

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07832

研究課題名(和文) 初期エンドソームの機能破綻に着目した神経変性疾患発症機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the pathogenic mechanism of neurodegenerative diseases focusing on the functional disruption of early endosomes

研究代表者

大友 麻子 (Otomo, Asako)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：50535226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内に取り込まれた物質は初期エンドソームと呼ばれる膜小胞上で選別を受けて、分解経路へ輸送される分子と、再利用経路を介して細胞膜やゴルジ体に輸送される分子に振り分けられる。この初期エンドソームを中心とした物流システムの破綻は、がん、アルツハイマー病などの神経変性疾患、免疫疾患など多様な疾患の原因となっている。そこで本研究は、初期エンドソームを中心とした物流システムの異常と神経変性疾患発症との関わりを明らかにすることを目的とし、神経細胞を用いて初期エンドソームの機能破綻の一因となる低分子量Gタンパク質Rab5の活性化の亢進に関与する分子群の同定をBioID法を用いて試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた分子は、初期エンドソームと呼ばれる膜小胞上で選別を受けて、分解経路へ輸送される分子と、再利用経路を介して細胞膜やゴルジ体に輸送される分子に振り分けられる。この初期エンドソームを中心とした物流システムの破綻は、がん、アルツハイマー病(AD)などの神経変性疾患、免疫疾患など多様な疾患の原要因であるが、詳しい分子的背景は明らかにされていない。本研究を通じて、神経細胞特異的な初期エンドソーム動態の制御メカニズムの一端が解明されれば、ADやその他神経変性疾患の発症機序解明の一助となる。また、それらの知見は、複雑な細胞内膜輸送の理解や発展に寄与することが出来る。

研究成果の概要(英文)：Endocytosed molecules are sorted into membrane compartments called early endosomes (EEs). EEs act as a sorting center where endocytosed cargo molecules are selectively transported to the recycling or degradation pathway. Previous studies have suggested that Rab5 hyperactivation is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. However, it remains unclear how Rab5 hyperactivation is maintained under pathological conditions. To elucidate the molecular pathogenesis of neurodegeneration caused by EE dysfunction, we aimed to identify the interacting proteins of the activated form of Rab5 in neurons using the BioID system.

研究分野：細胞生物学

キーワード：初期エンドソーム Rab5 iPS細胞 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、初期エンドソーム (EE) は、シグナル伝達に關与する受容体から細胞に感染した細菌に至るまで様々な積み荷 (Cargo) の選択的輸送を担う細胞小器官であることが明らかにされつつある。アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病 (PD) などの患者の検体を用いた病理学的解析及びそれらのモデルマウスを用いた病態解析を通じて、EE の機能破綻と神経細胞の機能変性及び細胞死との関連が見いだされ、注目されている (Nixon et al., FASEB J. 2017, Kimura et al., Neurochem Int. 2018)。その EE の機能破綻の原因として、低分子量 G タンパク質 Rab5 の機能亢進があるとされるが、なぜ Rab5 の機能亢進が生じるのか? などの具体的な分子メカニズムは明らかにされていない。Rab5 はエンドサイトーシス及び EE の融合や成熟を促進すると同時に、細胞生存や増殖シグナルを伝達する。よって、Rab5 の過剰活性化は、初期エンドソーム以降の輸送阻害と、シグナル伝達の亢進を引き起こす。この Rab5 の過剰活性化に依存した EE の機能破綻に關与する分子群を同定することが出来れば、EE 機能破綻の分子背景を明らかにし、新たな視点から、疾患理解やそれに根差した治療法開発へ繋がると思われる。

そのために本研究では、BioID (近位依存性ビオチン標識) 法を用いて、AD 疾患モデル細胞におけるエンドソーム膜上の活性化 Rab5 相互作用分子を同定し、Rab5 の活性化亢進に關与する分子背景の解明を試みる。これまで、目的分子の相互作用分子を同定する方法として、アフィニティー精製法であるプルダウンアッセイや共免疫沈降法が広く用いられてきた。しかし、これらの方法は、結合の弱い相互作用や一時的な相互作用の検出は困難である。また、可溶化サンプルを用いるため、界面活性剤で破壊される細胞膜やエンドソーム膜上の分子同士の相互作用分子の検索には不向きである。それに対し、BioID 法は、ビオチンリガーゼ融合型の目的タンパク質を細胞に発現させ、相互作用したタンパク質をビオチン化し、標識する。そして、ビオチンをタグとして用いて、相互作用タンパク質を分離同定する。そのため、結合が弱く、相互作用後に界面活性剤の作用で乖離した分子であっても、ビオチン化されているため、アビジンカラムにて精製し、同定することが可能である。これにより、エンドソーム膜上で、Rab5 の活性化維持に關わる分子を同定することができれば、Rab5 の機能制御における新たな知見となる。それは、AD, PD などの神経変性疾患のみならず、細胞内物流システムの破綻を原因とする種々の疾患理解の一助となると考える。

2. 研究の目的

エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた物質は初期エンドソームで選別を受けて、分解経路である後期エンドソームからリソソームへ輸送される分子と、再利用経路であるリサイクリングエン

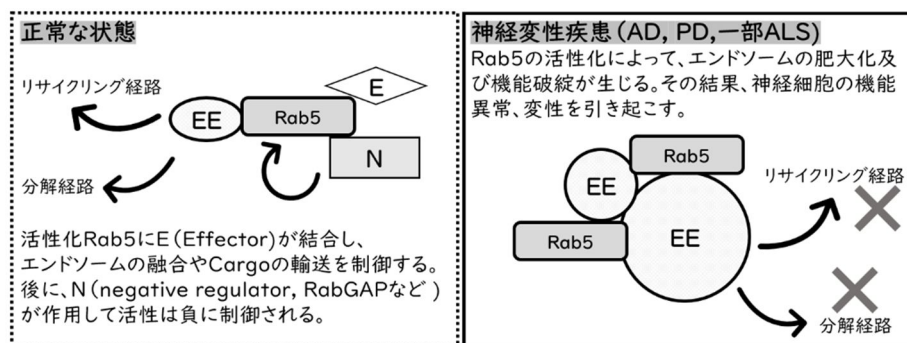


図1 初期エンドソームの機能破綻にはRab5の活性化亢進が関与する

ドソームを介して細胞膜やゴルジ体に輸送される分子に振り分けられる。この初期エンドソームを中心とした物流システムの破綻は、がん、アルツハイマー病などの神経変性疾患、免疫疾患など多様な疾患の原因となっている。従って、この細胞内物システムを分子レベルで理解することは前述の疾患を理解するためにも重要である。そこで本研究は、アルツハイマー病などの神経変性疾患でみられる初期エンドソームの機能破綻に着目し、なぜ、加齢や神経変性疾患によって初期エンドソームの機能破綻を生じるのか、そして、それがどのように神経細胞の変性を引き起こすのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

細胞内物流システムの異常に着目した研究は、国内外多くの研究者の注目を集めている。しかし、そのシステムを支える分子機構の解析は未だ十分とは言えない。現在までに、BioID 法を用いた活性化 Rab5 の結合分子を検索・同定した研究報告はなく、今回成功すれば初めての報告となることなる。Rab5 は、60 種ある Rab タンパク質の中でも長い研究の歴史を持ち、エフェクターや結合タンパク質も多数報告されている。しかし、エンドソーム膜上で相互作用することが明らかにされている分子は少ない。よって、申請研究によって見いだされる知見は、細胞内物流システムの理解を、加速・発展させるものであり、極めて独創的かつ先進的なものと位置づけられると考える。具体的な研究計画を説明する。

(1) エンドソーム機能破綻モデルの作製

EE の機能破綻モデル作製に必要な発現コンストラクト (BioID-Rab5, BioID-Rab5 活性化型 FLAG-APP, FLAG-CTF) を作製する。細胞は、HeLa 細胞、神経系由来培養細胞 NSC-34 及び iPS 細胞由来の神経細胞を用いる。これらの発現コンストラクトを用いて、Rab5 活性化型恒常的発現による、EE 機能破綻モデルに加えて、2 種類の EE 機能破綻モデルを作製を試みる。BioID-Rab5 と APP (amyloid precursor protein) もしくは APP-CTF (secretase-derived APP fragment) を発現させることによって EE を肥大化させ機能破綻させるモデル。BioID-Rab5 発現細胞に Rab5 活性化因子である ALS2 を発現させた後、3-methyladenine (3MA) などの PI3 キナーゼ阻害剤で処理し、EE の輸送阻害による機能破綻モデル。いずれの場合も、EE の過剰融合 (肥大化) が誘導されているかどうかを確認し、モデルとする。

(2) BioID 法による Rab5 相互作用分子の同定

それぞれの条件において EE の肥大化を確認した後に細胞を回収し、サンプルとする。Avidin 付加カラムを用いて、サンプルから Biotin 化タンパク質を精製する。Biotin 化タンパク質を、SDS-PAGE によって分離し、ゲルから切り出した後、質量分析によってタンパク質を同定する。また、同時に、BioID-Rab5 のみを発現させたサンプルからも、ビオチン化タンパク質を精製し、同手法によって結合タンパク質を同定し、コントロールとする。EE 破綻モデルサンプルから同定したタンパク質群からコントロール群を除いたものを、EE 肥大化関与分子とし、以降の解析を行う。

(3) 機能解析によるスクリーニング

候補分子について親株の培養細胞及び疾患モデル細胞において、Rab5 との PLA (Proximity Ligation Assay: 近接ライゲーションアッセイ) による初期エンドソームでの相互作用解析及び候補分子のノックダウンによる初期エンドソーム動態調節への影響について解析を行う。

(4) 疾患 iPS 由来モデル細胞を用いた候補分子の機能解析

同定した分子が、初期エンドソーム動態に影響を及ぼす分子であることが確認されたら、その細胞内動態を AD や ALS 患者 iPS から分化誘導した各種神経細胞 (疾患モデル細胞) を用いて精査する。それらの細胞に候補分子を一過的発現させ、EE 機能破綻が促進されるか否かを確認する。同定した分子群の機能的関連から、EE 機能破綻の生じるメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) エンドソーム機能破綻モデルの作製

HeLa 細胞を用いて、Rab5 活性化型恒常的発現による、EE 機能破綻モデルに加えて、BioID-Rab5 と APP (amyloid precursor protein) もしくは APP-CTF (secretase-derived APP fragment) を発現させることによって EE を肥大化させ機能破綻させるモデル及び BioID-Rab5 発現細胞に Rab5 活性化因子である ALS2 を発現させた後、3-methyladenine (3MA) などの PI3 キナーゼ阻害剤で処理し、EE の輸送阻害による機能破綻モデルの作製を試みた。その結果、Rab5 活性化型恒常的発現及びにおいて、EE の過剰融合 (肥大化) が誘導されていることを確認できた (Fig.1)。しかし、このモデルでは、EE の顕著な肥大化は見られなかった。よって、これ以降の実験には、Rab5 活性化型恒常的発現 (BioID-Rab5CA) もしくは、このモデルを用いた。

(2) BioID 法による Rab5 相互作用分子の同定

HeLa 細胞を用いて、EE 機能破綻モデル細胞を回収し、8MUrea, 2% TritonX-100 を含む溶液で、サンプルを可溶化した後、ソニケーション処理を行った。ソニケーション処理後に遠心分離によって可溶画分を分取し、アビジンビーズを用いたビオチン化タンパク質のアフィニティー精製に用いた。その結果、得た産物を SDS-PAGE 後に銀染色を行って解析した結果、BioID-Rab5CA の発現に依存して、特異的にビオチン化を受けるタンパク質の存在を確認した。しかし、内在性ビオチン化タンパク質や、BirA (ビオチンリガーゼ) 単独発現に依存してビオチン化を受けるタンパク質が多く存在することが判明した。次に、非特異的ビオチン化タンパク質を減らし、BioID-Rab5CA 依存的にビオチン化を受けるタンパク質を同定するために、アフィニティー精製に用いるサンプルを膜画分に絞るため、サンプルの分画を行った。EE 破綻モデル細胞を細胞質画分と膜画分、及び核画分に分離し、アフィニティー精製を行った。その結果、膜画分特異的に BioID-Rab5CA 依存的にビオチン

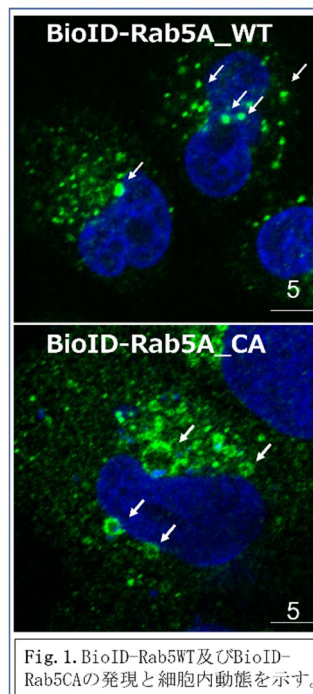


Fig. 1. BioID-Rab5WT及びBioID-Rab5CAの発現と細胞内動態を示す。

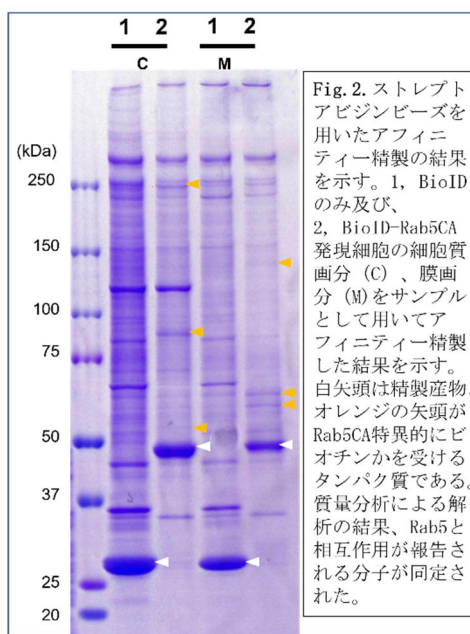


Fig. 2. ストレプトアビジンビーズを用いたアフィニティー精製の結果を示す。1, BioIDのみ及び、2, BioID-Rab5CA 発現細胞の細胞質画分 (C)、膜画分 (M) をサンプルとして用いてアフィニティー精製した結果を示す。白矢頭は精製産物、オレンジの矢頭が Rab5CA 特異的にビオチン化を受けるタンパク質である。質量分析による解析の結果、Rab5 と相互作用が報告される分子が同定された。

化を受けるタンパク質を確認することが出来た (Fig.2)。アフィニティー精製後のビオチン化タンパク質を、SDS-PAGE によって分離し、銀染色を行った後に切り出したゲルを質量分析に用い、膜画分における Rab5CA 依存的にビオチン化を受けるタンパク質同定を試みた。その結果、EEA1 などの Rab5 との相互作用を示す既知分子を同定することが出来た。次に、同じ実験系を用いて、神経細胞の EE での Rab5 活性化の維持や、継続に機能する分子を同定するために、NSC-34 細胞を用いて同様の実験を行ったが、BioID タンパク質の発現レベルが低く、アフィニティー精製が困難であった。そのため、神経細胞を材料として用いるため、iPS 細胞に BioID 活性型 Rab5 を発現するカセットをノックインしたクローンのクローニングを試みた。

iPS 細胞は、健常者由来 201B7 株を用いて、ゲノム上の AAVS1 サイトに対する gRNA を設計し、Crisper Cas9 発現系を用いた BioID, BioID-Rab5WT, BioID-Rab5CA 発現カセットのノックイン株のクローニングを行った。その結果、これらの発現カセットをノックインした細胞株の取得に成功した。現在、これらの iPS 細胞株を用いて、神経細胞へと分化誘導し、それらを材料として用いた活性化 Rab5 相互作用分子の同定を試みている。今後は、神経細胞のエンドソーム破綻モデルにおける活性化 Rab5 相互作用分子の機能について解析を継続し行う計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Otomo Asako, Ono Suzuka, Sato Kai, Mitsui Shun, Shimakura Kento, Kimura Hiroshi, Hadano Shinji	4. 巻 174
2. 論文標題 High-throughput quantitative analysis of axonal transport in cultured neurons from SOD1H46R ALS mice by using a microfluidic device	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 46 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.07.005	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 Shimakura Kento, Sato Kai, Mitsui Shun, Ono Suzuka, Otomo Asako, Hadano Shinji	4. 巻 569
2. 論文標題 The N-terminal intrinsically disordered region mediates intracellular localization and self-oligomerization of ALS2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 106 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.095	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 Otomo Asako, Ueda Mahoko Takahashi, Fujie Toshinori, Hasebe Arihiro, Suematsu Yoshitaka, Okamura Yosuke, Takeoka Shinji, Hadano Shinji, Nakagawa So	4. 巻 10
2. 論文標題 Efficient differentiation and polarization of primary cultured neurons on poly(lactic acid) scaffolds with microgrooved structures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63537-z	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 Hayashi Hideki, Wang Ting, Tanaka Masayuki, Ogiwara Sanae, Okada Chisa, Ito Masatoshi, Fukunishi Nahoko, Iida Yumi, Nakamura Ayaka, Sasaki Ayumi, Amano Shunji, Yoshida Kazuhiro, Otomo Asako, Ohtsuka Masato, Hadano Shinji	4. 巻 15
2. 論文標題 Monitoring the autophagy-endolysosomal system using monomeric Keima-fused MAP1LC3B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0234180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234180	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 Nozaki Masahisa, Otomo Asako, Mitsui Shun, Ono Suzuka, Shirakawa Ryohei, Chen YongPing, Hama Yutaro, Sato Kai, Chen XuePing, Suzuki Toshiyasu, Shang Hui-Fang, Hadano Shinji	4. 巻 22
2. 論文標題 SQSTM1L341V variant that is linked to sporadic ALS exhibits impaired association with MAP1LC3 in cultured cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eNeurologicalSci	6. 最初と最後の頁 100301 ~ 100301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ensci.2020.100301	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 該当する

1. 著者名 Ono Suzuka, Otomo Asako, Murakoshi Shuji, Mitsui Shun, Sato Kai, Fukuda Mitsunori, Hadano Shinji	4. 巻 523
2. 論文標題 ALS2, the small GTPase Rab17-interacting protein, regulates maturation and sorting of Rab17-associated endosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 908 ~ 915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.122	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 Yokoyama S., Otomo A., Hadano S., Kimura H.	4. 巻 13
2. 論文標題 An open-type microdevice to improve the quality of fluorescence labeling for axonal transport analysis in neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 034104 ~ 034104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5090968	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 Otomo A, Onodera W, Murakoshi S, Matsui K, Sato K, Mitsui S, Ono S, Fukuda M, Hadano S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Theme 3 In vitro experimental models: ALS2 along with a novel ALS2 interacting protein RAB30 regulates morphological integrity and functions of the Golgi apparatus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration	6. 最初と最後の頁 136 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21678421.2019.1646991	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Otomo A, Onodera W, Murakoshi S, Matsui K, Sato K, Mitsui S, Ono S, Fukuda M, Hadano S.
2. 発表標題 ALS2 along with a novel ALS2 interacting protein RAB30 regulates morphological integrity and functions of the Golgi apparatus
3. 学会等名 The 30th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Otomo A, Kushida T, Ishida T, Araki R, Sato K, Mitsui S, Ono S, Kimura H, Hadano S.
2. 発表標題 Microdevice-based method for quantifying endolysosomal and mitochondrial axonal transport in neurons derived from a mouse model of ALS
3. 学会等名 The 30th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大友麻子、串田隆志、石田智之、荒木良介、三井駿、小野鈴花、佐藤海、木村啓志、秦野伸二
2. 発表標題 ALSマウスモデル由来初代神経培養細胞のマイクロデバイスを用いた定量的軸索輸送解析
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東海大学 医学部医学科 基礎医学系分子生命科学 分子神経病態科学研究室（秦野 & 大友研究室） http://mls.med.u-tokai.ac.jp/hadano/ 東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター http://www.mnc.u-tokai.ac.jp http://mls.med.u-tokai.ac.jp/hadano/

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
研究 分 担 者	秦野 伸二 (Hadano Shinji) (60281375)	東海大学・医学部・教授 (32644)	

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