

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22744

研究課題名(和文) リソソームプロテアーゼ欠損に基づくオートファジー新規役割の解析

研究課題名(英文) Investigation of the new role of autophagy in the loss of lysosomal protease

研究代表者

山口 隼司 (Yamaguchi, Junji)

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30875282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では神経性セロイドリポフスチン症(NCL)のモデルマウスであるカテプシンD(CTSD)欠損マウスの脳内で蓄積する異常リソソームとオートファジーとの関連について解析を進めた。CTSD欠損条件下でも、p62やNBR1はオートファジー/リソソーム経路を介して正常に分解されるが、CTSD欠損神経細胞内ではユビキチン、p62、NBR1が異常リソソームの膜表面近傍に集積する現象について明らかにした。さらに、CTSD/Atg7 Nestin Creマウスの解析から、NCLで蓄積する異常リソソームはオートファゴソームによって処理されている可能性が示唆された。現在これらの結果について論文作成している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NCLは神経細胞内に異常なリソソームを蓄積する神経変性疾患の一種であり、その機序については未だ不明な点も多い。近年、NCLとオートファジーの関係についていくつかの報告があるが、その多くはオートファジー機能不全やリソソーム内での分解障害を示唆する内容である。本研究では、NCLで誘導されるオートファジーが不良リソソームの品質管理に働いている可能性を示した。細胞内不良オルガネラを標的にした選択的オートファジーは過去に多く報告されているが、その中で生体内での現象について示した例は未だ多くない。本研究はNCLの病態だけでなく、生体内での選択的オートファジーを理解する上で重要な意味を持つ。

研究成果の概要(英文)：Cathepsin D (CTSD), a major lysosomal aspartic protease, is a causative gene of neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL), characterized as one of lysosomal storage diseases. In this study, I investigated the relation between autophagy and the abnormal lysosomes accumulated in neurons of CTSD-deficient mice. We found that p62 and NBR1 were degraded normally via autophagy / lysosome pathway even in CTSD-deficient cells, while these proteins were increased and accumulated on the surface of abnormal lysosomes observed in CTSD-deficient neurons. Furthermore, from the investigation using CTSD / Atg7 Nestin-Cre mice, it was suggested that the abnormal lysosomes were enclosed by autophagosomes in CTSD-deficient neurons. These results have important implications for understanding the pathogenesis of NCL and the precise mechanism for selective autophagy of defective lysosomes. We are currently preparing a paper on these results.

研究分野：神経科学

キーワード：カテプシンD オートファジー 神経性セロイドリポフスチン症 p62 NBR1

1. 研究開始当初の背景

CTSD 欠損マウスの脳内ではセロイドリポフスチンを有する異常リソソームが蓄積し、CTSD は神経性セロイドリポフスチン症 (NCL) の原因遺伝子の一つ (CLN10) として同定された。CTSD 欠損マウスや、その他の NCL モデルマウスの神経細胞内では、オートファゴソームやオートファジーに関連するユビキチン、p62、NBR1、LC3-II が蓄積することが知られていたが、これらがなぜ蓄積するのかについて詳細は不明であった。その原因として、先行論文の中ではオートファジー機能不全やリソソーム内分解障害が示唆されていたが、CTSD 欠損マウス線維芽細胞でも p62 や NBR1 は正常に分解されることが分かった。一方で、CTSD 欠損マウスの神経細胞内ではユビキチン、p62、NBR1 が蓄積するが、これらは異常リソソームの表面近傍に集中して蓄積することが分かった。ここから、p62 や NBR1 の蓄積は、単純なリソソームの分解障害により生じた結果ではなく、異常リソソームを標的とした選択的オートファジーの受容体タンパク質として働いているのではないかと仮説を立てて研究を始めた。

2. 研究の目的

本研究は、NCL の病態解明のため、CTSD 欠損マウス神経細胞内で誘導されるオートファジーの役割について検討することを目的に行った。予備実験の結果から、CTSD 欠損マウス神経細胞内で蓄積する異常リソソームの一部は、オートファゴソーム様の二重膜により取り囲まれている事が分かった。そこで、この二重膜構造がオートファジーにより生じるかどうかを明らかにするため、CTSD Nestin-Cre マウスとオートファジー機能不全モデルである Atg7 Nestin-Cre マウスを掛け合わせにより、中枢神経系特異的オートファジー機能不全 NCL モデルマウス (CTSD/Atg7 Nestin-Cre マウス) を作成した。

3. 研究の方法

本研究では NCL におけるオートファジーの役割について検討するため、中枢神経系特異的オートファジー機能不全 NCL モデルマウス (CTSD/Atg7 Nestin-Cre マウス) を作成した。実験では電子顕微鏡を用いて、CTSD Nestin-Cre マウスと CTSD/Atg7 Nestin-Cre マウスの神経細胞内の超微細形態、特に異常リソソームとそれを取り囲む二重膜構造を中心に解析進めた。

また、野生型/CTSD 欠損マウス線維芽細胞を用いた実験では、バフィロマイシン処理により起こる p62 や NBR1 の量的変化について Westernblot 法を用いて検討した。併せて、生後 9 日齢と 23 日齢の CTSD 欠損マウス脳、生後 23 日齢の CTSD 欠損マウスの脊髄、心臓、肝臓、腎臓においても同様に Westernblot 法で蓄積タンパク質の量的変化を検討した。

4. 研究成果

(1) CTSD 欠損細胞内での p62、NBR1 の分解について

CTSD 欠損マウス線維芽細胞を用いた予備実験から、栄養飢餓培地により強制的にオートファジーを誘導すると蓄積する p62 や NBR1 は有意に減少する事が明らかとなった。また本研究では、細胞内 v-ATPase 阻害剤であるバフィロマイシンを用いて、オートファジー/リソソーム経路による分解障害を誘導した際に、CTSD 欠損マウス線維芽細胞で p62 や NBR1 の蓄積が増加することを明らかにした。さらに、電子顕微鏡を用いた解析から、正常細胞と同様に CTSD 欠

損マウス線維芽細胞でも栄養飢餓条件でオートファゴソームが形成されることを明らかにした。これらの結果は、CTSD 欠損条件下でも p62 や NBR1 は正常に分解されることを示しており、CTSD 欠損マウス神経細胞内で蓄積する p62 や NBR1 は単純な分解阻害によるものではないことを示唆する。

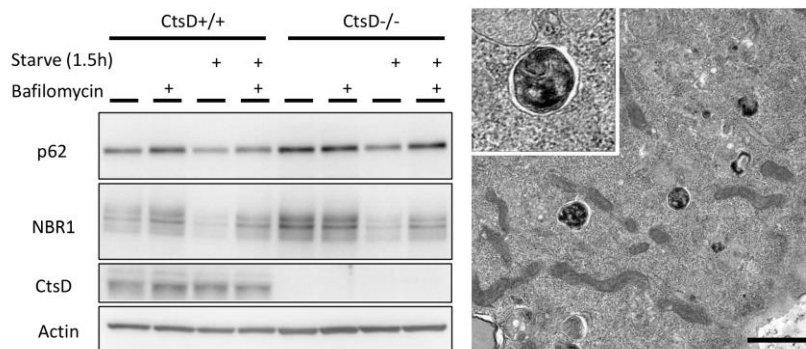


Fig.1.
 左：野生型、CtsD欠損マウス線維芽細胞におけるStarve、Bafilomycin有無によるp62、NBR1の変化
 右：Starve (1.5h)処理後のCtsD欠損マウス線維芽細胞内の電子顕微鏡像。スケールバー：1μm

(2) CTSD 欠損マウスで蓄積する p62、NBR1 について

生後 23 日齢の野生型、及び CTSD 欠損マウスの脳を用いて蓄積するタンパク質について比較した。CTSD 欠損マウスでは異常なリソソームが蓄積することが分かっており、リソソームマーカータンパク質として用いられる Lamp1 やカテプシン B (CTSB) は有意に増加することが分かった。加えて、オートファジーに参与するユビキチン、p62、NBR1 と LC3-II の蓄積についても野生型と CTSD 欠損マウスの間で有意な差があることを明らかにした。さらに、所属研究室で開発した In-resin CLEM 法を用いて蓄積する p62、NBR1 の詳細な局在についても検討を加えた。予備実験で行った免疫電子顕微鏡法と同様に p62 や NBR1 は主に異常リソソームの表面近傍に集積することが確認できた。

また、脳以外の臓器や、若齢マウス（生後 9 日齢）を用いた検討も加えた。脊髄、心臓、肝臓、腎臓を用いて同様の検討をしたところ、p62 や NBR1 は脳と脊髄だけで顕著に増加し、他の臓器では野生型と大きな差がないことが分かった。さらに興味深いことに、生後 9 日齢の CTSD 欠損マウス脳内ではリソソームマーカータンパク質である Lamp1 や CTSB については増加傾向が認められたが、ユビキチン、p62、NBR1 については野生型と差がなかった。これらの結果から、CTSD 欠損マウス神経細胞内ではユビキチン、p62、NBR1 が異常リソソームの膜表面近傍に蓄積することが明らかとなった。さらにこの変化は中枢神経系に特異的な現象であり、p62、NBR1 は経時的に増加する可能性が示唆された。

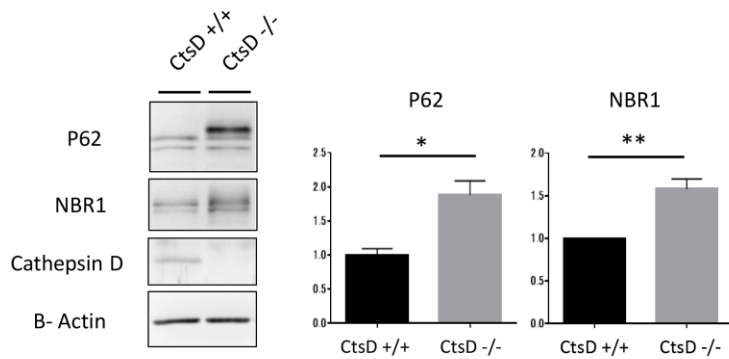


Fig.2.
 左：野生型、CtsD欠損マウス(生後23日齢)の脳におけるp62、NBR1のWesternblot像
 右：p62、NBR1シグナル強度 n=3の統計。標準偏差によりエラーバーを表示。
 有意差検定はt検定を用いた。 *<0.05、**<0.01、***<0.005

(3) CTSD/Atg7 Nestin Cre マウスでの異常リソソームと二重膜構造の検討について

作成したCTSD/Atg7 Nestin Cre マウスの大脳皮質、視床、小脳について電子顕微鏡による超微細形態観察を行った。CTSD 単独欠損同様にCTSD/Atg7 Nestin Cre マウスの脳内各領域にて異常リソソーム構造は散見されたが、二重膜構造により取り囲まれた異常リソソームは認められなかった。また、これまで観察してきた中で、CTSD/Atg7 Nestin Cre マウスで見られる異常リソソームのサイズや数に関してはCTSD 単独欠損と大きな差がないことも分かった。これらの結果から、CTSD 欠損マウスではオートファジーの有無に関係なく異常リソソームが蓄積し、それを取り囲む二重膜構造がオートファゴソームであることが示された。

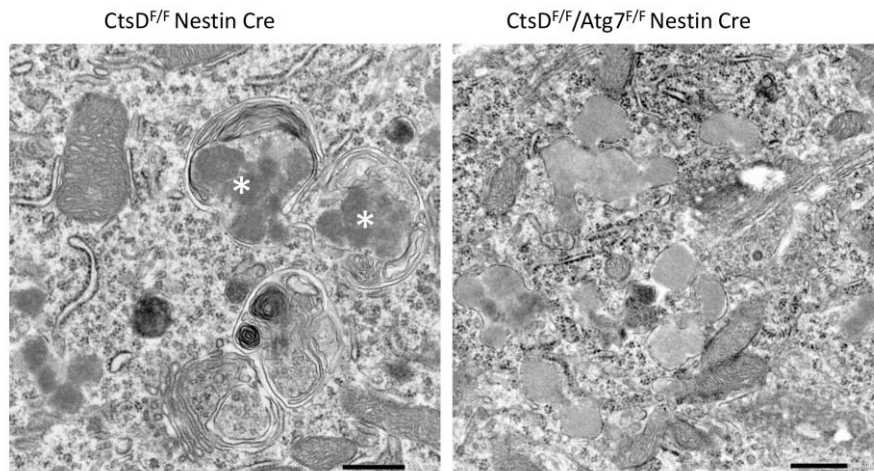


Fig.3.
 左：CtsD^{F/F} Nestin Creマウス (生後19日齢) 細胞での小脳プルキンエ細胞の電子顕微鏡像。
 右：CtsD^{F/F}/Atg7^{F/F} Nestin Creマウス (生後19日齢) の小脳プルキンエ細胞の電子顕微鏡像
 * はオートファゴソーム様膜構造に包まれた異常リソソームを示す。スケール：500 nm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Tanida Isei, Haruta Tomohiro, Suga Mitsuo, Takei Shunsuke, Takebe Akira, Furuta Yoko, Yamaguchi Junji, Oliva Trejo Juan Alejandro, Kakuta Soichiro, Uchiyama Yasuo	4. 巻 69
2. 論文標題 Membranous Structures Directly Come in Contact With p62/SQSTM1 Bodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 407 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/00221554211011423	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 Kawasaki Yuto, Hosoyamada Yasue, Miyaki Takayuki, Yamaguchi Junji, Kakuta Soichiro, Sakai Tatsuo, Ichimura Koichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Three-Dimensional Architecture of Glomerular Endothelial Cells Revealed by FIB-SEM Tomography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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) 10.3389/fcell.2021.653472	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 Sato Shigeto, Noda Sachiko, Torii Satoru, Amo Taku, Ikeda Aya, Funayama Manabu, Yamaguchi Junji, Fukuda Takahiro, Kondo Hiromi, Tada Norihiro, Arakawa Satoko, Watanabe Masahiko, Uchiyama Yasuo, Shimizu Shigeomi, Hattori Nobutaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Homeostatic p62 levels and inclusion body formation in CHCHD2 knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 443 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab057	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 Tanida Isei, Furuta Yoko, Yamaguchi Junji, Kakuta Soichiro, Oliva Trejo Juan Alejandro, Uchiyama Yasuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Two-color in-resin CLEM of Epon-embedded cells using osmium resistant green and red fluorescent proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78879-x	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 隼司、鈴木ちぐれ、角田宗一郎、眞田貴人、三井駿、谷田以誠、内山安男
2. 発表標題 中枢神経系特異的CTSD / Atg7両欠損マウスを用いた神経細胞内不良リソソームの品質管理機構の解明
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

〔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
---------	---------