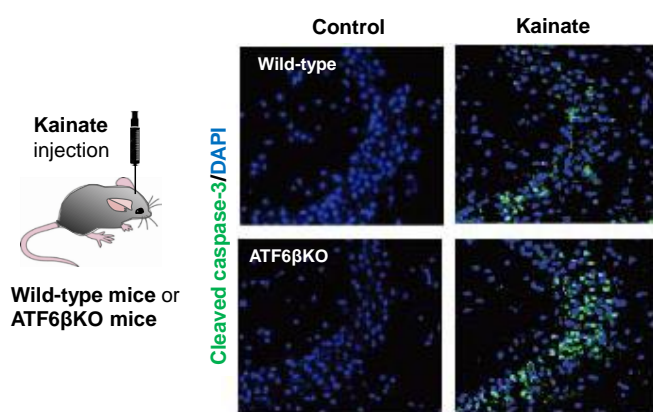


図2 ATF6 $\beta$  KO マウスにおけるカイニン酸誘導性神経細胞死の増大

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究は、世界で初めて ATF6 $\beta$ -CRT 経路の存在、及び海馬神経細胞の生存における同経路の重要性を明らかにしたものである。今後、脳内の ATF6 $\beta$  および CRT 活性化または増加させるような化合物、あるいはカルシウム調整作用のある化合物を探索することで、脳卒中やアルツハイマー病、さらには老化に伴い起こる記憶障害の予防・治療法の開発につながることを期待される。

### 【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

Nguyen DT, Le TM, Hattori T, Takarada-Iemata M, Ishii H, Roboon J, Tamatani T, Kannon T, Hosomichi K, Tajima A, Taniuchi S, Miyake M, Oyadomari S, Tanaka T, Kato N, Saito S, Mori K, Hori O. The ATF6 $\beta$ -calreticulin axis promotes neuronal survival under endoplasmic reticulum stress and excitotoxicity. *Sci Rep.* 2021 Jun 22;11(1):13086. doi: 10.1038/s41598-

021-92529-w.

[3-2] 学会発表

Qiyan Fan, Mika Takarada-Iemata, Osamu Hori, Brain damage triggers endoplasmic reticulum stress response in various cells over different time courses 第81回日本解剖学会中部支部学術集会, 2021年10月 オンライン開催

Mika Takarada-Iemata, Osamu Hori, Endoplasmic reticulum stress response of glial cells contributes to neuronal survival after optic nerve injury, 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2022年3月 オンライン開催

Melnikova Anastasiia, Osamu Hori, The protective role of calreticulin in a mouse model of spinal cord injury, 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2022年3月 Web開催

[3-3] 成果資料等

[3-1] 参照

### 【4】今後の課題等

今後、他の神経病態モデル、更に脳発達における ATF6 $\beta$ -CRT 経路の重要性を明らかにしていきたい。