

Establishment of a novel method to evaluate chaperone-mediated autophagy and microautophagy activities and elucidation of their roles in neurological diseases

Department of Chemico-Pharmacological Sciences,
Graduate School of Pharmaceutical Science, Kumamoto University
Sato Masahiro

In many neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease, accumulation of mutant or misfolded proteins is frequently and commonly observed in affected neurons. Age-related decline of protein degradation system would cause this accumulation. There are two major intracellular protein degradation system: the ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagy-lysosome system. The latter is further classified into macroautophagy (MA), microautophagy (mA) and chaperone-mediated autophagy (CMA). Many researches have revealed that UPS and MA are involved in various physiological functions and pathogenesis of various diseases. It remains unknown how CMA and mA are related to them. However, (1) approximately 30% of cytoplasmic proteins are degraded via CMA, (2) CMA exists only in mammalian cells, but not in yeasts and bacterias, and (3) CMA is activated by oxidative stress. Therefore, it is possible that CMA is essential for maintaining the homeostasis of mammalian cells by degrading oxidated or misfolded proteins. Interestingly, CMA mediates the degradation of α -synuclein, which is accumulated in Parkinson's disease, and huntingtin, whose mutation triggers Huntington's disease. Therefore, impairment of CMA might be responsible for the pathogenesis of. Recently, it is revealed that Hsc70, which is involved in CMA, also plays a fundamental role in mammalian mA. has similar pathway via Hsc70 as well as CMA, mA may be involved in maintaining homeostasis of intracellular proteins and disease pathogenesis. In the present study, I aimed to establish a novel method to assess CMA and mA activities to elucidate the involvement of CMA/mA activity in neurological diseases.

1. Establishment of a novel method to evaluate chaperone-mediated autophagy and microautophagy activities

The absence of easy methods to assess CMA and mA activities hampered the progression of studies about CMA and mA. I attempted to establish a novel method to assess CMA and mA activities in cultured cells. I focused on GAPDH, which is recognized by Hsc70 and degraded via both CMA and mA, and utilized GAPDH fused with HaloTag (GAPDH-HT) as an activity marker for CMA/mA. When cells expressing GAPDH-HT were treated with HT ligand with a fluorescent dye, only cytosolic GAPDH-HT was labeled. Thereafter, cytosolic GAPDH-HT was transported and accumulated to lysosomes or late endosomes via CMA and mA. I assumed this punctate accumulation of GAPDH-HT reflects CMA/mA activity. Then, I attempted to assess CMA and mA activities separately by the knockdown of mA- and CMA-related proteins, respectively. siRNA-mediated knockdown of LAMP2A, a CMA-related protein, and TSG101, a mA-related protein, significantly, but partly, decreased the punctate accumulation of GAPDH-HT. Chemicals that are reported to selectively activate CMA and mA did not increase the number of GAPDH-HT puncta under LAMP2A and TSG101 knockdown, respectively. These results suggest that punctate accumulation of GAPDH-HT represents mA activity under LAMP2A knockdown and CMA activity under TSG101 knockdown.

2. Effects of glucocorticoids on chaperone-mediated autophagy and microautophagy activities

Glucocorticoids are secreted from the adrenal cortex, are upregulated by stress and regulate stress responses. However, the persistent elevation of glucocorticoids by chronic stress affects neural activities in the central nervous system, leading to mental disorders such as depression. In addition, a recent report revealed that the autophagy-lysosome system is disrupted in patients of mental disorders, suggesting that protein degradation system has an important role in the pathogenesis of psychiatric disorders. In the present study, I investigated the effect of dexamethasone (DEX), a potent agonist of glucocorticoid receptor, on CMA/mA activities in AD293 cells and primary cultured neurons from rat cerebral cortex. DEX significantly decreased both CMA and mA activities in AD293 cells and primary cultured cortical neurons. This reduction was diminished by the pretreatment of RU-486, a glucocorticoid receptor antagonist. Moreover, cortisol and corticosterone, endogenous glucocorticoids, also decreased CMA/mA activity in AD293 cells and cortical neurons, respectively. These findings suggest that the activation of glucocorticoid receptor negatively regulates both CMA and mA activities.

3. Effect of CMA and mA impairment in cerebellar neurons on the motor function of mice.

My laboratory has revealed that CMA/mA activity is commonly impaired by several causal proteins causing spinocerebellar ataxia (SCA), an autosomal dominant neurodegenerative disorder. Therefore, I assumed that the decrease in CMA/mA activity of cerebellar neurons would cause the motor dysfunction, a characteristic symptom of SCA. To validate this hypothesis, I administered adeno-associated viral (AAV) vectors to express both GFP and miRNA against LAMP2A or TSG101 in a neuron-specific manner to the cerebellar parenchyma of mice. Beam walking test revealed that LAMP2A knockdown in cerebellar neurons significantly impaired motor performances of mice 8 and 12 weeks after AAV administration. On the other hand, TSG101 knockdown did not affect motor function. Histological analyses revealed that GFP-positive neurons were mainly granule cells and interneurons in the molecular layer, but were not Purkinje cells. However, severe degeneration of cerebellar Purkinje cells, granule cells and interneurons were observed in cerebellar sections of mice expressing LAMP2A miRNA 12 weeks after AAV administration. These results indicate that the miRNA-mediated decrease in CMA activity causes neurodegeneration of cerebellar neurons, leading to motor dysfunction.

In the present study, I first established a novel method to evaluate CMA/mA activity and clarified the involvement of glucocorticoid in the regulation of CMA/mA, using this novel method. In addition, I revealed that motor dysfunction of mice is caused by the decrease in CMA activity via miRNA-mediated knockdown of LAMP2A. These findings suggest that the decrease in CMA/mA activity may contribute to the pathogenesis of neurological disorders such as depression and SCA.

シャペロン介在性オートファジー及びマイクロオートファジー活性評価法の確立と 神経疾患における役割の解明

創薬・生命薬科学専攻 薬物活性学分野 佐藤 正寛

アルツハイマー病やパーキンソン病など多くの神経変性疾患では、神経細胞内に異常タンパク質が蓄積し、封入体を形成するという現象が共通に観察される。この封入体はユビキチン陽性であり本来分解されるべきタンパク質が蓄積した結果生じるものと考えられ、加齢に伴う細胞内タンパク質分解系の機能低下がその原因の一つとされている。また、異常タンパク質の蓄積が細胞内タンパク質分解系のさらなる障害を引き起こすことで、神経変性疾患は進行していく。細胞内タンパク質分解系はユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) とオートファジー・リソソーム系に大別されており、後者はさらに、マクロオートファジー (MA)、マイクロオートファジー (mA) 及びシャペロン介在性オートファジー (CMA) に分類されている。このうち UPS と MA は関連する分子や活性制御機構、生理機能、疾患発症への関与が明らかとなったものの、mA 及び CMA に関しては一部関連する分子が解明されたのみで、生理機能における役割はほとんどわかっていない。しかし、① CMA の標的となるタンパク質は細胞質タンパク質の約 30% を占める、② CMA はほかの分解系とは異なり哺乳細胞でのみ存在する、③酸化ストレスにより活性化され、酸化を受けたタンパク質の分解に関与する点から、CMA は哺乳細胞の恒常性維持に不可欠と考えられている。興味深いことに、パーキンソン病やハンチントン病の原因タンパク質である α -synuclein や huntingtin が CMA により分解されることから、CMA の疾患への重要な関与がうかがえる。また、哺乳細胞における mA の報告は極めて少ないが、CMA と同様に分子シャペロンである Hsc70 が標的タンパク質を輸送することから、mA も細胞内タンパク質の恒常性維持や疾患発症に関与する可能性は高く、これらのタンパク質分解経路は新たな創薬ターゲットになると期待される。そこで CMA 及び mA 活性と神経疾患との関連を解明するために以下の 3 点について検討を行った。

1. 蛍光観察によるシャペロン介在性オートファジー及びマイクロオートファジー新規活性評価法の確立

これまでのオートファジー・リソソーム系における研究は MA が主であり CMA, mA に関する研究は少ない。その理由は、MA は関連分子 LC3-II を用いた活性評価系が確立されているのに対し、CMA 及び mA は簡便な活性評価系がないためである。そこで私は CMA 及び mA 新規活性評価法を確立するため、両者に共通に関与する Hsc70 に認識される GAPDH に着目し、GAPDH と HaloTag との融合タンパク質 (GAPDH-HT) を CMA/mA の活性マーカーとした。GAPDH-HT を発現する細胞に蛍光色素が付加した HT ligand を処置すると細胞質に存在する GAPDH-HT のみが蛍光標識される。蛍光標識後培養することで GAPDH-HT は CMA, mA を介してリソソームまたは後期エンドソームへと移行すると想定した。実際に HT ligand 処置 18 時間後において GAPDH-HT は dot 状に集積し、その dot は後期エンドソーム及びリソソームマーカーと共局在した。また、CMA 関連タンパク質である LAMP2A 及び mA 関連タンパク質である TSG101 をノックダウンし、1 細胞あたりの GAPDH-HT の dot 数を定量化したところ、それぞれ部分的な減少が認められた。さらに、CMA 及び mA を選択的に活性化する化合物は、それぞれ LAMP2A 及び TSG101 ノックダウン下では GAPDH-HT の dot 数を増大させなかった。以上の結果より、GAPDH-HT の dot 状集積は LAMP2A ノックダウン下では mA 活性を、TSG101 ノックダウン下では CMA 活性を反映することが明らかになった。

2. グルココルチコイドがシャペロン介在性オートファジー及びマイクロオートファジー活性に及ぼす影響

グルココルチコイドは副腎皮質から放出され、生体内において糖、脂質の代謝や免疫応答などを調節する重要なホルモンである。またグルココルチコイドはストレス負荷により分泌が亢進しストレス応答を制御するが、慢性的なストレスによるグルココルチコイドの増加は脳において様々な機能障害を引き起こし、うつ病などの精神疾患に繋がる。さらに近年、精神疾患患者においてタンパク質分解系の一つであるオートファジー・リソソーム系が破綻していることが報告され、精神疾患発症におけるタンパク質分解系の機能低下の重要な関与が示唆されている。本研究では上述の評価法を用いて、グルココルチコイドが CMA/mA 活性に及ぼす影響を解析した。初代培養神経細胞及び AD293 細胞において、グルココルチコイド受容体作動薬である dexamethasone の処置により GAPDH-HT の dot 状集積は有意に減少した。またこの減少はグルココルチコイド受容体アンタゴニストである RU-486 処置により有意に抑制された。siRNA を用いた解析により、dexamethasone は CMA 及び mA のどちらの活性も低下させることが明らかとなった。さらにグルココルチコイド受容体に作用する内因性のリガンドである cortisol, corticosterone においても同様の結果が得られた。以上より、グルココルチコイド受容体の活性化は CMA/mA 活性を低下させることが明らかになった。

3. 小脳神経細胞における CMA 及び mA の活性低下がマウス運動機能へ及ぼす影響

私の所属する研究室では、神経変性疾患の一つである脊髄小脳失調症 (SCA) のいくつかの原因タンパク質発現細胞において、CMA/mA 活性が共通に低下することを解明した。そこで、CMA もしくは mA 活性低下が SCA で観察される運動障害に繋がるのではないかと想定し、小脳神経細胞における LAMP2A または TSG101 のノックダウンを介した CMA もしくは mA の活性低下がマウス運動機能に影響するか検討した。神経細胞特異的なプロモーター下で GFP 及び miRNA を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターを 4 週齢のマウスの小脳実質に投与することで、小脳神経細胞特異的に LAMP2A もしくは TSG101 をノックダウンさせた。Beam walking test によりマウス運動機能を評価したところ、ウイルス投与 4 週目以降で LAMP2A ノックダウン群において顕著な運動機能障害が観察されたが、TSG101 ノックダウン群は運動機能に変化はなかった。ウイルス投与 12 週後のマウスから小脳冠状切片を作製し、組織学的解析を行ったところ、GFP 陽性神経細胞は主に分子層の介在ニューロンと顆粒細胞であり、Purkinje 細胞への発現は観察されなかった。しかし、GFP 陽性神経細胞の周囲では、Purkinje 細胞の減少と分子層及び顆粒細胞層の縮小が観察された。以上の結果より、小脳神経細胞における CMA 活性の低下は Purkinje 細胞を変性させることで運動機能を低下させることが明らかとなった。

上述の様に、本研究ではまず CMA 及び mA の新規活性評価法を確立し、この評価法を用いてストレス関連因子であるグルココルチコイドと CMA/mA 活性の関与を明らかにした。さらには、LAMP2A ノックダウンを介した小脳神経細胞特異的な CMA 活性低下は運動機能の低下を引き起こすことを明らかにした。本研究は加齢などによる CMA, mA 活性の低下がうつ病などの精神疾患や SCA 等の神経変性疾患発症の一端に関与する可能性を示した重要な知見である。