

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07243

研究課題名(和文) 新しい遺伝子改変マウスを用いた脳神経小胞でのV-ATPaseの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of V-ATPase in synaptic and lysosomal vesicles using novel genome-editing mice

研究代表者

青戸 一司 (Aoto, Kazushi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60360476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん性脳症の原因遺伝子として、細胞内小胞(小胞体、シナプス小胞、リソソーム)の膜に発現し、プロトンポンプであるV-ATPaseの構成サブユニットの一つであるATP6V0A1の4変異を見出した。これらA512PとR741Q変異マウス及びノックアウトマウスを作製して解析を行い、リソソームのpH調節、細胞死制御、オートファジー、mTORシグナル制御などに関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかんは最も頻度が高い神経疾患の一つで、日本国内に人口の1%近くの約100万人の患者がいると推定される。本研究は、リソソームの膜タンパク質ATP6V0A1の変異が発達性およびてんかん性脳症と関与していることを世界で初めて明らかにした。本研究の成果は、小児難治性てんかんの病態解明に貢献し、ゲノム編集で作製した疾患モデルマウスは効果的な治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：From patients of epileptic encephalopathy, we found four variants of ATP6V0A1 which is one of the component subunits of V-ATPase and is a proton pump expressed on the membrane of intracellular vesicles (endoplasmic reticulum, synaptic vesicle, and lysosome). We generated two A512P and R741Q mutants and knockout mice and found that ATP6V0A1 is involved in the regulation of pH, cell death, autophagy, and mTOR signaling in brain vesicles including synaptic vesicles and lysosomes.

研究分野：発生学

キーワード：てんかん性脳症 ATP6V0A1 V-ATPase シナプス小胞 損傷リソソーム CRISPR-Cas9ゲノム編集 ヒト疾患モデルマウス オートファジー異常

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

V-ATPase は、ATP のエネルギーで働く液胞型プロトンポンプで、小胞内のプロトン（水素イオン）濃度を調節し、内腔を酸性に維持する。V-ATPase は多くのサブユニットからなる分子量 800kDa の超分子複合体で、ATPase 活性を持つ親水性の V_1 部分と、プロトンチャンネルである疎水性の V_0 部分からなる（図 1）。各サブユニットは多くのアイソフォームがあり、細胞・組織で発現が異なり、各サブユニットの組み合わせにより機能が異なることが報告されている¹⁾ (図 1)。

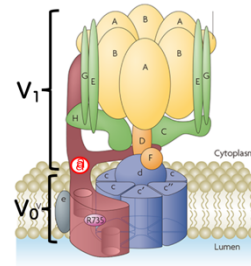


図 1: V-ATPase の構造
赤が Atp6v0a1 サブユニット

最近、神経細胞の初代培養の研究から V-ATPase は小胞内の pH 調節、前シナプスからのエクソサイトーシス、小胞輸送、小胞異常から始まる細胞死制御、オートファジー制御、mTor などのシグナル伝達への関与などの機能を担うことが報告されている²⁾。特に、培養細胞において、HA タグを付加して発現させた膜タンパク質を用いてリソソームを単離する方法³⁾ (Lyso-IP 法) によって、V-ATPase はリソソームで mTor シグナルを制御することが報告されている。

V-ATPase は、アルツハイマーなどの神経変性疾患、骨粗鬆症、がんなどのヒト疾患と関係していることが報告されている⁴⁾。最近、申請者らは、V-ATPase のサブユニットのうち、小児の難治性てんかんの患者から脳神経で発現する V_0 サブユニットの ATP6V0A1 (図 1 赤丸 a) の p. A512P 変異 (c. 1534G>C) を同定し、妊娠母獣の卵管膨大部内で受精卵の CRISPR-Cas9 ゲノム編集を行う変異マウス作製方法 (*i*-GONAD 法) で A512P のノックインマウス (*Atp6v0a1*^{A512P}) を作製し、解析を進めている。

1) Forgac, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007, 2) Pamarthy et al., Mol. Cancer. 2018, 3) Abu-Remaileh et al., Science 2017, Calacurcio and Nixon, Ageing Res. Rev. 2017.

2. 研究の目的

本研究では、*Atp6v0a1* の 3 系統のマウスを使って、マウス脳神経のリソソーム・シナプス小胞における V-ATPase の生理的役割と、小胞の形成・維持に関与する分子群を明らかにする。

3. 研究の方法

① GONAD法を用いた変異マウスの作製

既に作製済みの *Atp6v0a1*^{A512P} ホモマウスは生後 2 週齢までしか生存できない。そこで成獣の脳神経でのシナプス小胞の機能を観察するために、薬剤投与により時期特異的に遺伝子欠損誘導できるマウスとして *TetON* マウス、また、*Atp6v0a1* を発現する小胞を単離するために、C 末に 3xHA タグをつけた *Atp6v0a1*^{3xHA} マウスを GONAD 法で作製する。妊娠確定日の 0.7 日齢の卵管膨大部へ Cas9 タンパク質 (IDT から Off-target の少ない HiFi Cas9 タンパク質を購入)、guide RNA (IDT から購入)、一本鎖オリゴ (ssODNs、マクロジェンから購入) の 3 種混合溶液を注入し、NEPA21 (ネッパジーン) を用いてエレクトロポレーションを行う。Founder マウスのサンガーシーケンスを行い、目的の変異を有するマウスを選別する。次世代以降のマウスの遺伝子型判定は、領域特異的な PCR で行う。

② *Atp6v0a1*^{A512P} ホモマウスの脳神経での表現型解析

既に作出した脳変性疾患モデルマウスである *Atp6v0a1*^{A512P} マウスの表現型解析を行う。このマウスは生後 3 日目から体重、脳の減少が見られるのでまず、脳層構造異常などの形態観察のために、一般的なヘマトキシリン・エオジン染色、神経細胞の染色、ニッスル染色、脳層構造の特異抗体を用いた免疫染色を行う。また、V-ATPase の異常により、小胞の pH が上がり、小胞異常に起因した細胞死の増加が考えられる。そこで組織切片上で細胞死を検出できる Cleaved-caspase3 の抗体染色及び TUNEL 法を行う。さらに、

シグナルの変化として mTor signal の活性化・不活性化の発現を見るために、mTor シグナル分子 (mTor、phospho-mTor、S6、phospho-S6) を免疫染色、ウェスタンブロットで発現解析を行う。

③ *TetON3G-Cre; Atp6v0a1^{fllox}* (*TetON*) マウスの表現型解析

TetON マウスが性成熟する 8 週齢において Cre を発現できる Doxycyclin 薬剤の投与を行う。*Atp6v0a1^{A512P}* マウスと同様に、組織学的解析、神経細胞死、mTor シグナル、オートファジーの分子群の発現検出によって表現型解析を行う。また、変異マウスの脳神経においてシナプス小胞の機能不全が考えられるために、学内の国際マスイメージングセンターの MALD-IT-TOF 型顕微質量分析装置 (iMScope β 機、島津製作所) および MALDI-TOF/TOF 型質量分析イメージング装置 (UltraflexII, Bruker Daltonics) を使用し、神経細胞のシナプス小胞に存在する低分子の神経伝達物質 (グルタミン酸、GABA などのアミノ酸) の分布の違いを観察する。

④ Vesicle-IP による小胞単離と、プロテオーム解析による分子同定

Vesicle-IP 法を用いて、*Atp6v0a1-3xHA* を発現する小胞をマウスの脳から単離する。その後、トリプシンで消化して質量分析 (LC-MS) により小胞に含まれるタンパク質、アミノ酸 (グルタミン酸、GABA などのアミノ酸の神経伝達物質) を同定する。

② ~ ④ プロテオーム解析で同定した分子の解析

Vesicle-IP 法によって、単離同定できた候補分子の発現ベクターあるいは特異抗体を使って V-ATPase が発現する神経細胞内小胞での局在、V-ATPase との共局在を観察する。また、IP により V-ATPase に結合するかどうかを確認する。Duolink PLA (Proximity Ligation Assay: 近接ライゲーションアッセイ、MERCK) 用いて海馬の初代神経細胞培養あるいは、マウス脳の *Atp6v0a1* と標的分子の相互作用を観察する。また、プロテオーム解析によって同定した分子を *Atp6v0a1^{A512P}* マウスや、*TetON* マウスで発現が変化しているかどうか確認する。

4. 研究成果

1. 発達性およびてんかん性脳症の患者からの変異同定

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析によって、脳神経の細胞死、知的障害、発達遅滞、てんかんを示す発達性およびてんかん性脳症の 4 家系の患者で、*ATP6VOA1* の変異を同定しました (図 2)。

2 例は *ATP6VOA1* の同一の突然変異 (p. R741Q, 741 番目アミノ酸のアルギニンがグルタミンに置換) で、2 例は両アレルに変異を認めた。

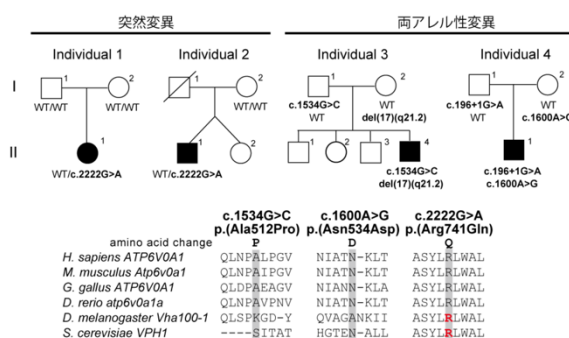


図 2: (上段) *ATP6VOA1* 遺伝子異常が見つかった 4 名の患者の家系図と変異の分離について示す。(下段) 患者で同定されたミスセンス変異が置換を起こすアミノ酸の保存性を示す。

2. ヒト疾患モデル細胞、マウスによる病態解明

ATP6VOA1 変異遺伝子を発現させた培養細胞では、プロトンポンプ機能の異常によるリソソームの酸性度の異常が観察された。さらに、R741Q 変異導入マウスは胎生致死であるのに対して、両アレル性の異常を認めた患者で同定された A512P 変異導入マウスは、生後すぐに体重減少、小脳性運動失調がみられ、2 週間以内に致死となった (図 3)。この新生児マウスの大脳皮質、海馬、小脳で

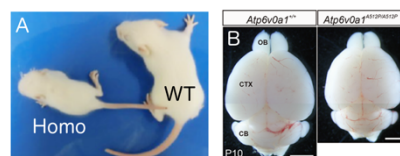


図 3: 野生型 (WT) とホモ接合型 (*Atp6v0a1^{A512P/A512P}*) マウスの外観 (A) と脳 (B)。OB, 嗅球; CTX, 大脳; CB, 小脳

は、神経細胞の減少、層構造異常が観察された。組織学的、生化学的解析では、Atp6v0a1 タンパク質の発現減少、海馬の神経シナプス結合の減少（図4左）、神経細胞の細胞死の増加、活性を持ったリソソーム酵素の減少、V-ATPase と関連し

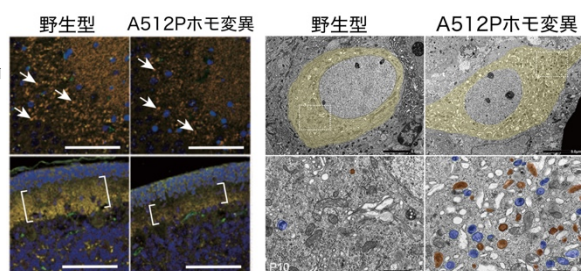


図4: (左図) A512Pホモ変異体マウスの海馬（上、矢印）と小脳（下、括弧）では神経と神経のつなぎ目であるシナプスの数が減少している。（右図） A512Pホモ変異体マウスではオートファジーの異常が見られる。青色がオートファゴソーム、茶色がリソソームを示す。

て細胞増殖に働く mTOR シグナルの減少が見られた。また、細胞内のタンパク質を

分解するのに重要なオートファジーの過程では、リソソームは、細胞内の老廃物や不要物を取り込んだオートファゴソームと癒合して分解する。電子顕微鏡による微細構造観察では、生後 10 日齢の新生児マウスの海馬神経細胞では、癒合不全によるオートファゴソームとリソソームの蓄積が観察された（図4右）。

以上の結果から、ATP6V0A1 変異を持った患者の脳神経細胞では、V-ATP の機能異常により、リソソーム内のプロトン濃度が減少し、リソソームの生理的機能が異常をきたし、mTOR シグナルの減少による細胞増殖低下、オートファゴソームとの癒合不全によるオートファジーの異常の蓄積、活性を持ったリソソーム酵素の減少が起こったと考えられた(図5)。

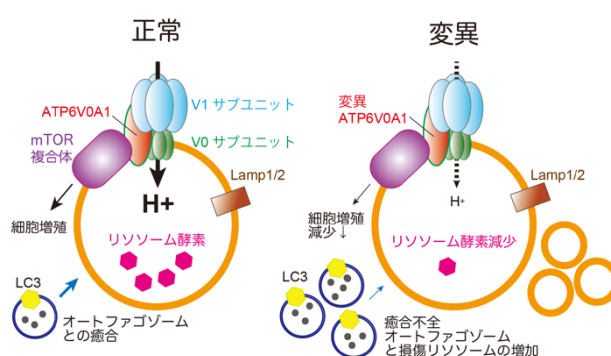


図5: ATP6V0A1の機能と疾患発症メカニズム
ATP6V0A1は、正常ではプロトン (H+) ポンプとしてリソソーム内を酸性化し、機能を調節しているが、変異では、酸性度を調節できず、リソソームに関わる機能が障害される（損傷リソソーム）。

3. エピトープタグノックインマウス作製

今回のエピトープノックインマウスの作製課題において、我々はゲノム編集法と電ポレーション法を組み合わせた *i*-GONAD 法を用いて Flag (DYKDDDDK)、2xHA、3xHA のエピトープタグを挿入する方法を確立した (Aoto, Int. J. Mol. Sci., 2022, Islam, Int. J. Mol. Sci., 2022)。

この方法を用いて Atp6v0a1 の C 末に 3xHA を挿入したノックインマウスを作製した。HA 抗体を用いた脳のサンプルのウェスタン・ブロットで Atp6v0a1-3xHA の発現を確認できた（図6）。

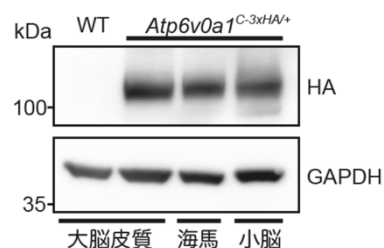


図6: 野生型 (WT)、Atp6v0a1^{C-3xHA/+}マウスのタンパク質のウェスタンブロット解析。GAPDHはコントロール。

今後、作製したマウスの解析を用いて疾患の原因に関わる分子シグナルを単離・同定して、病態解明を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11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 Aoto K, Kato M, Akita T, Nakashima M, Mutoh H, Akasaka N, Tohyama J, Nomura Y, Hoshino K, Ago Y, Tanaka R, Epstein O, Ben-Haim R, Heyman E, Miyazaki T, Belal H, Takabayashi S, Ohba C, Takata A, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Fukuda A, Matsumoto N, Saitzu H	4. 巻 12
2. 論文標題 ATP6V0A1 encoding the a1-subunit of the V0 domain of vacuolar H ⁺ -ATPases is essential for brain development in humans and mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22389-5	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 Mutoh Hiroki, Aoto Kazushi, Miyazaki Takehiro, Fukuda Atsuo, Saitzu Hiroto	4. 巻 100
2. 論文標題 Elucidation of pathological mechanism caused by human disease mutation in CaMKII	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 880 ~ 896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jnr.25013	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 -
1. 著者名 Fukumura Shinobu, Hiraide Takuya, Yamamoto Akiyo, Tsuchida Kousuke, Aoto Kazushi, Nakashima Mitsuko, Saitzu Hiroto	4. 巻 44
2. 論文標題 A novel de novo TMEM63A variant in a patient with severe hypomyelination and global developmental delay	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 178 ~ 183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2021.09.006	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 -
1. 著者名 Hiraide Takuya, Shimizu Kenji, Miyamoto Sachiko, Aoto Kazushi, Nakashima Mitsuko, Yamaguchi Tomomi, Kosho Tomoki, Ogata Tsutomu, Saitzu Hiroto	4. 巻 0
2. 論文標題 Genome sequencing and RNA sequencing of urinary cells reveal an intronic FBN1 variant causing aberrant splicing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-022-01016-1	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 -

1. 著者名 Takenoshita Manami, Takechi Masaki, Vu Hoang Tri, Furutera Toshiko, Akagawa Chisaki, Namangkalakul Worachat, Aoto Kazushi, Kume Tsutomu, Miyashin Michiyo, Iwamoto Tsutomu, Iseki Sachiko	4. 巻 250
2. 論文標題 Cell lineage and expression based inference of the roles of forkhead box transcription factor Foxc2 in craniofacial development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1125 ~ 1139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.324	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 -

1. 著者名 Miyamoto Sachiko, Kato Mitsuhiro, Sugiyama Kenji, Horiguchi Ryo, Nakashima Mitsuko, Aoto Kazushi, Mutoh Hiroki, Saitsu Hiroto	4. 巻 66
2. 論文標題 A boy with biallelic frameshift variants in TTC5 and brain malformation resembling tubulinopathies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1189 ~ 1192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00953-7	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 -

1. 著者名 Masunaga Yohei, Kagami Masayo, Kato Fumiko, Usui Takeshi, Yonemoto Takako, Mishima Kazuo, Fukami Maki, Aoto Kazushi, Saitsu Hiroto, Ogata Tsutomu	4. 巻 13
2. 論文標題 Parthenogenetic mosaicism: generation via second polar body retention and unmasking of a likely causative PER2 variant for hypersomnia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-021-01062-0	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 -

1. 著者名 Aoto K, Kato M, Akita T, Nakashima M, Mutoh H, Akasaka N, Tohyama J, Nomura Y, Hoshino K, Ago Y, Tanaka R, Epstein O, Ben-Haim R, Heyman E, Miyazaki T, Belal H, Takabayashi S, Ohba C, Takata A, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H	4. 巻 12
2. 論文標題 ATP6VOA1 encoding the a1-subunit of the V0 domain of vacuolar H ⁺ -ATPases is essential for brain development in humans and mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22389-5	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 Masunaga Yohei, Kagami Masayo, Kato Fumiko, Usui Takeshi, Yonemoto Takako, Mishima Kazuo, Fukami Maki, Aoto Kazushi, Saitsu Hiroto, Ogata Tsutomu	4. 巻 13
2. 論文標題 Parthenogenetic mosaicism: generation via second polar body retention and unmasking of a likely causative PER2 variant for hypersomnia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-021-01062-0	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 Takenoshita Manami, Takechi Masaki, Vu Hoang Tri, Furutera Toshiko, Akagawa Chisaki, Namangkalakul Worachat, Aoto Kazushi, Kume Tsutomu, Miyashin Michiyo, Iwamoto Tsutomu, Iseki Sachiko	4. 巻 2021
2. 論文標題 Cell lineage and expression based inference of the roles of forkhead box transcription factorFoxc2in craniofacial development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.324	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 Miyamoto Sachiko, Aoto Kazushi, Hiraide Takuya, Nakashima Mitsuko, Takabayashi Shuji, Saitsu Hiroto	4. 巻 60
2. 論文標題 Nanopore sequencing reveals a structural alteration of mirror image duplicated genes in a genome editing mouse line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 120 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12364	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 青戸 一司、才津 浩智	4. 巻 73
2. 論文標題 特集 リソソーム研究の新展開 . リソソームと疾患 損傷リソソームとてんかん	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 246 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201511	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青戸一司、高林秀次、武藤弘樹、才津浩智
2. 発表標題 簡便なi-GONAD法によるFlag (DYKDDDDK) タグを挿入したマウスの作製とその有用性
3. 学会等名 第128回日本解剖学会 公募シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------