

中枢神経系におけるリソソームタンパク質分解とその破綻

Proteolysis in lysosomes of neurons and its impairment

内山 安男(順天堂大学神経疾患病態構造学)



リソソームは広く生体の細胞に分布し、酸性条件下で高分子構造体をモノマーにまで分解するオルガネラである。このリソソームへの細胞内経路としてオートファジーがある。細胞内の不要な構成成分を隔離膜と呼ばれる小胞様の二重膜構造で、一般細胞質から隔離し(オートファゴソーム(AP)の形成)、この AP にリソソーム酵素を持った小胞が融合することで取り込んだ基質を分解する。近年、この AP 形成に必須な因子 (Atg) の哺乳類における同定が進み、遺伝学的な手法を交えた解析が可能となった。私達は、リソソームの中のプロテアーゼ、特にシステインプロテアーゼであるカテプシン B、L、H、C やアスパラギン酸プロテアーゼのカテプシン D (CD) に注目して解析を進めた。これらのプロテアーゼの分布をみると組織細胞によって発現するプロテアーゼは異なり、リソソームが非常に特異性の高い分解をしていることがわかった。そこでこれら酵素の役割を検討するため、CB、CL、CD をそれぞれ欠損する(KO)マウスの解析を行った。その結果、これらの酵素の KO マウスは、正常に生まれ CB と CL は生殖能力を有していることがわかった。しかし、CD-KO マウスは生後2週を越えると成長が止まり、約26日で小腸壊死とけいれんによって死に至ることが明らかにされた。CD-KO マウスはけいれん発作を呈することから同マウスの脳を検索したところ、ニューロンに CD の基質の溜まった異常なリソソームやオートファゴソーム、あるいは多層化した膜構造(指紋様構造)が核周囲に蓄積すること、網膜の形成が終わると直ぐにフォトレセプター層が消失して失明すること、さらにはプロテオリピッドの主たる物質であるミトコンドリアの ATP 合成酵素のサブユニット C がリソソームに蓄積すること(自家蛍光を発する)が明らかとなり、神経性セロイド蓄積症と類似の症状を呈することがわかった。その後、人でも CD の活性をほとんど持たない症例が見つかり、CD は第10番目の原因遺伝子として登録された (CLN10)。CD-KO 脳で最も神経変性が早く起こる視床で解析すると、ミクログリアに iNOS 活性が誘導され、NO を産生するため周辺の神経細胞がネクローシスに陥ることがわかった。同様の変化は、網膜ミクログリアでも起こり、その薄層化に NO 産生が関与することも明らかとなった。

CD-KO ニューロンを解析すると、異常なリソソームを取り込んだ AP が認められた。この機構を解析するため、私達は CD のコンディショナル KO マウスを作り、脳特異的な CD-KO マウスを作成し、脳特異的な Atg7-KO マウスと交配して、両者を欠損するマウスを得た。両者を欠損するニューロンでは、AP が消失し、CB 陽性のリソソームも有意に減少した。私達は、異常なリソソームを AP で積極的に処理すると考え、選択的オートファジーに関わる p62 と NBR1 とユビキチンの解析を免疫電顕法で検討した。その結果、p62 と NBR1 あるいはユビキチンはリソソームの膜上に共局在することがわかった。即ち、CD 欠損ニューロンに見られる異常リソソームの AP への取り込みは、p62 と NBR1 依存性であることが明らかとなった。さらに、これらの検索を進める中で、p62/NBR1 は神経細胞の核周囲と樹状突起には局在するが、軸索には局在しないこと、p62 と NBR1 はオリゴマーを形成し、不溶性画分にくること、これらタンパク質の C 末端の特異な領域を除去すると可溶性となり、軸索にも局在することがわかった。即ち、細胞体と異なり、神経終末で起こるオートファジーは非選択的で、形成された AP を逆行性に輸送して、細胞体で分解すと考えられた。

私達は、Atg7 に加えて Atg9 の解析も行っているが、Atg7 と異なり Atg9 は Atg タンパク質の中で唯一の膜タンパク質で、AP 形成の初期に働く。この Atg9 の機能と局在を解析するため Atg9 のコンディショナル KO マウスとノックインマウスを作成し、脳で解析を進めている。Atg9-KO マウス脳は Atg7-KO マウス脳に比べて、オートファジー以外の明瞭な表現型も見られることがわかった。これらの所見を含め、中枢神経系におけるオートファジーとリソソームによるタンパク質分解とその破綻について発表する。