

平成21年 5月14日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790151
 研究課題名 (和文) 軸索・シナプス前終末におけるオートファジーを介した蛋白分解機構について
 研究課題名 (英文) Role for autophagy in axons and pre-synaptic terminals.

研究代表者

小池 正人 (KOIKE MASATO)
 順天堂大学・医学部・先任准教授
 研究者番号：80347210

研究成果の概要：

リソソームタンパク分解酵素カテプシンを複数欠損させた3系統のマウスの神経組織を解析した結果、神経細胞の軸索においては、処理されなかったオートファゴソームが蓄積するという現象が一般的に認められることが明らかとなった。これは正常神経細胞の軸索においては軸索内において形成されたオートファゴソームが細胞体に輸送された後リソソームにより速やかに分解を受けるという機構が存在することが推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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、オートファジー、カテプシン、ダブルノックアウトマウス、軸索、spheroid

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者はリソソームカテプシン欠損に伴うリソソーム蓄積症のモデルマウスであるカテプシンD欠損マウスおよびカテプシンBLダブルノックアウトマウスを解析した結果、軸索にオートファゴソーム様構造物が蓄積し、spheroidを形成することを以前見出した(Koike et al., 2005)。さらにこれらのノックアウトマウスのシナプス前終末においては多数のオートファゴソームが蓄積していることも電子顕微鏡観察により明らかとなった。

このことは、正常の神経細胞では軸索内の構造物はオートファジー・リソソーム系により分解を受けていることを示唆している。

過去の神経変性疾患の電顕像の論文を精査した結果、軸索変性やspheroidにおいてオートファジー様構造物は普遍的に認められることが分かった。しかしながら、神経変性疾患とオートファジーとの関連の論文数は近年で飛躍的に増えているにもかかわらず、オートファジーが軸索変性に関与していると明確に示した報告は、Yueらのグループが小脳変性モデルマウスであるLurcherマウス

スの軸索変性にオートファジーが関与していることを報告(Yue et al., J. Neurosci. 8057-68; 2006)した研究のみであった。

2. 研究の目的

オートファジーのマーカーであるLC3の動態や軸索、シナプス前終末の形態をオートファジー不能マウス、カテプシンを複数欠損させた各種マウス脳組織で検討することにより、未だその存在も含め不明な点が多い、軸索におけるオートファジー・リソソーム系を介したタンパク分解機構について明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1)研究代表者はカテプシンD単独欠損マウス、カテプシンBL欠損マウスのほか、カテプシンDL、カテプシンBD両欠損マウスを作成している。これらマウスにおいて脳梁など、軸索の構造異常が有るか否か、あればどの時点で始まり、いかなる過程で推移するのかなどについて形態学的に詳細に検討する。

(2)カテプシンD欠損マウスと、神経組織特異的にオートファジーが起こらない、Atg7コンディショナルノックアウトマウス(Atg7^{F/F}:Nestin-Creマウス)を交配させ、カテプシンDとAtg7のダブルノックアウトマウス(Atg7^{F/F}:Nestin-Cre:CathepsinD^{-/-})を作製し、その軸索内の構造を詳細に比較検討する。

4. 研究成果

(1)各種カテプシンダブルノックアウトマウスの比較検討

カテプシンBとL、カテプシンDとLの生存期間は生後14日未満で死に至るものが多かった。一方カテプシンBとDのダブルノックアウトマウスはその多くが生後23日前後まで生存することが新たに判明した。このような寿命の違いがあるものの、軸索の変化に関してはいずれの系統においても脳梁等の軸索において、LC3陽性の顆粒状構造物が充満したspheroidが多数形成され、電顕的にも軸索、spheroid、前シナプス終末に初期段階のオートファゴソームと類似した構造物の蓄積が確認された。

ドイツのグループがカテプシンBLダブルノックアウトマウスと対照群のリソソームフラクションを用いて、iTRAQ法によって変化が認められた蛋白を見いだした(Stahl et al., 2007, BBA)。彼らは対照群と比べてRab14、Neuron specific gene family member 1/ Calcyon、Delta/notch-like EGF-related receptor (DNER)、Carboxypeptidase E、KIAA1414が約10倍以上増加していると報告したが、いずれも小胞輸送に関わることが知

られている。これらのうちRab14、DNER、Carboxypeptidase Eに対する良い抗体が得られたので上記3系統のダブルノックアウトマウスにおいてそれぞれその局在を検討したところ、いずれのマウスにおいても、軸索が変性しspheroid様構造を形成している部位に強く認められることが分かった(例としてカテプシンBDダブルノックアウトマウスにおける結果を図1に示す)。

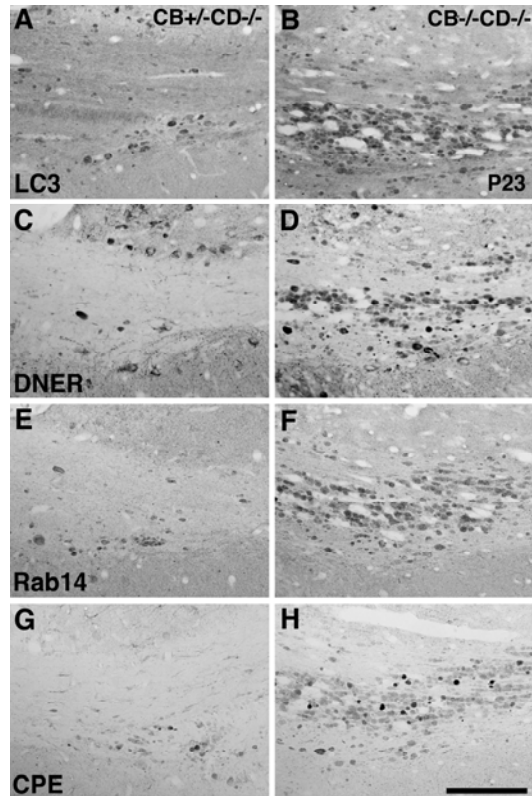


図1 カテプシンBD欠損マウス(B, D, F, H)および同腹仔のカテプシンD単独欠損マウス(A, C, E, G)におけるLC3(A, B)、DNER(C, D)、Rab14(E, F)、Carboxypeptidase E(CPE)(G, H)の局在。スケール=100 μ m

カテプシンD単独欠損マウスとカテプシンBDダブルノックアウトマウスは寿命がほとんど変わらず、神経細胞体におけるリソソームの蓄積も同様に認められる。しかし、軸索に関しては、図1に示す如く、カテプシンBD欠損マウスの方が腫大の程度が著しいことが分かった。

以上の結果はリソソームタンパク分解酵素の欠損を伴う神経細胞の軸索においては、処理されなかったオートファゴソームが蓄積するという現象が一般的に認められることを示唆している。このことから正常神経細胞の軸索においては軸索内において形成されたオートファゴソームがリソソームにより速やかに分解を受けるという機構が存在することが推察される。

軸索で形成されたオートファゴソームがどこで分解されるかということに関しては確定的なデータは得られていないが、現時点では逆行性に細胞体に運ばれ、そこでリソソームと融合して分解される可能性と、軸索内でリソソームタンパク分解酵素により直ちに分解される可能性が考えられる。

一般的には、軸索にはリソソームは認められないとされ、本研究代表者の小胞輸送関連タンパク質がオートファゴソームと共に軸索内で蓄積しているという免疫組織化学の結果は、リソソーム蓄積という病態そのものが、何らかの理由で、軸索から細胞体への輸送を阻害していることを強く示唆している。

一方カテプシンD単独欠損マウスとカテプシンBDダブルノックアウトマウスは寿命も細胞体の神経変性の所見も酷似しているにもかかわらず、軸索の変性の程度のみが後者でより激しいという遺伝学的な結果は、軸索内でもリソソームタンパク分解酵素により直ちに分解される可能性を支持するものである。そのため、リソソームタンパク分解酵素自体が本当に存在しないのかどうかについては再検討を行う余地があるものと思われる。

(2) カテプシンD/Atg7ダブルノックアウトマウスを用いた検討。

カテプシンD欠損マウスでは神経セロイドリポフスチン蓄積症の診断基準であるgranular osmiophilic deposits (GROD)が蓄積する。このGRODは分解されない基質を有し、細胞質の一部と共に、二重膜構造を持つオートファゴソームにしばしば取り込まれる。カテプシンD/Atg7ダブルノックアウトマウスはカテプシンD単独欠損マウスの生存期間より若干短いものの、生後21日ぐらいまでは生存できることが判明した。同マウスの神経細胞には、GROD自身は依然存在するが、やはりそのGRODを隔離するように特殊な二重膜が不完全に取り囲み、その膜自身は粗面小胞体と連続していることが分かった。このことは、カテプシンD/Atg7ダブルノックアウトマウスにおいてはオートファゴソーム由来の膜構造物の蓄積が起こっていないことを示している。

LC3の免疫組織化学を行ったところ、カテプシンD/Atg7ダブルノックアウトマウスの神経細胞の細胞質には、カテプシンD単独欠損マウスの神経細胞で認められたような、LC-3強陽性の顆粒状の構造物が認められなかった。一方、カテプシンD単独欠損マウスにおいて観察される、軸索の腫大している部位に一致したLC3強陽性の構造物は、カテプシンD/Atg7ダブルノックアウトマウスの軸索においても依然認められた。

最近オートファジーに必須なAtg5を小脳

プルキンエ細胞特異的に欠損させたマウスの解析結果が発表された(Nishiyama et al., 2007)。彼らの解析によると、Atg5欠損プルキンエ細胞の軸索は、膜様構造物の著明な蓄積のために腫大しているが、その蓄積物の詳細な観察から、オートファゴソーム様の二重膜を持った構造物が依然観察されることが明らかとなった。その構造物がオートファゴソームと直接関連が有るものなのか否か不明であるが、本研究における、カテプシンD/Atg7ダブルノックアウトマウス神経細胞の軸索におけるLC3陽性の構造物に関しても、同様の構造物である可能性があるため、超微形態学的解析を現在進めている。

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18件)

①Shibata 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.* 382(2): 419-23; 2009. 査読有り

(*These authors contributed equally to this work)

②Nada, S., * Hondo, A., * Kasai, A., * Koike, M. *, Saito, K., Uchiyama, Y., Okada, M. The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *EMBO J.* 28(5): 477-89; 2009. 査読有り

(*These authors contributed equally to this work)

③Gotoh, K., Lu, Z., Morita, M., Shibata, M., Koike, M., Waguri, S., Dono, K., Kominami, E., Sugioka, A., Monden, M., Uchiyama, Y. Participation of Autophagy in the Initiation of Graft Dysfunction after Rat Liver Transplantation. *Autophagy* 5(3) 351-60; 2009. 査読有り

④Miyamoto, K., Shiozaki, M., Shibata, M., Koike, M., Uchimaya, Y., Gotow, T. Very High Dose α -tocopherol Supplementation Increases Blood Pressure and Causes Possible Adverse CNS Effects in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Neurosci. Res.* 87(2): 556-66; 2009. 査読有り

⑤Maeda, Y., Ide T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kinoshita, T. GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. *Nat. Cell Biol.* 10(10): 1135-45; 2008. 査読有

り

⑥Saito, F., Kuwata, H., Oiki, E., Koike, M., Uchiyama, Y., Honda, K., Takeda, K. Inefficient phagosome maturation in infant macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375(1): 113-8; 2008. 査読有り

⑦Mori, Y.*, Koike, M.*, Moriishi, E., Kawabata, A., Tang, H., Oyaizu, H., Uchiyama, Y., Yamanishi, K. Human Herpesvirus-6 Induces MVB Formation and Virus Egress Occurs by an Exosomal Release Pathway. *Traffic* 9(10): 1728-42; 2008. 査読有り

(*These authors contributed equally to this work)

⑧小池正人、内山安男。「オートファジーと神経細胞死」*医学のあゆみ* 225(6): 491-4, 2008. 査読なし

⑨Shiozaki, M., Yoshimura, K., Shibata, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Gotow, T. Morphological and Biochemical Signs of Age-related Neurodegenerative Changes in Klotho Mutant Mice. *Neuroscience* 152(4): 924-41; 2008. 査読有り

⑩ Takatsuka, A., Yagi, R., Koike, M., Oneyama, C., Nada, S., Schmedt, C., Uchiyama, Y., Okada, M. Ablation of Csk in neural crest lineages causes corneal anomaly by deregulating collagen fibril organization and cell motility. *Dev. Biol.* 315(2): 474-88; 2008. 査読有り

⑪ Suzuki, C., Isaka, Y., Takabatake, Y., Tanaka, H., Koike, M., Shibata, M., Uchiyama, Y., Takahara S., Imai, E. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368(1):100-6; 2008. 査読有り

⑫ Oppenheim, RW., Blomgren, K., Ethell, DW., Koike, M., Komatsu, M., Prevette, D., Roth, KA., Uchiyama, Y., Vinsant, S., Zhu, C. Developing Post-Mitotic Mammalian Neurons In Vivo Lacking Apaf-1 Undergo Programmed Cell Death by a Caspase-Independent, Non-Apoptotic Pathway Involving Autophagy. *J. Neurosci.* 28(6):1490-7; 2008.

⑬ Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K., Uchiyama, Y. Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury. *Am. J. Pathol.* 172(2):454-69; 2008. 査読有り

⑭Somboonthum, P., Yoshii, H., Okamoto, S., Koike, M., Gomi, Y., Uchiyama, Y.,

Takahashi, N., Yamanishi, K., Mori, Y. Generation of a Recombinant Oka Varicella Vaccine Expressing Mumps Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein as a Polyvalent Live Vaccine. *Vaccine* 25(52):8741-55; 2007. 査読有り

⑮Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamasaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131(6): 1149-63; 2007. 査読有り

⑯Miyaniishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., Nagata, S. Identification of Tim-4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450(7168):435-9; 2007. 査読有り

⑰Iwai K., Koike, M., Ohshima S., Miyatake, K., Uchiyama, Y., Saeki, Y., Ishii, M. RGS18 acts as a negative regulator of osteoclastogenesis by modulating acid-sensing OGR1/NFAT signaling pathway. *J Bone Miner Res.* 22(10):1612-1620; 2007. 査読有り

⑱Nakahara, M., Nagasaka, A., Koike, M., Uchida, K., Kawane, K., Uchiyama, Y., Nagata, S. Lysosomal Degradation of Nuclear DNA by DNase II-like Acid DNase in Cortical Fiber Cells of Mouse Eye Lens. *FEBS J.* 274(12):3055-64; 2007. 査読有り

〔学会発表〕(計32件)

①小池正人、内山安男「リソゾーム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」第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009年3月 岡山理科大学

②前田裕輔ら「GPHRはゴルジ装置の酸性化・機能にとって重要な新規アニオンチャンネルである」第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009年3月 岡山理科大学

③大河内進ら「マウス DNaseII のプロセッシングに関する研究」第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009年3月 岡山理科大学

④ 多村博澄ら「膜局在型オートファジー関連遺伝子産物 Atg9A の組織及び細胞内分布について」第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009年3月 岡山理科大学

⑤ 小池正人ら「ヒトヘルペスウイルス6粒子はエクソソーム経路を経て細胞外に放出される」第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009年3月 岡山理科大学

- ⑥ 塩崎元子ら「レスベラトロールは SAMP10 の神経細胞及び肝細胞の老化関連変化を改善する」第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009 年 3 月 岡山理科大学
- ⑦ 竹内翔一ら「レスベラトロールの未分化及び分化 PC12 細胞における影響」第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009 年 3 月 岡山理科大学
- ⑧ 早川直哉ら「エタノール障害中枢神経細胞と肝細胞におけるキサントシンの緩和作用」第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009 年 3 月 岡山理科大学
- ⑨ Yusuke Maeda ら Acidification of the Golgi apparatus is regulated by GPHR, a novel anion channel, and critical for glycosylation. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 神戸ポートピアホテル
- ⑩ 名田茂之ら「エンドソームアダプター p18 とリン酸化シグナリング」第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 神戸ポートピアホテル
- ⑪ Masato Koike ら The role of macroautophagy in the pathogenesis of lysosomal storage disease due to cathepsin D deficiency. 38th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2008 年 11 月、ワシントン
- ⑫ Masahiro Shibata ら Lysosomal cathepsin D in neurons is in part delivered from glial cells. 38th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2008 年 11 月、ワシントン
- ⑬ 塩崎元子ら「エタノール細胞障害における赤ワインと白ワインエキスの修復能の効果」第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月、東京国際フォーラム
- ⑭ 柴田昌宏ら「マウス脳におけるカテプシン D の再取り込み」第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月、東京国際フォーラム
- ⑮ 小池正人ら「低酸素-脳虚血負荷後の海馬錐体細胞の細胞死におけるオートファジーの関与について」第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月、東京国際フォーラム
- ⑯ Yasuko Mori ら Human herpesvirus-6 induces MVB formation and virus egress via an exosomal release pathway. 第 60 回日本細胞生物学会大会、2008 年 7 月 パシフィコ横浜
- ⑰ 小池正人ら「低酸素-脳虚血負荷に伴う海馬錐体細胞の細胞死はオートファジー性細胞死である」第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月、大分大学医学部
- ⑱ 柴田昌宏ら「神経系特異的カテプシン D 欠損マウスについて」第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月、大分大学医学部
- ⑲ 塩崎元子ら「エタノール傷害性ラット肝臓及び中枢神経系における赤ワイン及び白ワインエキスの緩和効果」第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月、大分大学医学部
- ⑳ 多村博澄ら「マウス Atg9A 抗体の作製と組織細胞内分布について」第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月、大分大学医学部
- ㉑ 早川直哉ら「高齢ラット中枢神経系の神経細胞における植物化学物質、キサントシンの効果」第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月、大分大学医学部
- ㉒ 竹内翔一ら「高齢ラット肝細胞における植物化学物質、キサントシンの効果」第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月、大分大学医学部
- ㉓ 大河内進ら「抗マウス DNaseII 抗体の作製と同タンパク質の免疫組織化学的局在について」第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月、大分大学医学部
- ㉔ Masaaki Komatsu ら Selective autophagy regulates formation of cytoplasmic inclusions. 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月 パシフィコ横浜
- ㉕ Noriyuki Yamamura ら The roles of lysosomal proteinases in primary hepatocyte death induced by TNF- α and actinomycin D. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases、2007 年 11 月、シカゴ
- ㉖ Masato Koike ら Involvement of autophagy in neurons of the hippocampus after adult mouse hypoxic-ischemic injury. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2007 年 11 月、サンディエゴ
- ㉗ Chigure Suzuki ら Augmented Autophagy Protects against Ischemia / Reperfusion Injury in Tubular Epithelial Cells. American Society of Nephrology's Renal Week 2007, 2007 年 11 月、サンフランシスコ
- ㉘ 小池正人ら「カテプシン D 欠損に伴うリソソーム蓄積症の病態形成について」第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会合同大会、2007 年 9 月 パシフィコ横浜
- ㉙ 柴田昌宏ら「中枢神経特異的カテプシン D 欠損による神経性セロイドリポフスチン蓄積症類似症状の誘導」第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会合同大会、2007 年 9 月 パシフィコ横浜
- ㉚ Masato Koike ら Possible roles of LC3, ubiquitin, and P62 in the accumulation of lysosomes in neurons deficient in Cathepsin D. 7th IBRO World Congress of

Neuroscience, 2007年7月、メルボルン

⑪ Shibata Masahiro ら A mouse with low expression of Cathepsin D is a model animal of neuronal Ceroid Lipofuscinosis. 7th IBRO World Congress of Neuroscience, 2007年7月、メルボルン

⑫ 笠井篤子ら「新規ラフト局在蛋白質 p18 の機能解析-レセプターのリサイクリング制御への関連性」第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会大会 合同大会、2007年5月、福岡国際会議場

〔図書〕(計2件)

① Uchiyama, Y., Koike M., Shibata, M. Springer Japan. Autophagy and cell death. In: Molecular imaging for integrated medical therapy and drug development. Ed. Yuji Kuge. In press.

② Uchiyama, Y., Koike M., Shibata, M., Sasaki, M. Elsevier Inc. Monitoring of autophagy in neurodegeneration. Methods Enzymol. In: Autophagy in Disease and Clinical Applications, Part C Ed. Daniel J. Klionsky, 33-51; 2009.

〔その他〕

ホームページ

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・先任准教授

研究者番号：80347210

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし