

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21800048

研究課題名（和文）

神経突起形成におけるオートファジー関連タンパク Atg8 ホモログの機能解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of atg8 homologues in developing axons

研究代表者

西山 潤(NISHIYAMA JUN)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60508084

研究成果の概要（和文）：発達期の軸索においてオートファゴソームマーカーである LC3 が集積することを見出した。一方、電子顕微鏡を用いた解析においてオートファゴソーム様の構造体は認めなかった。これらの結果は LC3 が軸索においてオートファジーと独立した機能を持つことを示す。一方 *lurcher* マウスをモデルとした軸索変性時に、細胞内 ATP の低下とそれに続く AMPK の活性化によってオートファジーが誘導されることを見出した。更に遺伝的手法によってオートファジーを特異的に抑制すると神経変性が悪化した。これらの結果はオートファジーが神経細胞の生存に関与し得ることを示しており、神経変性疾患の新たな治療標的を示唆する所見である。

研究成果の概要（英文）： LC3, a only known marker for autophagosomes, were accumulated within developing axons. Interestingly, electron microscopical analysis reveals that there were no induction of autophagy in LC3 accumulated region, indicating that LC3 could have specific functions other than those in autophagy. Whereas, autophagy was remarkably induced in axons by intracellular ATP reduction and AMPK activation in *lurcher*-induced neurodegeneration. In addition, genetic suppression of autophagy significantly exacerbated *Lurcher*-induced neurodegeneration. These observations highlighted the cell-protective role of autophagy in neurodegeneration and modification and activation of the autophagic pathway could allow us to develop a new therapeutic approach to various neurodegenerative disorders involving excitotoxic mode of cell death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,280,000	384,000	1,664,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,480,000	744,000	3,224,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：オートファジー、神経細胞死、軸索変性

1. 研究開始当初の背景

オートファジー（自食作用）は酵母からヒトにいたるまでの真核生物に見られる大規模分解システムである。オートファジーの機能は、飢餓時に基質の分解によりアミノ酸や ATP を得るといった飢餓応答がよく知られているが、他にも、細胞内のクリアランス・

感染防御・受精など多様な生理的機能に重要な働きを担うことが明らかになっている。一方、神経細胞における機能は長らく不明であったが、オートファジーが神経細胞の生と死に深く関与することが次々と報告されている。例えば、ハンチントン舞蹈病やアルツハイマー病などの神経変性疾患における細胞

内凝集体の除去にオートファジーが重要な働きを果たすことが明らかになりつつある。しかし、生理的あるいは病的な過程において、オートファジーが神経細胞内のどの部位においてどのような機構で制御されているのか、といった未解明な問題が多く残されていた。

申請者らはこれまでに、小脳プルキンエ細胞特異的にオートファジーを抑制すると、軸索が腫大し異常な膜構造が蓄積することを報告した。また、オートファゴソーム膜の特異的マーカーである GFP-LC3 が全身に発現するトランスジェニックマウスを用いた予備実験の結果、LC3 が発達期の軸索に集積するという興味深い知見を得た。これらの結果より、オートファジー経路は生理的状態や病的状態において特に軸索末端部の形態や膜構造の維持に重要な役割を果たすという新しい仮説を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、軸索におけるオートファジー経路の生理的意義と制御機構を解明することによって、軸索形成・軸索変性におけるオートファジーの生理的・病的意義、及び軸索障害を伴う様々な神経変性疾患の病態を解明することを目的とする。具体的には、発達期の軸索におけるオートファジー及びオートファジー関連タンパク質 LC3, GATE-16 の生理的意義の解明、オートファジーと LC3, GATE-16 に着目した軸索再生・治療法の開発、を個別的に達成することにより、正常発達時および神経変性モデルマウス *lurcher*(Lc)における軸索におけるオートファジーの役割と制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) オートファゴソーム膜の特異的マーカーである LC3 に蛍光タンパク質 GFP が結合した LC3-GFP を発現するトランスジェニックマウスを用いて、出生 10 日において神経細胞軸索におけるオートファジーの活性を共焦点顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて解析を行った。また、オートファジー欠損マウス (*Nestin-Cre;Atg5^{fllox/fllox}*) で同様の解析を行うことで、軸索に集積した LC3-GFP がオートファゴソームであるか検討を行った。

(2) Lc マウスは、デルタ 2 型グルタミン酸受容体(GluD2)の点突然変異による遺伝性小脳失調マウスである。Lc マウスでは小脳プルキンエ細胞に顕著な細胞死が生じるが、神経変性が生じる前より、顕著なオートファジーの活性化と軸索腫大を生じるため、オートファジーの活性化を伴う軸索障害の最適なモデル動物である。このマウスと、Cre/LoxP システムを用いた小脳プルキンエ細胞特異的

オートファジー欠損マウス (*Pcp2-Cre;Atg5^{fllox/fllox}*) を交配し、神経変性の程度を定量的に解析することで Lc におけるオートファジーの活性化の意義を *in vivo* で解析した。更に、オートファジーが活性化される分子経路を同定するため、HEK293 細胞や海馬初代培養細胞に GluD2 (野生型・Lc 変異型) とオートファジーマーカーである EGFP-LC3 を共発現させ、オートファジーと細胞死を解析する簡便な *in vitro* の実験系を構築した。この実験系において、ATP センサータンパク AMPK の活性化をウエスタンブロットにて解析を行った。更に AMPK の機能阻害型変異体を発現した上で、オートファジーの活性化を解析した。

(3) 神経細胞は複数の樹状突起と 1 本の軸索から成り、この極性は神経細胞の機能に重要な役割を果たす。一方、オートファジーの神経細胞における役割は明らかになっておらず、軸索内での動態は不明であった。軸索におけるオートファゴソームの動態を明らかにするため、LC3-GFP マウスより小脳の移植片培養を作成し、神経軸索を同定した上でオートファゴソームの可視化を経時的に行うことができる実験系を構築した。オートファゴソームの軸索輸送に関与する分子モーターを明らかにするため、ダイニンの阻害薬である EHNA

(erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine) を投与し、オートファゴソームの動態の変化を定量的に解析した。また、興奮毒性刺激により軸索局所においてオートファジーが誘導されるか明らかにするため、NMDA

(N-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体のアゴニストを投与し、同様にオートファゴソームのタイムラプスイメージングを行った。

4. 研究成果

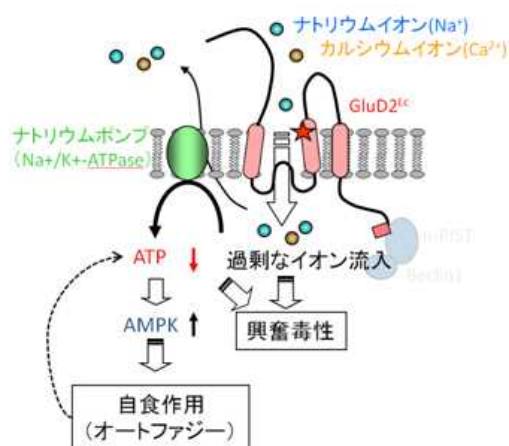
(1) GFP-LC3 は発達期の脳において小脳外顆粒層・前交連・脳梁など伸長しつつある軸索部分に強く集積した。一方、小脳外顆粒層における電子顕微鏡を用いた検討では、成体にはみられない 2 重膜構造がみられたが、抗 GFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法による解析ではこれらの構造体は免疫陰性であった。さらに連続切片による解析を行った結果、これらの 2 重膜構造に非対称性シナプスも同時に認められたため、これらは平行線維-プルキンエ細胞シナプスである可能性が考えられた。更に神経系特異的オートファジー欠損マウス (*Nestin-Cre;Atg5^{fllox/fllox}*) においても外顆粒層における GFP の集積を認めたことから、GFP-LC3 の集積はオートファジーと独立した現象であると考えられた。これらの結果はオートファゴソームマーカーである LC3

がオートファジーとは別の機能を神経細胞の軸索で生じている可能性を示唆しており、LC3の神経細胞における機能を考える上で興味深い所見である。

(2) GluD2^{Lc} を HEK293 細胞や海馬初代培養細胞に強制発現させ、オートファジーの誘導と細胞死を再現する *in vitro* の簡便な実験系を構築した。この系において GluD2^{Lc} を発現した細胞では、細胞死が生じる前より細胞内 ATP が顕著に低下していることを見出した。更に、細胞内の ATP センサーである AMPK (AMP-activated protein kinase) が活性化(リン酸化)されており、このリン酸化を阻害する優勢抑制型の変異体を共発現すると、Lc によるオートファジーの誘導が完全に抑制されることを見出した。一方、GluD2^{Lc} においては野生型には見られない持続的なイオン流入が生じていることが知られていたが、GluD2 の細孔(チャネルポア)領域に変異導入を行い、GluD2^{Lc} におけるイオン流入を完全に阻害すると Lc における細胞死とオートファジーの誘導が完全に抑制されることを見出した。これらの結果は、Lc におけるオートファジーの誘導が、細胞外からの持続的なイオン流入によるグルタミン酸興奮毒性により生じており、細胞内 ATP の低下とそれに引き続く AMPK の活性化によって誘導されていることを示している。更に、Lc マウスにおいて、小脳プルキンエ細胞特異的にオートファジーを抑制したマウス(GluD2^{Lc}; Pcp2-Cre; Atg5^{fllox/fllox})を作製し、Lc による神経変性が促進されることを *in vivo* ではじめて明らかにした(Nishiyama J. et al., The Journal of Neuroscience 2010)。これらの結果はオートファジーが細胞内 ATP の維持を介して神経細胞の生存維持に参与していることを示唆する。また、AMPK 経路などを修飾しオートファジーの活性を高めることで興奮毒性が関与する神経変性疾患の新規治療が開発できる可能性を示した(図1)。これらの結果は総説として報告した(Nishiyama J. Yuzaki M., Autophagy 2010)。

(3) 小脳の移植片培養における GFP-LC3 のタイムラプスイメージングによって、オートファゴソームが軸索内をゆらぎながらも一方向性に輸送されることを見出した。更に、EHNA 投与によりこの輸送が完全に抑制されたことから、オートファゴソームは軸索内でダイニン依存的に逆行性輸送されると考えられる。また、NMDA 投与による神経活動の上昇によって軸索内でオートファゴソームが顕著に増加することを見出した(Katsumata K. et al., Autophagy 2010)。これらの結果は神経細胞内でのオートファジーの動態を

めて定量的に示しただけでなく、様々な神経変性疾患で報告されている軸索でのオートファジーの活性化の病態を理解する上で重要な所見であると考えられる。



(図1)

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3件)

1. Nishiyama J, Yuzaki M. Excitotoxicity and autophagy: lurcher may not be a model of "autophagic cell death". Autophagy. 2010;2;6(4): 568-570 査読有
2. Katsumata K, Nishiyama J, Inoue T, Takeda J, and Yuzaki M. Dynein- and activity- dependent retrograde transport of autophagosomes in neuronal axons. Autophagy. 2010;6(3):378-853 査読有
3. Nishiyama J, Matsuda K, Kakegawa W, Yamada N, Mizushima N, Yuzaki M. Reevaluation of neurodegeneration in lurcher mice: constitutive ion fluxes cause cell death with, not by, autophagy. The Journal of Neuroscience. 2010;30(6):2177-87 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. Nishiyama J. Physiological and Pathological Role of Autophagy in Neurons. Global COE Program "Education and Research Center for Stem-Cell Medicine" "Keio KANRINMARU Project" COEX meeting #79, October 15, 2010, Tokyo, Japan

2. Nishiyama J, Matsuda K, Kakegawa W, Yamada N, Motohashi J, Mizushima N, Yuzaki M. Excitotoxicity and autophagy: Constitutive ion fluxes Induce autophagy to prevent neurodegeneration in Lurcher mice. Global COE Program Symposium 2010 Education and Research Center for Stem Cell Medicine, Feb 25-26, 2010, Tokyo, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

日本神経科学会ホームページ

「神経変性疾患と自食作用の関係；過剰なイオン流入によるエネルギー不足に対処するメカニズム」

<http://www.jnss.org/japanese/general/100323.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西山 潤(NISHIYAMA JUN)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60508084

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし