

令和 6 年 4 月 6 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20701

研究課題名（和文）Nwd1遺伝子によるプリノソーム形成を介した新たな神経分化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of neural differentiation mediated by purinosome formation by the Nwd1

研究代表者

山田 晴也（Yamada, Seiya）

早稲田大学・人間科学学術院・助教

研究者番号：70907146

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：正常な脳発達において2つのプリン代謝産物の合成経路の制御は不可欠であり、その異常は様々な精神疾患に関与するが、その時空間的な使い分けの詳細は不明である。また、近年、プリン新生のための連続的な酵素反応は、巨大タンパク質複合体プリノソームで行われることが示された。申請者が新規同定したNwd1遺伝子は、神経幹細胞で豊富に発現し、プリノソーム形成に関与することで神経幹細胞の増殖・分化を制御する。本研究では神経発生過程におけるプリン代謝酵素の時空間的な機能・局在解析および、Nwd1ノックアウトマウスを用いてNwd1の生理機能の一旦を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリン合成経路の時空間的制御の解明は、進化の過程で巨大な脳を獲得した哺乳類に特有の高次脳機能を司る分子メカニズムの一端および、その破綻から起きる精神疾患や神経発達障害の追究に寄与できると期待される。さらに、プリン代謝の異常による疾患は種々のがんとの関連も多数報告されている。細胞外環境に依存するプリン合成経路の切り替えは、神経幹細胞だけでなく、がん幹細胞や他の組織幹細胞にも共通して存在する可能性がある。今後、抗がん剤をはじめとする創薬開発にとって貴重な視点を提供することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In normal brain development, the control of two pathways producing purine metabolite is essential, and abnormalities in this process are implicated in various psychiatric disorders, although the details of their spatiotemporal regulation are unclear. In addition, it has been demonstrated that the enzymatic reactions for de novo purine synthesis is occurred within a large protein complex called purinosome. We identified Nwd1 gene, which is abundantly expressed in neural stem cells, is involved in purinosome formation and controls proliferation and differentiation of neural stem cells. This study revealed a spatiotemporal functional and localization of purine metabolism enzymes during neurogenesis, as well as a Nwd1 physiological function using Nwd1 knockout mice.

研究分野：分子神経科学

キーワード：神経幹細胞 Nwd1 プリノソーム プリン代謝

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳皮質の形成には、時空間的に制御された神経幹細胞の増殖と、その後のニューロン産生が重要である。全ての真核細胞のホメオスタシス維持に必須な分子であるプリン DNA や RNA、ATP/GTP の原料である。プリンには脳の正常な発達に必須であり、その代謝異常は先天性てんかんや精神遅滞、レッシュナイハン症候群などの重篤な疾患を引き起こす。哺乳類は新生 (*de novo*) 経路と再利用 (*salvage*) 経路の 2 種類のプリン産生経路を持ち、通常時はエネルギーコストの低い *salvage* 経路が使用されるが、細胞分裂など多量に核酸を必要とする際は、*de novo* 経路が駆動することが分かっている (図 1) [1]。更に、近年、*de novo* 経路の 6 種類の酵素が巨大タンパク質複合体であるプリノソームを形成することで酵素反応を行なっていることが明らかになった。我々が神経幹細胞から新規同定した *Nwd1* 遺伝子はプリノソームの形成に関与することで神経幹細胞の増殖・分化を制御することが示唆されている。

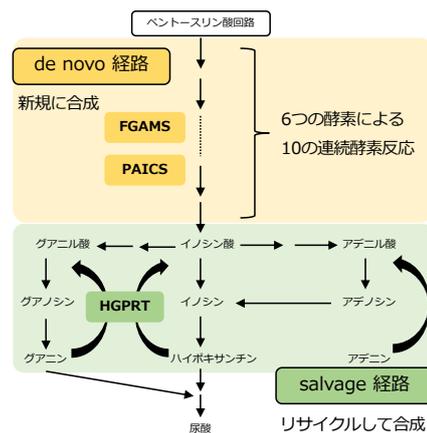


図1: 哺乳類における二つのプリン合成経路

2. 研究の目的

本研究では、依然として不明な①脳の発達におけるプリン合成経路の時空間的な使い分けを明らかにする、②生体内での *Nwd1* の機能を明らかにする、ことを目的とした。

3. 研究の方法

①各種プリン阻害剤投与マウスの表現系を解剖学・組織学的な解析及び生化学的な解析を行なった。②*Nwd1* ノックアウトマウスを作製し、その表現系を解剖学・組織学的及び生化学的な解析を行った。

4. 研究成果

①本研究ではまず、「マウス脳において発生段階によって駆動するプリン合成経路が異なる」という仮説を検証した。発生の各段階 (胎生 13 日目～生後 12 日目) のマウス脳皮質に含まれる PAICS (*de novo* 酵素) と HGPRT (*salvage* 酵素) タンパク質の発現量をウェスタンブロッティングで比較したところ、胎生期には *de novo* 経路が優位に駆動し、生後付近で *salvage* 経路に切り替わることが明らかになった (図 2) [1]。

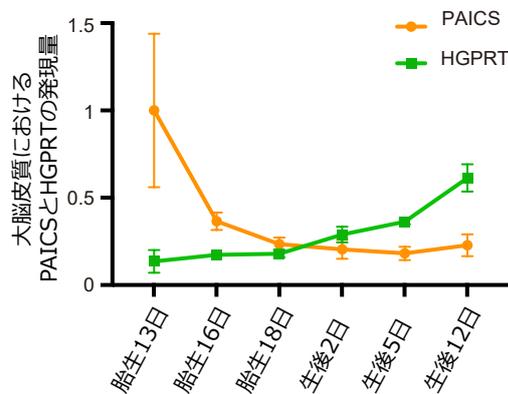


図2: 脳皮質発生過程におけるプリン合成酵素の発現量

続いて、空間的な使い分けを検証し、マウス脳内におけるプリン合成酵素群の局在を免疫組織化学染色で比較したところ、*de novo* 酵素と *salvage* 酵素は異なる脳領域において発現が見られたことから、脳の発達段階及び特定の脳領域において、時間・空間的に 2 つのプリン合成経路の使い分けが生じている可能性を見出した。特定の時期におけるプリン合成阻害が脳の発達に及ぼす影響を調べるために、プリン合成経路の特定の酵素を標的とする複数の阻害剤を用いて実験を行った。まず「*de novo* 経路が胎生期に優位に駆動するということは、胎生期に豊富に存在する神経幹細胞は *de novo* 経路阻害の影響を受ける」という仮説を検証した。マウス胎児脳皮質から単離した初代培養神経幹細胞に対して *de novo* 経路、*salvage* 経路を各々特異的に阻害する薬剤 (Mycophenolate mofetil (MMF)、Forodesine) で処理を行い、BrdU の取り込み率により増殖性を評価した。*De novo* 経路を阻害した時のみ神経幹細胞の増殖性が著しく低下した結果から、胎生期の脳皮質拡大で中心的役割を担う神経幹細胞の増殖には *de novo* 経路が必要不可欠であるということが示唆された。

次に、マウスを用いて生体内でプリン合成阻害を行うと脳発生にどのような影響を与えるか検証するために、胎生初期における MMF の連続的な薬剤投与実験による *de novo* 経路阻害を行った。野生型の脳では水平断面において Pax6 陽性の神経幹細胞と Doublecortin (DCX) 陽性の幼弱なニューロンが綺麗な層構造を形成する一方で、*de novo* 経路が阻害された個体は、大脳皮質の形成阻害、特に前頭葉の欠失が起こっており、Pax6 の発現が見られない特徴的な脳奇形を引き起こした (図3; 中段中央パネル) [1]。また、この領域には本来下方に位置するはずの Gsh2 陽性の大脳基底核原基が形成されていることが明らかになった (図3; 最下段中央パネル) [1]。つまり、*de novo* 経路阻害が与える影響が脳部位ごとに異なることから、プリンの感受性は後頭葉から前頭葉にかけて濃度勾配があり、2つの経路の使い分けが脳領域によって異なることを示した。

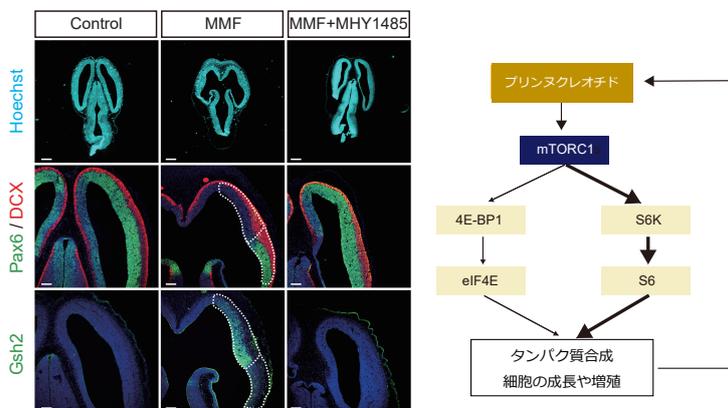


図3: *de novo*経路阻害はmTORシグナル経路の抑制を介した脳奇形を引き起こす

最後に、この *de novo* 経路阻害による脳奇形の分子メカニズムとして、タンパク質合成を担う mTOR シグナル経路に着目した。mTOR シグナル経路には 4E-BP1/eIF4E と S6K/S6 という二つの下流経路があるが、*de novo* 経路の阻害によって脳奇形が生じた個体では S6K/S6 経路が著しく抑制されていることを明らかにした (図3; 右図) [1]。そこで mTOR シグナル経路を活性化する薬剤 (MHY1485) を *de novo* 阻害剤と併用したところ、*de novo* 経路阻害による脳奇形の表現系がレスキューされた (図3; 右列パネル) [1]。この結果から、*de novo* プリン合成は、mTORC1/S6K/S6 シグナル伝達経路の時空間的制御を介して大脳皮質の発達を制御しているということが示唆された。本研究では、脳発生の進行に伴いプリン合成経路が切り替わることと、その制御の崩壊は mTOR シグナル経路の抑制を介して脳奇形を引き起こすことが明らかになった (図4) [1]。

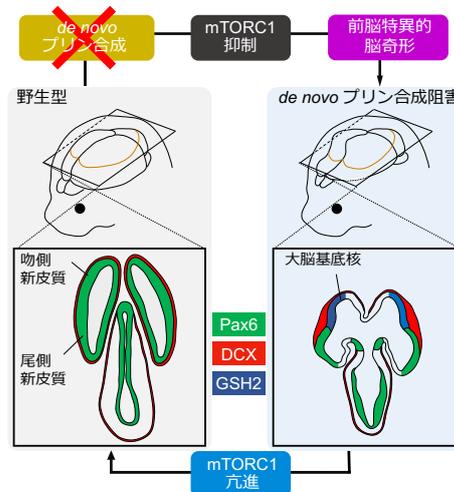


図4: *de novo*プリン合成阻害はmTORシグナル経路活性低下を伴う前脳特異的脳奇形を引き起こす

②次に、我々が神経幹細胞から同定した新規遺伝子 Nwd1 の機能解析を行なった。Nwd1 コンディショナルノックアウトマウスと CAG-Cre マウスを交配させ、Nwd1 ノックアウトマウスを作製した。

Nwd1 ノックアウトマウスは一部の割合で脳奇形を引き起こし胎生致死となることが確認された。しかし、大部分の Nwd1 ノックアウトマウスは成体まで正常な成長をとげ、成体脳においても顕著な変化は見られなかった。一方で、肝臓において脂肪の蓄積が促進し、非アルコール性脂肪肝 (NASH・NAFLD) 様の表現系を引き起こすことが明らかになった。免疫電子顕微鏡観察によるより詳細な局在解析の結果、Nwd1 はミトコンドリアに加え、小胞体の膜の上あるいはその近傍に局在することが明らかになった。さらに、生化学的な結合実験から小胞体の Ca^{2+} ポンプである SERCA 2 と結合することが明らかになった。そして、Nwd1 ノックアウトマウスでは、SERCA 2 の機能不全から小胞体に含まれる Ca^{2+} の量が低下し、小胞体ストレスを誘導することで非アルコール性脂肪肝様表現系を引き起こすことが明らかになった。

[1] Mizukoshi, Tomoya, Seiya Yamada, and Shin-ichi Sakakibara. "Spatiotemporal regulation of *de novo* and salvage purine synthesis during brain development." *eNeuro* 10, no. 10 (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizukoshi Tomoya, Yamada Seiya, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Spatiotemporal Regulation of De Novo and Salvage Purine Synthesis during Brain Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0159-23.2023	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 Yamada Seiya, Nakadate Kazuhiko, Mizukoshi Tomoya, Kawakami Kiyoharu, Kobayashi Ryosuke, Horii Takuro, Hatada Izuho, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Induction of NASH in the Nwd1-/- mouse liver via SERCA2-dependent endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.01.26.577307	査読の有無 無
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 山田 晴也、佐藤 彩佳、榊原 伸一	4. 巻 49
2. 論文標題 Nwd1 によるプリノソーム形成を介した 大脳皮質発生機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 134-135
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 無
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 Yamada Seiya, Furukawa Ryutarō, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 46
2. 論文標題 Identification and expression profile of novel STAND gene Nwd2 in the mouse central nervous system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 119284 ~ 119284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gep.2022.119284	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 Yamada Seiya, Mizukoshi Tomoya, Tokunaga Akinori, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Inka2, a novel Pak4 inhibitor, regulates actin dynamics in neuronal development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 1-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010438	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 Yamada Seiya, Sato Ayaka, Ishihara Naotada, Akiyama Hiroki, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Drp1 SUMO/deSUMOylation by Senp5 isoforms influences ER tubulation and mitochondrial dynamics to regulate brain development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103484 ~ 103484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103484	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 Yamada Seiya, Tokunaga Akinori, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 643
2. 論文標題 Inka2 expression in smooth muscle cells and its involvement in cell migration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.12.068	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 山田晴也, 水越智也, 徳永暁憲, 榊原伸一
2. 発表標題 新規Pak4抑制因子Inka2はスパイン形成時にアクチンを制御する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水越智也, 山田晴也, 榊原伸一
2. 発表標題 神経発達過程における二つのプリン合成経路の発現・機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seiya Yamada, Ayaka Sato, and Shin-ichi Sakakibara
2. 発表標題 Nwd1 controls NSPCs proliferation through purinosome formation
3. 学会等名 FENS Forum2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田晴也, 佐藤彩佳, 石原直忠, 秋山博紀, 榊原伸一
2. 発表標題 Drp1のSUMO化によるミトコンドリア形態制御を介した大脳皮質発生機構
3. 学会等名 Neuro2022(第45回日本神経科学大会、第65回日本神経化学大会、第32回日本神経回路学会大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水越智也, 山田晴也, 榊原伸一
2. 発表標題 プリン合成系タンパク質群の神経発達過程における発現・機能解析
3. 学会等名 Neuro2022(第45回日本神経科学大会、第65回日本神経化学大会、第32回日本神経回路学会大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田 晴也、佐藤 彩佳、榊原 伸一
2. 発表標題 大脳皮質発生時Nwd1はプリノソーム形成を調節する
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 晴也、佐藤 彩佳、榊原 伸一
2. 発表標題 Nwd1遺伝子とプリノソームによる神経分化制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 彩佳、山田 晴也、秋山博紀、榊原 伸一
2. 発表標題 脱SUMO化酵素Senp5によるミトコンドリア形態制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 彩佳、山田 晴也、秋山博紀、榊原 伸一
2. 発表標題 脱SUMO化酵素Senp5による神経突起制御
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------