

論 文 要 旨

学位申請者

氏 名 山口 史明



リソソームは生体膜に囲まれ、内腔が酸性に維持されている細胞小器官である。60種類以上の酸性加水分解酵素を内包し、これらを用いてオートファジーやエンドサイトーシスにより輸送された細胞内外の高分子の消化を行う。リソソーム膜には多数の糖鎖を持つ膜貫通糖タンパク質が存在する。これらのうち、I型膜貫通型のタンパク質である LAMP-1 (Lysosome-associated membrane protein-1) と LAMP-2 が総リソソーム膜糖タンパク質量のおよそ 10~50%を占めており、主要なリソソーム膜糖タンパク質となっている。LAMP-1 と LAMP-2 は類似した構造をしており、どちらも N-末端側の大部分はリソソーム内腔に存在し、この部分に N-結合型糖鎖と O-結合型糖鎖が結合している。それに続いて、膜貫通部分 (TMD) と C 末端の 11 個のアミノ酸から構成される細胞質テール (CT) が存在する。LAMP-2 には TMD と CT のアミノ酸配列の異なる LAMP-2A、LAMP-2B、LAMP-2C の 3 種のアイソフォームが同定されている。

LAMP-1 と LAMP-2 各アイソフォームの CT にはチロシンモチーフ (GYXXΦ) 配列が存在しており、このチロシンモチーフが LAMP-1 や LAMP-2 のリソソームへ輸送シグナルとして機能していることが広く知られている。アダプタータンパク (AP) 質複合体はこのチロシンモチーフ認識し、標的部位への輸送を担っている。AP 複合体は 2 つの大型サブユニット ($\gamma, \alpha, \delta, \epsilon, \zeta / \beta 1\sim 5$)、1 つの中型サブユニット ($\mu 1\sim 5$)、1 つの小型サブユニット ($\sigma 1\sim 5$) からなる四量体である。現在までに 5 種類の AP 複合体 (AP-1、AP-2、AP-3、AP-4 および AP-5) が同定されており、これらのうち AP-1~AP-4 がチロシンモチーフを持つタンパク質の輸送に関わっている。チロシンモチーフは、AP 複合体のサブユニットのうち μ -サブユニットと結合することが知られている。AP-1~AP-4 はそれぞれ $\mu 1$ 、 $\mu 2$ 、 $\mu 3$ および $\mu 4$ とよばれる中型サブユニットを持ち、 $\mu 1$ と $\mu 3$ にはアイソフォームが存在する。AP-1~AP-4 はそれぞれ異なる輸送経路に関与する。AP-1 はカチオン非依存性マンノース-6-リン酸レセプター (CI-MPR) のトランスゴルジ網 (TGN) から初期エンドソームへの輸送に関与する一方、AP-2 は細胞表面に存在する受容体のエンドサイトーシスに関与する。また、AP-3 は TGN、初期エンドソームから後期エンドソームへの膜タンパク質輸送に関与している。AP-4 も TGN でクラスリン非依存的な小胞輸送として機能している。

リソソームに大きく関わる疾患にライソゾーム病がある。ライソゾーム病は、リソソーム酵素や関連因子の遺伝的染色体異常による代謝異常疾患群であり、各因子が不活化することで、分解されるべき生体内基質が過剰に蓄積し発症する。発症する症状は多様であり、小児期に死に至るケースも存在する。現在 40 種類以上の疾患が知られており、難病にも指定(指定難病 19)されているものもあるが、治療法が確立されている疾患は少ない。ライソゾーム病の治療法に酵素補充療法がある。リソソーム酵素の多くはその末端にマンノース-6-リン酸(M6P)の糖鎖構造を持ち、細胞表面に存在する M6P 受容体と結合することで、エンドサイトーシスによりリソソームへ送達される。酵素補充療法はこのシステムを利用し、不具合を生じた酵素の代わりに M6P の糖鎖構造をもつ人工酵素を点滴する治療法であり、ゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ムコ多糖症 (I 型、II 型、IVA 型、VI 型) および酸性リパーゼ欠損症が国内外で承認されている。しかし、この治療法は M6P 受容体との結合能が前提であり、ノイラミニダーゼのように M6P 型糖鎖構造を有さない酵素で実行しても、マクロファージなどのごく一部の細胞にしか取り込まれず、十分な効果が見込めない。そこで、リソソーム膜タンパク質の利用を考えた。リソソーム膜タンパク質の中には AP 複合体と直接相互作用し、形質膜からリソソームへ送達されるものもある。この輸送には M6P は関与しないため、M6P 型糖鎖構造を有さない酵素でもリソソームへの効率的な送

達が可能となる。これを実現するにはリソソームへの送達率の高い膜タンパク質の選定や酵素タンパク質と膜タンパク質の融合、投与した膜タンパク質と形質膜の融合などいくつかの課題が存在する。本研究ではこれら課題のうち、膜タンパク質の選定を行うため、リソソーム存在量の多い代表的なリソソーム膜タンパク質である LAMP に注目し、LAMP-1 や LAMP-2 の細胞内局在や輸送効率を解析して、最も送達率の高いリソソーム膜タンパク質を調べた。

μ 3A への結合におけるチロシンモチーフ(GYXX Φ)の Y の一つ前 (Y-1)のアミノ酸が相互作用に大きく影響することが報告されている。そこで、LAMP-1 のチロシンモチーフの(Y-1)である Gly を Ala、Asp、Glu および Asn に置換した変異体を作成し、相互作用および細胞内分布にどう影響するかを Yeast Two-Hybrid 法およびパーコール密度勾配遠心法により調べた。その結果、Ala、Asp、Glu はチロシンモチーフと μ 3A との相互作用にあまり影響を及ぼさなかったが、Asn は相互作用へかなり負の影響を及ぼした。また、相互作用強度が低い Asn 変異体や、 μ 3A との相互作用に必須な Y を変異させた変異体はリソソームではなく細胞膜での存在量が上昇した。このことからリソソームへの輸送に必要な条件は μ 3A との強固な相互作用であることが分かった。

LAMP-2 のアイソフォーム(A,B,C)のそれぞれの局在および AP 複合体との相互作用については不明な部分が多い。そのため、LAMP-2 のアイソフォームと μ -サブユニットとの相互作用を Yeast Two-Hybrid 法で調べ、パーコール密度勾配遠心法および免疫蛍光顕微鏡法で細胞内分布や輸送経路にどう影響するかを調べた。結果、LAMP-2A はすべての μ サブユニットと相互作用し、特に μ 3A とは他の LAMP-CT/ μ 3A よりも強固であった。そして LAMP-2A のほとんどがリソソームへ送達されていた。LAMP-2B は μ 3A と特異的に結合し、リソソームと後期エンドソームに同等量に分かれて存在していた。LAMP-2C はいずれの μ サブユニットとも結合しなかった。その分布はリソソームと初期エンドソーム、後期エンドソーム、形質膜に分散していた。また、LAMP-2C を発現した細胞では LAMP-1 の形質膜での存在率の増加という分布の変化が見られた。

当研究室の過去の研究と本研究から、チロシンモチーフ (GYXX Φ) の(Y-1)位に Gly、Ala、Asp、Glu が、Y 位は Tyr が、 Φ 位はある程度の疎水性と嵩高さを持つ Ile、Leu、Phe が必要であることが分かった。薬として細胞外からの輸送を考えた場合、形質膜から初期エンドソームへの輸送を介する AP-2 との結合性も踏まえ、最も効率的にリソソームへ送達されるチロシンモチーフは LAMP-2A の GYEQF であり、酵素補充療法にはこの配列のモチーフが最適であると考えられる。

酵素補充療法は M6P 受容体との結合を起点としているため、M6P 構造を持たない酵素では使用できない。リソソーム膜タンパク質を利用した輸送は M6P 受容体との結合を介さない輸送であり、M6P 構造を持たない酵素でも補充が可能となる。本研究では、これを可能とするための条件の一つであるリソソーム膜タンパク質の選定を行った。まだまだ課題は残っているが、この結果が今後の酵素補充療法の適応拡大への知見として役立つことが期待できる。

論文審査及び試験の結果の要旨

山口史明氏の博士論文は、リソソームの代表的な膜タンパク質（LAMP）の輸送経路を詳細に解析した研究である。

ライソゾーム病は、リソソーム酵素や関連因子の遺伝的染色体異常により、各因子が不活化することで、分解されるべき生体内基質が過剰に蓄積する疾患である。ライソゾーム病の治療法の1つである酵素補充療法は細胞表面に存在するマンノース-6リン酸（M6P）受容体との結合を起点としているため、M6P非含有酵素に対しては使用できない。細胞表面を含むエンドサイトーシス経路にも幾分存在するLAMPをM6P受容体の代わりに利用することができれば、全てのリソソーム酵素に対し補充療法が可能となる。また、LAMPを融合した酵素の発現が可能になれば、効率的にリソソームへの輸送が実現できる。本研究は、LAMPファミリー（LAMP-1、LAMP-2A、2B、2C）の局在化や輸送効率を解析し、補充療法に最適なLAMPの選定について検討している。

LAMPファミリーの多くはアダプタータンパク質（AP）複合体との結合強度の違いにより、細胞表面、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームに輸送される。Yeast Two-Hybrid法、パーコール密度勾配遠心法および免疫蛍光顕微鏡法による結果から、リソソームへの輸送にはAP-3構成サブユニットの μ 3Aとの相互作用が重要であり、この結合が低い場合、細胞表面や初期エンドソームに移行することを見出した。さらに、LAMP-2Aはリソソームに多く局在、LAMP-2Bは後期エンドソームとリソソームに同程度局在、LAMP-2Cは細胞表面を經由しエンドサイトーシス経路に沿って分散していることから、最も効率的にリソソームへ輸送されるLAMPファミリーはLAMP-2Aであり、重要な配列はGYEQFであることを見出した。

以上のことから、本博士論文は難病に指定されているライソゾーム病の酵素補充療法の適応拡大への知見としてLAMP-2Aが利用できる可能性を初めて見出した報告であり、本成果はこれら疾患の新たな治療薬研究に応用されることが期待できる。特に、リソソーム輸送において重要な配列であるGYEQFを見出した成果は、酵素補充療法で発現させた酵素の活性に対し影響を与えない短い配列付加に寄与することが期待できる。

本学位請求論文は、福山大学薬学研究科指導教員により必要な研究指導論文を受けた上で提出されたものであり、本研究科学学位授与規程に従い、所定の審査に合格したので、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと判定する。

以上