

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15198

研究課題名（和文）オルガネラ間接触部位における糖脂質分解経路依存的な軸索発達メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of axonal development by the glycolipid metabolism at organelle contact sites

研究代表者

壺井 将史 (Tsuboi, Masafumi)

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：20847123

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ニューロンの形態は高い局性を示し、このユニークな形態の形成・維持には細胞膜を構成する多種多様な脂質のうち、特に糖脂質の組成割合の制御が重要だと考えられる。これまでに糖脂質合成経路が軸索発達に必要なことが明らかになっているが、糖脂質をリソソームでセラミドへと分解し小胞体へとリサイクルするサルベージ経路の重要性については分かっていない。本研究では、小胞体-リソソーム接触場に局在するPDZD8がサルベージ経路の制御に寄与するか、また軸索発達制御に必要なか検討したところ、大脳皮質交連ニューロンにおいてPDZD8が軸索分岐形成に必要なことを見出し、これは糖脂質代謝経路を介さない可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガネラは細胞内の適切なコンパートメントに局在し、細胞全体の恒常性維持のみならず細胞の局所的な機能発揮に必須の役割を果たす。近年オルガネラは単独で働くのではなく、接触面において脂質やイオン交換など重要な生体反応をしていることが明らかになっているが、その生理的役割は未解明な点が多い。本研究から、両接触場に局在するPDZD8が軸索分岐形成に寄与する可能性を示し、オルガネラ接触場の新たな機能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Neurons exhibit a highly polarized structure, and the development and maintenance of this unique morphology are believed to rely on the regulation of glycolipids. The glycolipid synthesis pathway has been demonstrated to be crucial for axonal development. However, the significance of the salvage pathway, in which glycolipids are degraded into ceramides in lysosomes and then recycled to the endoplasmic reticulum (ER), is still not fully understood. In this study, we examined whether PDZD8, which is located at the ER-lysosome contact sites, contributes to the regulation of the salvage pathway and is necessary for axonal development. We found that PDZD8 is required for the formation of axonal branches in cortical callosal neurons through an shRNA-based knockdown study, and this requirement may not be mediated by the glycolipid metabolism pathway.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：小胞体-リソソーム接触 ニューロン 糖脂質

### 1. 研究開始当初の背景

ニューロンは高い局性を示し、その機能及び形態的な特徴から軸索、細胞体、樹状突起と高度に区画化された領域を有する。ニューロンのこのユニークな形態の形成・維持には、細胞膜を構成する多種多様な脂質組成の制御がキーとなる。脂質は大きく、リン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールの3種類に大別されるが、高融点性のスフィンゴ脂質、中でも糖脂質が特にニューロンに多く存在し、この組成割合を増やすことがニューロンの形態形成に重要だと考えられている。スフィンゴ脂質のサブグループを構成する糖脂質はセラミドを中心とする代謝経路により産生される。セラミドは小胞体において新規合成され、セラミドから糖脂質への合成はゴルジ体で行われる。また、糖修飾を受けた糖脂質をリソソームでセラミドへと分解し小胞体へとリサイクルするサルベージ経路は新規合成と共に糖脂質量の制御に重要な役割を果たす。これまで神経系の発生において、スフィンゴ脂質の新規合成経路の重要性が明らかにされており、セラミドは軸索におけるフィロポディアなどの突起形成に、またその誘導体であるラクトシルセラミドの合成は軸索伸展に重要であることが知られている (Schwarz and Futerman, 1997)。さらに、ラクトシルセラミド合成酵素 B4gal5/6 のダブルノックアウトにより軸索長が短くなり軸索分岐数が減少することも報告されている (Yoshihara et al., 2018)。しかしながら、糖脂質制御において合成経路と同等に重要であるサルベージ経路の軸索発達における重要性は全く未知である。

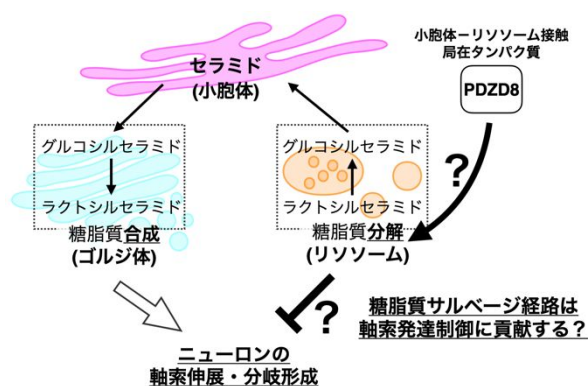


図1：本研究の目的  
小胞体-リソソーム接触場が糖脂質サルベージ経路を介して軸索分岐形成を制御するか検証する

### 2. 研究の目的

近年、脂質生合成・輸送の中心な場である小胞体は、ミトコンドリアやエンドソーム、リソソームなど様々なオルガネラと接触面を形成し、それらの接触面で金属イオンや脂質交換など重要な生体反応が起きていることが分かってきた。我々のグループでは、小胞体局在タンパク質 PDZD8 が小胞体-ミトコンドリアの物理的接触を担う繫留因子であることを見出した (Hirabayashi et al., 2017)。一方で興味深いことに、PDZD8 が小胞体-リソソーム接触面にも局在し、セラミドとの結合能を有することが報告された (Shirane et al., 2020; Gao et al., 2021)。これまでの我々の研究から、PDZD8 が大脳皮質ニューロンの軸索分岐の維持に必要であることを見出した。また、リソソームにおいて糖脂質グルコシルセラミドをセラミドへ分解する酵素 GBA1 の阻害剤 Conduritol B Epoxide (CBE) を PDZD8 をノックダウンした大脳皮質ニューロンに添加した。その結果、予備的ではあるが、PDZD8 ノックダウンによる軸索分岐数の低下が回復する結果が得られた。そこで本研究において我々は、セラミドを中心とする糖脂質代謝の新たな制御候補因子としてこの PDZD8 タンパク質に着目し、小胞体-リソソーム接触場が糖脂質サルベージ経路を介して軸索分岐形成を制御する可能性について検討した。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 大脳皮質ニューロンの糖脂質代謝経路制御における PDZD8 の必要性の検討

PDZD8<sup>fl/fl</sup> マウス大脳皮質由来の神経細胞を用いて Cre-ERT2 をレンチウイルスにより遺伝子導入し培養 3 日目から 4-OHT 処理を行い PDZD8 のノックアウトを行い 13 日間培養後、LC-MS による脂質組成解析を行なった。

#### 3-2. AID 法を用いた PDZD8 タンパク質発現の迅速分解系の検討

従来法の遺伝子のノックダウンやノックアウトではタンパク質分解までに時間を要し、脂質代謝異常に伴う補償機構の影響が無視出来ない。そこで本研究では、植物由来のタンパク質分解系であるオーキシンドェグロン法 (Auxin-inducible degron; AID 法) を用いて PDZD8 の迅速分解を行い糖脂質組成の変化を調べる。そのためにまず、大脳皮質ニューロンにおいて AID 法による PDZD8 の迅速分解が可能かを検討した。PDZD8-mAID と OSTIR1(F74G)タンパク質をレンチウイルスを用いて発現させ、オーキシン添加後の PDZD8 の発現量変化を調べた。

#### 3-3. AID 法及び Microfluid chamber を用いた PDZD8 タンパク質発現の時空間的制御の検討

グルコシルセラミドからセラミドへの分解反応はリソソームによって行われるが、非常に細長い構造をとる軸索においてリソソームはこれまでに確認されておらず、軸索発達時に糖脂質の分解が細胞体区画で起きているのか、もしくは軸索区画で局所的に起きているか分かっていない。糖脂質のサルベージ経路が軸索局所で起きているかの検証のために、Microfluid chamber を

用いたニューロンの局性培養系において、軸索区画特異的にオーキシンを添加することで PDZD8 を軸索区画特異的に分解することが可能か検討した。

3-4 . PDZD8 が軸索分岐形成の抑制に必要なか、もしくは軸索分岐の除去に必要なか明らかにする軸索の発達段階において、ニューロンは軸索分岐のスクラップアンドビルドを繰り返す。軸索分岐形成とともに分岐の除去も、適切なターゲットと回路形成する上で非常に重要である。これまでに、生後 21 日の大脳皮質交連ニューロンにおいて PDZD8 のノックダウンにより軸索分岐数が低下することを見出した。大脳皮質交連ニューロンの軸索分岐は生後 10 日程度までは主に形成が起き、その後分岐除去が起き始める。そのため、ノックダウンの効果として軸索分岐形成が抑制された、もしくは軸索分岐の除去が亢進した 2 つの可能性がある。そこで、これを区別し、PDZD8 の軸索分岐形成における作用点を明らかにする。生後 10 日程度のマウスの大脳で解析を行い、PDZD8 ノックダウンによる軸索分岐低下が軸索形成段階に影響を与えた結果が明らかにする。

#### 4 . 研究成果

4-1. 小胞体-リソソーム接触を担う PDZD8 のノックアウトでは糖脂質量に顕著な変化は見られなかった。

PDZD8 を培養 3 日目からノックアウトした条件では糖脂質量に顕著な差は見られなかった。しかしながら、この条件では PDZD8 タンパク質を長期的にノックアウトしており、脂質変化が起きていたとしても何らかの補償機構が働いた可能性を否定できない。そこで今後は、3-2 に示した通り、AID 法による PDZD8 タンパク質の迅速分解系を用いて再検証を行う。

4-2. AID 法により大脳皮質ニューロンにおいて PDZD8 の迅速分解に成功した。

大脳皮質ニューロンを用いて AID 法による PDZD8 分解の速度を検討した。その結果、オーキシニン処理後 1.5 時間で 50%以上の PDZD8 タンパク質が分解されることを見出した (図 2)。

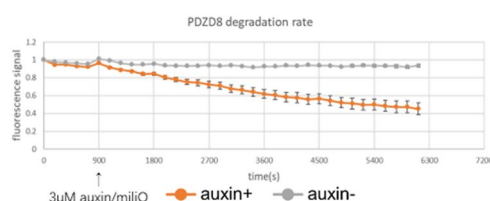
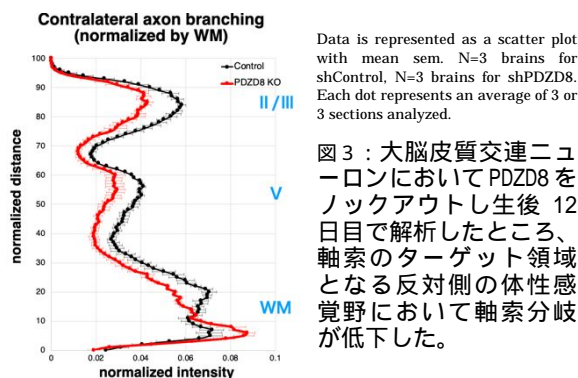


図 2 : 大脳皮質ニューロンにおいてオーキシニン添加後 1.5 時間で 50%以上の PDZD8-mAID が分解した。

4-3 . AID 法及び Microfluid chamber を組み合わせることで PDZD8 タンパク質を軸索区画で分解することに成功したが、細胞体、樹状突起区画においても PDZD8 が分解されることを見出した。

Microfluid chamber の軸索区画のみにオーキシンを添加したところ、軸索区画において顕著な PDZD8 タンパク質の低下が見られたが、同じチャンパーにおいて細胞体、樹状突起区画においても PDZD8 の分解が観察された。そこで、Hela 細胞を両区画に播種し、同様の検討を行ったところ、オーキシンを添加した区画のみで PDZD8 タンパク質の発現低下が観察された。すなわち、ニューロンにおける細胞体区画での PDZD8 タンパク質の低下はリガンドであるオーキシニンがリークしたためではなくオーキシニンが細胞内を逆行的に拡散した可能性が示唆された。

4-4 . PDZD8 ノックダウンによる軸索分岐形成低下が、軸索分岐形成の抑制に必要なか、もしくは軸索分岐の除去に必要なか明らかにするため、刈り込みがまだ頻繁に起こっていない生後 12 日目のマウス大脳で解析を行ったところ、PDZD8 ノックアウトにより軸索分岐の低下が見られた (図 3)。このことは PDZD8 が軸索分岐形成過程の制御に関わることを示唆する。



Data is represented as a scatter plot with mean sem. N=3 brains for shControl, N=3 brains for shPDZD8. Each dot represents an average of 3 or 3 sections analyzed.

図 3 : 大脳皮質交連ニューロンにおいて PDZD8 をノックアウトし生後 12 日目で解析したところ、軸索のターゲット領域となる反対側の体性感覚野において軸索分岐が低下した。

本研究全体を通じて、大脳皮質交連ニューロンにおいて PDZD8 が軸索分岐形成に必要なことを見出した。さらに、これは糖脂質代謝経路を介さない可能性が示唆されたが、脂質組成の変化を補う何らかの補償機構が働いている可能性がある。そこで、今後は本研究で構築した AID 法による PDZD8 タンパク質の迅速分解系による脂質代謝への影響を調べる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masafumi Tsuboi
2. 発表標題 The role of mitochondria-ER contact sites in neurons during mammalian brain development
3. 学会等名 Gordon research conference 2022 Cell biology of the neuron (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
---------------------------	-----------------------	----

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