

視床下部におけるペルオキシソームの代謝ストレス応答

神戸大学大学院医学研究科病態シグナル学

杉浦 歩

<背景>

ペルオキシソームは真核生物のほぼ全ての細胞に存在する脂質二重膜に囲まれたオルガネラである。細胞内代謝の中心的な役割を担い、細胞内・外の環境に応じ数や形、局在を変化させながら細胞内を動的に動き回る。機能と動態は相互に制御されており、代謝装置としての正常な機能を発揮するためにはその動態が重要である。

視床下部は食事や睡眠、性行動など個体の恒常性調節の中樞である。視床下部の第三脳室に面した側壁は、上衣細胞やタニサイトと呼ばれるグリア様の細胞で構成されている。タニサイトは栄養素の感知に加え、自己増殖能や神経細胞への分化能といった神経幹細胞様の機能を持ち、視床下部の機能維持や調節において重要な役割を担っている。

本研究課題はタニサイトに着目し、視床下部の代謝ストレス応答に果たすペルオキシソームダイナミクスの役割と作用機構の解明を試みた。

<実験方法>

本研究課題では 1) *in vivo*、2) *in vitro* モデルのタニサイトにおけるペルオキシソームを以下の様に解析した。

- 1) コントロール食、高脂肪食摂餌マウスより脳凍結切片を作製し、ペルオキシソームを免疫蛍光染色法などにより解析した。
- 2) タニサイトを単離培養し、種々の条件下におけるペルオキシソームを免疫蛍光染色法などにより解析した。

<結果>

視床下部タニサイトにおけるペルオキシソームの解析

これまでに視床下部のペルオキシソームダイナミクスに着目した報告はほとんどなく、タニサイトについては全くの未知である。本研究課題ではまず、生体内タニサイトにおけるペルオキシソームの基本的な分布や形態を解析した。C57BL/6 マウスより作製した脳凍結切片をペルオキシソーム膜タンパク質である PMP70 に対する抗体で免疫蛍光染色し、構造化照明顕微鏡で局在や形態を観察した (図 1A)。PMP70 陽性のペルオキシソームは脳内全域で広く分布しており、視床下部では Nestin で標識されるタニサイトでも同様に存在し、細胞体から突起まで広く分布していた (図 1A、矢頭)。ペルオキシソームを複数のマーカーで染色すると、各マーカーの染色性が異なることから、単一細胞内にペルオキシソームの亜集団が存在することが知られている¹⁾。本研究においても 2 種類の異なるペルオキシソーム膜タンパク質、PMP70 と Pex14 に対する抗体で多重染色を行ったところ、大部分は完全な共局在を示すが、一部で染色の不均一性が観察された (図 1B、矢頭)。このことからタニサイトにおいても、ペルオキシソームの亜集団が存在していることが示された。

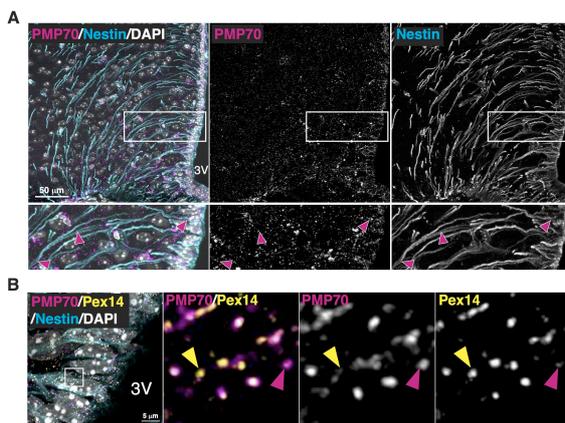


図 1 視床下部タニサイトにおけるペルオキシソーム
脳凍結切片を抗 PMP70、抗 Pex14(ともにペルオキシソーム膜タンパク質)、抗 Nestin 抗体(タニサイトマーカー)で免疫蛍光染色した。
A. 視床下部におけるペルオキシソーム。拡大図はタニサイトにおけるペルオキシソーム。矢頭は細胞体、突起内のペルオキシソームを示す。
B. タニサイトにおけるペルオキシソームの亜集団。矢頭は PMP70 リッチ(赤紫)、PEX14 リッチ(黄)なペルオキシソームを示す。3V: 第三脳室。

高脂肪食摂餌下における視床下部ペルオキシソームの解析

視床下部は摂食調節の中樞である。げっ歯類などを使った研究で高脂肪食摂餌下における視床下部タニサイトの変化が多数報告されており、その影響は短期間と長期間で異なる。短期間（4 週間）ではタニサイトの増殖が促され²⁾、長期間（8~16 週間）では逆に抑制される³⁾。本研究では、高脂肪食を様々な期間摂餌したマウスの視床下部ペルオキシソームの解析を行った。

高脂肪食摂餌 1, 2, 4 ヶ月のマウスから脳凍結切片を作製し、抗 PMP70 抗体による染色を行ったが、視床下部において、タニサイトも含めペルオキシソームの数や形態に顕著な変化は観察されなかった。酸化ストレスなどで傷害を受けたペルオキシソームはペルオキシソーム特異的オートファジー（ペキソファジー）で分解される。高脂肪食摂餌による酸化ストレスの亢進も報告されているので、ペルオキシソームの分解を検討するために、p62/SQSTM1 と PMP70 の共染色を行った。p62 は選択的オートファジーにおいて、ユビキチン化された基質とオートファゴソームのアダプタータンパク質で、ペキソファジーの過程でペルオキシソームへの集積が観察される。短期間の摂餌では変化は観察されなかったが、16 週間高脂肪食を摂餌したマウスでは p62 の点状のシグナルが多く観察され、その一部が PMP70 と共局在を示した（図 2A、矢頭）。さらに、この共局在はタニサイトマーカーである Nestin 陽性の細胞で観察された。一方、p62 やペルオキシソームタンパク質量の変化は視床下部全域より調製したホモジネートを用いたウェスタンブロッティングでは観察されなかった（図 2B）。これらの結果は PMP70 と p62 の共局在は視床下部全体の応答ではなく、タニサイトなど一部の細胞の応答であることを示唆している。高脂肪食摂餌下においてオートファジーが抑制されることも報告されていることから⁴⁾、PMP70 と p62 の共局在はオートファジーの過程が抑制された結果である可能性もあるが、ペキソファジーが亢進・抑制されたかを結論づけるためには、さらなる実験が必要である。

タニサイト初代培養法の確立とペルオキシソームの解析

視床下部は神経細胞やグリア細胞に加えタニサイトなど様々な細胞が密に存在し、それぞれが突起を伸ばしているので、ペルオキシソームとその由来する細胞を組織切片上で特定することや、組織試料を用いた生化学的な解析から特定の細胞の応答を解析することは困難である。より詳細なタニサイトにおけるペルオキシソームの解析を行うために、タニサイトの初代培養法を確立した。初代培養タニサイトを用いて免疫蛍光染色を行ったところ、組織切片と同様にペルオキシソームは細胞体と突起内に点在していた（図 3）。さらに、他の細胞と突起先端部で接触し、そこにペルオキシソームが集積していることが観察された（図 3、拡大図右）。生体内においてタニサイトは血管や神経細胞と接触し、代謝物やシグナルの交換を行っている。これらの観察結果はペルオキシソームがタニサイトと他細胞間における物質の交換や局所的な代謝に関与していることを示唆している。

タニサイトは第三脳室中の脳脊髄液成分を感知し応答することにより個体恒常性維持に機能している。高脂肪食が脳脊髄液に及ぼす変化の一つに遊離脂肪酸であるパルミチン酸の濃度が上昇し、代謝障害や小胞体ストレス、炎症などの細胞毒性を発揮することが報告されているが⁴⁾⁵⁾、タニサイトに対する作用は不明であ

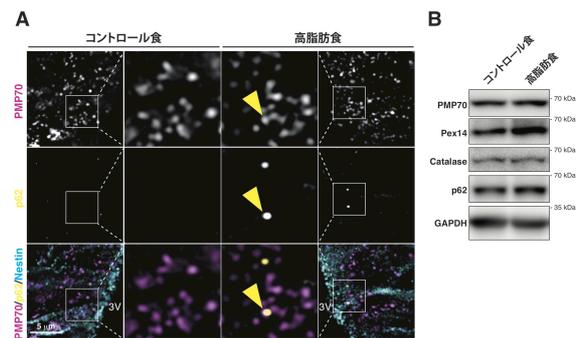


図 2 高脂肪食摂餌下のタニサイトにおけるペルオキシソーム
A. コントロール食、高脂肪食を 16 週間摂餌したマウスの脳凍結切片を抗 PMP70、抗 p62、抗 Nestin 抗体で免疫蛍光染色した。矢頭は PMP70 と p62 の共局在を示す。3V: 第三脳室。
B. 視床下部のホモジネート 5 μ g を上記に示す抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析。PMP70、Pex14: ペルオキシソーム膜タンパク質。Catalase: ペルオキシソーム内腔タンパク質。p62: ペキソファジーマーカー。GAPDH: ローディングコントロール。

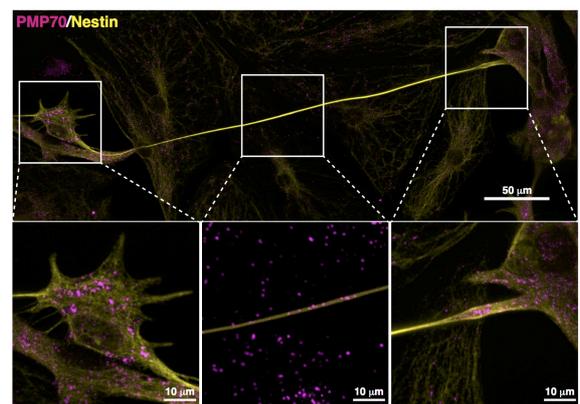


図 3 初代培養タニサイトにおけるペルオキシソームの局在
10 日齢のマウス視床下部より単離した初代培養タニサイトを抗 PMP70 抗体、抗 Nestin 抗体で免疫蛍光染色した。各挿入図は細胞体、突起、突起先端部の拡大図を示す。

る。パルミチン酸のタニサイトに対する影響を調べるために、初代培養タニサイトを 10 μ M~100 μ M のパルミチン酸で処理し、時間経過とともにペルオキシソームの形態を免疫蛍光染色法により観察した。ペルオキシソームの形態や数、局在に顕著な変化は観察されなかったが、ペキソファジーマーカーである p62 との共染色を行ったところ、細胞体において p62 陽性構造の増加が観察され、一部のペルオキシソームと共局在を示した (図 4A、矢頭)。一方、生化学的な解析により、ペルオキシソームタンパク質に顕著な差は観察されなかったが、p62 の蓄積が観察された (図 4B)。培養細胞に対するパルミチン酸のオートファジーに対する影響も複数の報告がされており、細胞種や処理条件により促進的にも抑制的にも作用する。本研究の結果より、パルミチン酸は初代培養タニサイトにおけるペキソファジーに対して抑制的に働いていることを示しているが、その特異性や生理的意義の解明にはさらなる実験が必要である。

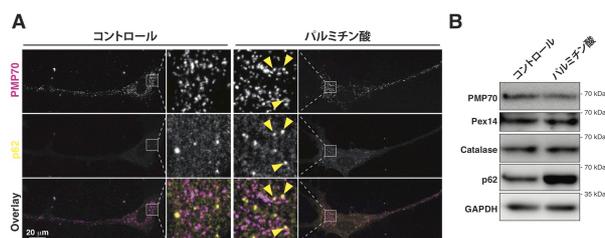


図 4 パルミチン酸添加培養下における初代培養タニサイトのペルオキシソーム

A 初代培養タニサイトを溶媒(コントロール: 溶媒であるエタノール)あるいは 100 μ M パルミチン酸で処理し、免疫蛍光染色した。B. タニサイトのホモジネイト 10 μ g を上記に示す抗体を用いたウェスタンブロットングにより解析。

<考察・今後の展望>

これまでの多くのペルオキシソームの形態・動態解析は出芽酵母や株化培養細胞を用いたもので、哺乳類の生体内における実際の挙動は未知の部分が多く残されている。本研究ではまず、生体内タニサイト (図 1) と初代培養タニサイト (図 3) のペルオキシソームを観察し、亜集団の存在や細胞内局在を同定した。さらに、高脂肪食摂餌マウスを *in vivo*、パルミチン酸処理した初代培養タニサイトを *in vitro* モデルとして、代謝応答におけるペルオキシソームを解析した。本研究では数や形態に顕著な変化は観察されなかったが、*in vivo*、*in vitro* 双方のモデルにおいてペキソファジーマーカーである p62 との共局在が観察された。これらの結果は高脂肪食摂餌下において脳脊髄液中のパルミチン酸濃度が上昇した結果、タニサイトでのペキソファジーが抑制されたことを示唆している。しかし、PMP70 と共局在を示さない p62 も観察されることから、ペキソファジーの特異性を解明するためにはさらなる実験が必要である。ペルオキシソームの代謝回転の大部分はペキソファジーを介したものであると考えられているが、生体内の直接的な証拠は未だに乏しい。例えば、CHO 細胞 (ハムスター卵巣由来) を用いた実験ではペルオキシソームの半減期はおおよそ 2 日とされているが⁶⁾、生体内や初代培養系におけるペルオキシソームの半減期は未知な部分が多く残されている。本研究での観察結果は、視床下部タニサイトにおいてもペキソファジーによってペルオキシソームが代謝回転されていることを示唆している。しかし、この結果が恒常的な分解、あるいは傷害ペルオキシソームの除去のためのペキソファジーかどうかを明らかにするためにはさらなる解析が必要とされる。今後はペキソファジー抑制やペルオキシソーム亜集団の変化などの生理的影響を解析するために、電子顕微鏡などによる詳細な形態学的解析に加え、脂質酸化などのペルオキシソームの機能解析を行う。また、タニサイト初代培養系を用いたペルオキシソーム動態関連遺伝子の発現抑制実験などにより、ペルオキシソーム動態異常下でのタニサイトの増殖や分化能を解析し、代謝応答におけるペルオキシソームの役割のさらなる解明を目指す。

異動もない状況で新たな実験系を導入するにあたり、貴助成金には多大なご支援をいただいた。この場を借りて、改めて深く御礼申し上げます。

<参考文献>

- 1) Qian, G. *et al.*, *PLOS ONE*. 10(12), 2015
- 2) Lee, D.A. *et al.*, *Nat. Neurosci.* 15, 700-702, 2012
- 3) Li, J. *et al.*, *Nat. Cell Biol.* 14, 999-1012, 2012
- 4) Meng, Q. and Cai, D., *J Biol. Chem.*, 37, 32324-32332, 2011
- 5) Posey, KA., *et al.*, *Am J Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E1003-E1012, 2009
- 6) Huybrechts, S. J. *et al.*, *Traffic*. 10: 1722-1733, 2009