

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09325

研究課題名(和文)オートファジーに注目した脳内鉄蓄積病原因遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Investigation of the relationship between autophagy and NBIA causative genes.

研究代表者

古屋 徳彦 (Furuya, Norihiko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50401188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はNeurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA)原因遺伝子群の機能解析をオートファジーとの関連に注目して行った。siRNAを用いたNBIA原因遺伝子群のノックダウン(KD)を試みたところ、FTL、PANK2、COASYのKDによりオートファジーへの影響が認められた。CRISPR/Cas9を用いて作成したFTLノックアウト(KO)細胞を解析したところ、フェリチノファジーの低下、ミトコンドリア機能の低下、酸化ストレスに対する耐性の低下が認められた。これらの表現型がNBIA病態発症メカニズムと関連していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) is a set of degenerative extrapyramidal monogenic disorders with radiological evidence of focal accumulation of iron in the brain, usually in the basal ganglia. In this study, we investigated the relationship between autophagy and NBIA causative genes. Knockdown using siRNA of a part of NBIA genes influenced autophagy or lysosomal system. To investigate those genes function more precisely, we tried to establish knockout (KO) cell lines using CRISPR/Cas9 system. We could successfully obtain FTL KO cells. FTL KO cells showed the reduction of ferritin-selective autophagy (ferritinophagy) flux, the reduction of mitochondrial function and the vulnerability against oxidative stress. Those phenotypes of FTL KO cells must tightly associate with the mechanism of NBIA disease onset.

研究分野：オートファジー

キーワード：オートファジー NBIA 鉄代謝 フェリチン フェリチノファジー ミトコンドリア 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

Neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA)は全世界での有病率は1-9/10万人の希少神経変性疾患群であり、複数の原因遺伝子が同定されているが分子病態は不明であり、唯一の病理学的特徴として大脳基底核を中心とする鉄沈着を認める。鉄は生体内に最も多く含まれる金属元素であり、ヘモグロビン合成、ATP産生に関わる酸化還元反応、デオキシリボース合成など生命に必須の機能に関与している。しかしながら過剰量の鉄の摂取は、鉄原子と過酸化物の反応によるフリーラジカルの産生を引き起こし、タンパク質や核酸などの生体内高分子に悪影響を与える、そのため鉄代謝は生体内において厳密に制御されている。実際、鉄過剰症は慢性肝炎による発癌などの発症に関わるとされ、またパーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症などの中枢神経疾患においても、脳への異常鉄沈着が認められることから、神経細胞変性における鉄代謝異常の重要性が示唆されている。鉄は血液中で主にトランスフェリンと結合した形態で存在し、トランスフェリンレセプターを介して細胞内へと取り込まれる。細胞内に取り込まれた鉄はミトコンドリアに送られ、ヘムや鉄硫黄クラスターの合成などに使われ、余剰鉄は鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンとして貯蔵される。フェリチンによる鉄貯蔵機構によって細胞内鉄レベルは一定に保たれ、鉄過剰による細胞へのダメージを最小化している。さらに細胞が鉄欠乏になると、フェリチンがオートファジーによって分解されることで、細胞内鉄レベルは一定に保たれるため(Mol. Cell. Biol., 31: 2040-2052, 2011)、オートファジーは鉄代謝に必須の分子機構であると言える。細胞内の大規模な分解機構であるオートファジーは、不要なタンパク質やオルガネラなどを分解することで細胞内恒常性維持に寄与しており、特に神経細胞においては、オートファジーによる分解が細胞内の異常タンパク質の蓄積を抑制し、神経変性を防ぐと考えられている(Cell, 147: 728-741, 2011)。実際にオートファジーノックアウトマウスでは神経細胞内凝集体の蓄積および進行性の神経細胞死が認められる(Nature, 441: 880-884, 2006; Nature, 441: 885-889, 2006)が、同報告では異常タンパク質蓄積に焦点が当てられており、オートファジーによる鉄代謝調節と神経変性については未解明である。またNBIAの一つであるSENDAの原因遺伝子がオートファジー関連分子WIPI4(酵母Atg18のヒトホモログの一つで、オートファゴソーム形成に働く分子の一つ)をコードするWDR45であることが報告されている(Nat. Genet., 45, 445-449, 2013)。以上のことから、研究代表者はオートファジー機能不全による鉄代謝調節破綻が神経変性に影響すると考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究課題では鉄沈着を共通分子病態とするNBIA原因遺伝子群の機能解析をオートファジーとの関連に注目して行うことを目的とした。NBIAとオートファジーに関する細胞生物学的/生化学的知見は皆無であることから、本研究計画では培養細胞を用いて、NBIA原因遺伝子群のオートファジーおよびオートファジーを介した鉄代謝への影響の有無を検討し、NBIA原因遺伝子がオートファジー機構およびオートファジーを介した鉄代謝にどのように関わるのか、その分子機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) siRNAを用いたNBIA原因遺伝子のノックダウン

HeLa細胞にDharmacon社より購入したNBIAの原因遺伝子特異的なsiRNAをトランスフェクトした。ノックダウン効率が最も高くなっているトランスフェクション後48-72時間後に実験に供した。

(2) CRISPER/Cas9を用いたノックアウト(KO)細胞の作成

Integrated DNA Technology社より購入したFTLまたはPANK2のExon1の塩基配列の特異性の高い領域に対するcrRNA、蛍光色素ATTO 550で標識されたtracrRNAおよびCas9タンパク質をin vitroで反応させgRNA-Cas9複合体を作成した。同複合体をHeLa細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。遺伝子導入後1日目に、ATTO 550陽性細胞をセルソーターにより1細胞ずつ96wellプレートに播いた。細胞が十分に増殖した後、個々のクローンをWestern Blottingに供し、標的遺伝子の発現が認められないクローンを同定した。さらに標的遺伝子の発現が認められないクローンについて、シーケンス解析を行い、KO細胞であることを確認した。

(3) ウェスタンブロッティング

細胞をLysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 1% NP-40, Protease inhibitor cocktail)で溶解後、12,500 x gで遠心し、得られた上清にSDS-PAGEサンプルバッファーを添加し、SDS-PAGEに供した。電気泳動後、ゲルをPVDF膜に転写し、各種抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。

(4) 蛍光免疫染色

ガラス製スライドチャンバー上で培養した細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、ジギトニン溶液で穿孔処理を行った後、4%BSA、1%ヤギ血清を含むPBSでブロッキ

グ処理した。各種一次抗体とインキュベートした後、蛍光色素付きの抗ウサギまたはマウス二次抗体と反応させた。細胞の観察はZeiss LSM880 共焦点顕微鏡を用いて行った。

(5) ミトコンドリア呼吸活性評価

細胞外フラックスアナライザー Seahorse XFe24 およびミトストレスキット(Agilent)を用いて FTL KO 細胞のミトコンドリア機能評価を行った。

(6) 細胞死測定

細胞を 250 μM 過酸化水素と 24 時間インキュベートし、細胞の生存率をトリパンブルー染色により評価した。

4. 研究成果

(1) NBIA 原因遺伝子ノックダウンのオートファジーに対する影響

NBIA 原因遺伝子として報告されているのうち、FTL1、PANK2、COASY、C19ORF12、FA2H について、HeLa 細胞にそれぞれ特異的な siRNA を導入しノックダウン (KD) を行った。

FTL1 KD 細胞では、野生型 HeLa 細胞で核近傍にドット状に局在するフェリチン複合体が減少し、びまん性の局在を示すことが観察され、鉄キレーター処理により誘導されるフェリチン複合体の分解が抑制されることが認められた(図 1、2)。鉄キレーター処理によるフェリチン複合体の分解はオートファジーを介して行われる(フェリチノファジー)ため、同細胞を用いて、栄養飢餓によって誘導されるオートファジーについて解析したところ、野生型との差異は認められな

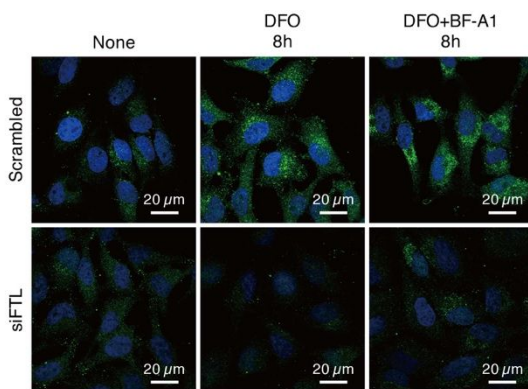
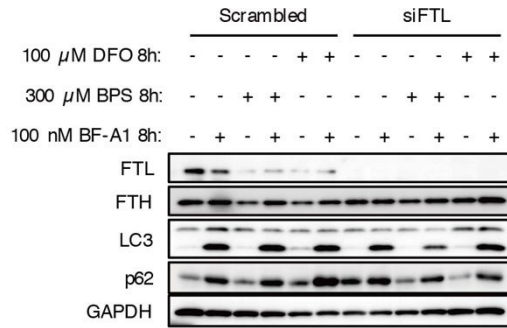


図 1 FTL ノックダウンによるフェリチン複合体の変化

FTL ノックダウン細胞のフェリチン重鎖 (FTH) の蛍光免疫染色像。緑: FTH、青: 核、DFO: デフェロキサミン (鉄キレーター)、BF-A1: パフィロマイシン A1 (リソソーム阻害剤)

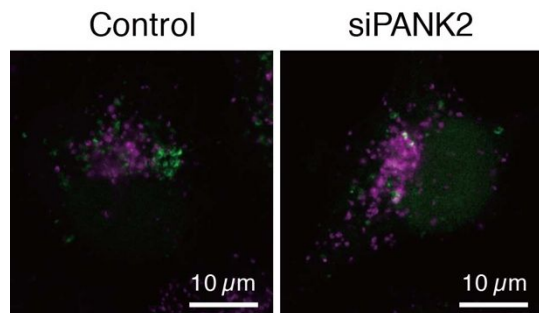
補酵素 A の生合成に関わる PANK2 および COASY の KD 細胞では、細胞質のリソソーム量



の増加が観察された(図 3)。また栄養飢餓によって誘導されるオートファジーおよび富栄養状態でも誘導される基底レベルのオートファ

図 2 FTL ノックダウンによる鉄欠乏誘導フェリチン分解への影響

FTL ノックダウン細胞のフェリチンおよびオートファジー関連分子のウエスタンブロットティング。DFO: デフェロキサミン (鉄キレーター)、BPS: パソフェナンスロリンスルホン酸ナトリウム (鉄キレーター)、BF-A1: パフィロマイシン A1 (ライソソーム阻害剤)、FTL: フェリチン軽鎖、FTH: フェリチン重鎖、LC3: オートファゴソームマーカー、p62: オートファジーの選択的基質、GAPDH: 内部標準



アジー活性の低下が認められた。また、鉄キレーター処理によるフェリチン複合体の分解への影響は認められなかった。

図 3 PANK2 ノックダウンによるリソソームの増加

PANK2 ノックダウン細胞の蛍光免疫染色像。それぞれの細胞を栄養飢餓培地で 3 時間培養した。緑: LC3: オートファゴソームマーカー、赤: Lamp1: リソソームマーカー

一方で、C19ORF12、FA2H のノックダウンのオートファジーに関わる影響は残念ながら見いだすことが出来なかった。

(2) FTL ノックアウト細胞の作成

上記のように FTL KO 細胞作成のために、CRISPR/Cas9 を導入した HeLa 細胞のクローンを 300 個程度セルソーターにより 96-well Plate に播き、それぞれのクローンについて、FTL 発現量をウエスタンブロットティングによ

り確認した。シーケンス解析の結果、最終的に多くのヘテロ KO 細胞と 3 つの異なるクローンの FTL ホモ KO 細胞を得ることに成功した。

(3) PANK2 ノックアウト細胞の作成

FTL と同様に PANK2 についても KO 細胞の作成を試みた。ウエスタンブロッティングによって発現が認められないクローンを数種類得ることが出来たが、シーケンス解析の結果、これらは全て 1 アリルのみが KO されたヘテロノックアウト細胞であることが分かった。

(4) FTL ノックアウト細胞におけるオートファジーの解析

オートファジーとの関連が示唆された NBIA 原因遺伝子のうち、PANK2 KO 細胞の Nu11 KO 細胞の作成が上手く行かなかったため、FTL KO 細胞の解析に集中して研究を行った。FTL KO 細胞と同様に、FTL KO 細胞ではフェリチン複合体のドットが減少し、よりびまん性の局在を示すことが分かった (図 4)。

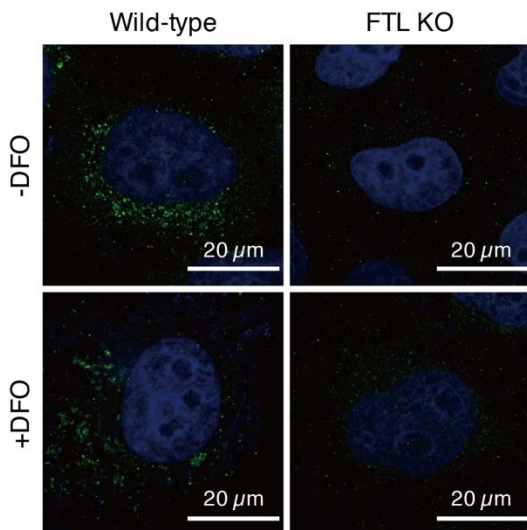
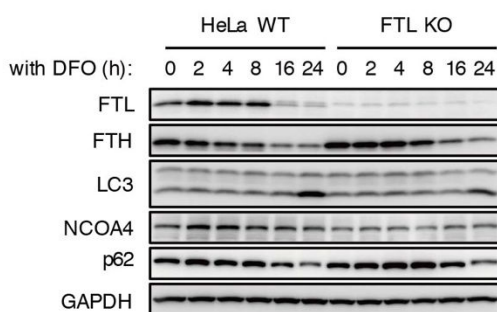


図 4 FTL ノックアウト細胞におけるフェリチン複合体の変化

緑: FTH、青: 核、DFO: 鉄キレート剤

鉄キレート剤 DFO 処理によって誘導されるフェリチン (FTH および FTL) の分解は FTL KO 細胞において野生型細胞と比べて有意に遅延することが分かった (図 5)。しかしながら、フェリチノファジーの誘導によるオートファジーマーカー LC3 の挙動およびオートファジーの選択的基質 p62 の分解は野生型細胞と FTL KO 細胞において差異は認められなかった。FTL KO 細胞ではフェリチノファジーのアダプ



ター分子として働く NCOA4 の発現が定常状態

図 5 FTL KO 細胞における鉄欠乏誘導フェリチン分解

鉄キレート剤処理 0-24 時間における FTL KO 細胞のフェリチンおよびオートファジー関連分子のウエスタンブロッティング。FTL: フェリチン軽鎖、FTH: フェリチン重鎖、LC3: オートファゴソームマーカー、NCOA4: フェリチノファジーのアダプター分子、p62: オートファジーの選択的基質、GAPDH: 内部標準

から有意に低いことが分かった。

FTH 分解の差異が有意に認められた 8 時間の DFO 処理時のフェリチノファジーのフラックスをバフィロマイシン A1 存在下、非存在下の比較により検討したが、野生型細胞と FTL KO 細胞の間に差は認められなかった (図 6)。

また、栄養飢餓誘導オートファジーについてもフラックスの差異は認められなかった。

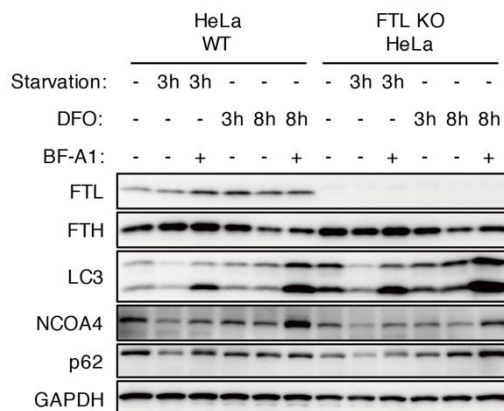


図 6 FTL KO 細胞における栄養飢餓誘導オートファジーおよび鉄キレート剤誘導フェリチノファジーのフラックスの検討

栄養飢餓および鉄キレート剤処理時の FTL KO 細胞ウエスタンブロッティング。FTL: フェリチン軽鎖、FTH: フェリチン重鎖、LC3: オートファゴソームマーカー、NCOA4: フェリチノファジーのアダプター分子、p62: オートファジーの選択的基質、GAPDH: 内部標準

フェリチンは細胞内鉄レベルの上昇に伴い翻訳レベルで発現が更新することが知られている。鉄付加条件におけるフェリチノファジーフラックスへの FTL KO の影響を評価するために、細胞をクエン酸鉄アンモニウム含有培地で 3 日間プレ培養後、図 6 と同様にオートファジーのフラックスの解析を行った (図 7)。栄養飢餓誘導のオートファジーには差が見られなかった一方、DFO 処理によって誘導されるフェリチノファジーのフラックスが FTL KO 細胞において止まっていることが分かった。また、フェリチノファジーに伴って起こるオートファジー選択的基質 p62 およびフェリチノファジーアダプター NCOA4 の分解も FTL KO 細胞では殆ど認められ

なかった。これらのことから、FTL KO 細胞では富鉄条件でのフェリチノファジー誘導に何らかの異常があることが示唆され、NBIA 病態における脳内鉄沈着メカニズムとの関連が疑われた。

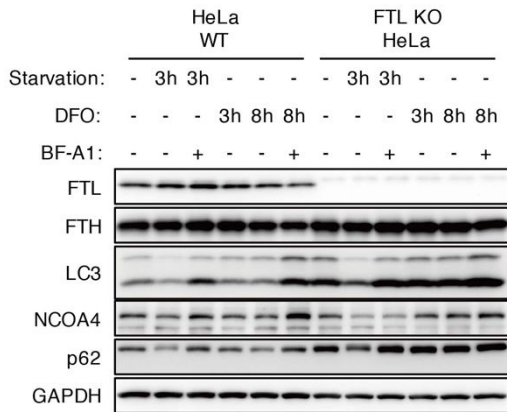


図 7 鉄付加処理を行った FTL KO 細胞における栄養飢餓誘導オートファジーおよび鉄キレート剤誘導フェリチノファジーのフラックスの検討

クエン酸鉄アンモニウム含有培地で 3 日間プレ処理した細胞の栄養飢餓および鉄キレート剤処理の影響。FTL: フェリチン軽鎖、FTH: フェリチン重鎖、LC3: オートファゴソームマーカー、NCOA4: フェリチノファジーのアダプター分子、p62: オートファジーの選択的基質、GAPDH: 内部標準

(5) FTL KO 細胞のミトコンドリア呼吸活性の検討

鉄はミトコンドリアにおいて、ヘムや鉄硫黄クラスターの合成に使われる。またミトコンドリアの呼吸鎖の活性に鉄硫黄クラスターが必須である。フェリチノファジーに異常が認められた FTL KO 細胞においてミトコンドリア機能に影響が起きているかどうか、細胞外フラックスアナライザーを用いて呼吸活性について検討した (図 8)。

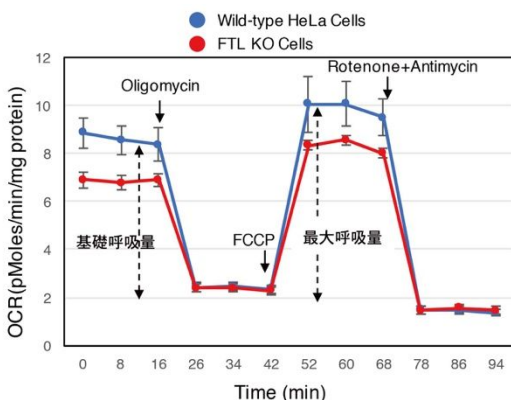


図 8 フラックスアナライザーを用いた FTL KO 細胞の呼吸活性の評価

oligomycin (ATP 合成酵素阻害剤) FCCP (ミトコンドリア膜脱役剤) Rotenone および

antimycin (呼吸鎖複合体阻害剤) を図に示した時間に添加し、ATP 代謝による酸素消費量、最大呼吸量、プロトンリークをそれぞれ評価した。OCR: 酸素消費量

その結果 FTL KO 細胞は野生型細胞と較べて、基礎呼吸量、最大呼吸量が低下していることが認められ、FTL KO 細胞のミトコンドリア機能低下が示唆された。

(6) FTL KO 細胞の酸化ストレス耐性の検討

フェリチンは鉄貯蔵という機能だけでなく、酸化ストレスから細胞を守る細胞保護的な役割を持っている。ミトコンドリア機能異常は酸化ストレスを引き起こす主要な原因の一つであるため、NBIA の病態において FTL の遺伝子変異が酸化ストレスの亢進を引き起こしている可能性は高い。そこで、FTL KO 細胞の過酸化水素に対する耐性を検討した。過酸化水素処理 24 時間後の生存率は野生型細胞と比較して FTL KO 細胞で有意に低く、FTL KO 細胞は酸化ストレスへの耐性が低いことが明らかとなった (図 9)。

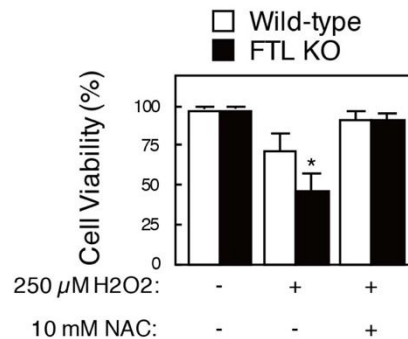


図 9 FTL KO 細胞の酸化ストレス耐性の評価
細胞を 24 時間過酸化水素で処理し、細胞の生存率を評価した。NAC: N-アセチルシステイン (抗酸化剤)

(7) まとめ

本研究により、NBIA 原因遺伝子のうちの一部はその機能がオートファジー・リソソーム経路と関わっていることが明らかとなった。また NBIA 原因遺伝子の一つ FTL のノックアウト細胞は、フェリチノファジーの低下、ミトコンドリア機能の低下、酸化ストレスに対する耐性の低下を示すことが分かった。KO 細胞で認められるこれらの表現型が NBIA の病態発症と密接に関わっていることが予想される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

(1) Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, regulates systemic

metabolism with dynamic changes in adipose tissue and skeletal muscle., Yamashita Y, Nakada S, Yoshihara T, Nara T, Furuya N, Miida T, Hattori N, Arikawa-Hirasawa E., Sci Rep. 2018 8(1):7766. doi: 10.1038/s41598-018-25635-x. 査読有り

(2) Decreased long-chain acylcarnitines from insufficient β -oxidation as potential early diagnostic markers for Parkinson's disease.,

Saiki S, Hatano T, Fujimaki M, Ishikawa KI, Mori A, Oji Y, Okuzumi A, Fukuhara T, Koinuma T, Imamichi Y, Nagumo M, Furuya N, Nojiri S, Amo T, Yamashiro K, Hattori N. Sci Rep. 2017 7(1):7328. doi: 10.1038/s41598-017-06767-y. 査読有り

(3) Ethambutol neutralizes lysosomes and causes lysosomal zinc accumulation., Yamada D, Saiki S, Furuya N, Ishikawa K, Imamichi Y, Kambe T, Fujimura T, Ueno T, Koike M, Sumiyoshi K, Hattori N. Biochem Biophys Res Commun. 2016 471(1):109-16. doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.171. 査読有り

(4) Perlecan inhibits autophagy to maintain muscle homeostasis in mouse soleus muscle.

Ning L, Xu Z, Furuya N, Nonaka R, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E. Matrix Biol. 2015 :26-35. doi: 10.1016/j.matbio.2015.08.002. 査読有り

(5) VPS29-VPS35 intermediate of retromer is stable and may be involved in the retromer complex assembly process., Fuse A, Furuya N, Kakuta S, Inose A, Sato M, Koike M, Saiki S, Hattori N., FEBS Lett. 2015 589(13):1430-6. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.040. 査読有り

〔学会発表〕(計 2件)

- (1) 古屋徳彦「ミトファジーにおける NDP52-LC3C 経路の解析」第9回オートファジー研究会・第3回「オートファジー」班会議 2015年11月兵庫県淡路市
- (2) 古屋徳彦「NDP52 を介したミトファゴソーム形成機構の解析」第10回オートファジー研究会・第4回「オートファジー」班会議 2016年11月新潟県南魚沼郡湯沢町

〔図書〕(計 2件)

- (1) Short Overview., Furuya N., Methods Mol Biol. 2017 May 12. doi: 10.1007/7651_2017_38.
- (2) Induction of PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy., Sato S, Furuya N., Methods Mol Biol. 2017 Mar 31. doi: 10.1007/7651_2017_7

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古屋 徳彦 (FURUYA, Norihiko)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号: 50401188

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()