

新規細胞内分解システム DUMP の破綻を原因とする 神経・筋疾患発病機序の解明

大阪大学大学院 連合小児発達学研究所
藤原 悠紀

1.緒言

リソソームは細胞内における物質分解の「ハブ」ともいえるべき細胞小器官（オルガネラ）であり、タンパク質や核酸、脂質や糖など、あらゆる細胞の構成因子を分解することのできるユニークな区画である¹⁾。このような特徴から、リソソームはこれら単一の生体高分子にとどまらず、ミトコンドリアやリボソーム、果ては核や他のリソソームまでも含む他のオルガネラや細胞外から運ばれてきた他の細胞まで、生体を構成する分子をひとそろえもった巨大な構造体をも分解することができる。このように、ともすれば細胞自身をも障害・消化してしまいかねない危険な分子である加水分解酵素を、リソソームというひとつのコンパートメント内に閉じ込めておくというのは、生命にとっては理に適ったリスクヘッジの方法であるともとらえることができる。実際、リソソームの内部は pH5 前後と、かなり酸性寄りに保たれており、多くのリソソーム性加水分解酵素はこの pH の周辺を至適 pH とする酸性加水分解酵素である。これにより、万が一細胞内でリソソームの障害などによりリソソーム内成分が細胞質に漏出するような事態に見舞われたとしても、pH7 付近に保たれた細胞質ゾル中ではこれらリソソーム性の加水分解酵素はじゅうぶんに働くことができず、結果として細胞自身は大きな障害を避けることができるという安全装置のような役割も果たしている。

しかしながら、このようにリソソームが境界膜で区切られた構造であるということは、とりもなおさず反対にリソソームにおいて物質を分解するためには、これらの分解基質がリソソームの膜を越えて内腔へと取り込まれなくてはならないことを意味する。細胞内のさまざまな分解基質を何らかの方法でリソソーム内腔へと運び込み、分解する一連の経路のことを、広義に「オートファジー」と総称する²⁾。オートファジーやリソソーム分解系の機能不全・破綻はこれまで多くの疾患との関わりが指摘されており、神経系や筋もオートファジー・リソソーム系不全の影響が多く報告されてきた組織である³⁾。オートファジーにはこれまで、主にマクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーと呼ばれる3種類の経路が知られてきた。これらのうち、最も研究が進んでいる経路はマクロオートファジーであり、狭義に「オートファジー」と述べた場合、多くはこの経路の

ことを指すのもこのためである。一方で、マイクロオートファジーやシャペロン介在性オートファジーなどの他の経路に関する研究は相対的に立ち遅れており、さらに既知の細胞内分解経路のみでは細胞内物質分解の多くの割合を説明しきれないとの指摘もあるなど、未知の経路の存在も指摘されていた⁴⁾。

このような背景のもと、筆者らはこれまでの研究で、既知のいずれの経路にも独立にリソソームが核酸やタンパク質を ATP 依存的に直接内部へと取り込み、分解するという、新たな細胞内分解経路を見出し、これを Direct-uptake-via/through-membrane-protein (DUMP) と名付け報告している⁵⁻⁸⁾。DUMP においては、リソソーム膜タンパク質である SID1 transmembrane family, member 2 (SIDT2) が基質分子のリソソームへの直接取り込みを担う重要因子として働く⁸⁻¹⁰⁾ (図 1)。SIDT2 は、細胞種においては富栄養条件下におけるリソソーム性タンパク質分解の大部分を担うなど、定常的な細胞内物質分解において重要な役割を担うことも、筆者らは明らかにしている⁸⁾。

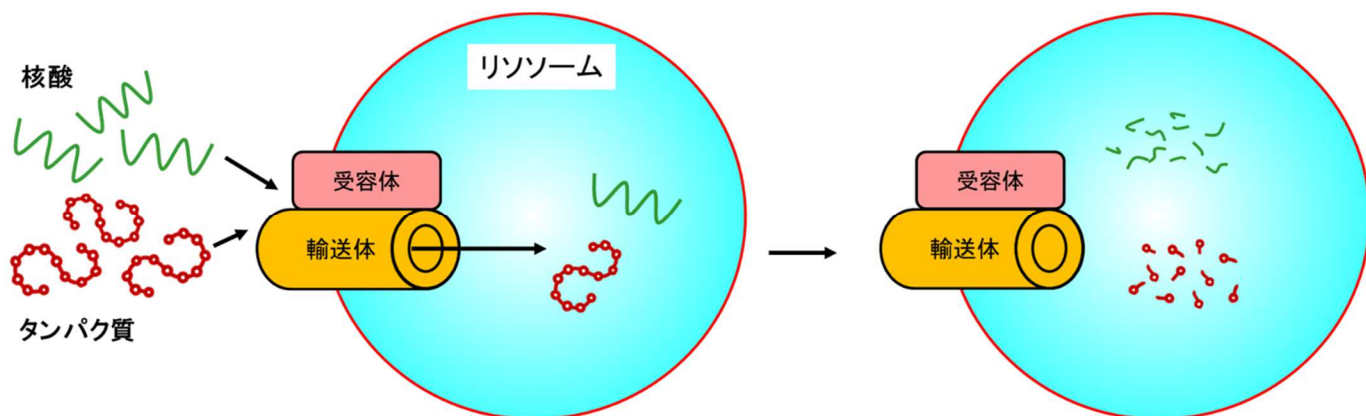


図 1 DUMP の模式図。リソソーム膜の受容体や輸送体が働くことで、生体高分子をリソソーム内腔へと運び込み分解する。DUMP の輸送体として、筆者らは SIDT2 を報告している。

さらに、筆者らはこれまでに、この SIDT2 の DUMP 活性に対するドミナント・ネガティブ活性を持つ変異をもち、DUMP 活性の低下が原因と考えられる家族性神経・筋疾患患者 1 例を見出し、報告している⁸⁾。この疾患患者や SIDT2 欠損マウスの骨格筋組織では多量のタンパク質等の凝集物がみられ、興味深いことに、これら蓄積タンパク質にはアミロイド β や TDP-43、 α -synuclein など、神経変性疾患において神経に蓄積するタンパク質との一致もみられた。本疾患患者においては末梢神経の脱落もみられたことなどから、筋原性と神経原性の病態双方がこの疾患に絡んでいると考えられる。これらに加えて筆者らは、レビー小体型認知症やパーキンソン病などの神経変性疾患患者の死後脳において病態依存的な SIDT2 の発現上昇や局在変化を見出すことにも成功している¹¹⁾。

以上から筆者らは、DUMP/SIDT2 の機能不全は、細胞内における凝集性タンパク質などの蓄積をもたらし、神経や筋における凝集・蓄積病の原因となるのではないかと考えた (図

2)。

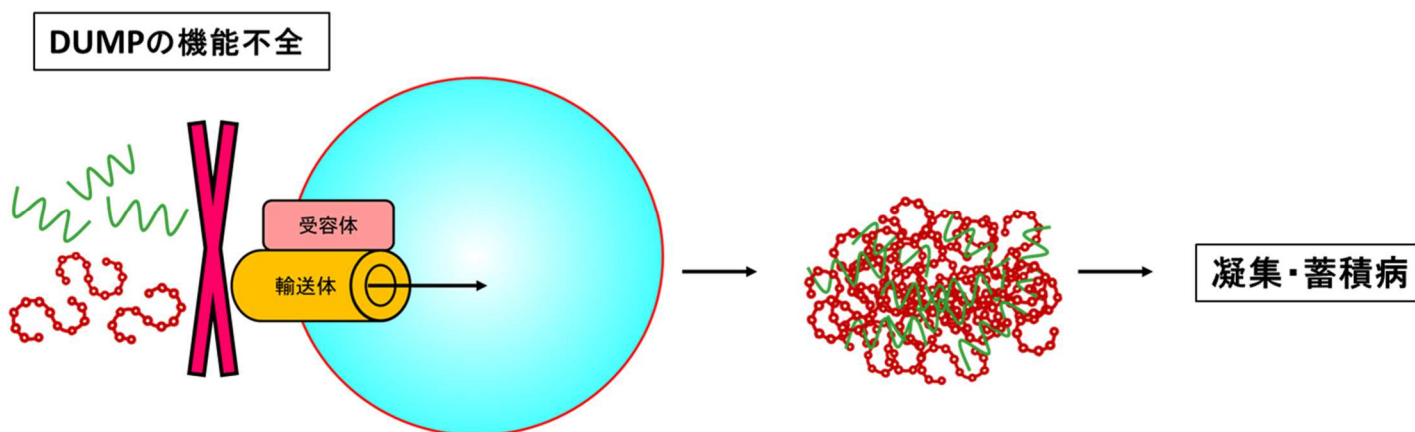


図2 DUMPの機能不全に起因する細胞内凝集・蓄積病の病態形成のモデル図。SIDT2の変異などによりDUMPの活性が低下することが、リソソームへのタンパク質などの輸送・分解を阻害し、これらの細胞質への蓄積・凝集を惹起し、疾患につながるのではないかと考えられる。

しかしながら、組織レベルでの解析のみでは、分子レベルでの病態形成過程や様態を詳細に検討するのは困難である。そこで筆者らは、より簡便にDUMPやリソソーム性のタンパク質分解の寄与やその機能不全のもたらす影響を詳細に検証しうる実験系として、初代培養神経細胞を用いた検討方法を試みた。

2.方法

上述の目標に向けて、まず胎生18日目のラット胎児の海馬より初代培養神経細胞を得た。以下に簡単に方法を述べる。胎生18日目のラット胎児脳より海馬を氷温HBSS (Gibco) 中で摘出し、37°Cでのパパイニン処理により細胞を分散させ、10% Fetal Clone III (HyClone) 入り Neurobasal Medium (Gibco) により再懸濁したものを TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad) により細胞数をカウントし、 5.0×10^5 cells/dish、poly-D-lysine (SIGMA) によりコーティング済みの 3.5 cm dish (IWAKI) に播種した。次に、インキュベーター内で3時間静置した後、B27 Supplement (Gibco) および Glutamax を添加した Neurobasal Medium に培地を交換し、以降3日毎に培地を半量ずつ交換し培養した。ペプスタチン A (Peptide Institute) および E64d (Peptide Institute) 処理群においては、各阻害剤を DMSO (Nacalai Tesque) に 50 mg/mL で溶解した原液を培地に各 5,000 倍希釈 ($10 \mu\text{g/mL}$ each at final concentration) したものの、その対照群としては DMSO を培地に 2,500 倍希釈したものをそれぞれ培養2日目より培地として用い、やはり以降3日毎に同様の培地を半量ずつ交換し培養した。細胞の顕微鏡観察および撮影は BZ-9000 (Keyence) により行った。ウェスタンブロッティングにおいて

は、SDS-PAGEにより分離したサンプルを Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore) に転写後、1%スキムミルクでブロッキングし、各目的のタンパク質に対する一次抗体 (anti-proteinX、BIOMOL、anti- β -actin、SIGMA) および HRP 標識二次抗体 (Cell Signaling) で処理した後、ECL start Western Blotting Detection Reagent (Amersham) により可視化し、CEPROS Q (FUJIFILM) で撮影した。

3.結果

まず、顕微鏡観察により初代神経細胞が単離され、培養下において神経突起の伸長などが起きている様子が観察された。神経細胞におけるリソソーム性のタンパク質分解阻害の影響を検討する目的で、次にこれら初代培養神経細胞をリソソーム性のタンパク質分解酵素の阻害剤であるペプスタチン A および E64d の存在下あるいは非存在下で 10 日間培養し、ウェスタンブロッティングにより検討した。その結果、ペプスタチン A および E64d 処理群の初代培養神経細胞において、細胞内におけるタンパク質分解の機能不全を示唆する proteinX の増加が認められた。

4.考察

ペプスタチン A および E64d 処理群の初代培養神経細胞において proteinX の増加が認められたことから、本実験系においてリソソーム性のタンパク質分解を阻害することで、細胞内における分解を免れたタンパク質の蓄積がすでに起きていることが示唆された。proteinX のシグナルが高分子量域にもみられたことから、一部、蓄積タンパク質の凝集が起きている可能性も考えられるが、この点については免疫染色による観察や他の生化学的解析など、さらなる検討が必要である。また、proteinX 以外にも前述の神経・筋疾患などにおいて蓄積・凝集がみられるタンパク質が蓄積してくるのか、またより早い培養日数や逆に培養日数をさらに伸ばして阻害を行った場合、どのような因子がいつ、どのような順序で蓄積してくるのかなどを解析することで、いわゆるタンパク量蓄積病の病態形成過程を理解する一助となる可能性が考えられる。今回の実験では、より広範にリソソーム性のタンパク質分解全体を阻害することでタンパク質の蓄積を示唆するデータが得られたが、今後は DUMP や他のオートファジー経路の重要因子の阻害を行うことで、各経路の特異的な阻害の影響をみていきたい。

5.結語

神経や筋においては、特に老齢期にかけてさまざまな凝集性タンパク質などの細胞内構成因子の蓄積が知られている。本実験系により、より簡便かつ迅速にこのような病態を模倣し、検討を行えるようになることが期待される。

6.文献

- 1) de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 1955;60:604-617.
- 2) Yim WW, Mizushima N. Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov.* 2020;6:6.
- 3) Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008;451:1069-1075.
- 4) Tong M, Smeekens JM, Xiao H, Wu R. Systematic quantification of the dynamics of newly synthesized proteins unveiling their degradation pathways in human cells. *Chemical Science.* 2020;11:3557-3568.
- 5) Fujiwara Y, Wada K, Kabuta T. Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids—multiple autophagic pathways. *J Biochem.* 2017;161:145-154.
- 6) Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, et al. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy.* 2013;9:403-409.
- 7) Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, et al. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy.* 2013;9:1167-1171.
- 8) Fujiwara Y, Contu VR, Kabuta C, Ogawa M, Fujita H, Kikuchi H, et al. Discovery of a protein uptake pathway in lysosomes. *bioRxiv*. DOI: 10.1101/2020.08.11.245688.
- 9) Aizawa S, Fujiwara Y, Contu VR, Hase K, Takahashi M, Kikuchi H, et al. Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes. *Autophagy.* 2016;12:565-578.
- 10) Aizawa S, Contu VR, Fujiwara Y, Hase K, Kikuchi H, Kabuta C, et al. Lysosomal membrane protein SIDT2 mediates the direct uptake of DNA by lysosomes. *Autophagy.* 2017;13:218-222.
- 11) Fujiwara Y, Kabuta C, Sano T, Murayama S, Saito Y, Kabuta T. Pathology-associated change in levels and localization of SIDT2 in postmortem brains of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies patients. *Neurochem Int.* 2022;152:105243.

7.成果発表

なし