

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08621

研究課題名(和文) 初期ゴルジ品質管理機構の破綻によって生じる神経疾患の分子病態

研究課題名(英文) Molecular pathogenesis of neurological diseases caused by disruption of early Golgi quality control system

研究代表者

原 太一 (Hara, Taichi)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：00392374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Rer1はゴルジ体中存在し、異常なタンパク質や組み立てに失敗したタンパク質を小胞体に送り返す役割をしていることが分かっています。本研究では、Rer1が欠損すると $\alpha$ -セクレターゼ複合体やその構成因子の一部がリソソームへと輸送され分解されることを示しました。Rer1をマウスの脳形成時に欠損させると、脳内の $\alpha$ -セクレターゼ量が減少することにより神経幹細胞の増殖や維持に働くNotchシグナルが低下し、神経幹細胞の量の減少を伴う大脳の形成異常や様々な行動異常が認められました。以上の結果から、Rer1による $\alpha$ -セクレターゼの品質管理が正常な脳の発達や高次脳機能に重要な役割を果たしていると考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

$\alpha$ -セクレターゼはアルツハイマー病の原因の1つであるアミロイドの産生に働くことが知られています。また、個体発生や幹細胞維持に機能するNotchシグナルの異常は、神経疾患やガンを含めた様々な疾患を引き起こすことが知られています。このことから、今回の成果は、 $\alpha$ -セクレターゼや幹細胞の関係する疾患の発症機構の解明や治療法開発への応用が期待できます。

研究成果の概要(英文)：Rer1 is a retrieval receptor for endoplasmic reticulum (ER) retention of various ER membrane proteins and unassembled or immature components of membrane protein complexes. We show that Rer1 is required for the sufficient cell surface expression and activity of  $\alpha$ -secretase complex, which modulates Notch signaling during mouse cerebral cortex development. When Rer1 was depleted in the mouse cerebral cortex, the number of neural stem cells decreased significantly, and malformation of the cerebral cortex was observed. In Rer1-deficient cells, a subpopulation of  $\alpha$ -secretase complexes and components was transported to and degraded in lysosomes, thereby significantly reducing the amount of  $\alpha$ -secretase complex on the cell surface. These results suggest that Rer1 maintains Notch signaling by maintaining sufficient expression of the  $\alpha$ -secretase complex on the cell surface and regulating neural stem cell maintenance during cerebral cortex development.

研究分野：細胞生物学, 食品科学

キーワード： $\alpha$ -セクレターゼ Notchシグナル 初期ゴルジ Rer1 細胞膜タンパク質 タンパク質品質管理 神経幹細胞 大脳形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜タンパク質の品質管理の主要な場所は小胞体であると考えられているが、研究開始当時のわれわれの研究や国内外の研究から、ゴルジ体や細胞膜にも不良タンパク質を認識するシステムが存在することが示唆されていた。Rer1 はゴルジ体に存在し、異常なタンパク質や組み立てに失敗したタンパク質を小胞体に戻す役割を果たしていることが示されていた(図1)。また、Rer1 がアルツハイマー病の発症原因となるβアミロイドの産生や神経発生の制御に重要な Notch シグナルの調節に関わるγ-セクレターゼの複合体形成に参与することが知られていた。しかしながら、動物個体の神経発生における Rer1 の役割は謎のままだった。

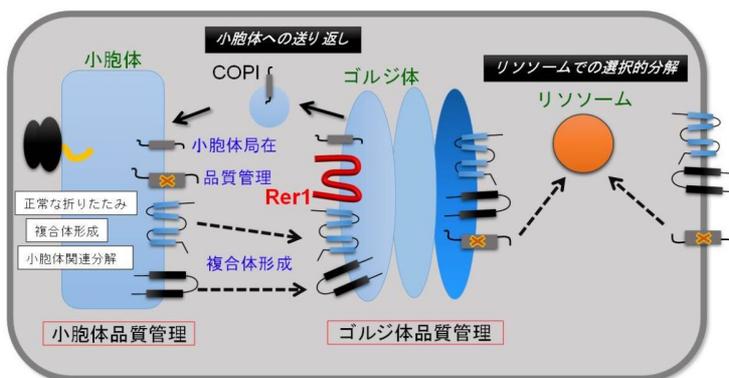


図1: 細胞膜タンパク質の品質管理機構

### 2. 研究の目的

本研究では、これまで不明な点を多く残していた神経発生における Rer1 の役割とその分子機構を明らかにし、疾患との関連を明らかにすることを目的とした。その結果、ゴルジ体における細胞膜タンパク質品質管理システムの大脳発生に関わる生理的役割とセクレターゼ複合体の機能制御における役割が示された。

### 3. 研究の方法

#### (1) 大脳特異的 Rer1 欠損マウスの作製と大脳形成における Rer1 の生理的役割の解析

Rer1 遺伝子欠損マウスは gene trap 法により作製した。Rer1 遺伝子領域に gene trap カセット [SA(splice acceptor)-IRES(internal ribosomal entry site)- geo(LacZ とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子から構成される)] が挿入されることにより、Rer1 遺伝子の発現を阻害する(図2)。組換え ES 細胞 (EUCOMM より入手) を用いて、ネオマイシン耐性遺伝子をプロンプトとしたサザンブロッティングを行い、Rer1 遺伝子領域にトラップベクターが挿入されていることを確認した。gene trap カセットの挿入を確認した ES 細胞をマイクロマニピレーターを用いて胚盤胞に注入し、仮親の支給に移植し、キメラマウスを作製した。トランスジェニックが germ line に導入されたキメラマウスからヘテロマウス ( $Rer1^{+/trap}$ ) を得た。ヘテロマウス同士の交配により、Rer1 遺伝子欠損マウス ( $Rer1^{trap/trap}$ ) の作製を試みた。動物個体における Rer1 の生理的役割を検討するために、全身性に Rer1 を欠損するマウスを作製した。しかし、このマウスは着床直後に致死となった。そのため、出生後の Rer1 の脳機能における役割を解析するために、大脳特異的 Rer1 遺伝子欠損マウスの作製を試みた。本研究で用いた gene trap カセットは、FLP-FRT recombination システムにより、リコンビナーゼ Flippase (Flp) により反転し、gene trap できない構造に変化する(図2)。そこで、 $Rer1^{+/trap}$  マウスを全身で Flp を発現するトランスジェニックマウスと交配し、 $Rer1^{+/inv-trap}$  マウスを作製した。 $Rer1^{+/inv-trap}$  マウスは Rer1 の発現量が減少するものの、生存や組織構造に大きな異常を認めなかった。さらに  $Rer1^{+/inv-trap}$  マウスは Cre

リコンビナーゼ依存的に再度反転し、gene trap することが可能になる。そこで、大脳興奮性神経細胞で特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Emx-Cre* (理化学研究所脳科学総合研究センター岩里琢治先生により作出) と  $Rer1^{+/inv-trap}$  マウス交配し、forebrain-specific  $Rer1^{inv-trap}$  ( $Rer1^{inv-trap/inv-trap}; Emx-Cre$ ) マウスを作製した

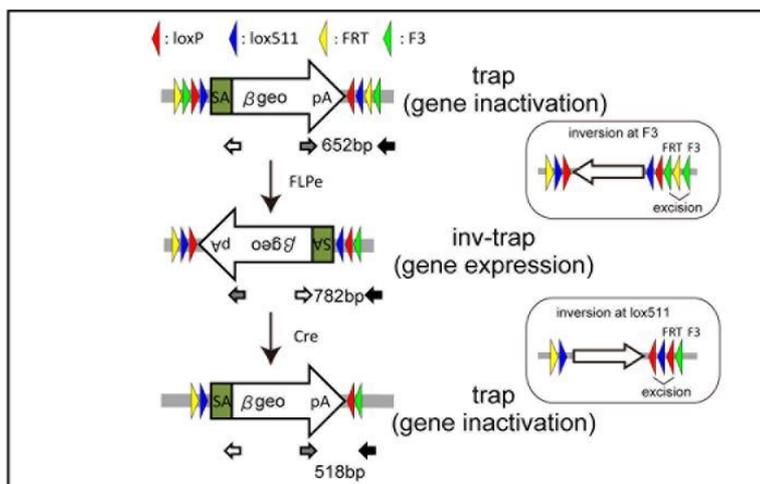


図2 可変式プロモータートラップ法による組織特異的遺伝子ノックアウトの概念

(2) Rer1 欠損細胞をもちいた  $\gamma$ -セクレターゼ複合体の機能制御におよぼす Rer1 の機能解析  
 CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集により作製した Rer1 欠損 Hap1 細胞 (Hrizon より購入) を用いて、Rer1 の欠損による  $\gamma$ -セクレターゼ複合体複合体構成因子の量的変化、細胞膜表面上の量、リソソーム分解系の関与、局在変化、複合体形成量に関して、WB 法や免疫染色、BN-PAGE などを用いて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大脳形成における Rer1 の生理的役割

Rer1 による細胞膜タンパク質品質管理機構の哺乳動物個体における生理的役割明らかにするために、全身性に Rer1 を欠損させたマウスを作製した。このマウスは着床直後に致死となることから、Rer1 が個体発生において必須の役割を果たしていることが明らかになった。そこで、大脳興奮性神経細胞特異的に Rer1 の機能を欠損させたマウスを作製し、大脳形成や機能維持における Rer1 の役割を調べた。Rer1 を欠損させたマウスでは、成体において脳の形成異常と様々な行動異常が観察された (図3)。また、神経細胞の脱落とグリオシス (神経脱落による脳炎症によって誘導される) を認めた。

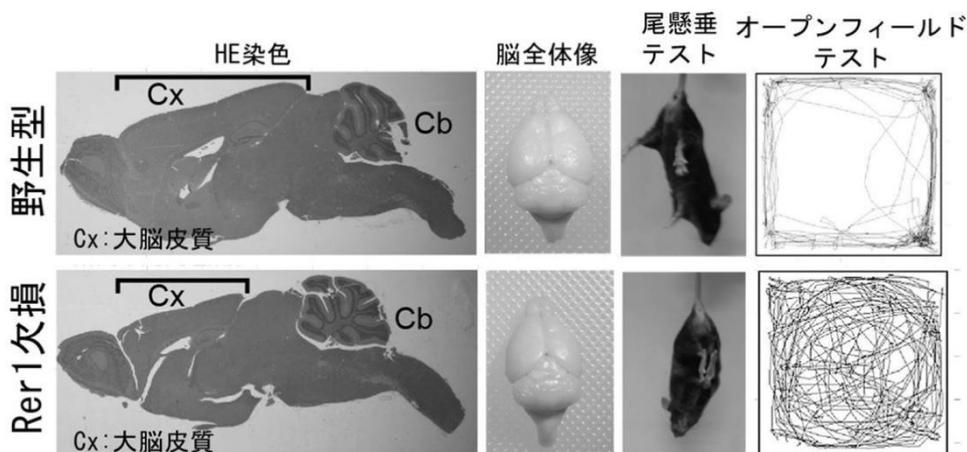


図3 大脳特異的Rer1欠損マウス (引用: Hara T et al., Plos Genetics. ,2018, 14(9), e1007647, DOI: 10.1371/journal.pgen.1007647)

次に Rer1 欠損の脳形成異常の原因を調べるために、神経発生における Rer1 の役割を調べた。その結果、Rer1 欠損大脳では、脳形成の後期に産生されるニューロンが著しく減少することが分かった。神経細胞の分化は正常であることから、神経幹細胞の増殖異常により脳形成に必要な神経細胞が産生できない可能性が疑われた。そこで、Rer1 欠損大脳の脳切片を様々な神経幹細胞マーカーで染色した結果、神経幹細胞の分裂する領域において著しく減少していることが観察された。また、Rer1 を欠失させた神経幹細胞の培養モデルにおいても、Rer1 の欠損が神経幹細胞の増殖を著しく阻害することが分かった (図4)。

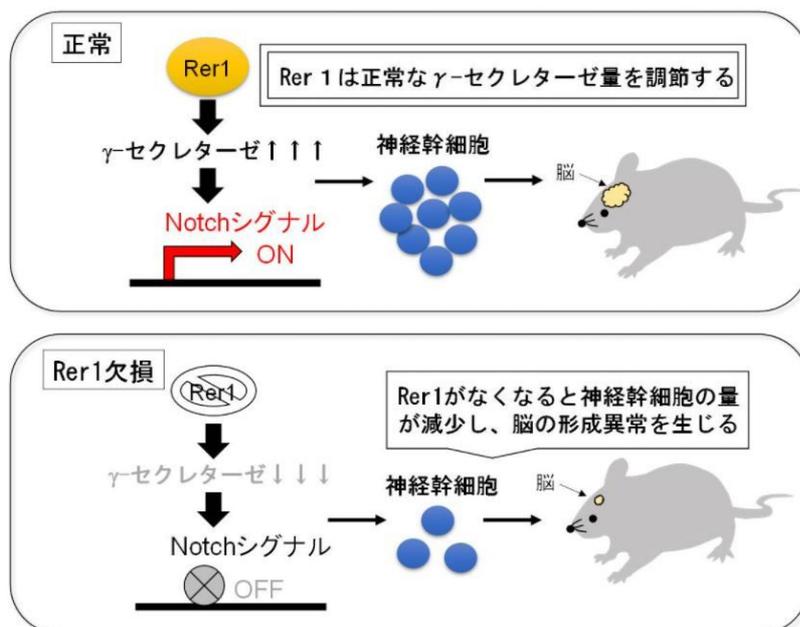


図4 : 大脳形成におけるRer1の役割

## (2) $\gamma$ -セクレターゼ複合体の機能制御における Rer1 の作用機構の解析

Rer1 を欠損した大脳では、脳内の  $\gamma$ -セクレターゼの量と活性が減少しており、その結果神経幹細胞の未分化性を制御する Notch シグナルが低下し、神経幹細胞の増殖・維持に異常を生じることが示唆された。また、Rer1 欠損細胞を用いた解析から、Rer1 遺伝子を欠損すると  $\gamma$ -セクレターゼの一部が組み立て完了前に小胞体以降に搬出されてしまい、リソソームへ運ばれ分解されることが明らかとなった(図5)。以上の結果より、大脳において Rer1 の機能を欠損させると、 $\gamma$ -セクレターゼの細胞膜量が減少し、神経幹細胞の増殖・維持に関わる Notch シグナルの不全が起こることが示唆された。その結果として大脳形成異常や行動異常を引き起こしている可能性が考えられた。

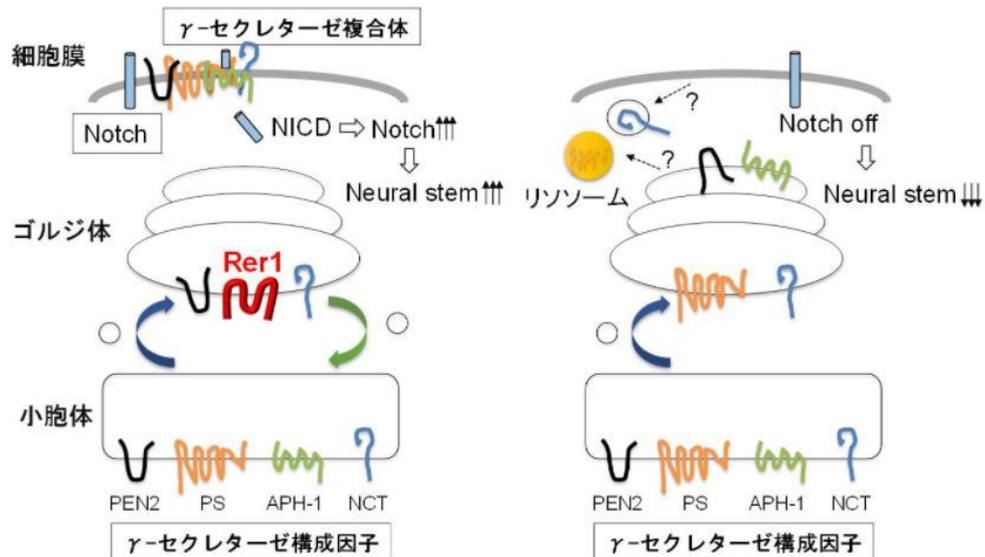


図5 Rer1欠損細胞では $\gamma$ -セクレターゼ量が低下している

## (3) 本研究の波及効果と今後の課題

孤発性のアルツハイマー病や重度の精神発達遅延の症状を来す 1p36 症候群において、Rer1 の発現低下が認められている。また、個体発生や幹細胞維持に機能する Notch シグナルの異常は、神経疾患やガンを含めた様々な疾患を引き起こすことが知られている。今回の成果は、難病の発症機構の解明や神経幹細胞を用いた治療法の開発への応用が期待できる。一方、大脳形成における Rer1 の役割が明らかになったが、他の組織における役割や Rer1 の標的タンパク質、疾患との関連に関しては不明な点を多く残している。これらの謎を明らかにしていくことが、今後の研究の重要な課題となると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Sakai M, Ohnishi K, Masuda M, Ohminami H, Yamanaka-Okumura H, Hara T, Taketani Y.	4. 巻 84(6)
2. 論文標題 Isorhamnetin, a 3'-methoxylated Flavonol, Enhances the Lysosomal Proteolysis in J774.1 Murine Macrophages in a TFEB-independent Manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem .	6. 最初と最後の頁 1221-1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1727309. Epub 2020	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 Taichi Hara, Ikuko Maejima, Tomoko Akuzawa, Rika Hirai, Hisae Kobayashi, Satoshi Tsukamoto, Mika Tsunoda, Aguri Ono, Shota Yamakoshi, Satoshi Oikawa and Ken Sato	4. 巻 14(9)
2. 論文標題 Rer1-mediated quality control system is required for neural stem cell maintenance during cerebral cortex development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1007647	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 Higuchi Y., et al.	4. 巻 141(6)
2. 論文標題 Mutations in COA7 cause spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain.	6. 最初と最後の頁 1622-1636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awy104.	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 Saegusa K, Sato M, Morooka N, Hara T, Sato K.	4. 巻 217(6)
2. 論文標題 SFT-4/Surf4 control ER export of soluble cargo proteins and participate in ER exit site organization.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 2073-2085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201708115.	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 Tatsumi T, Takayama K, Ishii S, Yamamoto A, Hara T, Minami N, Miyasaka N, Kubota T, Matsuura A, Itakura E, Tsukamoto S.	4. 巻 145
2. 論文標題 Forced lipophagy reveals that lipid droplets are required for early embryonic development in mouse.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.161893.	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Taichi Hara
2. 発表標題 Application of autophagy to the health promotion
3. 学会等名 ICoFF2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原太一
2. 発表標題 オートファジーの健康評価と未病制御への応用
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第9回例会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原太一
2. 発表標題 初期ゴルジ品質管理システムによる -セクレターゼ複合体形成制御メカニズムの解明
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山越正汰、大野あぐり、原太一
2. 発表標題 細胞内タンパク質管理機構を標的とした食品の機能性成分の探索系の開発
3. 学会等名 第23回日本フードファクター学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山越正汰、諸富勝成、有賀幸、佐々木詩緒理、油谷京香、牧野磨音、原太一
2. 発表標題 オートファジーを誘導する食品の探索およびその作用機序の解明
3. 学会等名 JAACT2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根結夏子、及川哲志、大畑佳久、松井彩、大野あぐり、山下 慎一郎、本藤和彦、原太一
2. 発表標題 動物細胞を用いた植物発酵液SWの美白効果の検討
3. 学会等名 JAACT2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根結夏子、及川哲志、松井彩、大野あぐり、山下慎一郎、本藤和彦、原太一
2. 発表標題 植物発酵液SWの美容効果に関する機能性の解析
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中瑞穂, 本藤和彦, 及川哲志, 松井彩, 大野あぐり, 山下慎一郎, 原太一
2. 発表標題 植物発酵液SWの美白効果に関する機能性の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山越 正汰、諸富 勝成、有賀 幸、原 太一
2. 発表標題 オートファジーを指標にした食品の機能性評価に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原太一
2. 発表標題 細胞内タンパク質品質管理機構を基盤とした応用研究の展開
3. 学会等名 JAACT2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山越正汰、矢野敏史、坂井麻衣子、藤元萌、大西康太、原太一
2. 発表標題 食品による栄養飢餓非依存性オートファジーの分子機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井麻衣子、大西康太、増田真志、大南博和、奥村仙示、原太一、竹谷豊
2. 発表標題 J774.1 マクロファージ様細胞においてmTORC2シグナルはリソソーム活性を制御する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田哲平、大西康太、増田真志、松崎泰教、今野歩、藤元萌、大西愛花、坂井麻衣子、大南博和、奥村仙示、原太一、平井宏和、竹谷豊
2. 発表標題 近赤外蛍光イメージングを用いたin vivoオートファジー活性評価法の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>神経幹細胞の増殖に働く遺伝子を発見 -細胞内品質管理機構の新たな役割-  <a href="https://www.waseda.jp/top/news/61349">https://www.waseda.jp/top/news/61349</a></p>
---

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