

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790191

研究課題名(和文) オートファゴソームの膜の由来に関する超微形態学的研究

研究課題名(英文) Ultrastructural analysis of the membrane origin for autophagy

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)：

神経性セロイドリポフスチン蓄積症のモデルであるカテプシン D 欠損マウスの神経細胞においては、granular osmiophilic deposits (GROD) と呼ばれる蓄積物自体がユビキチン化されている。一方、ユビキチンとオートファゴソームのマーカーである LC3 の両者に結合する p62 と Nbr1 も LC3 やユビキチンと同様の局在を示したことから、この両者が介して GROD は選択的にオートファゴソーム様の二重膜で取り囲まれる可能性があることが組織化学的な結果から示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Neurons in brains of cathepsin D-deficient (CD^{-/-}) mice, a murine model for neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs), possess abundant autophagosomes and granular osmiophilic deposits (GRODs), which are often found in nascent autophagosomes. In addition to immunocytochemical localization of LC3 and ubiquitin in, p62 and Nbr1, both of which can interact with both ubiquitin and LC3, were found to be also localized on the membrane of GRODs. Moreover, these molecules were present in the same granules of the neurons. The data indicate that ubiquitin and p62 and/or Nbr1 on the membrane of GRODs may serve as a signal of autophagy that contributes to the pathogenesis of NCLs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	0	0	0
2007年度	0	0	0
2008年度	0	0	0
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	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：カテプシン D、ノックアウトマウス、神経性セロイドリポフスチン蓄積症、オートファゴソーム、LC3、ユビキチン、p62、Nbr1

1. 研究開始当初の背景

神経性セロイドリポフスチン蓄積症(NCL)は、神経細胞を中心にセロイドリポフスチンを含むリソゾームが蓄積する常染色体劣性遺伝の神経変性疾患である。私たちは、代表的なリソゾームアスパラギン酸プロテアー

ゼとして知られるカテプシン D(CD)を欠損するマウス(CD^{-/-}マウス)がてんかん様のけいれん発作を起こし、盲目となること、また、病理組織学的には、神経細胞にオスミウム好性顆粒(granular osmiophilic deposits; GROD)、指紋様構造(fingar print profile)

が蓄積することから、NCL のモデルマウスであることを報告した。その後、CD を欠損あるいは CD の活性を持たないヒトの症例が報告され、CD は NCL の原因遺伝子 (CLN) の一つ (CLN10) として認められた。

従来、GROD は CD が欠損するためにリゾソームに分解されずに残った基質が蓄積する結果生じる構造物と考えられており、リゾソームと同じ一重の形質膜を持つ構造物と考えられてきた。しかし、電子顕微鏡観察の結果、私たちは GROD そのものがしばしばオートファゴソーム様の二重膜で取り囲まれていることに気付いた。

私達は、このことを遺伝学的に検証するため、Atg7 の脳組織特異的コンディショナルノックアウトマウスである Atg7F/+;Nes マウス、とカテプシン D 欠損マウスを交配し、中枢神経系では CD と Atg7 が共に欠損し、その他の組織では CD のみが欠損する

CD-/-Atg7F/F;Nes マウスを得ることに成功した。電顕観察を行ったところ、

CD-/-Atg7F/F;Nes マウス脳の神経細胞では依然として GROD が認められた。しかし GROD を取り囲む膜はオートファゴソーム様二重膜ではなく粗面小胞体に類似した粗な膜に変化していた。本モデルマウスはオートファゴソーム膜の由来を考える上で有用であると考えられる。

2. 研究の目的

ポリグルタミン病やハンチントン病などにおいて神経細胞体における凝集体形成の原因となる分子やある種の細菌などの病原体はオートファジー経路によって分解されていることが示唆されている。また、ごく最近、常染色体劣性遺伝性の家族性パーキンソン病原因遺伝子の Parkin と PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) が膜オルガネラであるミトコンドリアの選択的なオートファジー (マイトファジー) に関わることが明らかとなってきた。私たちは、電子顕微鏡観察の結果、CD-/-マウスの神経細胞体における GROD が積極的、選択的にオートファゴソームの膜に包み込まれていると推察し、ユビキチンおよび選択的オートファジーを担うことが近年明らかとなった p62 と Nbr1 に着目し、これらの動態を免疫組織化学的に検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物

本研究における動物実験は順天堂大学医学部における動物実験に関する指針に従って実施され、マウスはすべて SPF の動物実験施設で飼育された。CD-/-、p62 遺伝子欠損 (p62-/-) マウスはそれぞれゲッティンゲン大学、筑波大学より入手した。CD+/-マウス、p62-/-マウスを交配し、CD と p62 のダブルノックアウト (CD-/-p62-/-) マウスを作成した

遺伝子型は過去に報告されている方法に従って決定した。

(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 UC6) 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 H-7100) で観察した。

(3) 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および蛍光抗体法による免疫組織化学を行った。酵素抗体法の場合、切片を私たちの研究室で作成したウサギ抗 LC3B (20 µg/ml)、ユビキチン (1:500, DAKO)、Nbr1 (1:100、かずさ DNA 研究所) 抗体、モルモット抗 p62 (1:200, Progen) 抗体とそれぞれ一晩反応させ、ABC 法により DAB 発色を行った。蛍光抗体法の場合、切片をウサギ抗 LC3B、マウス抗ユビキチン (1:500, FK-2, BIOMOL)、モルモット抗 p62 抗体ないし、マウス抗ユビキチン、ウサギ Nbr1、モルモット抗 p62 抗体の混合液と反応させ、Alexa488、594 (Invitrogen)、Cy5 (Jackson Laboratory) 標識の二次抗体と反応後、共焦点顕微鏡 (FV1000、オリンパス) を用いて観察した。

5) 免疫電子顕微鏡法

本研究ではマウスを 4%PA (0.1MPB (pH7.2)) で灌流固定して得た脳組織を用いて凍結超薄切片法 (徳安法) による免疫電顕を行った。ウルトラクライオミクロトーム (ライカ UC6/FC6) を用いて得られた 60 nm 厚前後の凍結超薄切片を抗ユビキチンないし p62 抗体と反応させ、さらに金コロイド標識の二次抗体 (GE) と反応させた後、電子顕微鏡で観察を行った。

4. 研究成果

CD-/-マウス脳組織のパラフィンないし凍結切片を用いて、LC3、ユビキチン、p62、Nbr1 の免疫組織化学を行ったところ、いずれの分子についても顆粒状の陽性反応像が神経細胞体で認められた。対照群の CD+/+マウスではび漫性の染色像が認められるだけであった (図 1)。

蛍光三重線色により LC3、ユビキチン、p62 (図 2)、更にはユビキチン、p62、Nbr1 (図 3) が神経細胞の核近傍の同一の構造に共局在することが示された。

CD-/-マウス脳組織の凍結超薄切片を用いて免疫電顕を行ったところ、ユビキチン、p62 の局在を示す金コロイドは共に GROD の中で

はなく膜表面に主として認められた (図 4)。
 以上は、GROD の膜表面にユビキチン、ユビキチンと LC3 の両者に結合する p62 ないし Nbr1 が局在することより、ユビキチン- p62 複合体が隔離膜上の LC3 と会合することで効率的に GROD をオートファゴソームに取り込む機構が存在することを示唆している (図 5)。

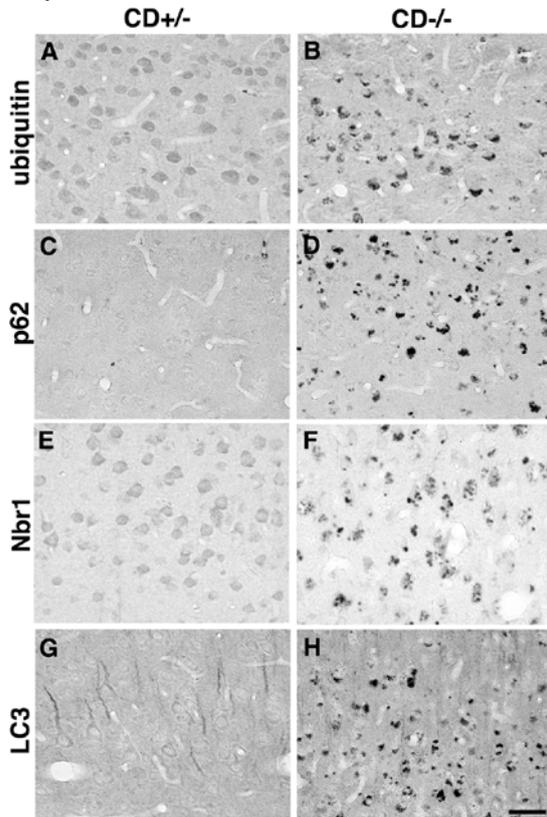


図 1 生後 23 日齢の CD^{-/-}マウス (B, D, F, H) および同腹仔の対照群 (CD^{+/-}) のマウス (A, C, E, G) におけるユビキチン (A, B)、p62 (C, D)、Nbr1 (E, F)、LC3 (CPE) (G, H) の局在。スケール=100 μ m

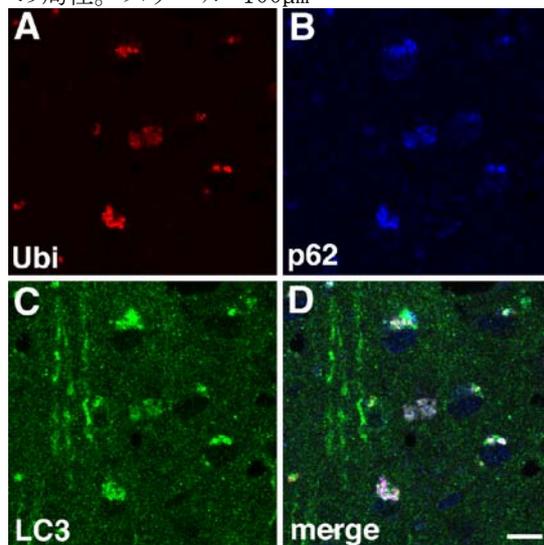


図 2 生後 23 日齢の CD^{-/-}マウス大脳皮質

におけるユビキチン (Ubi) (A)、p62 (B)、LC3 (C) の三重染色。スケール=10 μ m

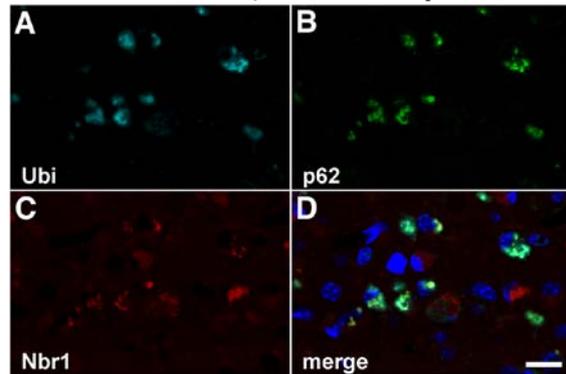


図 3 生後 23 日齢の CD^{-/-}マウス大脳皮質におけるユビキチン (Ubi) (A)、p62 (B)、Nbr1 (C) の三重染色。スケール=20 μ m

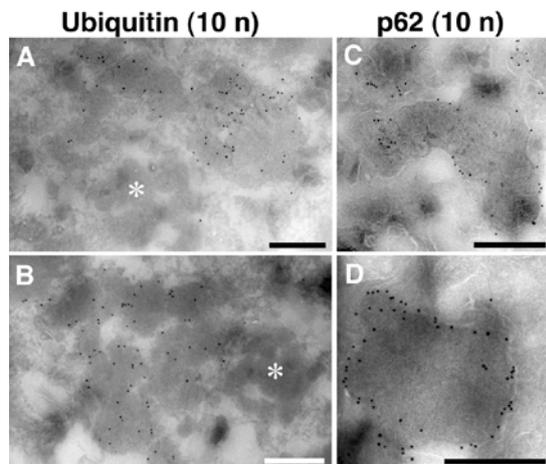


図 4 生後 23 日齢の CD^{-/-}マウス大脳皮質におけるユビキチン (A, B : 10 nm 金コロイド) (A, B)、p62 (C, D : 15 nm 金コロイド) の局在。スケール=0.5 μ m

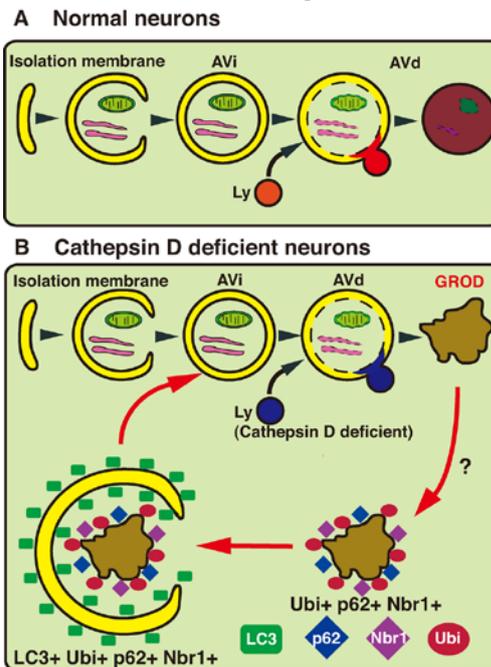


図 5 生後 23 日齢の CD^{-/-}マウス大脳皮質

図5 カテプシンD欠損マウスの病態形成とオートファジー

正常な神経細胞(A)では、細胞内小器官などが細胞質の一部とともに隔離膜と呼ばれる小胞様構造によって包み込まれ、オートファゴソームが形成される。これにトランスゴルジ網に由来するカテプシンDなどのリソソームの酵素を含む輸送小胞あるいはリソソームが融合することで、包み込まれた内容物が分解される。一方、カテプシンD欠損マウス由来の神経細胞(B)では、GRODの表面が未知のメカニズムによりユビキチン(Ub)およびp62ないしNbr1に修飾される。このような構造物は、LC3陽性のオートファゴソームに取り込まれる。しかし、リソソームの機能自体が異常であるため、この過程を何度も繰り返すことによりGRODの蓄積が起こる。

この過程を遺伝学的に検討するため、p62^{-/-}とCD^{+/+}を交配し、CD^{-/-}p62^{-/-}マウスの作成に成功した。CD^{-/-}p62^{-/-}マウスはCD単独欠損マウスと寿命は変わらず、電子顕微鏡で観察しても、GRODは依然オートファゴソーム様の二重膜により取り囲まれていることが明らかとなった。しかし、CD^{-/-}p62^{-/-}マウスの脳組織ではNbr1の強い顆粒状の反応が認められることを確認しており、p62とNbr1がGRODの選択的オートファジーに対して相補的に働いている可能性が示唆された。

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13件)

- ① 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.* in press.
- ② Komiya, K., Uchida, T., Ueno, T., Koike, M., Abe, H., Hirose, T., Kawamori, R., Uchiyama, Y., Kominami, E., Fujitani, Y., Watada, H. Free fatty acids stimulate autophagy in pancreatic beta-cells via JNK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401(4): 561-7; 2010. 査読あり
- ③ Kaneko, N., Marin, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Murakami, F., Wu, J., Tessier-Levigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H., Rubenstein, J., Sawamoto, K. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* 67(2): 213-23; 2010. 査読あり

- ④ Sasaki, K., Hamasaki, J., Koike, M., Hirano, Y., Komatsu, M., Uchiyama, Y., Tanaka, K., Murata, S. PAC1 gene knockout reveals an essential role of chaperone-mediated 20S proteasome biogenesis and latent 20S proteasomes in cellular homeostasis. *Mol. Cell Biol.* 30(15): 3864-74; 2010. 査読あり
- ⑤ Hadano, S., Otomo, A., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Akatsuka, A., Koike, M., Aoki, M., Uchiyama, Y., Itoyama, Y., Ikeda, J.E. Loss of ALS2/Alsin exacerbates motor dysfunction in a SOD1-expressing mouse ALS model by disturbing endolysosomal trafficking. *Plos One* 5(3): e9805; 2010. 査読あり
- ⑥ Shimada, N., Ohno-Matsui, K., Iseki, S., Koike, M., Uchiyama, Y., Peters, C., Wang, J., Yoshida, T., Mochizuki, M., Morita, I. Cathepsin L in bone marrow-derived cells is required for retinal and choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 176(5): 2571-80; 2010. 査読あり
- ⑦ Shibata, M., Yoshimura, K., Tamura, H., Ueno, T., Nishimura, T., Inoue, T., Sasaki, M., Koike, M., Arai, H., Kominami, E., Uchiyama, Y. LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393(2): 274-9; 2010. 査読あり
- ⑧ Tamura, H., Shibata, M., Koike, M., Sasaki, M., Uchiyama, Y. Atg9A protein, an autophagy-related membrane protein, is localized in the neurons of mouse brains. *J. Histochem. Cytochem.* 58(5): 443-53; 2010. 査読あり
- ⑨ Matsuda, T., Kido, Y., Nakano-Hashimoto, N., Kaisho, T., Tanaka, T., Asahara, S., Shigeyama, Y., Takeda, A., Inoue, T., Shibutani, Y., Koyanagi, M., Hosooka, T., Matsumoto, M., Inoue, H., Uchida, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Akira, S., Kasuga, M. Ablation of C/EBPbeta alleviates ER stress and pancreatic beta cell failure through the GRP78 chaperone in mice. *J. Clin. Invest.* 120(1): 115-26; 2010. 査読あり
- ⑩ Maejima, Y., Sedbazar, U., Suyama, S., Kohno, D., Onaka, T., Takano, E., Yoshida, N., Koike, M., Uchiyama, Y., Fujiwara, K., Takahashi, N., Horvath, T.L., Dietrich, M.O., Tanaka, S., Dezaki, K., Oh-I, S., Hashimoto, K., Shimizu, H., Nakata, M., Mori, M., Yada, T. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia

through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab.* 10(5): 355-65; 2009. 査読あり

⑪小池正人、内山安男。「オートファジーの超微形態観察」臨床検査 53(12): 1535-41; 2009. 査読なし

⑫小池正人、内山安男。「脳虚血とオートファジー、ユビキチン・プロテアソーム系の役割」医学のあゆみ 231(5): 347-51; 2009. 査読なし

⑬Sugita, S., Horie, S., Nakamura, O., Maruyama, K., Usui, Y., Takeuchi, M., Ishidoh, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Peters, C., Yamamoto, Y., Mochizuki, M. Acquisition of T regulatory function in cathepsin L-inhibited T cells by eye-derived CTLA-2alpha during inflammatory conditions. *J. Immunol.* 183(8): 5013-22; 2009. 査読あり

〔学会発表〕(計 25 件)

①小池正人、内山安男、「海馬 CA3 錐体細胞特異的 Atg7 コンディショナルノックアウトマウスの形態学的解析」第 16 回グリアクラブ 2011 年 2 月 2 日ヒルトンニセコビルジ

②内山安男、小池正人「リソソームカテプシン D 欠損とオートファジーについて」第 1 回放射線神経生物学研究集会 2011 年 1 月 29 日群馬大学医学部刀城会館

③小池正人、内山安男、「リソソ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 6 回オートファジー研究会 2011 年 1 月 14 日ヤマハリゾート「つま恋」

④Shinji Hadano, Asako Otomo, Ryota Kunita, Kyoko Suzuki-Utsunomiya, Akira Akatsuka, Masato Koike, Masaaki Aoki, Yasuo Uchiyama, Yasuoto Itoyama, Joh-E Ikeda. ALS2, the causative gene product of familial motor neuron diseases, regulates autophagy-lysosomal protein degradation. 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 7 日神戸国際会議場、神戸国際展示場

⑤秦野伸二、大友麻子、國田竜太、鈴木-宇都宮恭子、赤塚明、小池正人、青木正志、内山安男、糸山泰人、池田 穰衛、「運動ニューロン疾患原因遺伝子産物 ALS2 の機能喪失はエンド・リソソーム系タンパク質分解異常をもたらす」第 33 回日本神経科学大会 2010 年 9 月 3 日 神戸国際会議場、神戸国際展示場

⑥金子奈穂子、Oscar Marin、小池正人、廣田ゆき、内山安男、Jane Y Wu、Qiang Lu、Marc Tessier-Lavigne、Arturo Alvarez-Buylla、岡野栄之、John L. R. Rubenstein、澤本和延、「アストロサイトとの相互作用による新生ニューロン移動経路の形成・維持機構」第 33 回日本神経科学大

会 2010 年 9 月 3 日 神戸国際会議場、神戸国際展示場

⑦多村博澄、柴田昌宏、小池正人、佐々木光穂、内山安男、「オートファジー関連膜タンパク質である Atg9A はマウス脳の神経細胞に局在する」第 33 回日本神経科学大会 2010 年 9 月 2 日 神戸国際会議場、神戸国際展示場

⑧小池正人、内山安男「リソソームカテプシン群を欠損したマウスにおける軸索変性」第 33 回日本神経科学大会 2010 年 9 月 2 日 神戸国際会議場、神戸国際展示場

⑨Yasuo Uchiyama, Hirofumi Tamura, Masato Koike, Mitsuho Sasaki. Atg9A protein, is an autophagy-related membrane protein, is localized in the neurons of mouse brains. 7th Forum of European Neuroscience, 2010 年 7 月 6 日、アムステルダム

⑩Masato Koike, Yasuo Uchiyama. The role of macroautophagy in the pathogenesis of lysosomal storage disease due to cathepsin D deficiency. 7th Forum of European Neuroscience, 2010 年 7 月 5 日、アムステルダム

⑪小池正人、内山安男、「低酸素-脳虚血負荷後の海馬錐体細胞におけるカスパーゼ非依存性神経細胞死の表情」第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010 年 3 月 29 日 岩手県民会館

⑫佐々木光穂、多村博澄、小池正人、上野隆、内山安男、「哺乳類 Atg9A mRNA ノックダウン細胞株におけるリソソーム様構造物の生化学的解析」第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010 年 3 月 28 日 岩手県民会館

⑬多村博澄、佐々木光穂、小池正人、上野隆、内山安男、「哺乳類 Atg9A mRNA ノックダウン細胞の形態学的解析」第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010 年 28 日 岩手県民会館

⑭小池正人、柴田昌宏、内山安男、「リソソ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 15 回グリアクラブ 2010 年 2 月 12 日ヒルトンニセコビルジ

⑮Motoko Shiozai, Shoichi Takeuchi, Naoya Hayakawa, Masahiro Shibata, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, Takahiro Gotow.

Resveratrol is beneficial to senescence-accelerated mouse neurons and to differentiated but not naive PC12 cells. 39th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2009 年 10 月 21 日 シカゴ

⑯Masato Koike, Yasuo Uchiyama. Axonal degeneration in mice doubly deficient in cathepsin D or B and L. 39th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2009 年 10 月 19 日 シカゴ

⑰Hirosumi Tamura, Masato Koike, Mitsuho Sasaki, Masahiro Shibata, Yasuo Uchiyama.

Distribution of Atg9A, an autophagy-related membrane protein, Atg9, in mouse brains. 39th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2009年10月19日 シカゴ

⑮小池正人、「神経細胞におけるリソソームプロテアーゼの役割に関する分子細胞生物学的研究」第50回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2009年度日本組織細胞化学会若手学術奨励賞受賞講演、2009年9月27日 ピアザ淡海 滋賀県立県民交流センター

⑯小池正人、森 康子、森石 永子、河端 暁子、湯 華民、小柳津 裕子、山西 弘一、内山 安男「ヒトヘルペスウイルス6粒子のエクソソーム経路を利用した細胞外への放出機構について」第50回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2009年9月26日 ピアザ淡海 滋賀県立県民交流センター

⑰Masato Koike, Masahiro Shibata, Masaaki Komatsu, Paul Saftig, Tetsuro Ishii, Eiki Kominami, Keiji Tanaka and Yasuo Uchiyama. Involvement of macroautophagy in the pathogenesis of lysosomal storage disease due to cathepsin D deficiency. 5th International Symposium on Autophagy, 2009年9月26日 大津プリンスホテル

⑱Hirosumi Tamura, Masato Koike, Mitsuho Sasaki, Masahiro Shibata, Yasuo Uchiyama. Distribution of Atg9A, an autophagy-related membrane protein, Atg9, in mouse brains. 5th International Symposium on Autophagy, 2009年26日 大津プリンスホテル

⑳小池正人、柴田昌宏、内山安男、「リソソ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32回日本神経科学大会 2009年9月18日 名古屋国際会議場

㉑竹内翔一、塩崎元子、早川直哉、柴田昌宏、小池正人、内山安男、後藤隆洋、「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32回日本神経科学大会 2009年9月17日 名古屋国際会議場

㉒早川直哉、塩崎元子、竹内翔一、柴田昌宏、小池正人、内山安男、後藤隆洋、「エタノール障害中枢神経細胞に対するキサントシンの緩和作用」2009年9月17日 名古屋国際会議場

㉓塩崎元子、竹内翔一、早川直哉、柴田昌宏、小池正人、内山安男、後藤隆洋、「レスベラトロールはSAMP10中枢神経系の老化関連変性を改善する」第32回日本神経科学大会 2009年9月17日名古屋国際会議場

〔図書〕(計1件)

①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.

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: オートファジー性細胞死抑制剤
発明者: 内山安男、砂堀毅彦、小池正人
権利者: 内山安男、砂堀毅彦、小池正人
種類: 特許
番号: 特願 2011-054647
出願年月日: 2011年3月11日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし