

研究題目 脳発達における小胞体ストレス応答の重要性

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

これまで我々は、小胞体ストレス応答(UPR)因子 $ATF6\alpha$ 及び $ATF6\beta$ 、更に下流の小胞体内分子シャペロンの解析を通じて、生理下及び神経病態下における UPR の重要性を明らかにしてきた。しかし、 $ATF6\alpha/ATF6\beta$ ダブル KO マウスは早期胎生致死となる為、その全体像を明らかにすることは困難であった。そこで我々は、独自に作製した脳神経系特異的 $ATF6\alpha/ATF6\beta$ ダブルコンディショナル KO(dcKO) マウスを用いて、脳発達期における UPR の重要性について検討を開始した。

[1-2]研究の方法・経過

- ① **表現型解析**：dcKO マウスは、メンデルの法則に従い生まれてくるものの、生後 1 日以内に死亡した。更に、ダブル flox (コントロール) マウスに比較して、脳が小さいことが明らかになった(microcephaly)。そこで、大脳半球が発達する胎生 14.5 日 (E14.5) から生後 0.5 日 (P0.5) の神経幹細胞増殖、細胞死、移動、軸索形成について主に組織学及び免疫組織学的に検討した。更に遺伝子発現については、RT-qPCR、ウエスタンブロットを用いて検討した。
- ② **RNA-seq**：発達期のコントロール及び dcKO マウス脳における遺伝子発現の違いを網羅的に理解するために、E16.5 の大脳皮質を用いて RNA-seq を行った。GO 解析、ヒートマップを実施し、dcKo マウスで有意に発現が上昇しているまたは減少している遺伝子を同定した。
- ③ **脳内代謝評価**：やはり UPR 因子である PERK、及びその下流に存在する転写因子 ATF4 はアミノ酸代謝関連遺伝子の発現を誘

導することが知られている。そこで、本研究において LC/MS/MS を用いたアミノ酸定量を行うことで、cKO マウスの脳で起こっている代謝、特にアミノ酸代謝の変化について評価した。

【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 **表現型解析**：dcKO マウスが生後 1 日以内に死亡する原因として、ミルクの胃内貯留が認められない (図 1 A 矢印) ことから、ミルク飲みの不良が疑われた。実際、母親から隔離した仔獣に動物用ミルクをチューブで投与するとコントロール、dcKO マウス共に一定期間生存した。ミルク飲みは脳の発達とも関連する可能性があるため、両マウスの脳の大きさを比較した。その結果、dcKO マウスの脳が小さいことが確認された (図 1 B)。次に E14.5 から P0.5 の脳切片を作製し、

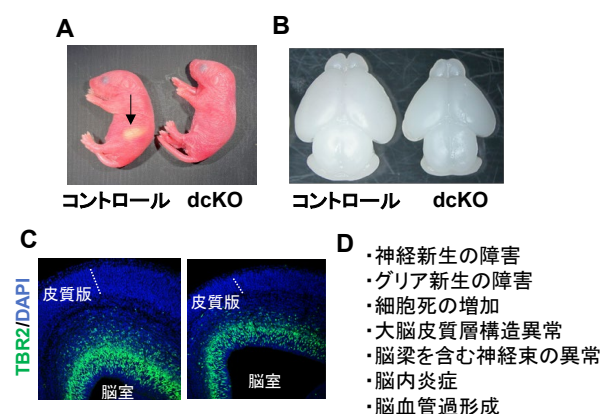


図 1. $ATF6\alpha/ATF6\beta$ dcKO マウスの表現型 A.生後直ぐ (P0.5)のマウス外観。dcKO マウスにはミルクスポット (矢印) を認めない。B.P0.5 における脳の外観。C.免疫組織化学。TBR2: (中間型) 神経前駆細胞。DAPI: 細胞核。D.dcKO マウス脳で認められる表現型

形態学的に検討したところ、神経前駆細胞数の低下（図 1 C）を含む多彩な表現型が確認された（図 1 D）。

- ② **RNA-seq**：①で認められた dcK0 マウスの表現型と UPR 欠損の関連を明らかにするため、網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行った。その結果、dcK0 マウスで発現が増加している遺伝子として、UPR 応答遺伝子、特に PERK 及び IRE1 の下流遺伝子が多く確認された。それらの中には、アミノ酸代謝、血管新生、飢餓応答に関わる遺伝子群も含まれていた（図 2 A）。一方、dcK0 マウスで減少している遺伝子として脳の発達、或いは神経突起の進展に重要な遺伝子群が認められた（図 2 B）。

A Up (184 genes)

GO:0006520: amino acid metabolic process
GO:0015807: L-amino acid transport
GO:0034976: response to endoplasmic reticulum stress
GO:0006564: L-serine biosynthetic process
GO:0045765: regulation of angiogenesis
GO:0015802: basic amino acid transport
GO:0001944: vasculature development
GO:0042594: response to starvation
GO:0008285: negative regulation of cell population proliferation
GO:2000118: regulation of sodium-dependent phosphate transport
GO:0035443: tripeptide transmembrane transport
GO:0060348: bone development
GO:0010810: regulation of cell-substrate adhesion
GO:0046653: tetrahydrofolate metabolic process

B Down (179 genes)

GO:0007610: behavior
GO:0051960: regulation of nervous system development
GO:0033555: multicellular organismal response to stress
GO:0021536: diencephalon development
GO:0001964: startle response
GO:0031175: neuron projection development
GO:0051588: regulation of neurotransmitter transport
GO:0032228: regulation of synaptic transmission, GABAergic
GO:0007423: sensory organ development
GO:0045664: regulation of neuron differentiation

図 2. ATF6 α /ATF6 β dcKO マウスの遺伝子発現 (GO 解析)
A. 発現が上昇している遺伝子群。B. 発現が減少している遺伝子群。

- ③ **脳内代謝評価**：dcKo マウスにおけるアミノ酸代謝関連遺伝子の発現増加が RNA-seq 解析



図 3. ATF6 α /ATF6 β dcKO マウスのアミノ酸量の変化 (ボルケーノプロット)

においても確認された為、コントロール及び dcKo 脳内のアミノ酸量を測定をした。dcK0 マウスで2倍以上増加している 24 化合物と半分以下に低下している 17 化合物を同定した。詳細については、現在検討中である。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究により、脳の発達における UPR 転写因子 ATF6 の重要性が明らかになった。ATF6 は小胞体内分子シャペロンの誘導に深くかかわることから、dcK0 マウスで認められる表現型の一部は、分子シャペロンを介したタンパク質恒常性 (プロテオスタシス) 障害を示唆する。一方、dcK0 マウスにおいてやはり UPR 因子である PERK 及び IRE1 が強く活性化しており、UPR のアンバランスが表現型に関与する可能性も存在する。つまり、ATF6 はプロテオスタシスの維持に加えて、UPR 経路間のバランス維持にも貢献していると考えられる。今後、マウス病態及びヒト疾患との関連などについても検討する必要があると考える。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

現在、投稿中。

[3-2] 学会発表

Nguyen et al., ATF6 branch of the unfolded protein response is required for the normal brain development in mouse. APPW 2025, Mar. 17-19.

[3-3] 成果資料等

[3-1] の通り。

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

dcK0 マウスの表現型のうち、プロテオスタシス障害によるものと、PERK、IRE1 の過活性によるものを分けて理解する必要がある。化合物、遺伝子による救済実験を含めて、この点を明らかにしたいと考えている。

また、dcK0 マウスは生後直ぐに死亡する為、生後の脳発達における UPR の役割については、未だ、明らかになっていない。現在、異なる Cre マウスを用いた新たな dcK0 マウスの作製を試みている。それらの解析を通じて、生後の脳発達についても明らかにしていきたい。