

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16929

研究課題名(和文)オルガネラ接点におけるVPS13Cの機能とそのドパミン神経変性への関与

研究課題名(英文)Role of VPS13C at organelle contact sites and involvement in dopaminergic neurodegeneration

研究代表者

緒方 洵(Ogata, Jun)

順天堂大学・医学部・特任助教

研究者番号：20825179

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)：パーキンソン病(PD)の原因遺伝子VPS13Cの機能を解析するため、VPS13-EGFPノックインショウジョウバエを作製し、細胞内局在を調べたところ、脂肪滴、リソソームへの蓄積が観察された。同様にPD原因遺伝子PLA2G6はリン脂質リパーゼA2をコードする。したがって脂質恒常性の破綻がPDを引き起こす原因の一つではないかと考えた。網羅的な脂質解析とRNAseqによる複合的なオミクス解析によって、幾つかの脂質分子種及び脂質関連遺伝子の変動を検出し、表現型との相関が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDの原因としてミトファジー制御や小胞輸送制御の異常が考えられる。これらの現象を引き起こす原因として脂質分子、脂質関連遺伝子にフォーカスし、いくつかの候補をリストアップできた。リスク脂質分子種と責任脂質酵素の同定は、食事指導によるPDリスク予防、脂質酵素に対するPDの分子標的薬の探索に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze the function of the Parkinson's disease (PD) causative gene, VPS13C, VPS13-EGFP knock-in Drosophila was prepared and its intracellular localization was examined. As a result, accumulation in lipid droplets and lysosomes was observed. Similarly, the PD causative gene PLA2G6 encodes phospholipid lipase A2. Therefore, we thought that the breakdown of lipid homeostasis might be one of the causes of PD. Omics analysis by comprehensive lipid analysis and RNAseq detected changes in several lipid molecular species and lipid-related genes, which partially correlated with several phenotypes.

研究分野：神経学

キーワード：VPS13C パーキンソン病 PLA2G6 脂質

1. 研究開始当初の背景

これまでに同定された 20 あまりのパーキンソン病 (PD) 原因遺伝子は、ミトコンドリアの機能制御およびエンドソーム-リソソームに関与するものに大別できる。これらオルガネラの機能異常が本疾患の運動症状の要因であるドパミン神経変性を引き起こすと考えられている。VPS13C は 23 番目のパーキンソン病 (PD) 原因遺伝子として同定された。酵母 VPS13C オルソログ (VPS13) はアダプタータンパク質と結合しオルガネラ間の接触部位で機能する。この研究背景から、VPS13C はミトコンドリアとエンドソーム-リソソームの両方の制御に関わる特異な遺伝子であることが示唆される。しかし、アダプタータンパク質のオルソログは哺乳類にはない。

近年の研究により、オルガネラ接点において直接的な物質交換が行われていることが明らかになりつつある。例えば生体膜の主要構成成分であるリン脂質は、ミトコンドリア 小胞体接点 (mitochondria-associated membrane: MAM) を介して合成される。合成過程、及び合成後のリン脂質の輸送は、輸送小胞を介さずに輸送タンパク質によって行われることが明らかとなってきた。このような接点は、各オルガネラ間 (核 小胞体、小胞体 脂質小胞、小胞体 リソソーム等) に存在している。酵母遺伝学的研究から、VPS13C はオルガネラ接点で機能すると考えられる。一方、哺乳類の脂肪細胞を用いた解析では、ミトコンドリア 脂肪滴、脂肪滴 脂肪滴、小胞体 脂肪滴、小胞体 後期エンドソーム、小胞体 リソソーム接触点に局在化することが示されている【Ramseyer *et al.*, *Mol Metab.* 2017, Kumar *et al.*, *J Cell Biol.* 2018】。しかしながら、VPS13C の局在を制御するアダプタータンパク質の全貌は明らかではない。VPS13C は、N 末端側に小胞体局在化モチーフ、C 末端側にミトコンドリアおよび後期エンドソーム局在化モチーフを有し、さらにオルガネラ間のリン脂質輸送活性が示唆されている【Kumar *et al.*, *J Cell Biol.* 2018】。これらの観察から、哺乳類 VPS13C はアダプタータンパク質の結合部位を使い分けることで、オルガネラ間のコミュニケーションを制御していることが示唆されている。この VPS13C の機能解析から、『オルガネラ間の接触は神経の機能・生存性にどのような役割を果たすのか?』という学術的問いに取り組む

2. 研究の目的

本研究では、オルガネラ間コミュニケーション異常という PD 発症の新たなメカニズムを理解するために、酵母のアダプタータンパク質の機能的オルソログを同定し、オルガネラ接点における VPS13C の機能解明を目的とする。そのために、VPS13C アダプタータンパク質は何か、アダプタータンパク質と共局在するオルガネラ接点はどこか、アダプタータンパク質との結合を担う VPS13C のドメインはどこか、オルガネラ接点の破綻が神経機能に与える影響はどのようなものか、を解明する。

3. 研究の方法

哺乳類細胞からの VPS13C 結合分子の同定と、分子遺伝学的解析に有利なショウジョウバエを組み合わせる。ハエはヒト VPS13C ホモログ VPS13 を有すること、VPS13 欠失により PD 同様ドパミン神経変性、運動機能障害の表現型を示すことから優れた PD モデルとなり得る。また、同定した結合分子のトランスジェニック・ノックアウトハエによる VPS13 欠失ハエの機能修飾実験から、VPS13C 機能制御に関与する重要な結合分子の同定が可能となる。

具体的には、FLAG タグを挿入したヒト VPS13C を HEK293 細胞に遺伝子導入し、安定発現株を樹立する。VPS13C はオルガネラ画分にあることが想定されるため、膜画分を粗分画し、抗 FLAG 抗体架橋ビーズを用いて精製する。対照コントロールとしては FLAG-LRRK2 (晩発性 PD 原因遺伝子でエンドソームに局在する) を置き、FLAG-VPS13C で特異的に濃縮されているタンパク質を質量分析法により同定する。VPS13C は生体膜上に存在し、結合分子が膜タンパク質であった場合、緩衝液、界面活性剤等に影響され通常の共免疫沈降法による検出が困難な可能性もある。そこで、BioID2-VPS13C 発現細胞株も作製し、アビジンビーズとのアフィニティー精製、結合分子を検出する。BioID2 タグは、VPS13C 近傍の分子を細胞内でビオチン標識できる。両方法によりオーバーラップするタンパク質をハエによる機能スクリーニングの候補とする。また、VPS13-EGFP ノックインショウジョウバエを作製し、細胞内局在を観察する。

次に、同定したアダプタータンパク質の欠失が神経機能に与える影響、VPS13C 欠失の表現型との類似性を評価する。

4. 研究成果

1) Flp-In System を利用して 293T FLAG-VPS13C 安定発現株を作成し、共免疫沈降法と質量分析によって、結合タンパク質を同定した(図1)。一方で BioID2 を用いた細胞内ラベルでは特異的なタンパク質は検出されなかった。次に、VPS13C - 結合タンパク質が共局在する場所を特定することを目的とし、細胞内局在を観察した。免疫染色法による解析では VPS13C の局在を検出することが出来なかったため、生細胞での観察を試みた。ショウジョウバエの VPS13C ホモログである Vps13 の ORF に EGFP を挿入した Vps13-EGFP ノックインハエを作成した。共焦点顕微鏡による Vps13-EGFP ノックインハエの観察では、脂肪滴、リソソームへの局在を確認した。次に結合タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色、結合タンパク質-mCherry 融合遺伝子の発現によるライブイメージングによる観察では、結合タンパク質は核、細胞質にディフューズに存在し、VPS13C との共局在化は見られなかった。次に、機能解析のため、SH-SY5Y 細胞で siRNA 導入による結合タンパク質のノックダウンを行った。その結果、ネガティブコントロールである scramble siRNA と比較し、VPS13C が有意に減少したことから、結合タンパク質は VPS13C の安定性に関与することが示された。この結合タンパク質を視細胞特異的に欠損させたショウジョウバエでは目が変性することが報告されている。そこでその表現型を Vps13 の過剰発現・発現抑制によりレスキューするか検証したが、表現型の修飾は起こらなかった。

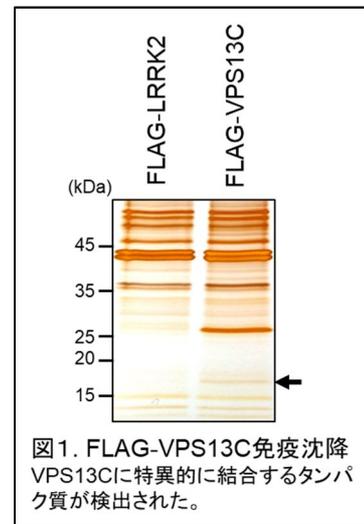


図1. FLAG-VPS13C免疫沈降 VPS13Cに特異的に結合するタンパク質が検出された。

2) Vps13-EGFP ノックインハエの解析では脂肪滴への局在化が観察された。また、VPS13C と同様に PD 原因遺伝子である PLA2G6 は、リン脂質リパーゼ A2 をコードする。したがって脂質恒常性の破綻が PD を引き起こす原因の一つではないかと考えた。脂質分子種は多彩な種類が存在し、各分子種が相互に代謝経路で繋がっている。そのため、一種類の脂質代謝酵素の変化が、多くの脂質分子種に影響を及ぼすと想定される。そこで、PD 遺伝子変異による脂質変動の全体像を俯瞰するため、VPS13C, PLA2G6 ノックアウトハエを PD モデルとして、オミックス解析にて網羅的に変動する脂質分子種および脂質関連酵素を探索し、複数の脂質代謝経路と鍵となる代謝酵素群の同定を試みた。その結果、Vps13 ノックアウトでは中性脂質及びその合成、代謝に関わる遺伝子が有意に変動した。この結果は脂肪滴に局在化する観察結果と関連し、Vps13 が中性脂質の合成や代謝、輸送等に関わることを示唆している。一方で PLA2G6 の欠損では、同様にトリアシルグリセロールなどの中性脂質、およびその合成に関わる遺伝子が減少した。また、いくつかのスフィンゴ脂質やその代謝、合成、輸送に関わる遺伝子が有意に変動していた。これらのことから、いずれかの脂質分子や脂質代謝ネットワークの変動が PD の原因になり得る可能性が示唆された。

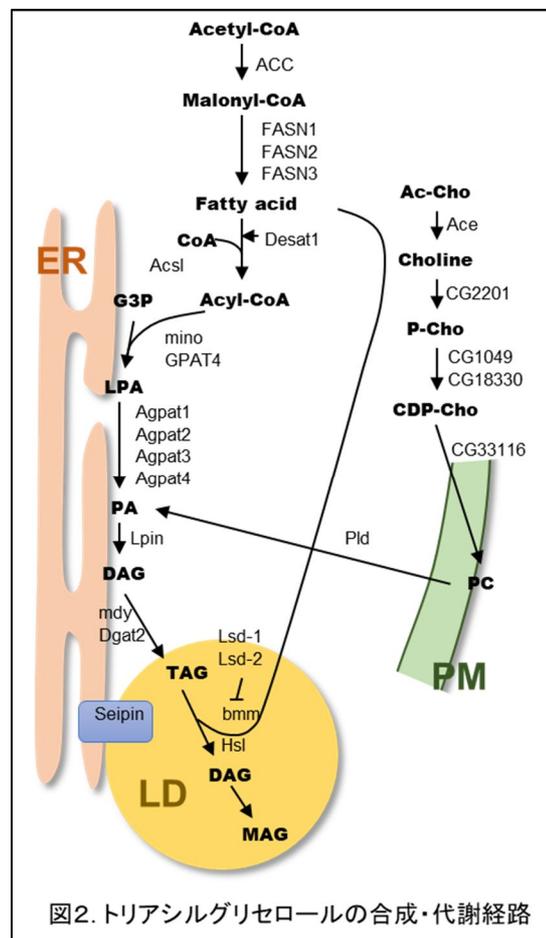


図2. トリアシルグリセロールの合成・代謝経路

図2の様に、トリアシルグリセロールの合成・代謝はオルガネラ膜上や ER-LD コンタクトサイトで行われる。加えて近年、VPS13 は疎水性のトンネルを形成し、オルガネラ間の脂質輸送を行っていることが報告されている。本申請研究によりトリアシルグリセロールの変動を検出したことから、VPS13C によるオルガネラ間の脂質輸送が障害されるとトリアシルグリセロールの恒常性に影響することが示された。今後は中性脂質の破綻がどのようにドパミン神経変性を引き起こすのか、解明する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogata Jun, Hirao Kentaro, Nishioka Kenya, Hayashida Arisa, Li Yuanzhe, Yoshino Hiroyo, Shimizu Soichiro, Hattori Nobutaka, Imai Yuzuru	4. 巻 22
2. 論文標題 A Novel LRRK2 Variant p.G2294R in the WD40 Domain Identified in Familial Parkinson's Disease Affects LRRK2 Protein Levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3708 ~ 3708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22073708	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 緒方 洵、上野 紀子、柴 福嶋 佳保里、井下 強、三浦 芳樹、今居 謙、服部 信孝
2. 発表標題 Loss of Parkinson's disease-associated VPS13C modulates altered lipid metabolism and neural phenotypes caused by loss of another Parkinson's disease-associated PLA2G6.
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 緒方 洵、上野 紀子、柴 福嶋 佳保里、井下 強、三浦 芳樹、今居 謙、服部 信孝
2. 発表標題 パーキンソン病関連分子VPS13は脂質代謝に関与する
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Jun Ogata, Daisaku Takemoto, Shotaro Shimonaka, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 13
3. 書名 Experimental Models of Parkinson's Disease, Chapter 3: -Synuclein Seeding Assay Using Cultured Cells	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------