

パーキンソン病関連神経毒 MPP⁺によるリソソーム機能低下を介したオートファジー阻害

平成 24 年度入学 宮良 政嗣
主指導教員 太田 茂

【序論】

パーキンソン病 (PD) は、中脳の黒質に存在するドパミン神経の選択的脱落に伴う運動機能障害を主症状とする神経変性疾患である。PD 患者の脳内においてタンパク質凝集体の蓄積が認められることから、タンパク質分解異常が発症に関与すると考えられているが、未だ PD の原因解明には至っていない。オートファジーとは、オートファゴソームによって囲まれた細胞内成分をリソソームに導き、大規模に分解する細胞内分解機構である。近年、脳特異的オートファジー欠損マウスが神経変性疾患特有のタンパク質凝集体を伴う神経細胞死及び神経変性疾患様症状を示すことが明らかになり^{1,2)}、神経変性疾患とオートファジーとの関係が注目されてきている。PD 関連神経毒 MPP⁺は、24 時間以内に有意な細胞死を引き起こす過激な曝露条件下 (SH-SY5Y 細胞においては数 mM) においてオートファゴソーム量の増加を引き起こすことが報告されているものの、その原因に関しては不明な点が多い^{3,4)}。本研究では、PD における緩徐性神経細胞死を模倣した曝露条件下 (10 μ M 及び 200 μ M) において MPP⁺ がオートファジーに及ぼす影響を明らかにすると共に、その原因となるメカニズムの解明を目指した。

【結果及び考察】

1. 低濃度 MPP⁺が細胞生存率に及ぼす影響

低濃度 MPP⁺ (10 μ M and 200 μ M) 曝露後、24 時間において細胞生存率に変化は認められなかったが (data not shown)、48 時間においては有意な低下が認められた。また、10 μ M MPP⁺曝露による細胞生存率の低下は緩やかに進行し、8 日後には約 57%に低下した。

2. 低濃度 MPP⁺が細胞内オートファゴソーム量に及ぼす影響

低濃度 MPP⁺曝露後、24 時間においてオートファゴソームマーカータンパク質 LC3-II の量に変化は認められなかったが、48 時間においては有意な増加が認められた。また、オートファゴソームを示す LC3 ドット状構造の増加も認められた。

3. 低濃度 MPP⁺が LC3-II ターンオーバーに及ぼす影響

オートファゴソーム量の増加は、オートファゴソーム生成促進または分解抑制のいずれかを示している。そこで、両者を区別する方法として広く用いられている LC3-II ターンオーバーアッセイ⁵⁾を行った。低濃度 MPP⁺は、過剰量の bafilomycin A₁ (リソソーム分解阻害剤) 存在下において LC3-II の増加を引き起こさなかったことから、オートファゴソーム分解抑制を引き起こしていたことが示された。

4. 低濃度 MPP⁺がオートファジー選択的基質 p62/SQSTM1 の蓄積に及ぼす影響

p62/SQSTM1 は高い凝集性を有している⁵⁾。低濃度 MPP⁺は、1% Nonidet P-40 可溶性 p62/SQSTM1 の量に変化を及ぼさなかったが、凝集体型であると考えられる不溶性 p62/SQSTM1 の有意な蓄積を引き起こした。

5. 低濃度 MPP⁺がリソソーム機能に及ぼす影響

bafilomycin A₁ (陽性対照) は、リソソーム内酸性度の著しい低下を引き起こしたが、低濃度 MPP⁺ はリソソーム内酸性度に顕著な変化を及ぼさなかった。低濃度 MPP⁺は、代表的なリソソーム内加水分解酵素であるカテプシン D の活性を有意に低下させた。pepstatin A (陽性対照) は、著しい活性低下を

引き起こした。

6. リソソーム生合成促進物質が低濃度 MPP⁺誘発オートファジー阻害及び細胞死に及ぼす影響

リソソーム生合成促進作用が報告されている trehalose⁴⁾及び rapamycin⁴⁾は、低濃度 MPP⁺誘発オートファジー阻害及び細胞死をわずかに抑制した。

【総括】

現在までに、高濃度 MPP⁺によるオートファジー誘導³⁾及び阻害⁴⁾の両者を示す報告が存在している。特に、阻害を示す報告において、高濃度 MPP⁺はリソソームの酸性化阻害や膜破壊など過激なリソソームダメージを介してオートファジーを阻害することが示唆されている⁴⁾。一方、本研究において、低濃度 MPP⁺は、過激なリソソームダメージではなく、リソソーム内加水分解酵素の弱い活性低下を介してオートファジーを阻害することが示された。また、リソソーム生合成促進物質を用いた研究から、これらの現象は低濃度 MPP⁺による緩徐性細胞死に関与することが示唆された。リソソーム内加水分解酵素の「持続的な弱い活性低下」は、PD 発症の本質的な原因である可能性が考えられる。

【参考文献】

1) Komatsu et al., Nature 2006; 441: 880-884. 2) Hara et al., Nature 2006; 441: 885-889. 3) Zhu et al., J Pathol 2007; 170: 75-89. 4) Dehay et al., J. Neurosci 2010; 30: 12535-12544. 5) Klionsky et al., Autophagy 2012; 8: 445-544.

本学位申請論文は、学術誌に投稿中である以下の論文の内容を含む。

Miyara M, Kotake Y, Sanoh S, Ohta S. Mild MPP⁺ exposure impairs autophagic degradation through a novel lysosomal acidity-independent mechanism. (Submitted).