

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19500327

研究課題名(和文) 神経細胞の小胞体ストレスにおけるシンタキシン5アイソフォームの役割

研究課題名(英文) Role of Syntaxin5 isoforms in neuronal cells under ER stress

研究代表者

須賀 圭 (SUGA KEI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：30306675

研究成果の概要(和文)：様々な神経変性疾患において神経細胞の小胞体ストレスに伴う応答機構は未だ不明な点が多い。小胞体ストレスに反応してシンタキシン5アイソフォームの発現上昇が引き起こされることを見出した。この上昇はストレス誘発の初期の段階で一過性に起こり、一端細胞死が誘導されてしまうと積極的に分解に転じることが分かった。さらにシンタキシン5アイソフォームの属する小胞体からゴルジに局在するいわゆるSNARE蛋白質の他の一部の分子群も小胞体ストレスに反応することを見出した。小胞体ストレスに対抗してこれら分子群は神経細胞内の小胞輸送において協調的に働いていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The underlying mechanism of how neuronal cells respond to ER stress during the progression of neurodegenerative diseases is poorly understood. We have shown that Syntaxin5 (Syx5) one of the ER-Golgi SNAREs is upregulated under ER stress. The transient upregulation of Syx5 isoforms was observed at the early stages of ER stress response before the cell death pathway have been activated. A subset of ER-Golgi SNAREs was also upregulated by ER stress. These ER-Golgi SNAREs may cooperatively function in the vesicular transport system in neuronal cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経生化学、神経科学、細胞生物学

科研費の分科・細目：神経化学・背陰茎薬理学

キーワード：神経科学、脳・神経、ストレス、脳神経疾患、syntaxin

1. 研究開始当初の背景

小胞体(ER)ストレスに伴う細胞内での多様な現象において様々な分子が関与している証拠は数多く蓄積されてきた。これまでは

核とER間における遺伝子発現制御、シグナル伝達ならびにタンパク分解系(ERAD)に関する研究が盛んであるが、ERストレスに伴うER-ゴルジ間の蛋白質輸送・糖鎖修飾ならびにゴルジ装置の変化に焦点をあてている研

究は極めて少ない。むしろそれらを司る分子の実体は明らかでない。申請者が得た研究結果は、Syx5 アイソフォームが単なる t-SNARE として細胞内小胞輸送を制御するだけにとどまらず、細胞の広範な生理機能の制御を担っている可能性を示唆したので、ER ストレスに伴い ER とゴルジで起こる膜蛋白質の輸送や翻訳後修飾ならびにゴルジ装置の形態維持などの現象を媒介している可能性が十分にあると考えた。

2. 研究の目的

ER ストレスが ER を起源として細胞全体にどのように波及し、細胞の運命や寿命をどのように決定付けているのかという基礎的なメカニズム、さらには ER ストレスに伴う細胞内蛋白質輸送機構の乱れや破綻の機構を理解することは、神経細胞の生存のみならず神経変性疾患発症機構の解明に向けて重要な目標の1つである。本研究は、細胞内小胞輸送や形質膜輸送を制御する Syx ファミリーの中において、特異な機能を有することを示して来た Syx5 アイソフォームに着目し、神経細胞の ER ストレスにおける膜蛋白質輸送と糖鎖修飾ならびにゴルジ装置の形態維持における Syx5 アイソフォームの役割を明らかにするのが目的である。

3. 研究の方法

マウス・ラット・ヒト株化培養神経細胞ならびにラット初代培養海馬神経細胞に ER ストレス負荷を与えた系において、Syx5 アイソフォームの役割の差異も想定しつつ、ER ストレス誘発時における Syx5 アイソフォームの発現量と局在ならびに細胞内動態の変化に焦点を当てて解析した。Syx5 アイソフォームの発現量を人為的に変化させた系において、それらの過剰発現効果を膜蛋白質の輸送・糖鎖修飾・ゴルジ体構造のダイナミクス並びに細胞生存率と共に検証した。また Syx5 アイソフォームと結合して SNARE 複合体を形成する他の ER-Golgi SNARE の関与も視野に入れて解析した。免疫化学的手法と生化学的手法と生細胞におけるダイナミクスを探る生理学的手法を統合して解析した。それにより、神経細胞の ER ストレス下において、Syx5 アイソフォームを中心とした分子群が時空間

的に、どのような機序で膜蛋白質の糖鎖修飾を含めた正常な生合成・細胞内輸送の過程に関与するのか、それらがどのようにして細胞全体に波及していくのかを考察した。

4. 研究成果

まず申請者の実験系においても既に報告されているようなアポトーシス誘導による Syx5 アイソフォーム発現量の減少が見られるかを確認した。やはりスタウロスポリンのような強烈なアポトーシス誘導により細胞死が誘発され、それに伴うカスパーゼ3によると考えられる Syx5 蛋白質の分解が見られた。その過程においてもマーカー蛋白質である BiP/GRP78 の発現上昇からわかるように ER ストレスが誘導されているとともにゴルジ装置の形態変化も見られた。次に株化培養神経細胞・初代培養海馬神経細胞に細胞死をほとんど誘発しない程度の濃度と時間において Thapsigargin (Tg: ER 内 Ca²⁺ホメオスタシスの攪乱あうる毒素)による ER ストレス負荷を与えた系で、2つの Syx5 アイソフォーム (Syx5, Syx5L) の発現および細胞内動態の変化に焦点を当てて解析した。免疫化学的手法により Syx5 アイソフォームの細胞内局在を検討したところ、ER ストレス負荷を与えた細胞において両アイソフォームは斑点状に局在し、Syx5 アイソフォームの発現を knock-down した時にも同様に見られるいわゆる Golgi fragmentation が観察された。それらは小さい小胞状の形状をなし、シヨ糖密度勾配遠心法を用いて検討したところ、やはり小胞由来の低密度な画分に分布された。ER ストレスもまた近接する細胞内小器官であるゴルジ装置の形態維持に影響を与えることが確認された。また、Tg だけでなく Cyclopiazonic acid (CPA: ER 内 Ca²⁺ホメオスタシスの攪乱) や、糖鎖修飾を阻害する毒素である Tunicamycin (Tm) さらには ER-ゴルジ間の小胞輸送を阻害する毒素である BrefeldinA (BFA) 処理することにより ER ストレス負荷を行うと、様々な細胞系において Syx5 アイソフォームの発現量が増加することを見出した (Suga K., *et al.*, *submitted*)。また Syx5 アイソフォームの役割の差異も考慮しながら、詳細に検討したところ、APP 等の膜蛋白質の細胞内輸送などの過程において Syx5 アイソフォームの役割の差を示し

た(Suga K., *et al.*, *J. Biochemistry* 2009)。次に Syx5 アイソフォームの発現量を人為的に増加させた系において、ER ストレスが誘発されるかを検討したところ、そのような証拠は得られなかった。そのことから Syx5 アイソフォームの発現量の増加は、ER ストレスが誘発された結果として起きていることが裏付けられた。これらのことはもはや細胞死の誘導が起こってからは Syx5 アイソフォームは必要でなく積極的にカスパーゼ 3 により分解されるが、細胞死が起こる前には一過性ではあるがその発現が上昇する必要性があることがわかった。また Syx5 蛋白質の発現量増加は、決してその分解抑制によるものではなく、転写レベルで上昇することがわかった。

ここまで見出した ER ストレスに応答した発現量の上昇と細胞内局在の変化は、近接した局在を示す他の Syx のタイプでは見られない特有な現象であり、Syx5 アイソフォームが族する ER-Golgi SNARE を構成する一部の蛋白質においても見られることを見出した(Suga K., *et al.*, *in preparation*)。これらのことは、ER ストレスに反応して Syx5 アイソフォームは他の ER-Golgi SNARE と協同的になんらかの積極的な役割を果たしている可能性を示唆した。そこで今後は転写レベルで上昇する Syx5 アイソフォームの発現調節機構とそのシグナリング機構を明らかにすると共に、Syx5 と結合して SNARE 複合体を形成する ER-Golgi SNARE ならびにそれら複合体形成の調節因子である SM 蛋白質による Syx5 アイソフォームの機能修飾までも視野に入れて ER ストレスに反応したこれら分子群の役割についても解析する必要性が出てきた。それらを検証することにより、Syx5 アイソフォームを中心とした分子群がどのような機序で神経細胞における ER ストレス誘発の初期段階の生存維持の機構に寄与するのかを明らかにしなければならないと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① K. Suga, A. Saito, T. Tomiyama, H. Mori, K. Akagawa

The Syntaxin5 isoforms Syx5 and Syx5L have distinct effects on the processing of β APP
J. Biochem. 査読有, Vol.146, No.6 2009, 905-915

② K. Tanaka, T. Iijima, T. Mishima, K. Suga, K. Akagawa, Y. Iwao
Ca²⁺ buffering capacity of mitochondria after oxygen-glucose deprivation in hippocampal neurons
Neurochem. Res. 査読有, Vol. 34, 2009, 221-226

③ K. Kasai, K. Suga, T. Izumi, K. Akagawa
Syntaxin8 has two functionally distinct di-leucine based motif
Cell. Mol. Biol. Lett. 査読有, Vol.13, 2008, 144-154

④ T. Iijima, K. Tanaka, S. Matsubara, S. Kawakami, T. Mishima, K. Suga, K. Akagawa, Y. Iwao
Calcium loading capacity and morphological changes in mitochondria in an ischemic preconditioned model
Neurosci. Lett. 査読有, Vol.448, 2008, 268-272

[学会発表] (計 8 件)

① 須賀 圭, 齋藤 綾子、三嶋 竜弥、赤川 公朗
Up-regulation of Syntaxin5 protein expression under ER stress
第 53 回日本神経化学学会大会、神戸、2010 年、9 月 3 日

② 須賀 圭, 齋藤 綾子、富山 貴美、森 啓、赤川 公朗
小胞体とゴルジ体での APP のプロセッシングと細胞内輸送における Syntaxin5 アイソフォームの役割
第 52 回日本神経化学学会大会、2009 年 6 月 22 日、伊香保

〔その他〕

ホームページ等

所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページURL:

http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/labo/cell_physiology.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須賀 圭 (SUGA KEI)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：30306675

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

齋藤 綾子 (SAITO AYAKO)
杏林大学・医学部・その他
研究者番号：80424109

三嶋 竜弥 (MISHIMA TATSUYA)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：40317095