

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18961

研究課題名(和文) ゴルジ体酸性環境不全に起因する病態発症機序の解明

研究課題名(英文) Impairment of Golgi pH homeostasis cause neurodegeneration

研究代表者

曾 友深 (Sou, Yu-shin)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60576221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体内腔の酸性環境維持に必須な分子、GPHRの遺伝子改変マウスを用いて、ゴルジ体内腔酸性環境の重要性を神経組織および神経回路レベルの解析を行った。中枢神経特異的GPHR欠損マウスは振戦症状を呈し、組織学的解析から、大脳皮質や海馬CA1の神経細胞の脱落、表層部分におけるTUNEL陽性細胞の集積や神経細胞内ゴルジ体の断片化など、神経変性疾患様症状を示すことを明らかにした。また、小脳抑制神経回路特異的GPHR欠損マウスはバスケット細胞の軸索変性に起因したシナプスの脱落および、その影響によるプルキンエ細胞への入力神経回路の再編成が起こることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：To address the importance of the Golgi lumenal pH homeostasis in brain and neuronal circuit level, we took advantage of GPHR conditional knock-out mice. Brain specific GPHR deficient mice exhibit tremor symptoms, and histological analysis revealed that cerebral cortex and hippocampal CA1 neuron shedding, accumulation of TUNEL positive neurons in the surface layer, fragmentation of Golgi in neuron. These results indicated that brain specific GPHR-deficient mice develop neurodegenerative disease. We also found that disruption of synapse due to axonal degeneration of basket cells and remodeling of neuronal circuits to Purkinje cells occurred in cerebellar inhibitory circuit specific-GPHR deficient mice.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：GPHR ゴルジ体 神経変性 小脳回路 プルキンエ細胞 バスケット細胞

1. 研究開始当初の背景

真核生物では様々なオルガネラが協調的に働き、その機能を発揮することが細胞の生存に必須である。細胞内オルガネラの中で、ゴルジ体、エンドソームやリソソームなどの内腔を酸性環境に保持しているオルガネラは酸性オルガネラと総称され、その内腔酸性環境は小胞輸送経路や各種シグナル応答に必須であること、そして、この酸性環境の阻害はオルガネラの機能低下や細胞内輸送の異常を引き起こし、様々な重篤疾患を発症することが報告されている (sFrances et al., *J Cell Biol.*, 2012.)。酸性オルガネラの1つであるゴルジ体は蛋白質の翻訳後修飾および最終目的地への輸送に重要な役割を果たす。蛋白質が正確な糖鎖修飾を受け、適切な目的地に輸送されるためには、ゴルジ体内腔の酸性環境が必要である。実際に、作用機序の異なる酸性化阻害剤を用いた研究では、ゴルジ体内腔酸性環境の破綻は蛋白質輸送障害を引き起こす。興味深い事にゴルジ体内腔酸性環境の阻害は蛋白質輸送障害に加え、その特徴的な層板構造の崩壊や小胞化・断片化が報告されている。そのようなゴルジ体の形態異常は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患病巣部の神経細胞において、頻繁に観察される。また、近年の研究報告には、先天性グリコシル化異常症 (CDG) の原因遺伝子としてゴルジ体内腔 pH 調整に関与する蛋白質 ATP6v0a2 や TMEM165 が同定された。さらに、アンジェルマン症候群の原因遺伝子である Ube3a がゴルジ体の内腔酸性化に関与すると報告されている。これらの研究報告は、ゴルジ体内腔酸性環境の破綻と病態発症の関連性を示唆している。しかしながら、ゴルジ体の酸性環境を特異的に阻害する薬剤は報告されておらず、また、モデルマウスも樹立されていないため、ゴルジ体酸性環境を特異的に制御する手法は未だ確立されていない。そのため、ゴルジ体酸性環境と病態発症との因果関係は不明なままであった。

2. 研究の目的

ゴルジ体内腔は細胞質より低い pH に維持し、ゴルジ特異的な酵素の至適 pH を保っている。そして、ゴルジ体内腔酸性環境の破綻がその機能障害や形態異常を引き起こすことが知られている。しかしながら、これまでのゴルジ体酸性環境を阻害するには、オルガネラ特異性の低いプロトンポンプ阻害剤を用いた研究がほとんどである。そして、その結果がゴルジ体酸性環境を阻害した表現型か、もしくはリソソームなどの他の酸性オルガネラを阻害した表現型であるかが、区別できない問題が残っている。そこで、ゴルジ体内腔の酸性化に寄与するイオンチャネル GPHR (Golgi pH regulator) に着目し、そのマウス遺伝学的解析をおこなうことで、ゴルジ体内腔酸性環境の生理機能とその異常に起

因する病態発症について検討することが可能であると考えた。GPHR はゴルジ体内腔の酸性化に寄与し、その欠損細胞株はゴルジ体内腔の pH 上昇に起因したタンパク質輸送障害、糖鎖修飾不全、ゴルジ体形態異常 (小胞化・断片化) を示す (Maeda et al., *Nat Cell Biol.*, 2008)。

本研究では GPHR のマウス遺伝学的解析を中心に、神経細胞におけるゴルジ体酸性環境の重要性、およびその形態異常の病態生理学的意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

中枢神経系におけるゴルジ体内腔酸性環境の重要性およびその破綻による病態発症機序を解明するため、組織特異的 GPHR 欠損マウスを作製した。作製したマウスを生化学、形態学および電気生理的解析を包括的に行った。

4. 研究成果

中枢神経系特異的 GPHR 欠損マウスの解析

GPHR コンディショナルノックアウトマウス (cKO) と中枢神経系特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Nestin-Cre マウスを交配し、中枢神経系特異的 GPHR 欠損マウス (GPHR cKO; Nes) を作出した。作出した GPHR cKO; Nes は野生型と比較し、有意に小さく、振戦症状を呈し、生後 12 日までに死亡した。そして、GPHR cKO; Nes の脳を形態学的解析した結果、大脳皮質における第 1 層の薄層化や海馬 CA1 の神経細胞の脱落が観察された (図 1)。



図 1 海馬の H&E 染色像。

コントロールと比較し、GPHR cKO;Nes では神経細胞の脱落による薄層化が観察される。

また、大脳皮質の表層部位に TUNEL 陽性細胞の集積が観察された。つまり、中枢神経系特異的 GPHR cKO マウスは神経変性疾患様の病態を呈する事が明らかとなった。そして、神経変性とゴルジ体の構造異常との因果関係を解析するために、ゴルジ体マーカーである GM130 と TGN38 の 2 重免疫蛍光染色を行った。その結果、神経細胞の脱落が顕著であった大脳皮質や海馬の神経細胞において、

通常では核周辺を取り囲む様に配置しているゴルジ体が GPHR 欠損神経細胞では細胞質全体に飛散していた、つまり断片化を起こしていた(図2)。これらの結果はゴルジ体内腔の酸性環境不全はゴルジ体の断片化を引き起こし、その結果、神経変性を引き起こすことを示している。(論文投稿準備中)

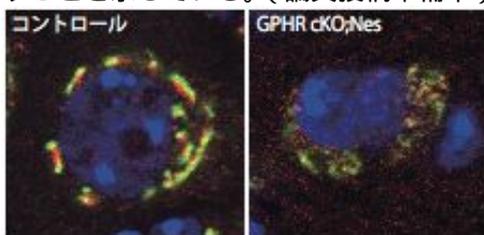


図2 大脳皮質の大型錐体細胞におけるゴルジ体。
ゴルジ体マーカーGM130(緑)と TGN38(赤)の染色像。GPHR cKO;Nes では、ゴルジ体が断片化し細胞質中に飛散した。

しかしながら、Nestin-Cre マウスは神経細胞だけでなく、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞においても遺伝子の欠損が認められる。そのため、細胞自律的な神経変性であるか区別が不可能である。また、成熟した神経細胞や神経回路におけるゴルジ体の酸性環境不全のモデルにはならない。そこで、小脳プルキンエ細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現させる L7/pcp2-Cre マウス、または、プルキンエ細胞バスケット細胞に特異的に Cre リコンビナーゼを発現させる GluD2-Cre マウスを用いて、プルキンエ細胞におけるゴルジ体酸性環境の重要性とその神経回路に及ぼす影響を解析した。

ゴルジ体酸性環境不全に起因する細胞自律的神経細胞死

GPHR cKO と小脳プルキンエ細胞とバスケット細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する GluD2-Cre マウスを交配し、小脳神経系特異的 GPHR 欠損マウス(GPHR cKO;GluD2)を作成した。GPHR cKO;GluD2 は外見上、野生型と相違を認められなかった。しかしながら、生後60日を過ぎる頃から協調運動障害や下肢反射異常の表現型を示し、加齢と共に重症化した。そして、GPHR cKO;GluD2 の小脳を形態学的解析した結果、生後60日からプルキンエ細胞の脱落が確認され、加齢と共にその数が増加した。この結果はプルキンエ細胞の脱落に起因した小脳失調症を発症していることが示している。一方で、細胞自律型神経細胞死を確認するため、プルキンエ細胞特異的 GPHR 欠損マウス(GPHR cKO;L7)を作成し、解析を行った。その結果、プルキンエ細胞の細胞自律的細胞死を確認した。

続いて、プルキンエ細胞のゴルジ体の形態学的解析を行った結果、GPHR cKO;Nes の神経細胞と同様に、ゴルジ体の形態異常が観察さ

れた。興味深いことに、正常プルキンエ細胞では樹状突起側に極性を持つゴルジ体が、GPHR 欠損プルキンエ細胞では、層盤構造の破綻と共に極性を失ったことを示している。

GPHR 欠損細胞を用いた先行研究では、ゴルジ体内腔酸性環境の破綻に起因した蛋白質輸送障害が起こることが既に報告されている。また、神経細胞におけるゴルジ体の機能は、発達期において、適切な極性や形態を維持するだけでなく、成熟した後に、軸索を介した神経伝達物質の輸送にも重要であることが報告されている。そこで、ゴルジ体酸性環境不全に起因するゴルジ体の形態異常が軸索輸送に与える影響を形態学的に解析した。プルキンエ細胞の軸索は顆粒細胞層を横断して、深部小脳核(DCN)に投射する。まず、顆粒細胞層を横断するプルキンエ細胞の軸索に着目した。プルキンエ細胞特異的マーカーであるカルピンジンの抗体を用いた免疫蛍光染色法による解析から、GPHR 欠損プルキンエ細胞の軸索は生後45日から軸索腫大が現れ、加齢と共に数とサイズが増加した(図3)。



図3 深部小脳核領域におけるプルキンエ細胞軸索末端。
深部小脳核領域のカルピンジン(緑)と NeuN(赤, 神経細胞)の2重染色像。GPHR cKO;GluD2 ではプルキンエ細胞軸索末端の肥大が観察された。

このような軸索腫大は、プルキンエ細胞の軸索末端部位である DCN 領域でも観察され、それは vesicular GABA transporter (vGAT) 陰性であった。軸索腫大のさらなる微細構造を解析するため、電子顕微鏡解析を行った結果、肥大した軸索部分には、ミトコンドリアや異常な膜構造の蓄積が観察された。これらの結果はゴルジ体酸性環境の障害が、軸索輸送に影響し、軸索腫大を引き起こすことを示唆している。

小脳神経回路におけるゴルジ体酸性環境の重要性

これまでの研究結果から、ゴルジ体の酸性環境の破綻は軸索輸送に影響を与え、軸索変性に起因した神経細胞死を引き起こすことが明らかとなった。GPHR cKO;GluD2 ではプルキンエ細胞と共に、GABA 作動性介在神経細胞であるバスケット細胞においても Cre リコンビナーゼが発現し、GPHR 欠損が起きる。そこで、バスケット細胞軸索末端の形態学的解析を行った。小脳皮質において、バスケット細胞

の軸索末端はプルキンエ細胞の軸索起始部周辺を幾重にも取り囲み、パンソー (Pinneau) 構造を形成する。GPHR cKO;GluD2 において、パンソー構造を確認するため、バスケット細胞とプルキンエ細胞の両細胞が染色されるパルプアルブミンとプルキンエ細胞のみ染色されるカルビンジンの共染色を行った。コントロールマウスのバスケット細胞の軸索はプルキンエ細胞軸索起始部を取り囲み、パンソー構造を形成したが、GPHR cKO;GluD2 ではパンソー構造の著しい消失が観察された(図4)。

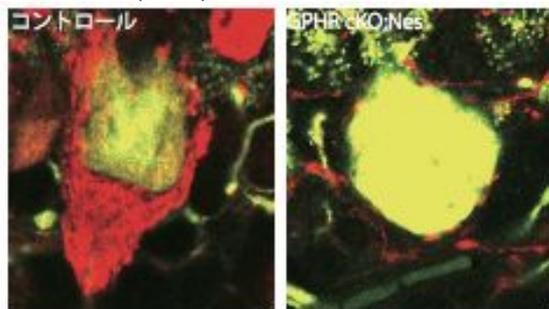


図4 小脳皮質におけるパンソー構造。カルビンジン(緑)とパルプアルブミン(赤)の2重染色像。コントロールではプルキンエ細胞(黄色)軸索起始部で観察されるバスケット細胞の軸索末端(赤)が、GPHR cKO;GluD2 では完全に消失している。

さらに、パンソー構造の消失がバスケット細胞の軸索変性に起因しているのか否かを検討するため、GPHR cKO;L7 において、同様の解析を行った。その結果、GPHR cKO;L7 ではプルキンエ細胞脱落后でもパンソー構造が保持されていた。この結果はパンソー構造がバスケット細胞軸索の状態に依存する構造であることを示唆している。続いて、GPHR cKO;GluD2 におけるパンソー構造の消失が、形成不全であるかを検討するため、経時的に形態学的解析を行った。その結果、GPHR cKO;GluD2 において、生後30日ではパンソー構造は一度出来上がり、生後60日において、完全に消失していた。これはパンソー構造が一度形成された後に、消失したことを示している。また、バスケット細胞からの入力脱落しているか否かを検討するため、プレシナプスマーカー-vGAT とポストシナプスマーカー-neuroigin2 (NL2)の共染色を行った。コントロールでは、プルキンエ細胞の細胞体全体にそってほぼ完全に共局在し、典型的なバスケット細胞軸索末端のパターンを示した。対して、GPHR cKO;GluD2 では、パンソー構造の領域ではvGAT とNL2 は共に観察されず、プルキンエ細胞の細胞体周辺に散発的に観察された。さらに、電子顕微鏡解析から、通常ではプルキンエ細胞軸索起始部に観察されるバスケット細胞からのシナプス構造が、GPHR cKO;GluD2 では完全に脱落し、その間にバグマングリアの浸潤が観察された。そして、GPHR cKO;GluD2 におけるバスケット細胞

からのシナプス伝達の低下を電気生理的手法によって解析した。プルキンエ細胞の抑制性シナプス後電流(mIPSC)はバスケット細胞からの大きな振幅とサテライト細胞からの小さい振幅に分類される。コントロールマウスと比較してGPHR cKO;GluD2 では、mIPSCの小さな振幅では差が見られなかったが、大きな振幅が劇的に減少していた。これらの結果は、バスケット細胞のゴルジ体酸性環境不全に起因した軸索変性がプルキンエ細胞への抑制的入力の脱落を示唆している。

これまでの先行研究から、発達期におけるプルキンエ細胞への抑制性入力の減少は、登上線維シナプスの刈り込み障害を引き起こし、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの異所性を引き起こすことが報告されている(Nakayama et al., neuron., 2012)。加えて、電子顕微鏡解析から、通常は樹上突起上の興奮性シナプスを包んでいるバグマングリアの浸潤が確認された。そこで、GPHR cKO;GluD2 において、バスケット細胞シナプスの脱落后に、登上線維シナプスが形成されるのではないかと仮定した。この仮説を検討するため、登上線維軸索末端マーカーであるtype2 vesicular glutamate transporter (vGluT2)とカルビンジンの共染色を行った。その結果、コントロール、GPHR cKO;GluD2 共に、分子層でのvGluT2 陽性登上線維末端の分布に差はなかった。しかしながら、GPHR cKO;GluD2 においては、vGluT2 陽性登上線維末端がプルキンエ細胞の細胞体に分布していた。続いて、GPHR cKO;GluD2 において、プルキンエ細胞の細胞体上に、スパインが形成されるかを検討するため、代謝型グルタミン酸受容体1(mGluR1)、カルビンジンとvGluT2の3重染色を行った。予想された通り、mGluR1 は、プルキンエ細胞の細胞体周辺領域においてvGluT2 と共局在した。この結果はプルキンエ細胞の細胞体へのCF神経支配を示唆している。そして、スパイン構造の超微細構造を決定するため、電子顕微鏡解析を行った。GPHR cKO;GluD2 プルキンエ細胞の細胞体上には典型的なバスケット細胞シナプスに加え、スパインを形成した登場線維シナプスが観察された。さらには、GPHR cKO;GluD2 において、細胞質に滑面小胞体が層板状に積み重なったマルチラメラ構造が観察された。マルチラメラ構造は過剰な興奮性伝達物質による活性化した代謝型グルタミン酸受容体によって、滑面小胞体が積み重なった構造であり、巨大なCa²⁺貯蔵庫として機能する。つまり、GPHRF / F; GluD2-Cre マウスにおいて、プルキンエ細胞の細胞体に入力する登上線維シナプスによる刺激は過剰なCa²⁺の入流に引き起こす。そして、マルチラメラ構造は過剰なCa²⁺の貯蔵し、適切な細胞内Ca²⁺濃度を保ち、細胞の保護に働くと考えられる。これらの内容に関して現在論文投稿中である。

現在までに、ゴルジ体内腔のpH維持機構

の重要性は、そのほとんどが培養細胞レベルの解析に留まっていた。本研究課題では、細胞レベルだけでなく、個体レベルでゴルジ体内腔酸性環境の生理的意義とその破綻に伴うゴルジ体形態異常の病態生理的意義を明らかにした。今後はより詳細な病態発症の分子メカニズムを明らかにすることが必要である。そして、分子機構の解明は、病態発症機序のより深い理解だけでなく、新たな治療法の発見に繋がると期待できる。

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 1 件)

van Wijk SJL, Fricke F, Herhaus L, Gupta J, Hötte K, Pampaloni F, Grumati P, Kaulich M, SouYS, Komatsu M, Greten FR, Fulda S, Heilemann M, Dikic I. Linear ubiquitination of cytosolic Salmonella Typhimurium activates NF- κ B and restricts bacterial proliferation. Nat Microbiol. (査読有) 2017 2:17066.

[学会発表](計 3 件)

曾友深、角田 宗一郎、前田 祐輔、木下 タロウ、崎村 建司、内山 安男、小池 正人 小脳神経細胞におけるゴルジ体酸性環境の重要性
2017年生命科学系学会合同年次大会
2017年12月7日(神戸)

曾友深、角田 宗一郎、前田 祐輔、木下 タロウ、渡辺 雅彦、崎村 建司、内山 安男、小池 正人
ゴルジ体酸性環境不全に起因する病態発症機序の解明
第121回日本解剖学会総会全国学術集会
2016年3月29日(長崎)

曾友深、角田 宗一郎、前田 祐輔、木下 タロウ、渡辺 雅彦、崎村 建司、内山 安男、小池 正人
ゴルジ体の形態異常に起因する神経病態発症機序の解明
第121回日本解剖学会総会全国学術集会
2015年3月27日(福島)

6. 研究組織

(1)研究代表者

曾友深 (SOU, YU-SHIN)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号: 60576221