

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07386

研究課題名(和文) ペルオキシソーム欠損症における代謝異常と病態発症機構

研究課題名(英文) Metabolic abnormality and pathogenesis of peroxisome biogenesis deficiency

研究代表者

阿部 雄一 (Abe, Yuichi)

九州大学・基幹教育院・学術研究員

研究者番号：00529092

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)：ペルオキシソーム形成異常症は脳中枢神経系において重度の障害を呈する。我々はいくつかのペルオキシソーム形成異常症モデルマウスを用いた解析から、小脳の脳由来神経栄養因子(BDNF)およびその受容体・TrkB-T1の発現異常が原因であることを見出している。ペルオキシソーム欠損グリア細胞の実験から、BDNFの発現異常はサイトゾルに誤局在したカタラーゼによるサイトゾルの還元化が原因であることを突き止めた。さらに、薬剤誘導性ペルオキシソーム欠損マウスを用いた解析から、生体マウスにおいてペルオキシソーム欠損を誘導すると記憶障害を呈することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペルオキシソーム形成異常症に関して、我々はBDNF-TrkBシグナル伝達系異常を介した小脳形態障害の分子機構を世界で初めて解明してきた。本研究成果は、ペルオキシソーム欠損により誘発される細胞質還元化が及ぼすBDNF発現異常を明らかにし、未解明であったペルオキシソーム形成異常症の病態発症機構において、代謝障害を起因とする中枢神経系障害の分子機構を明らかにした重要な知見である。さらに、ペルオキシソーム機能が成体マウス海馬における記憶形成に必須であることを示し、成体脳における新たなペルオキシソーム機能を明らかにした重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Peroxisome is a subcellular organelle essential for various metabolic reactions. Peroxisome biogenesis disorders (PBDs) manifest as neurological deficits in the brain, including abnormal cerebellum development. We previously reported that an elevated level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) together with the enhanced expression of TrkB-T1, resulting in abnormal development of Purkinje cells. In this research, we found that cytosolic reductive states caused by a mislocalized catalase in the peroxisome-deficient cells induce the elevation in BDNF secretion. Peroxisomal functions in adulthood brain have been little investigated. To induce the peroxisome deficiency in adulthood brain, we established tamoxifen-inducible conditional Pex2-knockout mouse. Peroxisome deficiency in the conditional Pex2-knockout adult mouse brain induces the upregulated expression of BDNF and its inactive receptor TrkB-T1 in hippocampus, which notably results in memory disturbance.

研究分野：生化学

キーワード：ペルオキシソーム BDNF 海馬 還元化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは酵母から哺乳動物まで広く存在する一重膜構造からなるオルガネラであり、極長鎖脂肪酸(炭素数22以上)の酸化、エーテル型リン脂質や胆汁酸の生合成、過酸化水素の分解など様々な代謝反応が行われている。ペルオキシソームの形成は peroxin (PEX) と呼ばれるタンパク質群によって行われている。PEX 遺伝子欠損は上記代謝反応をはじめ多岐にわたるペルオキシソーム代謝反応の酵素タンパク質の輸送障害を引き起こし、Zellweger 症候群(ZS)をはじめとするペルオキシソーム形成異常症を発症する。ZS は極度の筋緊張低下などの症状を呈し、生後数週間から1年以内で死に至る重篤な疾患である。様々な器官において重度の障害が観察され、特に脳中枢神経系では、神経細胞の遊走障害やブルキンエ細胞の樹状突起形成障害などが観察される。

ZS の臨床生化学的異常として、エーテル型リン脂質であるプラスマローゲンや多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸(DHA)の減少と同時に、極長鎖脂肪酸の蓄積などが観察される。これらペルオキシソーム代謝異常が高次細胞機能に影響を与え病態発症を導くと考えられている。したがって、ペルオキシソーム形成不全症の病態発症機構解明には異常代謝産物と細胞機能障害との関連性の解明は必須である。

一方、ZS の病態発症の分子機構解明に向け、当研究室を含めた数グループにより ZS モデルマウスの PEX ノックアウトマウスが作製された。PEX ノックアウトマウスは中枢神経系に ZS と同様の病態を示すが、病態発症の分子機構解明には至っていなかった。最近、研究代表者らは小脳ブルキンエ細胞の形態異常が脳由来神経栄養因子(BDNF)およびその不活性型受容体(TrkB-T1)の発現増加を原因としていることを見出した。しかしながら、BDNF の発現異常に関して、ペルオキシソーム欠損による様々な代謝障害との関連性は示されておらず、その詳細な分子機構は未解明であった。

ZS をはじめとするペルオキシソーム形成異常症の病態から、発達過程においてペルオキシソーム機能の重要性は明らかであった。一方で、成体におけるペルオキシソームの機能や重要性に関してはこれまでほとんど解明されていない。培養細胞では長期培養によりペルオキシソームタンパク質であるカタラーゼのサイトゾルへの誤局在が増加することが報告されており、加齢に伴う中枢神経系障害とペルオキシソーム輸送障害と関連性解明は重要な研究課題の一つであった。

2. 研究の目的

本研究では、ペルオキシソーム形成障害による病態発症の分子機構解明を目的として、以下の2課題を設定した。

- (1) BDNF 発現異常の分子機構解明
- (2) 成体マウスにおけるペルオキシソーム欠損が誘発する中枢神経への影響

3. 研究の方法

(1) ペルオキシソーム欠損性グリア細胞を用いた BDNF 発現異常の分子機構解明

ラットグリア細胞・RCR-1細胞においてペルオキシソーム欠損細胞を作成した。神経細胞との共培養実験を行い、軸索形成異常の原因が BDNF の分泌異常であることを見出したのち、各ペルオキシソーム代謝異常と BDNF 発現異常との関連性を検証した。

(2) 薬剤誘導性 Pex2 コンディショナルノックアウトマウスの中枢神経系解析

タモキシフェン誘導性 Cre/loxP システムを利用した Pex2 コンディショナルノックアウト(cK0)マウスを作成した。成体マウスにタモキシフェンを投与して Pex2 のノックアウトを引き起こし、ペルオキシソーム欠損を誘導した。行動実験や、生化学的解析および組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) ペルオキシソーム欠損性グリア細胞を用いた BDNF 発現異常の分子機構解明

ラットグリア細胞・RCR-1 に対して Pex5 および Pex14 のドミナントネガティブ体を安定発現させ、ペルオキシソーム欠損細胞を作成した。ラット海馬神経初代培養細胞との共培養により、神経軸索の分岐増加を導くことを見出した。遺伝子発現解析の結果、BDNF の mRNA 発現増加による BDNF の分泌増加がその原因であることを明らかにした。BDNF 発現増加の分子機構解明を目的として、各種ペルオキシソーム代謝反応に着目して解析を試みた。エーテル型リン脂質や極長鎖脂肪酸との関連性は見いだせなかった。一方、カタラーゼ阻害剤である 3-amino-1,2,4-triazole 処理によりペルオキシソーム欠損性 RCR-1 細胞における BDNF mRNA 発現量が低下した。ペルオキシソーム欠損細胞ではサイトゾルにカタラーゼが安定的に局在することから、サイトゾル局在のカタラーゼの活性 BDNF 発現低下を導くことを見出した。LC-MS/MS による代謝産物の解析により、サイトゾル局在性カタラーゼがサイトゾルの NADH やグルタチオン等の還元性代謝産物の増加を明らかにした(J. Biol. Chem. (2020), 295, 5321-5334)。以上の結果から、サイトゾルに誤局在したカタラーゼがサイトゾルの還元化を導き、BDNF の発現増加を誘発することが示唆

された。(図1)

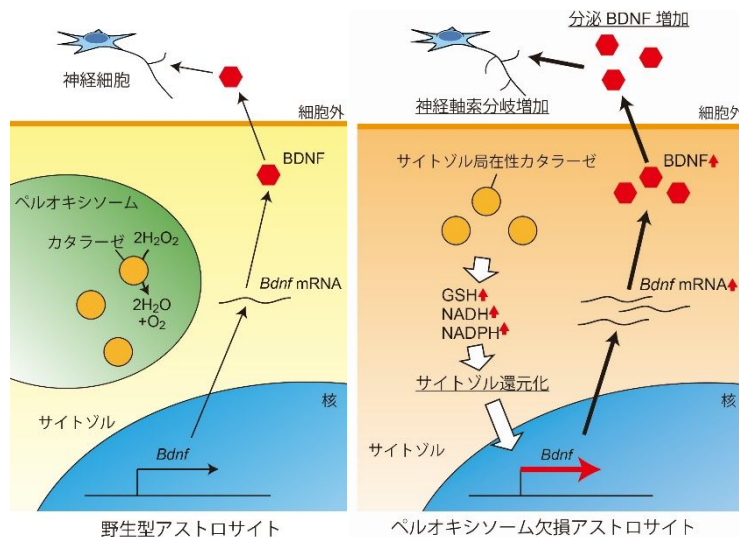


図1. ペルオキシソーム欠損細胞のサイトソル還元化による BDNF の発現増大と分泌
 (左図) 野生型細胞ではペルオキシソーム内でカタラーゼが H_2O_2 の分解を行っている。(右図) ペルオキシソーム欠損細胞ではサイトソルにカタラーゼが安定的に局在し、サイトソルを還元化することで *Bdnf* mRNA の発現と分泌の増加を導く。

(2) 薬剤誘導性 Pex2 コンディショナルノックアウトマウスの中樞神経系解析

成体マウスにおけるペルオキシソーム機能を検証するため、タモキシフェン誘導性 Pex2 コンディショナルノックアウト (cK0) マウスを作成した。タモキシフェン投与後のペルオキシソーム形成障害が誘発され、各種ペルオキシソーム代謝産物の異常が見出された。行動実験により Pex2cK0 マウスは記憶障害を呈することが明らかとなった。記憶障害は海馬への影響が考えられたことから、免疫組織染色を行ったところ、海馬神経幹細胞が減少していることを見出した。さらに、BDNF および TrkB-T1 の発現増加が観察された (Front. Cell Dev. Biol. (2020), 8, 567017)。以上の結果から、成体マウスにおいてペルオキシソーム機能は記憶機能維持に必須であり、ペルオキシソーム形成異常は BDNF-TrkB 系シグナル伝達障害を介した神経幹細胞死を導くことを明らかにした。(図2)

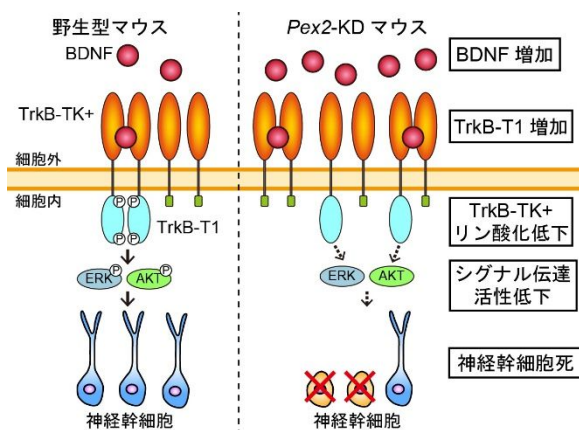


図2. 薬剤誘導性 Pex2-KD マウス海馬における BDNF-TrkB シグナル伝達障害による神経幹細胞の細胞死

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Honsho Masanori, Abe Yuichi, Imoto Yuuta, Chang Zee-Fen, Mandel Hanna, Falik-Zaccai Tzipora C., Fujiki Yukio	4. 巻 21
2. 論文標題 Mammalian Homologue NME3 of DYNAMO1 Regulates Peroxisome Division	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8040 ~ 8040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21218040	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 Abe Yuichi, Nishimura Yoshiki, Nakamura Kaori, Tamura Shigehiko, Honsho Masanori, Udo Hiroshi, Yamashita Toshihide, Fujiki Yukio	4. 巻 8
2. 論文標題 Peroxisome Deficiency Impairs BDNF Signaling and Memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 567017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.567017	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 Abe Yuichi, Honsho Masanori, Kawaguchi Ryoko, Matsuzaki Takashi, Ichiki Yayoi, Fujitani Masashi, Fujiwara Kazushirou, Hirokane Masaaki, Oku Masahide, Sakai Yasuyoshi, Yamashita Toshihide, Fujiki Yukio	4. 巻 295
2. 論文標題 A peroxisome deficiency-induced reductive cytosol state up-regulates the brain-derived neurotrophic factor pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5321 ~ 5334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011989	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 Fujiki Yukio, Abe Yuichi, Imoto Yuuta, Tanaka Akemi J., Okumoto Kanji, Honsho Masanori, Tamura Shigehiko, Miyata Non, Yamashita Toshihide, Chung Wendy K., Kuroiwa Tsuneyoshi	4. 巻 133
2. 論文標題 Recent insights into peroxisome biogenesis and associated diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 236943 ~ 236943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.236943	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 該当する

1. 著者名 Takahashi Takanori、Honsho Masanori、Abe Yuichi、Fujiki Yukio	4. 巻 166
2. 論文標題 Plasmalogen mediates integration of adherens junction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 423 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz049	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 Honsho Masanori、Dorninger Fabian、Abe Yuichi、Setoyama Daiki、Ohgi Ryohei、Uchiumi Takeshi、Kang Dongchon、Berger Johannes、Fujiki Yukio	4. 巻 166
2. 論文標題 Impaired plasmalogen synthesis dysregulates liver X receptor-dependent transcription in cerebellum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 353 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz043	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 該当する

1. 著者名 Kim Youn Jung、Abe Yuichi、Kim Young-Jae、Fujiki Yukio、Kim Jung-Wook	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of a Homozygous PEX26 Mutation in a Heimler Syndrome Patient	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 646 ~ 646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12050646	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 該当する

〔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 阿部雄一、本庄雅則、伊藤竜太、藤谷昌司、中山啓子、大城遼平、中山敬一、山下俊英、藤木幸夫
2. 発表標題 ペルオキシソーム形成異常による小脳形態形成障害の病態発症機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部 雄一, 本庄 雅則, 藤木 幸夫
2. 発表標題 ペルオキシソーム欠損性アストロサイトにおける代謝障害とBDNF異常発現
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部雄一、田村茂彦、本庄雅則、藤木幸夫
2. 発表標題 成体マウスにおけるペルオキシソーム機能欠損は記憶障害を惹起する
3. 学会等名 令和3年度日本生化学会 九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部雄一、藤木幸夫
2. 発表標題 ペルオキシソームの形態形成・分裂障害はリン脂質代謝異常をきたす
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Abe, Y., Tamura, S., Honsho, M., and *Fujiki, Y.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature, Berlin Heidelberg New York.	5. 総ページ数 25
3. 書名 A mouse model system to study peroxisomal roles in neurodegeneration of peroxisome biogenesis disorders. In: Lizard, G. (ed.) Peroxisomes in Neurodegenerative Diseases,	

〔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
---------	---------