

主論文の要旨

**Activating Transcription Factor 6 α Is Required for
the Vasopressin Neuron System to Maintain
Water Balance Under Dehydration in Male Mice**

〔 ATF6 α はバゾプレシンニューロンによる脱水下の
水分バランス維持に必要である 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：大磯 ユタカ 教授)

東 慶成

【諸言】

新たに合成されたタンパク質は小胞体シャペロンの介助を受け、小胞体内で適切な高次構造に折り畳まれる。一方で、正常に折り畳まれなかった構造の異常なタンパク質が小胞体内に蓄積することで小胞体ストレスが惹起される。小胞体ストレスに対する細胞内の恒常性維持機構が小胞体ストレス応答であり、activating transcription factor 6 α (ATF6 α)は小胞体ストレスセンサーとして immunoglobulin heavy chain binding protein(BiP)をはじめとする小胞体シャペロンや小胞体関連分解に関わる分子の誘導を担う。

バゾプレシン(AVP)は腎臓からの水の再吸収を促進する抗利尿ホルモンであり、視床下部の視索上核(SON)および室傍核の大細胞で産生され、軸索輸送にて下垂体後葉に運ばれた後に体循環へ分泌される。大細胞では基礎状態においても BiP mRNA の発現を認め、その発現は AVP 合成が亢進する脱水負荷により増強することから、AVP 合成における BiP の関与が示唆される。

家族性中枢性尿崩症(FNDI)は AVP ニューロンが経時的に障害されることで尿崩症症状を呈する常染色体優性遺伝疾患であり、病因として遺伝子変異に基づく変異蛋白の蓄積とそれにより惹起される小胞体ストレスの関与が考えられている。FNDI モデルマウスを用いた AVP ニューロンの組織学的検討では変異蛋白の蓄積が細胞内封入体として観察された。また、電子顕微鏡による超微形態学的検討では変異蛋白が小胞体内の一区画に閉じ込められ(ERAC; endoplasmic reticulum-associated compartment の形成)凝集体として観察され、ERAC の形成が小胞体ストレスを軽減するための細胞保護的な機構であることを見出した。加えて、変異蛋白の産生を促す脱水負荷により ERAC の形成は破綻し、AVP ニューロンにおける小胞体ストレスが増大することで尿量の増加や AVP ニューロンの細胞死が加速することを報告している。上記より、ERAC の形成が AVP ニューロンにおいて重要な役割を担うことが示されたものの、ERAC の形成に関する詳細な機序は未だ明らかではない。

今回、脱水下の AVP ニューロンにおける ATF6 α の役割を明らかにすること、また FNDI マウスにおける ERAC の形成に ATF6 α が与える影響を明らかにすることを目的に以下の検討を行った。

【対象および方法】

2 ヶ月齢雄性の野生型(ATF6 $\alpha^{+/+}$)マウスと ATF6 α ノックアウト(ATF6 $\alpha^{-/-}$)マウスを、また FNDI マウスと FNDI/ATF6 $\alpha^{-/-}$ マウスを自由飲水群と脱水負荷群に割り付けた。脱水負荷として、48 時間連続脱水を 1 週間毎に繰り返す間歇的脱水を施行した。代謝ケージにて飼育し、尿量及び尿中 AVP の推移を観察した。尿検体の採取は自由飲水期の 4 日目と 5 日目に行った。深麻酔下に灌流固定を施行後、脳を摘出し 16 μ m 厚の連続凍結切片を作成し、*in situ* hybridization 法による AVP mRNA および BiP mRNA の発現量の評価と免疫組織化学染色による AVP ニューロン数の評価に用いた。また、灌流固定後に切り出した 100 μ m 厚の脳切片に対して AVP 遺伝子にコードされ AVP

と共に合成されるニューロフィジンⅡに対する抗体による抗原抗体反応施行後に酵素抗体法により AVP ニューロンを可視化し、後固定・エタノール脱水・包埋を行った後に 70nm 厚の超薄切片を作成し、免疫電子顕微鏡法による超微形態学的評価を行った。FNDI マウスおよび FNDI/ATF6 α ^{-/-}マウスの自由飲水群、脱水 4 回負荷群においては灌流固定後に 1 μ m 厚の脳切片を作成し ERAC に関する検討を行った。

統計学的処理については、各数値は mean \pm SE で表し、*t* 検定、分散分析および Bonferroni 法を用いて解析した。また、危険率 5%未満をもって有意差ありとした。

【結果】

ATF6 α ^{+/+}マウスでは脱水負荷群において自由飲水群と比して尿中 AVP の増加を認め、尿量に差を認めなかった(Fig. 1A, C)。ATF6 α ^{-/-}マウスでは脱水負荷による尿中 AVP の増加を認めず、脱水負荷群の尿量は自由飲水群と比して有意に高値を示した(Fig. 1B, C)。SON における AVP mRNA 及び BiP mRNA の検討では、AVP mRNA は脱水負荷により ATF6 α ^{+/+}マウスと ATF6 α ^{-/-}マウスの両者で同等の増加を認めたものの、BiP mRNA は ATF6 α ^{+/+}マウスで認められる脱水負荷による増加を ATF6 α ^{-/-}マウスでは認めなかった(Fig. 2)。超微形態学的評価では、自由飲水群において ATF6 α ^{+/+}マウスと ATF6 α ^{-/-}マウスの両者で正常な小胞体を認めた。脱水負荷群において ATF6 α ^{+/+}マウスの AVP ニューロンでは小胞体の一部でのみ拡張を認め、拡張部以外に正常な小胞体を認めたものの、ATF6 α ^{-/-}マウスでは小胞体全域の拡張を認めた(Fig. 3)。

続いて ATF6 α ^{-/-}が FNDI マウスに与える影響を検討した。FNDI/ATF6 α ^{-/-}マウスでは FNDI マウスと比して自由飲水群における尿量および尿中 AVP に差を認めなかったものの、脱水負荷群において尿中 AVP の減少と尿量の一層の増加を認めた(Fig. 4)。ERAC の数は自由飲水群では差を認めなかったが、脱水負荷群では FNDI/ATF6 α ^{-/-}マウスにおいて FNDI マウスと比して有意な減少を認めた(Fig. 5)。また、FNDI マウスの AVP ニューロンの細胞死は ATF6 α ^{-/-}により加速された(Fig. 6)。

【考察】

本研究にて、脱水下の ATF6 α ^{-/-}マウスにおいて ATF6 α ^{+/+}マウスと比較して、SON の BiP mRNA 発現の増加を認めないこと、AVP ニューロンの小胞体の拡張がより顕著であること、尿中 AVP の増加を認めないこと及び尿量が増加することが示された。また FNDI/ATF6 α ^{-/-}マウスを用いた検討では、ATF6 α ^{-/-}により脱水下における FNDI マウスの尿中 AVP は低下し尿量が一層増加すること、ERAC 形成の早期破綻が生じ AVP ニューロンの細胞死が加速されることが示された。

ATF6 α ^{-/-}マウスでは脱水負荷による BiP mRNA 発現の増加を認めなかったことから、AVP ニューロンにおける BiP の誘導は ATF6 α により制御されていると考えられた。加えて、ATF6 α ^{-/-}マウスにおいて脱水下の AVP ニューロンの AVP mRNA 発現が ATF6 α ^{+/+}マウスと同等の増加を認めながらも尿中 AVP の低下を認めたことは、転写段階ではなく小胞体でのプロセッシングなどの翻訳以降の機構の障害による AVP 合成の

低下が生じ、さらには異常蛋白の蓄積による小胞体全域の顕著な拡張を来したことを示唆している。また、一部の小胞体シャペロンは ERAC の内部に存在することが報告されている。今回の検討で脱水下の FNDI/ATF6 α ^{-/-}マウスにおいて ERAC 形成の破綻がより早期に生じ、尿量の増加や AVP ニューロンの細胞死が加速したことから、BiP をはじめとする小胞体シャペロンが ERAC の形成・維持や AVP ニューロンの機能保持並びに細胞生存に寄与していることが示された。

【結語】

ATF6 α は小胞体シャペロンを介して脱水下の AVP ニューロンにおける小胞体の保全、ERAC の形成・維持や AVP ニューロンの機能保持および細胞生存に寄与し、水分バランス維持において重要な役割を持つことが示された。