

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19342

研究課題名（和文）神経細胞の膜流動性を標的とする神経機能改善法の開発

研究課題名（英文）Developing methods to improve neuronal function by targeting membrane fluidity in neurons.

研究代表者

服部 光治（Hattori, Mitsuharu）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・教授

研究者番号：60272481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：神経細胞膜の脂質組成が他の細胞膜とは大きく異なることは良く知られているが、その差異が生じるメカニズム、および、生物学的意義の全貌はほぼ未解明である。本研究では、神経細胞の機能を「膜流動性」という観点から見直し、細胞膜を構成する脂質分子の制御機構と神経細胞局所の流動性を解明することを目指した。その結果、神経細胞膜上で多くのタンパク質の機能調節に必要なスフィンゴミエリンという脂質の量の制御機構の一端を解明し、また、神経細胞の成長円錐（神経突起の先端部分）では、他の部分に比べ、流動性が高いことを見出した。本研究から、精神神経疾患の発症や増悪化に関する新たな仮説の妥当性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疫学研究から、脳における多価不飽和脂肪酸（PUFA）の減少が統合失調症や記憶障害などの精神神経疾患の悪化要因であることが強く示唆されている。また、PUFAが神経細胞（特にシナプス）で重要な機能をもつことは判っている。しかし、個々のPUFA分子が個別に重要な意義をもつのか、または、生体膜における炭素数と二重結合数のバランス（膜流動性）が重要なのかは不明である。本研究は、脳の機能に重要なリーリンという分泌タンパク質が統合失調症や記憶障害などの発症に関与する機構と、膜流動性の調節機構という、二つの（一見）独立した問題を結びつけたという点で大きな価値をもつと考えている。

研究成果の概要（英文）：It is well known that the lipid composition of neuronal cell membranes differs significantly from that of other cell membranes, but the mechanism underlying this difference and its full biological significance remain largely unresolved. In this study, we reviewed the function of neurons from the viewpoint of membrane fluidity and aimed to elucidate the regulatory mechanisms of lipid molecules constituting the plasma membrane and the local fluidity of neurons. We partly clarified the regulatory mechanism of the amount of sphingomyelin, a lipid necessary for the functional regulation of many proteins on the neuronal membrane, and found that fluidity is higher in the growth cone of neurons (the tip of neurites) than in other parts of the cell. This study provides validity to a new hypothesis regarding the onset and exacerbation of neuropsychiatric disorders.

研究分野：分子神経科学

キーワード：神経細胞 精神神経疾患 細胞膜 脂質 スフィンゴミエリン リーリン

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞膜の脂質組成が他の細胞膜のそれと大きく異なることは良く知られているが、その差異が生じるメカニズム、および、生物学的意義の全貌はほぼ未解明である。疫学研究から、脳における多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids、PUFA) の減少が、うつ・統合失調症・記憶障害などの精神神経疾患の悪化要因であることが強く示唆されている。また、*in vitro* の実験からは、PUFA が神経細胞 (特にシナプス) で重要な機能をもつことが示唆されている。しかし、個々の PUFA 分子 (またはそれを前駆体とするメディエーター) が個別に重要な意義をもつか、または、生体膜における炭素数と二重結合数のバランス (膜流動性) が重要なのかは、今なお全く不明である。

申請者は脳の構造形成と機能発現におけるリーリンという巨大分泌タンパク質について研究してきた。近年、リーリンが統合失調症や記憶障害などの「シナプス病態」の発症に関与することが確実視されているが、その分子メカニズムについては諸説あり決着していない。

上記二つの (一見、独立の) 問題を解決することは、精神神経疾患の発症を理解するためにも、新規治療法を開発するためにも、非常に重要である。

本研究に先立ち我々は、(I) 神経細胞の膜流動性は局所によって異なっているということと、(II) リーリン欠損マウスでは脳の脂質組成が一部変化しているということとを、発見した。これらの結果から、「神経細胞膜膜における PUFA の減少が流動性低下を引き起こし、これがシナプス伝達異常・精神神経疾患を引き起こす。リーリンの機能低下はこのトリガーの一つである。」という仮説が想定される。この仮説は、PUFA 減少による精神神経疾患の発症や増悪化と、リーリンの機能低下によるシナプス病態を包括して理解できるのみならず、従来は意味や意義が判然としなかった様々な知見もよく説明できる。また近年、質量分析技術や蛍光プローブの開発が進み、脂質と膜流動性の細胞内局在は徐々に明らかになりつつある。細胞膜を研究する方法の一つに蛍光プローブが着目され、多くの応用が試みられている。しかし神経細胞にこの方法を適用した研究は皆無である。

生体膜のリン脂質二重層には非対称性があり、ホスファチジルセリン (PS) やホスファチジルエタノールアミン (PE) は主に細胞質側 (内葉) に存在する。P4-ATPase ファミリーに属するアミノリン脂質フリッパーゼは、PS や PE を細胞外側 (外葉) から内葉へ移層することで、リン脂質の非対称性の維持に寄与している。神経系に発現するアミノリン脂質フリッパーゼは主に ATP8A1 と ATP8A2 であるとされており、ヒトでの ATP8A2 の変異は小脳失調・精神遅滞および平衡障害症候群 (CAMRQ) の原因となる。PS や PE の局在 (濃度) は膜流動性にも大きく関与するが、神経細胞においてこれらの分子の局在や動態についても不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

神経細胞の機能を「膜流動性」という観点から見直すことでシナプスにおける PUFA の機能を解明するとともに、新規の疾患治療法開発へとつなげる。具体的には、神経細胞内の局所膜流動性の測定、神経細胞膜の脂質組成を制御する分子メカニズムの解明を目指した。さらには、ATP8A1 と ATP8A2 の欠損が神経細胞に及ぼす影響を解明することも目的とした。

## 3. 研究の方法

蛍光プローブ NR12A はナイルレッドを基盤としたプローブで、形質膜特異的に結合し、膜流動性の低い Lo 相と膜流動性の高い Ld 相で発する蛍光波長が異なるという特徴を持つ。ガラスベースディッシュ上に初代培養神経細胞または HEK293T 細胞を播種後、10 nM NR12A を添加し、37℃、暗所で8分間インキュベートした。観察には LSM800 with Airyscan (Carl Zeiss) を使用した。488 nm の励起光で励起させ、550-600 nm と 600-nm の蛍光に分割した。NR12A を添加してから約 40 分以内に観察を終えるようにした。

成体の野生型およびリーラー (リーリン欠損) マウスの大脳より神経細胞特異的かつ神経細胞の機能にとって重要な画分であるシナプス後肥厚画分 (PSD 画分) を抽出した。この画分より脂質成分を Bligh & Dyer 法によって抽出し、LC-MS/MS を用いたノンターゲットリピドミクス解析をおこなった。また、マウス胎児由来の大脳神経細胞を培養し、脂質分子特異的に結合するプロ

ープを用いた染色を行った。

ATP8A1 ホモ欠損 (8A1KO) マウスおよび ATP8A2 ホモ欠損 (8A2KO) マウスは、名古屋市立大学大学院医学研究科の大石久史教授に作製していただいた。ATP8A1 ホモ欠損/ATP8A2 ヘテロ欠損マウス同士を交配して ATP8A1/ATP8A2 ダブルヘテロ欠損マウスを得た後、ATP8A1/ATP8A2 ダブルヘテロ欠損マウス同士を交配して ATP8A1/ATP8A2 ダブルホモ欠損 (dKO) マウスを得た。すべてのマウスは Jcl:ICR バックグラウンドで実験に使用した。

#### 4. 研究成果

海馬神経細胞では細胞体に比べて成長円錐で膜流動性が高く、またその多様性も高いことがわかった。成長円錐で膜流動性が高いことは、成長円錐の細胞膜で高い曲率を実現し、細胞体に比べてより複雑な形態をとる際に必要となると考えられる。さらにその多様性が大きいことは、細胞膜の形態変化のため、膜流動性の高い Ld 相が豊富な部分が存在している一方で、脂質ラフトのような膜流動性の低い Lo 相が豊富な部分も存在しており、より幅広い相状態が混在しているからだと考えられる。また、1DIV 以内の小脳顆粒細胞でも細胞体よりも成長円錐での細胞体に比べて成長円錐で膜流動性が高いことがわかった。ここから、細胞体と成長円錐の膜流動性の局所的な差異は神経細胞で広く見られる現象だと推察する。海馬神経細胞と HEK293T 細胞で膜流動性を比較すると、HEK293T 細胞の非仮足部分と仮足部分の膜流動性の差よりも海馬神経細胞の細胞体と成長円錐の膜流動性の差の方が大きいことがわかった。加えて、その多様性の差も海馬神経細胞の細胞体と成長円錐の方が大きかった。考えられる要因は細胞極性と脂質組成である。海馬神経細胞は極性を持った細胞であり、他の培養細胞に比べてその細胞膜組成の局在に偏りがあると考えられる。また、細胞種ごとに持つ脂質組成が異なり、細胞膜の相状態が変わることで膜流動性の多様性も変化するということも考えられる。

野生型およびリーラーマウス大脳 PSD 画分のリポドミクス解析の結果、リーラーでは、野生型に比べホスファチジルコリンとセラミドの含有割合が増加し、ジアシルグリセロールの割合が減少していた。これらの分子種はスフィンゴミエリン (SM) の代謝に関わる。非神経細胞を用いた先行研究により、チロシンキナーゼ Fyn (神経細胞ではリーリンによっても活性化される) の活性化によって細胞膜上の SM 量が増加することが知られているので、SM を認識して結合する Equinatoxin に GFP が付加された Eqt -GFP を使用し、培養神経細胞を染色した。リーリンを添加した群では、コントロール培地を添加した群に比べ、Eqt -GFP によって強く染色される細胞の割合が増加していた。このことから、リーリンは、神経細胞膜上の SM 量を増加させることが示唆された。

マウス海馬由来神経細胞における ATP8A1 と ATP8A2 の局在を、免疫染色を用いて調べた。その結果、ATP8A1 が細胞体と神経突起に斑状に存在すること) を明らかにした。当研究室で入手した ATP8A2 の抗体は免疫染色に使用できなかったのではほとんどの P4-ATPase に共通するサブユニットの TMEM30A の抗体を用いることを検討した。P4-ATPase と複合体を形成できない TMEM30A は小胞体から細胞膜に輸送されることなく、分解されてしまうので、免疫染色により検出される TMEM30A は ATP8A2 などの P4-ATPase の局在を反映する。そこで、8A1KO と dKO のマウス海馬由来神経細胞を TMEM30A の免疫染色を用いて比較したところ、ATP8A2 は神経突起に存在することが明らかとなった。なお、dKO の細胞体で TMEM30A のシグナルは観測されたことから、細胞体において ATP8A1 と ATP8A2 以外の、TMEM30A をサブユニットに持つ P4-ATPase が存在することが示唆された。

8A1KO、8A2KO、dKO の各マウス海馬由来神経細胞を用い、PS 結合分子 Annexin V を用いて染色を行った。その結果、細胞体での PS の露出は 8A1KO と dKO の間で顕著な差が認められなかった一方で、8A1KO に比べて dKO の神経突起で PS の露出量が增大することが明らかになった。8A1KO と dKO の表面積に対する PS 露出面積の割合を定量的に解析した結果、細胞体では PS 露出量に差が認められなかった一方で、神経突起では 8A1KO に比べて dKO で PS 露出量が有意に増大していた。dKO の神経突起上での PS の露出量の増大が細胞死によって生じる可能性を検証したところ、細胞死の寄与は非常に低いことが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagae Masamichi, Suzuki Kei, Yasui Norihisa, Nogi Terukazu, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu, Takagi Junichi	4. 巻 169
2. 論文標題 Structural studies of Reelin N-terminal region provides insights into a unique structural arrangement and functional multimerization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 555 ~ 564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa144	査読の有無 無
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 Tsuneura Yumi, Sawahata Masahito, Itoh Norimichi, Miyajima Ryoya, Mori Daisuke, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu, Sobue Akira, Nagai Taku, Mizoguchi Hiroyuki, Nabeshima Toshitaka, Ozaki Norio, Yamada Kiyofumi	4. 巻 144
2. 論文標題 Analysis of Reelin signaling and neurodevelopmental trajectory in primary cultured cortical neurons with RELN deletion identified in schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104954 ~ 104954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104954	査読の有無 無
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 Hattori Mitsuharu, Kohno Takao	4. 巻 169
2. 論文標題 Regulation of Reelin functions by specific proteolytic processing in the brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 511 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab015	査読の有無 無
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 Sawahata Masahito, Asano Hiroki, Nagai Taku, Ito Norimichi, Kohno Takao, Nabeshima Toshitaka, Hattori Mitsuharu, Yamada Kiyofumi	4. 巻 173
2. 論文標題 Microinjection of Reelin into the mPFC prevents MK-801-induced recognition memory impairment in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacological Research	6. 最初と最後の頁 105832 ~ 105832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phrs.2021.105832	査読の有無 無
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 Nakao Yousuke, Yokawa Satoru, Kohno Takao, Suzuki Takahiro, Hattori Mitsuharu	4. 巻 in press
2. 論文標題 Visualization of Reelin Secretion from Primary Cultured Neurons by Bioluminescence Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac019	査読の有無 無
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梅村悠太、大嶋智葉、中島鼓美、大石久史、築地仁美、河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 脳におけるリン脂質フリッパーゼの機能解明
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井圭介、河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 出生後におけるリーリントンパク質脳内投与は、リーリン遺伝子の欠損を補えるか？
3. 学会等名 第20回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井圭介、河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 出生後におけるリーリントンパク質脳内投与は、リーリン遺伝子の欠損を補えるか？
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅村悠太、大嶋智葉、中島鼓美、川瀬宗之、大石久史、築地仁美、河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 脳におけるリン脂質フリッパーゼの機能の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤飛悠吾、河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 脳の脂質代謝系におけるリーリンの機能解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 光輝、河野 孝夫、石井 圭介、服部 光治
2. 発表標題 脳の層構造の形成に必須であるDab1の新規リン酸化メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹腰 祐斗、安藤 飛悠吾、河野 孝夫、有田 誠、服部 光治
2. 発表標題 神経細胞膜の脂質組成に対するリーリンの影響の解明
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部光治
2. 発表標題 神経細胞における 酸性リン脂質フリッパーゼの機能
3. 学会等名 生理研研究会 機能的神経回路の構築と動作を支える分子細胞基盤
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
---------	---------