

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 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21780260

研究課題名（和文） ヘルペスウイルスタンパク質によるオートファジー制御：神経変性疾患への関与の検証

研究課題名（英文） Regulation of autophagy by herpesvirus protein: the involvement in neurodegenerative disorder

研究代表者

富岡 幸子 (TOMIOKA YUKIKO)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：50374674

研究成果の概要（和文）：豚ヘルペスウイルス 1 の前初期蛋白質 IE180 を発現するマウス (IE180 Tg) の解析を中心に、ヘルペスウイルスタンパク質がオートファジー経路を阻害して神経変性を誘発する可能性を検証した。IE180 Tg の神経細胞では、オートファジーで選択的に分解される p62 が異常凝集し、異常なリソソームの集積が認められた。培養細胞においても IE180 の発現は p62 の蓄積を誘導した。また、IE180 Tg とオートファゴソーム蛍光標識マウスのダブルトランスジェニックマウスの解析から、IE180 により一過性に神経細胞のオートファゴソームが活性化するが、やがて正常なオートファジーを維持できず細胞変性を引き起こすと推察された。

研究成果の概要（英文）：To verify that protein of herpes virus induce neurodegeneration via inhibition of cellular autophagy, the transgenic mice expressing IE180, immediate early protein of suid herpesvirus 1, were examined. P62 protein, which were degraded via selectively autophagic pathway, and abnormal lysosome were aggregated in neuronal cells of IE180 transgenic mice. Expression of IE180 also induced accumulation of p62 *in vitro*. Double transgenic mice crossed IE180 transgenic mice with GFP-LC3 transgenic mice, expressing the green fluorescent protein fused to the autophagic marker LC3, were generated and examined. It seemed that IE180 transiently induced activation of autophagy, but then prevent normal autophagy and result in cell degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	598,329	179,498	777,827
2010 年度	1,501,671	450,501	1,952,172
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,049,999	4,549,999

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：病態、疾患モデル、発生工学、ウイルス、脳・神経疾患、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

豚ヘルペスウイルス 1(仮性狂犬病ウイルス: PRV)は動物に重篤な神経症状を引き起こすため、獣医学領域で極めて重要なヘルペスウイルスである。また、PRV はヒトに多様な病態を引き起こす単純ヘルペスウイルス (HSV)と同じ α -ヘルペスウイルスに属することから、医学領域においても比較解析や神経科学のツールとして認識されている。PRV の転写調節因子 IE180 は転写活性化と抑制の両方に働いてウイルス複製を制御する多機能分子である。そこで、田原口らは IE180 がウイルスのみならず宿主細胞の遺伝子発現にも影響する可能性があると予想し、IE180 発現トランスジェニックマウス(IE180 Tg マウス)を作製したところ、このマウスは小脳形成不全を示した(Virology 307:243-254, 2003)。申請者らが IE180 Tg マウスのさらに詳細な解析を行ったところ、①IE180 は神経細胞およびグリア細胞(星状膠細胞)で発現していること、②IE180 発現細胞は器官形成期から変性・細胞死に陥り、その結果として小脳形成不全が起こること、③病態発現には転写の活性化と抑制の両方の機能を兼ね備えた全長型 IE180 が必要であることを明らかになった(Eur J Neurosci 27:2115-2132, 2008)。しかし、IE180 がどのようなメカニズムで神経変性を引き起こすかは未だ不明のままである。

ヘルペスウイルスがアルツハイマー病等の神経変性疾患のリスクファクターになる可能性が報告されているが(Lancet 352: 238, 1998; Nat Med 4: 1344,1998; Neurosci Lett 429: 95-100, 2007)、不明な点が多い。一方、近年、オートファジー-リソソーム分解系による神経細胞の自浄機能が異常蛋白質の蓄積を抑制し、神経変性疾患発症を防止することが明らかになってきた(Nature 441:885-889, 2006; Nature 441: 880-884, 2006)。すなわち、中枢神経系で何らかの因子がオートファジー経路を阻害すると、その結果として神経変性が誘発されると考えられる。そこで、申請者はへ

ルペスウイルス蛋白質が生体のオートファジー機構を阻害することで異常蛋白質の蓄積を促し神経変性疾患を誘発するという仮説を立て、IE180 Tg マウスを用いてこの分子機構を解明し、神経変性疾患治療に向けた新しい知見を得ること目的として本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、ヘルペスウイルス遺伝子導入によって新規に作出した神経変性マウスの解析を中心に、ヘルペスウイルス蛋白質が宿主のオートファジー-リソソーム経路を阻害して異常蛋白質の蓄積を起こし神経変性疾患を誘発する可能性を検証し、神経変性疾患の予防・治療に向けた新しい知見を得ることを目的とした。具体的には、(1)IE180 Tg マウスにおいてオートファジー機構の異常が生じているか、(2)IE180 はどのような宿主分子に作用してオートファジーを阻害するのか、(3)実際の PRV 感染病態でもオートファジー機構の異常が起こるか、を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1)IE180 Tg マウスにおけるオートファジー機構の解析

①ダブルトランスジェニックマウスの作出とオートファジー現象の可視化

オートファゴソーム蛍光標識マウス(GFP-LC3 Tg マウス)はオートファゴソームに特異的に局在する LC3 分子と GFP の融合タンパク質を発現するため、蛍光顕微鏡で簡単にオートファジーを観察できる(Nature 423: 1032-1036, 2004; Mol Biol Cell 15: 1101-1111, 2004)。この GFP-LC3 Tg マウスと IE180 Tg マウスのダブルトランスジェニックマウス(IE180/GFP-LC3 Tg)を作出し、中枢神経系におけるオートファジーを蛍光顕微鏡で観察する(図 1)。また、電子顕微鏡による観察および抗 LC3 抗体を用いたウェスタンブロット法によるオートファジーの解析を実

施する。IE180 Tg マウスにおいて IE180 は胎生期から発現して神経細胞と星状膠細胞に変性・細胞死をもたらす、その結果として小脳形成不全を起こす。したがって、病態の進行とオートファジーの動態との関連を明らかにするため、経時的に、特に小脳原基の発生が始まる胎生 13 日から小脳構築のための細胞移動が終了する生後 20 日までを重点的に材料採取する。

②IE180 の細胞局在とオートファジーとの関連

IE180/GFP-LC3 Tg マウスで IE180 がオートファジーに及ぼす影響を検討するため、抗 IE180 抗体や各種細胞マーカーを用いた多重蛍光免疫染色を行い共焦点顕微鏡で観察する。

(2) IE180 が作用するオートファジー機構の経路および関連分子の探索

IE180 Tg マウスの成績を裏付け、IE180 がどのような宿主分子に作用してオートファジーを阻害するのか基礎知見を得るため培養細胞レベルでの解析を行う。IE180 は主に神経細胞と星状膠細胞で作用すると予想されることから、まず、PC12 細胞 (神経細胞系)、DBT 細胞 (星状膠細胞系)などの培養細胞に IE180 を一過性に発現させた場合、あるいは PRV を感染させた場合、オートファジーが抑制されることを免疫染色とウェスタンブロットによって確認する。次に、オートファゴソームの形成に必要な既知の分子について、リアルタイム RT-PCR によって発現量の変動を調べる。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①IE180 Tg マウスの小脳の神経細胞およびグリア細胞は、器官形成期から変性・細胞死に陥り、その結果として小脳形成不全を示す (図 1)。IE180 Tg マウスの変性細胞についてさらに詳細な病理組織学的解析を行ったと

ころ、小脳形成期から小脳構築終了後もオートファジー経路で選択的に分解される p62 蛋白質が異常凝集していることが蛍光免疫染色によって確認された (図 2 左)。p62 がドット状に細胞質や核周囲に凝集したこれらの細胞の多くは IE180 タンパク質も陽性であり、変性あるいは細胞死に陥っていた。また、超微形態学的には変性した神経細胞やグリア細胞に異常なリソソームの集積が認められた (図 2 右)。

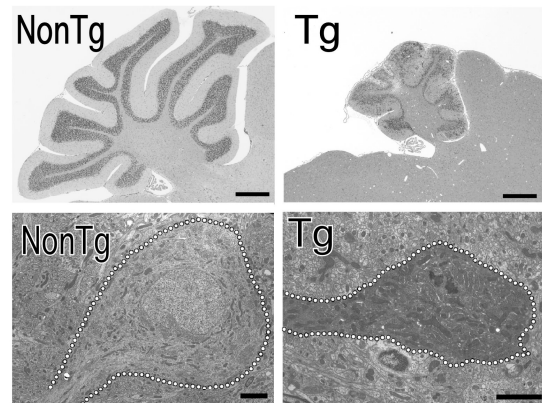


図1. IE180 Tgマウスの病変の本質は神経変性・細胞死である。IE180 Tgマウスでは器官形成期から神経細胞が変性・細胞死に陥り、その結果として小脳形成不全を示す (右上。左上は対照)。右下は変性した神経細胞の電顕像 (左下は対照。点線内が神経細胞体)。

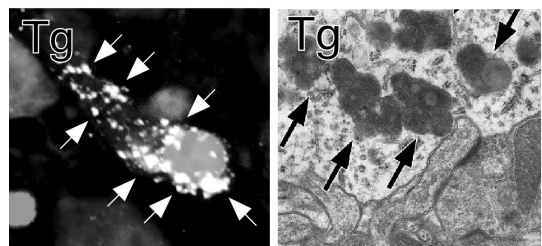


図2. IE180 Tgマウスの神経変性にオートファジー-リソソーム分解系の異常が関与している可能性が示唆された。写真左、矢印で示したように、オートファジー経路で選択的に分解されるp62蛋白質がドット状に蓄積している(蛍光免疫染色)。写真右の矢印は異常なリソソームの集積を示す(電顕)。

②GFP-LC3 Tg マウスでは小脳プルキンエ細胞の樹状突起および小脳溝の下層に位置するプルキンエ細胞の細胞体が規則的に GFP

陽性となり、オートファジーが正常に機能していると考えられた(図3左)。これに対し、IE180/GFP-LC3 ダブル Tg マウスのプルキンエ細胞では GFP 陽性像(オートファゴソーム)はより少数しか認められなかった(図3右)。若齢個体で少数認められる GFP 強陽性のプルキンエ細胞では、核および細胞質内に IE180 が強発現していた(図4)。また、このような IE180 と GFP-LC3 が共局在する細胞は若齢時には少数ながら認められるものの加齢と共に消失した。IE180/GFP-LC3 Tg では IE180 発現により一過性にオートファゴソームが活性化するが、やがてそれらの細胞は正常なオートファジー機能を維持できず細胞死すると推察された。

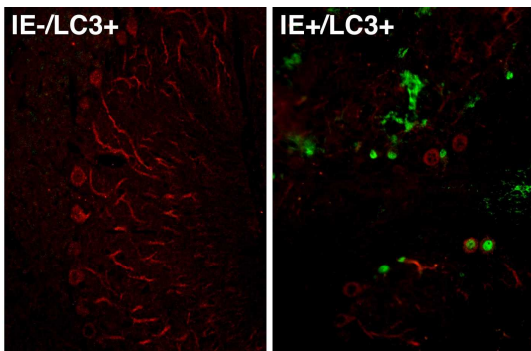


図3. 抗GFP抗体および抗IE180抗体を用いた蛍光免疫染色。赤：LC3-GFP、緑：IE180。IE180/GFP-LC3ダブルTgマウス(図右)ではLC3(オートファゴソーム標識)陽性細胞が減少している。

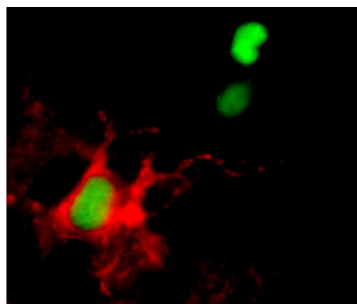


図4. LC3(赤)およびIE180(緑)の局在。IE180/GFP-LC3ダブルTgマウスの若齢個体ではLC3(細胞質内)とIE180(主に核内)が共に強陽性の細胞がときおり認められる。

③培養細胞に IE180 を一過性に発現させた場合や PRV を感染させた場合、オートファジー経路で選択的に分解される p62 蛋白質の発現が増加した(図5)。しかしながら、既知のオートファジー関連分子の発現異常は見いだせなかった。

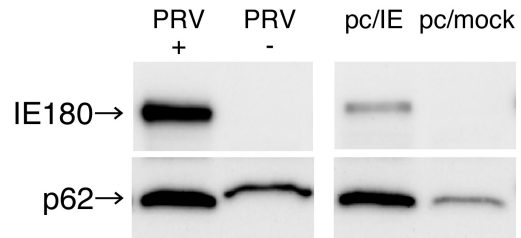


図5. 培養細胞においてPRV 感染およびIE180の発現はp62の蓄積を促進する。(図左) PRV+: 感染後8時間, PRV-:非感染の培養細胞抽出蛋白質を用いたウェスタンブロット。(図右) pc/IE: IE180を一過性に強制発現, pc/mock: 対照, 非発現。

(2)得られた成果の意義と今後の展望

IE180/GFP-LC3 ダブル Tg マウスの解析からは、ヘルペスウイルスタンパク質がオートファジー機構の異常を誘導し、神経変性に関与する可能性が示唆された。

今回、IE180 の一過性発現や PRV の感染細胞を用いた解析では IE180 が作用するオートファジー関連分子を見出すことは出来なかった。また、遺伝子導入マウスという特殊な形ではなく実際のヘルペスウイルス感染においてオートファジー異常に関連した神経変性が起こりうるかという追求には至らなかった。したがって、①IE180 安定発現株を作出し、IE180 が作用するオートファジー関連分子の探求すること、②実際のヘルペスウイルスの潜伏感染がオートファジー経路を介して神経変性を及ぼすか *in vivo* で明らかにすること、を今後の課題としたい。

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 4 件）

1. Takakuwa, H., Yamashiro, T., Le, M.Q., Phuong, L.S., Ozaki, H., Tsunekuni, R., Usui, T., Ito, H., Morimatsu, M., Tomioka, Y., Yamaguchi, T., Ito, T., Murase, T., Ono, E., Otsuki, K. Molecular epidemiology of avian influenza viruses circulating among healthy poultry flocks in farms in northern Vietnam. *Prev. Vet. Med.* 103(2-3):192-200 (2011) 査読有

2. Ochiai, K., Yoshikawa, Y., Yoshimatsu, K., Oonuma, T., Tomioka, Y., Takeda, E., Arikawa, J., Mominoki, K., Omi, T., Hashizume, K., Morimatsu, M. Valine 1532 of human BRC repeat 4 plays an important role in the interaction between BRCA2 and RAD51. *FEBS Lett.* 585(12):1771-1777 (2011) 査読有

3. Ochiai, K., Yoshikawa, Y., Oonuma, T., Tomioka, Y., Hashizume, K., Morimatsu, M. Interactions between canine RAD51 and full length or truncated BRCA2 BRC repeats. *Vet. J.* 190(2):293-295 (2011) 査読有

4. López-Ramos, J. C., Tomioka, Y., Morimatsu, M., Yamamoto, S., Ozaki, K., Ono, E., Delgado-García, J. M. Motor-coordination-dependent learning, more than others, is impaired in transgenic mice expressing pseudorabies virus immediate-early protein IE180. *PLoS One.* 5(8):e12123 (2010) 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富岡 幸子 (TOMIOKA YUKIKO)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：50374674

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：