

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670099

研究課題名(和文) 神経細胞におけるp62/Nbr1分子とリソソームの極性に関する研究

研究課題名(英文) The polarized localization of p62 and NBR1 in cathepsin D-deficient neurons is involved in selective autophagy

研究代表者

内山 安男 (Uchiyama, Yasuo)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10049091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、選択的オートファジーに關与するp62/NBR1はカテプシンD(CD)を欠損するニューロンで極性を示し、細胞体と樹状突起にのみに局在し、この局在化にこれら分子のN末端に責任領域があることを明らかにした。また、CD欠損マウス脳の神経細胞に蓄積する異常なリソソームは、p62/NBR1依存的にオートファゴソームに取り込まれることも明らかにした。さらに、異常なリソソームはニューロンの軸索には侵入できないことも分かった。即ち、極性を示すp62/NBR1はニューロンで選択的オートファジーに寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that p62/NBR1, adapter proteins of selective autophagy, localize in somatodendrites of neurons in cathepsin D (CD)-deficient mouse brains but not in axons. This localization pattern of p62 and NBR1 was confirmed in primary cultured cortical neurons, while the N-terminal specific domains of these proteins were responsible for the polarized localization. We further examined the intraneuronal target components of p62 and NBR1 and found that the target organelle was dysfunctional lysosomes in CD-deficient neurons. These results suggest that the polarized localization of p62 and NBR1 contributes to the selective autophagy in the somatodendrites of neurons.

研究分野：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：オートファゴソーム p62 NBR1 リソソーム ニューロン

1. 研究開始当初の背景

リソソームは細胞内外の不要な物質、構成要素などの高分子化合物を酸性環境下でモノマーまで分解する系で、これらモノマーは細胞で再利用される。オートファジーは、リソソームへの経路の一つで、細胞内の構成要素の代謝回転や恒常性の維持に重要な働きをなす。私達は、リソソームカテプシン D (CD) を欠損するマウスの研究から次の事実を明らかにした。1) granular osmiophilic deposits (GRODs) とよばれる分解されない CD の基質を含んだ異常なリソソーム、2) 指紋様の膜が蓄積した構造物、および 3) 小胞様の二重膜で囲まれたオートファゴソーム、が樹状突起から細胞体に蓄積し、4) 軸索にはオートファゴソームが蓄積した spheroid 状の腫脹が観察され、5) 細胞体/樹状突起中の GRODs はしばしば二重膜構造で包み込まれている。このような神経変性に陥る CD 欠損マウスは神経性セロイドリポフスチン蓄積症のモデルマウスであり、約生後 26 日で死に至る。これらの研究で、神経軸索にはリソソームは存在せず、オートリソソームのみ観察されたこと、また、近年明らかにされた選択的オートファジーに必須なタンパク質分子であるユビキチンはシナプス前終末に認められるが、p62 と NBR1 は認められないことを見出した。しかし、軸索/終末部にリソソームや p62 の存在を指摘する研究もある。それ故、リソソームやこれらタンパク質の軸索輸送に関する制御機構を知ることが重要である。

2. 研究の目的

リソソームは、広く生体細胞に分布し、酸性環境下で働く多くの加水分解酵素を含み、細胞内の高分子構造を生物活性のあるモノマーまで分解する。ニューロンにおけるリソソームの分布を見ると、核周囲や樹状突起には存在するが、軸索には認められない。初代培養大脳皮質神経細胞で見ると、培養日数とともに軸索にはリソソームがほとんど見られなくなる。成熟後にも神経終末部には、LC3 陽性のオートファゴソームの局在が見られることから、終末部でオートファジーによって不要な物質をオートファゴソームに詰め込み、細胞体に戻した後、リソソーム酵素を受けて分解が始まる、と考えられる。さらに、選択的オートファジーに関与する p62 や NBR1 も検索する限りにおいては軸索には存在しない。それ故、本研究の目的は、このような細胞体から軸索への移行を制御する機構をリソソームと p62/NBR1 を通して解明することにある。

3. 研究の方法

1) p62/NBR1、GROD の *in vivo* における局在化に関する解析：CD 欠損マウス脳における形態解析：免疫組織化学的に p62/NBR1

の局在を光顕および電顕レベルで解析する。電顕的には、4%パラフォルムアルデヒド (PAF) で固定した標本を用いて、徳安法に従い凍結切片金コロイド法を用いて実施する。電顕観察は通常の固定法で処理した後、樹脂包埋して薄切して染色し、観察する。

CD と p62 と NBR1 をそれぞれ欠損するマウスを交配し、得られたヘテロザイゴティックマウスをそれぞれ交配して、3者を欠損するマウスを作製する(既に、ヘテロザイゴティックマウスは得られているが、3分子を欠損するマウスの作成には時間を要する)。同マウスで、GRODs の神経細胞における局在を解析する。これらによって、p62/NBR1 の局在、GROD の局在と p62/NBR1 との関係解析することが可能となる。

2) 初代培養神経細胞を用いた p62/NBR1 の局在解析：野生型マウスの初代培養神経細胞 (PCN) を胎生 16、17 日齢胎仔の大脳皮質より得て、1 週から 2 週間培養し、p62/NBR1 の局在の変化を解析する。

初代培養神経細胞に GFP-p62/GFP-NBR1 を強制発現して、それぞれの局在を再確認する。

3) 神経細胞における p62/NBR1 の分子形態と局在化に関わるドメイン構造：初代培養神経細胞を用いて、p62/NBR1 の各ドメイン構造を欠損したミュータント分子に GFP を付加しプラスミドを作成して、2 DIV の PCN に導入し、6 DIV で局在を解析した。各ミュータント分子が単量体で存在するか、オリゴマーを形成するかを、ネイティブゲルや detergent-soluble ある い は detergent-insoluble 分画に分けてウエスタンブロット法で展開して、分子形態を解析した。

4. 研究成果

1) CD 欠損マウス脳における p62/NBR1 の発現と局在：

8 週齢の野生型および CD 欠損マウス脳の抽出液を detergent-soluble および detergent-insoluble 分画に分け、それぞれに入る p62 と NBR1 の量を検討したところ、CD 欠損グループでは対照群に比べて有意に不溶性分画に入ることが分かった。そこで、免疫組織細胞学的に p62 や NBR1 を正常及び CD を欠損した小脳、大脳皮質、海馬で局在を検討した。野生型マウスの小脳で見ると、p62 や NBR1 の免疫反応は弱く、びまん性であった。CD 欠損マウスでは、ユビキチンの顆粒状の陽性反応はプルキンエ細胞の細胞体/樹状突起のみならず軸索や終末部に認められたが、p62 や NBR1 の陽性反応は、細胞体/樹状突起では共同在したが、軸索やその終末部では全く陽性反応が見られなかった (図 1)。

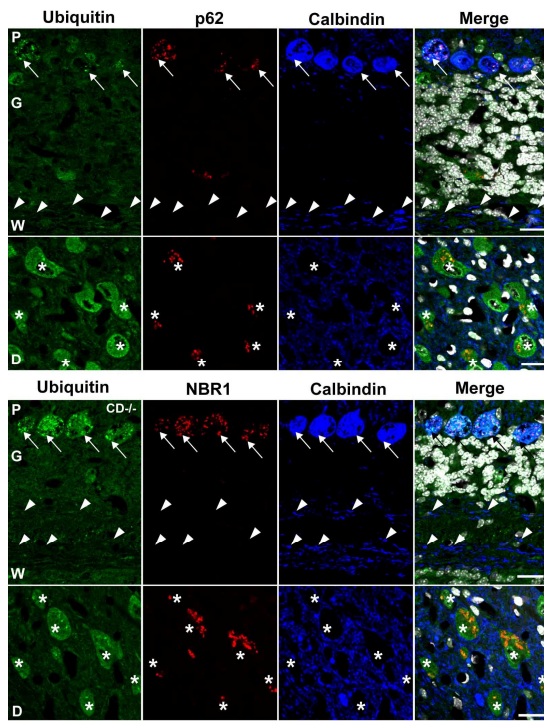


図1 .CD欠損小脳におけるubiquitin, p62, NBR1, Calbindin の局在. 矢印はプルキンエ細胞の細胞体、矢頭は軸索と過末端部、*は小脳核の神経細胞の細胞体を示している。緑はウビキチン陽性反応、赤は p62 (上段) と NBR1 (下段) の陽性顆粒、青はプルキンエ細胞の細胞体 / 樹状突起 / 軸索 / 終末部 (マーカータンパク質) に存在するカルビンデンインを示す。横棒は 20 μm を示す。

2) CD 欠損及び野生型培養大脳皮質神経細胞における p62/NBR1 の局在:

CD 欠損マウス脳の神経細胞体や樹状突起に p62/NBR1 陽性の顆粒が認められ、軸索には陰性であった。これをさらに詳細に検討するため、胎生 16、17 日のマウスの大脳皮質神経細胞の局在マーカー (細胞体 / 樹状突起は MAP2; 軸索諸説は Ankyrin G; 軸索は tau1) p62/NBR1 の変動を検討した。培養初日 (1 DIV) の発現量は低い。2 DIV から 14 DIV までほぼ一定の発現を呈した。特に、Ankyrin G は軸索初節が形成される時期に一致して増加し、その後一定の発現が見られた。

初代培養神経細胞 (PCN) を 6 から 10 DIV でみると、p62 や NBR1 陽性顆粒は細胞体や MAP2 陽性の樹状突起に見られたが、Ankyrin G 陽性の軸索初節を超えた tau1 や NF 陽性の軸索には陰性であった (図 2 A, B)。

さらに、これを確かめるために、GFP-p62 や GFP-NBR1 を 3 DIV の PCN に導入して、6 DIV で観察した。GFP-p62 および GFP-NBR1 陽性の顆粒状反応は MAP2 陽性の細胞体や樹状突起には認められるが、Ankyrin G 陽性の軸索初節を超えた軸索やその終末部には見られなかった。

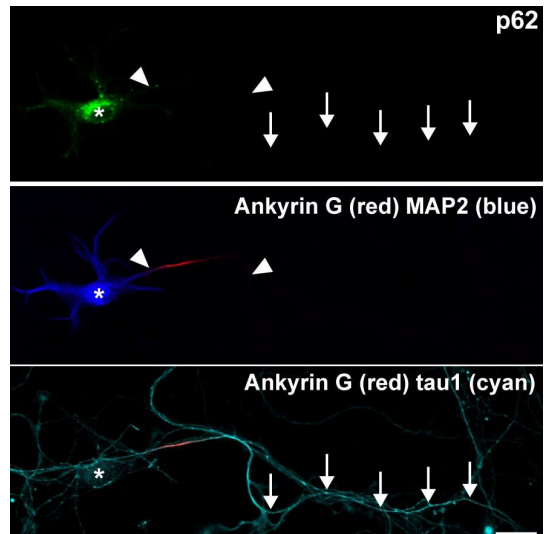


図 2 A . 6DIV の PCN における p62 の局在。P62 陽性反応 (緑) は MAP2 陽性 (青) の細胞体 / 樹状突起に局在し、Ankyrin G 陽性 (赤) の軸索初節を超えた軸索 (tau1 陽性でシアン) には見られない。* は細胞体、矢頭は軸索初節、矢印は軸索を表す。

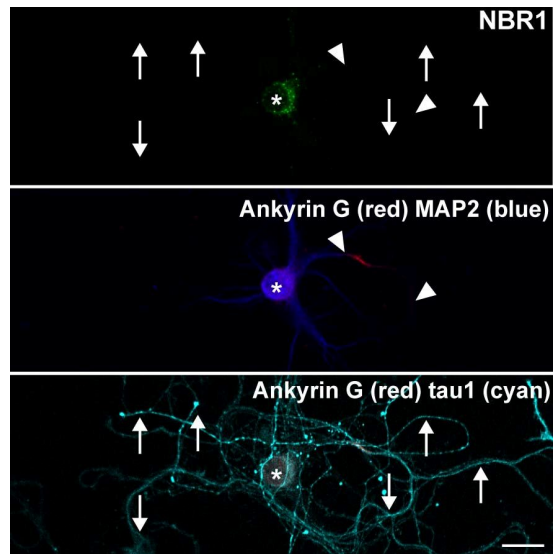


図 2 B . 6 DIV の PCN における NBR1 の局在。P62 陽性反応 (緑) は MAP2 陽性 (青) の細胞体 / 樹状突起に局在し、Ankyrin G 陽性 (赤) の軸索初節を超えた軸索 (tau1 陽性でシアン) には見られない。* は細胞体、矢頭は軸索初節、矢印は軸索を表す。2 A, B のスケールバーは 20 μm。

3 培養神経細胞における p62/NBR1 の局在化に関わるドメイン構造の同定:

PCN における p62 および NBR1 が Ankyrin G 陽性の軸索初節を超えた軸索に侵入できない、あるいはこれらタンパク質が細胞体 / 樹状突起に局在する分子機構を検討した。

P62 は C 端領域に LC3 やユビキチンと結合する領域があり、N 端領域にホモオリゴマーを作る PB1 領域が知られている。この PB1 領域を欠いたミュータント分子や PB1 ドメイン中の K7 と D69 を Ala に変えること

で、オリゴマー形成ができなくなるとの報告があることから、K7/D69A のミュータント分子を作成し、同遺伝子を PCN に誘導した。これらの分子状態を検討するため、ネイティブゲルで分子状態を調べた。野生型の p62 は、重合してほとんどがオリゴマーを形成し単量体としての p62 はみられなくなっていた。PB1 を欠損した分子や K7/D69A のミュータントはほとんど単量体の位置にあることが分かった。即ち、PB1 を欠損した分子や K7/D69A の分子も単量体で存在し、オリゴマー化できないこと、野生型はオリゴマーとして存在することが明らかとなった。そこでこれらミュータント分子に GFP で標識して、その局在を検討した。PB1 ドメインや K6/D69A のポイントミューテーションを施した分子は、オリゴマー化できないため、細胞体 / 樹状突起のみならず Ankyrin G 陽性の軸索初節を超えて軸索にもミュータント分子は侵入できることが明らかとなった (図 3 A)

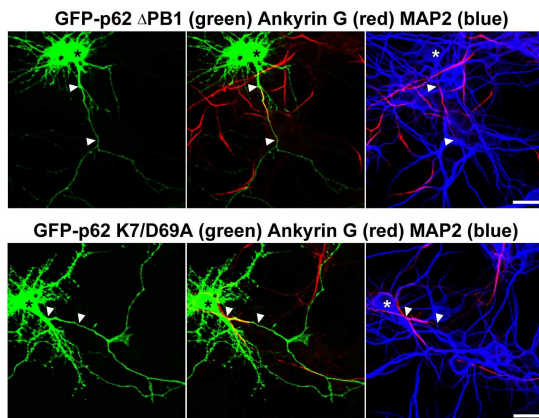


図 3 A. p62 の PB1 を欠損したミュータント分子 (上段) および K6/D69A の点変異を持ったミュータント分子 (下段) は細胞体 / 樹状突起のみならず Ankyrin G 陽性の軸索初節 (矢頭で示した部位) を超えた軸索にも分布する。ミュータント分子は緑、青は MAP2 を示す。スケールバーは 20 μm 。

同様に、NBR1 も N 端に PB1 ドメインと coiled-coil 1 (CC1) ドメインが存在し、これら領域を介して自身の分子や多分子とオリゴマーを形成することが指摘されている。そこで、これら部位を欠損したミュータント分子を作成して PCN に発現し局在を検討した。PB1 ドメインを欠損しても、あるいは CC1 ドメインを欠損しても、軸索に侵入することはなかった。そこで、CC1 の直前の領域を含めたミュータント分子 (pre-CC1/CC1 欠損 NBR1) さらに N 端から CC1 ドメインまでを欠損したミュータント分子 (1-329 欠損 NBR1) を作成して PCN に発現させたところ、pre-CC1/CC1-NBR1 分子は弱い軸索に侵入すること、さらには 1-329 欠損 NBR1 は明瞭に軸索に侵入することが明らかとなり、1-329 領域が NBR1 の細

胞体への局在化に必須であることが分かった (図 3 B)。これら分子の発現様式を可溶化、および不溶化分画を作成して検討したところ、1-329 を欠損するとほとんどは不溶化分画に入ることが明らかになった。

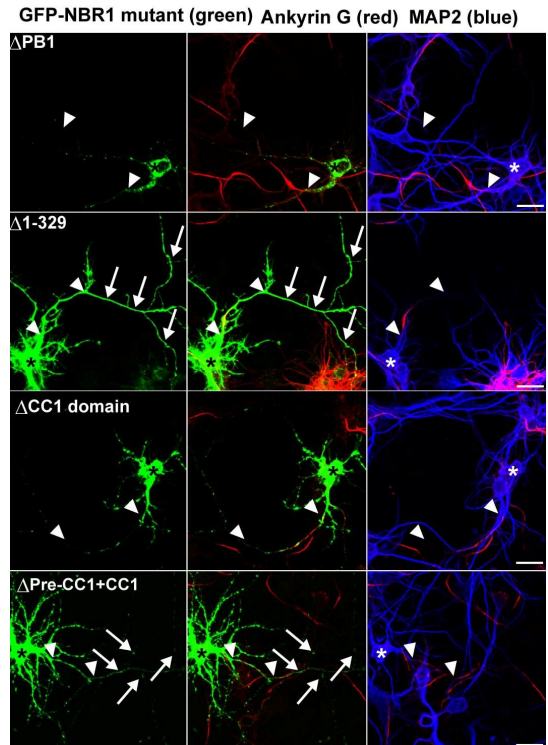


図 3 B. NBR1 の PB1 を欠損したミュータント分子、1-329 欠損ミュータント分子、CC1 ドメイン欠損ミュータント分子、pre-CC1-CC1 欠損ミュータント分子を導入した PCN の中で、PB1 ドメインおよび CC1 ドメインを欠損した NBR1 は野生型と全く同様で、細胞体 / 樹状突起にのみ局在する (上段と 3 段目)。pre-CC1-CC1 欠損分子は、Ankyrin G 陽性の軸索初節 (矢頭で示した部位) を超えた軸索にも多少の陽性像 (矢印) がみられる。1-329 欠損分子は細胞体や樹状突起のみならず、軸索にも強い発現が認められる。分布する。ミュータント分子は緑、青は MAP2 を示す。スケールバーは 20 μm 。

4) CD 欠損ニューロンではオートファジーが誘導される :

CD を欠損するマウス脳の神経細胞には、異常なリソソーム (GROD) とオートファゴソーム様の構造物が細胞体に蓄積する。この二重膜で囲まれたオートファゴソーム様の構造物は GROD を含めて細胞質の一部を取り込んでいるが、その由来を検討するために、脳で CD+/- と Atg7+/- のマウスを交配して両者を脳で欠損するマウスを得た。これらマウス脳における神経細胞を大脳皮質 5 層の神経細胞、海馬錐体細胞、小脳プルキンエ細胞で観察したところ、異常なリソソーム GROD は観察されたが、二重膜あるいは多重の膜で囲まれたオートファゴソームは全く見られな

った。即ち、CD 欠損マウスに見られる二重膜あるいは多重膜で囲まれた構造物は、オートファゴソームであることを示唆している。ダブルノックアウトマウスの神経細胞体の核周囲には、ポリソームが見られず、ユビキチン陽性の線維状の構造物を基質にした領域に、GROD やミトコンドリア、腔胞などの構造物が見られた(図4A,B)。ここには、GROD や粗面小胞体の槽腔が消失し、膜が強く結合した構造物が長く張り出し、その一部はミトコンドリアや GROD を取り囲むような形態が見られた。この形態は、隔離膜がおそらく小胞体由来であることを強く示唆する像と考えられる(図4B,C)。さらに、この膜は粗面正体が層状に集まったところに見られた(図4C、D)。

CD, p62, NBR1 の3者を欠損したマウスを作成し、GROD とオートファゴソームの関係を検討した。CD/p62、CD/NBR1 を欠損するマウス脳の神経細胞では、CD 単独ノックアウトマウスと同様に GROD はオートファゴソーム取り込まれることが多かった。しかし、CD/p62/NBR1 のトリプルノックアウトマウス脳の神経細胞では、オートファゴソームは存在するが、GROD を取り込んだ像は見られなかった。

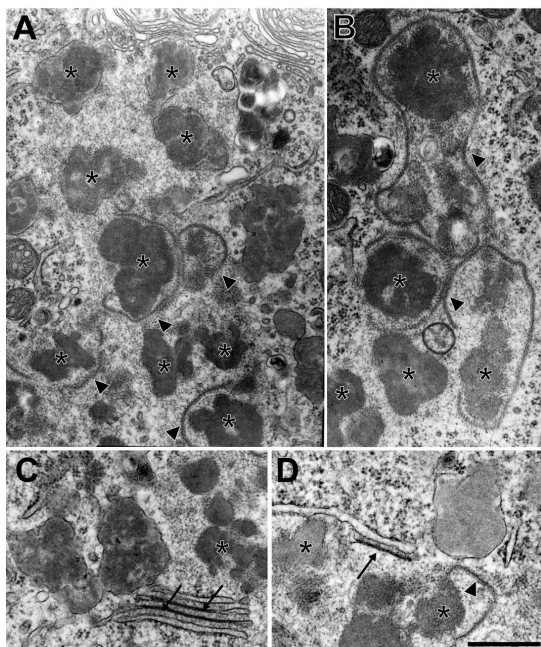


図4 . CD と Atg7 をダブルで欠損するマウス大脳皮質神経細胞を示す。ポリソームを欠き、細線維状のユビキチン陽性領域に GROD、腔胞やミトコンドリアが見られる(A,B)。粗面小胞体の層状化した小胞に挟まれて腔が消失して小胞膜がくっついた形の異常な膜が認められ(C、D)。これが GROD や腔胞を取り囲んだ像が見られる(A,B)。スケールバーは0.5 μm。

5) CD 欠損ニューロンにおける p62/NBR1 の細胞内局在:

CD 単独あるいは CD と Atg7 をダブルで欠損するマウスの大脳皮質で、p62, NBR1, ユビキチンの免疫染色を行った。その結果、神経細胞の細胞体ではこれら顆粒状の免疫染色陽性反応は共局在していた。さらに、凍結超薄切片金コロイド法にて、これら3者の局在を解析したところ GROD の膜上に共存することが分かった。さらに、この反応性は、Atg7 を欠損した神経細胞の GROD でも認められた。即ち、これらの結果は、GROD は p62/NBR1 を介した選択的オートファジのターゲットであることを示している。

以上の結果をまとめると:(1) CD 欠損によって神経細胞にオートファジーが誘導され、p62/NBR1 が蓄積する。(2) p62/NBR1 は神経細胞で極性のある局在を示し、細胞体と樹状突起にみられ、Ankyrin G 陽性の軸索初節を超えた軸索には認められない。(3) この局在化には責任のあるドメイン構造あるいは配列があり、p62 では PB1 ドメインに、また NBR1 では N 端側 1-329 アミノ酸配列であった。これらの配列を介して p61/NBR1 はホモあるいはヘテロオリゴマーを形成している。(4) p62 と NBR1 はユビキチンと共に、GROD の限界膜上に局在し、GROD の選択的オートファジーに関わる。

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11件)(全て査読あり)

- Rinchai D, Riyapa D, Buddhisa S, Utispan K, Titball RW, Stevens MP, Stevens JM, Ogawa M, Tanida I, Koike M, Uchiyama Y, Ato M, Lertmemongkolchai G (2015) Macroautophagy is essential for killing of intracellular *Burkholderia pseudomallei* in human neutrophils. *Autophagy* 11:748-755. doi: 10.1080/15548627.2015.1040969
- Furuta A, Kikuchi H, Fujita H, Yamada D, Fujiwara Y, Kabuta T, Nishino I, Wada K, Uchiyama Y (2015) Property of Lysosomal Storage Disease associated with Midbrain Pathology in the CNS of LAMP-2-deficient Mice. *Am J Pathol* 185: 1713-1723, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.015>
- Nori S, Okada Y, Nishimura S, Ssaki T, Itakura G, Kobayashi Y, Renault-Mihara F, Shimizu A, Koya I, Yoshida R, Kudoh J, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Okano H (2015) Long-Term Safety Issues of iPSC-Based Cell Therapy in a Spinal Cord Injury Model: Oncogenic Transformation with Epithelial-Mesenchymal Transition. *Stem Cell Rep* 4:1-14
- Nanao T, Koike M, Yamaguchi J, Sasaki M, Uchiyama Y (2015) Cellular localization and tissue distribution of endogenous DFCP1 protein. *Biomed Res* 36:121-133
- Tanida I, Ueno T, Uchiyama Y (2015) A

Super-Ecliptic, pHluorin-mKate2, Tandem Fluorescent Protein-Tagged Human LC3 for the Monitoring of Mammalian Autophagy. PLoS ONE 9: e110600. doi:10.1371/journal.pone.0110600

Suyama M, Koik M, Asaoka D, Mori H, Oguro M, Ueno T, Nagahara A, Watanabe S, Uchiyama U (2014) Increased immunoreactivity of cathepsins in the rat esophagus under chronic acid reflux esophagitis. J Histochem Cytochem 62:645-660

Nakafuku-Fukuda M, Hirata T, Keto Y, Yamano M, Yokoyama T, Uchiyama Y (2014) Inhibitory effect of the selective secretion 5-HT receptor antagonist ramosetron on duodenal acidification-induced gastric hypersensitivity in rats. Eur J Pharmacol 731:88-92 doi: 10.1016/j.ejphar.2014.02.040

Yokono M, Takasu T, Hayashizaki Y, Mitsuoka K, Kihara R, Muramatsu Y, Miyoshi S, Tahara A, Kurosaki E, Li Q, Tomiyama H, Sasamata M, Shibasaki M, Uchiyama Y (2014) SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin reduces body fat mass by increasing fatty acid oxidation in high-fat diet-induced obese rats. Eur J Pharmacol 727-66-74 doi: 10.1016/j.erphar.2014.01.004

Koike M, Tanida I, Nanao N, Tada N, Iwata J, Ueno T, Kominami E, Uchiyama Y (2013) Enrichment of GABARAP relative to LC3 in the axonal initial segments of neurons. PLoS One 8:e63568 (*equally contributed)

Ohkouchi S, Shibata M, Sasaki M, Koike M, Safig P, Peters C, Nagata S, Uchiyama Y (2013) Biogenesis and proteolytic processing of lysosomal DNase II. PLoS One, 8:e59148

Koike M, Shibata M, Ezaki J, Peters C, Saftig P, Kominami E, Uchiyama Y (2013) Differences in expression patterns of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I in normal, pathological and aged mouse central nervous systems. Eur J Neurosci, 37:816-830

[学会発表](計5件)

~~内山安男：神経系におけるオートファジー 第55回日本組織細胞化学会総会シンポジウム 平成26年9月27日(松本市中央公民館、長野県松本市)~~

~~内山安男：オートファジーと認知症 特別講演 第20回近畿老年期認知症研究会 平成26年7月5日(リーガロイアルNCB、大阪市)~~

~~内山安男：リソソーム蓄積症とオートファジー 学術教育講演 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会(自治医科大学、栃木県)平成26年3月29日~~

~~内山安男：神経細胞の極性とオートファジー 第19回クラーク特別講演 2014年2月28日~3月2日(KKR湯沢、新潟県南魚沼郡湯沢町)~~

Uchiyama Y: Memorial lecture of the Late Prof. Tsuneo Fujita. Opening lecture in the 23rd International Symposium on Morphological Sciences. On 10th of September, 2013 in Niigata. (Toki Messe Niigata Convention Center)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山安男 (Uchiyama Yasuo)

順天堂大学大学院医学研究科・特任教授