

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390041

研究課題名(和文)オートファジー関連タンパク質LC3AとBの分子特性に関する遺伝学的研究

研究課題名(英文)Genetic study of molecular characteristic of autophagy-related proteins LC3A and LC3B

研究代表者

内山 安男 (UCHIYAMA, Yasuo)

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：10049091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー関連遺伝子LC3AとLC3Bはオートファジーが誘導されるとオートファゴソームの膜上に局在するが、両者の役割については不明な点が多い。私達は、LC3AとLC3Bおよび両者のノックアウトマウスを作成し、形態学的及び生化学的に検討した。これらを欠損するマウスは正常に生まれ、成長し、生殖能力も持つことが分かった。これらを欠損する脳、肝、腎、心組織でGABARAPファミリータンパク質の発現は全く変化せず、基礎的オートファジーに働くことが分かった。LC3A/Bを欠損する新生仔マウス海馬錐体細胞は、低酸素脳虚血負荷に抵抗性を示し、オートファジー性神経細胞死の存在を強く示唆することが分かった。

研究成果の概要(英文)：The roles of autophagy-related proteins LC3A and LC3B largely remains unknown, although LC3 are used as a marker protein for autophagosome formation. To further understand their roles, single and double knockout (KO) mice of LC3A and LC3B were produced. These KO mice were born normally and grown up to be capable of reproduction. Protein expression of the GABARAP family of proteins did not change between wild-type and LC3A/B-deficient mouse body tissues such as brain, liver, kidney and heart, indicating they maintain basic autophagy. Hippocampal pyramidal neurons of neonatal brains deficient in LC3A/B were resistant to hypoxic-ischemic brain injury. The result strongly suggests the presence of autophagic neuro death in the hippocampal pyramidal layer of mouse brains.

研究分野：医歯薬学

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：LC3 オートファジー 脂肪滴形成

1. 研究開始当初の背景

細胞は基礎的な代謝に伴い合成と分解を繰り返している。この基礎代謝にオートファジー(自食作用)は必須の現象で、古くなって不要な細胞の構成要素を一部の細胞質と共に小胞様構造の隔離膜によって包み込み(オートファゴソームの形成)、リソソームの酵素を受けて分解する機構である。オートファゴソームに取り込まれた高分子物質は酸性条件下で生物活性のあるモノマー(アミノ酸等の)にまで分解され、再利用される。近年、出芽酵母の研究から数多くのオートファジー関連遺伝子が同定され(ATG)、それらのほ乳類におけるホモログも取られてきた。特に、オートファゴソームのマーカータンパク質として微小管関連タンパク質(MAP-) LC3(酵母Atg8のほ乳類ホモログ)が同定され、オートファジーが誘導されると細胞質型(18kDa)から膜型(15kDa)に変換され、形態的にも生化学的にもオートファゴソーム形成の指標となることが明らかにされた(Komatsu et al., 2005; 2006; 2007; Uchiyama et al. 2009)。

LC3のサブタイプにはAとBとが知られ、LC3Bがオートファジーに必須な因子であると考えられている(ヒトではLC3Cも発現している)。しかし、両者を識別する抗体(存在するが検証がない)、タンパク質レベルの組織発現、各組織細胞での役割については不明な点が多い。私達は、マウス肝細胞や心筋細胞で飢餓ストレスを加え、オートファジーを誘導してLC3の局在を検討した所、LC3はオートファゴソームのみならず脂肪滴の表面にも局在することが分かった。とくに、LC3を細胞質型から膜型に変換するE1酵素であるAtg7を肝細胞特異的に欠損させると、飢餓ストレスを加えても脂肪滴が増加しないことが明らかとなった(Shibata et al., 2009)。同様に、様々な培養がん細胞を用いて、RNAi法でLC3の発現を抑えると、脂肪滴の形成が抑制される。特に、LC3の発現抑制によって、脂肪細胞前駆細胞の3T3-L1細胞を脂肪細胞に分化させても脂肪滴の形成と中性脂肪量は抑制されることも分かった(Shibata et al., 2010)。膜型のLC3-IIは数分子が集まると対抗する膜の外葉同士が融合することから(hemifusion)、脂肪滴の成長には、膜型のLC3-IIが脂肪滴表面に局在することが必須であることを明らかにした。しかし、脂肪滴形成にLC3AとBのどちらが関与するのかについては全く不明であり、オートファゴソームの形成にLC3Bが

主でLC3Aに代理性がないのかという問題と同様である。LC3は神経細胞の細胞骨格タンパク質MAP1A/Bに結合する小分子として初めにクローニングされた(Mann & Hammarback, 1994)。LC3の発現は神経系に最も多いが、LC3AとBとが、MAP1A/Bとどのように結合し、どのような役割を有しているのかは依然不明である。

2. 研究の目的

私達は、LC3の抗体を作り、正常および病的に誘導されるオートファジーの状態を検討し(Koike et al., Gotoh et al., その他、2005, 2006, 2007, 2009, 2010)、遺伝学的に虚血後の海馬錐体細胞のオートファジー性神経細胞死の存在を世界で初めて明らかにした(Koike et al., 2009)。さらに、RNAi法を用いてLC3BとLC3Aの発現抑制を様々な細胞で試みた。抗体も両者を識別可能な抗体を作製したが、組織細胞化学的解析に耐えるLC3A抗体は出来ていない。RNAi法で、LC3の細胞質型から膜型への変換活性の検査法(Yoshimura et al., 2006)や脂肪滴形成(Shibata et al., 2009, 2010)の解析を行なった。in vivoでこれらの事象を検証するため、LC3A、LC3Bのノックアウト(KO)マウスを作製し、これらマウスを用いて、本研究では次の課題を明らかにすることを目指す。

1) オートファゴソーム形成やMAP1AとMAP1Bとの結合に際して、LC3AとBの代理性(redundancy)の有無について検討する。

2) 絶食時の肝細胞や脂肪組織での脂肪滴形成とLC3AあるいはLC3Bの役割を明らかにする。

3) PTEN(Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10)の肝細胞特異的KOマウスは脂肪肝に陥る。このマウスとLC3BのダブルKOマウスを作製し、中性脂肪の変化を検討し、LC3Bの役割を明らかにする。

4) LC3AあるいはLC3B、あるいは両者を欠損するマウス(コンディショナルKOマウス)を用いて低酸素脳虚血、中大脳動脈閉塞後の変化を調べ、LC3AとLC3Bの役割を検討す

る。

5) LC3A あるいは LC3B、あるいは両者を欠損するマウスを用いて、腎虚血再灌流傷害後の変化を調べ、LC3A と LC3B の役割を明らかにする

3. 研究の方法

1) LC3A と LC3B、それぞれのノックアウトマウスの作成について: LC3A と LC3B の flox マウスを作成し、TLCN-Cre と掛け合わせ、全身における欠損マウスを作成する。全身で LC3A あるいは LC3B を欠損するマウス(LC3A^{-/-}あるいは LC3B^{-/-})を交配し(交配可能であることを確認して)、さらに両者を欠損するマウス(LC3A/B^{-/-})を作成する。ゲノタイプはシッポから DNA を抽出して実施する。ハイブリダイズ用のプローブも作製済み。LC3A あるいは B を欠損するマウスの交配では、雄の欠損マウスと雌の欠損マウスで妊娠、不妊等異なる場合があるため、十分な検討が必要である。これらマウスを用いて次の実験を行った。

2) PTEN 肝細胞特異的欠損マウスと LC3A^{-/-} あるいは LC3B^{-/-}、あるいは LC3A/B^{-/-}マウスとの交配: PTEN ヘテロ欠損マウス(PTEN^{+/-})と LC3A あるいは B^{-/-}マウスとの交配(LC3A あるいは B もヘテロマウス(LC3A^{+/-};LC3B^{+/-})を使用する可能性もある)。トリプル KO を作製するためには PTEN^{+/-}LC3A^{+/-} と PTEN^{+/-}LC3B^{+/-} とを交配した。ゲノタイプは 1) に同じ。

3) LC3A^{-/-}、LC3B^{-/-}および LC3A/B^{-/-}マウスの形態的解析: これらマウスの神経系、肝細胞、脂肪組織、心筋細胞、腎組織の光顕、電顕レベルの解析: マウスは原則として、光顕(4%パラフォルムアルデヒド溶液)および電顕(2%パラフォルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒド溶液)用に灌流固定、免疫染色用に灌流固定を実施し、それぞれの処理後包埋した。光顕では、通常のヘマトキシリン-エオシン(HE)染色や LC3 抗体を用いて免疫染色にてこれらタンパク質の発現の変化を調べた。電顕的には、通常の透過電顕で検索すると共に、神経線維での細胞骨格を急速凍結-凍結割断法で細胞骨格を検索した。

LC3A/B の欠損によって、GABARAP family タンパク質がどのように変化するかも mRNA を PCR 法で、タンパク質量は Western blot 法で検討した。

4) 低酸素脳虚血(H/I)障害による LC3A/B^{-/-}海馬錐体細胞の変化: 生後7日齢の野生型、LC3A^{-/-}、LC3B^{-/-}、LC3A/B^{-/-}マウスを用いて、低酸素脳虚血負荷事件による海馬錐体細胞の変化を形態的、生化学的に検討した。各マウスの片側総頸動脈を剖出し、2カ所で結紮して縫合後、1時間ケイジに戻し、8%酸

素9.2%窒素、37℃に調節した容器に25分間置き、親の元に戻した。術後0分、3、6、12、24、72時間後に、光顕用と電顕用に灌流固定した(上述)標本を作製した。光顕的には、HE染色、TUNEL染色、LC3免疫染色あるいは His-FLAG-LC3 の染色を行った。また、同時間で術側と反対側の海馬を採取し、LC3の発現を検討した。5) 腎虚血再灌流(I/R)障害における LC3A/B^{-/-}腎尿細管上皮の変化: LC3A^{-/-}、LC3B^{-/-}、LC3A/B^{-/-}マウスの左腎動静脈の血流をクリップで遮断し、30分後に再灌流を行ない、24時間後、72時間後に灌流固定して、光顕および電顕用標本を作製した。光顕用標本を用いて、HE染色、Kim-1(障害度を計る)染色を行った。

4. 研究成果

1) LC3A、LC3B の flox マウスの作成: LC3A のノックアウトマウスを作成するために、LC3A ゲノムのエクソン2と3を欠失させるターゲティングベクターを作成した。ベクターをエレクトロポレーション法により B6 由来の ES 細胞に導入し、薬剤マーカーによる選択圧でセレクションした ES 細胞株の中から、サザンプロット法により、正確に相同組換えが起こった ES 細胞株をスクリーニングした。同 ES 細胞をマウス受精卵に移植し、仮親の子宮内へ移植してキメラマウスを得た。同キメラマウスと野生型 B6 マウスとの交配により、全身に組換え遺伝子を持った F1 マウスを得た。同マウスと CAG-Cre マウスと交配して全身の LC3A^{-/-}マウスを得た。同様に、LC3B のノックアウトマウスを作成するために、LC3B ゲノムのエクソン2を欠失させるターゲティングベクターを作成し、LC3A ノックアウトマウス作成と同じ手順で ES 細胞を得た。しかし、この ES 細胞株からキメラマウスが得られなかったため、ES 細胞株に Flpe 遺伝子を一過性に発現させることにより薬剤マーカーを欠失させた ES 細胞株を作成した。同 ES 細胞株を用いることにより、組換え LC3B マウスの作出に成功した。CAG-Cre マウスと交配して全身のノックアウトマウスを得た。LC3A^{-/-}、LC3B^{-/-}は正常に生まれ、成長し、生殖能力もあることが分かった。さらに LC3A/B^{-/-}マウスを作成したが、同様に正常に生まれ、成長し、生殖能力も有することが明らかとなった。

2) 肝細胞特異的に PTEN を欠損するマウスと交配して、肝細胞で特異的に LC3A/B と PTEN を欠損するマウ

ス：同マウスを作成したが、脂肪滴の形成については明らかな差は見いだせなかった。

3) LC3A^{-/-}、LC3B^{-/-}および LC3A/B^{-/-}マウスの形態的解析：8週齢の各 KO マウスを用いて顕微鏡レベルで、脳、肝、腎、心臓の各組織を検索した。HE 染色では肝、心、腎組織では有意な差は認められなかったが、神経組織で海馬の錐体細胞に変性像が認められた。この変化を継時的に追うために、現在、36週齢まで飼育を継続している。各時期に見られる神経変性像の数は一定ではないが、海馬錐体細胞の変化を見ると、縮小化し濃く染色される細胞の数が多く認められた (図-1)。また、小脳核の神経細胞に終わるプルキンエ細胞の終末部には、異常な膜構造が認められた。現在、行動異常との関係やどのくらいの頻度で変性に落ちるかを検討している。LC3の染色を、各 KO マウスで行ったが、現在、どの組織でも使用できる免疫組織化学用の抗体はないことが分かった。このため、適切な抗体の作成を目指している。

また、脂肪滴の形成能について8週齢マウスを24時間あるいは48時間絶食して、固定後肝組織解析した。LC3A^{-/-}マウスでは、絶食後に脂肪滴の形成は肝細胞で抑制されていたが、他のマウスでは全く差はなかった。

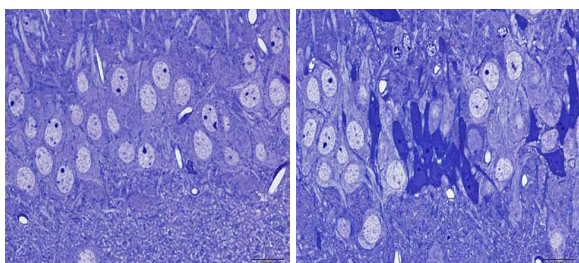


図-1. 8週齢マウス海馬 CA4 領域の準超薄切片トルイジンブルー染色。左は野生型、右は LC3A/B^{-/-}。LC3 を欠損する錐体細胞の多くは、萎縮し、濃染している。

LC3A^{-/-}、LC3B^{-/-}、LC3A/B^{-/-}マウス脳、肝臓、腎臓、心臓における LC3A、LC3B、GABARAP、GABARAAPL1、GABARAPL2



図-2. 生後7日齢の野生型 (左上)、LC3A^{-/-}

(右上)、LC3B^{-/-} (左下)、および LC3A/B^{-/-}マウスに H/I 負荷をかけ24時間後の海馬錐体領域の HE 染色像。LC3A/B^{-/-}海馬ではほとんどの錐体細胞は障害を受けていない。

のタンパク質の発現を調べた。KO マウスの各組織で代償性に発現が上昇を示すことはなかった。脳では、GABARAP ファミリーの発現は低く、肝、腎組織では GABARAP が、心臓では GABARAPL1 の発現が高かった。これらの発現も、KO マウスと野生がとで変化はなかった。すなわち、LC3A/B が欠損していても、基礎的なオートファジー-GABARAP ファミリーの発現によって維持されていることが分かった。

4) 生後7日齢の野生型および LC3A^{-/-}、LC3B^{-/-}、LC3A/B^{-/-}マウスに対する H/I 負荷実験：H/I 負荷24時間後の LC3A^{-/-}および LC3B^{-/-}マウス脳海馬錐体層における障害の度合い HE 染色標本、TUNEL 染色で検討したが、野生型のマウス海馬錐体細胞層に見られる障害の度合いと変わらなかった。しかし、LC3A/B^{-/-}海馬錐体細胞はほとんど変化が認められなかった (図-2)。同様に TUNEL 染色で陽性の核を数えた所、LC3A/B^{-/-}海馬錐体細胞層で有意に陽性死亡数は低く、障害の程度が低いことが明らかとなった。H/I 負荷後12、24、72時間で野生型海馬を摘出して、LC3のタンパク質発現を Western blot 法で検討した所、同側海馬で反対側に比べて有意に膜型の LC3 が上昇していた。His-FLAG-LC3-TG マウスを用いて、H/I 負荷して24時間後に海馬錐体細胞層を調べた所、LC3 陽性の顆粒が錐体細胞に出現すること、さらには電顕で調べても野生型錐体細胞にオートファゴソームが形成されていることも明らかとなった。これらの結果は、オートファジーが脳で特異的にできない (Atg7^{-/-}) マウスを用いて、H/I 負荷実験を行い、細胞死が有意に抑制されることを示した結果 (Koike et al., 2008) と同じであった。今回の結果も、神経系では、LC3 がストレス下で応答性に働くことが明らかとなり、オートファジー性神経細胞死の存在を強く示唆する結果となった。

5) 腎 I/R 障害における LC3A/B^{-/-}腎尿管上皮の変化：私達は、リソソームカテプシンDを皮髄境界領域の尿管で欠損させるとオートファジーが誘導され、I/R 負荷をかけるとさらにオートファジーが誘導されて、細胞死に陥ることを見いだした。尿管の障

害を示す Kim-1 染色を施すと、カテプシン D 欠損部位に一致して有意に Kim-1 陽性になることが分かり、現在論文にまとめている。そこで、今回作成した LC3A/B-/- マウスに I/R 負荷をかけた所、ノックアウトマウスでより強い障害を示すことが分かった。この結果は、神経系での障害の度合いと全く逆の結果である。両者の、細胞障害に関する分子機構は現在の所全く不明であるが、組織で誘導されるオートファジーが過剰に起きた場合の細胞の反応性に神経系と腎組織で異なることを示している。

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1件)

内山安男「脂肪滴とオートファジー」内分泌・糖尿病・代謝内科 33(4):338-343,2011

〔学会発表〕(計2件)

山口隼司 砂堀毅彦 七尾友久 佐々木光穂
小池正人 内山安男: 低酸素脳虚血障害と LC3 欠損マウス。第19回グリアクラブ(新潟県湯沢)平成26年3月2日。

山口隼司 砂堀毅彦 七尾友久 佐々木光穂
小池正人 内山安男: 中枢神経系における LC3A/B の役割。第119回日本解剖学会総会(自治医科大学)3月29日。

〔図書〕(計1件)

Uchiyama Y, Kominami E (2013) Autophagy regulates lipid droplet formation and adipogenesis. In: Lipid metabolism. Ed by Rodrigo Valenzuela Baez. InTech, Chapter 7, pp149-162

〔その他〕

ホ - ム ペ - ジ :
http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/shinkei_kozo/

6. 研究組織

(1)研究代表者

内山 安男 (Uchiyama, Yasuo)
順天堂大学・医学部・特任教授
研究者番号：10049091

(2)研究分担者

小池 正人 (Koike, Masato)
順天堂大学・医学部・先任准教授
研究者番号：20432536

(3)研究分担者

佐々木 光穂 (Sasaki, Mitsuho)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：20432536

(4)研究分担者

砂堀 毅彦 (Sunabori, Takehiko)
研究者番号：00407115

(5)研究分担者

鈴木 ちぐれ (Suzuki, Chigure)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：40536629

(6)研究分担者

柴田 昌宏 (Shibata, Masahiro)
新潟大学・歯学総合研究科・准教授
研究者番号：10343253