

論文内容要旨

Shutdown of ER-associated degradation pathway rescues functions of mutant iduronate 2-sulfatase linked to mucopolysaccharidosis type II

(小胞体関連分解の抑制はムコ多糖症 II 型原因タンパク質変異型イズロン酸 2 スルファターゼの機能を回復する)

Cell Death and Disease, 9(8): 808, 2018.

主指導教員：正木 崇生教授

(広島大学病院 腎臓内科学)

副指導教員：今泉 和則教授

(医歯薬保健学研究科 分子細胞情報学)

副指導教員：松原 昭郎教授

(医歯薬保健学研究科 腎泌尿器科学)

尾崎 陽介

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

膜タンパク質や分泌タンパク質は小胞体で正常に折りたたまれ、翻訳後修飾を受けて成熟する。しかし、変異タンパク質などは、折りたたみ不全の異常タンパク質として小胞体内腔に蓄積する。細胞は異常タンパク質を小胞体から排除するため、ユビキチン-プロテアソーム系による積極的な分解（小胞体関連分解 [ER associated degradation ; ERAD]）を促し、細胞の恒常性維持を図る。変異遺伝子から翻訳されたタンパク質はこの ERAD によって分解され機能を失い、疾患発症へと至る。変異タンパク質の ERAD における詳細な分解機構を解明することは、変異タンパク質の機能喪失を原因とする疾患の治療法確立につながることを期待できる。

ムコ多糖症は、リソソーム病の一種であり、遺伝的要因によってムコ多糖が全身に蓄積し、骨軟骨形成異常や神経系障害など様々な症状を呈する代謝異常症である。日本ではリソソーム酵素である Iduronate-2-sulfatase (IDS) の変異で起こるムコ多糖症 II 型が約半数を占めている。本研究では、ムコ多糖症 II 型発症の分子機構を解析する目的で変異 IDS の細胞内動態と分解経路について詳細に解析した。

ウェスタンブロッティングで検出される野生型 IDS は、全長型の 75kDa である全長型がプロセシングを受けた活性型である 55kDa の 2 本のバンドからなる。重篤な症状を示す重症型変異 IDS は全長型のバンドだけが検出されるが、軽症型変異 IDS はわずかに活性型 IDS のバンドが検出された。基質分解能を解析したところ、変異型 IDS は野生型 IDS の 2~4% 程度が残存するのみであった。また、重症型変異 IDS と軽症型変異 IDS の比較では、重症型変異 IDS に比べ軽症型変異 IDS は有意に基質分解能が残存していることが示された。次に IDS の細胞内局在を調べるために、HeLa 細胞に野生型及び変異型 IDS を遺伝子導入後、抗 IDS 抗体を用いて免疫染色を行った。野生型 IDS は主にリソソームマーカー LAMP2 陽性の顆粒状染色パターンを示し、一部分が小胞体マーカーカルネキシンと共局在した。一方、変異型 IDS はカルネキシン陽性の網目状染色パターンを示すのみで、LAMP2 との共局在は認めなかった。従って、変異型 IDS は小胞体内に留まり、リソソームまで到達していないことが示唆された。上述のように小胞体内に蓄積した変異タンパク質は ERAD で速やかに分解されることが知られている。そこで野生型及び変異型 IDS のタンパク安定性の比較する目的で IDS を発現させた HeLa 細胞を翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドで処理し、その後のタンパク質量の変化をチェイスした。重症型、軽症型とも変異 IDS は野生型 IDS と比較して極めて安定性が低く速やかに分解された。細胞をシクロヘキシミドに加えプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理すると、重症型、軽症型共に変異 IDS の分解は抑制された。このことから、変異 IDS はユビキチン-プロテアソーム系で分解されていることが確認できた。次に IDS の分解に関わる ERAD 関連因子の検討を行った。特に E3 リガーゼは基質特異的な分解に重要な役割を果たしていることが知られている。そのため IDS の分解に関わる ERAD 関連 E3 ユビキチンリガーゼを同定するため、小胞体膜上に局在する 7 種類の E3 ユビキチンリガーゼを siRNA を用いてノックダウンした。その結果、HRD1 をノックダウンした場合のみ重症型及び軽症型変異 IDS とともに分解が抑制され、全長型の有意な増加を認め

た。さらに軽症型変異 IDS では活性型が有意に増加しリソソームへの移行と基質分解能の改善が認められた。ERAD 関連分子の一つである ERdj3 をノックダウンすることで同様の現象がみとめられた。

以上から小胞体に留まった変異 IDS は速やかに ERAD で分解されることでリソソーム酵素としての機能を損失し、ムコ多糖症 II 型発症につながることを示唆された。さらに ERAD の阻害によって軽症型変異 IDS の基質分解能が回復したことから、ERAD における分解の抑制が病態の改善につながる可能性が示された。