

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：若手スタートアップ

研究期間：2007～2008

課題番号：19800066

研究課題名（和文） 軸索変性の分子機構の解明と神経保護法の開発

研究課題名（英文） Investigation of molecular mechanisms of axonal degeneration.

研究代表者

富樫 和也 (TOGASHI KAZUYA)

国立精神・神経センター・神経研究所・疾病研究第五部・外来研究員

研究者番号：40450613

研究成果の概要：

細胞内タンパク質分解機構であるオートファジー（自食作用）は多くの臓器では絶食などの飢餓時に誘導されるが、脳などの神経系においては飢餓応答としてのオートファジーは観察されないことが知られている。一方、神経系でオートファジー不全となった動物は神経変性疾患様の兆候を示すことから、神経機能の維持に重要であると考えられている。しかし、このオートファジーがどのようにして調節されているか詳細は不明である。本研究では神経系のモデル細胞を作製し、これを用いて細胞内 pH の上昇（アルカリ化）がオートファジーを誘導することを見出した。更に、細胞内の pH 調節に関わる NHE タンパクがオートファジーを調節する可能性を見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：神経変性疾患、オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

軸索変性は神経系の様々な疾患に共通して見られる障害である。末梢神経から中枢神経までの広い範囲で見られ、その病態も末梢神経障害から脊髄や脳の外的損傷、脳卒中、多発性硬化症のような脱髄疾患などに多岐に渡る。通常、神経軸索の切断など損傷が起こると、傷害された軸索の変性は不可逆的に進行する。これは Wallerian degeneration（ワーラー変性）と呼ばれる。ワーラー変性は軸

索切断に伴い、細胞体からのエネルギー供給が途絶えることから起こる受動的な軸索死であると考えられていたが、疾患モデル動物に対する Bcl-2 の過剰発現(*J. Neurosci.*, 15, pp7727-33, 1995)や GDNF 投与(*J. Neurosci.*, 16, pp2335-41, 1996)によって神経細胞死を抑制しても軸索変性を抑制できないことが知られており、このことから軸索変性と細胞死はそれぞれ独立した過程であると考えられるようになった。軸索変性が単に細胞体か

ら切り離され、受動的に壊れていく過程ではなく酵素反応を必要とする能動的な過程であることは軸索傷害後のワーラー変性が著しく遅延する自然発生突然変異マウス Wld<sup>S</sup>の存在により明確に示された(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(17), pp9985-90, 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(21), pp11377-82, 2000)。このマウスはユビキチンリガーゼの一種 Ufd2a のアミノ末端 70 残基 (全長 1173 残基) と nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 合成酵素の一種、NMNAT1 全長からなるキメラタンパクを発現しており、これによって軸索保護活性を獲得していることが示された(*Nat. Neurosci.*, 4, pp1199-1206, 2001)。軸索変性過程にはタンパク質の分解系としてユビキチン-プロテアソーム系(UPS)の関与が知られていることから Wld<sup>S</sup>による軸索保護活性は Ufd2a 領域の関与が予想された。しかし、Wld<sup>S</sup>タンパクのアミノ末端を構成する Ufd2a のアミノ末端 70 残基は E3 リガーゼとしての酵素活性ドメインを含んでおらず、NMNAT1 領域による NAD 合成活性が担っていることが明らかにされた。更に、野生型マウスでは NMNAT1 の神経での発現は非常に少ないことから、Wld<sup>S</sup>マウスでは神経細胞における NAD 産生の亢進が NAD 依存性タンパク質脱アセチル酵素(Sirt1; 酵母 Sir2 の哺乳動物オルソログ)を活性化して軸索保護活性を発揮していることが申請者の所属研究室主宰者である荒木らによって明らかにされた(*Science*, 305, pp1010-3, 2004)。

一方、UPS とは異なる、非選択性の大規模タンパク質分解系であるオートファジーによる神経細胞の生存と機能維持の関係が明らかにされつつあった。オートファジーの発動に必須のオートファジー関連遺伝子 Atg5、Atg7 をそれぞれ神経系特異的に欠損したマウスでは神経細胞内に多数の封入体が形成され、個体の成長と共に神経変性が進行し、最終的にはアポトーシスを引き起こして神経変性疾患様の表現型を示すことが報告された(*Nature*, 441, pp880-4, 2006; *Nature*, 441, pp885-9, 2006)。これら神経細胞において、封入体はポリユビキチン化されていた。これはオートファジー不全を代償するため細胞内に蓄積した異常なタンパク質を UPS 系が分解・除去しているものと考えられる。このことから、オートファジーは細胞内の異物を分解・除去することで、神経の生存と正常な機能の維持に寄与していることが強く示唆されている。オートファジーは、*in vivo* では食餌によるカロリー摂取を制限することで、*in vitro* では培地中の血清やアミノ酸を除去することで誘導することが出来る。同様に、Sir2 の活性化もカロリー制限によって誘導されることが知られている。通常の食餌

を与えられた野生型動物ではその誘導の指標の一つであるオートファゴソームの形成は観察されないにもかかわらず、オートファジー不全のマウスでは様々な神経変性疾患様の症状を示すことからカロリー非制限下においても基底レベルのオートファジーが起きていると考えられている(*Nature*, 441, pp880-4, 2006; *Nature*, 441, pp885-9, 2006)。このようにオートファジーと Sir2 の活性には共通の条件が存在することと共に、神経を保護する役割を持つことから細胞内で相互に影響を及ぼしていることが示唆される。また、別な報告で、Atg5 は Ca<sup>2+</sup>依存性タンパク質分解酵素カルパインによって切断されるとオートファジーではなく、アポトーシスを誘導することが示されており、Atg5 は細胞の生存と死を決定するスイッチの役割を担うことが示唆されている(*Nat Cell Biol*, 8, pp1124-32, 2006)。一方で、カルパインをノックアウトしたマウス胎児繊維芽細胞ではオートファジーが誘導されないことからオートファジーの誘導にもカルパインが必要であることが報告されており、カルパインが細胞の状況に合わせてオートファジー関連遺伝子を制御していることが示唆されている(*J Cell Biol.*, 175, pp595-605, 2006; *Autophagy*, 3, pp235-237, 2007)。更に、Atg7 は Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ (CaMKK) と AMP-activated kinase (AMPK)によって細胞内 Ca<sup>2+</sup>依存的に制御され、結果的にオートファジーを抑制することやオートファジーに対する Ca<sup>2+</sup>放出チャネル IP<sub>3</sub> 受容体の関与が報告されている(*Mol Cell*, 25, pp193-205, 2007; *Cell Death Differ.*, 14, pp1029-39, 2007)。これらのことはオートファジーと細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナリングの密接な関係を強く示唆するものである。特に、神経細胞においては細胞内 Ca<sup>2+</sup>は数多くの Ca<sup>2+</sup>透過性イオンチャネルによって調節されていることから Ca<sup>2+</sup>シグナリングを介したオートファジーの仕組みと NAD・Sir2 系の関わりを調べることにより神経系におけるオートファジーと神経機能の維持および神経変性過程に対するオートファジーによる神経保護の分子機構を明らかにすることを着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では神経系におけるオートファジーの分子機構を解明し、神経変性疾患の治療法の基盤を開発することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1)各種遺伝子のクローニング

マウス胎仔、成体の脳および後根神経節から総 RNA を調製した後、逆転写酵

素を用いて各組織からの cDNA を得た。この cDNA を鋳型として各遺伝子特異的プライマーを用いて PCR 反応を行い増幅したのち、各種哺乳動物発現ベクターに挿入した。本研究において以下に示す遺伝子のクローニングを実施した。

①オートファジー関連遺伝子

Atg5, Beclin1, Atg7, LC3 , LC3 , Atg12, p62/SQSTM1.

② NHE 関連遺伝子

NHE1, NHE5, CHP1, CHP3

(2) 蛍光タンパク結合 LC3 安定発現細胞の作製

マウス神経芽細胞腫由来の Neuro-2a 細胞、NHE 欠損細胞であるハムスター肺由来繊維芽細胞株 PS120 細胞および HEK293 細胞に対し、EGFP(緑色)、mCherry(赤色)を単独もしくは両方を直列に結合した LC3 をコードする発現ベクター(それぞれ EGFP-LC3、mCherry-LC3、tfLC3 (tandem-fluorescent LC3)) を作製した。これらのプラスミドをリポフェクション法により導入した後、G418 投与して生存した細胞のコロニーを発する蛍光を指標に選択し、それぞれの安定発現株を樹立した。

(3) オートファジー誘導実験

(2)項で作製した細胞株を培養皿に播種した約 24 時間後、血清不含培地に交換して 2 時間、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター(37°C)で培養した。その後、PFA で固定し蛍光顕微鏡法を用いてオートファジー誘導を観察した。同様の培養後、抗 GFP 抗体を用いてウェスタンブロットを行い、LC3-I から LC3-II へのフォーム変換を指標としてオートファジーの誘導を確認した。

(4) RT-PCR 法を用いた pH 調節因子発現の解析

(2)項で作製した細胞株を用いて pH 調節に関わる SLC4A ファミリーおよび SLC9A ファミリーに属する遺伝子の発現パターンを調べた。

(5) 細胞内 pH イメージング

pH 感受性蛍光色素である BCECF-AM を用いて細胞内 pH イメージングを実施した。

(6) pH 感受性蛍光タンパクの作製

蛍光色素 BCECF を用いた細胞内 pH イメージングでは蛍光試薬の褪色により長時間観察が困難であった。そこで細胞内、およびオルガネラ内の pH を測定

することを目的として GFP 変異体で pH 感受性蛍光タンパクとして機能する Superecliptic pHluorin および Ratiometric pHluorin を EGFP に対する点変異導入により作製した。

(7) 実験モデル動物の作製

WldS マウスと GFP-LC3 マウスの交配および、NHE5<sup>+/+</sup>マウス同士の交配によりそれぞれ以下の動物を作製、バッククロスを実施した。

① Wld<sup>S</sup>/GFP-LC3 マウス

② NHE5<sup>+/+</sup>マウス

(8) レンチウイルス用発現ベクターの作製

各種蛍光タンパク結合 LC3、NHE1 または NHE5 を発現するレンチウイルスベクターを作製した。

(9) shRNA 発現ベクターの作製

NHE1、NHE5 それぞれに特異的な shRNA を発現するベクターを作製した。

4. 研究成果

EGFP-LC3 安定発現 Neuro-2a 細胞(以下 EGFP-LC3/N2a) は一般的なオートファジー誘導条件である血清・アミノ酸除去ではオートファゴソームの形成が見られなかった。そこで、細胞外液に Krebs-Ringer bicarbonate 溶液(KRB)を用いたところ、光学顕微鏡下でオートファゴソームの形成が確認された。しかし、KRB による培養ではカルシウム塩(おそらくリン酸カルシウムまたは炭酸カルシウム)が培養時間依存的に沈殿するため、細胞外液のイオン組成が経時的に変化していることが明らかである。また、カルシウム塩沈殿物がオートファジーを誘導することが報告されたため(Gao et al., *Autophagy*, 2008; Sarkar et al. *Autophagy*, 2009)、培養中に塩の沈殿が起こらない細胞外液を探索した。この実験においては KRB 以外に以下の生理食塩水を用いた。

Hanks' balanced salt solution (HBSS), Earle's balanced salt solution (EBSS), Phosphate buffered balanced salt solution (PBBS), Standard bath solution (SBS), DMEM-based balanced salt solution (DMESS), phosphate buffered saline (PBS).

中でも、SBS は電気生理学等の実験において大気中で用いることを前提として 10mM の HEPES バッファーを含んでいる。このため、オートファジー誘導実験では全ての細胞外液で 5% CO<sub>2</sub> インキュ

ベータのほかに大気組成のインキュベータでも培養を行った。その結果、EGFP-LC3/N2a 細胞は 5% CO<sub>2</sub> インキュベータ中では KRB でのみオートファゴソーム様の構造体が確認されたが、大気中のインキュベータでは SBS と PBS 以外全ての細胞外液でオートファゴソーム様の構造体が観察された。更に、蛍光顕微鏡で確認されたこれらのオートファゴソーム様構造体が単なる凝集体ではなく、実際にオートファジーの誘導であることを確認するため、GFP に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、検出されたバンドの高さから EGFP-LC3-I から EGFP-LC3-II へのフォーム変換が確認された。また、20% CO<sub>2</sub> インキュベータではこれらの現象は誘導されなかった。同様の実験を栄養の十分な培地 (DMEM+10%FBS) 中で行った場合でも大気中のインキュベータにおいてはオートファジーの誘導が観察された。オートファジーの誘導条件の違いとしては細胞外液中の基本的なイオン組成が同一であるため、培養液中に溶け込む CO<sub>2</sub> の影響のみが考えられる。すなわち、細胞外液の pH である。そこで、本研究では生体内において細胞内外の pH 調節に関わる分子に注目し、オートファジーとの関連を詳細に調べることとした。大気中 (37°C) に置いた細胞外液は時間変化に伴って溶液中から二酸化炭素を失い緩やかにアルカリ化する (pH の上昇)。

細胞外液のアルカリ化が細胞内 pH に与える影響を調べるため、Neuro-2a 細胞を用いて細胞内 pH([pH]<sub>i</sub>) イメージングを行ったところ、予想通り、[pH]<sub>i</sub> も上昇した。このことから緩やかな [pH]<sub>i</sub> の上昇 (水素イオン濃度の低下) がオートファジーの誘導に関わっていることが示唆された。そこで、RT-PCR 法を用いて pH 調節に関わる遺伝子群 (SLC4A および SLC9A ファミリー) の発現解析を行った。すると、この EGFP-LC3/N2a 細胞には SLC9A 遺伝子ファミリーに属し、全身で普遍的に発現する NHE1 と神経系特異的に発現する NHE5 の発現が確認された。そこで、NHE 阻害剤である EIPA を前述のオートファジー誘導実験に用いた。すると、CO<sub>2</sub> インキュベータ内ではオートファジーが誘導され、大気中で見られたオートファゴソームの形成は阻害された。これらのことからオートファジーの誘導に NHE が関与していることが強く示唆された。そこで細胞膜に発現する NHE 全てを欠損する PS120 細胞を用いて EGFP-LC3 を安定発現す

る細胞株を作製し、同様の実験を行ったところ、NHE 欠損細胞ではオートファジーが誘導されなかった。また、この細胞に前述 2 種の NHE を強制発現させると、オートファジーの誘導が観察された。以上のことから、NHE1 と NHE5 は細胞内 pH 調節を介して神経系におけるオートファジーの誘導に寄与していると考えられる。

しかしながら、EGFP-LC3/PS120 細胞はリポフェクション法や電気穿孔法では遺伝子導入効率が非常に低く、NHE1 および NHE5 を安定発現した EGFP-LC3/PS120 細胞を得ることは困難を極めた。これを克服するため、レンチウイルスを用いた遺伝子導入法を行うための発現ベクターを作製した。また、これと並行して NHE1 に対する特異的な shRNA の発現ベクターの作製を行い、NHE1 を効果的に発現抑制できることを確認した。NHE5 については現在までのところ効果の認められる shRNA 発現ベクターが得られていないため、今後改めて作製し、EGFP-LC3/N2a 細胞において NHE1 および NHE5 のノックダウン実験を行う予定である。また、Atg5 欠損マウス胎仔繊維芽細胞に対する強制発現実験も同様に実施を予定している。

NHE1 欠損マウスは生後 2 週間目頃からてんかん様の症状や運動失調を伴う神経変性疾患様の兆候を示し、短命であることが報告されている (Cox et al., *Cell*, 1997; Bell et al., *Am J Physiol*, 1999)。また、NHE5 その生体内での生理的機能や活性化の分子機構は不明であるものの、その発現は脳神経系に限局すること、そのゲノム上の配置が脊髄小脳変性症 4 型や小脳性運動失調の原因遺伝子を含む遺伝子座 16q22.1 に位置することなどから神経系で重要な役割をしていると考えられている (Diering et al., *J Biol Chem.*, 2009)。

病態以外にも、生理的条件下では NMDA 受容体などを含む多くの興奮性シナプスにおける局所的な pH 変化はこれらのイオンチャネル型受容体を抑制することで神経細胞膜の興奮状態を調節していることが古くから知られている。また、NHE5 は細胞膜だけでなく、エンドソームなどのオルガネラ膜への移行することが知られている。更に、最近、オートファゴソーム形成過程におけるエンドソームの重要性も報告されていることから NHE5 を介したオルガネラ内の pH 調節がオートファジーの誘導に関連していることも考えられる。特に、

神経細胞では軸索内で形成されたオートファゴソームは軸索内では分解されず、細胞体まで輸送されてからリソソームと融合してオートリソソームを形成することは知られているが軸索内でのオートファゴソームがどのように形成されるかは未解明である。

以上のことから神経系における NHE とオートファジーの関連を明らかにすることで神経細胞死に先だって起こる軸索変性を特徴とする多くの神経変性疾患の治療法を開発する手掛かりとなることが想定される。

本研究ではオートファジーおよび NHE 関連の cDNA のクローニングと安定発現細胞の作製、遺伝子改変動物の作製に多くの時間を割いたため、予備的な実験に終始したが、今後は、本研究で得られたこれらの資源を基にして、神経系における pH 調節とオートファジー誘導の分子機構、更には神経系における NHE5 の生理的役割と神経変性疾患との関連性を詳細に調べていきたい。特に、現在交配している NHE5 欠損マウスと GFP-LC3 マウスの交配系を用いて神経系におけるオートファジー誘導機構の詳細な解析を進めることを予定している。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

- (1) 富樫和也、荒木敏之、  
細胞外イオンによるオートファジーの制御、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、平成 20 年 12 月 10 日、神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富樫 和也 (TOGSHI KAZUYA)

国立精神・神経センター，神経研究所疾病  
研究第五部，外来研究員

研究者番号：40450613