

令和元年6月14日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06762

研究課題名(和文) 神経細胞における新たな小胞体ストレス応答機構の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of a novel ER stress response in neurons

研究代表者

山中 智行 (Yamanaka, Tomoyuki)

同志社大学・研究開発推進機構・准教授

研究者番号：00381575

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)：最近の解析から、UPR以外に、「小胞体凝集」という別の小胞体ストレス応答機構の存在が示唆されつつある。これは、小胞体膜タンパク質の変異や異常蓄積などによって誘導される。これまでに、我々は、転写因子NF-Yの脳錐体神経細胞での機能破壊が、小胞体凝集を伴うタンパク質蓄積病態を示すことを見出した(Nat Commun 2014)。本研究では、異なる神経細胞種を用いた比較解析から、小胞体凝集に関わるキーファクターを見出すと共に、RNA-seqやプロテオミクス解析をさらに行うことにより、小胞体凝集の病態メカニズムの全体像を見いだし、学会・論文等に発表した(Sci Rep 2016等)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、UPRが関わるいわゆる典型的な小胞体ストレス応答については多く解析されてきた。一方、小胞体凝集はUPRを伴わない新しいタイプの応答機構であり、神経変性疾患に深く関わっていると考えられる。しかし、その詳細な分子機構はよくわかっていない。本研究では、主にマウスを用いたin vivo系でその解析を試み、小胞体凝集形成に関わるキーファクターを同定すると共に、トランスクリプトーム、プロテオーム解析により、その全体像も見い出すことができた。本研究成果は、神経変性疾患の診断や治療・予防に活用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent observations suggest, in addition to UPR, existence of a novel ER stress response, that is, ER aggregation, which is induced by mutation/accumulation of ER resident membrane proteins. Previously, we found that inactivation of NF-Y transcription factor in pyramidal neurons induces the atypical ER protein deposition pathology in association with ER aggregation (Nat Commun 2014). In this study, by comparative analysis of multiple types of neurons in mouse CNS, we identified a key factor involved in the ER aggregation induced by NF-Y inactivation (Sci Rep 2016). We further performed transcriptome and proteome analyses to identify the molecular mechanism underlying ER aggregation and neurodegeneration.

研究分野：分子神経病態学

キーワード：神経変性疾患 小胞体ストレス シャペロン NF-Y

1. 研究開始当初の背景

小胞体は、何らかのストレスにより機能障害が生じると、ある種の応答反応を示し、その内部の恒常性維持を試みる。よく知られているものが Unfolded protein response (UPR) であり、小胞体内腔でのミスフォールディングタンパク質の蓄積を検知していくつかのセンサータンパク質を活性化し、小胞体シャペロンや XBP1 等の発現誘導や翻訳抑制によりその恒常性の回復を試みる (Walter P & Ron D Science 2011)。一方、最近、主に培養細胞を用いた解析から、小胞体膜タンパク質の高発現や、小胞体 - ゴルジ体間の輸送異常により、滑面小胞体の増幅と局所的集積という特徴的な小胞体凝集構造が形成されることが見出された (Federovitch CM et al. COCB 2005)。この現象は、ALS8 (筋萎縮性側索硬化症 8) などの疾患に関連した膜タンパク質の変異とそれに伴う小胞への蓄積でも観察されている (Teuling E et al. J. Neurosci 2007)。興味深いことに、この応答反応は UPR を誘導せず、上記ストレスセンサー非依存的であることも示された。よって、小胞体は、膜タンパク質蓄積等のストレスに対して、「小胞体凝集」という、UPR とは全く異なる新しい応答反応を示すことが明らかとなってきた。しかし、その生理的意義及び分子機構についてはほとんど不明である。

近年、我々は、神経変性疾患であるハンチントン病で、NF-Y 等の転写因子が活性阻害されることを見出した (Yamanaka T et al. EMBO J. 2008, Hum Mol Genet. 2010)。その生理機能を解明すべく、マウス脳の分化神経細胞で NF-Y の機能破壊を試みたところ、興味深いことにカルネキシンや APP などの膜タンパク質がユビキチン、p62 と共に小胞体に蓄積することを見出した。さらに、滑面小胞体の増幅・集積が誘導されること、Grp94 が減少する一方 UPR は誘導されないことが観察された。よって、NF-Y 機能破壊は、何らかの小胞体恒常性の異常により、小胞体の増幅・凝集という第 2 のストレス応答を誘導し、神経変性を引き起こすことが明らかとなった (図 2、Yamanaka T et al. Nat Commun 2014)。一方で、肝臓の肝細胞では、NF-Y を機能破壊すると、小胞体シャペロン、XBP1 等の発現誘導や小胞体内腔の膨張といった典型的な小胞体ストレス応答 (UPR) を示すことが報告された (Luo R et al. Sci Rep 2011)。このことは、NF-Y が細胞種を超えて小胞体恒常性維持に重要であることを示すと同時に、その阻害によるストレス応答は、神経細胞では肝細胞と全く異なることを示唆している。よって、神経細胞では、小胞体恒常性維持・ストレス応答に関わる独自の分子機構が存在し、その生存・変性に強く関わっていると期待される。しかし、その詳細は解析されていない。

2. 研究の目的

本研究では、神経特異的な小胞体ストレス応答機構とその生理的・病的意義の解明を目的とし、まず、NF-Y 機能阻害マウスを用いた *in vivo* 系にて、小胞体凝集が神経細胞一般に観察されるかについて検討する。同時に、セルソーター、遺伝子アレイ、RNA-seq 等を用いた包括的解析により小胞体凝集を直接制御する因子を同定する。また、培養細胞系にて、小胞体膜タンパク質の変異・蓄積と小胞体凝集との関連を調べると共に、ここを制御する因子の網羅的検索を行う。以上を元に、小胞体病態の分子機構の全体像の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経系における細胞種特異的な NF-Y 機能阻害

マウスの中枢神経系の異なる神経細胞において NF-Y ノックダウンを行った。線条体の有棘神経細胞や小脳のプルキンエ細胞については、アデノ随伴ウイルスベクターにて RNAi により NF-Y をノックダウンした後、神経変性の有無について病態解析を行った。脊髄運動ニューロンについては、運動ニューロン特異的に cre リコンビナーゼを発現する VAcT-cre マウスを使用し、これを NF-YA flox マウスと交配し、運動ニューロン特異的ノックアウトマウスを作製した。これについても病態解析を行うとともに、運動・行動変化についても継続的に観察した。

(2) 小胞体病態におけるトランスクリプトーム解析

神経系培養細胞 (N2a 細胞) については、RNAi ベクター導入により NF-Y をノックダウンした後、RNA 抽出し DNA マイクロアレイ解析により発現変動遺伝子を網羅的に検索した。マウス脳については、アデノ随伴ウイルスの RNAi ベクターを用いて、線条体の有棘神経細胞で NF-Y をノックダウンしたのち、ノックダウン細胞を GFP の蛍光をもとにセルソーターにより単離した。これら細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーにて RNA-seq 解析を行い、発現変動遺伝子を網羅的に検索した。

(3) 小胞体病態を示す細胞モデルの構築と生化学的解析

小胞体病態関連遺伝子について、その野生型・変異体を恒常発現する N2a 細胞株を作製した。

これより小胞体を生化学的に分離・精製し、プロテオミクスにより含まれているタンパク質を網羅的に検索した。これらを比較することで、小胞体凝集により、タンパク質構成成分が変化するかを検討した。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系における細胞種特異的な神経変性病態の同定

これまでに NF-Y をマウス大脳の錐体神経細胞でノックアウトすると、小胞体に異常タンパク質が蓄積し神経細胞の脱落・変性を引き起こすことを見出してきた (Yamanaka T et al. Nat Commun 2014)。今回、この神経変性病態の普遍性を解明するため、中枢神経系での別の神経細胞での NF-Y ノックダウン・ノックアウトを行い、その影響を観察した。その結果、線条体有棘神経細胞や小脳プルキンエ細胞では同様のタンパク質蓄積病態を引き起こすものの、運動ニューロンでは観察されないことを見出した。さらなる解析から、運動ニューロンでは主要な小胞体シャペロンである Grp78/Bip の発現が消失していることを見出し、これが運動ニューロン特異的な病態に関わっていることが示唆された。実際、線条体有棘神経細胞で Grp78/Bip の発現を減少させると、NF-Y ノックダウンによるタンパク質蓄積病態が抑制されたことから、Grp78/Bip が細胞種特異的な病態に関わっていることが支持された。

これらをまとめ、第 39 回日本分子生物学会年会のシンポジウムにて発表し、論文発表 (Yamanaka T et al. Sci Rep 2016)、プレスリリースを行った (同志社大学)。また慶応大学との共同研究により、運動ニューロンでのノックアウトに使用した VACHT-cre トランスジェニックマウスについて、cre の発現が slow motor neuron に選択的であることを明らかとした (Misawa H et al. Genesis. 2016)。

(2) 小胞体病態におけるトランスクリプトーム解析

NF-Y 機能障害により小胞体病態が引き起こされるメカニズムについて、トランスクリプトームを用いた解析を行った。まず、神経系培養細胞にて NF-Y をノックダウンし、DNA マイクロアレイにて発現変動遺伝子を同定した。遺伝子分類解析の結果、~100 の小胞体関連遺伝子が有意に発現減少していることがわかり、NF-Y が小胞体関連遺伝子群のメジャーな発現制御因子であることが示唆された。一方、マウス脳でのトランスクリプトーム解析については、NF-Y ノックダウンによる影響を選択的に解析するため、ノックダウン細胞をセルソーターにて回収した後、次世代シーケンサーにより、発現変動する遺伝子群を網羅的に同定した (RNA-seq)。遺伝子分類解析により、小胞体に局在する遺伝子群が濃縮していることを見出され、NF-Y が *in vivo* においても小胞体関連遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。よって、NF-Y は神経系細胞では、小胞体関連遺伝子の発現を調節するキーファクターであり、この異常が神経変性に関わることが示唆された。これらについてまとめ、2 つの国際学会 (The 8th International Symposium on Autophagy, World Congress of Neurology 2017) 及び第五回 NGS 研究会にて発表した。

(3) 小胞体病態を示す細胞モデルの構築と生化学的解析

小胞体病態関連遺伝子の発現細胞株より、小胞体を生化学的に単離する手法を確立し、これを質量分析で解析したところ、小胞体自体の構成成分は変化していないが、小胞体と他オルガネラとの相互作用が影響されていることが示唆され、小胞体の異常がどのようにして細胞機能障害を引き起こすか、そのメカニズムを見出しつつある。これについてまとめ、国際学会 (Cold Spring Harbor Laboratory Conference) 及び国内学会 (第 70 回日本細胞生物学会大会) にて発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Tanaka G, Yamanaka T*, Furukawa Y, Kajimura N, Mitsuoka K, Nukina N* Sequence- and seed-structure-dependent polymorphic fibrils of alpha-synuclein. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019 Feb 18 pii: S0925-4439(19)30065-1 (査読有)
2. Tanaka G, Yamanaka T*, Furukawa Y, Kajimura N, Mitsuoka K, Nukina N* Biochemical and morphological classification of disease-associated alpha-synuclein mutants aggregates *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Jan 15 508(3):729-734. (査読有)
3. Park H, Miyazaki H, Yamanaka T, Nukina N* Non-coding RNA Neat1 and Abhd11os expressions are dysregulated in medium spiny neurons of Huntington disease model mice. *Neurosci Res.* 2018 Nov 2 S0168-0102 (査読有)
4. Okuzumi A, Kurosawa M, Hatano T, Takanashi M, Nojiri S, Fukuhara T, Yamanaka T, Miyazaki

- H, Yoshinaga S, Furukawa Y, Shimogori T, Hattori N, Nukina N* Rapid dissemination of alpha-synuclein seeds through neural circuits in an in-vivo prion-like seeding experiment *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Sep 19 6(1):96. (査読有)
5. Yamanaka T*, Nukina N. ER Dynamics and Derangement in Neurological Diseases. (Review) *Front Neurosci.* 2018 Feb 20 12:91. (査読有)
 6. Yamanaka T*, Tosaki A, Miyazaki H, Kurosawa M, Koike M, Uchiyama Y, Maity SN, Misawa H, Takahashi R, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Differential roles of NF-Y transcription factor in ER chaperone expression and neuronal maintenance in the CNS. *Sci Rep.* 2016 Sep 30 6:34575. (査読有)
 7. Misawa H, Inomata D, Kikuchi M, Maruyama S, Moriwaki Y, Okuda T, Nukina N, Yamanaka T. Reappraisal of VChT-Cre: Preference in slow motor neurons innervating type I or IIa muscle fibers. *Genesis.* 2016 Nov 54(11) 568-572. (査読有)
 8. Yamanaka T*, Tosaki A, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N*. Genome-wide analyses in neuronal cells reveal that upstream transcription factors regulate lysosomal gene expression. *FEBS J.* 2016 Mar 283(6) 1077-87. (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Yamanaka T, Nukina N. Biochemical characterization of pathological ER domain isolated from cultured cells. Cold Spring Harbor Laboratory Conference: Neurodegenerative Diseases: Biology & Therapeutics 2018 年 Dec NY Poster
2. Yamanaka T, Nishiyama R, Nukina N. Immuno-isolation of different ER membrane domains from cultured cells. 第 70 回日本細胞生物学会大会 2018 6 月 東京 (ポスター発表)
3. 山中智行、田中剛貴、吉永早希、古川良明、貫名信行 ヒト・マウス シヌクレインを用いたアミロイド線維多様性の解析 生命科学系学会合同年次大会(分子生物学会) 2017 年 12 月 神戸 ワークショップ(オーガナイザー)
4. Yamanaka T, Nukina N. NF-Y inactivation induces differential ER chaperone downregulations and ubiquitin/p62 pathologies in the CNS XXIII World Congress of Neurology 2017 年 Sep Kyoto Poster
5. 山中智行、宮崎晴子、貫名信行 転写因子 NF-Y を介した新規神経変性メカニズムの解明 第 5 回 NGS 研究会 2017 5 月 仙台 (ポスター発表)
6. Yamanaka T, Nukina N. Neuronal type-specific regulation of ER chaperones determines the ubiquitin/p62 pathology caused by NF-Y inactivation The 8th International Symposium on Autophagy 2017 年 May Nara Poster
7. 山中智行、貫名信行 転写因子 NF-Y の中枢神経系での機能阻害は細胞種特異的な神経変性病態を示す 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 横浜 シンポジウム
8. 山中智行、貫名信行 転写因子 USF はリソソーム関連遺伝子の発現を制御する 第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 横浜 一般口演
9. 山中智行、貫名信行 転写因子 USF は神経系細胞でリソソーム関連遺伝子の発現を制御する 第 68 回日本細胞生物学会大会 2016 6 月 京都 (ポスター発表)
10. Yamanaka T, Nukina N. NF-Y inactivation induces differential, cell type-specific neuropathology. Brain Protein Aging and Dementia Control 1st International Symposium, 2015 年 10 月 Nagoya
11. 山中智行、戸崎麻子、宮崎晴子、黒澤大、小池正人、内山安男、Sankar N. Maity、三澤日出巳、服部信孝、貫名信行 転写因子 NF-Y の機能欠損は細胞種特異的な神経変性病態を示す 第 38 回日本神経科学大会 2015 年 7 月 神戸 一般口演

〔図書〕(計 1 件)

1. 山中智行 NF-Y 脳内環境辞典 2017 3 月 120-121 出版社: メディカルドゥ

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://brainscience.doshisha.ac.jp/introduction/pat/ca.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：下郡 智美
ローマ字氏名：Tomomi Shimogori
所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所
部局名：脳神経科学研究センター
職名：チームリーダー
研究者番号(8桁)：30391981

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 貫名 信行 (同志社大学)
ローマ字氏名：Nukina Nobuyuki

研究協力者氏名： 小池 正人 (順天堂大学)
ローマ字氏名：Koike Masato

研究協力者氏名： 三澤 日出巳 (慶応義塾大学)
ローマ字氏名：Hidemi Misawa

研究協力者氏名： Sankar N. Maity (テキサス大学)
ローマ字氏名：Sankar N. Maity

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、研究者個人に帰属されます。