

91. リソソーム膜蛋白 p18 欠損による髄鞘形成不全の機構

小池 正人

順天堂大学 大学院医学研究科 神経機能構造学講座

Key words : mTORC1, LAMTOR1, リソソーム, オリゴデンドロサイト, 神経幹細胞

緒 言

後期エンドソームおよびリソソームに特異的に局在する分子量 18 kDa のタンパク質 p18 は細胞内シグナル伝達系の 1 つの mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を後期エンドソーム/リソソームにリクルートするために必須の足場として機能分子として同定された^{1,2)} が、その後、mTORC1 (mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1) の活性化に関わる Rag GTPase の足場としても機能することが明らかとなり、現在 p18 は LAMTOR1 (late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1) と呼ばれている³⁾。細胞内の特定のコンパートメントを経由するこれらシグナル伝達系の *in vitro* レベルの解析は急速に進んでいるが、*in vivo* レベルの臓器細胞における役割については不明である。そこで、中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 遺伝子欠損マウスを作製し、脳組織における p18/LAMTOR1 の役割についての検討を試みた。

方法および結果

1. 中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 欠損マウスの作製

LAMTOR1 コンディショナルノックアウト (*LAMTOR1^{fllox/fllox}*) マウス⁴⁾ と Nestin-*Cre* トランスジェニックマウスを交配し、中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 遺伝子欠損 (*LAMTOR1^{fllox/fllox}; Nestin-Cre*) マウス (以下 *LAMTOR1* cKO マウスと標記) を得た。全ての実験において対照群として *LAMTOR1^{fllox/fllox}* マウスを用いた。

LAMTOR1 cKO マウスは生後 14 日前後で致死となることが判明した。出生時には外見上の大きな差は認められなかったが、体重が対照群より軽い傾向が認められた。生後 14 日の時点では *LAMTOR1* cKO マウスは対照群より明らかに小さく (図 1A)、対照群の約 3 分の 2 程度の体重であった (図 1B)。同マウスは生後 10 日以降で、動きが鈍くなり、歩行時に振戦を伴い、しばしば転倒を認めた。生後 14 日の *LAMTOR1* cKO マウスの脳は対照群より小さい傾向を示した (図 1C)。

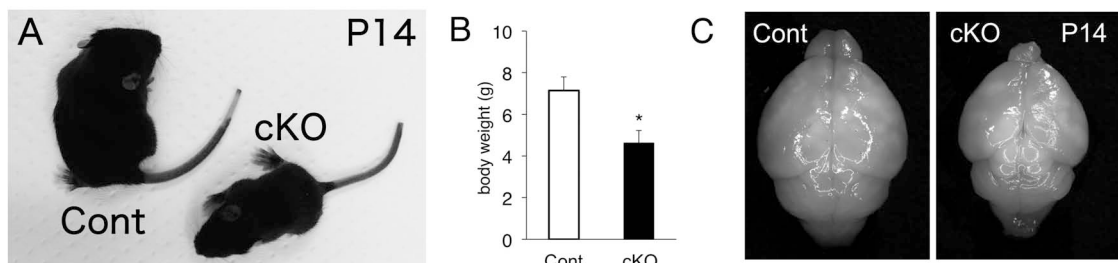


図 1. 中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 欠損マウスの作製

(A) 生後 14 日齢の対照群 (Cont) と *LAMTOR1* cKO マウス (A)。(B) 生後 14 日齢の対照群と *LAMTOR1* cKO マウスの体重の比較 (Student's t test, *p < 0.01)。(C) 生後 14 日齢の対照群と *LAMTOR1* cKO マウスの脳。

2. 中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 欠損マウス脳組織の形態学的解析

脳組織の形態学的解析を行うため、14 日齢の対照群および *LAMTOR1* cKO マウスを 4 %パラホルムアルデヒド（光学顕微鏡観察用）ないし 2 %パラホルムアルデヒド-2 %グルタルアルデヒド（電子顕微鏡観察用）溶液で灌流固定を行い、脳組織を取り出し、パラフィン切片、凍結切片、電顕超薄切片を作製した。ヘマトキシリン-エオジン染色では、*LAMTOR1* cKO マウスにおいて大脳皮質の薄層化を認めた（図 2A）。一方、アストロサイト、ミクログリアの動態をそれぞれのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) および ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) に対する抗体を用いた免疫組織化学における染色性は両群で変わらず（図 2B）、神経変性の徴候としてのグリオシスは否定的であった。

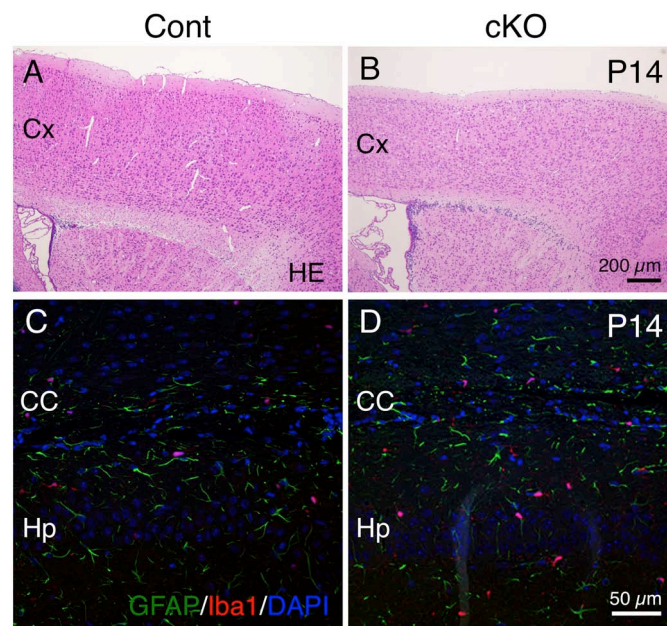


図 2. 中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 欠損マウス脳組織の形態学的解析

14 日齢 (P14) の対照群 (Cont) (A、C) および *LAMTOR1* cKO マウス (B、D) 脳組織のヘマトキシリン-エオジン染色 (HE)、および GFAP (緑)、Iba1 (赤)、DAPI (青；核染) の三重染色像。(A、B) HE 染色では *LAMTOR1* cKO マウスの大脳皮質 (Cx) の薄層化が観察された。(C、D) 両マウスにおける GFAP、Iba1 の染色性に変化は認めなかった。CC: 脳梁、Hp: 海馬。

LAMTOR1 cKO マウスが死に至る生後 14 日は、正常マウスにとって髄鞘化のピークの時期に相当する。そこで、両群における髄鞘化の程度の差異を明らかにするために、成熟オリゴデンドロサイトの髄鞘のマーカーである myelin basic protein (MBP) に対する抗体を用いて免疫組織化学を行った。その結果、*LAMTOR1* cKO マウスにおいては、脊髄を含む中枢神経系全体にわたり、MBP の免疫陽性反応を認めなかった（図 3A）。更に、脊髄の後索と小脳髄質において電子顕微鏡観察を行ったところ、観察した限り全ての神経線維が髄鞘を持たないものであった（図 3B）。以上の結果より、*LAMTOR1* cKO マウスにおける髄鞘化が中枢神経系全体で阻害され、その結果同マウスでは白質が完全に認められないことが明らかとなった。

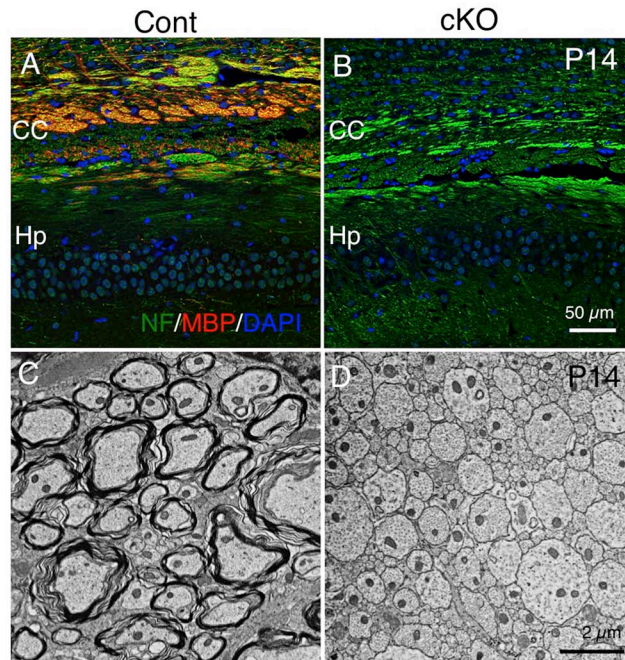


図 3. 中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 欠損マウス脳における髄鞘化の阻害

(A、B) 14 日齢 (P14) の対照群 (Cont) (A) および *LAMTOR1* cKO マウス (B) 脳梁 (CC) におけるニューロフィラメント (NF) (緑)、MBP (赤)、DAPI (青；核染) の三重染色像。*LAMTOR1* cKO マウスでは MBP の免疫陽性反応を全く認めなかった。Hp: 海馬。(C、D) 14 日齢 (P14) の対照群 (C) および *LAMTOR1* cKO マウス (D) 脊髄後索の電子顕微鏡像。*LAMTOR1* cKO マウスでは有髄線維が全く観察されなかった。

3. 中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 欠損マウス脳におけるオリゴデンドロサイトの分化不全

LAMTOR1 cKO マウス脳では神経変性を伴わない髄鞘化の阻害を認めたため、同マウスでは脱髄の亢進ではなく、オリゴデンドロサイトへの分化そのものが阻害されていると推察した。そこでオリゴデンドロサイトの分化の各段階のマーカーについて生化学的および組織化学的解析を行った。対照群のマウスでは生後 4 日齢の時点で検出されなかった成熟オリゴデンドロサイトのマーカーである MBP および myelin proteolipid protein (PLP) タンパク質が、髄鞘形成のピークである生後 14 日齢では豊富に検出された。より未熟なオリゴデンドロサイトに発現する 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) についても 4 日齢から 14 日齢で顕著に増加した。一方、*LAMTOR1* cKO マウス脳では 14 日齢においても MBP と PLP は全く検出されず、CNPase の増加も認められなかった。しかし、オリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーである Oligodendrocyte transcription factor (Olig2) は両群で検出された (図 4A)。しかしながら、*LAMTOR1* cKO マウス小脳髄質における免疫組織化学では、Olig1/2 陽性細胞の数は対照群と比べてにはるかに少なかった (図 4B、C)。以上の結果は *LAMTOR1* cKO マウス脳では Olig1/2 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞からの分化が阻害されていることを強く示唆した。

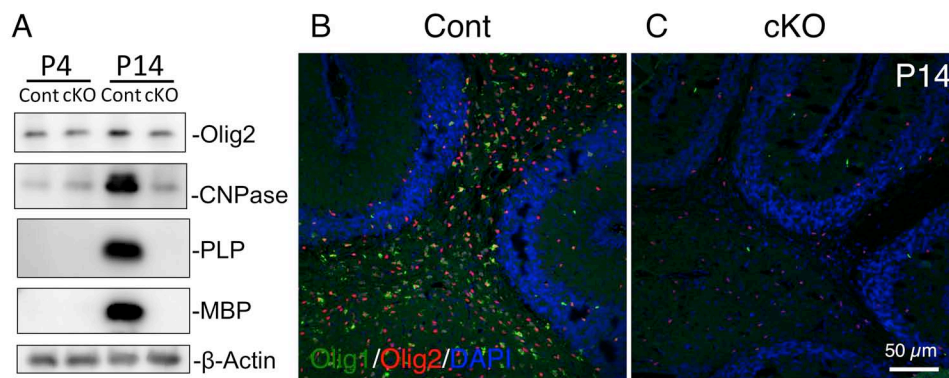


図4. 中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 欠損マウス脳組織におけるオリゴデンドロサイトの分化不全

(A) 生後4日齢 (P4)、14日齢 (P14) の対照群 (Cont) および *LAMTOR1* cKO マウス由来脳組織抽出液について、各種オリゴデンドロサイトの分化マーカーの発現をウエスタンブロッティングにより解析した。(B、C) 生後14日齢の対照群および *LAMTOR1* cKO マウスの小脳髄質における Olig1 (緑)、Olig2 (赤) 陽性細胞の分布 (青は DAPI (核染色))。

4. 中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 欠損マウス脳における mTORC1 活性の低下

これまでに *LAMTOR1* は MEK (MAPK/ERK kinase) と結合すること、および mTORC1 の活性化に関わる Rag GTPase のリクルートすることにより、MAP キナーゼ経路と mTORC1 経路の制御に関与することが *in vitro* の系で示されている¹⁻³⁾。そこで生後4日齢と14日齢の両群の脳組織を用いて mTORC1 および MAP キナーゼ経路の主要な分子である S6 キナーゼ (S6K) および MEK のリン酸化状態を比較した。両群において、S6K および MEK の全体量については変化を認めなかった。*LAMTOR1* cKO マウス脳においてリン酸化 S6K (pS6K) の減少を認めたが、MEK のリン酸化の程度に変化はなかった (図5)。以上は、出生後の脳組織における *LAMTOR1* は mTORC1 の活性化に関与することを示唆した。

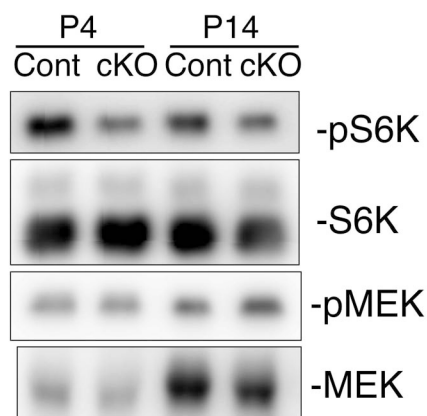


図5. 中枢神経系特異的 *LAMTOR1* 欠損マウス脳における mTORC1 経路と MAP キナーゼ経路の動態

生後4日齢 (P4)、14日齢 (P14) の対照群 (Cont) および *LAMTOR1* cKO マウス由来脳組織抽出液について、mTORC1 経路および MAP キナーゼ経路の主要な分子である S6K、MEK の発現量やリン酸化状態をウエスタンブロッティングにより解析した。

考 察

中枢神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトはいずれも神経幹細胞から分化成熟する。本研究で用いた Nestin-Cre マウスは神経幹細胞において Cre リコンビナーゼを発現することから、リソソーム膜タンパク質 p18/LAMTOR1 が上記3系統のうちオリゴデンドロサイト分化成熟に必須な役割を有することが強く示唆された。

in vitro では LAMTOR1 は MAP キナーゼ経路および mTORC1 経路の制御に関与するアダプタータンパク質と考えられている。本研究により生後の脳組織においても LAMTOR1 が mTORC1 経路の活性化に関与することが示されたが、MAP キナーゼ経路との関連性は認められなかった。今後、LAMTOR1 cKO マウスの脳組織の発生段階における MAP キナーゼ経路および mTORC1 経路の活性化を対照群と比較や LAMTOR1 cKO マウス由来の神経幹細胞を用いた *in vitro* における分化実験などにより、オリゴデンドロサイト分化成熟における上記シグナル経路の関与をより直接的に示すことが必要と考えている。

mTOR は、過栄養や成長因子により活性が上昇し、細胞増殖や代謝機構を調節するセリン/スレオニンキナーゼである。mTOR はラパマイシンにより抑制される mTORC1 とラパマイシン非依存的な mTORC2 という2種類の巨大複合体を形成し、それぞれ異なる機能を有する。近年、オリゴデンドロサイト分化成熟における mTORC1 の役割に関する論文が散見され始めたが、オリゴデンドロサイトの分化後に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを用いた研究がほとんどで、初期のオリゴデンドロサイトの分化における mTORC1 の役割については不明な点が多い。mTORC1 の活性化に関与する低分子量 GTP 結合タンパク質 Rheb1 (Ras homolog enriched in brain 1) については Nestin-Cre マウスと交配して作製した脳特異的欠損マウスにおける髄鞘化の阻害が明らかにされている⁵⁾。しかし、LAMTOR1 cKO マウスと比較すると、このマウスでは有髄線維は一定の割合で残存しており、寿命も生後6週とはるかに長い。そのことから、オリゴデンドロサイトの分化における LAMTOR1 の役割は mTORC1 の活性化にとどまらず、LAMTOR1 のもつ他の役割も関与していることが推察され、それを明らかにするためにも *in vitro* における分化実験が必要と考え、現在その系の立ち上げを行っている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、順天堂大学大学院医学研究科神経機能構造学講座の砂堀毅彦博士、大阪大学微生物病研究所発癌制御研究分野の岡田雅人博士および名田茂之博士である。最後に、本研究にご支援をいただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nada S, Hondo A, Kasai A, Koike M, Saito K, Uchiyama Y, Okada M. The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. EMBO J. 2009;28(5):477-89. doi: 10.1038/emboj.2008.308. PMID: 19177150.
- 2) Nada S, Mori S, Takahashi Y, Okada M. p18/LAMTOR1: a late endosome/lysosome-specific anchor protein for the mTORC1/MAPK signaling pathway. Methods Enzymol. 2014;535:249-63. doi: 10.1016/B978-0-12-397925-4.00015-8. PMID: 24377928.
- 3) Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. Cell. 2010;141(2):290-303. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.024. PMID: 20381137.
- 4) Soma-Nagae T, Nada S, Kitagawa M, Takahashi Y, Mori S, Oneyama C, Okada M. The lysosomal signaling anchor p18/LAMTOR1 controls epidermal development by regulating lysosome-mediated catabolic processes. J Cell Sci. 2013;126(Pt 16):3575-84. doi: 10.1242/jcs.121913. PMID: 23781028.
- 5) Zou J, Zhou L, Du XX, Ji Y, Xu J, Tian J, Jiang W, Zou Y, Yu S, Gan L, Luo M, Yang Q, Cui Y, Yang W, Xia X, Chen M, Zhao X, Shen Y, Chen PY, Worley PF, Xiao B. Rheb1 is required for mTORC1 and myelination in postnatal brain development. Dev Cell. 2011;20(1):97-108. doi: 10.1016/j.devcel.2010.11.020. PMID: 21238928.