

研究題目 中枢神経における小胞体品質管理機構の破綻に起因する 運動障害のメカニズム

研究組織

研究代表者：加藤裕紀（宮崎大学医学部機能生化学分野）

共同研究者：片桐豊雅（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：杉山崇史（宮崎大学医学部機能生化学分野）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

研究計画・内容（継続の場合は、その状況も記載）

細胞は、小胞体ストレス状態を回避するため Unfolded protein response (UPR) とよばれる品質管理機構をもつ。特徴的な機能・形態をもつ神経細胞において、小胞体は神経突起の先端にまで張り巡らされており、タンパク質の修飾、物質の輸送、カルシウムイオンの恒常性維持など、その機能は多岐にわたる。小胞体の機能障害は、多くの神経変性疾患と密接に関わることが知られているが、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。我々は、これまでに小胞体品質管理機構の破綻と運動機能に関連した神経変性疾患との関わりを明らかにしてきた

(Nishitoh et al., *Genes Dev.* 2002, 2008)。我々は、小胞体品質管理に重要な小胞体関連分解に関わる膜分子 Derlin-1 (Derl1) と Derlin-2 (Derl2) の中枢神経特異的欠損 (nKO) マウスをそれぞれ作製し、小胞体の機能破綻が運動機能に与える影響を解析している。これまでに、Derl1 nKO マウスと Derl2 nKO マウスは、いずれも運動の調整に関わる脳領域である線条体と小脳において幼若期から低形成が顕在化し、神経細胞の脱落は認めないものの、各領域に存在する中型有棘神経細胞やプルキンエ細胞といった神経細胞の樹状突起が縮小すること、さらには両マウスとも協調運動障害を呈することが明らかになっている（未発表）。一方で、様々な神経変性疾患で異常が観察されるグリア細胞に着目し解析を行ったところ、Derl1 nKO マウスのみ

で小脳と線条体に異常増生が認められた。これらの結果から、神経細胞の樹状突起の形成不全が小胞体品質管理機構の破綻による協調運動障害に特に重要であることが示唆された。小胞体品質管理機構の破綻に起因する障害であれば、ケミカルシャペロンにより改善するのではないかと考え、4-phenylbutyric acid (4-PBA) の腹腔内投与を行ったところ、両マウスともに脳の低形成の程度が緩和した。そのため、本共同研究により、4-PBA 投与マウスを含めた Derl1 nKO マウスと Derl2 nKO マウスを対象に DNA マイクロアレイ解析を行い、網羅的な遺伝子群の変動を比較することで、協調運動障害を引き起こすより詳細なメカニズムの解明を目指した。本解析により、小胞体品質管理機構の破綻がどのようなメカニズムで樹状突起の形成障害および脳萎縮を引き起こしているか、またそれらのグリア細胞の異常増生との関係性についても明らかにできるのではないかと考えた。

[1-2]研究の方法・経過

1.小胞体品質管理の破綻に起因する神経突起の形成障害に関わる経路の同定

マウスの小脳は14日齢から28日齢にかけて成熟することが知られており、この時期でDerl1 nKO マウスと Derl2 nKO マウスは小脳の低形成が顕在化することが分かっている。そこで、Derl1 nKO マウスと Derl2 nKO マウスに対して、14日齢から28日齢まで毎日、4-PBA もしくは Vehicle (超純水)を腹腔内投与した後、小脳を採取して DNA マイクロアレイ解析を行った。Gene ontology 解析などを駆使した網羅的な解

析により小胞体品質管理の破綻に起因する神経障害に関わる新たな経路の同定を試みた。

2. 小胞体品質管理の破綻が中枢神経でグリア細胞の異常増生を引き起こすメカニズムの解析

神経変性疾患では神経障害が生じている部位にグリア細胞の異常増生が生じることが知られており、疾患との関わりが注目されている。そこで、上記 1. と同じ小脳を用いて、グリア細胞が増生しない *Der12 nKO* マウスと比較することで、小胞体品質管理が破綻した際にグリア細胞の異常な増生を引き起こすメカニズムを明らかにすることを試みた。

これらの課題を遂行し、*Derlin* ファミリーの欠損に起因する神経障害に関与している遺伝子群を同定することで、中枢神経における小胞体品質管理の破綻に起因する運動障害のメカニズムの解明を目指した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

小胞体品質管理の破綻に起因する神経障害は、一般的には小胞体ストレス応答によるアポトーシスや慢性炎症の関与などが広く知られている。そこで、小胞体ストレス応答に関する遺伝子群を抽出して *Heat map* により変動を可視化したうえで、*Gene set enrichment analysis* で統計処理した。その結果、*Der11 nKO* マウスでは、小胞体ストレスは惹起されていたものの、ストレスを緩和するとされる *4-PBA* 投与下でもストレス関連の遺伝子群は減少せず、さらに、*Der12 nKO* マウスにおいては、ストレス関連の遺伝子群は上昇する傾向はなかった。以上より、小胞体ストレスは脳低形成やグリア細胞の異常増生には関与している可能性は低いと考えられた。

そこで、*Der11 nKO* マウスの小脳において遺伝子発現の変化した遺伝子を対象とした *Gene ontology* 解析を行ったところ、コレステロール合成に関わる酵素の遺伝子群が減少していることが分かった。さらに *Real time qPCR* による追加の解析により、*Der11 nKO* マウスだけでなく *Der12 nKO* マウスの小脳においてもコレステロール合成酵素の遺伝子発現が全体的に減少していることが分かった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

コレステロールは、脳内に非常に多く含まれており、髄鞘やシナプス、突起の形成などに関与しており、中枢神経系の発達やその機能に重要である。そのため、コレステロール合成経路の障害が中枢神経特異的 *Der11* 欠損マウスの脳低形成や協調運動障害に関与している可能性が想定された。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし。

[3-2]学会発表

1) 杉山崇史. 中枢神経における小胞体品質管理機構の破綻に起因する運動障害のメカニズム. 第14回小胞体ストレス研究会. 岡山市, 9月26日, 2019年

[3-3]成果資料等

なし。

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

コレステロール合成酵素は *SREBP-2* による制御を受けているため、*Der11 nKO* マウスと *Der12 nKO* マウスで *SREBP-2* が変動していることを確認する必要がある。その上で、コレステロール合成経路の障害と *Der11 nKO* マウスと *Der12 nKO* マウスの脳低形成に関与していることを証明するために、ウイルスを用いて小脳に *SREBP-2* を過剰発現させて、神経突起の短縮や脳の大きさが改善するか確認する必要がある。