

主論文の要旨

**Degradation of Mutant Protein Aggregates within
the Endoplasmic Reticulum of Vasopressin Neurons**

〔 バソプレシンニューロンの小胞体内での
変異タンパク凝集体の分解 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：有馬 寛 教授)

宮田 崇

【緒言】

小胞体 (ER) は分泌タンパクおよび膜タンパクの折りたたみを担う細胞内小器官である。一方で、種々の要因により正常な構造に折りたたまれなかった異常タンパクが ER に蓄積すると ER ストレスが生じる。ER ストレスは神経変性疾患や糖尿病を始めとした多くの疾患の病態に関与している。一般に ER に蓄積した異常タンパクはユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) による ER 関連分解 (ERAD) あるいは ER-phagy により分解されるが、いずれも異常タンパクを ER から細胞質へ輸送あるいは隔離した後に分解が行われる。その一方で、ER 内で凝集体を形成し ER から細胞質へ輸送隔離されることのできなくなった異常タンパクに対してどのような分解機構が働くかは未だ明らかとなっていない。家族性中枢性尿崩症 (FNDI) は、生後数ヶ月から数年で緩徐に進行する尿崩症症状を呈する常染色体優性遺伝性疾患であり、バソプレシン (AVP) ニューロンの ER に変異ニューロフィジン II (NPII) が蓄積することによる ER ストレスが病態の主体である。我々は FNDI モデルマウスを作出し AVP ニューロンの ER の一部に凝集体が隔離された区画 (ER-associated compartment: ERAC) が形成されることを見出し、さらには ERAC 形成が ER ストレスを緩和する細胞保護的な機構であることを明らかにしてきた。ER ストレスが病態に関与する他の疾患モデルでも FNDI マウスと同様に ERAC の形成が報告されていることから、ERAC の形成は普遍的な機構であると考えられる。その一方で、ERAC 内の異常タンパクの分解機構は未だ不明であり、その機序の解明は ER ストレス応答のさらなる理解に繋がると考えられる。

【目的】

AVP ニューロンにおける異常タンパク凝集体の分解機構を解明する。

【方法】

(1) FNDI マウスの視索上核 (SON) において、連続ブロック表面走査電子顕微鏡 (SBF-SEM) を用いて AVP ニューロンにおける ERAC と周囲のオルガネラとの構造的関係性を解析した。(2) FNDI マウスの AVP ニューロンにおいて、変異 NPII と正常 NPII、ER シャペロン BiP およびライソソーム関連分子 LAMP2、cathepsin D の細胞内局在を蛍光免疫染色および免疫電顕により検討した。また、FNDI×GFP-LC3 マウスを作出し、ファゴフォアのマーカーである GFP-LC3 の発現を、同じく蛍光免疫染色および免疫電顕にて観察した。(3) FNDI マウスにオートファジー誘導薬のラパマイシン (Rapa) あるいはライソソーム阻害薬のクロロキン (CQ) を腹腔内注射にて 1 ヶ月間投与し、SON における封入体の数の変化を免疫組織化学にて検討した。

【結果】

(1) SBF-SEM の解析により、FNDI マウスの AVP ニューロンにおいて ERAC は小さな突起構造を有していることが観察された (図 1A)。その ERAC の突起構造と正常 ER の連続性が確認され (図 1B, C)、さらには ERAC へのライソソームの融合が観察

された (図 1D, E)。(2) FNDI マウスの蛍光免疫および免疫電顕において、変異 NPII が ERAC 内あるいは ER 内の凝集体に確認された一方で、正常 NPII は分泌顆粒内に認められた (図 2A-G)。下垂体後葉では変異 NPII は確認されず、正常 NPII の発現のみが認められた (図 2H, I)。また、ERAC の膜構造に BiP の集積を認めた (図 3A-E)。FNDI×GFP-LC3 マウスの解析において、ERAC の膜構造に GFP-LC3 の発現が認められた (図 3F-I)。さらには ERAC 内に LAMP2、cathepsin D が確認された (図 4)。(3) ERAC の数は Rapa 投与により有意に減少し、一方で CQ 投与により有意に増加した (図 5)。

【考察】

ERAC は、 α_1 アンチトリプシン欠損症、ニューロセルピン封入体脳症、セイピノパチー、常染色体優性網膜色素変性症などの疾患モデルでも確認されている。これまで ERAC と正常 ER との連続性は明らかとされていなかったが、本研究で SBF-SEM を用いることによってその連続性が詳細に示された。

免疫電顕による検討において、変異 NPII は分泌顆粒内には認められず ERAC 内に封じ込められていた。この結果は、様々な AVP 遺伝子変異から生じた変異 AVP 前駆体が ER 内に蓄積しているという過去の *in vivo* および *in vitro* の結果と一致していると考えられた。

今回の研究で、ERAC は BiP および LC3 が発現する膜に囲まれていること、ERAC へのライソソームの融合しており ERAC 内部にライソソーム関連分子が発現していること、さらには薬理的解析により ERAC 内の凝集体はライソソームによる分解を受けていることが示された。この ER 内部におけるライソソームによる分解 (ERAC degradation) と macro-ER-phagy の違いは、macro-ER-phagy では ER 内の異常タンパクは ER の一部とともにファゴフォアで完全に隔離された後にライソソームが融合して分解している一方で、ERAC degradation では ER 内の異常タンパクは ER から隔離されずに ER の内部でライソソームにより分解されるという点である。また、ERAC は SBF-SEM で電子密度の高い膜構造に囲まれており、またこの膜構造は免疫電顕において LC3 の発現が確認されていることから、ERAC はファゴフォアの特徴を持つ膜構造に囲まれていると考えられ、この点において ERAC degradation は micro-ER-phagy とも異なっている。以上のことから、ER 内に蓄積した異常タンパクが ER 内部で分解されることが本研究において初めて示されたと言える。しかしながら、ERAC degradation において、変異 NPII と同様にライソソームの加水分解酵素である cathepsin D が ERAC 内に封じ込められ正常 ER に広がっていかないメカニズムに関しては明らかとなっておらず、今後解明すべき課題である。

過去に当研究グループの解析より、自由飲水下の FNDI マウスの AVP ニューロンにおいては変異 NPII が ERAC に封じ込められている限り AVP ニューロンにおいて macro-ER-phagy および細胞死が誘導されない一方で、間歇脱水負荷を継続して与えた FNDI マウスの AVP ニューロンでは変異 NPII の凝集体が ER 内腔全体に散らばり、や

がてはオートファジー関連細胞死へ至ることが報告されている。以上を踏まえると、ERAC の形成と同様に ERAC degradation は、AVP ニューロンを細胞死から保護するために必要不可欠なメカニズムであると考えられる。

AVP ニューロンにおいて、野生型 AVP 前駆体は UPS による分解を受けることが報告されている。さらに最近の研究では、ERAD における E3 リガーゼである Sel1L-Hrd1 タンパク複合体を欠損させると AVP ニューロンの ER において著しい拡張ならびに野生型 AVP 前駆体の凝集体が蓄積し、AVP 欠乏のために多尿を呈することが報告された。これらの報告からは ERAD が AVP ニューロンの細胞機能の維持に必要不可欠であるといえるが、一方で本研究の結果は、AVP ニューロンにおいて異常タンパク凝集体を ER から細胞質へ輸送することなく ER 内部で分解するという ERAD とは別のメカニズムが存在することを示している。

【結語】

FNDI マウスの AVP ニューロンにおいて、ER 内で凝集体を形成した異常タンパクは、ER から輸送隔離されることなく、ER 内部でライソソームにより分解されていることが示された。