

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460276

研究課題名(和文) in vivoにおけるミトコンドリア品質管理機構についての組織化学的評価

研究課題名(英文) Immunohistochemical evaluation of mitochondrial quality control in vivo

研究代表者

小池 正人 (Koike, Masato)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80347210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1) Atg7遺伝子を神経系特異的に欠損させたマウスとParkin欠損したマウスそれぞれとカテプシンD欠損マウスとのダブルノックアウトマウスを作成したところ、前者でミトコンドリアサブユニットcの蓄積が完全に阻害されたが、後者では部分的な阻害に止まった、Parkinを介するマイトファジーの寄与は部分的であった。2) 神経細胞特異的に鉄を増加させたIRP2トランスジェニックマウスと parkin欠損マウスを交配して得た二重変異マウスで黒質のドパミン細胞特異的な神経変性を見出した。3) オメガソームのマーカータンパク質とされるDFCP1についてその内在性分子のミトコンドリアに関連した局在を示した。

研究成果の概要(英文)：1. Lysosomal accumulation of mitochondrial subunit c in cathepsin D (CD) deficient neurons were completely inhibited in neurons doubly deficient in CD and Atg7 and only partially reduced in neurons doubly deficient in CD and parkin, indicating the limited contribution of mitophagy mediated by parkin in the mitochondrial quality control in neurons. 2. Intercrossing of the transgenic (Tg) mice expressing iron regulatory protein 2 (IRP2) to Parkin knockout mice perturbed the integrity of neurons specifically in the substantia nigra and provoked motor symptoms. 3. Therefore, we produced antibodies specific to mouse DFCP1, a marker for omegasomes. In HeLa cells under normal conditions, dotted or tubular immunoreactivity for DFCP1 was found along Tom20-positive mitochondria. Moreover, under starved conditions, DFCP1-positive structures were co-localized in one part of the LC3-positive autophagosomes.

研究分野：解剖学

キーワード：ミトコンドリア マイトファジー リソソーム parkin オメガソーム DFCP1

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはリソソームの代表的なアスバラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D の欠損マウスを解析し、神経細胞をはじめとする様々な細胞のリソソームにミトコンドリア内膜の  $F_1F_0$ ATPase のサブユニット c が蓄積することを明らかにした(Koike et al., J. Neurosci. 2000)。サブユニット c の蓄積はオートファジーによりリソソームに運ばれたミトコンドリアの分解不全の指標となることを示している。

特に、ミトコンドリアをオートファジーにより選択的に分解する過程はマイトファジーと呼ばれており、哺乳類細胞においては若年性パーキンソン病の原因遺伝子の一つ PARK2 にコードされるユビキチンリガーゼ Parkin がマイトファジーに関連していることが明らかとなった。

申請者らは PARK2 遺伝子異常を有する家族性パーキンソン病患者より作出した人工多能性幹細胞(iPS 細胞)より分化させた神経細胞の形態学的解析に参画した(Imazumi et al., Mol. Brain 2012)。同病患者 iPS 細胞由来の神経細胞は酸化ストレスが亢進しており、不整なクリステなどの形態異常を呈するミトコンドリアが細胞体に集積することを示し、PARK2 にコードされている Parkin が、ミトコンドリアの品質管理に重要であることを遺伝学的に直接証明した。

申請者はさらにミトコンドリア膜電位阻害剤 CCCP を投与した際の iPS 細胞由来神経細胞におけるミトコンドリアの超微形態変化を観察したが、典型的なマイトファジーでは説明できない形態像を見出してきた。

## 2. 研究の目的

そこで、オートファジーが行うことができない、あるいは Parkin が欠損した各種組織、細胞におけるミトコンドリアの品質管理の低下の有無について超微形態学的評価、組織細胞化学的評価を通して、in vivo におけるミトコンドリア品質管理機構について評価を行うことを研究目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物

マクロオートファジーに必須な Atg7 遺伝子を神経系特異的に欠損させたマウス (Atg7<sup>F/F</sup>;Nes)ないし、マイトファジーに必須な Parkin 遺伝子を欠損したマウス (Parkin<sup>-/-</sup>)と、カテプシン D 欠損(CD<sup>-/-</sup>)マウスとを交配しそれぞれのダブルノックアウトマウスを交配しカテプシン D/Atg7、カテプシン D/parkin ダブルノックアウトマウス (CD<sup>-/-</sup>-Atg7<sup>F/F</sup>;Nes ないし CD<sup>-/-</sup>-Parkin<sup>-/-</sup>マウス)を作成した。IRP2 Tg, parkin 単独欠損、IRP2 Tg parkin KO 二重変異マウスについては京都大学大学院医学系研究科岩井県キユ室より導入した。

### (2) 免疫組織化学

マウスを 4%PA (0.1MPB (pH7.2)) で灌流固定して得た脳組織由来のパラフィン切片ない

し凍結切片を用いて酵素抗体法による免疫組織化学を行った。切片を私たちの研究室で作成したウサギ抗 LC3B (1:100, Cell signaling)、sutunit c(1:100)抗体とそれぞれ一晚反応させ、ABC 法により DAB 発色を行った。

### (2) 電子顕微鏡による純形態観察

マウスを 2%パラホルムアルデヒド(PA)-2%グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液 (PB)(pH7.2)) で灌流固定し、取り出した脳組織を 1 mm 厚に細切後、1%四酸化オスミウム溶液、1%酢酸ウラン溶液に浸透させ、脱水後エポキシ樹脂に包埋した。ウルトラミクロトーム(ライカ UC7)を用いて 80 nm 厚の切片を作製し、電子染色後、電子顕微鏡(日立 HT7700)で観察した。

### (3) 抗 DFCEP1 抗体の作成

ヒト DFCEP1 のアミノ酸配列に基づき、2つのペプチド (EELHRQERLRNHERIRLKAGHVPYC、CDARNVQLDVTEAQADDEGGTLIARK)を抗原としてウサギに摂取し、血清を採取し、抗原カラムを用いて抗体を生成した。

### (4)DFCEP1 強発現、およびノックダウン細胞の作成

マウス DFCEP1 の翻訳領域をサブクローニングし、N 末に mCherry を融合して発現するためのベクターを作成した。これを HeLa 細胞に発現させ mCherry-DFCEP1 強発現細胞を得た。DFCEP1 ノックダウンはシグマ社より DFCEP1 に対する siRNA を購入し、発現後 48 時間後に用いた。ノックダウン細胞を容易に同定するため、siRNA と共に GFP を発現させた。

### (5) 飢餓細胞の調整

各種細胞は通常時には 10%FBS 添加 DMEM で培養し、飢餓によるオートファジー誘導時には Wako 社の D-MEM (高グルコース)(ピルビン酸ナトリウム含有, アミノ酸不含)で 90 分間培養した。

### (6) 培養細胞の免疫組織化学

各種培養細胞を 4%PA/0.1MPB で固定し、ウサギ抗 DFCEP1 (1:200)、マウス抗 GM130(1:200、BD)、Bip (1:200、BD)、TOM20 (1:200、BD)、LC3(1:100、コスモバイオ)で反応した。二次抗体として Cy3-ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:300、Jackson)、Alexa488-ロバ抗マウス IgG 抗体 (1:500、Sigma)を用いた。免疫染色後 DAPI による核染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000、オリンパス)にて観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1)カテプシン D/Atg7、カテプシン D/parkin ダブルノックアウトマウスの解析

カテプシン D 欠損マウスの神経細胞のリソソームにおいてミトコンドリア内膜のサブユニット c が蓄積する機構が、非選択的なマクロオートファジーないしマイトファジーを介するかについて、遺伝学的な検証を試みた。Atg7<sup>F/+</sup>;NesCD<sup>-/-</sup>マウスでは以前報告した CD<sup>-/-</sup>マウスと同様、オートファゴソームマーカー LC3 およびサブユニット c の顆粒状の強染色像が神経細胞対に認められたが、

CD-/-Atg7<sup>F/F</sup>;Nes マウスでは認められず、同マウスでマクロオートファジーが阻害されたためミトコンドリアタンパク質のリソソームの蓄積も完全に阻害されていることが判明した(図1)。一方 CD-/-Parkin-/-マウスでサブユニットcの免疫染色を行ったところ CD-/-Parkin+/+マウスにおける顆粒状の陽性像が減弱するのみで完全消失には至らなかった(図2D)。このことは正常の神経細胞ではミトコンドリアは非選択的なマクロオートファジーにより分解される割合が高く、Parkinを介するマイトファジーの寄与は部分的であることを示唆している。

Atg7<sup>F/+</sup>;Nes: Atg7<sup>F/F</sup>;Nes: Atg7<sup>F/+</sup>;Nes: Atg7<sup>F/F</sup>;Nes:  
 CD+/- CD+/- CD-/- CD-/-

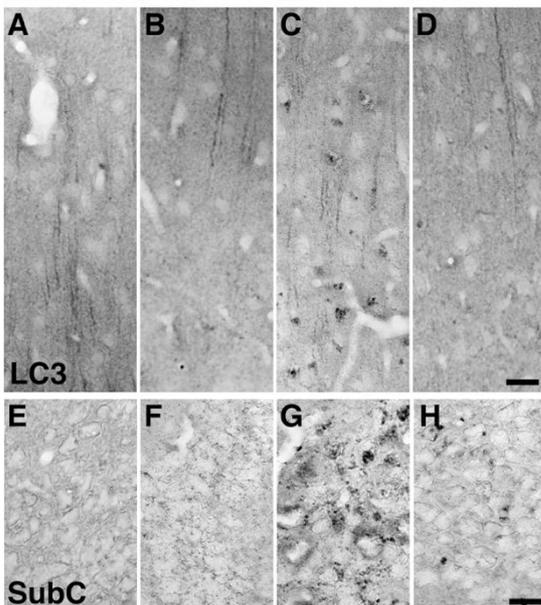


図1 生後21日齢のカテプシンD(CD)+/-Atg7<sup>F/+</sup>;Nes、CD+/-Atg7<sup>F/F</sup>;Nes、CD-/-Atg7<sup>F/+</sup>;Nes、CD-/-Atg7<sup>F/F</sup>;Nesマウスの大脳皮質のLC3(A-D)、海馬のsubunit C(E-H)染色像。スケール=50μm

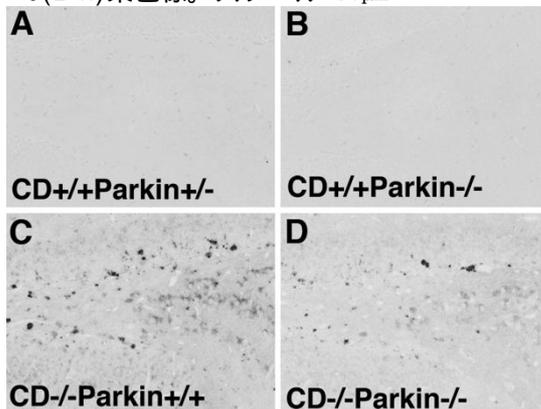


図2 生後21日齢のCD+/+Parkin+/-、CD+/+Parkin-/-、CD-/-Parkin+/-、CD-/-Parkin-/-マウス海馬のsubunit C(E-H)染色像。

(2) 神経細胞特異的鉄代謝制御タンパク質 IRP2Tg/parkin 欠損二重変異マウスの黒質緻密質神経細胞の超微形態学的解析  
 鉄代謝異常とマイトファジーとの因果関係

を検討する目的で、神経細胞特異的に反応性に富んだ鉄を増加させたトランスジェニックマウス(IRP2 Tg)をパーキンソン病の原因遺伝子である Parkin の欠損(KO)マウスと交配し、形態学的解析を行った。その結果、Parkin 単独欠損マウスが目立った表現型を示さないのに対し、IRP2 Tg Parkin KO 二重変異マウスでは黒質の領域特異的な神経変性を呈することが分かった(図3右下)。

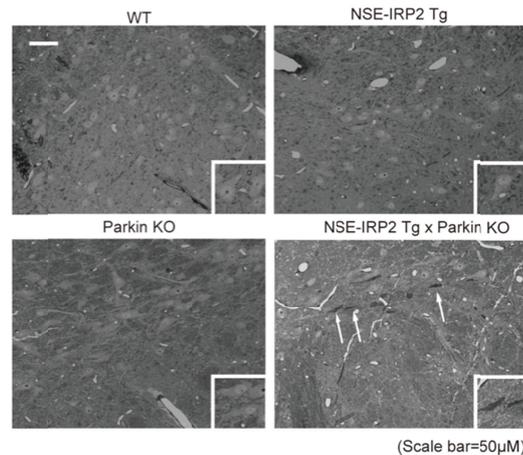


図3 6カ月齢の野生型(WT)、IRP2 Tg、Parkin 単独欠損、IRP2 Tg Parkin KO 二重変異マウスの黒質緻密質の光学顕微鏡写真(トルイジンブルー染色)。スケール=50μm

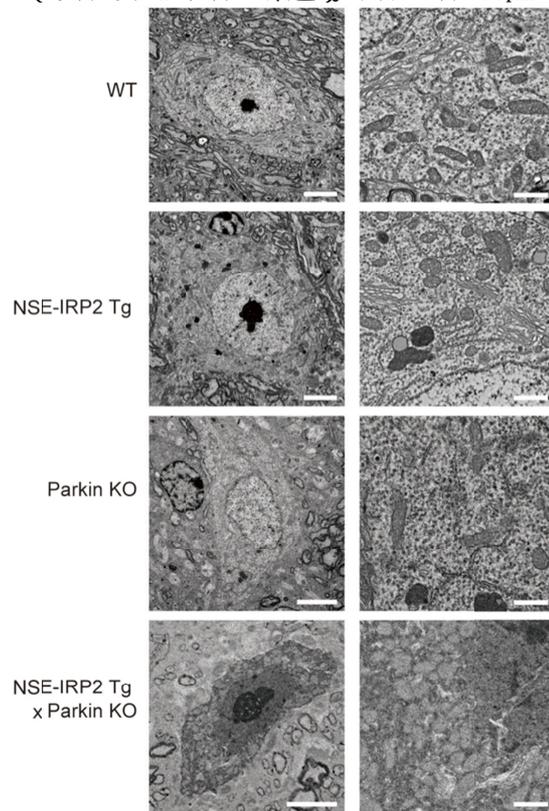


図4 6カ月齢のWT、IRP2 Tg、Parkin 単独欠損、IRP2 Tg parkin KO 二重変異マウスの黒質緻密質のドパミン細胞の電子顕微鏡写真。スケール=5μm(左)、1μm(右)

電子検鏡観察により、IRP2 Tg、IRP2 Tg parkin KO 二重変異マウスの黒質神経細胞の

ミトコンドリアは、野生型、Parkin 単独欠損マウスのそれとくらべ、長さが短く丸い形状を呈することが分かり、これらのマウスの神経細胞ではミトコンドリアにおける酸化ストレスの増大が認められ、parkin の更なる欠損により、不良ミトコンドリアの蓄積が神経変性を来すことを示唆した (図 4)。

(3) オメガソームマーカータンパク質 DFCP1 の内在性分子の局在

オートファジーの膜の起源としては、小胞体、ミトコンドリア、細胞膜などが提唱されているが、近年オートファゴソーム形成の場となる小胞体の部位のマーカータンパク質 DFCP1 が発見された。オートファジー形成時の DFCP1 陽性の構造物はその形からオメガソームと呼ばれている。これまで DFCP1 とオメガソーム関連はすべて蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させた細胞における動態の解析によるもので、定常状態では蛍光が粗面小胞体(ER)とゴルジに局在し、飢餓状態で ER に沿ってドット状のオメガソームの局在パターンに変化すると考えられてきた。

我々は特異的抗体により内在性 DFCP1 の局在を検証することはオートファゴソームの形成過程、さらにはマイトファジーの形成過程を検討する上で重要と考え、DFCP1 由来のペプチド配列を抗原とする抗体を作成した。DFCP1 を siRNA 法によりノックダウンさせた HeLa 細胞をネガティブコントロールとして、上記抗体の特異性を検定したところ、1 種類の抗体はウエスタンブロッティングで、もう 1 種類は免疫組織化学法で使用可能な DFCP1 に特異的な抗体であることが分かった。そこで、免疫組織化学法に使用可能な抗体を用いて HeLa 細胞を用いてその動態を検討した。その結果、定常状態の細胞においても、従来 GFP-DFCP1 発現細胞で報告されていた ER-ゴルジパターンではなく、ドット状ないし線状の局在を示すことが分かった (図 5)。

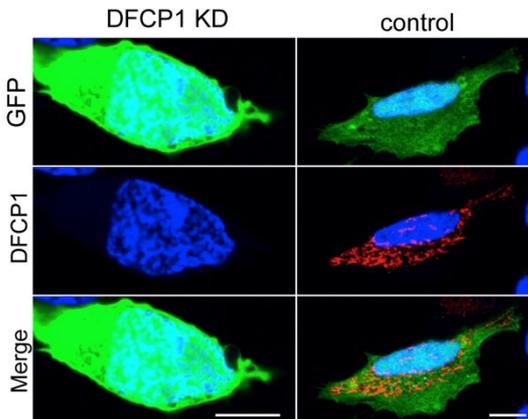


図 5 DFCP1 ノックダウン(KD)および野生型 HeLa 細胞における内在性 DFCP1 の局在。ノックダウン細胞は GFP が陽性となる。これらの細胞は DFCP1 の免疫陽性反応を認めなかった(中段左列)。一方野生型の細胞での DFCP1 の局在はこれまでの報告と異なり、ド

ット状ないし線状の局在を示した(中段右列)。スケール=10 $\mu$ m

ER、ゴルジ体、ミトコンドリアのマーカーである BiP、GM130、TOM20 に対する抗体を用いた二重染色により、定常状態の内在性 DFCP1 と最もよく共局在を示すものはミトコンドリアのマーカーであった。一方、ER との共局在は部分的なものにとどまった。このことは定常状態の細胞の ER-ミトコンドリアのコンタクトサイトが既に DFCP1 が局在していることを強く示唆している (図 6)。

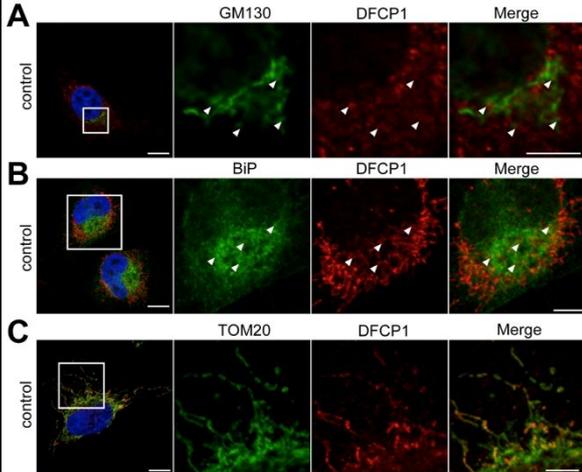


図 6 定常状態の野生型 HeLa 細胞における内在性 DFCP1 とゴルジ体、ER、ミトコンドリアマーカー (GM130、BiP、TOM20) の二重染色。内在性 DFCP1 陽性のドットはゴルジ体や ER のマーカーとはわずかにしか共局在を示さなかった。一方、TOM20 陽性のミトコンドリアと最も良い共局在性を示した。スケール=10 $\mu$ m

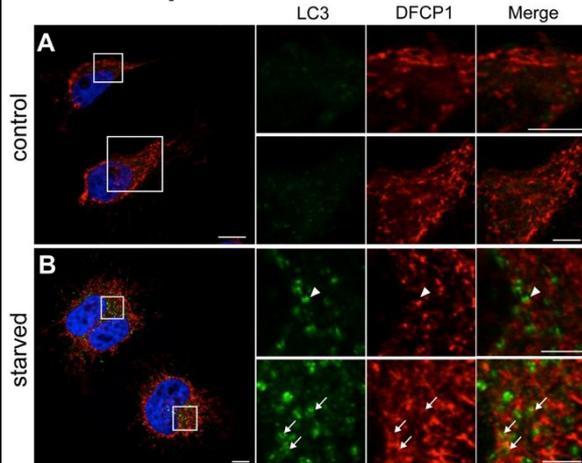


図 7 定常状態(A)と飢餓状態(B)の HeLa 細胞における内在性 DFCP1 と LC3 の二重染色。定常状態では、LC3 の免疫陽性反応はほとんど観察されなかった。飢餓状態では LC3 陽性のドットが観察され、DFCP1 陽性構造物が近接していた。スケール=10 $\mu$ m

さらに、HeLa 細胞を D-MEM(高グルコース) (ピルビン酸ナトリウム含有、アミノ酸不含) で 90 分間培養することで飢餓によるオートファジーを誘導させたところ、オートファゴソームのマーカーである LC3 陽性のドット

トが観察され、これらのドットとDFCP1陽性のドットが近接していた(図7)。以上はオメガソームは外来性に発現されたDFCP1によってのみ形成される構造ではないことを示すとともに、そのマーカーとしてDFCP1が有用であること、オメガソームがER-ミトコンドリアのコンタクトサイトと関連して形成される可能性が高いことを示唆している。

#### 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26件)

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. [PMID: 23671684] (\*These authors contributed equally to this work) 査読あり

Suyama, M., Koike, M., Asaoka, D., Mori, H., Oguro, M., Ueno, T., Nagahara, A., Watanabe, S. Uchiyama, Y. Increased immunoreactivity of cathepsins in the rat esophagus under chronic acid reflux esophagitis. *J. Histochem. Cytochem.* 62(9):645-60, 2014. (\*These authors contributed equally to this work) 査読あり

Asano, T., Koike, M., Sakata, S., Takeda, Y., Nakagawa, T., Hatano, T., Ohashi, S., Funayama, M., Yoshimi, K., Asanuma, M., Toyokuni, S., Mochizuki, S., Uchiyama, Y., Hattori, N., Iwai, K. Possible involvement of iron-induced oxidative insults in neurodegeneration. *Neurosci. Lett.* 588:29-35, 2015. [PMID: 25549542] (\*These authors contributed equally to this work) 査読あり

Nanao, T., Koike, M., Yamaguchi, J., Sasaki, M., Uchiyama, Y. Cellular localization and tissue distribution of endogenous DFCEP1 protein. *Biomed. Res.* 36(2):121-33, 2015. [PMID: 25876663] (\*These authors contributed equally to this work) 査読あり

Sekine S., Yao, A., Hattori, K., Sugawara, S., Naguro, I., Koike, M., Uchiyama, Y., Takeda, K., Ichijo, H. PGAM5 deficiency confers resistance against metabolic stress in mice. *EBioMedicine* 5:82-92, 2016. (\*These authors contributed equally to this work) 査読あり

#### [学会発表](計45件)

Masato Koike, Yasuo Uchiyama. Possible roles of LC3, ubiquitin, and P62 and/or

Nbr1 in the accumulation of abnormal lysosomes in neurons deficient in cathepsin D. XXIII ISMS 2013 International Symposium on Morphological Sciences, 2013年9月10-13日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)  
小池正人、「ATP13A2やカテプシン異常と神経変性疾患」第55回神経学会学術大会、2014年5月21日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Masato Koike. The role of autophagy and lysosomal proteolysis for the maintenance of the normal environment of neuronal cells: a genetic study of mouse models for rare neurodegenerative diseases for understanding of common ones. INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2014 (CURRENT TRENDS ON NEUROBIOLOGY) 2014年11月28日、蔚山(韓国)

Masato Koike, Tomohisa Nanao, Junji Yamaguchi, Mitsuho Sasaki, Yasuo Uchiyama. Cellular localization and tissue distribution of endogenous DFCEP1 protein. 第67回日本細胞生物学会大会、2015年6月30日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

小池正人、七尾友久、山口隼司、内山安男、「オメガソームマーカーDFCEP1の内在性分子の細胞内局在と組織分布」第38回日本神経科学大会、2015年7月28日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

#### [図書](計1件)

Isei Tanida, Masato Koike. John Wiley & Sons Inc., Autophagy, Infection, and the Immune Response. 19-32; 2014.

#### [その他]

ホームページ等

[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laborary/lab/shinkei\\_kozo/](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laborary/lab/shinkei_kozo/)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小池 正人 (KOIKE, Masato)  
順天堂大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 80347210