

令和 5 年 4 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03255

研究課題名（和文）オルガネラコミュニケーションの破綻による神経変性疾患の発症機構

研究課題名（英文）Mechanisms of neurodegenerative disorders caused by defects in organelle communication

研究代表者

白根 道子（Shirane, Michiko）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・教授

研究者番号：90398082

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：オルガネラコンタクト(MCS)複合体について、エンドソーム成熟やリポファジーなどの新たな細胞内機能を明らかにした。またその責任タンパク質であるPDZD8の遺伝子欠損マウスを作製し、脳のリピドーム解析によりコレステロールエステルの異常蓄積を見だし、それが脂質輸送を介するリポファジーの不全に起因することを明らかにした。また行動バッテリー解析により、PDZD8の遺伝子欠損マウスが認知機能や情動に異常を来すことを見いだした。ヒトのPDZD8遺伝子変異は、知的障害などの脳機能障害と関連することが知られているため、PDZD8は脳内脂質のクリアランスにより脳機能に寄与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患において脳内の脂質異常の関与が示唆されており、PDZD8複合体はそれらの機構解明のカギとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we revealed novel functions of intracellular organelle membrane contact sites (MCSs), such as endosome maturation and lipophagy. In addition, we generated mice deficient in the gene for PDZD8 and found abnormal accumulation of cholesterol esters in the brain by lipidome analysis, which was attributed to defective lipophagy mediated by lipid transport. In addition, we found that PDZD8 deficient mice showed abnormal cognitive and emotional behaviors by behavioral battery analysis. The mutations in human PDZD8 gene are known to be associated with brain dysfunction including intellectual disability. Therefore, PDZD8 plays a role in suppression of abnormal accumulation of lipids in the brain by promoting lipophagy, thus contributes to brain function.

研究分野：細胞生物学・神経科学

キーワード：オルガネラ 脳 脂質

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性痙性対麻痺 (Hereditary spastic paraplegia, HSP) は、皮質脊髄路の運動神経が損傷する神経変性疾患である。その主な原因としてヘアピンドメインを有する一群の小胞体 (ER) 膜構造制御タンパク質の不全がよく知られているが、さらに近年 ER と後期エンドソーム (LE) 間の膜接触部位 (Membrane contact site, MCS) の関連が示唆されている。プロトルーディンは細胞内輸送制御タンパク質で軸索伸長を促進し [Shirane, *Science*, 2006]、その変異は HSP の原因となる [Hashimoto, *J. Biol. Chem.*, 2014]。プロトルーディン複合体は ER-LE 間 MCS 繫留に中心的な役割を果たす [Raiborg, *Nature*, 2015]。MCS の個体における生理機能には未知の部分が多いため、本研究で ER 膜構造と ER-LE MCS が神経機能にどのように関与しているのか明らかにし、神経変性疾患の発症機構の解明に繋げることを目標とした。

### 2. 研究の目的

MCS の主要な機能として脂質輸送、細胞内カルシウムイオン調節、オルガネラ動態制御がよく知られており、われわれはこれらの活性評価系を確立した。またプロトルーディンのプロテオミクス解析を行い、ER-LE MCS 複合体の構成因子を複数同定した。本研究では、これらの因子の分子機能を上記評価系により明らかにする。さらに ER-LE MCS 複合体構成因子の変異マウス神経細胞を用いて、MCS や軸索の異常をイメージング解析し、その結果を変異マウス行動と関連づける。そして ER 構造不全と ER-LE MCS 不全との関連機構を明らかにし、神経変性疾患の原因解明を目指す。

### 3. 研究の方法

ER-LE MCS 複合体の構成因子の分子機能と生理機能の解析

(1) MCS の形成能と代表的な機能 (2) 脂質輸送、(3) 細胞内カルシウムイオン調節、(4) オルガネラ動態制御について、われわれは独自に活性評価系を確立した。本研究では独自に同定した ER-LE MCS 複合体因子について、これらの解析を行う。また (5) 変異マウスの神経系表現型を解析し、MCS 機能と神経変性疾患との関連を明らかにする。

- (1) MCS 形成能: Split-GFP の細胞内イメージング解析
- (2) 脂質輸送活性: in vitro リポソーム FRET システムによる解析
- (3) ER 内カルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) の測定: G-CEPIA-cr を用いた  $Ca^{2+}$  ライブイメージング
- (4) オルガネラ動態のイメージング: 神経細胞の TEM 解析, FIB-SEM 解析
- (5) MCS の個体における生理機能: 変異マウスの行動バッテリー解析、脳の IHC 解析

### 4. 研究成果

本研究において、オルガネラコンタクト繫留複合体因子について、エンドソーム成熟やリポファジー促進などの新たな細胞内機能を明らかにした。またその責任タンパク質である PDZD8 の遺伝子欠損マウスを作製し、脳のリポドーム解析によりコレステロールエステルの異常蓄積を見だし、それが脂質輸送を介するリポファジーの不全に起因することを明らかにした。また行動バッテリー解析により、PDZD8 の遺伝子欠損マウスが認知機能や情動に異常を来すことを見いだした。近年アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患において脳内の脂質異常の関与が示唆されており、PDZD8 複合体は、それらの機構解明のカギとなる (図 1)。

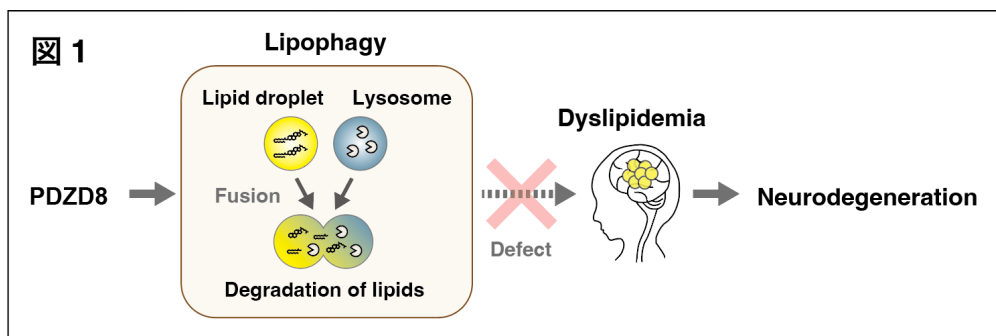


図 1 リポファジーによる脂質分解と脳機能制御の関連

ヒトの PDZD8 遺伝子変異は、知的障害などの脳機能障害と関連することが知られている。本研究により、PDZD8 遺伝子欠損マウスの脳において、リポファジーの不全により脂質が異常蓄積することを見いだした。よって PDZD8 はリポファジーの促進により脳内脂質の異常蓄積を抑制し、正常な脳機能の維持に働いていることが明らかになった。

図 2

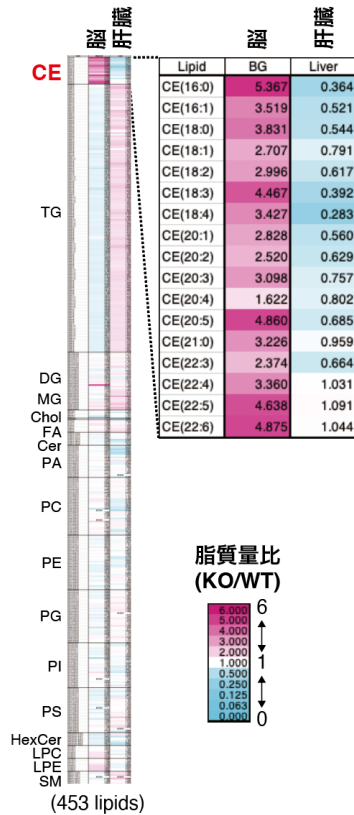


図 3

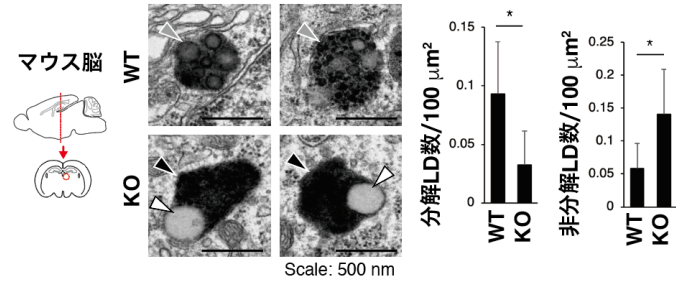


図 4

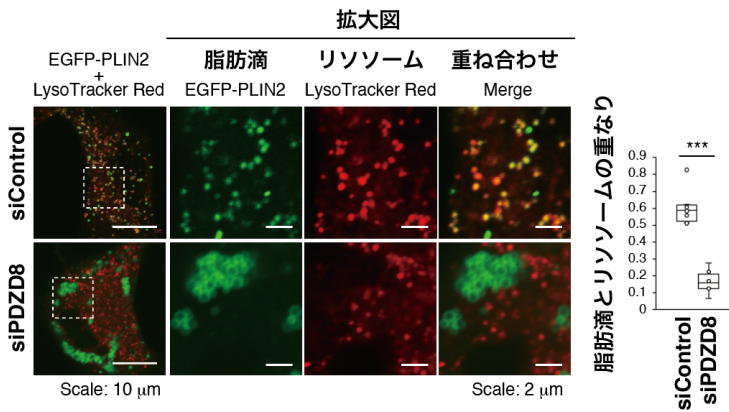


図 5

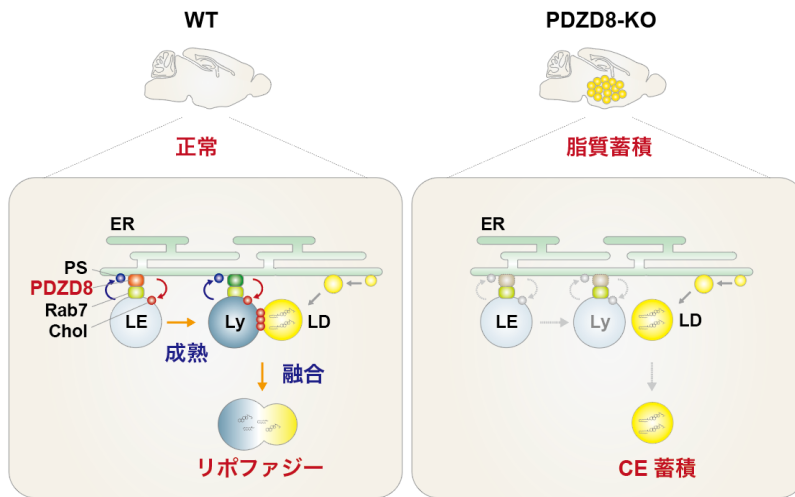


図 2 マウス組織のリピドーム解析

野生型(WT)および PDZD8 欠損(KO)マウスの脳と肝臓より脂質を抽出し、リピドーム解析を行い、脂質量比(KO/WT)をヒートマップで示した。脳で CE が異常に増加している。肝臓では脂質異常は認められない。WT に比べて KO で増加している脂質を赤系色、減少している脂質を青系色で表示。

図 3 マウス脳のリポファジー解析

WT と PDZD8-KO マウスの脳のリポファジーを、電子顕微鏡(TEM)により解析した。WT では脂肪滴がリソソームと融合して灰色で小さくなり分解されている(グレー矢頭)が、KO では脂肪滴(白矢頭)はリソソーム(黒矢頭)と融合せず非分解のままである。脳の観察領域(左)、リポファジー

一の TEM イメージ(中)、リポファジーの統計解析結果(右)を示す。

#### 図 4 神経細胞のリポファジー解析

ラット褐色脂肪細胞腫 PC12 細胞においてコントロール(siControl)または PDZD8(siPDZD8)の発現抑制を行い、NGF 添加により神経分化誘導を行い、脂肪滴マーカー (EGFP-PLIN2、緑) とリソソームマーカー (LysoTracker Red、赤) のイメージング解析を行った。コントロール細胞では脂肪滴とリソソームは融合しているものが多いが、PDZD8 発現抑制細胞では両者が分離しており融合不全が多く認められた。共焦点顕微鏡イメージ(左)と、ピアソンの相関係数の解析結果(右)を示す。

#### 図 5 PDZD8 欠損マウス脳における脂質の異常蓄積と PDZD8 によるリポファジー促進機構

PDZD8 欠損(KO)マウスの脳では脂質の異常蓄積が認められる(上)。その原因メカニズムを調べる中で、PDZD8 によるリポファジーの促進作用を見いだした(左下)。PDZD8 は脂質輸送を介してリソソーム成熟を促進する。また PDZD8 は脂肪滴とリソソームの融合を促進する。その結果、PDZD8 はリポファジーを促進し、細胞内の異常な脂質蓄積の抑制に働く。よって PDZD8-KO マウスの脳では、リポファジー不全により脂質分解が遅延し、CE が蓄積していると示唆された(右下)。

#### 原著論文

1. Kurihara Y, Kotone M, Nagi M, Shoji H, Miyakawa T, and \***Shirane M**. PDZD8-deficient mice manifest behavioral abnormalities related to emotion, cognition, and adaptation due to dyslipidemia in the brain. *Mol Brain*, 16(1):11 (2023)
2. Morita K, Wada M, Nakatani K, Matsumoto Y, Hayashi N, Yamahata I, Mitsunari K, Mukae N, Takahashi M, Izumi Y, Bamba T, and \***Shirane M**. PDZD8-deficient mice accumulate cholesteryl esters in the brain as a result of impaired lipophagy. *iScience*, 16;25(12):105612 (2022)
3. Arora A, Kivelä AM, Wang L, Minkeviciene R, Taskinen JH, Zhang B, Koponen A, Sun J, **Shirane M**, Zhou Y, Hotulainen P, Raiborg C, \***Olkkonen VM**. Protrudin regulates FAK activation, endothelial cell migration and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 79(4):220 (2022)
4. \***Shirane M**, Wada M., Morita K, Hayashi N, Kunimatsu R, Nakatsumi H, Ohta K, Tamura Y, and Nakayama KI. Protrudin and PDZD8 contribute to neuronal integrity by promoting lipid extraction required for endosome maturation. *Nat Commun*, 11, 4576-4594 (2020)
5. \***Shirane M**, Shoji H, Hashimoto Y, Katagiri H, Kobayashi S, Manabe T, Miyakawa T, and Nakayama KI. Protrudin-deficient mice manifest depression-like behavior with abnormalities in activity, attention, and cued fear-conditioning. *Mol Brain*, 13, 146-163 (2020)

#### 総説・著書

1. \***Shirane M** and Kamiguchi H. Molecular machinery regulating organelle dynamics during axon growth and guidance. *Semin Cell Dev Biol*, S1084-9521(22), 00058-1 (2023)
2. 白根 道子、羊土社 論文図表を読む作法, FRET, BiFC/SplitGFP (2022) (共著)
3. \***Shirane M**, Interorganelle communication by protrudin complex and its neuronal function, *Seikagaku*, 93, 4, 441-450 (2021)
4. \***Shirane M**. Lipid Transfer-Dependent Endosome Maturation Mediated by Protrudin and PDZD8 in Neurons. *Front Cell Dev Biol*, 8, 615600-615609 (2020)
5. \***Shirane M** Roles of protrudin at interorganelle membrane contact sites. *Proc Jpn Acad Ser B*, 95, 312-320 (2019)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 M. Shirane, M. Wada, K. Morita, N. Hayashi, R. Kunimatsu, Y. Matsumoto, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Protrudin and PDZD8 contribute to neuronal integrity by promoting lipid extraction required for endosome maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 4576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18413-9	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 M. Shirane, H. Shoji, Y. Hashimoto, H. Katagiri, S. Kobayashi, T. Manabe, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Protrudin-deficient mice manifest depression-like behavior with abnormalities in activity, attention, and cued fear-conditioning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 146-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00693-3	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 M. Shirane	4. 巻 8
2. 論文標題 Lipid Transfer-Dependent Endosome Maturation Mediated by Protrudin and PDZD8 in Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 615600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.615600	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 Arora Amita, Kivel? Annukka M., Wang Ling, Minkeviciene Rimante, Taskinen Juuso H., Zhang Birong, Koponen Annika, Sun Jing, Shirane Michiko, Zhou You, Hotulainen Pirta, Raiborg Camilla, Oikonen Vesa M.	4. 巻 79
2. 論文標題 Protrudin regulates FAK activation, endothelial cell migration and angiogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 220-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-022-04251-z	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 Morita Keiko, Wada Mariko, Nakatani Kohta, Matsumoto Yuki, Hayashi Nahoki, Yamahata Ikuko, Mitsunari Kotone, Mukae Nagi, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi, Shirane Michiko	4. 巻 25
2. 論文標題 PDZD8-deficient mice accumulate cholesteryl esters in the brain as a result of impaired lipophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105612 ~ 105612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105612	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 Shirane, M.	4. 巻 93
2. 論文標題 Interorganelle communication by protrudin complex and its neuronal function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seikagaku	6. 最初と最後の頁 441-450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 白根道子
2. 発表標題 神経恒常性維持における脂質輸送を介したエンドソーム成熟
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michiko SHirane
2. 発表標題 Lipid transfer-mediated endosome maturation and neurodegeneration
3. 学会等名 MBSJ2020 (第43回日本分子生物学会年会)ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白根道子
2. 発表標題 Inter-organelle membrane contact site complex and neuropsychiatric disorders
3. 学会等名 MSBJ2021 (第44回日本分子生物学会年会)ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白根道子
2. 発表標題 PDZD8欠損マウスはリポファジー不全により脳内脂質異常を呈する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白根道子
2. 発表標題 脂質輸送タンパク質PDZD8によるエンドソーム成熟機構
3. 学会等名 日本薬学会第142年会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 牛島 俊和、中山 敬一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 288
3. 書名 論文図表を読む作法	

〔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
---------	---------