

ペリー症候群責任遺伝子産物によるオートファジー調節機構についての検討

研究分担者： 斉木臣二 順天堂大学医学部神経学 准教授

### 研究要旨

本分担研究では、ペリー症候群の分子病態を解明するため、2種類の培養細胞ライン(HeLa細胞、SH-SY5Y細胞)を用いて、オートファジー調節機構への影響を検討した。

まず、ペリー症候群責任遺伝子 p150glued をコードした野生型及び変異型プラスミド DNA を作製し、培養細胞に導入し、フローサイトメータにより p150glued 導入細胞のみを抽出し、ウェスタンブロッティングにて検討したところ、LC3-II/actin ratio の上昇、p62 レベルの上昇を認めたため autophagic flux が抑制されていると判断した。さらに免疫細胞染色を行ったところ、変異型 p150glued 導入細胞では、細胞内小器官の分布変化が認め、特にリソソームが核周囲から細胞膜直下に移動する傾向が顕著であった。また mTOR 染色でも mTOR 陽性リソソームが細胞膜直下に移動していることから、PI3K/mTOR 経路の活性化による autophagosome 形成抑制が生じていることが考えられた。以上から p150glued はリソソームの分布を変化させ autophagic flux を変化させると同時に mTOR 活性化による autophagosome 産生を抑制すると考えられた。

#### A. 研究目的

p150glued の野生型、変異型遺伝子をコードするプラスミドを培養細胞に導入し、オートファジー機能の変化を評価することにより、ペリー症候群とオートファジー機能の相関を評価することを目的とする。

#### B. 研究方法

##### I. autophagic flux の生化学的評価

変異型 p150glued の autophagic flux における役割を正確に評価する為に、GFP-p150glued construct を作製し、HeLa 細胞への導入を行う。さらに GFP 陽性細胞を抽出し、ウェスタンブロッティングにて検討することで p150glued の影響をより正確に評価できると考えた。

まず、野生型 p150glued、変異型 p150glued (G71R) を 6-well plate に播いた HeLa 細胞に、

lipofectamine 2000 (1 ul/1ug plasmid DNA) を用いて遺伝子導入した。24 時間後にトリプシンを添加し培養細胞を回収し、FACS Aria (BD 社製) を用いて、GFP 陽性細胞のみを回収し RIPA buffer を用いて蛋白を回収した。

Western blotting 法にて上記細胞抽出蛋白中の p62、LC3-II、actin 発現量を定量し検討した。

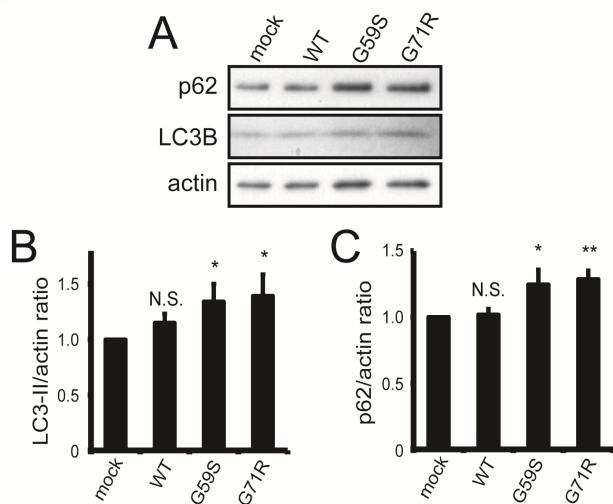
##### II. 細胞生物学的検討

昨年度報告したように、培養細胞内に変異型 p150glued を導入した場合、5 - 15% 程度の遺伝子導入された細胞に p150glued 凝集体を認めた。同細胞でのオートファジー機能変化を評価するため、免疫細胞染色にて各種オルガネラマーカーを用いて、細胞内小器官の分布変化を検討した。またオートファジー調節機構として最も解明が進む PI3K/mTOR 経路を評価するため、mTOR の免疫染色を併用した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については順天堂大学倫理委員会より承認を得、行った。

### C. 研究結果



結果 1 :

上図 A のように変異型 p150glued 過剰発現により、p62 の増加と LC3B の増加を認める。図 B、C は定量画像である。

結果 2 :

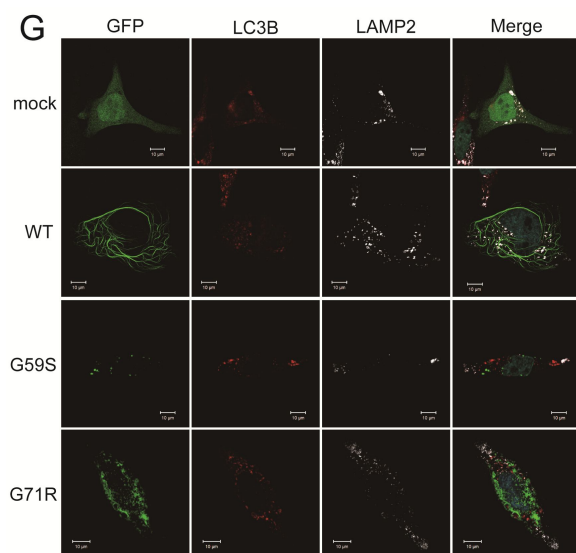


図 G のように変異型 p150glued (G59S または G71R) 過剰発現により LAMP2 陽性顆粒が細胞膜直下に移動し、autophagosome (LC3 陽性) との共局在が減少する。また LAMP2 陽性顆粒 (リソソームと考えられる) は同様に mTOR 陽性である。

### D. 考察

autophagosome と lysosome は主に microtubule organizing centre (MTOC) 周辺で融合し、autophagic flux を最終段階で調整しうる (*Nat Cell Biol* 2011 13:453)。変異型 p150glued 強制発現により、autophagosome の分布もやや MTOC から離れ、diffuse に存在する傾向を持つが、lysosome は顕著に細胞膜直下に移動する。現在同現象を 3 次的に定量化する software を用いて、詳細に検証を進め、より広い意味での lysosome による autophagic flux 制御機構を解明したいと考えている。

### E. 結論

p150glued 変異型は、リソソーム分布を核周囲から細胞膜直下に移動させることにより、MTOC 周囲での autophagosome-lysosome 融合が障害されることにより autophagic flux が阻害される。同時に PI3K/mTOR 経路が活性化されることにより autophagosome 産生が抑制されることにより、flux 自体の阻害量はそれほど大きくならないと考えられる。

### F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, Hattori N.  
p150<sup>glued</sup>-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway.  
**PLOS ONE** 9:e94645 (2014)
2. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R.  
ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons.  
**FEBS Lett** 587:1316-25 (2013)

## 2. 学会発表（学術学会への招待公演のみ）

1. 斉木臣二 「パーキンソン病の臨床と創薬 - オートファジーとの関連を中心に-」 第 33 回ゲノム創薬フォーラム 東京大学医科学研究所 東京都 2013 年 7 月 25 日
2. 斉木臣二 「パーキンソン病病態とオートファジーの関連について」 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域 細胞内ロジスティクス・シンポジウム 淡路夢舞台国際会議場 兵庫県 2013 年 9 月 17-18 日
3. 斉木臣二 「オートファジーを標的としたパーキンソン病治療について」 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域 オートファジーの集学的研究・オートファジー研究会 ヤマハリゾート孺恋 静岡県 2013 年 12 月 19-21 日

## H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

出願番号： 2013-091903、発明者： 服部信孝、斉木臣二、井本正哉、藤巻貴宏、発明の名称： パーキンソン病予防治療剤、出願人： 学校法人順天堂、出願日： 2013 年 4 月 25 日

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表 ( 齊木 臣二 )

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, Hattori N.	p150 <sup>glued</sup> -associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway.	<i>PLOS ONE</i>	9	e64654	2014
Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R.	ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons.	<i>FEBS Lett</i>	587	1316-1325	2013