

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460510

研究課題名(和文)ロイシン添加によるオートファジー不全の改善機序を新規膜蛋白質 Spin1 から探る

研究課題名(英文) Does Spin1 mediate L-leucine-effects to ameliorate impaired autophagy?

研究代表者

柳澤 比呂子 (YANAGISAWA, Hiroko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員

研究者番号：60416659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ライソゾーム病の一つであるニーマンピック病のモデルマウス由来シュワン細胞株を用いて、オートファジー動態を解析した。血清飢餓により、ライソゾームが増大し、細胞内部には、大きな空胞や多数の異常な膜状構造物が内包されていた。ロイシン添加、Spin1発現細胞株では、オートファジー基質であるp62の細胞内蓄積が減少し、増大したライソゾームも減少した。よって、ロイシン添加、Spin1発現による共通のオートファジー不全を改善する働きが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have examined the events of autophagy by starvation, adding L-leucine and Spin1 expressing cells in a Schwann cell line (573C10), derived from a model mouse of Niemann-Pick disease type C. We detected an increase of LC3-II and accumulation of p62 in 573C10 cells, in which enlarged lysosome was increased upon serum starvation. Electron microscopic observations revealed that 573C10 cells contain enlarged lysosomes with large vacuoles, which are accompanied by lamellar inclusions composed of aggregated membrane vesicles. We observed that addition of L-leucine or expressing Spin1 ameliorated the enlargement of lysosomes and the p62 accumulation. Then we found the common mechanism for amelioration of defective autophagy, between L-leucine and Spin1.

研究分野：医歯薬学分野 分科 基礎医学 細目 代謝異常

キーワード：オートファジー ロイシン p62 Spin1/SPNS LC3 ライソゾーム病 ニーマンピック病C型 シュワン細胞株

1. 研究開始当初の背景

(1)オートファジーシステムは、生体内の恒常性維持に不可欠であり、その破綻による様々な疾患が報告されている。特に、不要物を分解するライソゾーム酵素等の欠如により発症するライソゾーム病では、オートファジーシステムの不全が報告されている。

(2)ロイシンとオートファジーシステムとの関連が注目されており、ロイシン欠乏によるオートファジーの誘導が報告されている。

(3)ショウジョウバエのプログラム細胞死を起こさない変異体、*spinster/Spin1*では、神経セロイドリポフスチン症に類似のリポフスチン様物質が蓄積するが、*Spin1*のノックダウン細胞では栄養飢餓条件において、mTORのリン酸化が減少せずに、ライソゾームの形状が増大した。

2. 研究の目的

本研究ではニーマンピック病モデルマウス由来細胞のシュワン細胞株を用いて、オートファジーの動態を解析し、ライソゾーム病や神経変性疾患等病態に関わるオートファジーシステムの病態解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) ニーマンピック病モデルマウス由来細胞を用いて、血清飢餓により、オートファジー関連因子 (LC3II、mTORのリン酸化、p62) の局在や発現量の変化がないかを免疫細胞化学的染色法 (IF) やウエスタンブロット法 (WB) 等で検討する。

(2) 増大したライソゾームの微細構造について電子顕微鏡を用いて観察する。

(3) ニーマンピック病モデルマウス由来細胞を用いて血清飢餓下でロイシン添加により、オートファジー関連因子 (LC3II、mTORのリン酸化、p62) の局在や発現量の変化、リン酸化等の修飾変化の有無をWBやIFで検討する。

(4) ニーマンピック病モデルマウス由来細胞を用いて血清飢餓、ロイシン添加、無処理での発現動態変化をマイクロアレイで解析する。

(5) *Spin1/SPNS*を恒常的に発現した細胞株を単離し、オートファジー関連因子の局在や発現量の変化がないかを免疫細胞化学染色

法 (IF) やウエスタンブロット法 (WB) 等で検討する。

(6) ニーマンピック病モデルマウス由来細胞を用いて、SiRNAにより*Spin1*をノックダウンし、オートファジー関連因子 (LC3II、mTORのリン酸化、p62) の局在や発現量の変化がないかを免疫細胞化学的染色法 (IF) やウエスタンブロット法 (WB) 等で検討する。

4. 研究成果

(1) 血清飢餓によるオートファジー動態
血清飢餓により、ライソゾームの増大やオートファジー基質である p62 の蓄積が確認された (IF)。また、LC3II の発現量が増加しており、LC3 のターンオーバー アッセイにより、オートファジーの不全が示唆された。

さらに、電子顕微鏡を用いた解析により、増大したライソゾーム領域には空胞が多数あり、膜様の異常な構造体が多数混在していた。つまり、ニーマンピック病モデルマウス由来のシュワン細胞株においては、不要物を分解しアミノ酸等を再生するという「オートファジー機構が不全」になっている事が明らかとなった。

(2) ロイシン添加によるオートファジー不全の改善

WB では、血清飢餓処理 8 時間後に p62 が増加したが、ロイシン添加により減少した。

IF においても、血清飢餓処理で増大したライソゾーム細胞が、ロイシン添加により減少した。また、p62 の蓄積もロイシン添加により抑制された。

定量的な解析が必要なため、画像解析ソフト (MetaMorph) を用いて、ライソゾームの大きさと p62 の大きさの変化を検討した。半径 1 μ m 以上 3 μ m 以下のライソゾームは、血清飢餓処理で未処理と比較して約 2 倍に増加し、ロイシン添加により血清飢餓処理と比較して二分の一に減少した。同様に半径 0.5 μ m 以上の p62 も、血清飢餓処理で未処理と比較して約 2 倍に増加し、ロイシン添加により血清飢餓処理と比較して二分の一に減少した。

つまり、ロイシン添加により、増大したライソゾーム細胞や p62 の蓄積が解消され、オートファジー不全が改善されたことを示す結果が得られた。

(3) 血清飢餓、ロイシン添加による発現量の変化した因子の探索

マイクロアレイ解析を用いて、血清飢餓有無、ロイシン添加の3条件における発現量の変化した遺伝子を解析した。

血清飢餓により、Nrf2のターゲット因子であるp62mRNA発現量が増加し、同時にオートファジー不全によるp62蛋白質分解減少(つまり、p62蛋白質増加)し、p62のリン酸化(ser351)が促進し、Nrf2が活性化するという負のループが示唆された。

ライソゾームで働くATPaseの発現量がロイシン添加により上昇した。

血清飢餓による内向きカリウムチャネル発現量の上昇は、ロイシン添加により低下し、活性化カリウムチャネルの発現が上昇した。ネットワーク解析の結果から、CREBによる転写活性により、活性化カリウムチャネルの発現が上昇したと推察された。

ライソゾームで働くATPaseやカリウムチャネルがオートファジー不全の改善に寄与していると考えられた。

(4) Spin1/SPNSを恒常的に発現した細胞によるオートファジー不全の改善

Spin1を恒常的に発現した細胞株を単離し、オートファジー動態を解析した。

血清飢餓によるライソゾーム増大細胞の増加やp62の蓄積が観察されなかった。

(5) Spin1ノックダウンによるオートファジー不全の増強

SiRNAによりSpin1をノックダウンし、オートファジー動態を解析した。

血清飢餓処理無しにおいてもLC3IIの発現増加、p62の蓄積が観察され、オートファジー不全の増強が推察された。

(6)成果

ニーマンピック病モデルマウス由来のシュワン細胞株を用いた本研究により、以下の事が明らかになった。

血清飢餓により、オートファジー不全を呈した。

ロイシン添加により、血清飢餓によるオートファジー不全が改善された。

ライソゾームで働くATPaseやカリウムチャネルがオートファジー不全の改善に寄与している可能性が示唆された。

Spin1の発現により、血清飢餓によるオートファジー不全が改善された。一方Spin1のノックダウンにより、オートファジー不全が改善されず、より不全状態がシビアになると観察された。

オートファジー不全の改善にロイシン添加とSpin1の発現に共通の作用を見出すことができた。

(7) 得られた成果の国内外における位置づけ

ロイシン添加とSpin1の関連についての研究は本研究以外では報告されておらず、Spin1の発現により、オートファジー不全が改善される事象を初めて発見した。

(8) 今後の展望

オートファジー不全を改善する共通機構としてのロイシン添加や、Spin1の発現について、直接的に作用するライソゾームの動態を調べ、その機序を明らかにしていく予定である。その機序が解明されれば、ニーマンピック病の患者において、ロイシン添加や、Spin1の遺伝子治療等により、オートファジー不全の改善に寄与し、病状の緩和が期待できると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 4 件)

柳澤 比呂子、石井 智裕、河上 江美子、遠藤 堅太郎、平岡 由佳、上野 隆、山元 大輔、小松 雅明、渡部 和彦

ロイシン添加によるオートファジー不全を改善するメカニズムとSpin1との関連

BMB2015(第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学会 合同大会)

2015年12月2日

神戸ポートアイランド(兵庫県 神戸市)

柳澤 比呂子、西藤 泰昌、河上 江美子、遠藤 堅太郎、山元 大輔、小松 雅明、渡部 和彦

L-leucine 添加によりオートファジー不全が改善するメカニズムとは？

第 37 回日本分子生物学会

2014 年 11 月 27 日

パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)

Hiroko Yanagisawa, Daisuke Yamamoto,
Emiko Kawakami, Kentaro Endo,
Masaaki Komatsu, Kazuhiko Watabe

L-leucine ameliorates defective autophagy through involvement of cathepsin D activation.

2014 年 7 月 9 日

FENS

MiCo - Milano Congressi、イタリア

柳澤 比呂子、山元 大輔、河上 江美子、遠藤 堅太郎、小松 雅明、渡部 和彦

L-leucine 添加によるオートファジー不全改善と cathepsin D の関連

第 36 回日本分子生物学会年会

2013 年 12 月 3 日

神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

研究者番号：30240477

小松 雅明 (KOMATSU, Masaaki)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：90356254

山元 大輔 (YAMAMOTO, Daisuke)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：50318812

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 比呂子 (YANAGISAWA, Hiroko)
公益財団法人 東京都医学総合研究所・
運動・感覚システム研究分野・研究員
研究者番号：60416659

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

渡部 和彦 (WATABE, Kazuhiko)
公益財団法人 東京都医学総合研究所・
運動・感覚システム研究分野・
神経変性病理研究室 室長