

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22700407

研究課題名（和文） Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体によるオートファジーの調節機構研究課題名（英文） Regulation of autophagy by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers

研究代表者

富樫 和也 (Kazuya Togashi)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第五部・流動研究員

研究者番号：40450613

研究成果の概要（和文）：オートファジーは細胞内分解系の一つで、長寿命蛋白や細胞内オルガネラ等の分解除去に寄与し、これによって正常な細胞機能を維持している。したがって、神経系におけるオートファジーの破綻は異常蛋白の凝集や神経変性疾患の原因となる。しかし、神経系におけるオートファジーの制御機構はほとんど知られていない。本研究では NHE の阻害剤がオートファジーを抑制すること、および細胞膜局在型の NHE の強制発現がポリグルタミンの凝集を顕著に抑制することを見出した。更に、NHE5 ノックアウトマウスとハンチントン病モデルマウスを交配させたところ、小脳顆粒細胞において顕著な凝集体の形成を認めた。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is an intracellular degradation process that clears long-lived proteins and organelles from the cytoplasm, and then maintains normal cellular functions. Thus failure of autophagy in neurons can result in the accumulation of aggregate-prone proteins and neurodegeneration. However, the regulation mechanism of autophagy in brain is less known. In the present study, I found that an NHE blocker inhibited autophagy and that the over expression of plasma membrane type NHEs significantly reduced the formation of poly glutamine aggregation in a cell-line. Moreover, NHE5KO/Htt-Tg mice were generated by crossing with NHE5 knockout mouse and a Huntington's disease model mouse in which a large number of aggregations were observed in the cerebellar granule cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体・オートファジー・神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーとはユビキチン-プロテアソーム系と並ぶ細胞内大規模分解系であり、酵母から哺乳類まで広く保存された機構で

ある。近年、分子生物学的手法により、多くの関連遺伝子群(Atg 遺伝子群)が明らかにされている(Ohsumi, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2001; Xie and Klionsky, *Nat Cell Biol.*,

2007)。これらの遺伝子改変動物を用いた解析から Atg5、Atg7 はオートファジーの誘導過程に必須の遺伝子であることが報告されている (Kuma *et al.*, *Nature*, 2004; Komatsu *et al.*, *J Cell Biol.*, 2005)。特に、神経特異的なオートファジーの不全は神経変性疾患様の徴候を示すことから神経変性疾患治療の標的として注目を集めている (Hara *et al.*, *Nature*, 2006; Komatsu *et al.*, *Nature*, 2006; Rubinsztein *et al.*, *Nat Rev Drug Discov.*, 2007)。更に、オートファジー不全により起こるユビキチン陽性封入体形成に関与する p62/SQSTM1 との関連も徐々に明らかにされている (Björkøy *et al.*, *J Cell Biol.*, 2005; Komatsu *et al.*, *Cell*, 2007)。多くの神経変性疾患では神経細胞内に異常蛋白の凝集体が起こることが知られているが、神経毒性はこれらの凝集体ではなく、凝集する前段階のオリゴマーが毒性を発揮すると考えられている (Taylor *et al.*, *Hum Mol Genet.*, 2003; Sánchez *et al.*, *Nature*, 2003)。細胞内凝集体の一種であるアグリソームの形成にはヒストン脱アセチル化酵素 HDAC6 が重要な役割を果たすことが報告されている (Kawaguchi *et al.*, *Cell*, 2003)。HDAC6 は酵素活性領域のほかにユビキチンおよび微小管のそれぞれと結合する領域を持ち、ユビキチン化蛋白を微小管形成中心に集める機能を有することから、こうして凝集した異常蛋白はオートファジーによって分解されることが示唆されていた。実際、ハンチントン舞踏病や脊髄球筋萎縮症といったポリグルタミン病モデルにおいて HDAC6 はオートファジーを増強して症状を改善しうることが示された (Iwata *et al.*, *J Biol Chem*, 2005; Pandey *et al.*, *Nature*, 2007)。また、オートファジーの調節因子の一つとして知られる mTOR を抑制することで誘導されるオートファジーがハンチントン舞踏病モデルにおいて凝集体の形成と細胞毒性を有意に低減することも報告されている (Ravikumar *et al.*, *Nat Genet.*, 2004)。しかし、神経系では飢餓状態においてもオートファゴソーム形成の指標である GFP-LC3 のドットは光学顕微鏡ではほとんど観察することができない (Mizushima *et al.*, *Mol Cell Biol.*, 2004)。これらのことから絶食などの飢餓条件によらないオートファジーの誘導機構を見出すことはこれらの細胞内異常蛋白凝集を特徴とする難治性の神経変性疾患に新たな治療法を開発の道を拓く可能性がある。そこで神経系でのオートファジーの誘導機構を解析するため、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro-2a 細胞を用いて EGFP-LC3 を安定に発現する細胞株 (EGFP-LC3/N2a) を作製し予備実験を行った。すると、この細胞では単純な血清・アミノ酸除去ではオートファ

ジーが誘導されなかった。そこで様々な細胞外液 (Krebs-Ringer 液、Hanks 液、Earl 液、PBS、電気生理学用標準細胞外液ほか) を比較したところ、Krebs-Ringer 液で最も強くオートファジーが誘導されることを見出した。また、電気生理学等で用いられるイオン置換法を用いて検討したところ、この細胞ではオートファジーの誘導に細胞外  $\text{Na}^+$  と  $\text{HCO}_3^-$  および  $\text{Ca}^{2+}$  が存在することが非常に重要であること、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度がオートファジーの度合いを調節していることを発見した。更に、細胞外 pH の低下すなわち酸性化がオートファジーを抑制することを見出した。対照的に細胞外 pH の上昇は血清を含有する培地中でもオートファゴソーム形成を誘導することを確認している。哺乳動物において細胞内外の pH を調節する分子機構には大きく分けて  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換担体 (NHE) と、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送担体 (NBC) が挙げられる (Chesler, *Physiol Rev*, 2003; Taylor *et al.*, *J Physiol*, 2006)。更に、予備実験として行った EGFP-LC3 を安定発現する NHE 欠損細胞株を用いた実験において、血清・アミノ酸除去及び細胞外 pH 依存的なオートファジーが起こらないことを確認している。しかし、この細胞に NHE1 または NHE5 をそれぞれ強制発現させると細胞外環境によるされることが確認された。このことは、細胞内 pH 変化に伴うオートファジーの制御に NHE1 または NHE5 あるいはその両方が関与していることを示唆している。実際、NHE1 は全身ほぼすべての細胞に発現し、主要な細胞内 pH の制御に関わると考えられているが、組織特異的に発現する他の NHE 分子と共存することも知られている (Masereel *et al.*, *Eur J Med Chem.*, 2003)。そこで、NHE の属する SLC9A ファミリーの遺伝子発現を RT-PCR 法により検証したところ、EGFP-LC3/N2a 細胞には細胞膜に存在する分子としては NHE1 と NHE5 が発現することが確認された。自然発生突然変異により NHE1 機能を欠損したマウス (*slow wave epilepsy*) ; 一塩基置換により蛋白の全長はコードされない) では半数以上が離乳前に死亡し、生存した個体も成長とともに深部小脳核 (DCN) および脳幹で選択的な神経細胞死を起こし、生後約 10~14 日で運動機能障害を伴った神経変性疾患様症状を呈することが報告されている (Cox *et al.*, *Cell*, 1997)。同様の表現型は人為的に作成されたノックアウトマウスでも報告されている (Bell *et al.*, *Am J Physiol*, 1999)。これらのマウスで NHE1 の欠損は全身におよぶにもかかわらず、脳においては特定の神経核に存在する細胞のみが脱落することから、細胞死を免れた神経細胞では NHE5 のような異なるアイソフォームによる代償機構が

働いている可能性が考えられる。しかし、現在までのところ NHE5 をはじめとする中枢神経系における細胞膜型 NHE の役割や生理的意義、各アイソフォームの脳内局在も含め、相互の機能的連関は明らかにされていない。しかしながら NHE1 欠損マウスにおけるその表現型はオートファジーの必須遺伝子である Atg5 や Atg7 の神経系特異的なオートファジー欠損マウスと類似しており、個体レベルでのオートファジーも NHE によって調節されていることが示唆される。

## 2. 研究の目的

神経系に発現する NHE のオートファジー活性化機構を明らかにすると共に、神経系における NHE の生理的役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) オートファジーフラックスアッセイ

マウス神経芽細胞腫由来の Neuro-2a 細胞を用いて、NHE 阻害剤 EIPA のオートファジーに対する作用、および NHE の強制発現によるオートファジーへの効果をウェスタンブロット法により確認した。

### (2) 各種プラスミドの作製

NHE のオートファジーに与える効果を評価するため、ポリグルタミン蛋白の凝集を指標として定量するにあたって各種ポリグルタミン鎖と蛍光蛋白の融合体を発現するプラスミドを作製した。ここで、NHE とポリグルタミン蛋白を共発現させるのにあたり、同時に発現させると NHE の発現量が十分増える前に細胞死が始まるため、NHE の発現後にポリグルタミン蛋白の発現を誘導出来る、Cre/loxP システムを用いた。

### (3) NHE5 の脳内分布の確認

NHE5 は脳に限局して発現することが報告されるが、脳内の局在について蛋白レベルでの発現分布の報告はない。そこでモノクローナル抗体の作製を試みたが残念ながら使用に耐える抗体を得ることはできなかった。そこで定量的 PCR を用いて嗅球、大脳、小脳、脳幹部に分けて mRNA の発現量を比較した。

### (4) 細胞膜指向性 pH 感受性蛍光蛋白 pdKeima-mem の作製

pH 感受性蛋白質として報告された Keima-red には 2 量体型の dKeima-red と単量体型の mKeima-red がある。当初、両方を用いてそれぞれの特性を調べ、成熟が早く、比較的発する蛍光の強い dKeima を用いることとした。また、細胞質に発現させるとオートファジーに依ってリソソームに輸送されてしまい、長時間観察には適さないことからこれを

改善するため、膜移行シグナルを付加し、pdKeima-mem を作製した。

### (5) dKeima-mem を用いた細胞内 pH イメージングシステムの構築

2 波長励起のため、dKeima での pH イメージングに最適なフィルターを選定し、細胞内 pH を測定できるシステムを構築した。

### (6) NHE5KO/Htt-tg マウスの作製

NHE5KO マウスと 2 種類のハンチントン病モデルマウスを交配したが、1 種類は出生率が悪かったことから断念し、もともと症状の緩やかな Htt-N171-82Q マウスと交配したマウス NHE5KO/Htt-tg を作製した。

### (7) ハンチントン病モデル動物を用いた免疫組織化学および定量的解析

NHE5KO マウス、Htt-N171-82Q マウスおよび NHE5KO/Htt-tg マウスをそれぞれ 2% の PFA 溶液で灌流固定し、抗ハンチンチン抗体、抗 p62/SQSTM1 抗体、抗ポリユビキチン抗体を用いて免疫染色し、凝集体の数、大きさ共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影して解析を行った。

## 4. 研究成果

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE)の阻害剤がオートファジーを阻害することから、まず、NHE の強制発現が異常蛋白の凝集を抑制するかどうかを調べた。マウス神経芽細胞株 Neuro-2a 細胞にポリグルタミン蛋白(polyQ) と NHE1、NHE5 およびそれらのイオン輸送活性欠損変異体をそれぞれ共発現させ、polyQ の凝集を観察した。また、最近、エンドソーム局在型の NHE6 について、通常は主にエンドソームに局在するが一部は細胞膜に移行するとの報告がなされたこと、および神経変性疾患の一種である Angelman 様症候群の患者においてそのイオン輸送活性を欠損した変異が同定されたことなどから、NHE1 と NHE5 に加えて同様の実験を行った。すると NHE1、NHE5、および NHE1 の変異体を強制発現させたときに polyQ の凝集を顕著に抑制したが、NHE5 の変異体及びエンドソーム局在型の NHE6 およびその変異体は抑制しなかった。このことは細胞内における凝集体の抑制には細胞膜局在の NHE が重要であることを意味する。次に、これら polyQ の凝集を抑制する NHE を強制発現させた細胞でオートファジーフラックスアッセイを行ったところ、実際に NHE 発現細胞においてオートファジーが活性化していることが確認された。これらのことは細胞膜局在型の NHE がオートファジーを介して異常蛋白の凝集を抑制することを示唆している。細胞内 pH イメージングの結果から細胞膜型

各細胞膜型 NHE を単独で強制発現した細胞では基底レベルの細胞内 pH が対照群に対し有意にアルカリ化していたことからそれらの NHE を介した細胞内 pH の上昇がオートファジーの活性化に関与していると考えられる。そこで、polyQ を発現させた細胞を用いて細胞内 pH イメージングを行ったところ、凝集体の形成に伴って細胞内 pH が低下していることが明らかとなった。これらのことから、NHE の強制発現は polyQ の凝集による細胞内酸性化を中和し、さらにオートファジーを活性化することで凝集体の分解・除去を促進しているものと考えられる。以上の結果を踏まえて、NHE5 ノックアウトマウスと polyQ 凝集を伴うハンチントン病モデルマウスを交配して NHE5KO/Htt-tg マウスを作製し、9 週齢の各マウスより脳切片を作製して組織学的な解析を行った。その結果、NHE5KO/Htt-tg マウスでは小脳の顆粒細胞において Htt-tg マウスに比べて顕著に polyQ 凝集体が蓄積しており、数、直径共に有意に大きいことが明らかとなった。本研究に用いたハンチントン病モデルマウスは 12 週齢頃から脳内に凝集体が観察されると報告されていることから、9 週齢の NHE5KO/Htt-tg マウスで見られた顕著な凝集体の蓄積は NHE5 の欠損に起因するものと考えられる。定量的 PCR により脳内各所における NHE5 の発現量を比較したところ、小脳では嗅球、大脳、脳幹部に比して 2 倍以上の発現量が確認された。この結果は Allen Institute が公開している NHE5 mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーションの結果とも一致しており、NHE5 は特に小脳顆粒細胞においてオートファジーを活性化し、細胞内清浄作用を担っているものと考えられる。NHE5 以外の細胞膜型 NHE は脳内の様々な部位に応じて複雑な発現パターンを取ることが報告されていることから小脳顆粒細胞以外の領域では、それらの NHE が協調的に細胞内浄化機能を担っているものと考えられる。これらのことから、脳内における細胞膜型 NHE は加齢性および異常蛋白の凝集を伴う遺伝性の神経変性疾患の治療標的となりうることが示唆された。

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 富樫 和也、荒木 敏之  
Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体の強制発現によるポリグルタミン凝集の抑制  
第 33 回日本分子生物学会・第 84 回日本生化学会合同大会 合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸

- ② 富樫 和也、荒木敏之  
Regulation of Autophagy by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger(s)  
第 34 回日本分子生物学会大会、平成 23 年 12 月 15 日、横浜

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
富樫 和也 (TOGSHI KAZUYA)  
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第五部  
流動研究員  
研究者番号：40450613
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし