

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07616

研究課題名(和文)カルボニルストレスにおけるCRMP2のAGE修飾の解析

研究課題名(英文)Analysis of AGE modification of CRMP2 by carbonyl stress

研究代表者

豊島 学 (Toyoshima, Manabu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：90582750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：GLO1 KO iPS細胞から作成した神経細胞では、神経突起の伸長低下が見られた。AGE修飾タンパク質を解析した結果、CRMP2がAGE修飾のターゲットとなることが明らかとなった。CRMP2のAGE修飾サイトを解析した結果、複合体形成に関わる部位にAGE修飾が集積していた。更にAGE修飾されたCRMP2は、不可逆的な凝集化を起こし、微小管の束化機能が大きく低下することが明らかとなった。以上のことから、カルボニルストレスの亢進は、AGE化CRMP2の不可逆的な凝集化を介して、微小管の束化不全を誘導し、神経細胞の発達障害を引き起こすことで、統合失調症の発症脆弱性に繋がることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルボニルストレスを伴う統合失調症において、AGE修飾を受けたCRMP2タンパク質が多量体化して細胞骨格の制御機能を失うことが疾患病態の基盤にある可能性を初めて示した。これまでカルボニルストレスがどのように統合失調症の病態を引き起こすのか不明であったが、患者由来iPS細胞と原子レベルの構造解析によって新しい分子経路が明らかになった。カルボニルストレスを伴う統合失調症の詳細な分子病態が明らかになったことにより、統合失調症における分子標的治療・創薬、及び発症予防法開発を促進する基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Impairments in neurodevelopmental process are thought to play a pivotal role in the pathogenesis of schizophrenia. To date, carbonyl stress have been identified as pathophysiological factors for schizophrenia, but it is unclear by molecular mechanism underlying carbonyl stress affects neural differentiation and development. Here, we elucidated the molecular mechanism underlying the effects of carbonyl stress in GLO1 KO iPS cells. The GLO1 KO iPS cells exhibited significant cellular and developmental deficits, and hyper-AGE modification of CRMP2. Structural and biochemical analyses revealed that AGE modified CRMP2 was stacked in the multimer conformation by irreversible cross-linking, resulting in loss of function to bundle microtubules. Thus the current study revealed that the enhanced carbonyl stress stemmed from the genetic aberrations results in neurodevelopmental deficits through the formation of irreversible dysfunctional multimer of AGE modified CRMP2.

研究分野：神経科学

キーワード：統合失調症 CRMP2 カルボニルストレス

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は複数の遺伝的要因や環境要因により発症すると考えられており、病因や病態は非常に異質であることから、その具体的な発症・病態メカニズムの解明はあまり進んでいない。そのため、統合失調症の発症・病態メカニズムの解明には、その異質性の中から特定の病因・病態仮説に基づいた遺伝子変異、代謝異常を捉えて研究を進める必要がある。

近年、およそ2割の統合失調症患者において、カルボニルストレスという代謝異常が起きていることが報告され (Arai et al., 2010)、「カルボニルストレス性」の統合失調症という新しい統合失調症の病因・病態仮説が考えられるようになった。このカルボニルストレスは、生体内の糖、脂質、アミノ酸の酸化・還元、過酸化に由来する種々の反応性カルボニル化合物の増加により引き起こされる代謝異常であり、除去機構に関わる酵素をコードする *GL01* 遺伝子の変異が統合失調症患者で見ついている (Arai et al., 2010)。カルボニルストレスによって生体内では、反応性カルボニル化合物がタンパク質を非酵素的に修飾し、終末糖化産物 (Advanced Glycation End products: AGEs) が蓄積する。AGE 修飾を受けるタンパク質については同定が進んでいないが、我々の予備的解析で CRMP2 がカルボニルストレスの重要な標的分子である可能性が示唆された。また興味深いことに、糖尿病の母体から生まれた子供 (胎児期にカルボニルストレスを受けた状態) では、統合失調症の発症が7倍に増加することが報告されている (Van Lieshout and Voruganti, 2007)。これらのことから、胎生期から生後脳発達期にかけてのカルボニルストレスは、統合失調症の発症脆弱性を形成することが考えられるが、どのような分子メカニズムでカルボニルストレスが神経分化・発達に影響を与えるのかは不明である。

2. 研究の目的

上記の背景より、「胎生期から生後脳発達期にかけてのカルボニルストレスは、CRMP2 などの機能分子の AGE 修飾を亢進させ、正常な機能を阻害することで、神経分化・発達の異常を引き起こし、統合失調症の発症脆弱性を形成する」との仮説を構築するに至った。本研究では、この仮説を基に、*GL01* KO iPS 細胞を用いて、CRMP2 の機能が AGE 修飾によってどのように変化するかを解析し、カルボニルストレス性統合失調症における神経発達障害の分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *GL01* KO iPS 細胞の作成

ヒト *GL01* 遺伝子の ATG 配列近傍を認識する gRNA を設計し、sgRNA In Vitro Transcription System (TaKaRa bio) を用いて gRNA を合成した。CAS9 タンパク質 (TaKaRa bio) と合成した gRNA をエレクトロポレーションにて健常者由来 iPS 細胞に導入し、*GL01* 遺伝子欠損株をクローニングした。

(2) iPS 細胞の培養と神経分化

iPS 細胞から神経幹細胞への分化誘導は、シングルセル化した iPS 細胞を LIF、FGF2 を加えた神経幹細胞用培地で浮遊培養することで、神経分化を誘導し、ニューロスフィアを作製した。神経細胞への分化誘導は、ニューロスフィアを細胞乖離液でシングルセル化した後、ポリオルニチン/ラミニンコートしたディッシュ上に蒔き、LIF、FGF2 を除いた神経細胞用培地で培養することで、最終分化を誘導し、神経細胞を作製した。

(3) HiRes-SEC アッセイ

AKTA pure system の twin Superdex 200 Increase 10/300 カラム (GEヘルスケア) からなるタンデム連結カラムを用いて行った。大腸菌で産生した CRMP2 組み換えタンパク質に glyoxal (終濃度 20mM) を加え、20 で 48 時間の条件で反応させ、AGE 修飾 CRMP2 を作製した。精製した未修飾または AGE 修飾 CRMP2 タンパク質をアッセイバッファー (20mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT, 5% Glycerol) を含むカラムにロードして溶出した画分を、SDS-PAGE で分析した。

(4) MT-bundling assay

大腸菌で産生した CRMP2 組み換えタンパク質に glyoxal (終濃度 20mM) を加え、20 で 48 時間の条件で反応させ、AGE 修飾 CRMP2 を作製した。精製した未修飾または AGE 修飾 CRMP2 タンパク質とローダミン標識した tubulin を混合し、束化した微小管を全反射顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。

4. 研究成果

(1) *GLO1* KO iPS 細胞における神経分化・発達異常の解析

GLO1 KO iPS 細胞を用いて神経細胞への分化効率や突起伸長を解析した。*GLO1* KO iPS 細胞から神経細胞への分化効率については変化がなかったが、神経細胞の突起の長さは優位に低下した。この突起伸長の低下は、カルボニルストレス阻害剤(ピリドキサミン)の添加によって改善した。これらのことから、*GLO1* 遺伝子の異常によりカルボニルストレスが亢進して、神経細胞の発達異常が起こることが明らかになった(図1)。

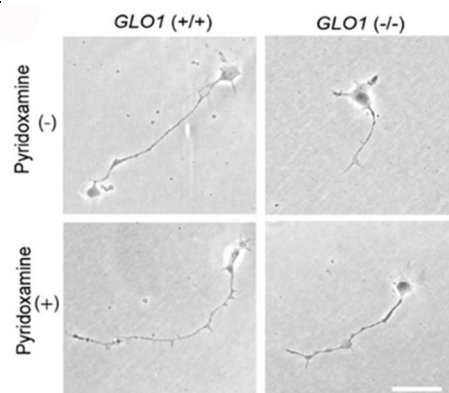


図1 *GLO1* KO iPS 細胞における神経突起伸長の低下

(2) CRMP2 の AGE 修飾部位の解析

カルボニルストレスの増加は、細胞内のタンパク質に AGE 修飾を起こす。*GLO1* KO iPS 細胞の中でカルボニルストレスによって強く AGE 修飾を受ける主要なタンパク質を質量分析により詳細に調べた結果、神経突起の伸長に関わる CRMP2 を同定した。CRMP2 は神経細胞の形態形成に関わる重要なタンパク質であり、統合失調症の関連遺伝子の一つである。この AGE 修飾された CRMP2 の構造を詳細に調べた結果、表面電荷が大きく変化すること、CRMP2 の機能発揮に重要な複合体形成部位に AGE 修飾が密集していることが明らかとなった。

(3) AGE 修飾による CRMP2 の多量体化

AGE 修飾によって CRMP2 の複合体形成が影響を受けることが考えられたため、HiRes-SEC アッセイによって CRMP2 複合体のサイズ変化への影響を解析した。その結果、修飾のない CRMP2 は 4 量体の複合体を形成していたが、AGE 修飾 CRMP2 は 4 量体よりも高分子量側で検出され、不可逆的に凝集・多量体していることが明らかとなった(図2)。この多量体は、カルボニルストレスが亢進している *GLO1* KO iPS 細胞においても検出され、更にピリドキサミン添加により多量体が軽減した。

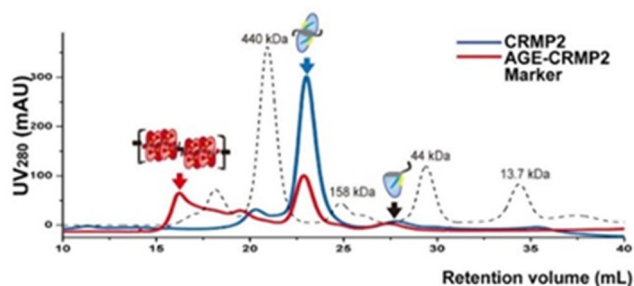


図2 AGE 修飾による CRMP2 の多量体化

(4) AGE 修飾による CRMP2 の機能低下

多量体化により、CRMP2 の機能低下が考えられたことから、CRMP2 の機能の一つである微小管の束化(微小管を束ねる活性)に注目して解析を行った。その結果、AGE 修飾 CRMP2 では微小管を束ねる活性が失われていることが明らかとなった(図3)。さらに、*GLO1* KO iPS 細胞においても束化した安定な微小管が減少し、微小管の安定性の低下および CRMP2 複合体の微小管束化機能の低下が裏付けられた。

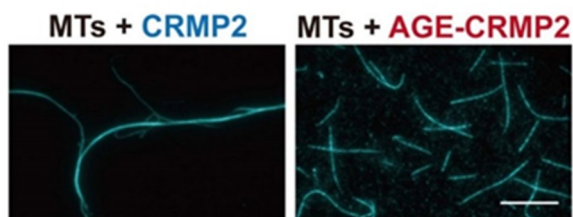


図3 AGE 修飾による CRMP2 の微小管束化活性の低下

(5) まとめ

上記の結果から、カルボニルストレスを伴う統合失調症の少なくとも脳発達期の細胞内では、AGE 修飾を強く受けた CRMP2 が不可逆的に多量体化してしまうために微小管の束化機能が失われ、神経の形態形成が障害されるという新しい分子病態の可能性が示された(図4)。

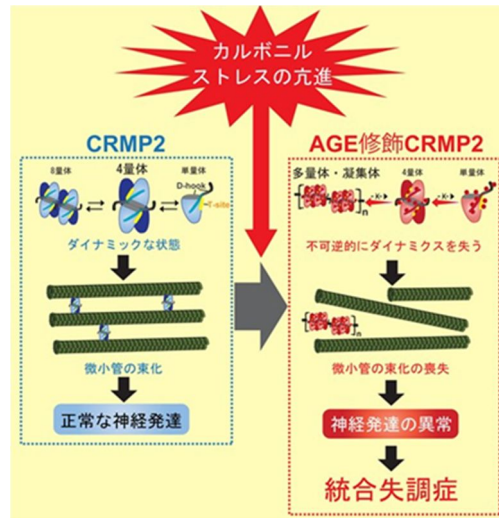


図4 AGE修飾CRMP2による神経発達異常

引用文献

- 1) Arai M, Yuzawa H, Nohara I, Ohnishi T, Obata N, Iwayama Y, Haga S, Toyota T, Ujike H, Arai M (2010) Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. Arch Gen Psychiatry 67: 589-597.
- 2) Van Lieshout RJ, Voruganti LP (2008) Diabetes mellitus during pregnancy and increased risk of schizophrenia in offspring: A review of the evidence and putative mechanisms. J Psychiatry Neurosci 33: 395.

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 Toyoshima M, Jiang X, Ogawa T, Ohnishi T, Yoshihara S, Balan S, Yoshikawa T, Hirokawa N.	4. 巻 2
2. 論文標題 Enhanced carbonyl stress induces irreversible multimerization of CRMP2 in schizophrenia pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.201900478	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 豊島学, 大西 哲生, 新井誠, 糸川昌成, 岡野栄之, 吉川武男
2. 発表標題 カルボニルストレスによる神経発達異常の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊島学, 大西 哲生, 吉川武男
2. 発表標題 iPS細胞を用いた神経発達障害の分子病態の解明
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊島学, 蔣緒光, 小川覚之, 大西 哲生, 吉原壯悟, Shabeesh Balan, 吉川武男, 廣川信隆
2. 発表標題 カルボニルストレス性統合失調症におけるタンパク質分子病態解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊島学, 大西哲生, 新井誠, 糸川昌成, 岡野栄之, 吉川武男,
2. 発表標題 神経分化・発達におけるカルボニルストレスの影響
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manabu Toyoshima, Wado Akamatsu, Tetsuo Ohnishi, Makoto Arai, Masanari Itokawa, Hideyuki Okano, Takeo Yoshikawa
2. 発表標題 Examination of the effects of carbonyl stress elicited by GL01 gene knockout in human iPS cells
3. 学会等名 CINP 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------