

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15621

研究課題名(和文)ペルオキシソーム代謝異常と中枢神経系障害

研究課題名(英文)Defect of peroxisome metabolism impairs development of central nervous system

研究代表者

阿部 雄一 (Abe, Yuichi)

九州大学・生体防御医学研究所・学術研究員

研究者番号：00529092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソーム形成異常症は脳中枢神経系において重度の障害を呈する。ペルオキシソーム形成異常症モデルマウスを用いた解析の結果、顕著な形態異常を示す小脳においてbrain-derived neurotrophic factor (BDNF) およびその不活性型受容体TrkB-T1の発現量増加を見出した。これら因子の発現増加が下流のシグナル伝達障害を導き、小脳プルキンエ細胞の形態異常を誘発することを明らかにした。一方、ペルオキシソーム欠損グリア細胞でもBDNFの発現増加が認められ、その原因は細胞質局在性カタラーゼの作用による細胞質の還元状態であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、ペルオキシソーム形成異常症の病態発症機構に関して、分子レベルでの解明には至っていなかった。そんななか、我々の研究成果はBDNF-TrkBシグナル伝達系の異常が小脳形態異常の原因の一つであることを示し、世界で初めてペルオキシソーム形成異常症の病態発症機構を分子レベルで解明することに漕ぎ着けた。さらに、ペルオキシソーム欠損により誘発される細胞質還元化が及ぼす細胞機能への影響についても世界で初めての発見である。これらの成果は根本的な治療法が確立されていないペルオキシソーム形成異常症の治療法開発に繋がる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Peroxisome is a subcellular organelle essential for various metabolic reactions. Peroxisome biogenesis disorders (PBDs) manifest as neurological deficits in the brain, including abnormal cerebellum development. However, the mechanisms underlying pathogenesis remain enigmatic. In this research, we showed that ERK and AKT signaling are attenuated in peroxisome-deficient mouse by an elevated level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) together with the enhanced expression of TrkB-T1, a dominant-negative isoform of the BDNF receptor. This result suggests that dysregulation of the BDNF-TrkB pathway, an essential signaling for cerebellar morphogenesis, gives rise to the pathogenesis of cerebellum in PBDs. In addition, we revealed that the elevation of BDNF was induced by the cytosolic reductive state caused by the mislocalized catalase in peroxisome-deficient glia cells. Thus, our findings demonstrate for the first time the pathogenesis of PBDs.

研究分野：生化学

キーワード：ペルオキシソーム ペルオキシソーム形成異常症 小脳 プルキンエ細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは酵母から哺乳動物まで広く存在する一重膜構造からなるオルガネラであり、極長鎖脂肪酸(炭素数 22 以上)の酸化、エーテル型リン脂質や胆汁酸の生合成、過酸化水素の分解など様々な代謝反応が行われている。ペルオキシソームの形成は peroxin (PEX) と呼ばれるタンパク質群によって行われている。PEX 遺伝子欠損は上記代謝反応をはじめ多岐にわたるペルオキシソーム代謝反応の酵素タンパク質の輸送障害を引き起こし、Zellweger 症候群 (ZS) をはじめとするペルオキシソーム形成異常症を発症する。ZS は極度の筋緊張低下などの症状を呈し、生後数週間から 1 年以内で死に至る重篤な疾患である。様々な器官において重度の障害が観察され、特に脳中枢神経系では、神経細胞の遊走障害やプルキンエ細胞の樹状突起形成障害などが観察される。

ZS の臨床生化学的異常として、エーテル型リン脂質であるプラスマローゲンや多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) の減少と同時に、極長鎖脂肪酸の蓄積などが観察される。これらペルオキシソーム代謝異常が高次細胞機能に影響を与え病態発症を導くと考えられている。したがって、ペルオキシソーム形成不全症の病態発症機構解明には異常代謝産物と細胞機能障害との関連性の解明は必須である。

一方、ZS の病態発症の分子機構解明に向け、当研究室を含めた数グループにより ZS モデルマウスの PEX ノックアウトマウスが作製された。PEX ノックアウトマウスは中枢神経系に ZS と同様の病態を示すが、現在までに病態発症の分子機構解明には至っていなかった。

研究代表者は各種中枢神経系細胞におけるペルオキシソーム形成障害による高次細胞機能への影響を明らかにするために、アストロサイト様グリア培養細胞とラット胎児海馬神経初代培養細胞を共培養する *in vitro* の軸索形成実験系を確立した。その結果、ペルオキシソーム形成障害を示すグリア細胞との共培養が神経細胞の軸索形成異常を導くことを見出した。詳細な解析の結果、ペルオキシソーム欠損性グリア細胞において brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の発現量および分泌量の増加が認められ、これが神経軸索形成異常の原因であることを見出した。しかしながら、ペルオキシソーム欠損による BDNF 発現量増加が ZS における病態発症に関与するか明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、ペルオキシソーム形成不全症モデルマウスを用いて、中枢神経系障害の詳細な解析を行うとともに、ペルオキシソーム代謝産物との関連性を明らかにし、病態発症の分子メカニズム解明を目的とした。特に以下の 2 課題を設定した。

- (1) ペルオキシソーム形成異常症モデルマウス脳における BDNF・TrkB の分子動態解明
- (2) BDNF 発現増加を導くペルオキシソーム異常代謝産物の同定

3. 研究の方法

- (1) ペルオキシソーム形成異常症モデルマウス脳における BDNF・TrkB の分子動態解明

ペルオキシソーム形成異常症モデルマウスである *Pex14* 欠損マウスの脳組織の形態を観察した。小脳における BDNF および受容体タンパク質 TrkB の発現量解析を行った。また、BDNF-TrkB シグナル伝達経路の活性を解析した。*Pex14* 欠損マウス小脳由来神経初代培養細胞に対して BDNF を作用させ、神経細胞の形態観察を行った。

- (2) BDNF 発現増加を導くペルオキシソーム異常代謝産物の同定

ペルオキシソーム欠損性グリア細胞を用いて、BDNF の発現増加の分子機構解明を試みた。プラスマローゲンや極長鎖脂肪酸、細胞質局在カタラーゼ活性の BDNF 発現への影響を解析した。

4. 研究成果

- (1) ペルオキシソーム形成異常症モデルマウス脳における BDNF・TrkB の分子動態解明

所属研究室においてペルオキシソーム欠損症の病態発症機構解明を目的として、ペルオキシソーム形成因子 *Pex14p* の C 末端領域を欠失した *Pex14* 欠損マウスを確立している。このマウスは成長遅滞とともに中枢神経系障害を呈し、生後 2 週間以内に死亡することを明らかにした。中枢神経系において、その障害がとくに顕著な小脳では、顆粒細胞遊走障害やプルキンエ細胞の樹状突起発達異常などが観察された。ペルオキシソーム欠損による小脳形成障害機構の解明に向けて、小脳の形態形成に関わる因子に関して詳細に解析したところ、プルキンエ細胞周辺において brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の発現量が増加していることを見出した。また、小脳神経初代培養実験により、高濃度の BDNF が *Pex14* 欠損マウスプルキンエ細胞の形態異常を誘発することが観察された。そこで、小脳において BDNF 受容体である TrkB を検証したところ、*Pex14* 欠損マウスにおいて不活性化型受容体 TrkB-T1 が上昇していることを見出した。TrkB-T1 は活性化型受容体 TrkB-TK+ のリン酸化活性に対して阻害的に作用することが知られている。そこで、*Pex14* 欠損マウス小脳における BDNF-TrkB シグナル伝達経路を解析したところ、TrkB-TK+ の自己リン酸化および下流の ERK・AKT のリン酸化の低下が観察された。以上のことから、BDNF-TrkB を介した細胞シグナル応答の障害がペルオキシソーム形成異常症における

小脳形態異常の主たる原因であることを発見した(図)。すなわち、この発見は世界で初めての
本症の病態発症機構の解明として高く評価されている。

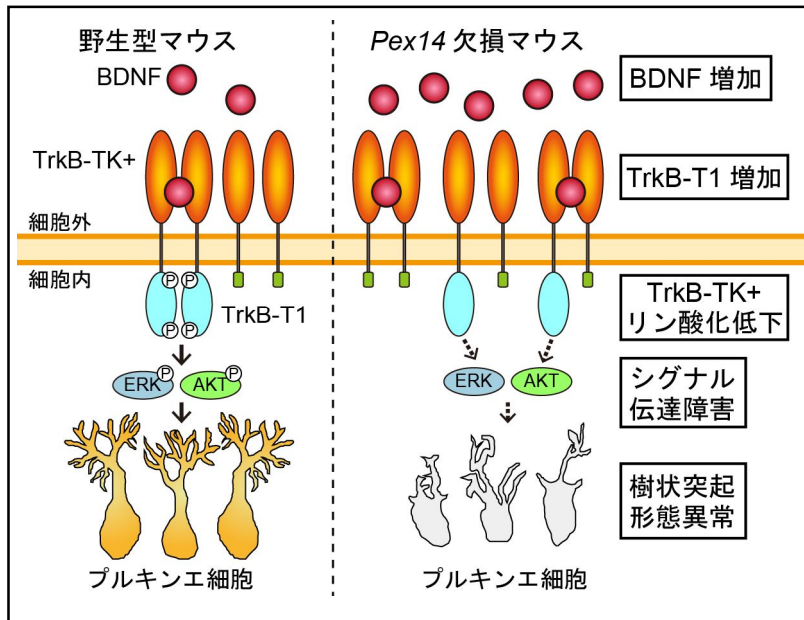


図 Pex14 欠損マウスにおける小脳プルキンエ細胞の形態形成障害。野生型マウスにおいては BDNF が TrkB-TK+ に結合し自己リン酸化(Ⓟ)を誘導し、下流の ERK および AKT のシグナル伝達系の活性化を介してプルキンエ細胞の樹状突起形成を導く(左)。Pex14 欠損マウスでは BDNF および TrkB-T1 が増加しており、下流のシグナル伝達系を不活性化させ形態形成異常を起たす(右)。

(2) BDNF 発現増加を導くペルオキシソーム異常代謝産物の同定

ペルオキシソーム欠損性グリア培養細胞において、BDNF 発現量の増加を見出している。ペルオキシソーム代謝異常が原因と考えられるため、各代謝産物との関連性を検討した。まず、ペルオキシソーム欠損細胞に対して、プラスマローゲン前駆体である Hexadecylglycerol (HG) を添加し、プラスマローゲンをコントロール細胞程度まで回復させたところ、BDNF の発現には影響が観察されなかった。ペルオキシソーム酸化代謝経路の影響を検証するため、acyl-CoA 酸化酵素(AOX)に対する shRNA を安定発現する細胞を作製した。ペルオキシソーム酸化活性低下により、極長鎖脂肪酸が蓄積していたものの、BDNF の発現量に差は認められなかった。次いで、ペルオキシソーム欠損細胞において細胞質において活性を保持しているカタラーゼの影響を解析した。カタラーゼの阻害剤である 3-amino-1,2,4-triazole を作用させたところ、ペルオキシソーム欠損細胞において増加していた BDNF 発現量が低下した。細胞質局在カタラーゼは細胞質の還元化状態を導くことが示唆されていたことから、細胞質を還元化状態にすると BDNF の発現が増加した。更なる解析の結果、細胞質中の還元型 NADH の増加が BDNF の発現増加を導いていることが示唆された(論文投稿準備中)。細胞質における NADH 増加がなぜ BDNF の転写活性を増大させるのか、その分子機構は明らかとなっておらず、その解明はペルオキシソーム形成異常症における病態発症機構の解明に繋がるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- (1) Imoto, Y., Abe, Y., Okumoto, K., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and Fujiki, Y.: Dynamics of nucleoside diphosphate kinase protein DYNAMO2 correlates with global GTP level during cell cycle of *Cyanidioschyzon merolae*. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* 95: 75-85 (2019). 査読有
DOI: 10.2183/pjab.95.007
- (2) Tanaka, A.J., Okumoto, K., Tamura, S., Abe, Y., Hirsch, Y., Deng, L., Ekstein, J., Chung, W.K., and Fujiki, Y.: A newly identified mutation in the *PEX26* gene is associated with a milder form of Zellweger spectrum disorder. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* 5: a003483 (2019) (equally contributed). 査読有
DOI: 10.1101/mcs.a003483
- (3) Abe, Y., Honsho, M., Itoh, R., Kawaguchi, R., Fujitani, M., Fujiwara, K., Hirokane, M., Matsuzaki, T., Nakayama, K., Ohgi, R., Marutani, T., Nakayama, K.I., Yamashita, T., and Fujiki, Y.: Peroxisome biogenesis deficiency attenuates the BDNF-TrkB pathway-mediated development of cerebellum. *Life Sci. Alliance* 1: e201800062 (2018). 査読有
DOI: 10.26508/lsa.201800062
- (4) Imoto, Y., Abe, Y., Honsho, M., Okumoto, K., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and Fujiki, Y.: Onsite GTP fuelling via DYNAMO1 drives division of mitochondria and peroxisomes. *Nat. Commun.* 9: 4634 (2018). 査読有

DOI: 10.1038/s41467-018-07009-z

- (5) Hossain, Md. S., Abe, Y., Ali, F., Youssef, M., Honsho, M., Fujiki, Y., and Katafuchi, T.: Reduction of ether-type glycerophospholipids, plasmalogens, by NF- κ B signal leading to microglial activation. *J. Neurosci.* 37: 4074-4092 (2017). 査読有
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3941-15.2017
- (6) Honsho, M., Abe, Y., and Fujiki, Y.: Plasmalogen synthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. *Sci. Rep.* 7, 43936 (2017). 査読有
DOI: 10.1038/srep43936
- (7) Imoto, Y., Abe, Y., Okumoto, K., Honsho, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and Fujiki, Y.: Defining dynamin-based ring organizing center on the peroxisome-dividing machinery isolated from *Cyanidioschyzon merolae*. *J. Cell Sci.* 130: 853-867 (2017). 査読有
DOI: 10.1242/jcs.199182
- (8) Yagita, Y., Shinohara, K., Abe, Y., Nakagawa, K., Al-Owain, M., Alkuraya, F. S, and Fujiki, Y.: Deficiency of a retinal dystrophy protein, acyl-CoA binding domain-containing 5 (ACBD5), impairs peroxisomal α -oxidation of very-long-chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 292: 691-705 (2017). 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M116.760090

〔学会発表〕(計 5件)

- (1) Yuichi Abe, Masanori Honsho, Ryota Itoh, Ryoko Kawaguchi, Masashi Fujitani, Kazushirou Fujiwara, Masaaki Hirokane, Takashi Matsuzaki, Keiko Nakayama, Ryohei Ohgi, Toshihiro Marutani, Keiichi I. Nakayama, Toshihide Yamashita, and Yukio Fujiki: Pathological mechanism of peroxisome biogenesis disorders. EMBO Workshop “Current advances in protein translocation across membranes” (2019). 3/23-27
- (2) Yukio Fujiki, Yuuta Imoto, Yuichi Abe, Masanori Honsho, Kanji Okumoto, Mio Ohnuma, Haruko Kuroiwa, Tsuneyoshi Kuroiwa: Local GTP fueling via nucleoside diphosphate kinase like protein DYNAMO1 drives division of peroxisome and mitochondrion. ASCB/EMBO 2018 Meeting (2018). 12/8-12
- (3) 阿部雄一、本庄雅則、藤木幸夫: *Pex14* 欠損マウスにおける小脳形態異常の分子機構. 平成 30 年度日本生化学会九州支部例会 (2018). 6/30
- (4) 阿部雄一、本庄雅則、大城遼平、藤木幸夫: *PEX14* 障害マウスにおける小脳形態異常. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017). 12/6-9
- (5) 本庄雅則、阿部雄一、藤木幸夫: エーテルリン脂質プラスマローゲンの生合成を制御するセンシング機構. 第 59 回日本脂質生化学会 (2017). 6/15-16

〔その他〕

ホームページ等: 九州大学プレスリリース「世界初、ペルオキシソーム形成異常症の発症メカニズムを解明- 治療法開発にも期待 -」

<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/302>

6. 研究組織

(1)研究分担者 無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 藤木 幸夫、本庄 雅則、山下 俊英、大城 遼平

ローマ字氏名: Fujiki Yukio, Honsho Masanori, Yamashita Toshihide, Ohgi Ryohei.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。