

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07276

研究課題名（和文）オルガネラ酸性環境の破綻に起因する細胞内変動の解明

研究課題名（英文）Cellular cholesterol homeostasis and luminal pH of the Golgi apparatus

研究代表者

曾 友深（Sou, Yu-shin）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60576221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内オルガネラのうち、分泌経路に位置するオルガネラはその内腔を酸性環境に保持しており、酸性オルガネラと総称されます。本研究課題では、神経組織におけるゴルジ体酸性環境維持機構の生理機能に焦点をあて、遺伝子改変マウスを用いた解析を遂行した。その結果、脳神経系ではゴルジ体酸性環境はSREBP2の活性化を介したコレステロール生合成に寄与していること、そして、その経路の破綻は神経細胞の形態形成を抑制することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸性オルガネラの解析において、ゴルジ体の酸性環境維持機構の生理機能やその破綻による病態生理は、そのほとんどが培養細胞を用いた解析に留まっていた。そこで、本研究課題では、ゴルジ体酸性環境維持に必須な遺伝子GPHRの遺伝子改変動物を用いて、組織レベルにおけるゴルジ体酸性環境維持機構の生理的意義とその破綻に伴うゴルジ体形態異常の病態生理的意義を明らかにした。今後はより詳細な病態発症の分子機構を明らかにすることで、ゴルジ体酸性環境の破綻に起因する病態発症機序の解明および新たな治療法の発見に繋がると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Organelles located in the secretory pathway are collectively called acidic organelles, and their lumen is maintained in an acidic condition. To gain insight into the luminal acidic pH of the Golgi apparatus in neuronal cells, we analyzed GPHR knockout mice which can be manipulating the Golgi specific acidic condition. We confirmed that loss of GPHR affects cholesterol biosynthesis via SREBP2 activation in neuronal cells. Morphological analysis provided evidence that GPHR-deficiency course the inhibition neurite outgrowth. These results suggesting that the acidic pH of the Golgi apparatus contributes to cholesterol biosynthesis via activation of SREBP2 in the neuronal cells, and that inhibition lead to suppresses neuronal morphogenesis.

研究分野：細胞生物学、組織学

キーワード：ゴルジ体 GPHR SREBP2 コレステロール

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞はエネルギー代謝、蛋白質の合成・分解、シグナル応答などの複雑な反応を効率よく行うために、区画化による空間的な調節を行っている。小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、エンドソーム・リソソーム(液胞)、ペルオキシソームなどの細胞内小器官(以下オルガネラ)はまさに脂質二重膜によって分離されている区画であり、その生理的機能を十分に発揮できるように固有のpH環境や蛋白質・脂質成分を保持している。これらオルガネラの内、分布経路やエンドサイトーシス経路に位置するゴルジ体、エンドソームやリソソームなどはその内腔を酸性環境に保持しており、酸性オルガネラと総称される。これまでの蛍光物質や改良型蛍光タンパク質などのpHインジケータを用いた解析から、酸性オルガネラ内腔pHは順行性の小胞輸送経路の流れに沿ってより酸性側に傾く勾配を形成していることが明らかにされた(Joseph et al., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010)。また、プロトンポンプ阻害剤などの酸性化阻害剤を用いた研究から、このpH勾配は正しい小胞輸送や各種シグナル応答に必須であることが明らかにされてきた。しかし、酸性オルガネラのpH制御機構を解析するうえで、酸性化阻害剤を用いた解析は1)特異性が低い故に、示された細胞の表現型が何れかの酸性オルガネラの機能阻害に由来するかの区別が困難である、また、2)細胞毒性が強いが故に断続的な処理が困難である、なので、3)組織・個体への応用が難しいことなどの問題が残っている。従って、個体や組織レベルでのオルガネラ特異的酸性環境の生理機能には未解明な部分が多く残っている。一方で、近年の遺伝学的解析から、オルガネラ酸性環境の維持機構の破綻が遠位尿管アシドーシスや大理石病などの病態発症に関与していることが報告されてきた。これらの知見はオルガネラ酸性環境が細胞の生理機能にとって必要不可欠な要素であることを示している。しかし、なぜ各々の酸性オルガネラに異なった酸性環境が必要なのか?そして、なぜオルガネラ酸性環境の破綻が種々の疾患の発症に結びつくのか?は不明であった。

2. 研究の目的

酸性オルガネラの中でも、エンドソームやリソソームの酸性環境維持に必須なプロトンポンプの阻害は、リソソーム内加水分解酵素の機能低下や様々な細胞内物質輸送の異常を引き起こし、神経変性疾患をはじめとする様々な重篤疾患を発症することが報告されている(Weisz, *Traffic*, 2003. Frances et al., *J Cell Biol.*, 2012.)。特に、V型ATPaseやCLC(クロライドチャネル)ファミリーの同定とその遺伝子改変マウスの解析は酸性オルガネラのpH調整機構やその破綻に起因する病態発症機構の解明に多大な貢献を果たしている(Marshansky et al., *Biochim Biophys Acta.*, 2014. Stölting et al., *Front Physiol.*, 2014)。一方で、エンドソーム・リソソーム系の多数の研究報告と比較して、同じ酸性オルガネラであるゴルジ体のpH調整機構を不活性化した報告はごく少数であり、そのモデルマウスすら確立されていない。そこで、本研究課題では、ゴルジ体の酸性環境を組織レベルで解析するために、ゴルジ体酸性環境維持に必須なアニオンチャネルGPHR(Golgi pH regulator)に着目し(Maeda et al., *Nat Cell Biol*, 2008)、その遺伝子改変マウスの解析を遂行した。そして、その結果から、組織、特に中枢神経組織におけるゴルジ体酸性環境の生理および病態生理的意義を導き出すことを目的とした。

3. 研究の方法

ゴルジ体内腔酸性環境の重要性およびその破綻による細胞内変動の解明が病態発症機序を解明につながると想定し、神経系特異的GPHR欠損マウス(GPHR cKO)を作製した。作製したマウスを形態学、生化学および電気生理的解析を包括的に解析した。また、GPHR欠損細胞をCRISPR-Cas9システムを用いて作製し、ゴルジ体酸性環境破綻に起因する細胞内変動の分子機構を解析した。

4. 研究成果

小脳神経系特異的GPHR欠損マウスの解析

ゴルジ体が機能を発揮する最適環境に内腔の酸性環境を必要とすることは既に明らかとなっていたが、この酸性環境維持機構が神経回路レベルにどのような役割を果たすか未解明であった。加えて、ゴルジ体の形態異常(小胞化・断片化)が筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病やクロイツフェルトヤコブ病の病巣の神経細胞において観察されている(Mourelatos, *PNAS*, 1990., Fujita et al., *Acta Neuropath.*, 2006. Sakura et al., *Acta Neuropath.*, 2000. Stieber et al., *Acta Neuropath.*, 1998.)。つまり、神経細胞におけるゴルジ体形態と神経変性に相関あることが示唆されている。そこで、GPHR cKOと小脳プルキンエ細胞とバスケット細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するGluD2-Creマウスを交配し、小脳神経系特異的GPHR欠損マウス(GPHR cKO;G2)を作出し、形態学および電気生理学的手法を用いて表現型解析を行った。GPHR cKO;G2は外見的異常は観察されなかったが、生後45日から協調運動障害を示し、加齢とともに重篤化した。また、

同週齢マウス小脳の形態学的解析からプルキンエ細胞の脱落が加齢とともに増加することが確認された。つまり、GPHR cKO;G2 は小脳プルキンエ細胞の脱落に起因した神経変性疾患様症状を呈することが明らかとなった。加えて、グリア細胞マーカーを用いた免疫染色解析から、GPHR cKO;G2 の小脳全体に活性型マイクログリアの増加が観察された。これの結果は神経変性の特徴の一つであるグリオシスの増大していることを示す。さらに、脱落前のプルキンエ細胞をゴルジ体マーカーの免疫染色した結果、ゴルジ体の特徴的構造に変化が観察され、電子顕微鏡を用いた超微形態解析ではゴルジ体の断片化が認められた (図1)。これらの結果は、ゴルジ体の異常が神経変性を引き起こすことを示唆している。

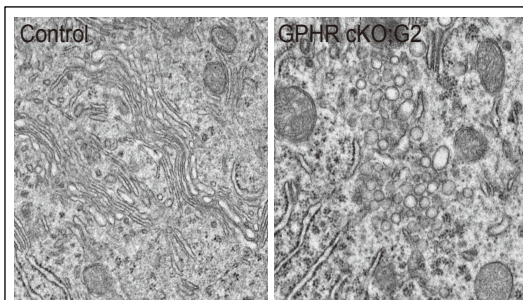


図1 Control(左)と GPHR f/f;G2(右)由来のプルキンエ細胞の電子顕微鏡画像
GPHRf/f で観察される典型的なゴルジ体構造が GPHR f/f;G2では小胞化している。

神経細胞におけるゴルジ体は膜タンパク質の軸索、樹状突起への極性輸送に寄与していると報告されている。そこで、プルキンエ細胞の軸索および樹状突起の形態学的解析を行った。GPHR 欠損プルキンエ細胞の樹状突起には目立つ形態的異常は観察されなかったが、軸索が明確に肥大化していた。また、プルキンエ細胞は深部小脳核の神経細胞に抑制性のシナプスを形成する。そこで、深部小脳核の神経細胞周囲を観察した結果、軸索肥大に加え、シナプスの脱落が観察された(図2)。これらの結果はゴルジ体の酸性環境の破綻は軸索やシナプスの異常を引き起こすことを示している。

続いてプルキンエ細胞への入力線維を解析した。分子層のバスケット細胞はプルキンエ細胞に抑制性シナプスを形成する。この時バスケット細胞軸索はプルキンエ細胞の軸索起始部を取り囲み、パンソーと呼ばれる構造を構築する。そこで、パンソー構造を形態学的に解析した結果、GPHR cKO;G2 ではパンソー構造の消失が確認された。つまり、バスケット細胞からの抑制性シナプスが欠如していること示している。加えて、電気生理的解析から、GPHR cKO;G2 ではバスケット細胞からプルキンエ細胞への抑制的入力欠落していることが明らかとなった。

先行研究では発達期の小脳ではプルキンエ細胞への抑制的入力の減少は下オリーブ核由来の登上線維の興奮性シナプスの刈り込み阻害を引き起こすことが報告されている (Nakayama et al., neuron.,2012)。そこで、生後 45 日目の GPHR cKO;G2 の小脳で登上線維シナプスの解析を行った、その結果、通常では樹状突起にシナプスを作る登上線維が、GPHR 欠損プルキンエ細胞では細胞体にまでシナプスを形成していた (図3)。これらの結果は適切な神経細胞の形態および神経回路を維持する上でゴルジ体の酸性環境が重要な役割を担っていることを示している。

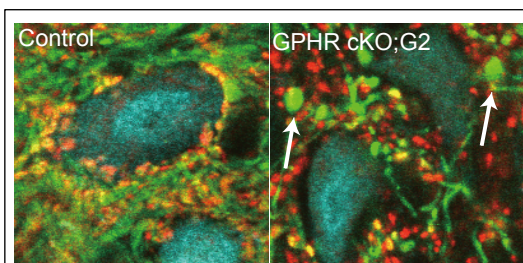


図2 小脳核の3重染色画像
カルビンジン(緑、プルキンエ細胞軸索)、vGAT(赤、シナプス小胞)と NeuN(シアン、小脳核神経細胞)の3重染色。矢印は肥大化した軸索を示す。

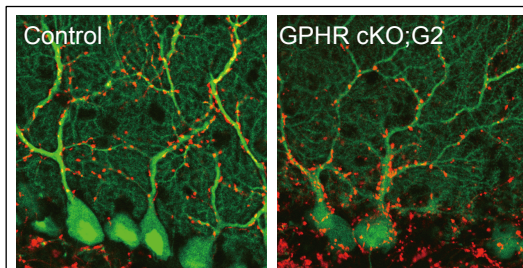


図3 カルビンジン(緑、プルキンエ細胞)と vGlut2(赤、登上シナプス)の2重染色像。
樹状突起上に観察される登上線維由来シナプス(赤ドット)が GPHRcKO;G2 ではプルキンエ細胞の細胞体に観察された。

中枢神経系特異的 GPHR 欠損マウス

GPHR cKO と Nestin-Cre トランスジェニックマウスを交配し、中枢神経系特異的 GPHR 欠損マウス(GPHR cKO;Nes)を作出した。GPHR cKO;Nes はメンデルの法則に従って出生するが、生後 13 日までに死亡する。それ故に生後 10 日ほどのマウスを中心に解析を進めた。GPHR cKO;Nes の個体はコントロールと比較すると有意に小さく、そのマウス脳切片のニッスル染色から様々な脳部位の萎縮が認められた(図4)。次いで、この脳萎縮が神経細胞死によって引き起こされたか否かを検証するために、TUNEL 解析を行った。その結果、GPHR cKO;Nes の大脳皮質には多数の TUNEL 陽性細胞が確認された。さらに、大脳皮質ではマイクログリアやアストロサイトの増加、グリオシスが認められた。これらの結果は GPHR cKO;Nes では神経変性を起因した大規模な脳萎縮が引き起こされていることが明らかとなった。次いで、神経細胞死とゴ

ルジ体の相関を解析するために、脱落前の神経細胞の超微形態解析を行った。その結果、GPHR cKO;Nes マウス脳では様々大脳皮質や海馬 CA1 を含む様々な神経細胞でゴルジ体の形態異常を確認した。これらの結果は上記の小脳特異的 GPHR 欠損マウスと同様にゴルジ体の異常が神経変性に先行して起こり、その結果が神経変性を誘発することを示している。

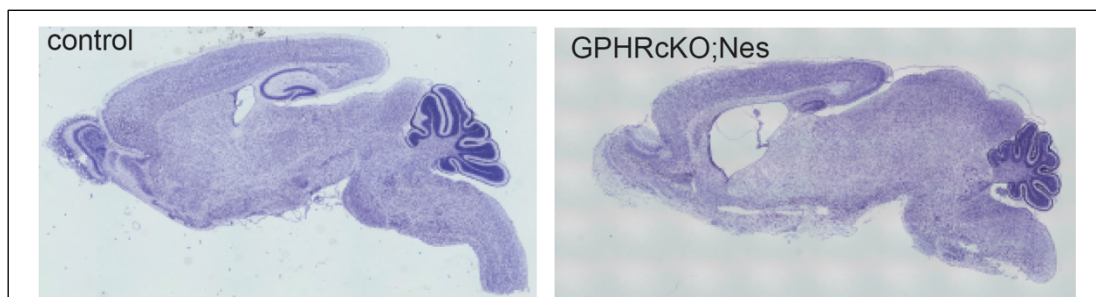


図4 ニッスル染色像
GPHRcKO;Nes では様々な脳部位で萎縮が認められる。

神経細胞におけるゴルジ体異常に起因する細胞内変動の解明

神経細胞におけるゴルジ体の異常がどのような細胞内変動を引き起こすかを解明するため、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、GPHR cKO;Nes ではコレステロール生合成に関連する遺伝子群の発現低下が認められた。これら酵素群の発現は転写因子 SREBP2 の制御を受ける。通常、SREBP2 は小胞体に局在しているが、細胞内コレステロール濃度の低下に伴い、誘導因子である SCAP によってゴルジ体に運搬され、ゴルジ体局在酵素による N 末端側の切断を受ける。切断された N 末端側が活性型 SREBP2 となり、核移行し、その標的遺伝子の転写を活性化する(Luo et al., *Nat Rev Mol cell Biol.*, 2020)。マイクロアレイ解析の結果を確かめるため、定量 PCR による SREBP2 の標的遺伝子群の転写を検証した。その結果、GPHR cKO;Nes 脳における SREBP2 の転写活性はコントロールと比較して有意に下がることが確認された(図5)。次いで、GPHR cKO;Nes 脳に含まれるコレステロールを測定した結果、コントロールと比較して有意に低かった(図6)。これらの結果はゴルジ体の異常が SREBP2 の活性化を阻害する、そして、誘発された脳内コレステロールの低下が神経変性の一因になることを示唆している。

脳内コレステロールは神経細胞の適切な形態形成・保持やシナプス伝達に必要と報告されている(Martin et al., *EMBO Rep.*, 2014)。そこで、ゴルジ体の異常に起因した SREBP2 を介したコレステロール生合成低下の分子機構の解明のため、神経芽細胞腫細胞(N2A)細胞に RISPR-Cas9 システムを用いて GPHR 欠損株(GKO)を作製した。作出した GKO N2A 細胞は GPHR 欠損脳と同様に SREBP2 の転写活性が低く、また細胞内コレステロール量も低かった。N2A 細胞はオールトランスレチノイン酸(RA)を処理することで神経分化が誘導され神経突起を伸ばす性質をもつ。そこで、作出した GPHR KO N2A に RA 処理した結果、神経突起の伸長能力がコントロールと比較して有意に低かった。さらに、GPHR KO N2A に活性型 SREBP2 を強制発現すると、SREBP2 の標的遺伝子群の転写や細胞内コレステロール量の低下が回

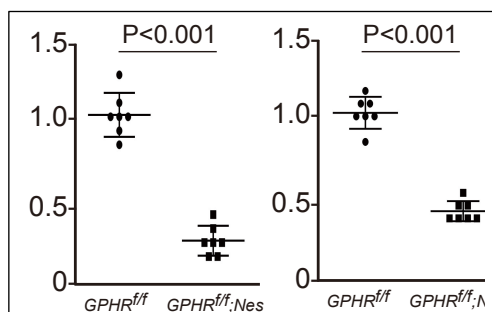


図5 SREBP2 標的遺伝子の発現
表記した遺伝型マウス脳から RNA 抽出と cDNA 合成し、定量 PCR によって解析した。

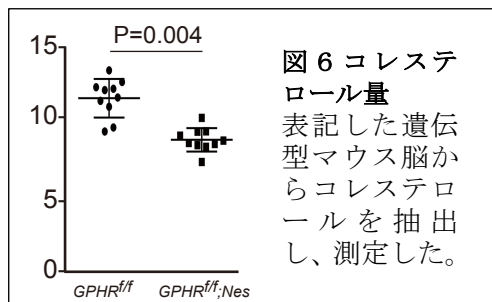


図6 コレステロール量
表記した遺伝型マウス脳からコレステロールを抽出し、測定した。

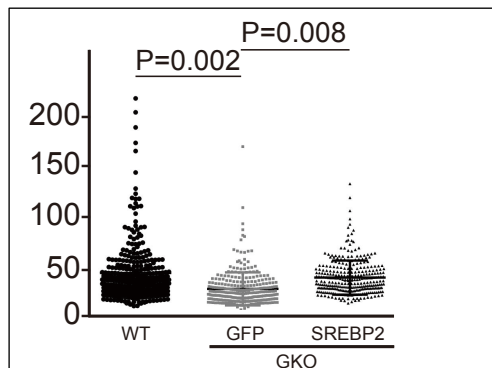


図7 神経突起の伸長
GPHR 欠損細胞にアデノウイルスで GFP と活性型 SREBP2 を発現させた後、48 時間 RA 処理し、その突起の長さを測定した。

復した。そして、GPHR KON2A で認められた神経突起伸長の抑制は活性型 SREBP2 を強制発現によりコントロールと同等レベルまで回復した (図 7)。これらの結果は、神経細胞における GPHR を介したゴルジ体酸性環境の維持機構は神経形態の形成に寄与することを示している。

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 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 nchez-Martin P, Sou YS, Kageyama S, Koike M, Waguri S, Komatsu M.	4. 巻 21
2. 論文標題 NBR1-mediated p62-liquid droplets enhance the Keap1-Nrf2 system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO Reports	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） 10.15252/embr.201948902.	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 Faruk MO, Ichimura Y, Kageyama S, Komatsu-Hirota S, El-Gowily AH, Sou YS, Koike M, Noda NN, Komatsu M.	4. 巻 297
2. 論文標題 Phase-separated protein droplets of amyotrophic lateral sclerosis-associated p62/SQSTM1 mutants show reduced inner fluidity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 101405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101405	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 該当する
1. 著者名 Kageyama S, Gudmundsson SR, Sou YS, Ichimura Y, Tamura N, Kazuno S, Ueno T, Miura Y, Noshiro D, Abe M, Mizushima T, Miura N, Okuda S, Motohashi H, Lee JA, Sakimura K, Ohe T, Noda NN, Waguri S, Eskelinen EL, Komatsu M.	4. 巻 12
2. 論文標題 p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-020-20185-1	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 該当する
1. 著者名 Sou YS, Kakuta S, Kamikubo Y, Niisato K, Sakurai T, Parajuli LK, Tanida I, Saito H, Suzuki N, Sakimura K, Maeda Y, Kinoshita T, Uchiyama Y, Koike M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Cerebellar Neurodegeneration and Neuronal Circuit Remodeling in Golgi pH Regulator-Deficient Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eNEURO	6. 最初と最後の頁 0427-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0427-18.2019.	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 Takahashi SS, Sou YS, Saito T, Kuma A, Yabe T, Sugiura Y, Lee HC, Suematsu M, Yokomizo T, Koike M, Terai S, Mizushima N, Waguri S, Komatsu M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Loss of autophagy impairs physiological steatosis by accumulation of NCoR1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance.	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) 10.26508/lisa.201900513.	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 曾 友深
2. 発表標題 ゴルジ体酸性環境が担う適切な糖鎖修飾の変化がリソソームに与える影響
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 曾 友深
2. 発表標題 ゴルジ体酸性環境による糖鎖修飾の制御メカニズム
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曾 友深
2. 発表標題 小脳神経系におけるゴルジ体酸性環境の重要性
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾 友深
2. 発表標題 小脳神経系におけるゴルジ体酸性環境の重要性(神経変性とゴルジ体の変性)
3. 学会等名 日本解剖学会第108回関東支部学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

順天堂大学大学院 医学研究科 神経機能構造学講座 医学部 神経生物学・形態学講座
<https://juntendo-cellbio.jp/>

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