

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15日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790183

研究課題名（和文）

神経系におけるリソソーム酵素の細胞間輸送経路の解明

研究課題名（英文）

Transcytosis of cathepsin D in nervous system.

研究代表者

柴田 昌宏 (SHIBATA MASAHIRO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10343253

研究成果の概要（和文）：

リソソーム酵素の細胞間輸送機構を明らかにするため、生体観察の容易な鶏胚モデルの構築を行った。以前申請者は、鶏胚で目的とする遺伝子を長期間・安定的に発現させることに成功した。今回、この方法を発展させ、Cre-loxP システムとトランスポゾンシステムを併用し、目的とする時期に、目的とする細胞で、目的とする遺伝子の発現を制御する機構に確立し、さらに、U6 プロモーターを分割することで、条件的に遺伝子発現の抑制を行えるシステムを確立した。

研究成果の概要（英文）：

A chick model to monitor the transcytosis of lysosomal enzymes in vivo was developed. I have previously shown that the stable integration of transgenes into chick genome using Tol2 transposition allows to trace astrocytes from the early embryo to late developmental stage near hatching. In this study, a conditional gene knockdown technique driven by U6 promoter using a combination of Cre-loxP system and Tol2 transposition was developed.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：リソソーム、カテプシン、ライソゾーム病、セロイドリポフスチノーシス

1. 研究開始当初の背景

リソソーム酵素は小胞体で合成された後、ゴルジ体でマンノース 6 リン酸 (M6P) の修飾

を受け、一部は構成性分泌経路により細胞外へ、大部分は M6P レセプター (MPRs) によってリソソームへと運ばれる。細胞外へと分泌

されたリソソーム酵素の中には、細胞表面に局在するMPRsによって再取り込み(エンドサイトーシス)され、リソソームへと運ばれるものもある。これらの機構はほぼ全ての細胞に普遍的に備わっており、細胞内分解機構の主役となっている。

リソソーム酵素が先天的に欠損または機能不全に陥ると、ライソゾーム病とよばれる先天性代謝異常疾患(特定疾患に指定)になる。ムコ多糖症、ポンベ病、バッテン病、I-cell病など、現在約30種類の疾患が報告されており、欠損する酵素によってその症状は異なるが、本来リソソームで分解されるべき基質(糖、脂質、タンパク質など)が蓄積するということが共通している。カテプシンD(CTSD)は代表的なリソソームプロテアーゼであり、申請者らの研究により、同遺伝子がライソゾーム病の1種である神経性セロイドリポフスチノーシスの原因遺伝子であることが明らかとなった(Koike et al, 2000 & 2005)。

ライソゾーム病の治療には酵素補充療法と骨髄移植が知られており、リソソーム酵素が細胞へ取り込まれることによってある程度良好な効果が得られている。しかし、リソソーム酵素が血液脳関門を越えることが出来ないため、中枢神経系に対しては有意義な効果を得るに至っていないのが現状である(Urayama et al, 2004)。言い換えると、リソソーム酵素が血液脳関門を越えて神経細胞へ到達出来れば、ライソゾーム病が克服されると予想される。

2. 研究の目的

申請者は、中枢神経系における神経性セロイドリポフスチノーシスの病態解析を行うため、CTSD遺伝子を神経特異的に欠損したマウスを作成し、その解析を行った。その結果、

同マウス神経細胞は、CTSD遺伝子が欠損しているにもかかわらず、有意にCTSDタンパクを発現していることが明らかとなった。この結果は、神経細胞が他の細胞(グリア)からCTSDを受け取っていることを示唆しているが、その分子機構については何も分かっていない。

本申請課題では、神経系におけるリソソーム酵素の細胞間輸送経路の解明を目的とし、生体観察の容易な鶏胚モデルの構築を試みた。

3. 研究の方法

(1) U6プロモーターの分割

条件的遺伝子発現抑制系を構築するため、Cre-loxPシステムで制御可能なU6プロモーターを構築した。具体的には、U6をshRNAに近い領域(PSE)と遠い領域(DSE)分割し、その間に2つのloxPサイトに挟まれた約2kbpのカセットを挿入した。今回は下記Tet-onシステムを厳密に制御させるため、サイレンサーであるtTSを使用した。このコンストラクトは、通常はU6プロモーターが機能しないが、Creリコンビナーゼの発現下では、PSEとDSEの間に挟まれた2つのloxPカセットが切り出され、結果的にU6プロモーターが機能するようになる。

(2) 条件的Cre発現系の構築

上記U6プロモーターの発現制御を条件的に機能させるため、ドキシサイクリン(Dox)を利用した条件的Creリコンビナーゼ発現系を構築した。本コンストラクトは以下①と②の2つのカセットで成立する。

- ① Dox依存的に遺伝子発現を可能とするTet-onシステムより、rtTAを発現するカセット。
- ② Doxと結合したrtTAにより遺伝子発現

が可能となるプロモーター下に、Cre リコンビナーゼ遺伝子を発現するカセット

(3) 持続的・恒常的発現系の構築

上記(2)の①と②で構築したコンストラクトを持続的かつ恒常的に機能させるため、メダカ由来のトランスポゾンである To12 システムを利用した。全カセットを2つの To12 配列の間に挿入し、1つのコンストラクトとした。

(4) 培養細胞での確認

上記(3)で構築したコンストラクトとトランスポゼースを発現するコンストラクトを HeLa 細胞へ導入し、コンストラクトの確認を行った。今回は標的遺伝子として視認性の優れた赤色蛍光タンパク (DsRed) を利用し、DsRed 遺伝子を標的とした RNAi 配列を挿入した。Dox 添加により DsRed 遺伝子の発現を抑制させた。

(5) 鶏胚への遺伝子導入

上記(4)と同様に、孵卵開始3日目鶏胚の神経管にエレクトロポレーション法により遺伝子を導入した。

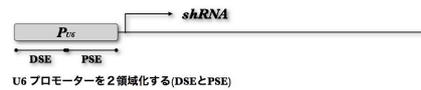
(6) 薬剤添加により遺伝子発現の抑制

孵卵4日目から12時間間隔で計4回、卵黄嚢に Dox を添加し、DsRed 遺伝子の発現を抑制させた。

4. 研究成果

(1) コンストラクトの概略を下図に示す。

条件的遺伝子発現抑制法の概略



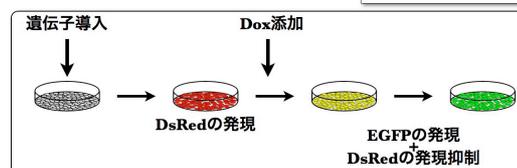
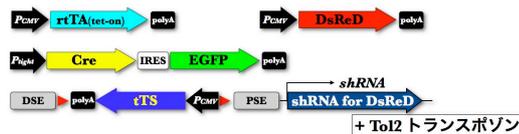
条件的遺伝子発現抑制系の概略図。Dox+組織特異的プロモーターにより、目的の細胞で任意の時期に Cre リコンビナーゼの発現が可能となり、結果的に目的遺伝子の発現が抑制される。

(2) HeLa 細胞で効果

DsRed を標的遺伝子とするため、同遺伝子を HeLa 細胞へ導入し、DsRed の RNAi 配列を本システムに挿入した。Cre リコンビナーゼが発現していることを確認するため、Cre 遺伝子と緑色蛍光タンパク (EGFP) を IRES で直列につなげた。Dox 添加により EGFP (緑) の発現が上昇し、DsRed (赤) の発現が低下していることが確認出来た。

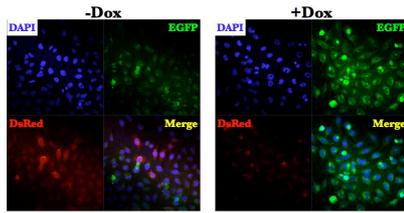
培養細胞とchickで検出

DsRedを標的遺伝子とし、CMVプロモーター下にDsRed、rtTAをコードするコンストラクトを導入



HeLa細胞での遺伝子発現抑制効果

遺伝子導入24時間後にDoxを投与し、その48時間後に観察



若干のEGFP発現が認められるが、血清にコンタミしているテトラサイクリンによる誘導と思われる。

EGFP発現が増強し、DsRedの発現が抑制されている。

(3) 鶏胚での効果

上記(2)と同じコンストラクトを孵卵3日目の鶏胚神経管にエレクトロポレーション法で導入した。翌日実体顕微鏡下で観察すると(左)DsRedのみ発現していることが確認出来た。その後、12時間間隔でDoxを投与し、孵卵6日目で鶏胚を取り出し、固定後、クライオ切片を作成して観察した。Dox添加(右)によりEGFP(緑)の発現が上昇し、DsRed(赤)の発現が低下していることが確認出来た。

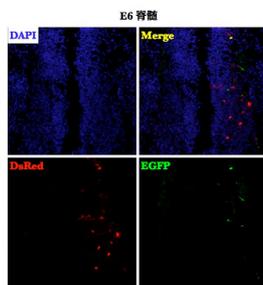
chickでの遺伝子発現抑制効果

E3で遺伝子導入し、E4で観察



DsRedのみ発現している

Dox投与
12時間間隔、計4回



EGFPの発現が認められる

以上の結果より、鶏胚を用いた遺伝子発現、遺伝子発現抑制システムの確立出来た。これより、鶏胚でリソソーム酵素の遺伝子発現を抑制させることが可能となり、鶏胚でライソゾーム病モデルの構築が可能となるだけでなく、2光子顕微鏡を用いたリソソーム酵素の生体観察も可能となる。

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. Yamazaki Y, Shibata M, Ushiki T, Isokawa K, Sato N. Bilateral, asymmetric anomalies of the anterior bellies of digastric muscles. *J Oral Sci.* 2011 Dec;53(4):523-7. (査読有り)
2. Matsuo T, Kawasaki K, Osada T, Sawahata H, Suzuki T, Shibata M, Miyakawa N, Nakahara K, Iijima A, Sato N, Kawai K, Saito N, Hasegawa I. Intracal electrocorticography in macaque monkeys with minimally invasive neurosurgical protocols. *Front Syst Neurosci.* 2011;5:34. (査読有り)
3. Shiozaki M, Hayakawa N, Shibata M, Koike M, Uchiyama Y, Gotow T. Closer association of mitochondria with lipid droplets in hepatocytes and activation of Kupffer cells in resveratrol-treated senescence-accelerated mice. *Histochem Cell Biol.* 2011 Oct;136(4):475-89. (査読有り)
4. Shibata M, Yoshimura K, Tamura H, Ueno T, Nishimura T, Inoue T, Sasaki M, Koike M, Arai H, Kominami E, Uchiyama Y. LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Mar 5;393(2):274-9. (査読有り)
5. Tamura H, Shibata M, Koike M, Sasaki M, Uchiyama Y. Atg9A protein, an

autophagy-related membrane protein, is localized in the neurons of mouse brains. J Histochem Cytochem. 2010 May;58(5):443-53. (査読有り)

6. Shibata M, Yoshimura K, Furuya N, Koike M, Ueno T, Komatsu M, Arai H, Tanaka K, Kominami E, Uchiyama Y. The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. Biochem Biophys Res Commun. 2009 May 1;382(2):419-23. (査読有り)

[学会発表] (計3件)

1. 「細胞の脱分化過程を観察する試み」
平林茂樹、伊藤健二郎、柴田昌宏、佐藤昇、
第117回日本解剖学会、2012年3月26日、
山梨大学(甲府、山梨県)

2. 「Gene transfer into the chick by using Tol2 transposition for studying the nervous system development.」

柴田昌宏、佐藤昇、第8回国際脳研究機構会議、2011年7月16日、(フィレンツェ、イタリア)

3. 「In vivo imaging of the chick using tol2 transposition」

柴田昌宏、伊藤健二郎、佐藤昇、第116回日本解剖学会、2011年3月30日、パシフィコ横浜(横浜:震災のため誌上開催)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 昌宏 (SHIBATA MASAHIRO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 10343253

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし