

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14835

研究課題名(和文)脂質代謝の破綻による加齢性神経変性の分子基盤解明

研究課題名(英文) Understanding the Molecular Mechanisms of Lipid Metabolism Disruption-induced Age-Related Neurodegeneration

研究代表者

新田 陽平 (Nitta, Yohei)

新潟大学・脳研究所・特任助教

研究者番号：30800429

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)：脂質代謝異常によって年齢依存的に神経細胞が軸索先端から変性する分子機構の解明を試みた。時期特異的にリン脂質の代謝異常を起こす実験によって、神経が分化直後に脂質代謝の異常が起きるとその後の伸長・投射までは正常に行われるものの神経細胞の形態を維持することが出来ずに軸索末端から変性が始まることを見出した。そして、遺伝学的解析によって、この現象はホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸(PI(4,5)P2)の減少が原因であることを突き止めた。PI(4,5)P2の代謝酵素であるPI3K及びPLCは関与していないため、未知の分子機構がこの現象を制御している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、分化直後の神経細胞が頑健性を獲得するのにリン脂質の代謝が必須なことが明らかとなった。この現象は細胞膜に局在するリン脂質の1つであるPI(4,5)P2が関与している。興味深いことに神経細胞の発生が完了した後にPI(4,5)P2を減少させても変性が観察されなかったことから、PI(4,5)P2依存的かつ時期特異的な神経細胞の頑健性獲得メカニズムの存在を強く示唆している。神経変性疾患においても、神経細胞のリン脂質の組成が異常になることが知られており、本研究によって提供される知見によって神経細胞変性の抑制が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have attempted to elucidate the molecular mechanism by which neurons degenerate from axon terminals in an age-dependent manner caused by disorder of lipid metabolism. I found that the neurodegeneration is triggered by the induction of disturbances in phospholipid metabolism immediately following the differentiation of neurons. Interestingly, the onset of neurodegeneration is not immediate; elongation and projection are normal. It is possible that the disturbance of the phospholipid metabolism affects the morphological maintenance mechanism of the neuron. By genetic analysis, we identified that this degeneration was caused by a decrease in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI (4,5) P2). PI3K and PLC, the major metabolic enzymes of PI (4,5) P2, are not involved, suggesting that an unknown molecular mechanism may control this degeneration.

研究分野：神経科学

キーワード：ショウジョウバエ 脂質代謝 神経変性

1. 研究開始当初の背景

脂質は生体膜の構成成分であるだけでなく、生体内において脂質メディエーターや二次メッセンジャーとして細胞の増殖や分裂、極性等、多くの生命現象に関与している。その一方、神経系の形成にも重要な役割を果たしている事が報告されており、神経幹細胞を休止状態から起こして増殖を促進し、ショウジョウバエではシナプス成長や樹状突起の形成に関与する等多種多様な機能を有している。近年では脂質と神経変性疾患との関連性も報告されてきており、正常な脂質代謝の維持の重要性に対する認識が更に高まってきている。しかし、脂質代謝の恒常性が崩壊した時に、細胞内でどのような分子機構に異常が起きて神経変性が発症してしまうのか、未だ解明されていない。以前の自身の研究で、ショウジョウバエの嗅覚記憶中枢であるキノコ体特異的に CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) 合成酵素である CdsA を抑制すると、神経細胞が加齢性の神経変性を起こす事を見出した(図 1)。しかし、CdsA のノックダウンがどのような分子機構で加齢性の神経変性を引き起こすのか、その分子機構は未知であった。

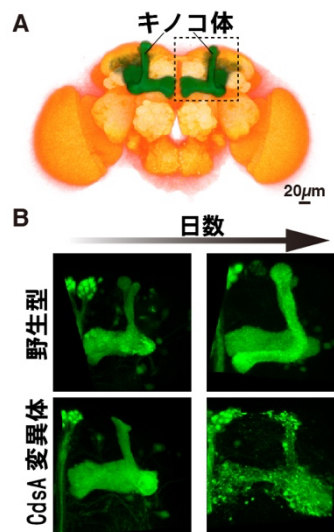


図 1: (A) ショウジョウバエ成虫脳のキノコ体 (点線部)。 (B) CdsA 変異体では日数経過に従ってキノコ体軸索の断片化が進行する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂質代謝で重要な役割を果たす CdsA を手掛かりとして、脂質代謝の破綻による加齢性神経変性の分子病態機序を解明する事である。CdsA はヒトの CDS1 及び CDS2 のホモログであり、ホスファチジン酸 (PA) から CDP-DAG を合成する (図 2)。CdsA によって合成された CDP-DAG はホスファチジルグリセロール (PG) またはホスファチジルイノシトール (PI) に変換される (図 2)。PI はホスファチジルイノシトール四リン酸 (PI4P) などを通じて、ホスファチジルイノシトール二リン酸 (PIP2) やホスファチジルイノシトール三リン酸 (PIP3) に変換され、細胞内シグナルとして機能する。CdsA 変異体ではこれら代謝産物の内、リゾホスファチジン酸 (LPA) を含む主に 4 種のリン脂質 (PA, LPA, PI, PG) の構成比率が有意に変化する事が報告されている。その為、これら 4 種のリン脂質の代謝が破綻する事によってキノコ体神経が加齢性の神経変性を受けている可能性を示唆しており、神経変性を誘導する分子機序の解明の手掛かりとなりうる。

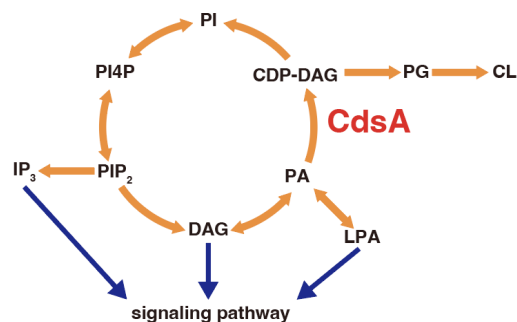


図 2: CdsA が関与する脂質代謝経路。CdsA はホスファチジン酸 (PA) から CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) を合成している。

3. 研究の方法

CdsA 変異体において神経変性を引き起こす分子機構を解明する為に、異常が生じているシグナル伝達経路を同定する。その為に、CdsA 変異体において変動する、4 種のリン脂質が関与する細胞内シグナル経路 (PI3K/Akt シグナル伝達系、PKC シグナル経路、Arf1 ファミリー等) を対象として網羅的に RNAi スクリーニングを行い、CdsA 変異体と同様の加齢性神経変性が引き起こされるか検証する。また、既知の神経変性の実行経路 (アポトーシス、ワーラー変性、ネクローシスなど) を抑制し、どの経路によって神経変性が引き起こされているのかを検証する。これらの CdsA を起点とした下流探索、実行因子を起点とした上流探索によって、リン脂質異常による神経変性メカニズムを解明する。

その他にも、発生中及び発生後に CdsA の発現を抑制し、CdsA が神経細胞の発生及び発生後の維持のどちらの段階で機能しているのかを明らかにする。

4. 研究成果

まず、CdsA の機能欠失による神経変性が発生期の異常に由来するのか正常発生後の維持機構の破綻に由来するのかを区別するために、Gal4 の機能を阻害する Gal180 の温度感受性変異体である Gal180^{ts} を用いて時期特異的に CdsA をノックダウンした。その結果、正常発生後に CdsA をノックダウンしても変性が生じず、発生中の特定の時期 (蛹化後 24 時間前後) に CdsA をノックダウンするとキノコ体神経細胞のサブタイプの 1 つである α' / β' ニューロン選択的に変性

が生じることが明らかとなった(図3)。この時期は、キノコ体の神経幹細胞が α' / β' 細胞へと分化しはじめる時期の直後である。これらの結果は、分化直後の期間にリン脂質代謝が破綻すると時間差で軸索の断片化が始まることを意味している。一方で、特定の時期を過ぎてからCdsAをノックダウンしても断片化が観察されないことから、このリン脂質依存的な未知の機構が分化直後のみ存在し、CdsAノックダウンによってこの機構が破綻すると断片化が生じる可能性が強く示唆される。

次に、CDP-DAG経路における各因子の合成酵素を標的にRNAiスクリーニングを行い、CDP-DAGの下流を探索した。その結果、CDP-DAGからPIを合成するPis、及びPI4PからPIP2を合成するPI4P5Kを抑制した時にCdsAをノックダウンしたときと同様の軸索の断片化が確認された(図4A)。一方で、CDP-DAGからPGを合成する酵素、PGからカルジオリピンを合成する酵素を抑制しても表現型は得られなかった。また、PIP2を切断し、イノシトールトリスリン酸(IP3)とDAGを産生するnorpAを抑制しても断片化が確認されない事、CdsAとnorpAを同時に抑制すると断片化が抑制される事から、PIP2の減少が断片化を引き起こす可能性を強く示唆している(図4B)。

PIP2が関与する既知の分子経路がこの断片化に関与しているのかを明らかにするために、PIP2をPIP3へと変換するPI3KやPIP2をIP3とDAGに変換するnorpA以外のホスホリパーゼCの抑制を試みた。しかし、これらの遺伝学的操作を行ってもCdsAノックダウン同様の軸索断片化の表現型が観察されなかったため、PIP2が関与する新規の経路が関与する可能性が示唆された。そのため、PIP2と結合することが報告されている258遺伝子を対象としたRNAiスクリーニングを行い、同様の表現型を示す遺伝子の探索を行った。その結果、8遺伝子の候補を得ることが出来た。

次に、既知の神経変性に関係する経路を抑制し、断片化の実行遺伝子の同定を試みた。本研究では、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼを抑制するp35やワーラー変性を抑制するWldsの発現、ネクローシスの実行因子であるカルパインのノックダウン、オートファジー関連因子のノックダウンを試みた。しかし、どの遺伝学的操作によっても、CdsAノックダウンによる軸索断片化を抑制することが出来なかった。また、神経変性の前にはミトコンドリアの局在異常が観察されることが知られているが、CdsAノックダウンによるミトコンドリアの局在変化は観察されなかった。これらの結果は、全く新規の機構が軸索の断片化に関与している可能性を示唆している。

本研究開始時には、CdsAをノックダウンしても発生時には構造異常が観察されず、発生が完了してから変性が観察されることから、CdsA変異体で観察された軸索変性は神経細胞の維持機構の喪失に起因すると考えていた。しかし、時期特異的なCdsAノックダウン実験によって、発生期のリン脂質代謝の異常が時間をおいて軸索の断片化を引き起こすことが明らかとなった。更に、特定の時期以降にCdsAをノックダウンしても断片化が生じないことから、幹細胞から神経細胞へと分化した後の一定期間、リン脂質の異常に対して神経細胞が脆弱性を示す可能性が強く示唆された。逆説的に、神経細胞が分化してから一定期間経過して成熟するとリン脂質の異常に対して頑健性を示すことを意味している(図5)。分化直後の未成熟な神経細胞は非常に脆弱であることが知られており、化学物質や低酸素状態、ウイルス感染といった外的要因からのストレスに対してアポトーシスを引き起こしやすいことが報告されている。しかし、神経細胞がどのような分子機構で頑健性を獲得し、加齢によって喪失していくのか、その分子機構の全貌は未だに明らかとなっていない。本研究によって存在が示唆された頑健性機構を解き明かすことによって、神経細胞の頑健性喪失の抑制や頑健性の再獲得を人為的に行うことが可能となり、健康な神経細胞の維持が期待できる。

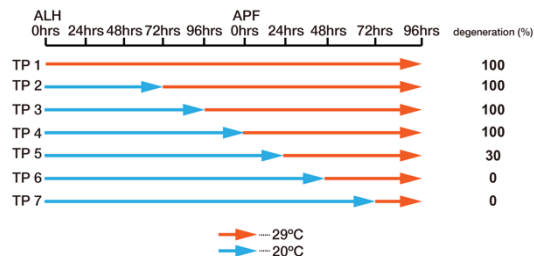


図3：時期特異的なCdsAノックダウンと変性率。APF0hrs~24hrsの間にCdsAの機能が喪失すると軸索の断片化が引き起こされる。

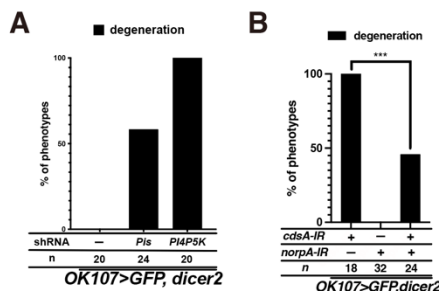


図4：(A) CDP-DAGからPIP2へと変換する経路上に存在する酵素を抑制すると同様の表現型が観察された。(B) CdsAと同時にnorpAを抑制すると変性が抑制された。

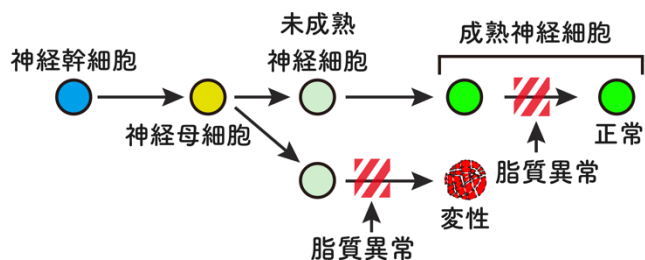


図5：本研究によって存在が示唆された脂質異常に対する頑健性機構。分化した直後の神経細胞でリン脂質異常が生じると時間を置いて軸索の断片化が引き起こされるが、成熟した神経細胞にリン脂質異常を引き起こしても断片化は引き起こされない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sakamoto M, Sasaki K, Sugie A, Nitta Y, Kimura T, Gursoy S, Cinletti T, Iai M, Sengoku T, Ogata K, Suzuki A, Okamoto N, Iwama K, Tsuchida N, Uchiyama Y, Koshimizu E, Fujita A, Hamanaka K, Miyatake S, Mizuguchi T, Taguri M, Ito S, Takahashi H, Miyake N, Matsumoto N	4. 巻 31
2. 論文標題 De novo ARF3 variants cause neurodevelopmental disorder with brain abnormality	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 69～81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddab224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nitta Yohei, Kawai Hiroki, Osaka Jiro, Hakeda-Suzuki Satoko, Nagai Yoshitaka, Doubkova Karolina, Suzuki Takashi, Tavosanis Gaia, Sugie Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 MeDUsA: A novel system for automated axon quantification to evaluate neuroaxonal degeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.10.25.465674	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Melisande Richard, Karolina Doubkova, Yohei Nitta, Hiroki Kawai, Atsushi Sugie, Gaia Tavosanis	4. 巻 -
2. 論文標題 A quantitative model of sporadic axonal degeneration in the Drosophila visual system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2115-21.2022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takechi Hiroki, Hakeda-Suzuki Satoko, Nitta Yohei, Ishiwata Yuichi, Iwanaga Riku, Sato Makoto, Sugie Atsushi, Suzuki Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Glial insulin regulates cooperative or antagonistic Golden goal/Flamingo interactions during photoreceptor axon guidance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/elife.66718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nyuzuki Hiromi, Ito Shinji, Nagasaki Keisuke, Nitta Yohei, Matsui Noriko, Saitoh Akihiko, Matsui Hideaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Degeneration of dopaminergic neurons and impaired intracellular trafficking in Atp13a2 deficient zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IBRO Reports	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibror.2020.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 新田 陽平、船山 理恵、杉江 淳、平井 克之	4. 巻 8
2. 論文標題 博士後期課程入学数と教員の研究業績の 関連性に関する探索的研究 新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程の事例分析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 新潟大学高等教育研究	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yohei Nitta, Sayaka Matsui, Yukine Kato, Yosuke Kaga, Kenkichi Sugimoto & Atsushi Sugie	4. 巻 9
2. 論文標題 Analysing the evolutionary and functional differentiation of four types of Daphnia magna cryptochrome in Drosophila circadian clock	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45410-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yohei Nitta, Atsushi Sugie	4. 巻 -
2. 論文標題 Studies of neurodegenerative diseases using Drosophila and the development of novel approaches for their analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fly	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新田陽平
2. 発表標題 MeDUsA : A novel method for quantification of degeneration using fly axons to evaluate neuroaxonal degeneration
3. 学会等名 第14回日本ショウジョウバエ研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yohei Nitta, Hiroki Kawai, Yosuke Kaga, Atsushi Sugie
2. 発表標題 Semi-automated quantitative system for neurodegeneration reveals the axonal degeneration by the Impaired PtdIns(4,5)P2 synthesis in Drosophila photoreceptor axons
3. 学会等名 Neuro2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yohei Nitta, Atsushi Sugie
2. 発表標題 CdsA, CDP-diacylglycerol synthase, protects neurons from degeneration through PI(4,5)P2-dependent mechanisms in Drosophila
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yohei Nitta, Atsushi Sugie
2. 発表標題 Impaired PtdIns(4,5)P2 synthesis in Drosophila neurons causes Calpain-dependent neurodegeneration
3. 学会等名 BRI 10th The International Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yohei Nitta, Daisuke Yamazaki, Atsushi Sugie, Makoto Hiroi, Tetsuya Tabata
2. 発表標題 DISCO Interacting Protein 2 regulates multiple aspects of the development of axonal branches in Drosophila mushroom body neurons
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yohei Nitta, Atsushi Sugie
2. 発表標題 Loss of CdsA, CDP-diacylglycerol synthetase, causes neurodegeneration in mushroom body through phosphatidylinositol pathway
3. 学会等名 JDRC13
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ショウジョウバエを利用したミジンコのクリプトクロームの進化的および機能的分化の解析 https://www.bri.niigata-u.ac.jp/result/neuroscience/001200.html</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	DZNE			