

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06390

研究課題名（和文）極長鎖脂肪酸産生による神経軸索成長の制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Neural Axon Growth Regulation via Very Long-Chain Fatty Acid Synthesis

研究代表者

本多 敦子（HONDA, ATSUKO）

新潟大学・医学部・助教

研究者番号：40467072

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）：神経成長円錐に豊富な脂肪酸伸長酵素、GPSN2の欠損マウスを作製。ホモ欠損マウスは胎生致死で神経回路形成が停滞することを見出した。リポミクス解析では、GPSN2欠損により極長鎖脂肪酸を含むセラミド代謝産物、特に脂質ラフト構成要素のガングリオシドの産生が低下した。GPSN2ヘテロ欠損や発現抑制した神経細胞では、脂質ラフト形成および神経極性形成が阻害されることを明らかにした。これらは、極長鎖脂肪酸セラミドの投与で回復することから、極長鎖脂肪酸は、ガングリオシド産生などを介して脂質ラフト形成を誘導、神経軸索成長に重要な神経極性決定を制御することを解明した。Cell Reports 2023

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経軸索形成機構の解明は、脳神経回路形成や、成体の神経損傷後の神経軸索再生過程を理解する上で不可欠である。

本研究成果は、神経軸索形成機構を脂質・タンパク質の分子レベルで解明すると共に、生体内での実体が殆ど分かっていない脂質合成と脂質ラフト形成の関係から、脂質膜マイクロドメインレベルの生理機能制御機構を生き残った細胞・組織において示したもので、神経科学だけでなく細胞生物学全体において汎用性の高い生理機能を提示するものである。本研究で扱うGPSN2変異による精神遅滞だけでなく、脂質ラフトが関与する病態の解明や、神経軸索再生をはじめとする脂質ラフトを介した治療法開発など臨床医学への発展が強く期待される。

研究成果の概要（英文）：We generated knock out mice lacking the enzyme for the fatty acid elongase of VLCFAs, GPSN2 abundant in the neuronal growth cones. Homozygous knockout mice exhibited embryonic lethality and the suppression of neural circuit formation. Lipidomic analysis revealed decreased production of gangliosides, particularly a components of lipid rafts containing very long-chain fatty acid ceramide metabolites, due to GPSN2 deficiency. In neurons with heterozygous knockout or suppressed expression of GPSN2, lipid raft formation and neuronal polarity were inhibited. These findings suggests that very long-chain fatty acids induce lipid raft formation via ganglioside production, crucially regulating neuronal polarity determination and axon growth. (A Honda et al, Cell Reports 2023)

研究分野：Neuroscience

キーワード：神経軸索成長 脂質ラフト 極長鎖脂肪酸 ガングリオシド 神経成長円錐 神経極性 シグナル伝達
精神遅滞

1. 研究開始当初の背景

神経回路を作る神経軸索の成長機構の解明は、発生期の脳形成過程や神経損傷後の再生過程を理解する上で不可欠である。申請者らは、これまでに成長過程の軸索先端の特殊な構造体「成長円錐」において GPM6a 膜タンパク質が関与する「脂質ラフト」を見出し、その形成・拡大がシグナル伝達分子群の集積を引起し、神経極性決定や軸索成長に重要な役割を持つことを明らかにしている(申請者論文)。

「脂質ラフト」とよばれる脂質マイクロドメインは、コレステロールと極長鎖脂肪酸[炭素数 22 (C22) 以上の脂肪酸]をもつスフィンゴ脂質、すなわちスフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質から構成されており、極長鎖脂肪酸の産生が脂質ラフトの形成や機能に重要であることがこれまでに報告されている(1988年 Simons ら, 1998年 箱守仙一郎ら, 2009年 岩淵和久ら, 2010年 木原章雄ら)。成長円錐には小胞体構成タンパク質と、小胞体上で極長鎖脂肪酸を産生する脂肪酸伸長酵素が豊富に存在する(申請者論文)が、成長円錐における極長鎖脂肪酸産生の実態については不明である。

GPSN2/Tec は、極長鎖脂肪酸を産生する脂肪酸伸長サイクル最終段階を担う唯一の責任酵素で、ヒトにおける GPSN2 の 1 残基変異 P182L は、酵素活性の低下や非症候性精神遅滞症を引起することが報告されている(2013年 木原章雄 ら)。申請者はこれまでに超解像イメージングにより、GPSN2 を含む脂肪酸伸長酵素と成長円錐内のチューブ状ネットワーク小胞体とが共局在することを見出しており、その生理的意義を解明するため、GPSN2 のホモ欠損(ノックアウト: K0)マウスを作製した。

2. 研究の目的

神経軸索成長の制御機構を、神経成長円錐に局在する脂肪酸伸長酵素による極長鎖脂肪酸合成による「脂質マイクロドメイン(ラフト)」形成とその制御機構から解明する

これまでに申請者はプロテオミクス解析により、極長鎖脂肪酸産生に関わる脂肪酸伸長酵素が成長円錐に豊富に存在することを見出しているが、成長円錐における極長鎖脂肪酸役割は不明である。極長鎖脂肪酸産生酵素 GPSN2 は、どのような脂質代謝経路を介して、軸索成長に作用するのか? 申請者は、その作用が、自身がこれまでに報告している成長円錐において神経極性決定を制御する脂質マイクロドメイン(ラフト)の形成に大きく寄与するのではないかと仮説を立て、本研究において検証した。

3. 研究の方法

① 脂肪酸伸長酵素 GPSN2 による極長鎖脂肪酸産生の、神経成長過程における重要性の *in vivo*, *in vitro* 解析

申請者らが作製した GPSN2 K0 マウスの脳形成過程の軸索伸長や神経極性決定、神経回路形成における異常を組織・個体レベルで解析した。K0 マウスは胎生 9.5 日で胎生致死であることから、胎生 9.5 日目の K0, Ht, WT の胎仔マウスの神経回路を神経マーカー抗体 Tuj1 によるホールマウント染色で解析した。

発生過程の脳での神経軸索伸長における GPSN2 の関与を調べるため、胎生 14.5 日目の GPSN2 WT, Ht 胎仔マウス脳への *in utero* エレクトロポレーションにより GFP 発現遺伝子を導入し、胎生 17.5 日目の脳切片において大脳皮質神経細胞における軸索伸長を GFP による可視化により解析。胎生 14.5 日目における GPSN2 K0 の解析が行えないため、GPSN2 WT Ht 胎仔マウス脳へ GFP 発現遺伝子と共に GPSN2 shRNA を導入して GPSN2 ノックダウン実験をおこなった。神経細胞の軸索伸長の測定は、脳梁を通過して反対側に伸長する GFP 発現神経細胞の軸索を解析。神経極性の測定は、大脳皮質の中間帯における GFP 発現神経細胞の形態から極性決定を解析した。

GPSN2 WT, Ht 胎仔マウス脳神経細胞の *in vitro* 解析には、海馬もしくは大脳皮質の初代培養神経細胞を用いて、神経極性形成や成長円錐の形態、軸索伸長能を超解像イメージングやライブイメージングによる解析を行った。

②リピドミクス解析により、GPSN2 KO マウス胎仔における脂質代謝の変化と神経成長円錐の形質膜の脂質組成を解析

質量分析装置を用いて、胎生 9.5 日目の KO, Ht, WT の胎仔マウスのノンターゲットのリピドミクス解析を行う。結果から、GPSN2 欠損下 (KO) において、極長鎖脂肪酸が低下しているのか、どの分子種の代謝産物に影響しているのかなど代謝経路から解析した。さらに密度勾配遠心法により胎生 14.5 日目マウス胎仔脳から成長円錐画分を精製し、ノンターゲットなりピドミクス解析を行い、GPSN2 発現阻害による成長円錐の形質膜への作用を分子種レベルで解析した。

③ 超解像 および 共焦点顕微鏡によるイメージング解析と生化学的解析により、GPSN 阻害による神経成長円錐 脂質ラフトの形成・分布の変化を解析

GPSN2 阻害により形態・動態変化が観察された成長円錐における脂質ラフトの形成や分布の変化を、蛍光標識脂質ラフトマーカー (D4: コレステロール/OlyA: スフィンゴミエリン・コレステロール クラスター/CtxB:GM3 / GPM6a, Flotillin:脂質ラフトタンパク質) を用いて超解像イメージングにより解析。さらに、GPSN2 Ht の脂質ラフト画分のウェスタンブロッティングにおいて、WT との比較において変化のあった分子の成長円錐での局在変化についてもイメージングにより解析した。

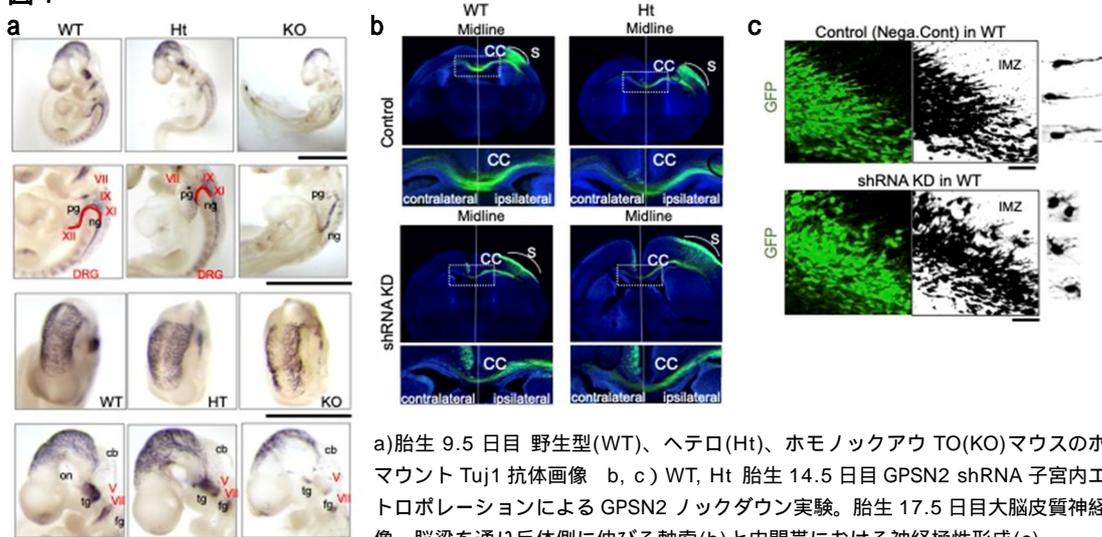
④ リピドミクス解析結果より、GPSN2 発現抑制により阻害された代謝経路の回復実験を行い、神経軸索伸長や極性形成、脂質ラフトにおける作用を解析・検証する

胎生 9.5 日目の GPSN2 KO マウス胚や、胎生 14.5 日目 GPSN2 Ht マウス胎仔脳の成長円錐膜画分において野生型に比べて産出が顕著に低下している極長鎖脂肪酸含有の代謝産物を同定し、これを胎生 14.5 日目 GPSN2 Ht マウス胎仔脳の神経細胞に培地添加を行う。添加後の x により神経軸索伸長や極性形成における回復を解析。

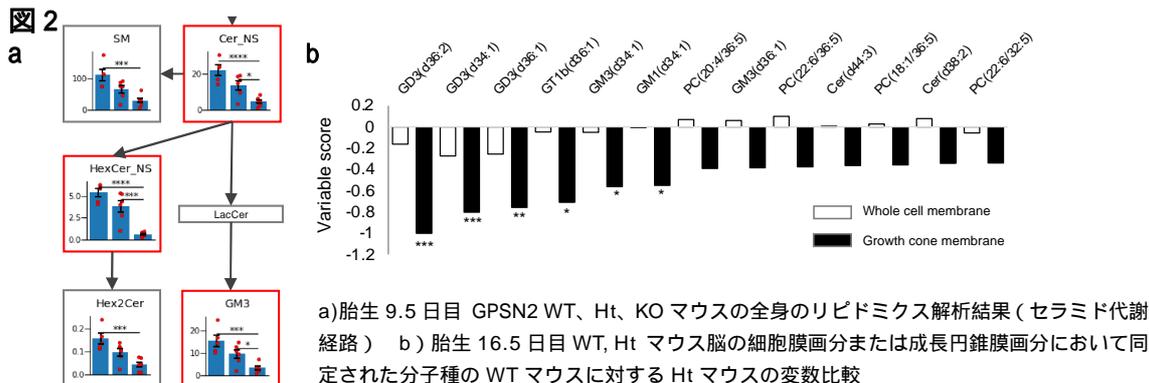
4 . 研究成果

[1] 極長鎖脂肪酸産生酵素 GPSN2 の神経軸索成長における重要性を調べるため、GPSN2 ノックアウト(KO)マウスを作製したところ、KO ホモマウスは胎生 9.5 日において胎生致死であることが分かった。胎生 9.5 日目の胎仔の神経回路形成を調べるため神経マーカーTuj1 でホールマウント染色を行ったところ(図 1a)、KO ホモマウスの中枢・末梢の神経回路形成が著しく阻害されていることが分かった。また、子宮内エレクトロポレーションにより胎生 14.5 日目の野生型(WT)及びヘテロ(Ht)マウス胎仔脳へ GPSN2 shRNA を導入し、in vivo ノックダウン(KD)実験を行なったところ(図 1b),胎生 17.5 日目の導入神経細胞(緑)の脳梁における神経軸索伸長が、WT 及び Ht において KD により遅滞することが分かった。また WT で GPSN2 を KD した神経細胞とネガティブコントロール神経細胞の発生過程を調べたところ(図 1c)、大脳皮質中間帯における神経極性決定が著しく阻害されていることが分かった。これらの結果は in vivo において GPSN2 発現が神経の極性決定や軸索伸長に必要であることを示しており、WT, Ht マウス胎仔脳の初代培養細胞においても(図 3a)、同様な結果が得られた。

図 1

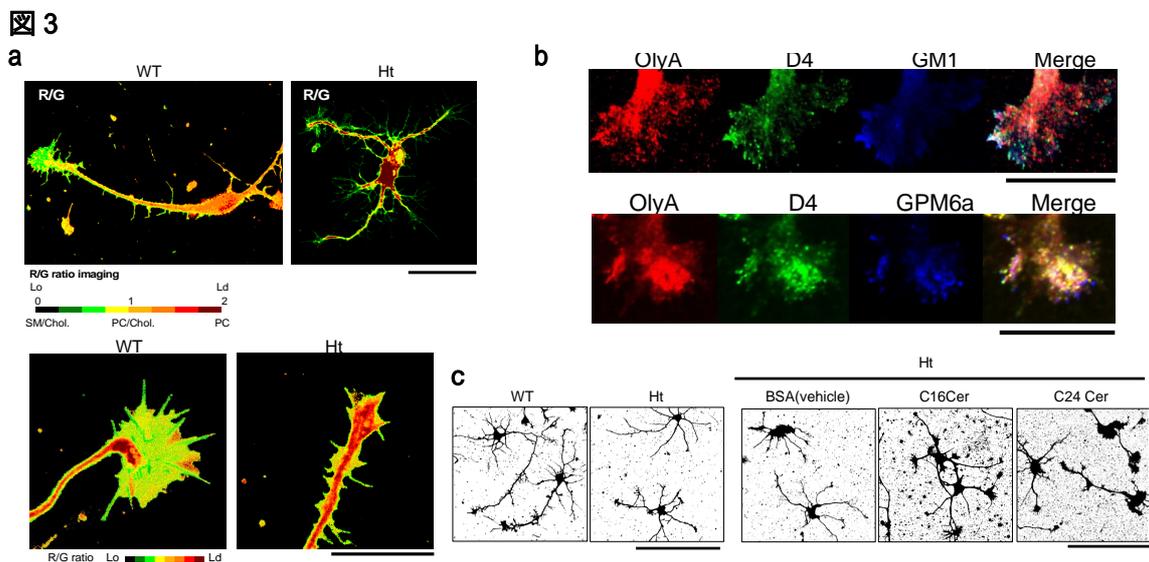


[2] GPSN2の極長鎖脂肪酸合成の脂質代謝における役割を調べるため、胎生9.5日目のGPSN2 WT, Ht, KO マウス胎仔のノンターゲットリポドミクスを行ったところ、セラミド代謝経路の代謝産物、特に極長鎖脂肪酸を含有する ganglioside や sphingolipid の KO での産生量の有意な低下が確認された (図 2a)。胎生 16.5 日の野生型と GPSN2 ヘテロマウスの神経成長円錐膜画分と細胞全体膜画分における脂質の分子種を比較したところ (図 2b)、成長円錐画分における ganglioside の分布量が顕著に減少することが分かった。これらの結果より、GPSN2 による極長鎖脂肪酸合成は成長円錐膜に存在する ganglioside や sphingolipid 脂質などの産生に参与していることが示唆された。

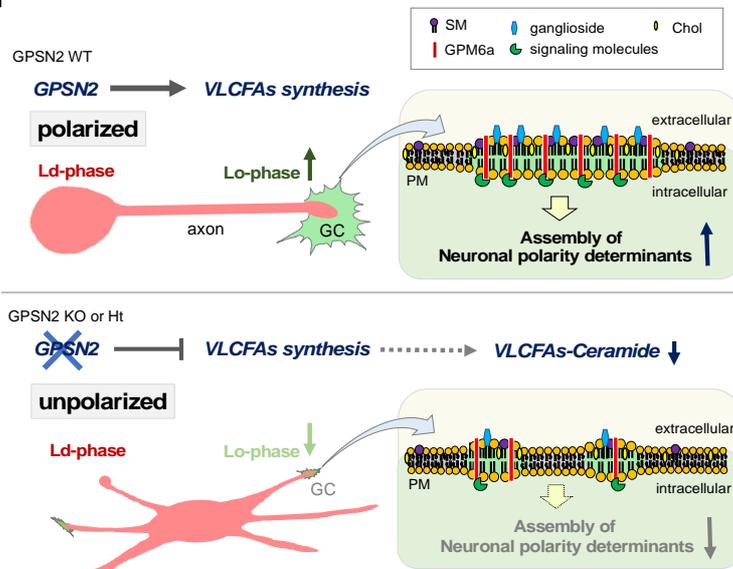


[3] 極長鎖脂肪酸の神経成長円錐の形質膜 (脂質二重膜) における重要性とその生理的作用を明らかにするため、胎生 16.5 日の GPSN2 WT, Ht マウス神経細胞における、成長円錐形質膜にの相分離について、蛍光プローブを使用して生きた神経細胞を用いて検証したところ (図 3a)、WT では成長円錐の形質膜が液体秩序相 (コレステロール、スフィンゴ脂質豊富) であるのに対し、GPSN2 Ht では成長円錐膜を構成している液体秩序相が顕著に失われていることが分かった。コレステロール、スフィンゴ脂質が豊富な液体秩序相は脂質ラフトを構成していると考えられているが、これと一致して成長円錐形質膜の染色像では (図 3b)、成長円錐にコレステロール、ganglioside、スフィンゴミエリン、脂質ラフトタンパク質 M6a が共同在していることを明らかにした。GPSN2 Ht の表現型、神経極性形成および軸索伸長の阻害とリポドミクスの結果から、GPSN2 Ht で減少した極長鎖脂肪酸含有セラミド代謝産物が、GPSN2 Ht の表現型を回復できるかどうか調べるため、C24 セラミドの細胞添加によるレスキュー実験を行った (図 3c)。その結果、成長円錐膜形成及び神経極性形成、軸索伸長が C24 セラミドの添加で回復したことから、極長鎖脂肪酸は神経細胞においてセラミド代謝産物の産生に参与しており、その代謝産物が成長円錐の形質膜に脂質ラフトを構成することが、神経極性決定や軸索伸長において重要であること (図 3d) を明らかにした。

以上の研究成果を、A. Honda et al, Cell Reports 2023 において報告した (申請者論文)



d



a) 胎生 14.5 日目 GPN2 WT、Ht マウス大脳皮質神経細胞 (上; 細胞全体、下; 成長円錐) の膜相分離イメージング 脂質液体秩序相 Lo は緑色、脂質液体無秩序相 Ld は赤で指標される b) 胎生 14.5 日目 GPN2 WT 成長円錐の染色像 OlyA: スフィンゴミエリン, D4: コレステロール、GM1: ガングリオシド、GPM6a: 脂質ラフトタンパク質 c) 胎生 14.5 日目 GPN2 WT、Ht マウス大脳皮質神経細胞の形態像 右側: Ht 神経細胞に BSA (コントロール)、C16Cer (長鎖脂肪酸セラミド)、C24Cer (極長鎖脂肪酸セラミド) を培地中に添加した d) GPN2 による極長鎖脂肪酸合成と脂質液体秩序相 L α (脂質ラフト) 形成、成長円錐形質膜と神経極性決定の関係を示した模式図

< 申請者論文 >

Journal of Biological Chemistry; vol. 277(23): p20234-42; 2002年6月

[A Honda](#), Yamada M, Saisu H, Takahashi H, Mori KJ, Abe T. Direct, Ca²⁺-dependent interaction between Tubulin and SynaptotagminI: A possible mechanism for attaching synaptic vesicles to microtubules

Neuron; vol. 41(1): p101-111; 2004 年 1 月

H Kuromi, [A Honda](#), Y Kidokoro Ca²⁺ influx through distinct routes controls exocytosis and endocytosis at Drosophila presynaptic terminals

Seikagaku; vol.78(9): p874-878; 2006年9月

[A Honda](#) Roles of Tubulin in endocytosis: their contribution to synaptic vesicle recycling

Proc Natl Acad Sci USA.; vol.106(40) 17211-17216 ; 2009年10月

[M Nozumi](#), T Togano, K T Niki, J Lu, [A Honda](#), M Taoka, T Shinkawa, H Koga, K Takeuchi, T Isobe, M Igarashi Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone

The Journal of Neuroscience, vol. 37(15): 4046- 4064; 2017年 4月

[A Honda](#), [Y Ito](#), K.T. Niki, N Matsushita, [M Nozumi](#), H Tabata, K Takeuchi, M Igarashi Extracellular Signals Induce Glycoprotein M6a Clustering of Lipid Raft and Associated Signaling Molecules

Journal of Biological Chemistry, Vol. 292(51): 20936-20946; 2017年12月

[A Honda](#), H Usui, K Sakimura, M Igarashi Ruffy3 is an adapter protein for small GTPases that activates a Rac guanine nucleotide exchange factor to control neuronal polarity

Neuroscience Research, 128:19024; 2018年 3月

[A Honda](#)*, [Y Ito](#)*, M Igarashi *equal contribution Glycoprotein M6a as a signaling transducer in neuronal lipid rafts

Molecular Brain 12(1):93; 2019 年 11 月

Y Ishikawa, M Okada, [A Honda](#), [Y Ito](#), A Tamada, N Endo, M Igarashi Phosphorylation sites of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) are involved in axon growth and regeneration

Journal of Neuroscience Methods, 339:108723; 2020 年 6 月

M Igarashi, A Kawasaki, Y Ishikawa, [A Honda](#), M Okada, S Okuda Phosphoproteomic and bioinformatics methods for analyzing signaling in vertebrate axon growth and regeneration

Frontier of Molecular Neuroscience; 2020 年 8 月

M Igarashi, [A Honda](#), A Kawasaki, M [Nozumi](#) Neuronal signaling involved in neuronal polarization and growth: Lipid rafts and phosphorylation

Cell Reports; 42(10):113195; 2023 年 10 月

[A Honda](#), M Nozumi, Y Ito, R Natsume, A Kawasaki, F Nakatsu, M Abe, H Uchino, N Matsushita, K Ikeda, M Arita, K Sakimura, M Igarashi. Very-long-chain fatty acids are Crucial to Neuronal Polarity by Providing Sphingolipids to Lipid Rafts

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 Honda Atsuko, Nozumi Motohiro, Ito Yasuyuki, Natsume Rie, Kawasaki Asami, Nakatsu Fubito, Abe Manabu, Uchino Haruki, Matsushita Natsuki, Ikeda Kazutaka, Arita Makoto, Sakimura Kenji, Igarashi Michihiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Very-long-chain fatty acids are crucial to neuronal polarity by providing sphingolipids to lipid rafts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113195 ~ 113195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.113195	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 M. Igarashi, A. Honda
2. 発表標題 GPSN2, an enzyme for fatty acid chain elongation, is involved in neuronal polarity determination
3. 学会等名 Cell Bio Meeting, The American Society for Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsuko Honda, Yasuyuki Ito, Kazutaka Ikeda, Haruki Uchino, Makoto Arita, Michihiro Igarashi
2. 発表標題 Regulation of neuronal polarity by VLCFAs through the lipid raft formation in the axonal growth cone
3. 学会等名 第96 日本生化学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本多 敦子、池田 和貴、伊藤 泰行、五十嵐 道弘
2. 発表標題 神経極性決定におけるGPSN2/Terによる極長鎖脂肪酸合成の役割
3. 学会等名 Neuro2023 日本神経科学学会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本多 敦子
2. 発表標題 生きた神経細胞における膜マイクロドメイン動態の超解像イメージング解析
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本多 敦子、野住 素広、五十嵐 道弘
2. 発表標題 神経軸索成長における極長鎖脂肪酸産生酵素GPSN2の生理的役割
3. 学会等名 第94回日本生化学大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多 敦子、内野 春樹、野住 素広、豊國 伸哉、崎村建司、有田 誠、五十嵐 道弘
2. 発表標題 極長鎖脂肪酸産生酵素GPSN2の神経軸索成長における役割
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本多 敦子
2. 発表標題 生きた神経細胞における膜マイクロドメイン動態の超解像イメージング解析
3. 学会等名 Neuro2022 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会（国際学会）
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
研究 分担者	野住 素広 (NOZUMI MOTOHIRO) (00420323)	新潟大学・医歯学系・講師 (13101)	
研究 分担者	伊藤 泰行 (ITO YASUYUKI) (70710573)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

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