

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790238

研究課題名（和文） リソソームカテプシン群の基質の探索

研究課題名（英文） Searching for substrates of lysosomal cathepsins

## 研究代表者

小池 正人 (KOIKE MASATO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80347210

## 研究成果の概要（和文）：

カテプシン D 欠損マウスの全脳サンプルを用いて、同マウスにおいて増加しているタンパク質をプロテオーム解析にて探索し、いくつかのタンパク質を同定したが、その一部は、同マウスの変性した神経組織の活性化したミクログリアないしアストロサイトに局在していた。またカテプシン D によって活性化されると報告されているカテプシン C の動態を検討したところ、同マウス脳で著明な増加を見たが、活性型ミクログリアが同酵素を発現するためと判明した。

## 研究成果の概要（英文）：

For the discovery of substrates for cathepsin D, whole brain lysates from cathepsin D deficient (CD<sup>-/-</sup>) and the control littermate mice were separated by two-dimensional gel electrophoresis. Several proteins increased in CD<sup>-/-</sup> mouse brains were identified by mass spectrometry (MS). However immunohistochemical analyses revealed that some of the identified proteins were enriched in active microglia or astrocytes in CD<sup>-/-</sup> brains. We also found that the protein amount and activity of cathepsin C, which is a lysosomal protease and reported to be cleaved by cathepsin D in vivo, was increased. However cathepsin C was also detected in activated microglia in CD<sup>-/-</sup> brains.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：基礎医学・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 D、ノックアウトマウス、基質特異性、ミクログリア、カテプシン C

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは、リソソームの代表的はアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D の欠損マウス (CD<sup>-/-</sup>マウス) を解析した結果、リソソーム病の一種の神経性セロイドリポフスチン蓄積症 (NCL) のモデルとなること、サブユニット c が CD の基質候補であることを発見した。CD の基質候補を同定することは、CD の酵素としての特性を明らかにするのみならず、NCL の病態解明にとっても重要な課題である。文献上、CD に関する基質の候補とし

て、すでに様々な物質が挙げられている。しかしながら、これらは in vivo 研究に終始しており、生理的な条件では遭遇する筈のないタンパク質も多く候補に挙げられているのが現状である。

## 2. 研究の目的

CD<sup>-/-</sup>マウスの脳組織と対照群の脳組織について差異のあるタンパク質を網羅的に同定し、これらを更に生化学的、組織化学的に検証することで、CD の基質を可能な限り決定することを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) プロテオーム解析

終末期（生後 20 日以降）の CD 欠損 (CD<sup>-/-</sup>) マウスおよび対照群全脳を用いて二次元発現差異解析を行い、ノックアウトマウスと対照群において発現量が異なるタンパク質を質量分析装置を用いて同定した。

#### (2) 二次スクリーニング

差異が認められた構造物のうち抗体が手に入るものに関してはその抗体を入手して CD<sup>-/-</sup>マウスと対照群の脳組織において細胞内局在の免疫組織化学的検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) プロテオーム解析

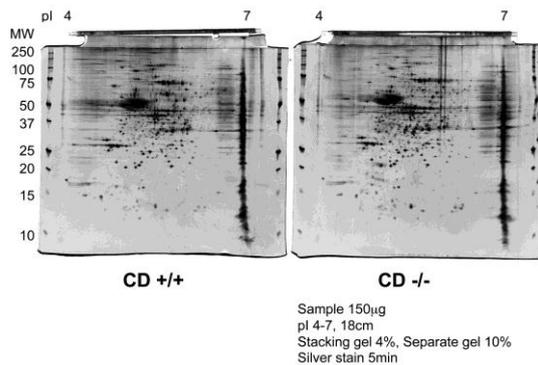


図1 CD<sup>-/-</sup> (右) および対照群 (左) 由来の全脳組織の二次元電気泳動

CD<sup>-/-</sup>および対照群由来の全脳組織の二次元電気泳動を行い、CD<sup>-/-</sup>マウス脳由来のサンプルで増加しているスポットを質量分析法により同定した。その結果、既に増加することが判明していた 26S proteasome, non-ATPase subunit 14, apolipoprotein E, peroxiredoxin 6 に加えて、Fatty acid-protein 5, ATP synthase subunit gamma, 60 kDa heat shock protein, Alpha-soluble NSF attachment protein, Sulfotransferase 4A1, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5, ATP synthase subunit beta, Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 が同定された。私たちは既にミトコンドリアのサブユニット c のほかにサブユニット b も CD<sup>-/-</sup>脳で増加することを報告しており、本解析においてもサブユニット b に加えて ATP synthase subunit gamma, 60 kDa heat shock protein などのミトコンドリアのタンパク質が同定された。

#### (2) 二次スクリーニング

既に増加することが判明していた 26S proteasome, non-ATPase subunit 14, peroxiredoxin 6, さらに Fatty acid-protein 5, Sulfotransferase 4A1 に対する抗体を用いて免疫組織化学を行った結果、これらの分子は CD<sup>-/-</sup>マウス脳で認められる活性化型ミク

ログリア、アストロサイトにおいて二次的に増加することが明らかとなった。

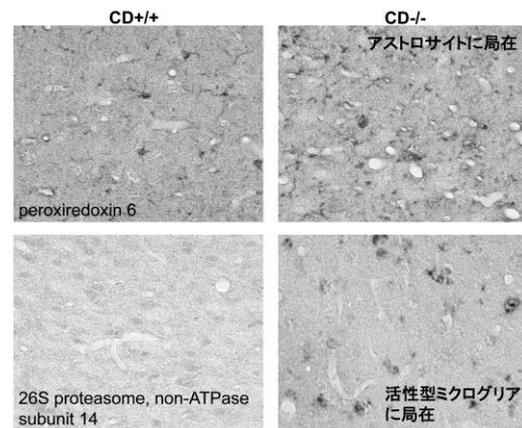


図2 CD<sup>-/-</sup> (右) および対照群 (左) 脳組織における peroxiredoxin 6(上)、26S proteasome, non-ATPase subunit 14(下)の局在

(3) CD<sup>-/-</sup>マウス脳でのカテプシン C の増加 N 末端から 2 個のアミノ酸残基を切断するリソゾームのシステインプロテアーゼであるカテプシン C (CC) はヒトの遺伝性皮膚疾患の Papillon-Lefevre および Haim-Munk 症候群は同酵素遺伝子の変異によって起こることが報告されている。神経組織における CC の発現量は極めて低いことが知られている。CC は CD により活性化されるという報告があるため、CD<sup>-/-</sup>マウス脳における CC の増加の有無を検討した。その結果、CD<sup>-/-</sup>マウスにおける活性化ミクログリアに特異的に上昇することを見出した。

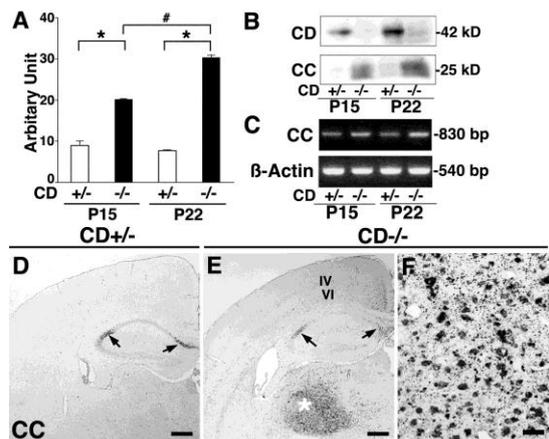


図3 CD<sup>-/-</sup>マウスおよび対照群の脳組織における CC の活性 (A)、ウエスタンブロット (B) および発現 (C)。(D-F) 対照群 (D) および CD<sup>-/-</sup>マウス (E, F) 脳における CC の局在

その際、対照群マウスにおいても一部の神経細胞において陽性反応が得られたため、8 週齢の正常マウス脳における同酵素の分布を免疫組織化学により詳細に検討したとこ

ろ、副嗅球、中隔、海馬の一部 (CA2、fasciola cinereum、indusium griseum、tenia tecta、一部の介在ニューロン)、大脳皮質の一部 (前帯状皮質や運動皮質) の第五層、下丘のニューロンで顆粒状の強い陽性反応が認められた。

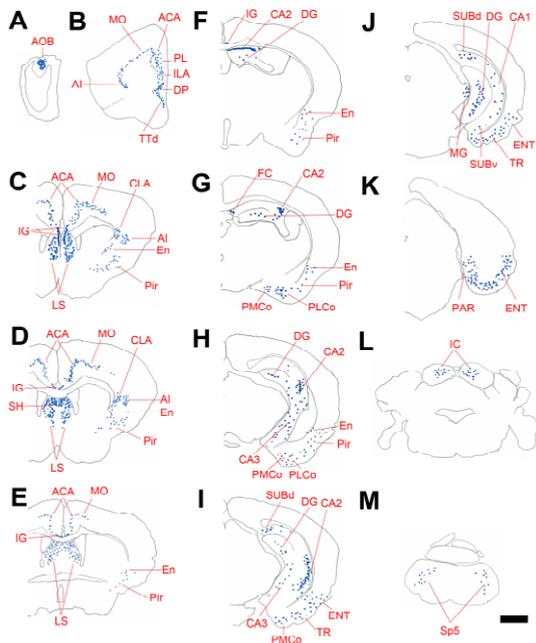


図4 8週齢の正常マウス脳におけるCCの分布(青点)。ACA, anterior cingulate area; AI, agranular insular area; AOB, accessory olfactory bulb; CLA, claustrum; DG, dentate gyrus; DP, dorsal peduncular area; En, endopiriform nucleus; ENT, entorhinal area; FC, fasciola cinereum; IC, inferior colliculus; IG, indusium griseum; ILA, infralimbic area; LS, lateral septum; MG, medial geniculate nucleus; MO, motor area; PAR, parasubiculum; Pir, piriform area; PL, prelimbic area; PLCo, posterolateral cortical amygdaloid nucleus; PMCo, posteromedial cortical amygdaloid nucleus; SH, septhippocampal nucleus; Sp5, spinal trigeminal nucleus SUBd, dorsal subiculum; SUBv, ventral subiculum; TR, amygdalopiriform transition area; TTD, dorsal tenia tecta.

ニューロンの他には脈絡叢細胞で陽性反応が認められた。通常状態のミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞では陰性であった。

## 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)

[雑誌論文] (計19件)

- ① Mori, H. \*, Koike, M. \*, Gotow, T., Ichimura, K., Asaoka, D., Oguro, M., Nagahara, A., Ueno, T., Uchiyama, Y., Watanabe, S. Ultrastructural analyses of the rat esophageal stratified epithelium under normal conditions and chronic reflux esophagitis. Arch. Histol. Cytol. in press. (\*These authors contributed equally to this work)
- ② Koike, M. \*, Tanida, I. \*, Nanao, T., Tada, N., Iwata, J., Ueno, T., Kominami, E., Uchiyama, Y. Enrichment of GABARAP relative to LC3 in the axonal initial segments of neurons. PLoS One 8(5):e63568, 2013. (\*These authors contributed equally to this work)
- ③ Matsui, H. \*, Sato, F. \*, Sato, S., Koike, M., Taruno, Y., Saiki, S., Funayama, M., Ito, H., Taniguchi, Y., Uemura, N., Toyoda, A., Sakaki, Y., Takeda, S., Uchiyama, Y., Hattori, N., Takahashi, R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. FEBS letters 587(9):1316-25, 2013. (\*These authors contributed equally to this work)
- ④ Ohkouchi, S., Shibata, M., Sasaki, M., Koike, M., Saftig, P., Peters, C., Nagata, S., Uchiyama, Y. Biogenesis and proteolytic processing of lysosomal DNase II. PLoS One 8(3):e59148, 2013.
- ⑤ Koike, M., Shibata, M., Ezaki, J., Peters, C., Saftig, P., Kominami, E., Uchiyama, Y. Differences in expression patterns of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I in normal, pathological and aged mouse central nervous systems. Eur. J. Neurosci. 37(5):816-20, 2013.
- ⑥ Hayakawa, N., Shiozaki, M., Shibata, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Gotow, T. Resveratrol affects undifferentiated and differentiated PC12 cells differently, particularly with respect to possible differences in mitochondrial and autophagic functions. Eur. J. Cell Biol. 92(1):30-43, 2013.
- ⑦ Piao, X., Komazawa-Sakon, S., Nishida, T., Koike, M., Piao JH., Ehlken, H., Kurihara, H., Hara, M., van Rooijen, N., Schütz, G., Ohmuraya, M., Uchiyama, Y., Yagita, H., Okumura, K., He YW., Nakano, H. c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and programmed necrosis. Sci. Signal 5 (255): ra93,

- 2012.
- ⑧ Tashiro Y. \*, Urushitani, M. \*, Inoue, H., Koike, M., Uchiyama, Y., Komatsu, M., Tanaka, K., Yamazaki, M., Abe, M., Misawa, H., Sakimura, K., Ito, H., Takahashi, R. Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 109(43):42984-94, 2012. (\*These authors contributed equally to this work)
- ⑨ Imaizumi, Y., Okada, Y., Akamatsu, W., Koike, M., Kuzumaki, N., Hayakawa, H., Nihira, T., Kobayashi, T., Ohyama, M., Sato, S., Takanashi, M., Funayama, M., Hirayama, A., Soga, T., Hishiki, T., Suematsu, M., Yagi, T., Ito, D., Kosakai, A., Hayashi, K., Shouji, M., Nakanishi, A., Suzuki, N., Mizuno, Y., Mizushima, N., Amagai, M., Uchiyama, Y., Mochizuki, H., Hattori, N., Okano, H. Mitochondrial dysfunction with increased oxidative stress and  $\alpha$ -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain. *Molecular Brain* 5(1):35, 2012.
- ⑩ Klionsky, D.J. and 1428 authors. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8(4) 445-544; 2012.
- ⑪ Unno, T., Wakamori, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Ishikawa, K., Kubota, H., Yoshida, T., Sasakawa, H., Peters, C., Mizusawa, H., Watase, K. The development of Purkinje cell degeneration in a knockin mouse model reveals lysosomal involvement in the pathogenesis of SCA6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(43):17693-8, 2012.
- ⑫ Sekine, S., Kanamaru, Y., Koike, M., Nishihara, A., Okada, M., Kinoshita, H., Kamiyama, M., Maruyama, J., Uchiyama, Y., Ishihara, N., Takeda, K., Ichijo, H. Rhomboid protease PARL mediates the mitochondrial membrane potential loss-induced cleavage of PGAM5. *J. Biol. Chem.* 287(41):34635-45, 2012.
- ⑬ 小池正人、内山安男。「神経性セロイドリポフスチン蓄積症における”異常なリソソーム”のオートファジーによる処理」生体の科学 63(5): 404-5; 2012.
- ⑭ Nori, S., Okada, Y., Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Fujiyoshi, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Ikeda, E., Toyama, Y., Yamanaka, S., Nakamura, M., Okano, H. Grafted human induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promotes motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108(40): 16825-30, 2011.
- ⑮ Uchida, Y., Hasegawa, J., Chinnapen, D., Inoue, T., Okazaki, S., Kato, R., Wakatsuki, S., Misaki, R., Koike, M., Uchiyama, Y., Iemura, S., Natsume, T., Kuwahara, R., Nakagawa, T., Nishikawa, K., Mukai, K., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Sheff, D., Lencer, W. I., Taguchi, T., Arai H. Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108(38): 15846-51, 2011.
- ⑯ Koyanagi, M., Asahara, S., Matsuda, T., Hashimoto, N., Shigeyama, Y., Shibutani, Y., Kanno, A., Fuchita, M., Mikami, T., Hosooka, T., Inoue, H., Matsumoto, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Noda, T., Seino, S., Kasuga, M., Kido, Y. Ablation of TSC2 enhances insulin secretion by increasing the number of mitochondria through activation of mTORC1. *PLoS One* 6(8): e23238, 2011.
- ⑰ 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.* 136(4): 475-89, 2011.
- ⑱ Oguro, M., Koike, M., Ueno, T., Asaoka, D., Mori, H., Nagahara, A., Uchiyama, Y., Watanabe, S. Dissociation and dispersion of claudin-3 from the tight junction could be one of the most sensitive indicators of reflux esophagitis in a rat model of the disease. *J. Gastroenterol.* 46(5): 629-38, 2011.
- ⑲ 小池正人、内山安男。「リソソームプロテアーゼの多様性とその病態生理学的役割」*実験医学増刊号* 29(12): 1903-1908; 2011. [学会発表] (計 26 件)
- ① 小池正人、内山安男、第 34 回日本神経科学大会、カテプシン D 欠損に伴う神経性ロイドリポフスチン蓄積症の病態形成にオートファジーが果たす役割について、2011 年 9 月 15 日、パシフィコ横浜
- ② 岡田洋平、宮冬樹、金村米博、砂堀毅彦、小池正人、幸田和久、柚崎通介、内山安男、角田達彦、山中伸弥、岡野栄之、第 34 回日本神経科学大会、神経分化と造腫瘍性から迫るヒト iPS 細胞の品質評価、

- 2011年9月17日、パシフィコ横浜
- ③ 砂堀毅彦、小池正人、内山安男、第34回日本神経科学大会、虚血性侵襲に対するヒアルロン酸4糖の神経細胞保護効果の検討、2011年9月17日、パシフィコ横浜
- ④ Koike, M., Uchiyama, Y. Possible roles of LC3, ubiquitin, and P62 and/or Nbr1 in the accumulation of lysosomes in neurons deficient in Cathepsin D. 41st Annual Meeting Society for Neuroscience, 2011年11月13日、ワシントン・コンベンション・センター
- ⑤ Sunabori, T., Koike, M., Uchiyama, Y. Protective effects of hyaluronan tetrasaccharide on hippocampal pyramidal neurons in neonatal mouse brains after hypoxic-ischemic injury. 41st Annual Meeting Society for Neuroscience, 2011年11月13日、ワシントン・コンベンション・センター
- ⑥ Kaneko, N., Marin, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Levigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H., Rubenstein, J.L., Sawamoto, K. New neurons use Slit 1 to maintain astrocytic tunnels for their rapid migration in the adult brain. 41st Annual Meeting Society for Neuroscience, 2011年11月15日、ワシントン・コンベンション・センター
- ⑦ 小池正人、山口隼司、内山安男、第17回グリアクラブ、カテプシンBDダブルノックアウトマウスの中枢神経系の形態学的解析、2013年3月1日、ヒルトンニセコビルリッジ
- ⑧ 小池正人、内山安男、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、正常および老齢マウス脳におけるリソソームカテプシンCの分布、2011年3月27日、山梨大学甲府キャンパス
- ⑨ 多村博澄、佐々木光穂、小池正人、内山安男、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、ほ乳類 Atg9AmRNA ノックダウン HeLa 細胞について/A study on Atg9AmRNA-knockdown HeLa cells, 2011年3月27日、山梨大学甲府キャンパス
- ⑩ 鈴木ちぐれ、砂堀毅彦、佐々木光穂、多村博澄、小池正人、内山安男、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、腎虚血尿細管傷害におけるオートファジー・リソソーム系の関わりについて、2011年3月28日、山梨大学甲府キャンパス
- ⑪ Sunabori, T., Koike, M., Uchiyama, Y. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、Protective effects of hyaluronan tetrasaccharide on hippocampal pyramidal neurons in neonatal mouse brains after hypoxic-ischemic injury. 2011年3月28日、山梨大学甲府キャンパス
- ⑫ Sunabori, T., Koike, M., Uchiyama, Y. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、Protective effects of hyaluronan tetrasaccharide on hippocampal pyramidal neurons in neonatal mouse brains after hypoxic-ischemic injury. 2011年3月28日、山梨大学甲府キャンパス
- ⑬ Koike, M., Uchiyama, Y. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Different expression patterns of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I in normal, pathological and aged central nervous system of mice. 2012年8月29日、京都国際会議場
- ⑭ 早川直哉、塩崎元子、柴田昌宏、小池正人、内山安男、後藤隆洋、第35回日本神経科学大会、レスベラトロールは未分化PC12細胞では障害的に分化PC12細胞では保護的に作用する、2012年9月18日、名古屋国際会議場
- ⑮ 砂堀毅彦、小池正人、内山安男、第35回日本神経科学大会、ヒアルロン酸4糖は低酸素/脳虚血負荷依存性にToll様受容体2/4の活性化を抑制することで海馬錐体細胞に神経保護効果を示す、2012年9月18日、名古屋国際会議場
- ⑯ 小池正人、内山安男、第35回日本神経科学大会、正常・老齢・各種傷害時のマウス脳におけるリソソームカテプシンCの分布、2012年9月21日、名古屋国際会議場
- ⑰ Imaizumi, Y., Okada, Y., Akamatsu, W., Koike, M., Hayakawa, H., Kuzumaki, N., Ohyama, M., Ito, D., Uchiyama, Y., Mochizuki, H., Hattori, N., Okano, H. Mitochondrial dysfunction and  $\alpha$ -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain of cell donor. 42nd Annual Meeting Society for Neuroscience, 2012年10月14日、ニューオーリンズ
- ⑱ Koike, M., Uchiyama, Y. Different expression patterns of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I in normal, pathological and aged central nervous system of mice. 42nd Annual Meeting Society for Neuroscience, 2012年10月15日、ニューオーリンズ
- ⑲ Nori, S., Okada, Y., Itakura, G., Kobayashi, Y., Yasuda, A., Koike, M., Uchiyama, Y., Ikeda, E., Toyama, Y., Yamanaka, S., Okano, H., Nakamura, M. Grafted unsafe human iPSC-derived

neurospheres promote temporal functional recovery in spinal cord injured mice, followed by neoplasm formation and motor deterioration after long term observation. 42nd Annual Meeting Society for Neuroscience, 2012年10月15日、ニューオーリンズ

⑳ Hayakawa, N., Shiozaki, M., Shibata, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Gotow, T. PC12 cells are influenced differently by resveratrol depending on their differentiation. 42nd Annual Meeting Society for Neuroscience, 2012年10月17日、ニューオーリンズ

㉑ Koike, M., Shibata, M., Sunabori, T., Sakimura, K., Uchiyama, Y. Genetic dissection of the role of cathepsin D in mouse central nervous system. 6th International Symposium on Autophagy, 2013年10月28日、万国津梁館

㉒ 小池正人、柴田昌弘、砂堀毅彦、崎村健司、内山安男、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、Characteristic differences between Purkinje cells specifically deficient in cathepsin D and Atg7, 2013年3月28日、サンポートホール高松、かがわ国際会議場

㉓ 七尾友久、小池正人、山口隼司、砂堀毅彦、佐々木光穂、内山安男、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、初代培養神経細胞の成熟過程におけるリソソームの局在動態について、2013年3月28日、サンポートホール高松、かがわ国際会議場

㉔ 山口隼司、佐々木光穂、小池正人、七尾友久、砂堀毅彦、内山安男、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、軸索終末部に置けるAtg9Aを含む小胞の膜成分の精製および解析、2013年3月28日、サンポートホール高松、かがわ国際会議場

㉕ 早川直哉、森本美幸、柴田昌弘、小池正人、内山安男、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、レスベラトロールによるミトコンドリア/オートファジー機能制御と細胞寿命との関係、2013年3月29日、サンポートホール高松、かがわ国際会議場

㉖ 鈴木ちぐれ、砂堀毅彦、佐々木光穂、小池正人、内山安男、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、オートファジー/リソソームプロテアーゼの腎虚血再灌流尿細管傷害における役割について、2013年3月30日、サンポートホール高松、かがわ国際会議場

[図書] (計2件)

① 小池正人、内山安男。「リソソーム内の分解機構」オートファジー 生命をささえる

細胞の自己分解システム (水島昇・吉森保編集) (化学同人), 67-76, 2012.

② 小池正人、「マウス低酸素-脳虚血負荷後の神経細胞死の遺伝学的検討」ブレインサイエンスレビュー2011 (伊藤正男・川合述史編集) (クバプロ), 149-168, 2011.

[その他]

ホームページ等

[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/shinkei\\_kozo/index.html](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/shinkei_kozo/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小池 正人 (KOIKE MASATO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80347210