

# リソソームは小胞輸送を介さずに生体高分子を取り込むか？

株田 智弘, 藤原 悠紀, 和田 圭司

私達の体の細胞内では恒常的にRNAやタンパク質などが作られており、恒常性の維持のためにはこれらが適切に分解される必要がある。リソソームは内部に、タンパク質、核酸、脂質、糖質など様々な生体高分子に対する加水分解酵素を有していることから、生体高分子分解の主要な場であると考えられる。リソソームへと生体物質を輸送し分解する経路としてはエンドサイトーシスやマクロオートファジーなどの膜輸送を介したものがよく研究されている。一方でシャペロン介在性オートファジーとよばれる、リソソームに直接タンパク質が取り込まれ分解されるシステムも知られている。最近筆者らはRNA、DNAを直接リソソームに取り込み分解するシステムを発見し、それぞれRNautophagy、DNautophagyと名付けた。本稿では、これらの直接的システムに関する筆者らの研究を中心に紹介する。

## 1. はじめに

リソソームはChristian de Duve博士(1974年にノーベル生理学医学賞受賞)によって1955~1956年に発見された直径約100~1,000 nmの細胞内小器官(オルガネラ)である<sup>1-3)</sup>。リソソームの内部にはプロテアーゼ、ヌクレアーゼ、リパーゼ、グリコシダーゼ、ホスファターゼなど多種多様な加水分解酵素が存在し、リソソームはタンパク質、核酸、脂質、糖質など、様々な生体高分子を分解することができる。このことから、リソソームは生体物質分解の主要な場であると考えられる。分解されたアミノ酸、核酸、脂質などはその後リサイクルされるか、さらに代謝される、または細胞外・体外へと廃棄されると推測される。リソソームへ生体内物質を輸送し、分解する経路として、エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、マクロオート

ファジーといった、生体膜輸送を介したものがよく知られ研究されている。マクロオートファジーなどの生体膜輸送に関しては多くの書籍や総説が書かれているので、そちらを参照されたい。

一方で、1989年頃までにJ. Fred Dice博士らは膜輸送を介さずに直接的にタンパク質がリソソーム内へと輸送され分解されるシステムを見いだした<sup>4)</sup>。このシステムは現在ではシャペロン介在性オートファジー(chaperone-mediated autophagy: CMA)と呼ばれている<sup>5)</sup>。さらに、最近筆者らはRNA/DNAが直接的にリソソーム内へ輸送され分解されるシステムを新たに発見し、それぞれRNautophagy/DNautophagy(アールエヌオートファジー/ディーエヌオートファジー)と名付けた<sup>6,7)</sup>。本稿では、このシステムの発見を中心に、筆者らが以前から取り組んできたCMAとパーキンソン病に関する研究についても概説する。

## 2. LAMPファミリータンパク質

リソソームの大きな特徴の一つとして、その限界膜上に存在する大量のグリコシル化タンパク質があげられる。その多くはlysosomal-associated membrane protein (LAMP)ファミリータンパク質である。LAMPファミリーの主要なものとしてはLAMP1とLAMP2があげられ、これらはリソソーム膜タンパク質の約50%を占める<sup>8)</sup>。このうちLAMP2にはLAMP2A, LAMP2B, LAMP2Cの3種類のス

(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部 (〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1)

Do lysosomes take up various macromolecules independently of membrane traffic ?

Tomohiro Kabuta, Yuuki Fujiwara and Keiji Wada (Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan)

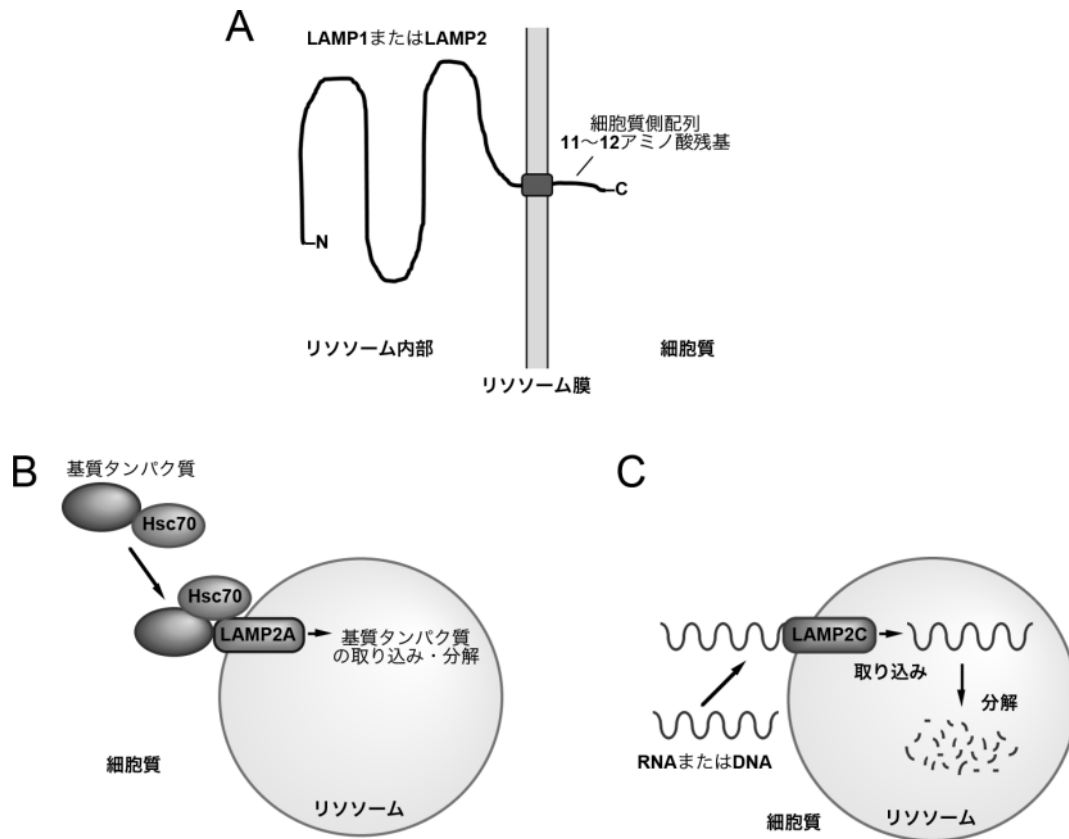


図1 LAMPとリソソームによる生体高分子の直接取り込み  
(A) LAMP1およびLAMP2の模式図。(B) CMAのモデル図。(C) RNautophagy/DNautophagyのモデル図。

プライス・バリエントが存在する<sup>9)</sup>。LAMP1, LAMP2は1回膜貫通型タンパク質であり、その大部分を占めるN末端側領域はリソソームの内側に存在し、高度にグリコシルーションを受けている。C末端側の11~12アミノ酸残基のみが細胞質側に位置する(図1A)。LAMP2A, LAMP2B, LAMP2Cでは、リソソーム内領域は膜の極近傍を除いて完全に共通した配列をもつ一方、膜貫通領域と細胞質側配列は異なる配列を有する。その他のリソソーム膜に存在するLAMPとしてはLAMP3(DC-LAMP), LAMP4(CD68)が知られている。

これまでLAMPファミリータンパク質の具体的な分子機能はほとんど不明であり、筆者らの知る限りはっきりとした分子機能がわかっていたのは、CMAの受容体として働くLAMP2Aのみであった<sup>10)</sup>。

### 3. シャペロン介在性オートファジー (CMA)

CMAは、LAMPファミリーのうちLAMP2Aを介して特定のタンパク質を選択的にリソソームに直接取り込み分解する経路である<sup>5)</sup>。現在までに提唱されているメカニズムは以下の通りである(図1B)。①細胞質において、KFERQ様モチーフを分子表面に出した基質タンパク質をHsc70シャペロンが認識する。②基質タンパク質、Hsc70

およびコシャペロンの複合体がリソソーム膜表面にリクルートされ、LAMP2Aと相互作用する。③LAMP2Aとシャペロン分子複合体のはたらきにより、基質タンパク質がリソソーム膜を通過し内部へ取り込まれる。④リソソーム内の加水分解酵素により、基質タンパク質が分解される。

上述のようにCMAの基質となるにはKFERQ様モチーフという特定のアミノ酸配列が必要であることが報告されている<sup>11)</sup>。一方で、MEF2Dという分子は典型的なKFERQ様モチーフを有していないが、このモチーフに類似した配列を有しており、CMAの基質となることが報告されている<sup>12)</sup>。いずれにせよ、CMAは選択性をもった、リソソームによる直接的なタンパク質取り込み・分解経路として知られている。

### 4. 膜タンパク質に着目した新たなリソソーム機能の解明

マクロオートファジーのように膜輸送を介したリソソームへの輸送経路は非常によく研究されている一方、リソソームが細胞質の生体高分子をどの程度直接取り込んでいるのかに関しては不明な点が多い。最近になって筆者らはRNAやDNAをリソソームがATP依存的に直接内部に取

り込み、分解するという新たな核酸分解システムを発見し、それぞれ RNautophagy および DNautophagy と名付けて報告した<sup>6,7)</sup>。興味深いことにこれらの経路の少なくとも一部において、LAMP2 のスプライス・バリエントの一つである LAMP2C が、基質である RNA や DNA の受容体として働くことも明らかとなった。その一方で、CMA とは異なり Hsc70 が核酸のリソソームへの直接取り込みには影響を与えないことや、これらのシステムには LAMP2 非依存的な経路も存在することが示唆されるなど、RNautophagy および DNautophagy と CMA の類似点・相違点も少しずつ明らかになりつつある (図 1C)。

本研究のはじめに筆者らは LAMP タンパク質に着目した。以前、高度にグリコシレーションされた LAMP1, LAMP2 の存在意義は、「構造タンパク質」としてリソソーム膜を酸性環境から守っていることではないかという説があった。ところが Paul Saftig 博士の研究グループは LAMP1 と LAMP2 のダブルノックアウト MEF (mouse embryonic fibroblast) においてリソソームの形態が正常であることを示しており<sup>13)</sup>、現在のところ構造タンパク質説を支持する研究はない。また、LAMP がもし単なる構造タンパク質であるのなら、LAMP2 のようにわざわざ異なる細胞質側配列を持ったバリエントが存在する必要はないはずである。筆者らは、LAMP はそれぞれ特異的な分子機能を担っており、グリコシレーションの意義は LAMP タンパク質を分解から守るためであると考えている。

筆者らは CMA における LAMP2A のように LAMP2B あるいは LAMP2C も何かしらの物質のリソソームへの直接取り込みに関与しているのではないかと考え、このわずかに 11~12 アミノ酸残基の各 LAMP2 バリエントの細胞質側配

列に注目し、これらの配列に特異的に結合する細胞内構成物質の探索にあたった。筆者らは各 LAMP2 バリエントの細胞質側 11~12 アミノ酸残基に相当する配列をビオチン標識した合成ペプチドを作製し (図 2A)、細胞あるいは組織抽出液を用いてプルダウンアッセイを行った。各ペプチドによってプルダウンされたタンパク質を銀染色してみたところ、驚くほど多量のタンパク質が LAMP2C ペプチド特異的に相互作用することを見いだした (図 2B)。これらのタンパク質を質量分析により網羅的に解析したところ、興味深いことにその大部分が RNA 結合タンパク質であった。あまりにも多くのタンパク質が相互作用することから最初はアーティファクトかと疑ったが、その後 RNase A 前処理したサンプルではタンパク質と LAMP2C ペプチドのほとんどの相互作用が消失したこと (図 2C) などから、これらの相互作用が RNA を介したものであることが示唆された。そこで筆者らは LAMP2C の細胞質側配列が RNA と直接結合するかどうかを検討する目的で、LAMP2C ペプチドによる精製 RNA のプルダウンを試みた。結果は期待以上のもので、なんと実験に用いたマウス由来の精製トータル RNA のほぼすべてが LAMP2C の細胞質側配列と直接結合していた (図 2D)。さらに全長の LAMP2C が RNA と相互作用することも確認した。

## 5. RNautophagy の発見

以上から、LAMP2C を介したリソソームによる RNA の直接取り込み・分解機構が存在するのではないかと考えた。そこで筆者らは、単離リソソームを用いた実験系を立ち上げ、そもそもリソソームが RNA を直接取り込むような現象が存在するかどうか、検討した。このような *in*

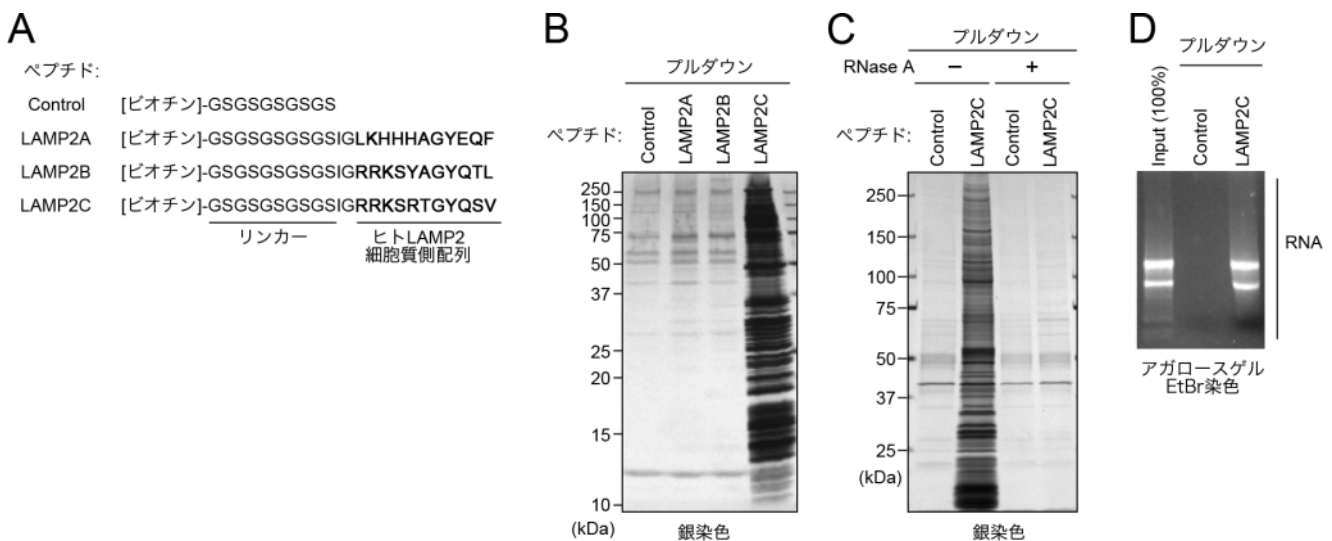


図 2 LAMP2C の細胞質側配列と RNA との結合 (文献 6 より改変引用)

(A) 実験に用いたペプチドの模式図. (B) 各ペプチドと細胞抽出液を用いてプルダウンアッセイを行った. (C) LAMP2C ペプチドと RNA の結合への RNaseA 前処理の影響. (D) マウス由来精製トータル RNA を用いたプルダウンアッセイ.

*vitro* 実験系はリソソーム以外のオルガネラにおけるタンパク質膜通過の研究や CMA 研究で古くから用いられている<sup>4,14)</sup>。例えば CMA に関しては ATP および Hsc70 存在下で、 $\alpha$ シヌクレイン (alpha-synuclein) などの基質となるタンパク質はリソソームに取り込まれる一方で、オвалブミン (ovalbumin) などの基質にならないタンパク質はまったく取り込まれないことが知られている。このことは実際に筆者らも自らの実験系で確認した。

筆者らは ATP および Hsc70 それぞれの存在下・非存在下で、単離リソソームと精製トータル RNA を混合し 37°C で 5 分間インキュベートした。続いて遠心分離によりリソソームを除去し、リソソーム外液中に残存した RNA の量を検討した。結果は驚くほどクリアで、ATP 存在下においてのみリソソーム外液中の RNA 量の劇的な減少が見られた (図 3A)。当初は筆者ら自身も、はたして RNA を、しかも 37°C で、リソソームなどという加水分解酵素の塊と言っても過言ではないオルガネラと共にインキュベートして大丈夫なものかと心配しながら実験を開始したが、ATP の非存在下では RNA の減少はほぼまったく見られなかった。コントロール実験として、ATP 存在下で単離リソソームを 37°C でインキュベートした後にリソソームを除去し、このリソソーム外液と RNA を混合し 37°C でインキュベートしても RNA の分解は見られなかった

(図 3B)。すなわち、筆者らの実験系においてリソソームからの加水分解酵素の「漏れ」といったようなことはほとんど起きていないことを確認した。

同時に筆者らは上記の条件においてリソソーム内部に相当する RNA の存在の有無を検討した。前述と同様にインキュベーションし、4°C で反応を停止させた後に、サンプルに RNaseA を加えてリソソーム外液中やリソソームの表面に残存した RNA を分解し、RNaseA 処理抵抗性の RNA を検出した。実験の結果、前述の結果にちょうど対応するように、今度は ATP 存在下においてのみ RNaseA 処理抵抗性の RNA が検出された (図 3C)。さらに筆者らは免疫電子顕微鏡法によっても、ATP 存在下においてリソソーム内部に直接取り込まれた RNA の存在を確認した (図 3E)。以上により、ATP 依存的に RNA がリソソームへ直接取り込まれるという新現象を初めて明らかにした。

意外だったのは、Hsc70 が RNA の取り込みへまったく影響を与えなかったことである (図 3A, C)。Hsc70 自体が RNA と結合することが報告されていることから<sup>15)</sup>、リソソームによる RNA の直接取り込みシステムが存在するのであれば、CMA と同様に Hsc70 が関わっているだろうと予想していたのだが結果は逆であった。

また、ATP の存在下および非存在下において単離リソソームによる RNA 分解を検討したところ、ATP 存在下に

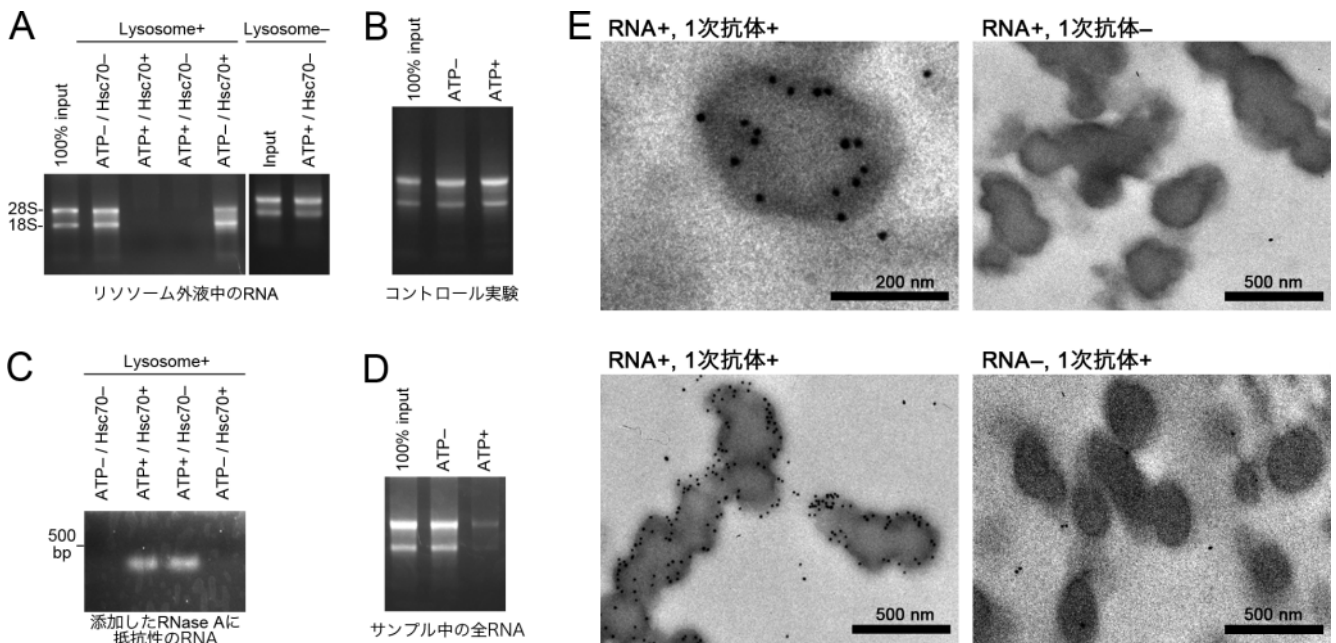


図3 RNautophagy (文献6より改変引用)

(A, C) 単離リソソームを ATP (エネルギー再生系), Hsc70 の存在下・非存在下で精製 RNA と混合して 37°C で 5 分間インキュベーション後、リソソーム外液中の RNA 量を解析した (A)。インキュベーション後、4°C で反応を止め、RNaseA を加えてリソソーム外部の RNA を分解し、リソソーム内部に相当する RNA 量を検討した (C)。リソソームを ATP の存在下・非存在下でインキュベートした後のリソソーム外液のみを RNA とインキュベーションし、RNA 量への影響を検討した。(D) 単離リソソームを ATP の存在下・非存在下で精製 RNA と混合しインキュベーション後、サンプル中の全 RNA 量を解析した。(E) 免疫電子顕微鏡法による、ATP 存在下でリソソームに直接取り込まれた RNA の観察。

おいてのみ RNA が分解された (図 3D)。以上のように筆者らは、「リソソームが ATP 依存的に RNA を直接内部に取り込み分解する」という新規 RNA 分解システムを見いだした。RNA の A と autophagy (自食作用) の a を小文字でつなげ、このシステムを「RNautophagy」(アールエヌオートファジー) と名付けた。

## 6. RNautophagy における LAMP2C の関与

さて、以上からリソソームによる RNA の直接取り込み、分解システムが見いだされたわけであるが、これだけではそもそもの始まりである LAMP2C がはたしてこの RNautophagy に関わっているのかどうか、不明である。RNautophagy における LAMP2C の関与を検討するため、筆者らはまず LAMP2C を過剰発現させた細胞における RNA 代謝量の変化の有無を検討した。その結果、各 LAMP2 パリアントのうち LAMP2C を発現させた細胞においてのみ、RNA 代謝量の有意な増加が観察された (図 4 A)。さらに LAMP2C 過剰発現細胞由来の単離リソソームにおいて RNautophagy 活性が上昇していた (図 4B)。これとは反対に、LAMP2 のノックアウトマウスから単離したリソソームにおいては RNautophagy 活性が低下していた (図 4C)。以上の結果から、少なくとも RNautophagy の一部において LAMP2C が RNA 受容体として働いていると考えられた。一方で LAMP2 ノックアウトマウス由来のリソソームにおいても RNautophagy 活性が完全に失われる

ことはなかったことから (図 4C)、どうやら RNautophagy には LAMP2 非依存的な経路も存在するようである。この点は今後、さらなる研究が必要であろう。

マウスにおける *Lamp2c* mRNA の臓器別発現を調べてみると、脳、中でもグリア細胞と比較して特に神経細胞において非常に高い<sup>6)</sup>。また、心臓、骨格筋、肝臓、腎臓でも比較的高く発現している<sup>6)</sup>。筆者らは、LAMP2 ノックアウトマウスの脳において、野生型と比較して有意にトータル RNA 量が増加していることを見いだした (図 4D)。このことから、*in vivo* においても RNautophagy が機能していることが示唆された。

## 7. DNautophagy

ここまで主に RNautophagy に関する研究について述べてきたが、筆者らはこれに続いて少なくとも *in vitro* においては、RNA だけでなく DNA も ATP 依存的にリソソームに直接取り込まれ、分解されることを見だし、これを DNautophagy と名付けて報告した<sup>7)</sup>。

この DNA 分解に関する研究はもともと、LAMP2C の細胞質側配列と相互作用するタンパク質の中に、RNA 結合タンパク質に加えて DNA 結合タンパク質が見られたことに端を発する。精製したプラスミド DNA を用いたプルダウンアッセイを行ったところ、プラスミド DNA と LAMP2C の細胞質側配列との特異的な直接結合が見られた (図 5A)。さらに単離リソソームによる生化学的解析や

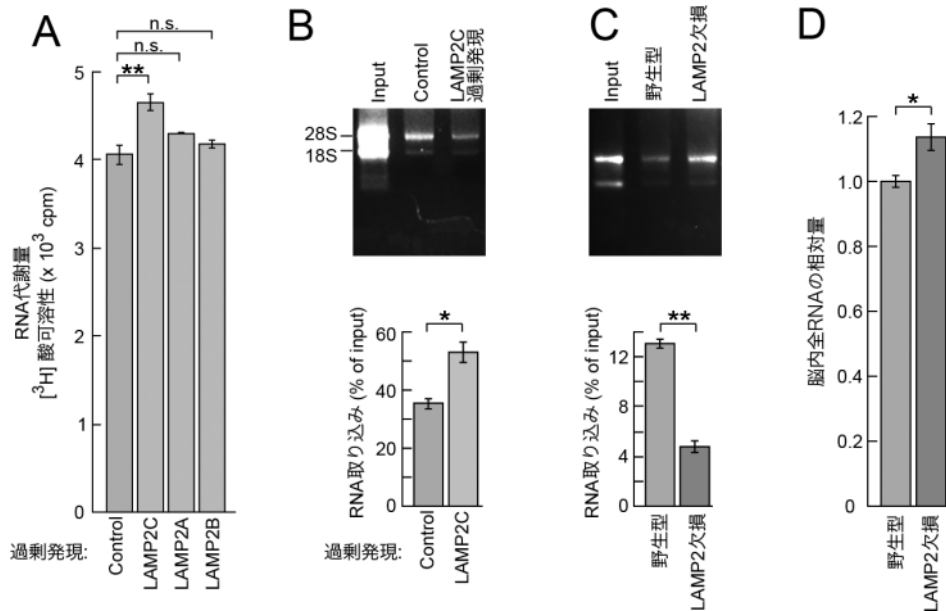


図 4 LAMP2C の RNautophagy における関与 (文献 6 より改変引用)

(A) 各 LAMP2 を過剰発現させた HeLa 細胞における RNA 代謝量. (B) LAMP2C 過剰発現細胞由来の単離リソソームにおける RNautophagy 活性. (C) LAMP2 欠損マウス由来の単離リソソームにおける RNautophagy 活性. (D) 野生型および LAMP2 欠損マウスの脳における RNA の相対量.

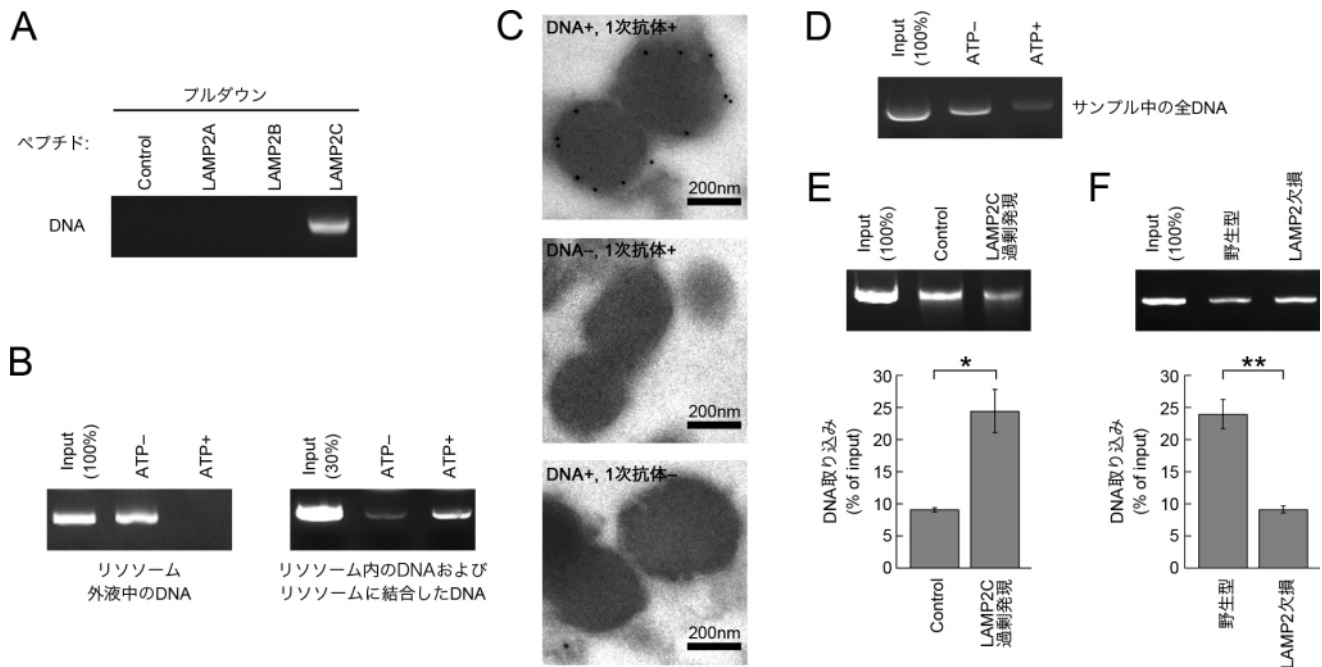


図5 DNautophagy (文献7より改変引用)

(A) 各ペプチドとプラスミドDNAを用いたプルダウンアッセイ。(B) 単離リソソームをATPの存在下・非存在下でプラスミドDNAと混合しインキュベーション後、リソソーム外液中のDNA量(左)および、リソソーム中(結合したものを含む)のDNAの量(右)を解析した。(C) 免疫電子顕微鏡法による、ATP存在下でリソソームに直接取り込まれたDNAの観察。(D) ATPの存在下・非存在下におけるリソソームによるDNAの直接分解。(E) LAMP2C過剰発現細胞由来の単離リソソームにおけるDNautophagy活性。(F) LAMP2欠損マウス由来の単離リソソームにおけるDNautophagy活性。

免疫電子顕微鏡法を用いた解析から、プラスミドDNAがATP依存的にリソソームに直接取り込まれ、分解されることを見いだした(図5B~D)。この単離リソソームによるDNAの直接取り込み活性もまた、RNautophagyの場合と同様、LAMP2Cの過剰発現により上昇し、逆にLAMP2ノックアウトマウス由来のリソソームでは減少していた(図5E~F)。これらの結果から、DNautophagyの少なくとも一部においてもLAMP2Cが核酸受容体として働くと考えられた。

また*in vitro*系において、単離ミトコンドリアDNA(mtDNA)も直接リソソームに取り込まれ分解されることも見いだされた<sup>7)</sup>。以上の*in vitro*の結果から筆者らは、細胞内では外来DNAや細胞質中mtDNAなどがDNautophagyの基質となるのではないかと考えている。

#### 8. 多様な動物におけるLAMP2C相同性分子

LAMP2Cについて興味深いのは、LAMP2AやLAMP2Bの細胞質側配列がニワトリやマウス、ヒトにおいて少しずつ異なるのに対し、LAMP2Cの細胞質側配列がこれらの動物で完全に一致していることである(図6A)。さらには線虫やショウジョウバエはそれぞれ1種類ずつしかLAMPオルソログを持たないが、これらオルソログの細胞質側配列は3種類のLAMP2を含むヒトLAMPの中でLAMP2C

の細胞質側配列と最も高い相同性を示す(図6B)。そこで線虫およびショウジョウバエのLAMPオルソログの細胞質側配列に相当するペプチドも作製し、これらを用いてプルダウンアッセイを行ったところ、どちらの配列においてもLAMP2C配列と同様の高いRNAおよびDNA結合能が見られた(図6C, D)。このようにLAMP2Cの細胞質側配列やその核酸結合能が進化的に広く保存されていることから、RNautophagyやDNautophagyはかなり古くから動物細胞において営まれてきた現象であると推測される。なお、酵母や植物ではLAMPオルソログに相当する遺伝子は見つっていない。

#### 9. RNautophagy/DNautophagyに関する今後の展望

以上のように、リソソームがRNAやDNAをATP依存的に直接内腔に取り込み、分解することや、少なくともその一部においてLAMP2Cが受容体として働くことが明らかとなった。これまで細胞質や核などリソソーム外でのRNA分解に関する研究は盛んに行われてきた。他方、リソソーム内部に局在するRNAやDNAの分解酵素が古くから知られていたにも関わらず、核酸を直接標的とするリソソームによる分解システムはまったく知られていなかった。また、マクロオートファジーには選択性のない「バルクな」経路と選択的な経路の両方が存在するが、選択的マ

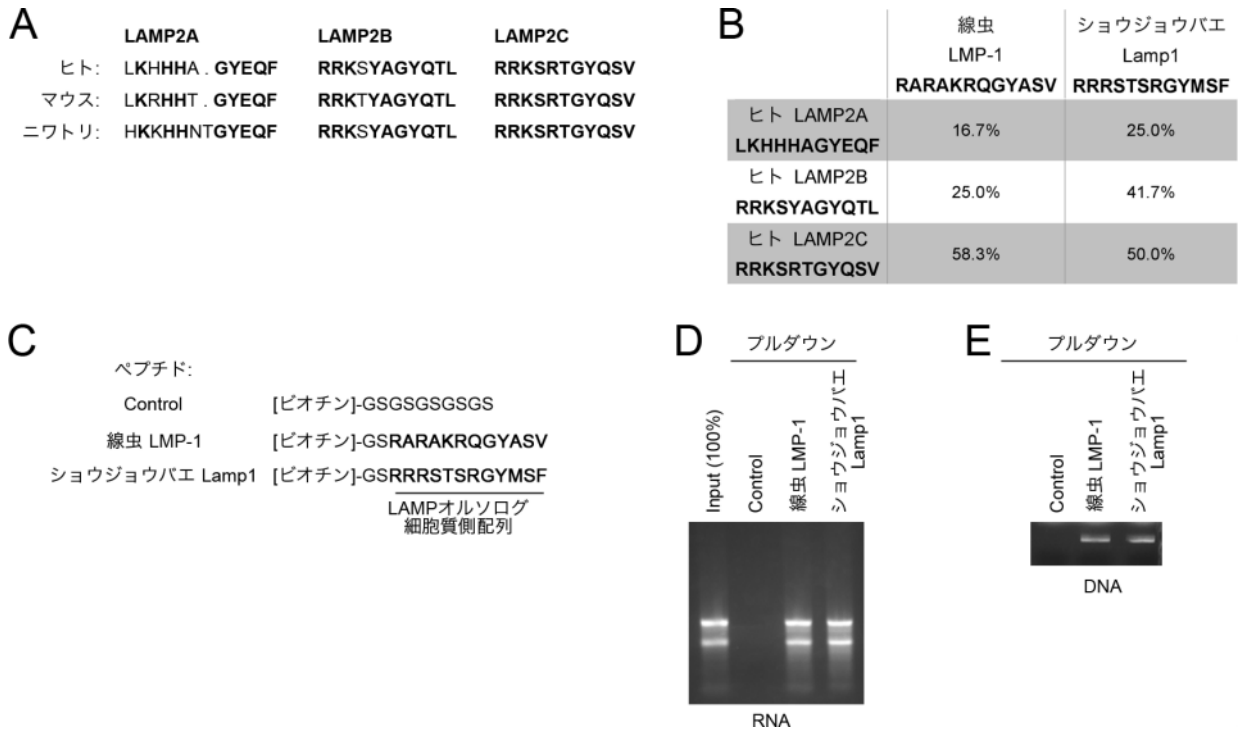


図6 LAMP2C 配列と核酸結合能の進化的保存

(A) 動物種間での各 LAMP2 の細胞質側配列の比較. (B) ショウジョウバエおよび線虫 LAMP オルソログと各ヒト LAMP2 間での細胞質側配列の同一性. (C) 実験に用いたペプチドの模式図. (D) 各ペプチドとマウス由来精製トータル RNA を用いたプルダウンアッセイ. (E) 各ペプチドとプラスミド DNA を用いたプルダウンアッセイ. (B, D, E) は文献 6, 7 より改変引用.

クロオートファジーの研究は専らタンパク質の標的を介したシステムに関するものに限られてきた. オートファゴソームという二重膜構造を介したシステムであるマクロオートファジーに比べ, リソソームによる細胞内の物質の直接取り込み・分解システムについては, 一部のタンパク質を標的とした経路である CMA を除いてこれまでほとんどわかっていなかった.

CMAにおいて, 基質タンパク質はシャペロンにより立体構造を解かれ, 膜貫通ポアを通過することでリソソームに取り込まれると言われている. RNautophagy および DNautophagy において基質の核酸が一体どのような経緯をたどってリソソームに取り込まれるのかはまだ不明である. 膜の内外を物質が直接移動するには, 膜を通過するか, 膜が陥入などの形態変化を起こすことが必要と考えられるが, 基質核酸がどちらの過程を経てリソソームに入るのか, 今後明らかにしていきたい. 単離リソソームへの RNA の取り込みに関しては RNA の種類による選択性は観察されなかったが, 実際の細胞内・生体内では RNA に関する選択性が存在する可能性があり, 今後の検討課題である.

疾患との関連では, *LAMP2* はダノン病の原因遺伝子であることがわかっている<sup>16)</sup>. ダノン病とは精神発達遅滞と

心筋症を伴う筋疾患である. 多くの患者では全ての *LAMP2* バリエーションの発現欠損が原因となっているが, 一部の患者では *LAMP2B* 特異的エクソン内の変異による *LAMP2B* の発現欠損が原因だと考えられている. ただし *LAMP2B* エクソン変異を原因とする患者は比較的症状が軽いという報告もあり<sup>17)</sup>, *LAMP2A* や *LAMP2C* の機能, すなわちリソソームによる直接的な生体高分子の取り込み・分解システムが生体の恒常性維持に必要であることが示唆される.

また, 近年複数の神経および筋疾患において繰り返し配列が異常伸長した RNA の発病への関与が示唆されているが<sup>18)</sup>, これらの疾患と細胞内の RNA 代謝との関係については多くが謎のままである. *LAMP2C* がマウスの組織のうち脳 (特に神経細胞) および心筋・骨格筋において高発現していることから, RNautophagy とこれらの疾患との関連は興味深いテーマである. 一方で核酸を認識するタイプの Toll 様受容体 (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) は後期エンドソーム/リソソームに局在しており, 外来性の RNA や DNA がこれらのオルガネラに取り込まれることで炎症などの免疫反応が惹起されることが知られている<sup>19,20)</sup>. また, 近年ストレスを受けた細胞などにおいて mtDNA がミトコンドリアから放出されることや<sup>21)</sup>, mtDNA が後期

エンドソーム／リソソームに局在する DNA 認識 Toll 様受容体である TLR9 を介して炎症を引き起こすことも報告されている<sup>22)</sup>。LAMP2 は古くはマクロファージのマーカーとして用いられており、マクロファージの活性化に伴って LAMP2 の発現も上昇するとの報告もある<sup>23,24)</sup>。加えて筆者らはマクロファージ由来の培養細胞において LAMP2C が高発現していることも観察しており、免疫応答反応や炎症における RNautophagy や DNautophagy の関与もまた、今後の重要な研究テーマと言えよう。以上のように RNautophagy や DNautophagy の疾患との関わりや生理的意義についても今後、研究を進めていきたいと考えている。

## 10. CMA とパーキンソン病

さて時系列としては逆になるが、LAMP2C に着目する以前から筆者らは CMA とパーキンソン病に関連した研究を行ってきた。パーキンソン病と CMA の関連については、まず 2004 年に CMA の基質の一つとして、パーキンソン病と深く関わる  $\alpha$  シヌクレインが報告された<sup>25)</sup>。パーキンソン病はアルツハイマー病について頻度の高い神経変性疾患であり、運動の障害を主症状とする。中脳黒質のドパミン作動性ニューロンの変性脱落が運動症状の主な原因であると考えられている。疾患の大半を占める孤発性パーキンソン病では、病理学的特徴として残存ドパミン神経細胞内にレビー小体と呼ばれるタンパク質封入体が認められ、 $\alpha$  シヌクレインはこの封入体の主成分である<sup>26)</sup>。また症例数は少ないものの家族性パーキンソン病家系において、 $\alpha$  シヌクレインのミスセンス変異<sup>27)</sup>、あるいは  $\alpha$  シヌクレイン遺伝子の重複 (duplication または triplication) が病因となること<sup>28,29)</sup> などから、 $\alpha$  シヌクレインの異常蓄積がパーキンソン病におけるドパミン神経変性の主要な原因であることが示唆されている。

Ana Maria Cuervo 博士らは  $\alpha$  シヌクレインが CMA の基質であること、変異型  $\alpha$  シヌクレインは LAMP2A とより強く結合し CMA を阻害することを報告した<sup>25)</sup>。一方筆者らは、別のパーキンソン病関連分子である ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) に着目し長年研究を進めてきた。まずパーキンソン病とは異なる病態を示す gracile axonal dystrophy (gad) マウスにおいて、筆者らはポジショナルクローニングにより、Uchl1 遺伝子変異による UCH-L1 発現欠損が神経軸索変性の原因であることを明らかにした<sup>30)</sup>。UCH-L1 の分子機能としては、脱ユビキチン化活性が最初に報告された<sup>31)</sup>。無細胞系の実験系では UCH-L1 がユビキチンリガーゼとして働くことも報告されている<sup>32)</sup>。筆者らは、UCH-L1 の新たな分子機能として、酵素活性非依存的にモノユビキチンを安定化させること<sup>33)</sup>、酵素活性非依存的に Cdk ファミリータンパク質のキナーゼ活性を増強することを見いだした<sup>34)</sup>。最近ヒトでも UCH-

L1 の機能欠損変異が、パーキンソン病とは異なる病態を示す神経変性疾患の原因となることが報告された<sup>35)</sup>。一方パーキンソン病家系において UCH-L1 の I93M 変異が報告されている<sup>36)</sup>。筆者らは I93M 変異型 UCH-L1 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、このマウスでは黒質ドパミンニューロンが一部脱落することを報告した<sup>37)</sup>。以上の知見や、gad マウスでは黒質ドパミンニューロンの脱落は起きていないことから、I93M UCH-L1 は変異により新たに毒性を獲得していると考えられた。それでは新たな毒性とは何であろうか？ 筆者らは「タンパク質結合性の増加が毒性の原因となる」という仮説を考案し、実際に I93M 変異により他の多くのタンパク質との結合性が上昇するというところを見いだした<sup>38)</sup>。同時に UCH-L1 に結合する新規タンパク質を探索してきた。その過程で UCH-L1 がモノユビキチン以外にも、LAMP2A, Hsc70, Hsp90,  $\alpha/\beta$ -tubulin, Cdk1, Cdk4, Cdk5, Cdk6 など様々なタンパク質と結合することを見いだした<sup>34,38~40)</sup>。

筆者らは共免疫沈降により、UCH-L1 が CMA 経路における主要分子である LAMP2A, Hsc70, Hsp90 と結合することを確認した<sup>39)</sup>。さらに I93M 変異により、これらと UCH-L1 の結合性が上昇した。UCH-L1 が LAMP2A の細胞質側配列 (11~12 アミノ酸残基) と結合するかを調べるために、このアミノ酸配列をビオチン標識したペプチドを作製した。このペプチドを用いたプルダウンアッセイにより、UCH-L1 は LAMP2A の細胞質側に結合することがわかった。さらに培養細胞を用いた実験では、I93M UCH-L1 が CMA による  $\alpha$  シヌクレイン分解を阻害した<sup>39)</sup>。望月秀樹教授 (現在大阪大学大学院医学系研究科) との共同研究では、黒質ドパミンニューロンにおいて I93M UCH-L1 により  $\alpha$  シヌクレインが蓄積すること、I93M UCH-L1 存在下では  $\alpha$  シヌクレインによるドパミン神経の脱落が促進されることを示した<sup>41)</sup>。以上から、I93M UCH-L1 による CMA 阻害や  $\alpha$  シヌクレイン蓄積は、I93M UCH-L1 の細胞毒性の少なくとも一端を担っていると考えている。

症例の大部分を占める孤発性パーキンソン病発症において、酸化ストレスは代表的な危険因子であると考えられている。興味深いことに、患者剖検脳においては UCH-L1 が酸化ストレスの最も主要な標的となっていることが報告されている<sup>42)</sup>。筆者らが酸化修飾型の UCH-L1 について解析したところ、酸化修飾型 UCH-L1 は I93M UCH-L1 と近似した分子性質を示すことが明らかとなった<sup>38)</sup>。また、酸化修飾型 UCH-L1 と LAMP2A や Hsc70 との結合性についても野生型と比較して上昇することを見いだした<sup>40)</sup>。以上から孤発性パーキンソン病において、酸化修飾型 UCH-L1 が CMA 阻害や  $\alpha$  シヌクレイン蓄積の一因に関与する可能性を考えている。ただし現在のところ、*in vivo* において CMA による  $\alpha$  シヌクレイン分解は示されておらず、今後



の検討が必要である。

以上、簡単にはあるが、CMAとパーキンソン病に関する研究と、そこに至るまでの筆者らの研究についても紹介した。このようなCMA研究を行っていたことが、前に述べた新たな核酸分解システム発見の元となった発想につながったと言えよう。

## 11. おわりに

本稿を執筆中の5月、リソソームの発見者であるChristian de Duve博士が逝去された。心よりご冥福をお祈りしたい。近年のプロテオーム解析によると、リソソームの限界膜上には数百種類ものタンパク質が存在すると報告されている<sup>43,44</sup>。リソソームというと単なる受動的なゴミ捨て場のように思われる読者の方も多岐にわたるが、多数の膜タンパク質により制御される非常にダイナミックな小器官である可能性がある。特に膜輸送を介さない経路、すなわちリソソームによる直接的な生体高分子の取り込み・分解システムに関しては、まだまだ未開拓の分野であり、不明な点も多い。RNAutophagy発見の経緯は非常に心躍らされる体験であった。これからもリソソームの未知の機能解明に挑戦していきたい。

## 文 献

- Appelmans, F., Wattiaux, R., & de Duve, C. (1955) *Biochem. J.*, **59**, 438–445.
- de Duve, C., Pressman, B., Gianetto, R., Wattiaux, R., & Appelmans, F. (1955) *Biochem. J.*, **60**, 604–617.
- Novikoff, A., Beaufay, H., & de Duve, C. (1956) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 179–184.
- Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P., & Dice, J.F. (1989) *Science*, **246**, 382–385.
- Cuervo, A.M. (2011) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 535–541.
- Fujiwara, Y., Furuta, A., Kikuchi, H., Aizawa, S., Hatanaka, Y., Konya, C., Uchida, K., Yoshimura, A., Tamai, Y., Wada, K., & Kabuta, T. (2013) *Autophagy*, **9**, 403–409.
- Fujiwara, Y., Kikuchi, H., Aizawa, S., Furuta, A., Hatanaka, Y., Konya, C., Uchida, K., Wada, K., & Kabuta, T. (2013) *Autophagy*, **9**, 1167–1171.
- Eskelinen, E.L. (2006) *Mol. Aspects Med.*, **27**, 495–502.
- Eskelinen, E.L., Cuervo, A.M., Taylor, M.R., Nishino, I., Blum, J.S., Dice, J.F., Sandoval, I.V., Lippincott-Schwartz, J., August, J.T., & Saftig, P. (2005) *Traffic*, **6**, 1058–1061.
- Cuervo, A.M. & Dice, J.F. (1996) *Science*, **273**, 501–503.
- Dice, J.F. (1990) *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 305–309.
- Yang, Q., She, H., Gearing, M., Colla, E., Lee, M., Shacka, J. J., & Mao, Z. (2009) *Science*, **323**, 124–127.
- Eskelinen, E.L., Schmidt, C.K., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J., von Figura, K., Knecht, E., & Saftig, P. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 3132–3145.
- Murakami, H., Pain, D., & Blobel, G. (1988) *J. Cell Biol.*, **107**, 2051–2057.
- Matsui, H., Asou, H., & Inaba, T. (2007) *Mol. Cell*, **25**, 99–112.
- Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J.E., Oh, S.J., Koga, Y., Sue, C.M., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., DiMauro, S., & Hirano, M. (2000) *Nature*, **406**, 906–910.
- Hong, D., Shi, Z., Wang, Z., & Yuan, Y. (2012) *Clin. Neuro-pathol.*, **31**, 224–231.
- Cooper, T.A., Wan, L., & Dreyfuss, G. (2009) *Cell*, **136**, 777–793.
- Takeda, K. & Akira, S. (2005) *Int. Immunol.*, **17**, 1–14.
- Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G., & Choi, S. (2007) *Exp. Mol. Med.*, **39**, 421–438.
- Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A., Lee, S.J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., Fitzgerald, K.A., Ryter, S.W., & Choi, A.M. (2010) *Nat. Immunol.*, **12**, 222–230.
- Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., & Hauser, C.J. (2010) *Nature*, **464**, 104–107.
- Ho, M.K. & Springer, T.A. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 636–642.
- Garner, R.E., Malick, A.P., Yurochko, A.D., & Elgert, K.D. (1987) *Cell. Immunol.*, **108**, 255–268.
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., & Sulzer, D. (2004) *Science*, **305**, 1292–1295.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997) *Nature*, **388**, 839–840.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., & Nussbaum, R.L. (1997) *Science*, **276**, 2045–2047.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M.R., Muentzer, M., Baptista, M., Miller, D., Blacato, J., Hardy, J., & Gwinn-Hardy, K. (2003) *Science*, **302**, 841.
- Chartier-Harlin, M.C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Leveque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., & Destee, A. (2004) *Lancet*, **364**, 1167–1169.
- Saigoh, K., Wang, Y.L., Suh, J.G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., & Wada, K. (1999) *Nat. Genet.*, **23**, 47–51.
- Wilkinson, K.D., Lee, K.M., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J.M., & Pohl, J. (1989) *Science*, **246**, 670–673.
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z., & Lansbury, P.T., Jr. (2002) *Cell*, **111**, 209–218.
- Osaka, H., Wang, Y.L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y.J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S., & Wada, K. (2003) *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 1945–1958.
- Kabuta, T., Mitsui, T., Takahashi, M., Fujiwara, Y., Kabuta, C., Konya, C., Tsuchiya, Y., Hatanaka, Y., Uchida, K., Hohjoh, H., & Wada, K. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 12615–12626.
- Bilguvar, K., Tyagi, N.K., Ozkara, C., Tuysuz, B., Bakircioglu, M., Choi, M., Delil, S., Caglayan, A.O., Baranoski, J.F.,

- Erturk, O., Yalcinkaya, C., Karacorlu, M., Dincer, A., Johnson, M.H., Mane, S., Chandra, S.S., Louvi, A., Boggon, T.J., Lifton, R.P., Horwich, A.L., & Gunel, M. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 3489–3494.
- 36) Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P.J., Wilkinson, K.D., & Polymeropoulos, M.H. (1998) *Nature*, **395**, 451–452.
- 37) Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kwon, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M., & Wada, K. (2007) *Neurochem. Int.*, **50**, 119–129.
- 38) Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., & Wada, K. (2008) *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 1482–1496.
- 39) Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., & Wada, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 23731–23738.
- 40) Kabuta, T. & Wada, K. (2008) *Autophagy*, **4**, 827–829.
- 41) Yasuda, T., Nihira, T., Ren, Y.R., Cao, X.Q., Wada, K., Setsuie, R., Kabuta, T., Wada, K., Hattori, N., Mizuno, Y., & Mochizuki, H. (2009) *J. Neurochem.*, **108**, 932–944.
- 42) Choi, J., Levey, A.I., Weintraub, S.T., Rees, H.D., Gearing, M., Chin, L.S., & Li, L. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 13256–13264.
- 43) Bagshaw, R.D., Mahuran, D.J., & Callahan, J.W. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 133–143.
- 44) Chapel, A., Kieffer-Jaquinod, S., Sagne, C., Verdon, Q., Ivaldi, C., Mellal, M., Thirion, J., Jadot, M., Bruley, C., Garin, J., Gasnier, B., & Journet, A. (2013) *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 1572–1588.
-