

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 **筋萎縮性側索硬化症関連タンパク質 VAP の生理機能と分泌機構解析**
(Investigating physiological functions and secretion mechanism of ALS-related protein VAP)

広島大学大学院統合生命科学研究科

生命医科学プログラム

学生番号 D 2 0 5 5 7 5

氏 名 亀村 興輔

研究背景・研究目的

細胞内オルガネラがその構造維持に必要な不可欠な脂質の供給を受けるには、脂質の供給源である小胞体に「接触」する必要がある。この際、細胞内オルガネラの「繋ぎ止め分子」として機能するのが VAP と呼ばれる小胞体膜タンパク質である。VAP は酵母からヒトまで進化的に保存されており、膜貫通ドメインによって小胞体膜にアンカーされ、N 末の MSP ドメインが細胞質側を向くと考えられている。ヒト VAP の 1 つ VAPB/ALS8 における点突然変異は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こす。近年、VAPB の MSP ドメインが切断・分泌され、他の細胞の様々な膜受容体に結合することが分かった。このことから、VAPB は細胞内において「繋ぎ止め分子」として機能すると同時に、細胞外でも機能する可能性が示唆されている。興味深いことに、VAPB に変異の入っていない孤発性 ALS 患者においても、脊髄の VAPB mRNA 量が減少し、脳脊髄液中の MSP 切断断片が減少しているという報告がある。上記研究背景を踏まえ本研究では、VAPB の細胞内外における生理機能と分泌メカニズムの解明を目的とした。さらに、本研究で得られた知見を通して、VAPB と ALS がどのように関与しているかを明らかにすることを目指した。

研究結果

VAPB の生理機能や分泌メカニズムを解析するために、私は遺伝学的解析に適したショウジョウバエをモデル生物として採用した。VAPB の細胞内機能を解析するために、VAPB のショウジョウバエオルソログである *vap33* の機能欠失変異体を用いた遺伝学的モザイク解析 (MARCM) を行った。ショウジョウバエの触角葉嗅覚投射神経において *vap33* 機能欠失変異体神経幹細胞クローンを作製することにより、*vap33* 機能欠失によって生じる神経突起形態の表現型を解析した。その結果、*vap33* 機能欠失により、樹状突起の形態に異常が生じ、細胞内オルガネラ (ミトコンドリア・ゴルジ体) の細胞内局在が異常になった。この結果から、Vap33 は神経の形態維持とオルガネラの細胞内局在に必要なことが分かった。また、ALS8 疾患変異の一つである P56S 突然変異を導入した VAPB を *vap33* 機能欠失変異体神経幹細胞クローンに発現させた場合、樹状突起の形態は正常であったが、膜タンパク質である mCD8 や前シナプス分子 Bruchpilot が加齢依存的に蓄積することを発見した。このことから、ALS 疾患変異によって、シナプスタンパク質の局在や小胞体品質管理機構に異常が生じることが示唆された。

Vap33 の細胞外機能を解明するためには、Vap33 の細胞内機能は維持されつつも細胞外機能のみが阻害された変異体、すなわち「非分泌型 *vap33* 変異体」を作製する必要がある。この変異体を作製するために、Vap33 に様々な変異を導入した Vap33 変異タンパク質 (計 9 種類) を作製した。ショウジョウバエの培養細胞である S2 細胞を用いて生化学的解析を行った結果、Vap33 の分泌に重要なアミノ酸配列

(L118-T139)を同定することに成功した。ユビキタスなプロモーターを用いてVap33^{ΔL118-F127}をvap33機能欠失変異体に過剰発現したところ、この個体は致死性を呈したことから、分泌されたMSPドメインが個体生存に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

Vap33 MSPドメインの分泌に重要な遺伝子を特定するために、vap33機能欠失変異体を用いた遺伝学的スクリーニングを行った。C164-Gal4を用い、vap33機能欠失変異体の運動神経にVap33を過剰発現させると、致死性が回復することが知られている。これは、運動神経からMSPドメインが分泌されることで、個体の生存を可能にすることを意味する。そこで、運動神経でVap33が発現しているvap33機能欠失変異体 (vap33^{-/-}; C164-Gal4>UAS-vap33^{WT}) に、様々なUAS-RNAi系統を交配させた時の個体致死性を調べることで、Vap33 MSPドメインの分泌に関与する遺伝子を探索した。小胞体-ゴルジ体経路を介した典型的分泌経路、及び非典型的分泌経路に関係する104種類のRNAi系統を用いてスクリーニングを行った結果、典型的分泌経路に関与する遺伝子群をノックダウンすることで致死性が誘発されることを見出した。S2細胞においてCOPI/COPIIタンパク質をノックダウンし、典型的分泌経路を遮断したところ、Vap33 MSPドメインの分泌量が顕著に減少することが確認できた。よって、Vap33のMSPドメインは、典型的分泌経路を介して細胞外に分泌されることが示唆された。

通常、分泌性タンパク質はN末端にシグナルペプチドを持つことで小胞体内腔へと輸送され、典型的分泌経路によって細胞外に分泌される。しかし、VAPは一般的な分泌性タンパク質とは異なり、シグナルペプチドを持っていないため、小胞体膜上のVAPはMSPドメインを小胞体内腔には向けていないと考えられる。実際、Split-GFPシステムや生化学的手法を用いて、小胞体膜上のトポロジー状態を確認したところ、Vap33は分泌される側のMSPドメインを小胞体内腔には向けていないことが分かった。そこで、「Vap33は小胞体から細胞膜に至るまでの膜輸送経路のどこかの膜上でトポロジーを逆転させ、MSPドメインを細胞外に露出させることで、典型的分泌経路を介したMSPドメインの分泌を可能にしている」という仮説を立てた。これを検証するために、生化学的手法を用いて細胞膜上に存在するVap33のトポロジー状態を確認した。その結果、Vap33が細胞膜上でMSPドメインを細胞外に露出させている、すなわちトポロジーを逆転させていることを発見した。

次に私は、Vap33は細胞外に存在するプロテアーゼによって切断されると予測した。細胞膜上の膜タンパク質を切断する酵素としては、ADAMプロテアーゼが広く知られている。そこで、様々なADAM関連のプロテアーゼ（計9種類）をS2細胞に過剰発現させ、Vap33 MSPドメインの切断・分泌量を確認することで、Vap33の切断酵素を探索した。その結果、細胞膜結合型のプロテアーゼであるMMP1、及び分泌型のプロテアーゼであるMMP2を過剰発現させた場合、MSPドメインの切断・分泌が顕著に増加することを見出した。したがって、細胞膜上でトポロジーを逆転させたVap33は細胞外プロテアーゼによって切断されることで、MSPドメインを細胞外に放出することが示唆された。次に、ALS8疾患変異を持ったVap33に対するMMP1の効果を検証した。ALS8の疾患変異であるP56S/T46Iの相同変異をVap33に導入したVap33^{P58S}及びVap33^{T48I}からのMSPドメイン分泌は顕著に減少する。一方、この疾患変異によるMSPドメイン分泌の減少は、MMP1を過剰発現することにより回復もしくは通常以上に増加することを見出した。

まとめと展望

本研究を通して、VAPBが細胞内オルガネラの局在制御を介して神経の形態維持に関与しており、ALS8疾患変異によって神経細胞内のタンパク質局在に異常をきたすことを明らかにした。また、VAPBのMSPドメインは細胞外に分泌され、個体生存に必須の役割を果たしていることを見出した。さらに、VAPBは典型的分泌経路を介して細胞膜まで輸送される過程でトポロジーを逆転させ、その後MMP1/2プロテアーゼによる切断を受けることで結果的にMSPドメインが分泌されることを明らかにした。今後、MMP1発現量や細胞膜上VAPBのトポロジー状態を調節することでMSPドメインの分泌量を制御し、これがALSの新しい治療戦略につながることを期待している。