

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）		氏名	蔡 龍杰
学位授与の条件	学位規則第 4 条第① 2 項該当			
論文題目 Neuronal activity-dependent local activation of dendritic unfolded protein response promotes expression of brain-derived neurotrophic factor in cell soma (樹状突起における神経活動依存的な小胞体ストレス応答の活性化は細胞体における brain-derived neurotrophic factor の発現を誘導する)				
論文審査担当者				
主査	教授	川上秀史	印	
審査委員	教授	浅野知一郎		
審査委員	准教授	森野豊之		
〔論文審査の結果の要旨〕				
<p>細胞が変異タンパクの発現や酸化ストレスなどの様々なストレスに曝されると、小胞体の機能が障害されて小胞体内に折りたたみが不完全な異常タンパクが大量に蓄積する。このような状態を小胞体ストレスと呼ぶ。小胞体ストレスが発生すると、小胞体膜に局在する主要な小胞体ストレスセンサー IRE1、PERK、ATF6 がこれを感知して小胞体ストレス応答シグナルを活性化させ、小胞体ストレスの回避を試みる。さらに近年では、小胞体ストレス応答が小胞体ストレスの回避だけではなく細胞・生体の機能制御に関わることも分かっている。神経細胞において、IRE1 とその下流で活性化する転写因子 XBP1 が記憶形成をはじめとする神経機能制御に関わることが最近報告された。そこで申請者は、初代培養マウス海馬神経細胞を用いて神経活動依存的な IRE1-XBP1 経路の活性化メカニズムを解析するとともに、XBP1 の転写ターゲットを明らかにしてその神経機能制御機構と生理的意義を解明することを試みた。</p> <p>免疫染色法によって神経細胞の細胞体から樹状突起遠位部にかけて IRE1 が局在していることが明らかになった。神経細胞をグルタミン酸で処理すると樹状突起のポストシナプス部でリン酸化 IRE1（活性化型 IRE1）が増加し、XBP1 が核内に集積することが分かった。このことから、グルタミン酸などによる興奮性シナプス発火に応答して IRE1 がポストシナプス部で活性化し、転写因子 XBP1 の核内集積を促進することが明らかになった。次にシナプス発火依存的に活性化する XBP1 の転写ターゲットを調べた。神経栄養因子の 1 つである brain-derived neurotrophic factor (BDNF) のプロモーター領域には XBP1 が結合し得る unfolded protein response element (UPRE) 配列が存在する。BDNF プロモーターコンストラクトと N2a 細胞 (murine neuroblastoma) を用いてルシフェラーゼアッセイを行うと、グルタミン酸処理によってルシフェラーゼ活性が上昇した。UPRE 配列変異もしくは欠損コンストラクトを用いるとルシフェラーゼ活性の上昇はキャンセルされた。さらに ChIP アッセイによって XBP1 が内在性の BDNF プロモーター領域に直接結合することを確認した。以上より、シナプス発火によって活性化した XBP1</p>				

が UPRE 配列への結合を介して BDNF の発現を誘導することが分かった。分泌された BDNF は自身の発現を誘導する positive feedback loop を形成することが報告されている。初代培養マウス海馬神経細胞を BDNF で処理すると IRE1-XBP1 経路が活性化し、XBP1 が BDNF プロモーターに結合することが明らかになった。一方で他の小胞体ストレス応答経路である PERK および ATF6 経路は活性化しなかった。従来とは異なる IRE1 の活性化機構を明らかにするため、IRE1 をリン酸化する酵素を探索した。その結果、BDNF 添加によって活性化された protein kinase A (PKA) が IRE1 のリン酸化を促進することが分かった。PKA 阻害剤 H89 で処理すると、BDNF 依存的な IRE1-XBP1 経路の活性化と BDNF の発現誘導は抑制された。このことから BDNF は PKA-IRE1-XBP1 経路を介して positive feedback loop を形成することが明らかになった。次に PKA-IRE1-XBP1 経路で発現レベルが上昇した BDNF の役割を調べた。BDNF を初代培養マウス海馬神経細胞に添加して 7 日後、樹状突起の成長を解析するために樹状突起マーカー MAP2 認識抗体を用いた免疫染色を行うと、BDNF 添加によって樹状突起の伸長・分岐が促進された。この効果は IRE1 のノックダウンもしくは H89 処理によって抑制された。

以上の結果から、興奮性シナプス発火依存的にポストシナプス部で活性化した IRE1-XBP1 経路が BDNF の発現を誘導すること、BDNF は PKA-IRE1-XBP1 経路を介して positive feedback loop を形成し、樹状突起の伸長・分岐を促進することが明らかになった。本論文は神経細胞局所における IRE1 の神経活動依存的な活性化とその生理的意義を初めて明らかにしたものであり、神経回路の形成や記憶障害などの病態形成に IRE1 とその下流シグナルが関わる可能性を示したことは高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が蔡龍杰に博士（医学）の学位を授与するのに十分な価値あるものと認めた。