

オートファジーと神経疾患

Autophagy in neurology

順天堂大学大学院医学研究科神経疾患病態構造学講座

内山安男^{*}（特任教授）

1. はじめに

リソソームは真核生物に共通する細胞内小器官で、酸性条件下（pH5-5.5）で働く加水分解酵素を数多く含む。分解する場としてのリソソームに基質を運ぶ経路には、主に3つの機構が知られている¹⁻³。1) 細胞外からの物質を取り込む経路として、リガンドとそのレセプターをエンドサイトーシスにより、また 2) 細胞残渣などを貪食により細胞に取り込み、初期エンドソームや貪食胞を形成する経路があり、これらにリソソーム酵素を持った輸送小胞が癒合して、後期エンドソームやヘテロファゴリソソームとなり分解が始まる。3) もう一つの経路は、細胞内で

不要となった構成成分を分解する機構で、オートファジーと呼ばれる。この機構では、小胞様の隔離膜で不要な細胞の構成成分を細胞質から隔離してオートファゴソーム（AP）に詰め込み、形成された AP とリソソーム酵素を持つ小胞とが癒合して分解が始まる（図 1-3）。

2. オートファジーの種類

オートファジーは、細胞の基礎代謝に関わる基本的なオートファジーと飢餓や様々なストレス状態に応答して誘導されるオートファジーとがある。この AP の形成には、オートファジー関連遺伝子（Atg）

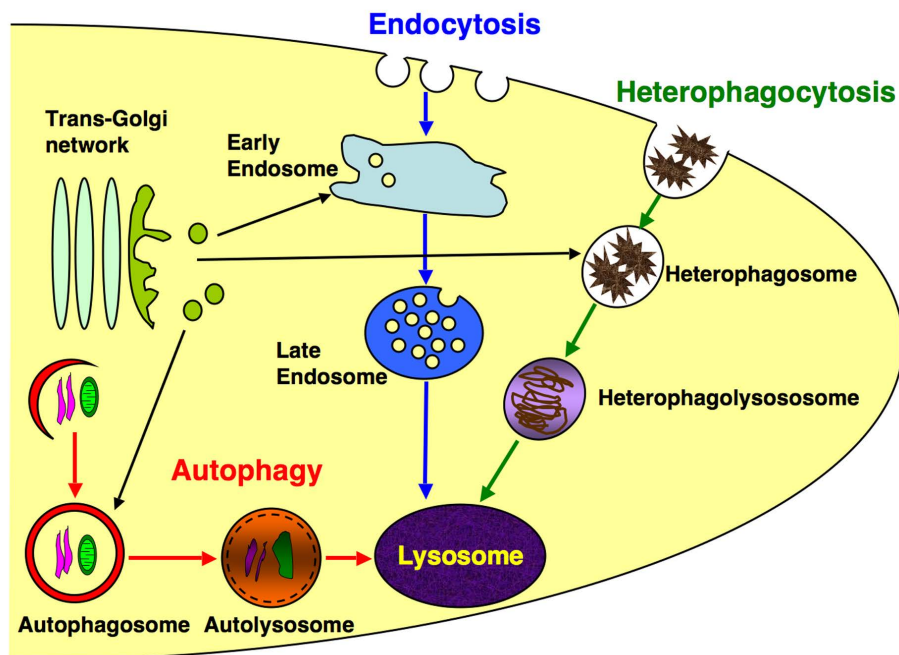


図 1

^{*} Yasuo Uchiyama: Department of Cellular and Molecular Neuropathology, Juntendo University Graduate School of Medicine.

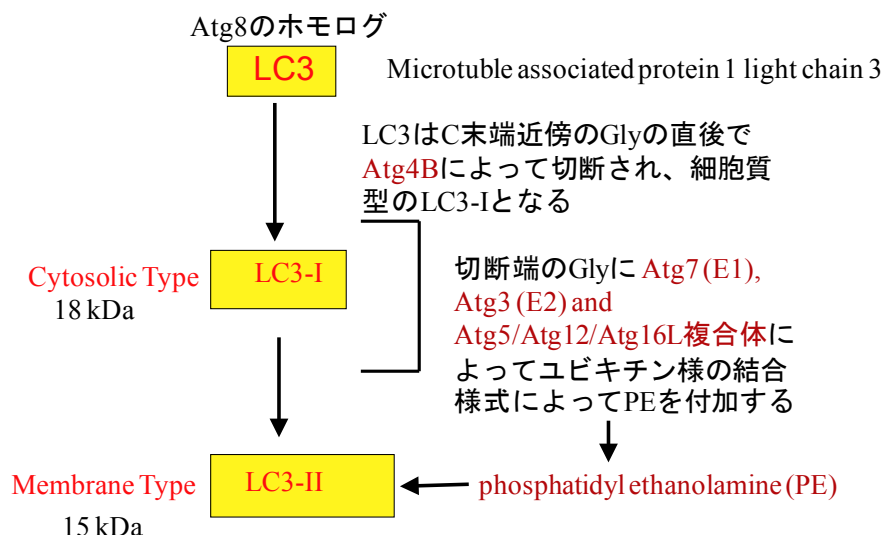


図2 出芽酵母のAtg8のほ乳類ホモログ

ユビキチン様因子Atg8の結合反応系(Atg8系):

LC3, Atg4, Atg7, Atg3, Atg5-12-16L複合体

ユビキチン様因子Atg12の結合反応系(Atg12系):

Atg12, Atg7, Atg10, Atg5, Atg16L

Atg1蛋白質キナーゼ複合体:

Atg1, Atg13, FIP200, Atg101

Vps34 PI3キナーゼ複合体:

Vps34, Vps15, Atg14, Atg6

Atg9とAtg2-Atg18複合体:

Atg2, Atg18, Atg9

図3 オートファゴソーム形成に必須な17因子

の中で、17個の因子が必須である(図1-3)。出芽酵母のAtg8は、APのマーカータンパク質として知られ、その代表的なほ乳類のホモログとして微小管関連タンパク質A/Bの軽鎖3(MAP1-LC3「LC3」)が同定されている(同様に、GABARAPファミリータンパク質も存在する)。このLC3は合成されると直ぐにC末端近傍にあるGlyの直後で、細胞質システインプロテアーゼの一つであるAtg4Bによって切断され、細胞質型のLC3-Iとなる。刺激が入ると断端のGlyにユビキチン化反応と同様の反応がAtg7(E1), Atg3(E2), およびAtg5/Atg12/Atg16Lの複合体(E3)によって実行され、ホスファチジルエタノラミン(phosphatidylethanolamine; PE)が付加されて膜型のLC3-IIとなる(図2)。AP形成に際して隔離膜上に

膜型に変換されたLC3-IIが付着して、非選択的なオートファジーあるいは、選択的なオートファジーが起こる。オートファジーは非選択的で、一度にたくさんの細胞の構成要素を分解する機構と考えられてきたが、タンパク質のユビキチン化がトリガーとなりユビキチンと隔離膜上のLC3の両者に対してそれぞれ結合する領域を持つp62やNBR1というアダプタータンパク質を介して選択的にAPに取り込む機構もあることが分かってきた(図5)³⁻⁶⁾。細胞内の長寿命の構造タンパク質の分解はこのリソソーム/オートファジー系で実行され、寿命の短い代謝調節に関わるタンパク質の分解はユビキチン化を介してプロテアソームによって分解される。

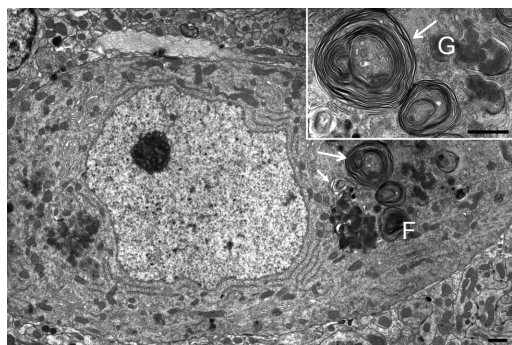


図 4

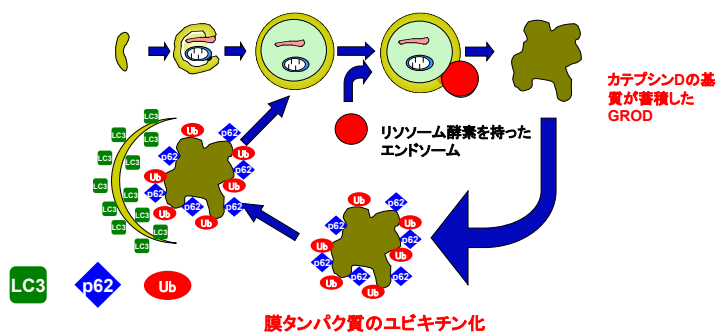


図 5

リソソームでの分解
オートファゴソーム(AP)への酵素の輸送

オートファゴソーム(AP)の形成
逆行性輸送
リソソーム(酸性コンパートメント)
は認められない

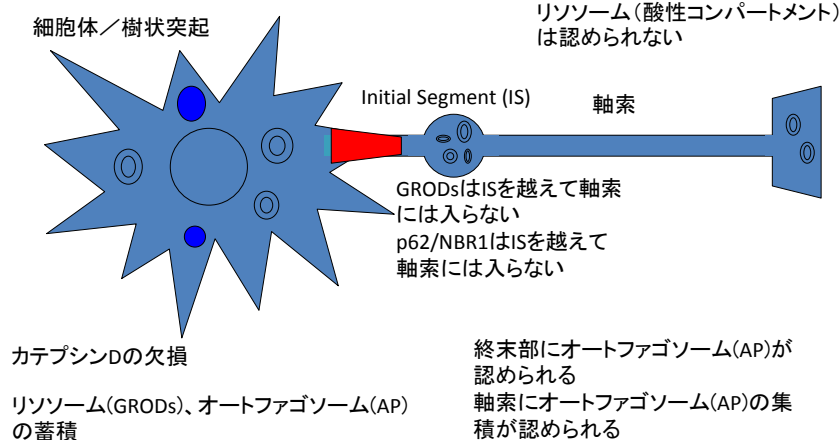


図 6

3. カテプシン D は神経性セロイドリポフスチン蓄積症 (NCL) のひとつである

私達は、リソソームの代表的なシステインプロテアーゼとして知られるカテプシン B や L、およびアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D (CD) の組織細胞における発現と機能的な役割をこれらプロテアーゼの欠損マウスを用いて解析した。特に、CD を欠損するマウスは、生後 2 週までは正常に成長するが、2 週を越えるとけいれん発作や小腸壊死により生後約 26 日で死に至る。私達は、CD 欠損マウスの脳を中心に解析した結果、NCL の病態像と類似し、granular osmiophilic deposits (GROD)、指紋様構造と AP が核周囲に蓄積することから、CD 欠損マウスは NCL のモデルマウスであり、新しいタイプのリソソーム蓄積症 (病) であることを明らかにした (図 4)⁷⁻¹⁰⁾。この GROD にはミトコンドリア性 ATP 合成酵素のサブユニット C を初め CD の基質が蓄積し、その結果、GROD は自家蛍光を発する。神経細胞の細胞体と樹状突起に認められる GROD の

20% は AP 中に見られることが分かった。即ち、GROD は強力なオートファジー誘導因子であることが示唆された (図 5)。蛍光染色により、GROD は AP のマーカーである LC3 陽性で、ユビキチンや p62/NBR1 と共存することを明らかにした。このことから、GROD の膜タンパク質がユビキチン化され、これに p62/NBR1 が結合して AP の隔離膜上の LC3 と結合することによって、GROD を AP 中に取り込むと予想された。これを実証するため、CD/p62/NBR1 の 3 者を欠損するマウスを作成して解析した結果、CD 欠損ニューロンの細胞体では、隔離膜で囲まれた GROD はほとんど認められないことが分かった。リソソームの研究は長期間かかったが、遺伝学的な手法を用いることで実証的な研究を進めることができた。

リソソーム蓄積症は様々な原因で発症する。これらの病態像としてユビキチン陽性であることが多いことを考えると、リソソームの蓄積にオートファジーが関与することが予想される。

4. さいごに

CD/p62/NBR1 のトリプル KO マウス脳には、p62/NBR1/ubiquitin 依存性の選択的なオートファジーは見られないが、非選択的な AP の形成は細胞体や軸索／軸索終末部でみとめられ、軸索にはこれらが蓄積した sheroïd 構造が見られる。この AP にはリソソームの酵素は認められず、また、リソソームの変形である GROD は軸索には認められない。即ち、軸索終末部で非選択的に形成される AP は、逆行性に軸索中を輸送され、細胞体でリソソーム酵素を持ったエンドソームと癒合して分解が始まる (図 6)。オートファジーが出来ないマウスでは、終末部で異常な膜系の蓄積が見られ、その後に細胞体に変性に陥ると報告されている。しかし、代謝活性の高い神経終末部で、どのような因子が働くことによって AP の形成がなされるのかは全く不明である。今後の解析が期待される。

参考文献

- 1) Uchiyama Y, Shibata M, Koike M, Yoshimura K, Sasaki M. Autophagy - Physiology and Pathophysiology. *Histochem Cell Biol* 129: 407-420, 2008
- 2) Uchiyama Y, Koike M, Shibata M, Sasaki M. Autophagic neuron death. *Methods in Enzymology* 453:33-51, 2009
- 3) Komatsu M, Koike M, Ichimura Y, Uchiyama Y. Genetic mouse models for elucidation of autophagy-lysosomal systems in neurons under physiologic and pathologic conditions. In Ed. Zhenyu yue, Charleen T Chu: *Autophagy of the nervous system – Cellular self-digestion in neurons and neurological diseases*. World Scientific, Chapter 8, pp175-204, 2012
- 4) Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169: 425-434, 2005
- 5) Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441: 880-884, 2006
- 6) Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131: 1149-1163, 2007
- 7) Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, Schulz-Schaeffer W, Watanabe T, Waguri S, Kametaka S, Shibata M, Yamamoto K, Kominami E, Peters C, Figura K, Uchiyama Y. Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J. Neurosci.* 20:6898-6906, 2000
- 8) Nakanishi H, Zhang J, Koike M, Nishioku T, Okamoto Y, Kominami E, Figura K.v, Peters C, Yamamoto K, Saftig P, Uchiyama Y. Involvement of nitric oxide released from microglia-macrophages in pathological changes of cathepsin D-deficient mice. *J. Neurosci.* 21: 7526-7533, 2001
- 9) Koike M, Shibata M, Ohsawa Y, Nakanishi H, Koga T, Kametaka S, Waguri S, Momoi T, Kominami E, Peters T, Figura K.v, Saftig P, Uchiyama Y. Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 22:146-161, 2003
- 10) Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow T, Peters C, Figura Kv, Mizushima N, Saftig P and Uchiyama Y. Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 167:1713-1728, 2005

この論文は、平成 26 年 7 月 5 日 (土) 第 20 回近畿老年期認知症研究会で発表された内容です。