

# リソソーム病におけるオートファジーの異常およびその病態との関連に関する研究

2023

田中 裕大

## 目次

本論文で用いた省略語 .....	2
第1章 緒論 .....	3
第2章 実験試料および方法 .....	7
第3章 結果 12	
3-1 リソソーム病患者由来細胞株におけるオートファジー異常の解析 .....	12
3-2 Sandhoff 病モデル細胞の樹立およびオートファジーに関する検討 .....	13
3-3 Sandhoff 病モデルマウスにおけるオートファジーの解析と症状発現との関連に関する検討 .....	16
3-4 Sandhoff 病モデルマウスにおける SNARE タンパク質の発現量の変動に関する検討 .....	19
3-5 リソソームにおける SNARE タンパク質の局在量の変動に関する検討 .....	20
3-6 エンドサイトーシスの低下に伴うリソソーム局在性 SNARE タンパク質の変動に関する検討 .....	23
第4章 考察 .....	27
参考文献 .....	33
謝辞 .....	42

## 本論文で用いた省略語

略語	正式名称
4-MU	4-Methylumbelliferone
AMPK	AMP-activated protein kinase
AUTAC	Autophagy-targeting chimera
BSA	Bovine serum albumin
CALM	Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF receptor
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
iPS	Induced pluripotent stem cells
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LAMP2	Lysosomal-associated membrane protein 2
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
LIR	LC3 interacting region
MAM	Mitochondria-associated ER membrane
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NDP52	Nuclear dot protein 52
PBS	Phosphate-buffered saline
PROTAC	Proteolysis Targeting Chimera
SNAP29	Synaptosomal-associated protein 29
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SNIPER	Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Eraser
TBS	Tris-buffered saline
UBA	Ubiquitin-associated (domain)
VAMP8	Vesicle associated membrane protein 8

# 第1章 緒論

リソソームは、細胞内外の様々な物質の異化に関わる細胞内小器官(オルガネラ)である [De Duve C. and Wattiaux R. 1966]。その内腔側は酸性に保たれており、酸性 pH に至適をもつ多様な加水分解酵素(リソソーム酵素)を内包している。元来、リソソームは単に物質の分解を行うのみのオルガネラであると考えられてきたが、実は様々な機構により細胞内のエネルギー状態を感知し、Mechanistic target of rapamycin complex1(以下、mTORC1)等の活性を調節することで、ある種の代謝センサーのように機能することもわかってきた [Settembre C. *et al.* 2013, Ballabio A. and Bonifacino JS. 2020]。リソソームによる分解は、エンドサイトーシスなどによって細胞外の物質を取り込み分解するヘテロファジー経路と、細胞内成分を分解するオートファジー経路に大別される。また、近年の研究から、オートファジーには飢餓応答やオルガネラの品質管理、易凝集性物質の恒常的な分解、発生・分化など様々な生理的意義があることが多数報告され、高い注目を集めている [Mizushima N. 2007]。

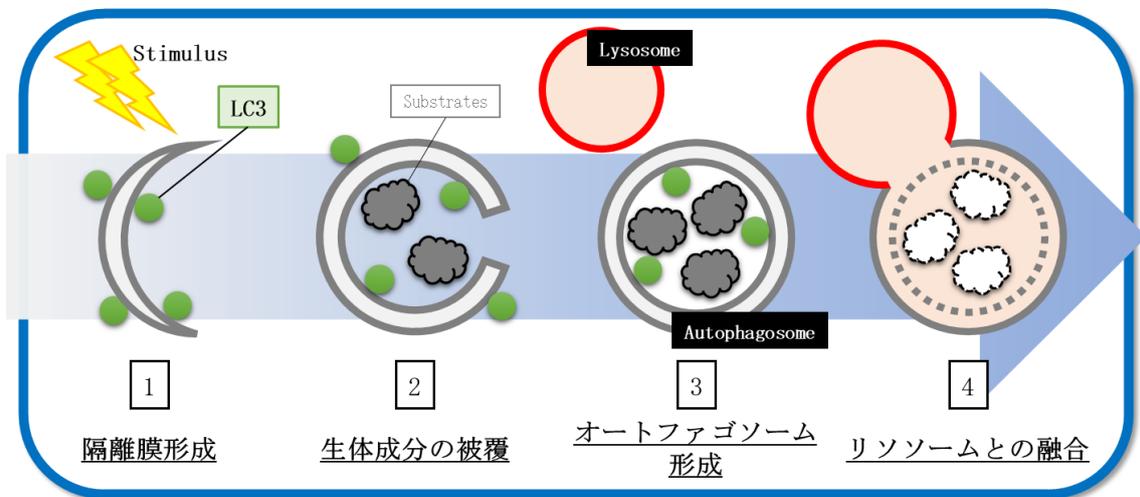


図1 オートファジーの略図

マクロオートファジー(以下、オートファジー)は、オートファゴソームと呼ばれるユニークなオルガネラによって細胞内成分を取り囲み、これがリソソームと融合することで内容物の分解を行う(図1)。オートファジーの活性は mTORC1 や AMP-activated protein kinase(以下、AMPK)などのリン酸化酵素によって制御されている [Kim J. *et al.* 2011]。オートファジーが誘導されると各オートファジー関連タンパク質が複合体を形成し、隔離膜(または、ファゴフォアとも呼ばれる。)の形成が起こる。このとき、小胞体とミトコンド

リアの膜接触部(Mitochondria-associated ER membrane ; MAM)が主な複合体形成の場となることが報告されている[Hamasaki M. *et al.* 2013]。隔離膜は、その後、末端同士が融合してオートファゴソームとなる(隔離膜は、扁平な構造をとってはいるが、実際には脂質二重膜を有する小胞であり、オートファゴソームはその末端同士が閉じた小胞であるため、脂質二重膜の二重膜構造をとっている。したがって、ここでは便宜上“融合”と記載したが、隔離膜からオートファゴソームへ変化するステップは、厳密には、膜融合ではなく膜の“解離”である。)。分解基質を内包したオートファゴソームとリソソームとの融合にあたっては、膜融合関連因子である Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (以下、SNARE)タンパク質が介在する。SNARE タンパク質は小胞輸送における膜融合に必須の因子であるが、オートファジーにおいては特に VAMP8、Syntaxin7、Syntaxin17、YKT6、SNAP29 が二対の複合体を形成する(図2)。これら SNARE タンパク質の欠損はリソソーム-オートファゴソーム融合をほぼ完全に阻害することが報告されている[Itakura E. *et al.* 2012, Matsui T. *et al.* 2018]。

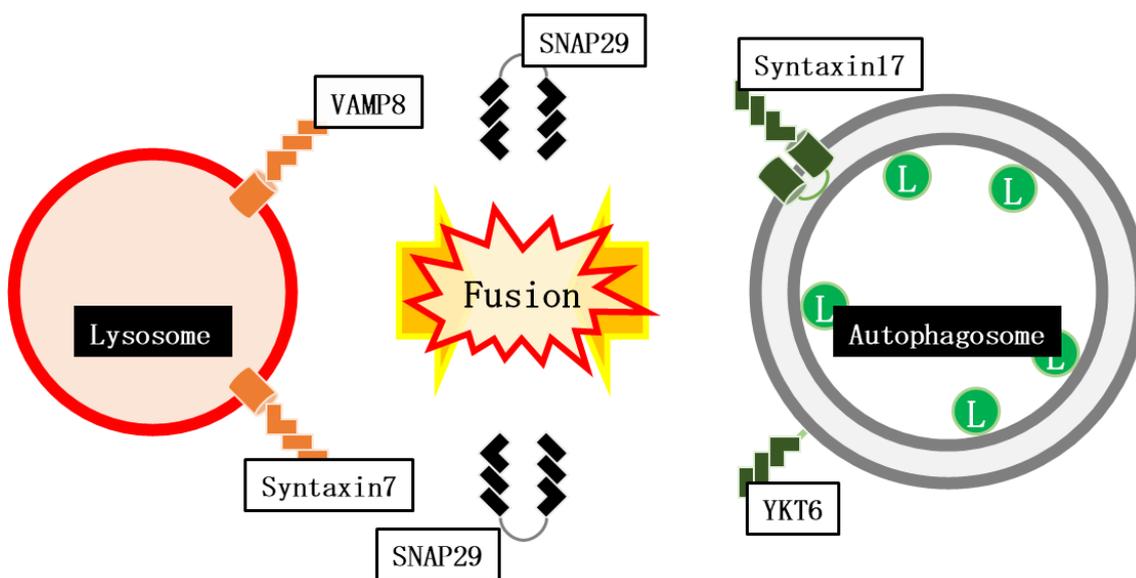


図2 オートファジーに関連する SNARE タンパク質とその局在  
 図中の L(緑色の円)は LC3 II を示す。

オートファジーは酵母からヒトに至るまで高度に保存された機構であり、生物個体の生存にとって必須である[Mizushima N. 2007, Kuma A. *et al.* 2004, Komatsu M. *et al.* 2005]。また、組織特異的にオートファジー不全をきたすよう遺伝子改変を加えたマウスでは、それぞれの組織・細胞種の機能異常が報告されている[Komatsu M. *et al.* 2006, Hara T. *et al.* 2006, Nakai A. *et al.* 2007, Komatsu M. *et al.* 2010, Mortensen M. *et al.* 2010, Taneike M. *et al.* 2010, Toshima T. *et al.* 2014, Takagi A. *et al.* 2016]。オ

オートファジーには、一般に良く知られている、飢餓等の刺激によって活性化される誘導性のオートファジーと、何らかの刺激がなくても引き起こされる恒常的なオートファジーとが存在する。さらに、以前まではオートファジーは非選択的な分解経路であると考えられていたが、最近の研究により、p62 や NDP52 など様々なアダプタータンパク質が介在し、選択的にターゲットを認識して分解する経路があることも知られるようになった[Johansen T. *et al.* 2011, Birgisdottir ÅB. *et al.* 2013, Gatica D. *et al.* 2018]。これらのアダプタータンパク質は、分解基質に付加されたポリユビキチン化タグと隔離膜上の LC3 のそれぞれに相互作用する分子内領域(前者を Ubiquitin-associated(UBA)ドメイン、後者を LC3-interacting region(LIR)と呼ぶ。)を有している。オートファジーにより、機能の低下・異常化したオルガネラやアミロイド $\beta$ 、 $\alpha$ -シヌクレインなど、生理的に悪影響を及ぼす物質は除去される。それに加え、近年、オートファジーの異常は多様な疾患の発症・増悪に関わることも多数報告されている。その中には、パーキンソン病[Narendra D. *et al.* 2008, Matsuda N. *et al.* 2010]やアルツハイマー病[Caccamo A. *et al.* 2010, Caccamo A. *et al.* 2011, Nilsson P. *et al.* 2013]、筋萎縮性側索硬化症(ALS)[Deng HX. *et al.* 2011, Wong YC. and Holzbaur EL. 2014, Goode A. *et al.* 2016]といった神経変性疾患やリソソーム病(または、ライソゾーム病、リソソーム蓄積症。本論文では、以下、リソソーム病とする)[Raben N. *et al.* 2007, Liao G. *et al.* 2007, Settembre C. *et al.* 2008, Takamura A. *et al.* 2008, Ishibashi S. *et al.* 2009]、クローン病[Fujita N. *et al.* 2009, Nys K. *et al.* 2013, Nguyen HT. *et al.* 2013]といった難病が含まれており、それら難治性疾患の詳細な病態メカニズムの解明や新規の治療法開発といった観点から、幅広い分野で多くの研究が進められている。

リソソーム病は、リソソーム酵素またはその関連因子の遺伝的欠損によって発症する代謝異常疾患である。各因子が本来担っていた生体内基質の分解が著しく滞り、主にリソソーム内に基質の過剰な蓄積が起こる。中枢神経系や末梢組織、あるいはその両方に多様な臨床症状を呈し、重症例では小児期に死に至る。現在 50 種類前後の疾患が知られており、本邦では難病にも指定(指定難病 19)されているが、根本的な治療法が確立されている疾患は多くない。欠損酵素を体外から補充する酵素補充療法が一部の疾患に適応されており、それに一定の治療効果が認められることから、酵素欠損および基質の過剰蓄積が症状発症・増悪のトリガーとなっていることは明らかであるが、その間を繋ぐメカニズムにもいまだ多くの不明点が残されている。この点についてはグリア細胞の異常活性化[Kawashita E. *et al.* 2009, Rama Rao KV. *et al.* 2016]や小胞体ストレス[d'Azzo A. *et al.* 2006, Sano R. *et al.* 2009]、Ca<sup>2+</sup>シグナリング異常[Pérez-Cañamás A. *et al.* 2017]、ミトコンドリア障害[de la Mata M. *et al.* 2016, Gegg ME. *et al.* 2016]などの報告があるものの、十分とは言いがたい。これらの報告はいずれも病態への寄与を完全には説明しきれておらず、また、何よりリソソーム内で引き起こされる異常がその外部のイベントに対してどのようにして影響を与え得るか不明である。

本疾患の治療に関しては、上述した酵素欠損療法に加え、遺伝子治療や蓄積基質の生合成を抑制する基質枯渇療法などが研究・開発されているが、問題点も多い。酵素補充療法に用いる酵素製剤は、現状、哺乳類細胞を用いて製造する必要があり、非常にコストがかかる。遺伝子治療に関しても同様に医療費の面で改善が必要と言える。また、酵素補充療法では1-2週間に1度の頻度で点滴によって製剤を投与する必要があり、患者への負担が大きい。さらに、リソソーム病の多くは重篤な中枢神経症状を特徴とする一方で、末梢からの投与では十分量の製剤を中枢神経系に届けることができず、満足のいく治療効果は見込めない。

リソソーム病においてはこれまでに、上述のように、複数の疾患でオートファジーに異常が認められることが報告されている[Raben N. *et al.* 2007, Liao G. *et al.* 2007, Settembre C. *et al.* 2008, Takamura A. *et al.* 2008, Ishibashi S. *et al.* 2009]。特に、リソソームとオートファゴソームとの融合が低下している可能性が示されているが、そのメカニズムに関しては不明であり、さらに、病態との関連についても情報は少ない。しかしながら、オートファジーが疾患に及ぼす影響について研究が進んでいるパーキンソン病等の他の疾患と比べ、リソソーム病はリソソームの機能低下を直接の原因として発症する疾患であるため、病態とのより密接な関係が推察される。また、神経変性疾患には症状発現の原因やメカニズムが非常に複雑なものが多いのに対し、リソソーム病は単一遺伝子疾患であることから、モデル系の構築は比較的容易であると言え、解析対象として有用であると考える。

上述のように、オートファジーの異常は複数の(蓄積基質の種類異なる)リソソーム病で報告されており、それらの異常がいずれも類似の機序で引き起こされるのであれば、複数種類のリソソーム病に対する共通の治療ターゲットとなる可能性がある。リソソーム病は、それ自体は非常に希少な疾患であるが、これまでにいくつかの神経変性疾患との関連が報告されている。例えば、GM2 ガングリオシドの蓄積症である Sandhoff 病のモデルマウス脳内ではアミロイド  $\beta$  やリン酸化 tau、 $\alpha$ -シヌクレインの増加が起こっており[Keilani S. *et al.* 2012]、また、大規模な疫学的調査の結果、グルコシルセラミドの蓄積症であるゴーシェ病の原因遺伝子 *GBA* の遺伝子変異はパーキンソン病のリスク因子として知られている[Sidransky E. *et al.* 2009]。このような報告は、実は様々な疾患がリソソームの異常と関係している可能性を示しているかもしれない。そこで本研究ではリソソーム病に着目し、リソソーム病におけるオートファジー異常の原因解明と、その病態との関連に関する検討を目的とし、解析を行った。

## 第 2 章 試料および方法

### 2-1 培養細胞およびマウス

SH-SY5Y は Dulbecco' s modified Eagle' s medium/Nutrient mixture F-12 Ham(D8062 : SIGMA ALDRICH) に対して 5% Fetal bovine serum(FB-1365 : Biosera) 、 100 $\mu$ g/mL Streptomycin(S6501 : SIGMA ALDRICH) 、 70 $\mu$ g/mL Penicillin G(P7794 : SIGMA ALDRICH) を添加し、37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。分化誘導の際は、血清濃度を 3%にし、10 $\mu$ M Retinoic acid(R2625 : SIGMA ALDRICH) を添加して 8 日間培養した [Cheung YT. *et al.* 2009]。

健常者由来皮膚繊維芽細胞株として F258 および F592 [Tatano Y. *et al.* 2008, Matsuoka K. *et al.* 2011] を、Tay-Sachs 病患者由来皮膚繊維芽細胞株として F218 [Matsuoka K. *et al.* 2011] を、I 型 Galactosialidosis 患者由来皮膚繊維芽細胞株として F598 [Oheda Y. *et al.* 2006] をそれぞれ使用した。繊維芽細胞株は、Nutrient mixture F-10 Ham(N6908 : SIGMA ALDRICH) に 10% Fetal bovine serum, 100 $\mu$ g/mL Streptomycin, 70 $\mu$ g/mL Penicillin G を添加し、37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

健常者 iPS 細胞株(201B7)は理研 CELL BANK から購入した。Tay-Sachs 病 iPS 細胞は Takahashi らの手法 [Takahashi K. and Yamanaka S. 2007] に従い、Tay-Sachs 病患者由来繊維芽細胞株 F218 から樹立した。健常者および Tay-Sachs 病 iPS 細胞は、それぞれ、SNL フィーダー上で 5ng/mL bFGF (RCHEMD005B : ReproCELL) を添加した Repro Stem (RCHEMD005 : ReproCELL) および Primate ES Cell Medium(RCHEMD005B : ReproCELL) を用い、37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。また、健常者およびテイ-サックス病 iPS 細胞は Neurosphere の作製を経て、Bissonnette らの手法 [Bissonnette CJ. *et al.* 2011] に従い、大脳皮質神経細胞へと分化させた。

C57BL/6 マウスを SLC 株式会社から購入し、野生型マウスとした。Sandhoff 病モデルマウス (C57BL/6 $\times$ 129sv) [Sango K. *et al.* 1995, Sango K. *et al.* 1996] は横浜市立大学医学部の山中正二准教授より分与いただき、C57BL/6 との交配で得られた子孫を解析に用いた。

### 2-2 抗体

Western blot 解析(WB)および免疫蛍光観察(IF)には下表に記す通り抗体を使用した。

標的	製品番号(製造元)	希釈比率	
		WB	IF
$\beta$ -ヘキソサミニダーゼ	Tsuji A. 博士より分与	1:1000	-
Cleaved caspase 3	9661S (CST)	-	1:100
EGFR	4267 (CST)	1:500	-

GAPDH	sc-32233 (Santa Cruz)	1:1000	-
GM2 ガングリオシド	Tai T. 博士より分与	-	1:20
LAMP1	ab24170 (abcam)	1:1000	1:300
LAMP2	ab25631 (abcam)	1:1000	1:200
LC3B	#3868S (CST)	1:1000	-
LC3B	M152-3 (MBL)	-	1:100
NeuN	ABN78 (MILLIPORE)	-	1:100
Rab7	#2094 (CST)	1:1000	-
SNAP29	ab181151 (abcam)	1:1000	-
Syntaxin7	NBP1-87497 (NOVUS)	1:1000	-
Syntaxin17	HPA001204 (SIGMA ALDRICH)	1:1000	-
VAMP8	HPA006882 (SIGMA ALDRICH)	1:1000	1:100
YKT6	HPA030818 (SIGMA ALDRICH)	1:1000	1:100

表 1 Western blot 解析および免疫蛍光観察に使用した抗体一覧

### 2-3 CRISPR-Cas9 システムによる *HEXB* 遺伝子のノックアウト

10% Fetal bovine serum を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient mixture F-12 Ham で SH-SY5Y を培養した。表 2 に示す配列のガイド RNA を GeneArt CRISPR Nuclease-OFP vector (A21174: Thermo Fisher Scientific) に組み込み、Opti-MEM (31985070: Thermo Fisher Scientific) 中で Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (L3000-015: Thermo Fisher Scientific) を用い、トランスフェクションを行った。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 48 時間培養を行った後、EPICS ALTRA (Beckman Coulter) で OFP 陽性の細胞を分離し、限界希釈を行った。酵素活性測定の結果、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ活性の低下していた細胞集団に対し、シーケンス解析および Western blot 法によるタンパク発現の確認、免疫蛍光観察による GM2 蓄積の確認を行った。

配列	5' - gtggccggcttgccgagacgctcggtttt -3'
----	--

表 2 *HEXB* ノックアウト用ガイド RNA 配列

### 2-4 細胞抽出液の作製

Phosphate-buffered saline (以下、PBS) (137mM NaCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68mM KCl, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) により洗浄した後、セルスクレーパーを用いて細胞を剥離し、回収した。4°C, 500×g で 5 分間遠心を行い、上清を除去した。酵素活性測定に用いるサンプルは、Milli-Q に 1 $\mu$ M Pepstatin A, 1mM EDTA を添加し、ペレットを懸濁した。Western blot 解析に用いるサンプルは RIPA バッファー (50mM Tris-HCl (pH7.6), 150mmol/l NaCl, 1%

Nonidet P40, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS)に 1 $\mu$ M Pepstatin A, 20 $\mu$ M Leupeptin, 1mM EDTA, 1mM PMSF, Phosphatase Inhibitor Cocktail を添加し、ペレットを懸濁した。いずれの抽出液も、超音波発生器 UD-201 (TOMY) による破碎を 10 回および超音波洗浄機 MUS-10 (EYELA) による超音波破碎を 10 分間水中で行った。

## 2-5 マウス脳凍結切片の作製

マウスから脳を摘出し、-80 $^{\circ}$ C で凍結させた。続いて、全脳を矢状方向に半分に切断し、半脳を Tissue-Tek O. C. T. compound (4583 : Sakura Finetek) を用いて -80 $^{\circ}$ C 条件下で包埋皿に固定した。Microm HM550 cryostat (Microedge Instruments) を使用して厚さ 10 $\mu$ m の切片を作製し、APS コートスライドガラス (APS-01 : 松浪硝子工業) に貼り付けた後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

## 2-6 タンパク質定量

DC protein assay kit (Bio-Rad) によりタンパク質量を定量した。標準物質としてウシ血清アルブミン (BSA) (P0914 : SIGMA ALDRICH) を用い、検量線を作成した。

## 2-7 酵素活性測定

$\beta$ -ヘキソサミニダーゼに対しては 4-MUG (M9130 : SIGMA ALDRICH) を、 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対しては 4-MUGal (M1633 : SIGMA ALDRICH) を用いて酵素活性測定を行った。細胞抽出液 15 $\mu$ L に各人工蛍光基質をそれぞれ 2mM および 1mM で 15 $\mu$ L 添加し、37 $^{\circ}$ C, pH4.2 条件下で 15 分間反応させた。続いて、0.2M Glycine-NaOH (pH10.7) で酵素反応を停止させ、4-MU の蛍光強度 (励起波長 355 nm, 蛍光波長 460 nm) を測定した。標準物質として 4-MU (M1381 : SIGMA ALDRICH) を使用し、検量線を作成した。

## 2-8 リソソーム画分の分離

培養細胞およびマウス組織を Dounce' s glass homogenizer (WHEATON TIGHT) に移し、0.25M Sucrose-5mM Sodium phosphate buffer (pH 7.5)/PBS を加えた。100 ストローク破碎を行い、4 $^{\circ}$ C, 1800 $\times$ g で 5 分間遠心した上清を回収した。同様の操作をさらに 2 度行った。回収した上清画分を 4 $^{\circ}$ C, 1800 $\times$ g で 5 分間遠心し、その上清を回収した。得られた上清をさらに 4 $^{\circ}$ C, 18500 $\times$ g で 30 分間遠心し、上清を除去した。また、この際の上清はマイクロソーム等を含む画分とした。ペレットを 0.25M Sucrose-5mM Sodium phosphate buffer/PBS で懸濁し、4 $^{\circ}$ C, 18500 $\times$ g で 30 分間遠心し、洗いを行った。0.25M Sucrose-5mM Sodium phosphate buffer/PBS に対して 100 : 1 で抗 LAMP1 抗体 (ab24170 : abcam) を添加した抗体希釈溶液でペレットを懸濁し、4 $^{\circ}$ C で一晩処理した。続いて、4 $^{\circ}$ C, 18500 $\times$ g で 30 分間遠心を行い、上清

を除去した。0.25M Sucrose-5mM Sodium phosphate buffer/PBS に対して 100 : 1 でビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体(BA-1000 : Vector Laboratories)を添加した抗体希釈溶液でペレットを懸濁し、室温で1時間、抗体処理を行った。4°C, 18500×g で30分間遠心を行い、上清を除去した。0.25M Sucrose-5mM Sodium phosphate buffer/PBS に対して 30 : 1 で BD IMag Streptavidin particle plus-DM(557812 : BD Biosciences)を添加した希釈溶液でペレットを懸濁し、室温で1時間、処理した。BD IMagnet (552311 : BD Biosciences)にチューブをセットに、30分間静置した。ネガティブ画分を除去し、壁面に付着する LAMP1 ポジティブ画分を PBS で回収した。また、この際のネガティブ画分は LAMP1 ネガティブ画分とした。4°C, 18500×g で30分間遠心を行った上清を除去した後、ペレットを RIPA バッファーで懸濁し、リソソーム画分とした。

## 2-9 Western blot 法

細胞抽出液は 6×SDS サンプルバッファー(125mM Tris-HCl(pH6.8), 4%(w/v) SDS, 20%(w/v) Glycerol, 0.01%(w/v) BPB, 10%(w/v) 2-Mercaptoethanol)を添加し、3分間煮沸した。SDS-PAGEは10%又は15%のアクリルアミドゲルを用い、SDS 泳動バッファー(25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1%(w/v) SDS)中で行った。電気泳動を行ったアクリルアミドゲルおよび濾紙、PVDF 膜を転写バッファー(25mM Tris, 192mM Glycine, 20%(w/v) Methanol)中で10分間振盪した後、TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL(Bio-Rad)を用いてタンパク質を PVDF 膜へと転写した。50% Blocking One(03953-95:Nacalai tesque)/Tris-buffered saline (以下、TBS) (25mM Tris-HCl(pH7.4), 137mM NaCl, 2.7mM KCl) でブロッキングを行った後、一次抗体希釈溶液を用い、4°Cで一晩処理した。続いて0.1% Tween20(30-5450 : SIGMA ALDRICH) /TBS で PVDF 膜を洗浄し、室温で1時間、二次抗体処理を行った。0.1% Tween20/TBS で洗浄し、さらに TBS で洗浄を行った。Western Lightning Plus-ECL(NEL104001EA : Perkin Elmer)又は Western Lightning Ultra(NEL113001EA : Perkin Elmer)を用いて発色させ、LAS 4000(GE Healthcare Life Sciences)又は ChemiDoc XRS+(Bio-Rad)で検出した。各バンド強度は、Image Lab™ software(6.0.1)を用いて定量した。

## 2-10 間接蛍光抗体法

培養細胞を 8well Lab-Tek chamber slides(177445 : Thermo Fisher Scientific)に播種し、4% パラホルムアルデヒドを用いて、4°Cで一晩固定した。LysoTracker Red DND-99(L7528 : Thermo Fisher Scientific)を用いて後期エンドソーム/リソソームを染色する場合は、固定を行う前に 1µM で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で2時間前処理した。PBS で洗浄した後、5% Goat Serum-1% BSA/PBS を用い、室温で2時間、ブロッキングを行った。各 well に一次抗体希釈溶液を添加し、4°Cで一晩処理した。続いて、0.1% Tween20/PBS で洗浄し、室温で1時間、二次抗体処理を行った。また、細胞核を染色する目的で Hoechst33258(861405 :

SIGMA ALDRICH)を同時に添加した。0.1% Tween20/PBS で洗浄した後、さらに PBS で洗浄を行った。50% Glycerol/PBS を滴下して封入し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700(ZEISS)で観察した。

## 2-11 エンドサイトーシスに関する解析

各細胞を dish に均等に播種し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 2 日間培養した。阻害剤処理群に対しては 20µM Chlorpromazine を、非処理群に対しては同量の Dimethyl sulfoxide(以下、DMSO)を添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 3 時間培養した。培地を無血清培地に交換し、阻害剤処理群には 20µM Chlorpromazine を、非処理群には DMSO を上記と同様に添加した。各サンプルに対して上皮成長因子(以下、EGF)を 10ng/mL で 0(EGF 未処理)、0.5、1、2 時間処理し、各時点で細胞抽出液を作製した。Western blot 解析によって EGF 添加後の EGF 受容体のタンパク質量の減少割合を定量解析し、エンドサイトーシスの進行程度として評価した。

## 2-12 化合物処理後の細胞生存率解析

細胞を 96well プレートに  $1 \times 10^4$  個/well で播種した。Rapamycin(R-5000 : LC Laboratories)および Chloroquine(C6628 : SIGMA ALDRICH)をそれぞれ 10µM および 15µM で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 72 時間処理した。阻害剤を添加した培地を除去し、培地に対して 10 : 1 で Cell Count reagent SF 試薬(07553-15 : Nacalai tesque)を添加した WST-8 希釈溶液で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 2 時間培養した。450nm の吸光度を測定し、化合物処理の有無における細胞生存率の変動を概算した。

## 第3章 結果

### 3-1 リソソーム病患者由来細胞株におけるオートファジー異常の解析

リソソーム病とは、リソソーム酵素やその関連因子の遺伝的欠損に起因した生体内基質の過剰蓄積によって引き起こされる先天性の代謝異常疾患である。酵素欠損および基質の過剰蓄積と症状発症・増悪とを繋ぐメカニズムには多くの不明点が残されており、本研究ではその点についてオートファジーに着目して解析を行った。これまでにいくつかのリソソーム病でオートファジーの異常が報告されており、それらの異常が引き起こされる原因の解明と病態との関連性の検討を本研究の目的とする。

当研究室ではすでに複数のリソソーム病患者由来繊維芽細胞株を所有している。各疾患の原因遺伝子とそれぞれがコードしている酵素タンパクおよびその蓄積基質は表 3 に示す通りである。まず、先行研究で報告されている事例が当研究室でも再現できるか、また、そのようなオートファジーの異常は蓄積基質の種類異なるリソソーム病間でも共通であるか解析を行った。ここでは、ガングリオシドの蓄積症(Tay-Sachs 病)とオリゴ糖の蓄積症(Galactosialidosis)について検討したが、いずれも Western blot 解析による LC3 II の増加(図 3A)、および免疫蛍光観察による Lysotracker の蛍光と LC3 のシグナルとの共染色箇所割合の有意な減少(図 3B)が観察された。LC3 は主要なオートファゴソーム(または、隔離膜)のマーカータンパク質であり、オートファジーの誘導に伴って LC3 I から LC3 II へと変換される[Mizushima N. *et al.* 2004, Mizushima N and Yoshimori T. 2007]。これらの結果は、以前に報告されている内容と同様に、複数のリソソーム病細胞において共通してリソソームとオートファゴソームとの融合が低下し、オートファジーの完遂が停滞していることを示していると考えられる。

疾患名	原因遺伝子	欠損酵素(/タンパク質)	主な蓄積基質
Galactosialidosis	<i>CTSA</i>	カテプシン A	末端シアル酸含有糖鎖
Gucher 病	<i>GBA</i>	$\beta$ -グルコシルセラミダーゼ	グルコシルセラミド
GM1 gangliosidosis	<i>GLB1</i>	$\beta$ -ガラクトシダーゼ	GM1 ガングリオシド
Niemann-Pick 病 C 型	<i>NPC1, NPC2</i>	NPC1, NPC2	コレステロール
Pompe 病	<i>GAA</i>	酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼ	グリコーゲン
Sandhoff 病	<i>HEXB</i>	$\beta$ -ヘキササミニダーゼ	GM2 ガングリオシド
Tay-Sachs 病	<i>HEXA</i>	$\beta$ -ヘキササミニダーゼ	GM2 ガングリオシド

表 3 本論文および参考文献中で言及しているリソソーム病

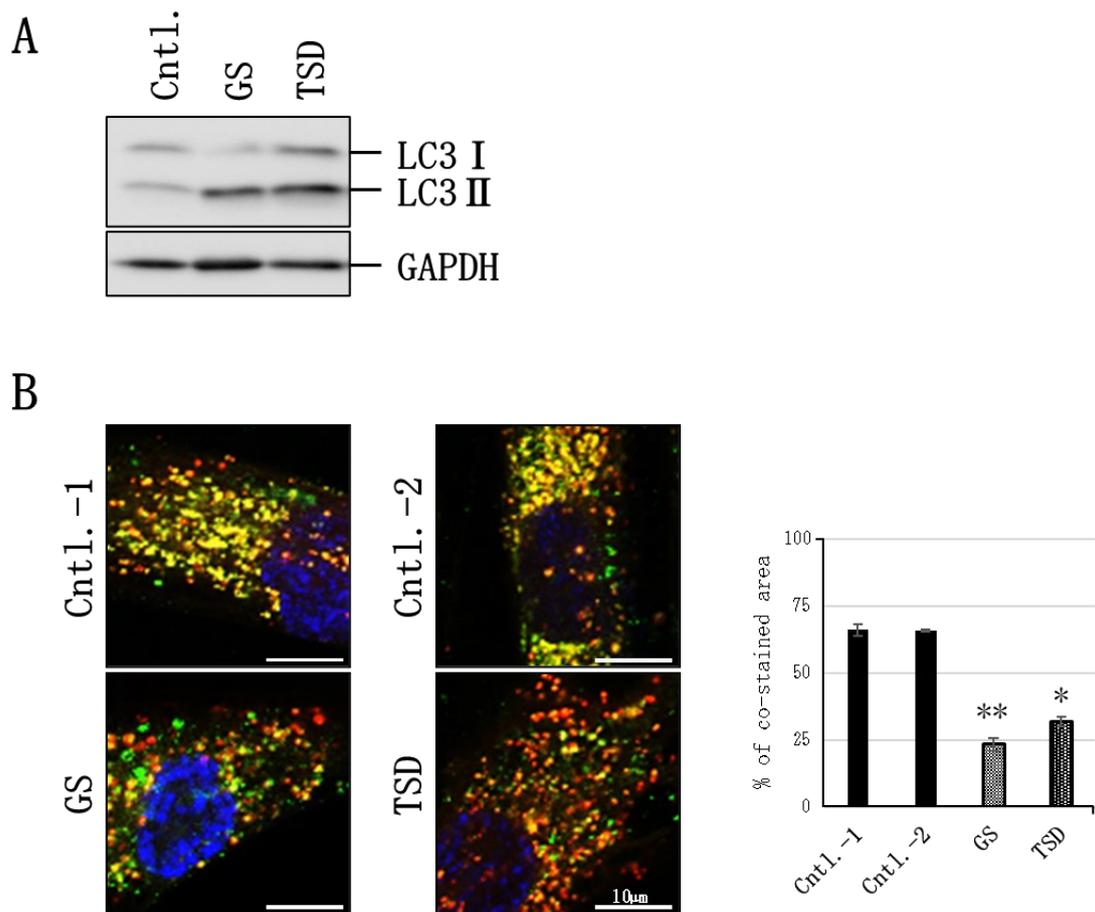


図3 複数のリソソーム病患者由来繊維芽細胞株において、リソソームとオートファゴソームの融合が障害されていた。

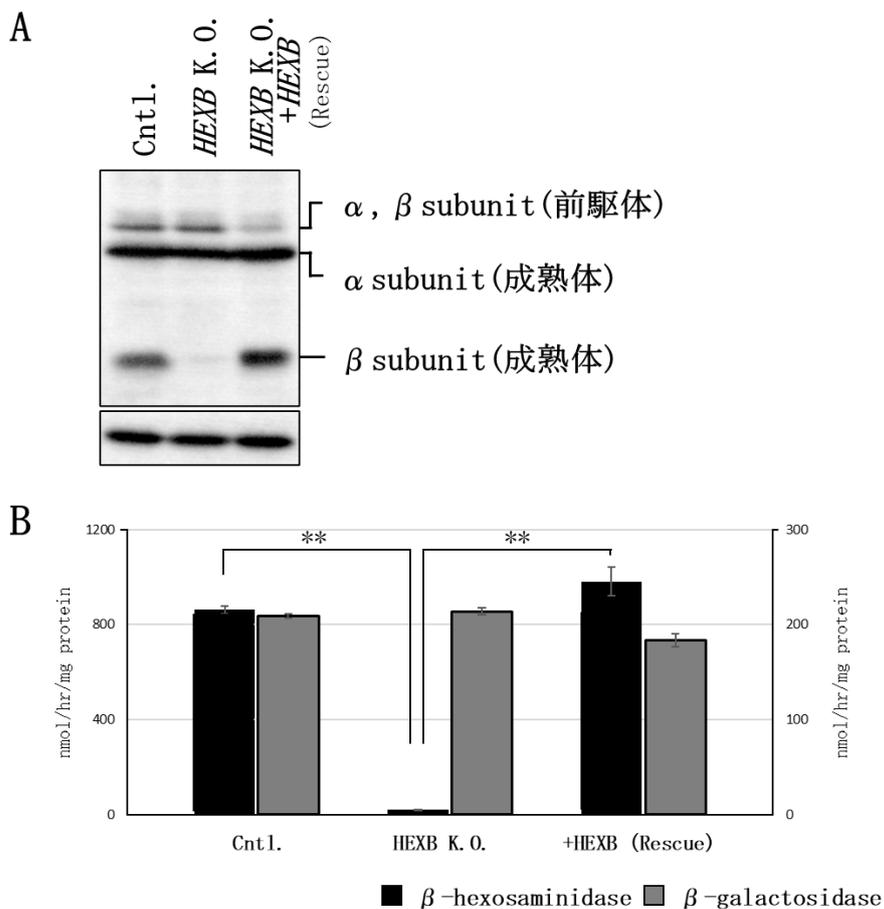
(A)ガラクトシアリドーシス(GS)および Tay-Sachs 病(TSD)患者由来繊維芽細胞において、オートファゴソームマーカーである LC3 II の増大が観察された。(B)ガラクトシアリドーシス(GS)および Tay-Sachs 病(TSD)患者由来繊維芽細胞を用いた免疫蛍光観察においてリソソーム-オートファゴソーム融合の程度について解析を行った。右グラフは、Lysotracker と LC3 のシグナルの共染色箇所を定量化した。エラーバーは標準誤差を示す。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  ( $n=3$ , vs. Cntl.-2, Student's t-test.)

### 3-2 Sandhoff 病モデル細胞の樹立およびオートファジーに関する検討

3-1 における検討およびこれまでの先行研究から、蓄積基質の種類異なる幅広いリソソーム病でオートファジーの異常が引き起こされている可能性が示された。リソソーム病は比較的多くの疾患で重篤な中枢神経症状を呈するというのが特徴であり、以降は神経系モデルを用いて解析を進めていくこととした。そこで、ヒト神経芽細胞腫の細胞株である SH-SY5Y に対して第 2 章で示すように CRISPR-Cas9 システムを利用した方法で *HEXB* 遺伝子を欠損(以下、K. O.)させ、Sandhoff 病モデル神経系細胞として解析に用いた。*HEXB* 遺伝子は  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの  $\beta$  サブユニットをコードしている。 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼは  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットのヘテロダイマーからなる HexA と、 $\beta$  サブユニットのホ

モダイマーからなる HexB に大別される ( $\alpha$  サブユニットのホモダイマーである HexS は不安定であり、生体内にはほとんど存在していない)。GM2 ガングリオシドの末端糖鎖を切断し GM3 ガングリオシドへと変換する反応を触媒する酵素は、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼのうち、HexA のみである。

Western blot 解析の結果、*HEXB* K. O. 細胞において  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ  $\beta$  サブユニットの成熟体を示すバンドの消失が確認された (図 4A)。また、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼおよび  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (リソソーム酵素の一種。ここではコントロールとして用いている。) の酵素活性を測定したところ、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ活性の著しい低下が観察された (図 4B)。さらに、免疫蛍光観察によって細胞内における GM2 ガングリオシドの蓄積の程度を解析した結果、*HEXB* K. O. 細胞において顕著な GM2 ガングリオシドの増加が認められ (図 4C)。以上の検討より、*HEXB* 遺伝子が目的通り K. O. されてことが確認でき、Sandhoff 病のモデル神経系細胞の樹立がなされた。また、*HEXB* K. O. 細胞に対して正常 *HEXB* 遺伝子を導入した細胞 (*HEXB* K. O. + *HEXB* (K. I.)) と記載) については、目的タンパク質の発現および  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ活性の回復、GM2 ガングリオシドの分解が起こっていることが確認された (図 4A-C)。



C

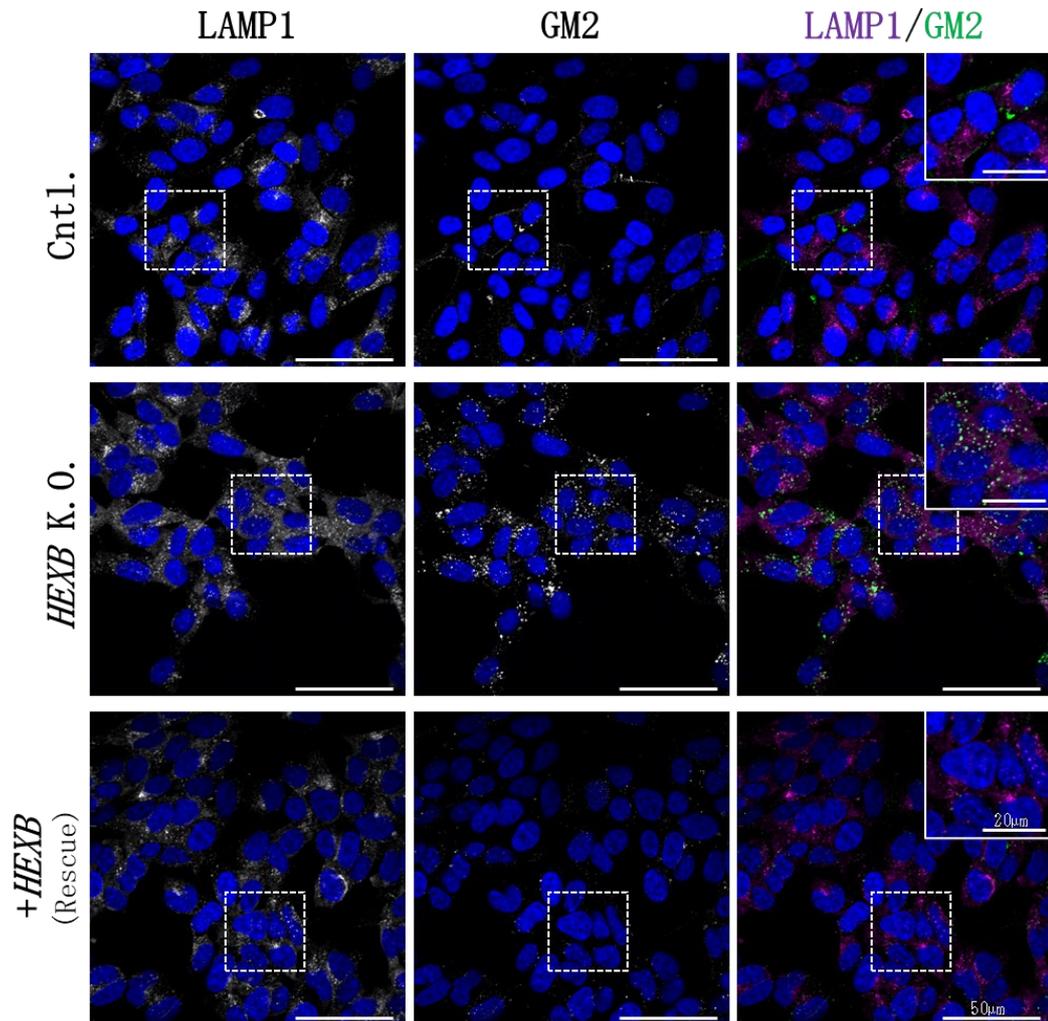


図4 リソソーム病モデル神経系細胞を樹立した。

(A) Western blot 法により、目的遺伝子の K. O. および導入が正しく行われているか確認した。(B) 各細胞のリソソーム酵素活性を測定した。詳しい手技については第2章に示す。ここでは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼをコントロールとして用いた。エラーバーは標準誤差を示す。\*\*:  $p < 0.01$  ( $n=3$ , Tukey's test.) (C) 免疫蛍光観察により、各細胞における GM2 ガングリオシドの蓄積の程度について解析を行った。スケールバーは、それぞれ記載の縮尺を示す。

SH-SY5Y 細胞の親株をコントロールとして、樹立した各細胞のオートファジーの変化について検討した。Western blot 解析によって、HEXB K. O. 細胞における LC3 II の有意な増大が認められ、さらにそれは正常遺伝子の導入によって正常化した(図5)。したがって、作製したリソソーム病モデル神経系細胞においてもオートファジーの異常が引き起こされたこと、また、オートファジー異常は、予想通り、リソソーム酵素の欠損に起因することが示された。

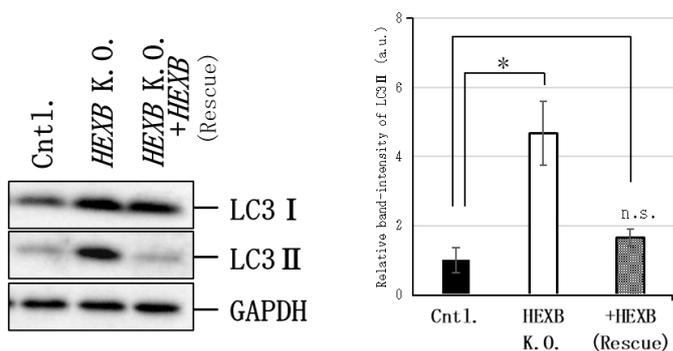


図5 リソソーム酵素の欠損によってオートファジーの異常が引き起こされた。

先に作製したリソソーム病モデル細胞を用いて、オートファジーの状態についてWestern blot法によって解析を行った。右グラフは、LC3 IIの相対バンド強度を定量化した。エラーバーは標準誤差を示す。\*:  $p < 0.05$  (n=3, Tukey's test.)

### 3-3 Sandhoff 病モデルマウスにおけるオートファジーの解析と症状発現との関連に関する検討

これまでの解析から、比較的幅広いリソソーム病でオートファジーの異常が認められること(図 3A, B)、さらに、それはやはりリソソーム酵素の欠損および基質の過剰な蓄積に起因すること(図 5)が示された。しかしながら、この点について病態との関連にまで言及している先行研究はほとんどみられない。そこで、Sandhoff 病モデルマウス[Sango K. *et al.* 1995, Sango K. *et al.* 1996]を解析試料として用い、本マウスにおける神経系の表現型(ここでは、これをリソソーム病としての症状とみなす)とオートファジー異常の各発現時期の比較も併せて行うこととした。Sandhoff 病モデルマウスの種々の表現型およびその発現時期は図 6 に示す通りであり、これをもとに、0-8 週齢を疾患初期(発症前)、9-12 週齢を疾患中期、13-16 週齢(本マウスはおおよそ 15-17 週齢で死に至る)を疾患後期と設定した。神経細胞死が認められ始めるのは 10 週齢頃からであり、この時期から各表現型の発現がみられることから、それぞれの異常の多くは神経細胞死に起因すると考えられる。

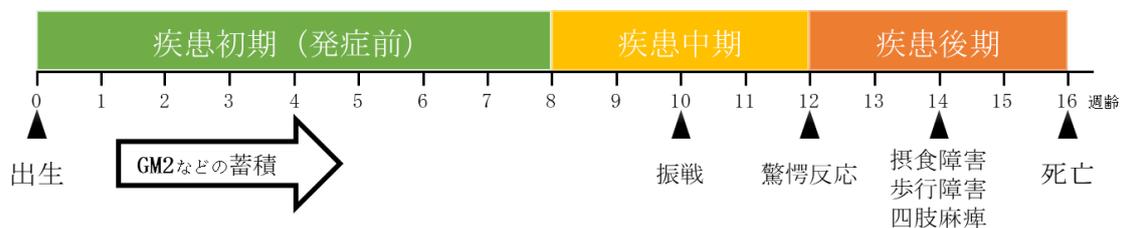


図 6 Sandhoff 病モデルマウスの表現型とその発現時期(週齢)

野生型(以下、WT)およびSandhoff 病モデルマウスそれぞれの全脳抽出液を用いてWestern blot 解析を行ったところ、培養細胞系での解析と同様に、LC3 II の有意な増加が観察された(図 7A, B)。また、免疫蛍光観察の結果から、LC3 と LAMP2 との共染色箇所が認められたことから(図 7C)、こちらも培養細胞系での解析同様、リソソーム-オートファゴソーム

融合の低下が示唆される。ここでは症状の発現前後でオートファジーの異常について比較を行うために8週齢および16週齢のサンプルを用いたが、興味深いことに、表現型の発現以前である8週齢で既にオートファジーに異常が認められた(図7A)。

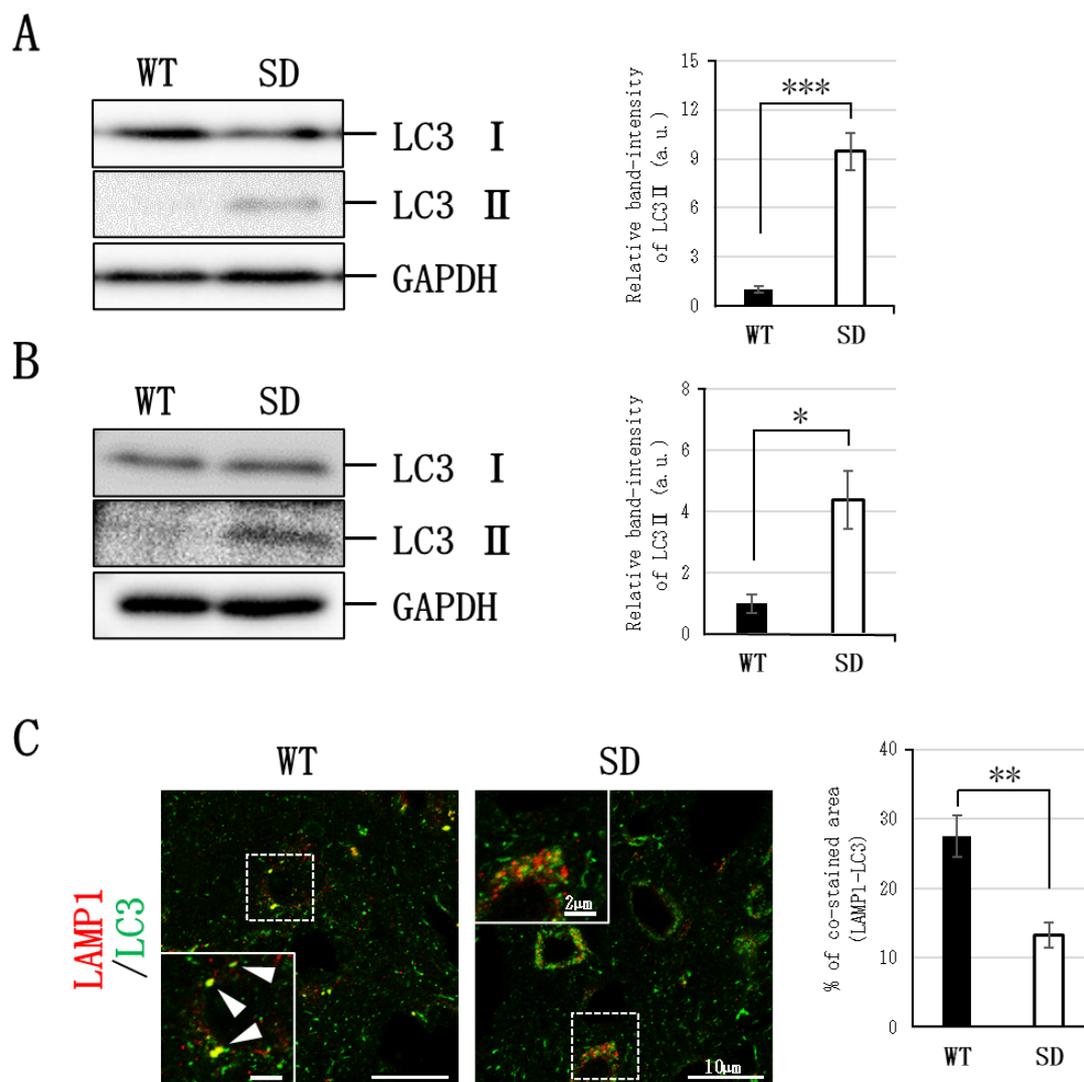


図7 Sandhoff病モデルマウス脳においてオートファジーの異常が観察された。

8週齢(A)または16週齢(B)の野生型(図中ではWTと示す)およびSandhoff病モデルマウス(図中ではSDと示す)の全脳抽出液を用いてWestern blot解析を行った。右グラフはLC3 IIの相対バンド強度を定量化した。(C)16週齢の野生型およびSandhoff病モデルマウスの脳切片(大脳皮質)を用いて組織免疫蛍光観察を行った。スケールバーは記載の縮尺を示す。右図はLAMP1とLC3のシグナルの共染色箇所割合を定量化した。エラーバーは標準誤差を示す。\*\*:  $p < 0.01$  ( $n=3$ , vs. WT, Student's t-test.)

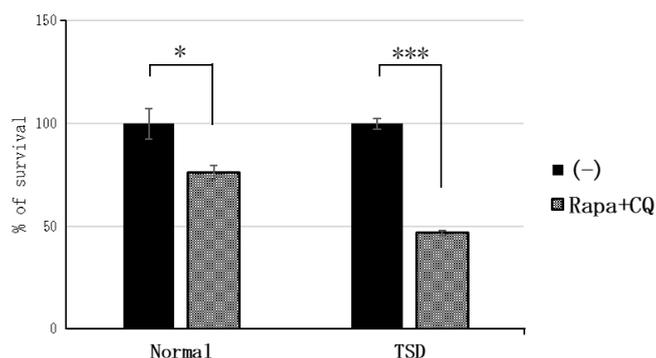
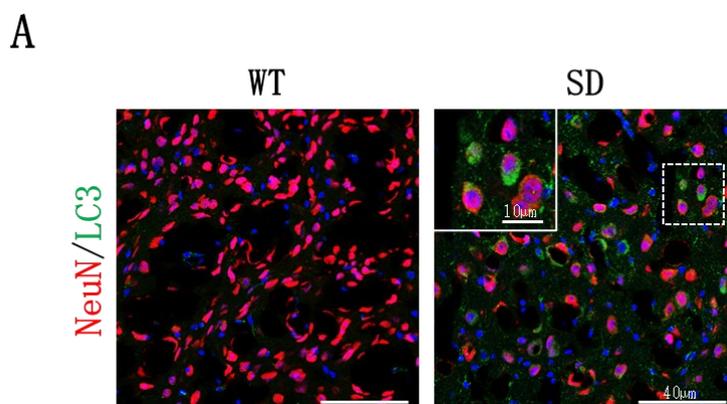


図8 オートファジーの異常によって神経細胞の生存率が有意に低下した。

健常者由来 iPS 細胞株 (201B7) および Tay-Sachs 病患者由来 iPS 細胞を第 2 章に示す方法で大脳皮質神経細胞へと分化させた。各神経細胞に対してラパマイシン (図中では Rapa と示す) およびクロロキン (図中では CQ と示す) をそれぞれ 10 $\mu$ M、15 $\mu$ M で処理し、WST8 試薬を用いて神経細胞の生存率について解析した。図中のエラーバーは標準誤差を示す。\*:  $p < 0.05$ 、\*\*\*:  $p < 0.005$  (n=3, vs. (-), Student's t-test.)

オートファジーの異常によって細胞・組織の機能不調が起こることは広く知られている [Komatsu M. *et al.* 2006, Hara T. *et al.* 2006, Nakai A. *et al.* 2007, Komatsu M. *et al.* 2010, Mortensen M. *et al.* 2010, Taneike M. *et al.* 2010, Toshima T. *et al.* 2014, Takagi A. *et al.* 2016]。実際に、iPS 細胞から分化させた神経細胞に対し、化合物の処理によってオートファジーの異常を惹起させたとき、細胞生存率の有意な低下が観察された (図 8)。このとき、Tay-Sachs 病患者由来細胞から樹立した iPS 細胞を用いて分化させた神経細胞では、オートファジーの異常を惹起させた場合の影響はより顕著であった (図 8)。同様の結果は、Gaucher 病を対象とした研究でも報告されている [Awad O. *et al.* 2015]。また、Sandhoff 病モデルマウスにおいては、脳サンプルを用いた免疫蛍光観察から、LC3 のシグナルの増大がみられる、すなわちオートファゴソームが蓄積している細胞種は主に神経細胞であり (図 9A)、そのような細胞では Cleaved Caspase3 のシグナルも同時に観察された (図 9B)。以上の結果より、オートファジーの異常がリソソーム病の症状発症・増悪に寄与している可能性が示されたと考える。



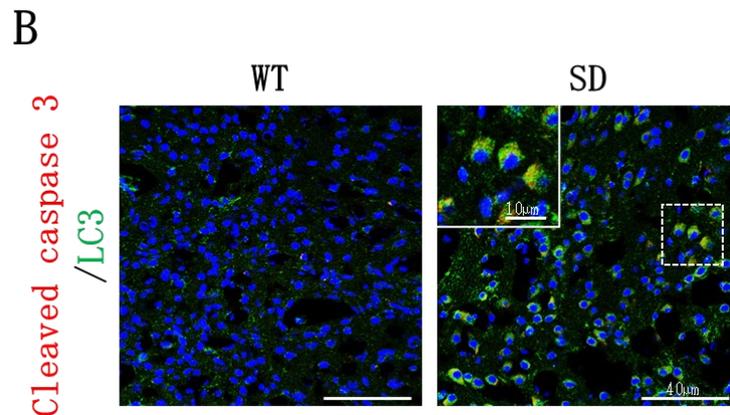


図9 Sandhoff 病モデルマウスにおいてオートファゴソームの蓄積は主に神経細胞で引き起こされ、神経細胞死と関連する可能性がある。

16 週齢の野生型および Sandhoff 病モデルマウスの脳切片(大脳皮質)を用いた組織免疫蛍光観察を行った。LC3 と NeuN(A)、LC3 と Cleaved Caspase3(B)について解析し、オートファジーの異常が引き起こされている細胞種の特定と、神経細胞死との関連について検討した。スケールバーはそれぞれ記載の縮尺を示す。

### 3-4 Sandhoff 病モデルマウスにおける SNARE タンパク質の発現量の変動に関する検討

ここまでの解析から、リソソーム病細胞ではリソソームとオートファゴソームの融合が低下しており、そのオートファジー系の異常は Sandhoff 病モデルマウスにおける症状の発症に先行して引き起こされることが示された。リソソーム-オートファゴソーム融合が低下することでオートファジーによる分解の完遂が妨げられ、代謝サイクルの停滞や細胞内品質管理機構としての働きが阻害されることが考えられる。パーキンソン病においては、オートファジーでの不良ミトコンドリアの分解(マイトファジー)の障害が病態と関係することが示唆されており [Narendra D. *et al.* 2008, Matsuda N. *et al.* 2010]、これはリソソーム病においてもオートファジーの異常が症状発症・増悪に関連する可能性を支持している。ここで次なる疑問としては、リソソームとオートファゴソームとの融合が障害される機序は何か、ということである。

小胞輸送系における膜融合のステップには、SNARE タンパク質と呼ばれる膜融合関連因子の会合が必要である [Ungar D and Hughson FM. 2003]。輸送小胞とそのターゲットの両方の膜上に局在し、両者の接近に伴って複合体を形成する。複合体形成によって両膜同士が極めて接近し、膜融合が誘起される。リソソーム-オートファゴソーム融合については、既に VAMP8、Syntaxin7、Syntaxin17、YKT6、SNAP29 という 5 種類の SNARE タンパク質が関与することが報告されている(図 2) [Itakura E. *et al.* 2012, Matsui T. *et al.* 2018]。これらが形成する二対の複合体の欠失はリソソームとオートファゴソームの融合をほぼ完全に

阻害することから、SNARE タンパク質の複合体形成はオートファジーにとって必須と言える。

そこで、3-3 でオートファジーの異常が認められた Sandhoff 病モデルマウスの全脳サンプルを用いて、各 SNARE タンパク質の発現量について解析を行った。3-3 と同様に 8 週齢と 16 週齢のサンプルを用い、各ポイントで検討した。結果は、期待には反して、いずれの週齢、いずれの SNARE タンパク質に関しても有意な変化は認められなかった (図 10)。したがって、いずれかの SNARE タンパク質の発現低下によってリソソーム-オートファゴソーム融合が障害されるという可能性は否定された。

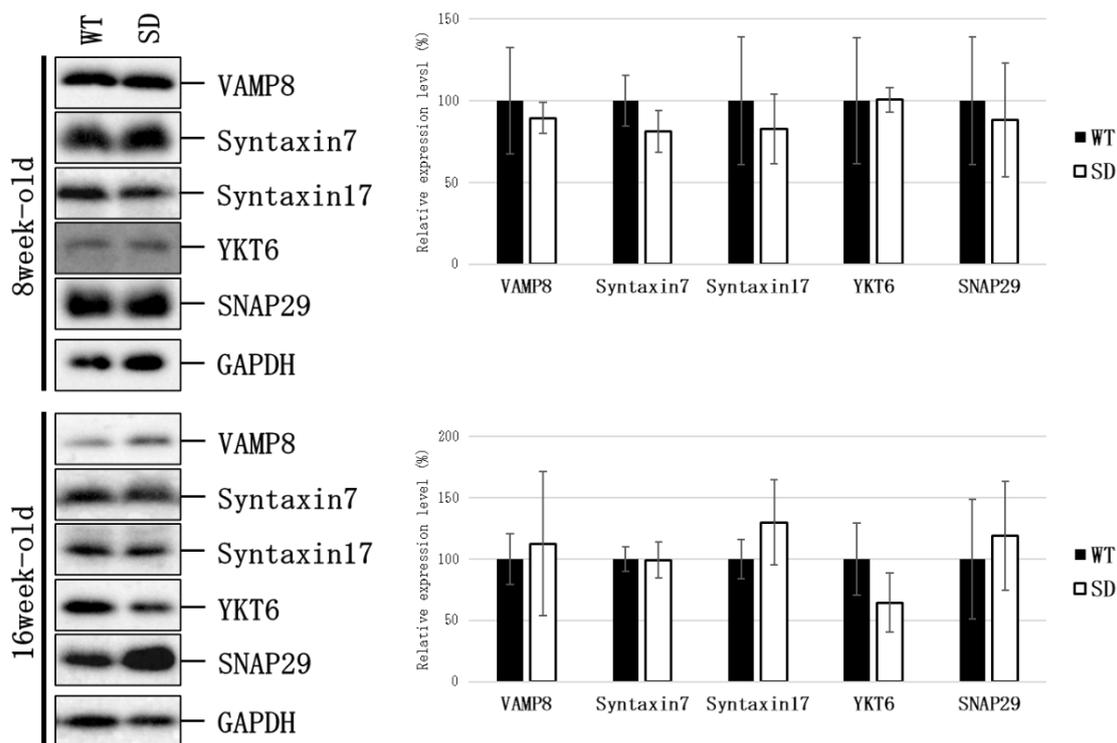


図 10 Sandhoff 病モデルマウスにおいて、各 SNARE タンパク質の発現量に変化はなかった。

8 週齢または 16 週齢の野生型および Sandhoff 病モデルマウス全脳抽出液を用いた Western blot 解析によって、オートファジーに関与する各 SNARE タンパク質の発現量の変化について検討した。右グラフは各 SNARE タンパク質の相対バンド強度を定量化した。エラーバーは標準誤差を示す。(n=3, vs. WT, Student's t-test.)

### 3-5 リソソームにおける SNARE タンパク質の局在量の変動に関する検討

3-4 より、リソソーム-オートファゴソーム融合が低下するメカニズムとして、SNARE タンパク質の発現量の低下という可能性は否定された。しかしながら、SNARE タンパク質の機能を規定しているのはその発現量だけではないだろう。SNARE タンパク質は基本的に膜タンパク質であり (上述の 5 種類の SNARE タンパク質のうち、SNAP29 を除いた 4 種は膜タンパク

質)、小胞輸送に伴って複数のコンパートメント間を往来している。円滑に小胞輸送が進行していくためには、必要時に必要量の SNARE タンパク質が必要な場所の存在しておかなければならず、したがって、その局在もまた重要な因子であると言える。リソソーム病はリソソームの機能低下に起因する疾患であるため、ここではリソソームにおける SNARE タンパク質の局在量について検討を行った。

そこでまず、全脳サンプルからリソソームを抽出する方法を考案した。解析を行う Sandhoff 病は糖“脂質”(ガングリオシド)の蓄積症であることから、従来用いられるような超遠心法を利用した方法では、コントロールとリソソーム病サンプル間でリソソームの比重が異なる可能性を危惧し、今回は避けることとした。ここでは、第2章で示すように、免疫沈降法を利用した。簡単にまとめると、サンプルをホモジェナイザーで破碎した後、遠心操作によってデブリや細胞ゾルタンパク質、ミクロソーム等を除き、残った画分に対して抗 LAMP1 抗体を用いた免疫沈降法によってリソソームの単離を試みた。サンプルをホモジェナイズした後に直接免疫沈降を行わないのは、LAMP1 は主要なリソソーム性膜タンパク質であるが、実は(割合として多量ではないが、)比較的広範なコンパートメントに分局しているためである。獲得したリソソーム画分はリソソーム性タンパク質が高度に濃縮されていた(図 11)。

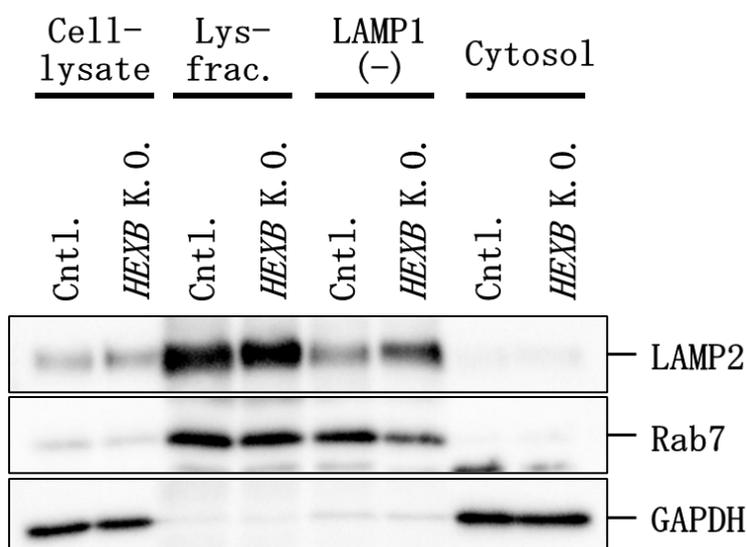


図 11 免疫沈降法を利用してリソソーム画分の獲得を行った。

第2章に示す通り、遠心操作と免疫沈降法を利用した方法により、リソソーム画分を獲得した。リソソーム画分ではリソソーム性タンパク質の高度な濃縮が確認される。

3-3、-4 で解析を行ったものと同じマウスの全脳サンプルから上記のようにリソソーム画分を獲得し、リソソーム局在性の SNARE タンパク質について検討した。オートファジーに関わる 5 種類の SNARE タンパク質のうち、リソソームに局在して機能するのは VAMP8 と Syntaxin7 である(図 2)。8 週齢および 16 週齢の各マウスのリソソーム画分について、3-4 同様 Western blot 解析を行ったところ、Sandhoff 病モデルマウスのサンプルにおいて有意

な減少が観察された(図 12)。これは、リソソーム局在性の SNARE タンパク質の減少を示唆している。また、興味深いことに、特に VAMP8 に関しては 8 週齢のサンプルにおいても有意な低下が認められ(図 12)、オートファジーの異常と同様に、SNARE タンパク質の局在変化は本モデルマウスの症状の発現に先行していた。この結果は、リソソームとオートファゴソームの融合障害の原因のひとつとして SNARE タンパク質のリソソーム局在性の低下が関係しており、さらにそれが本疾患の病態に寄与する可能性を支持している。

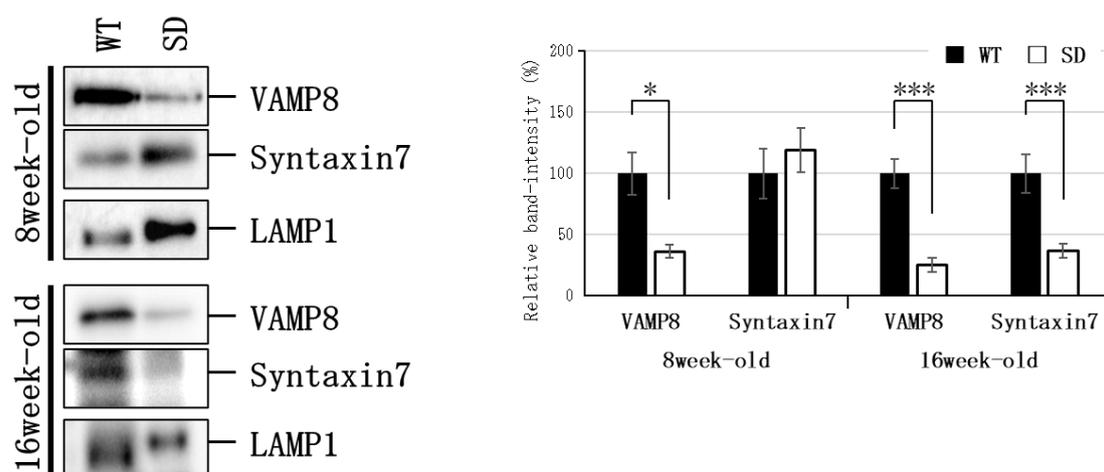


図 12 Sandhoff 病モデルマウスにおいて、リソソーム局在性 SNARE タンパク質の減少が観察された。

図 7 および図 10 に示す野生型および Sandhoff 病モデルの全脳サンプルから、上述の方法でリソソーム画分を獲得した。各リソソーム画分について、リソソーム局在性 VAMP8 および Syntaxin7 を Western blot 法によって解析した。右グラフは各 SNARE タンパク質の相対バンド強度を定量化した。それぞれのバンド強度は LAMP1 のそれによって補正した。エラーバーは標準誤差を示す。\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  ( $n=3-6$ , vs. WT, Student's t-test.)

このとき、8 週齢および 16 週齢のコントロールと Sandhoff 病モデルマウス間で LAMP1 の発現量に大きな変化は認められなかった(図 13)。LAMP1 の発現量がリソソームの個数を表すひとつの指標であると考えれば、野生型と Sandhoff 病モデルマウスの間でリソソームの数に顕著な変化はないことになる。Sandhoff 病モデルマウスにおいてリソソームの個数が(図 11 の結果を参照すると 3~4 倍に)増加しているようであれば、単に SNARE タンパク質が分布する受け皿の数が増えているだけで、それがリソソーム局在性 SNARE タンパク質の見かけ上の減少の原因であると言えるが、本検討により、その可能性は否定されたと考える。

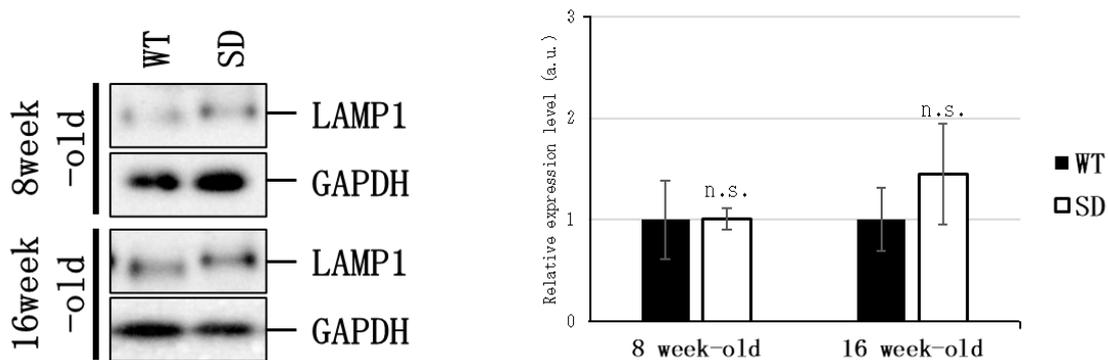


図 13 野生型と Sandhoff 病モデルマウス間でリソソームの顕著な量的な差は認められなかった。

8 週齢または 16 週齢の野生型および Sandhoff 病モデルマウス脳サンプルを用いて LAMP1 のタンパク量を解析した。右グラフは各週齢における LAMP1 の相対バンド強度を定量化した。エラーバーは標準誤差を示す。(n=3, vs. WT, Student's t-test.)

### 3-6 エンドサイトーシスの低下に伴うリソソーム局在性 SNARE タンパク質の変動に関する検討

ここまでの解析から、リソソーム-オートファゴソーム融合の低下の原因のひとつとしてリソソーム局在性 SNARE タンパク質の減少が示唆された。ここではさらに、SNARE タンパク質のリソソーム局在性低下のメカニズムについて検討を行う。SNARE タンパク質の細胞内局在化機構については、結合タンパク質の会合[Sudhof TC. *et al.* 2009]、生体膜の厚みや膜脂質との静電的な相互作用[Stein A. *et al.* 2009, Milovanovic D. *et al.* 2015]、SNARE タンパク質のコレステロール結合モチーフ[Enrich C. *et al.* 2015]など、様々な制御を受けていることが知られている。また、SNARE タンパク質の多くは膜タンパク質であることから、小胞輸送の頻度・程度もその局在に影響する可能性が示されている。実際に、クラスリン依存性エンドサイトーシスの関連タンパク質である CALM の遺伝子変異は複数の SNARE タンパク質の局在パターンを変化させ、オートファジーを障害することが報告されている[Moreau K. *et al.* 2014]。すなわち、エンドサイトーシスの異常によって SNARE タンパク質の細胞内局在に変化がみられるということである。リソソームに至る主な小胞輸送経路はエンドサイトーシス経路と小胞体・ゴルジ体からの経路であるため、その異常がリソソーム上の SNARE タンパク質の局在量に影響する可能性は十分考えられる。そこで、本事象においても同様の異常が関与しないか、検討を行うこととした。

EGF 受容体はそのリガンドである上皮成長因子(以下、EGF)の結合に伴い、クラスリンの介在によってエンドサイトーシスによって取り込まれ、リソソームで分解される。ここではそのシステムを利用し、リソソーム病細胞のエンドサイトーシスの進行について検討した。Chlorpromazine(図中では CP と記載)はクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤とし

て用いている。EGF 処理後の EGF 受容体のタンパク量を Western blot 法によって解析した。コントロールでは時間経過に伴ってバンド強度の減弱が認められ、エンドサイトーシスが正常に誘起されているのに対して、*HEXB* K. O. 細胞については EGF 受容体タンパクの減少が明らかに阻害されていた(図 14A, B)。EGF 処理 1 時間後の EGF 受容体タンパク量の減少の程度を比較すると、コントロールに対して *HEXB* K. O. 細胞で有意に少なかった(図 14C)。すなわち、リソソーム酵素の欠損によってエンドサイトーシスが障害されたことが示唆される。さらに、このエンドサイトーシス系の障害は正常遺伝子の導入によってキャンセルされた(図 14C)。

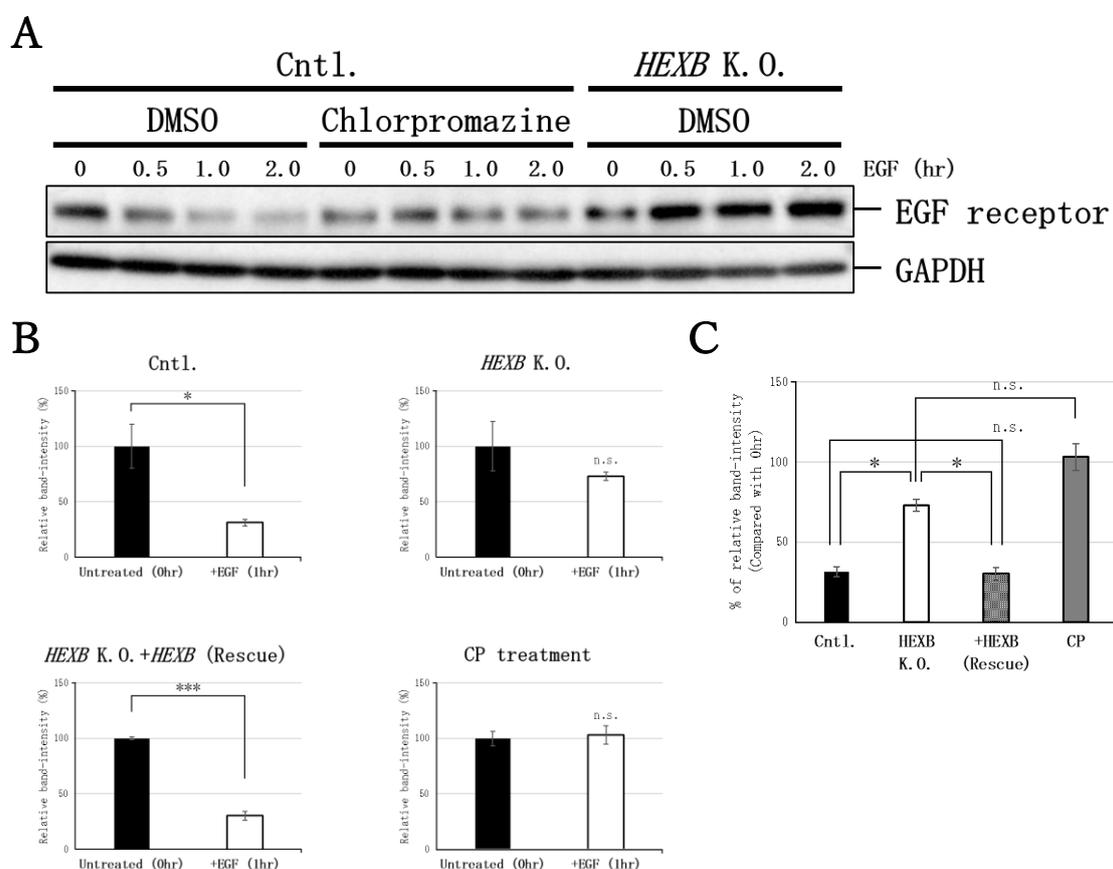
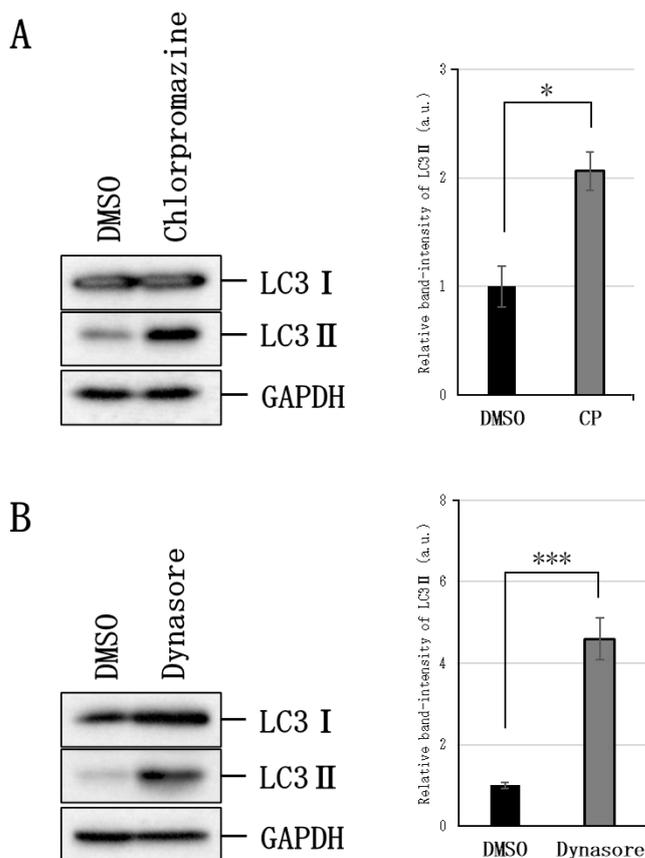


図 14 リソソーム酵素の欠損によってエンドサイトーシスの進行が抑制された。

(A) 第 2 章の通り、記載の各細胞に対して EGF をそれぞれ 0 (未処理)、0.5、1.0、2.0 時間処理した。各サンプルを Western blot 法によって解析し、EGF 受容体の時間経過に伴うタンパク量の減少をエンドサイトーシスの進行程度として評価した。(B) EGF 処理 0 時間 (未処理) に対する処理 1 時間後の EGF 受容体のタンパク量を定量した。エラーバーは標準誤差を示す。\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  ( $n=3-4$ , vs. Untreated, Student's t-test.) (C) EGF 処理 0 時間 (未処理) に対する処理 1 時間後の EGF 受容体の減少割合を各細胞間で比較解析した。SH-SY5Y *HEXB* K. O. + *HEXB* 細胞を +*HEXB* (Rescue) と、Chlorpromazine 処理群を CP と記載する。エラーバーは標準誤差を示す。\*:  $p < 0.05$  ( $n=3-4$ , Tukey-Kramer test.)

次に、二種類のエンドサイトーシスの阻害剤を用いて、エンドサイトーシスの異常がオートファジーに影響するか検討した。Chlorpromazine はクラスリンの阻害剤、Dynasore®はダイナミンの阻害剤として用いた。各阻害剤を添加して24時間培養した細胞についてWestern blot 法によって解析した結果、LC3 II の有意な増加が観察された(図 15A, B)。最後に、エンドサイトーシスの阻害によって SNARE タンパク質の細胞内局在に変化がみられるか検討した。Chlorpromazine を処理した細胞に対して免疫蛍光観察を行ったところ、VAMP8 および Syntaxin7 と LAMP2 との共染色箇所割合の有意な減少が観察された(図 16)。すなわち、エンドサイトーシスの障害は SNARE タンパク質のリソソーム局在量を減少させ、これがオートファジーを障害する可能性が考えられる。

以上の結果をまとめると、リソソーム酵素の欠損または基質の過剰蓄積はエンドサイトーシスを阻害することでリソソーム局在性 SNARE タンパク質を減少させ、これによってリソソーム-オートファゴソーム融合が障害されることが示唆される。さらに、このようなオートファジー系の異常は Sandhoff 病モデルマウスにおける表現型の発現に先行して観察されたことから、リソソーム病の症状発症・増悪に寄与している可能性が考えられる。



**図 15 エンドサイトーシスの阻害によってオートファジーが障害された。**

SH-SY5Y 細胞に対して 20 $\mu$ M Chlorpromazine (図中では CP と示す。クラスリンの阻害剤として用いた。) (A) または 100 $\mu$ M Dynasore (ダイナミン阻害剤として用いた。) (B)、コントロールとして同量の DMSO をそれぞれ培地中に添加して 24 時間処理した。Western blot 法によって LC3 を解析し、エンドサイトーシスの阻害によるオートファジーの変動について検討した。エラーバーは標準誤差を示す。\* :  $p < 0.05$ 、\*\*\* :  $p < 0.005$  (n=3, vs. control, Student's t-test.)

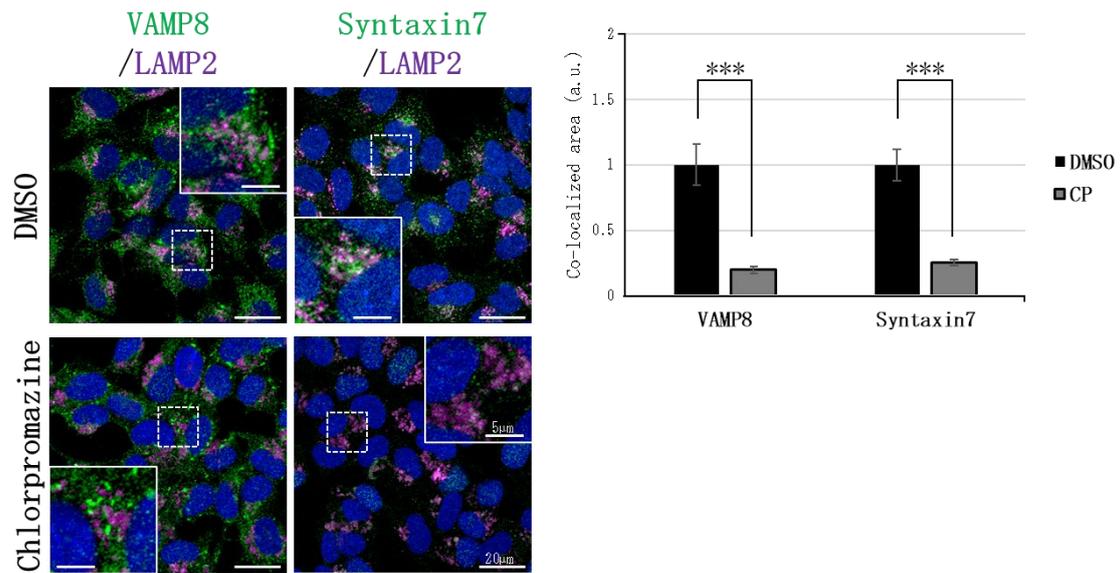


図 16 エンドサイトーシスの阻害によって SNARE タンパク質のリソソーム局在性が低下した。

SH-SY5Y を 8well Lab-Tek chamber slides に播種し、2 日間培養した。培地に対して 20 $\mu$ M Chlorpromazine、またはコントロールとして同量の DMSO を添加し、さらに 24 時間培養した。その後、免疫蛍光観察によって各 SNARE タンパク質のリソソーム局在性について解析した。スケールバーは記載の縮尺を示す。右グラフは共染色箇所を定量した。\*\*\* :  $p < 0.005$  ( $n=3$ , vs. control, Student's t-test.)

## 第4章 考察

本研究では主に、リソソーム病においてリソソーム-オートファゴソーム融合が障害されるメカニズムについて解析を行い、そのひとつの原因としてエンドサイトーシスの低下に伴うリソソーム局在性 SNARE タンパク質の減少という結果を見出した(図 17)。SNARE タンパク質はオートファジーに必須の因子であるため、そのリソソームにおける局在量の減少はオートファゴソームとの融合に対して抑制的に作用することが考えられる。また、リソソームに至る主な小胞輸送経路のひとつであるエンドサイトーシスの低下によって、リソソームへの SNARE タンパク質の供給が減ることがリソソーム局在性 SNARE タンパク質の減少につながっていると考察する。

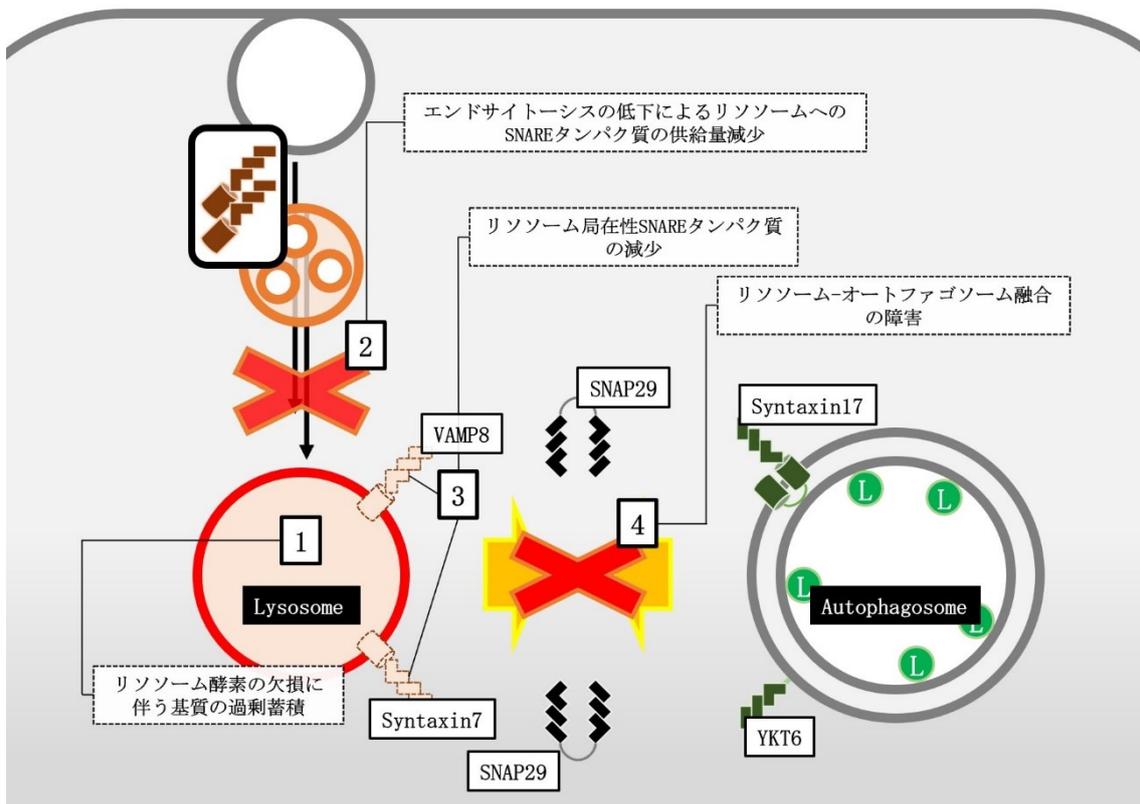


図 17 本研究の概要図

図中の L(緑色の円)は LC3 II を示す。

本研究といくつかの先行研究を踏まえて考えると、オートファジーの異常は複数のリソソーム病で共通して起こっていると言える。この共通性が何によるかという点についてはさらなる解析が必要である。ひとつの可能性として、そもそも蓄積する基質の種類は関係な

いのかかもしれない。内部に何らかの物質が蓄積することによるリソソームの物理的な変化がオートファジーに影響を与えている可能性がある。例えば、リソソーム膜の曲率や膜透過性の変化などが挙げられる。リソソームはオートファジーによってオートファゴソームと融合するとサイズが何倍にも大きくなるが(実際には、そもそもひとつのオートファゴソームに対して複数のリソソームが融合するとされている)、これは後に複数のリソソームへと再分配され、一定のサイズに保たれるようになっている。小胞体やゴルジ体などのオルガネラは膜の曲率や構造が種々の因子によって制御され、その特徴的な形状が保持されるようになっているが、リソソームにもサイズ等を感知・調節するシステムがあるのだろう。そうでなければ、ひとつの大きなリソソームとして残されるはずである。実際に、オートファジー完遂後のリソソームの再分配には mTORC1 の活性が必要であることが知られている [Munson MJ. *et al.* 2015]。また、リソソーム膜の損傷は Galectin や Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) 複合体等のタンパク質によって認識され、mTORC1 や AMPK などのシグナル因子の活性が調節されることも報告されている [Jia J. *et al.* 2018, Skowrya ML. *et al.* 2018, Jia J. *et al.* 2019, Jia J. *et al.* 2020]。基質の蓄積は、膜の損傷までは引き起こさないかもしれないが、その透過性などを変化させる可能性はある。例えば、H<sup>+</sup>のリソソームからのリークなどを認識する機構があるかもしれない。一方で、逆に蓄積基質の共通性に着目することもできる。今回解析を行った疾患はガングリオシドの蓄積症 (Sandhoff 病および Tay-Sachs 病) とオリゴ糖の蓄積症 (Galactosialidosis) であり、一見その蓄積基質は全く異なる成分に思えるが、例えば、ともにシアル酸が付加されている点では共通している。これにおいては、近年、Siglec などのシアル酸を認識する分子の存在が知られ、高く注目されているし、単にシアル酸に由来するマイナスチャージが影響すると考えられるかもしれない。

いずれにせよ、複数のリソソーム病においてオートファジーの異常が共通する疾患の増悪因子であるとすれば、これは新規の治療ターゲットとなり得るかもしれない。現在、リソソーム病の治療法として最も研究が進んでおり、また実際に臨床応用されているものに酵素補充療法という治療法がある。これは欠損する酵素を、酵素製剤として体外から投与し補充するというものであるが、緒論にて触れた通り、問題点もある。それら上述の問題点に加え、本疾患がいずれも希少疾患であることも相まって、治療薬の開発は困難を極めている。酵素補充療法では疾患ごとに治療に用いる酵素タンパクを変える必要であるためである。そこで、もしオートファジーがリソソーム病における新規の治療ターゲットとなり得れば、複数の疾患に対して適応することができる可能性があり、非常に有意義である。また、例えば抗てんかん薬のカルバマゼピンはオートファジーを活性化する可能性が報告されている。実際に、肝細胞の小胞体内に変異タンパク質が蓄積することで肝障害を引き起こす  $\alpha_1$  アンチトリプシン欠損症のモデル動物に対して、カルバマゼピンが有効であったとする報告もある [Hidvegi T. *et al.* 2010]。このように、低分子化合物の中にはオートファジーに影響を与え、かつ中枢神経系まで到達可能なものがある(引用した報告は主に肝障害

に対する効果を検討したものであるが、カルバマゼピンが抗てんかん薬であることを考慮すると、中枢神経系においても同様の効果が期待できるであろう)。したがって、今回見出したようなオートファジーの異常を低分子化合物によって是正することができれば、生産コストや免疫学上問題、中枢神経症状に対する効果など、現状の問題点を改善する足掛かりとなるかもしれない。また、酵素補充療法において酵素製剤は、主に細胞膜上のマンノース-6-リン酸受容体を介してエンドサイトーシス経路によって取り込まれ、リソソームまで送達される。そのため、このエンドサイトーシスの低下は、酵素補充療法の治療効果にも影響しているかもしれない。本研究ではリソソーム病でエンドサイトーシスの低下をきたすメカニズムについては解明できなかったため、さらなる解析が急がれる。

リソソーム病における基質の蓄積は、基本的にはリソソームの内腔側で起こるイベントであり、それがその外部にどのように影響するか、考察は難しい。可能性として、リソソーム内での分解が滞っていることをセンサーする未知のシステムがあるのかもしれない。それは、リソソーム膜の曲率なのか、膜の透過性なのか、またはアミノ酸や脂質・糖質の組成等をモニターしているのかわからないが、リソソームでの分解が停滞している場合にリソソームへの物質の輸送を一時的に抑制するというにはある意味理にかなっていると言える。例えば、リソソームが関与する重要なシグナル分子である mTORC1 は細胞内のエネルギー状態によって活性が調節されており [Kim J. and Guan KL. 2019]、mTORC1 の活性化状態ではタンパク合成と細胞増殖が、不活性化状態ではオートファジーによる物質の分解が促進されることが知られている。これはすなわち、細胞内のエネルギーが良好な状況ではタンパク質合成を、不良の状況ではオートファジーによってタンパク質合成に必要なアミノ酸の供給を行っているということである。このようなシステムを踏まえて考えると、リソソームでの分解の程度をモニターし、エンドサイトーシスを調節する機構があるのかもしれない。しかしながらエンドサイトーシスは、オートファジーとは異なり、受容体へのリガンドの結合がトリガーとなって誘起される場合が多いため、果たして調節が可能であるかについては疑問もある。考え得る可能性としては、リサイクリング経路に回す割合を変動させることである。このようなメカニズムが存在する場合、何らかのシグナル伝達等によって活性の調節が行われていると考えられる。しかし、私たちは mTOR の阻害剤である Torin1 を処理した細胞においてもエンドサイトーシスの解析を行ったが、コントロールと全く変化はなかった。

SNARE タンパク質の細胞内局在変化に関する解析結果でやはり気がかりなのは、Syntaxin7 に関しては 8 週齢のサンプルで変化がみられなかった点である。SNARE タンパク質は輸送小胞に搭載される V (Vesicle)-SNARE と、そのターゲット膜に局在する T (Target)-SNARE の二種類に大別される。このうち、小胞輸送の程度に影響を受けやすいのは V-SNARE であると予想される。Syntaxin ファミリーは、VAMP ファミリーと比べ、T-SNARE として働く割合が多いのかもしれない。T-SNARE として機能する場合は、ひとつのコンパートメントに長期間留まることになる。実際、Syntaxin6 はゴルジ体のマーカーとしても用いられる。

SH-SY5Y の *HEXB* K. O. 細胞と比べ、Sandhoff 病のモデルマウス脳内ではより顕著に GM2 ガングリオシドが蓄積しているため、基質蓄積が何らかの機序でエンドサイトーシスを障害していると考えられる。8 週齢と 16 週齢では、やはり 16 週齢のほうが蓄積程度はより甚だしいことから、エンドサイトーシスの障害の程度も 16 週齢でより顕著になるのであろうか。また、慢性的にエンドサイトーシスが低下し続けることが SNARE タンパク質の局在に影響していることも考えられる。しかしながら、培養細胞系での解析においては、長時間のエンドサイトーシス阻害剤の添加は細胞生存率にも影響してしまうことから、この点について詳細に検討を行うことは難しかった。もしくは、エンドサイトーシスの低下以外にもリソソーム病細胞でリソソーム局在性 SNARE タンパク質を減少させているメカニズムがあるのかもしれない。

本研究においては、リソソーム画分のタンパク濃度は LAMP1 または LAMP2 によって補正している。これは単位個数のリソソーム中に含まれるリソソーム性タンパク質のタンパク量は、(欠損タンパクを除いて)コントロール-リソソーム病細胞間で顕著な差はないという仮定に基づいている。この点についておおよそ問題はなく、例えばリソソーム画分におけるリソソーム酵素の活性や LAMP1、LAMP2 等のタンパク質の存在量に大きな変化はみられなかった。また、マウス脳サンプルを用いた解析においては、WT-Sandhoff 病モデル間で LAMP1 の発現量に有意な差は認められなかった。これは実は重要で、今回、SNARE タンパク質のリソソームにおける局在量は LAMP1 または LAMP2 によって補正した値で比較・検討を行っているため、その解析上の分母となる LAMP1・LAMP2 の発現量とリソソーム中の存在量に変化がないことは、解析の正当性を担保する条件であると言える。また、本研究では抗 LAMP1 抗体を用いた免疫沈降法によってリソソームの分離を行っているため、LAMP1 が発現していないまたは存在量の少ない小胞は獲得できないことになるが、ここではそれはリソソームとみなさない。リソソームの定義に立ち返ると、リソソームとは細胞内外成分の異化の場であり、その機能は種々のリソソーム酵素によって規定されているため、理想は酵素活性による分離であると考えられる。酵素活性や酸性 pH を認識する色素プローブ等を用いてフローサイトメトリーにより単離する方法は、小胞のサイズが小さいためか、うまくいかなかった。また、結果の項でも記載した通り、従来よく用いられる超遠心法による分離法については、糖“脂質”の蓄積症を対象としているため、今回は採用しなかった。実際、超遠心法による分離を行った場合、各フラクションにおけるリソソーム性タンパク質や種々の糖脂質のプロファイルには変化がみられた。本解析は、主要なリソソーム性タンパク質である LAMP1 または LAMP2 が高発現している小胞は、同じくリソソーム性タンパク質であるリソソーム酵素も高度に濃縮されているはずである、という仮説のもとで行っている。

もう一点、LAMP1 に関しては Sandhoff 病モデルにおいて高分子側にわずかにシフトしているように見える。これはヒト培養細胞系でもマウスサンプルを用いた解析でも毎回観察される現象である。LAMP1 は高度に糖鎖修飾を受けるタンパク質であり、Sandhoff 病が糖鎖

加水分解酵素の欠損症であることを鑑みると、このバンドシフトはおそらく糖鎖修飾のされ方に違いがあることを意味しているのではないかと考える。しかしながら、LAMP1 はリソソームの膜タンパクとして最も発現量の多いものであるにも関わらず、実はその機能については研究が進んでいない。例えば、LAMP2 はシャペロン介在性オートファジーにおいてリソソーム上の受容体のように機能することが良く知られており [Bandyopadhyay U. *et al.* 2008]、また、Danon 病と呼ばれる欠損症も存在する。したがって、LAMP1 の糖鎖構造の違いがどのような影響を与え得るかについては考察が難しい。

本研究では、あくまでリソソームにのみ着目して SNARE タンパク質の解析を行ったが、本来であれば、オートファゴソームに対しても検討できれば良かった。この点については、その単離法が足かせとなった。オートファジーの解析に頻用される LC3 は隔離膜とオートファゴソームの両方の膜上に存在する(厳密には、オートファゴソームの細胞質側に結合している LC3 は ATG4 による切断を受ける [Kauffman KJ. *et al.* 2018, Agrotis A. *et al.* 2019]。)。一方で、Syntaxin17 は隔離膜からオートファゴソームに変換された後に膜に挿入されることが知られており、オートファゴソーム画分を用いて SNARE タンパク質について解析するには隔離膜との分離が必要となる。Syntaxin17 のドミナントネガティブ変異体を発現させて成熟したオートファゴソームを獲得する方法が報告されている [Uematsu M. *et al.* 2017] が、これでは本研究の目的が果たせない。また、もちろん Syntaxin17 に対する抗体を用いた免疫沈降法による分離も、同じく、今回は不適である。

リソソーム病は、それ自体は希少疾患であるが、アルツハイマー病やパーキンソン病などの他の疾患との関連が複数報告されている点は興味深い。例えば、Sandhoff 病モデルマウス脳内ではアミロイド  $\beta$  やリン酸化 tau、 $\alpha$ -シヌクレイン等の増加が報告されている [Keilani S. *et al.* 2012]。本マウスではもちろん、アルツハイマー病モデルマウスやパーキンソン病モデルマウスのように、それら各タンパク質の発現が過剰になったり、より凝集しやすくなったりするような変異は加えられていない。それにも関わらず、Sandhoff 病モデルマウスでは十数週という非常に早期の時点でこれらタンパク質の増加が認められる。この変化は、オートファジー系の障害によって説明できる可能性がある。また、大規模な疫学的研究の結果から、ゴーシェ病の原因遺伝子である *GBA* 遺伝子の変異がパーキンソン病の危険因子であることが報告されている [Sidransky E. *et al.* 2009]。このような事例はその他多く報告されており [Yamazaki T. *et al.* 2001, Suzuki M. *et al.* 2015, Lee JS. *et al.* 2019, Oji Y. *et al.* 2020]、リソソーム病やアルツハイマー病、パーキンソン病等の一見大きく異なるようにみえる疾患も、リソソームという点でクロストークがみられる可能性を示していると考えられる。これまで多くの研究はタンパク質の機能やその合成系に偏重していたと言えるかもしれないが、リソソームをはじめとする分解系もまた、疾患の発症・増悪に大きく寄与しているかもしれない。例えば、同じくタンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソーム系の阻害剤であるボルテゾミブは、がん領域において現在広く治療に用いられているし、同じくがん治療においては、従来の抗がん剤とリソソーム阻害剤であ

るヒドロキシクロロキンとの併用療法が米国において臨床試験を実施中である [Onorati AV. *et al.* 2018]。また、神経変性疾患では、何らかの物質の蓄積または凝集が症状発症・増悪の原因となっていると考えられているものが多い。この点について、リソソームの機能が病態と関連しているのかもしれない。リソソーム病の多くで末梢臓器と比べて中枢神経系で症状が強くみられるのも、そのようなことが関係している可能性もある。逆に、末梢症状とオートファジーの異常がどの程度関連するかについても興味深い。今回解析に用いた Sandhoff 病は主に神経細胞に基質の蓄積をきたす疾患であるため、末梢症状の解析が難しかった。繊維芽細胞を用いた解析でもオートファジーの異常は観察されていることから、神経系細胞以外でも、基質蓄積が過剰に起こればオートファジーが障害され得ると考えられる。一方で、オートファジーの異常が与える影響の大きさは臓器・組織ごとに異なる可能性があり、一概にオートファジーの異常が起こっているからといって、それが症状と関連しているというように安易に関連付けるのは注意が必要かもしれない。

本研究ではリソソーム病におけるオートファジーの異常とそのメカニズムの解明、さらには病態との関連について解析を行った。しかしながら、上述のように、リソソーム病はその他複数の疾患との関連が報告されているし、さらにはリソソーム機能自体が多くの生理現象と密接に関連することが近年の研究から知られるようになってきた。したがって本研究によって得られた知見は、リソソーム病のみならず、様々な分野への応用が期待できるものとする。最近では、ハンチントン病において LC3 と凝集タンパク質の両方に結合するコンストラクトを用いて、オートファジーによって選択的に凝集タンパク質を除去する治療法が報告されている [Bauer PO. *et al.* 2010, Li Z. *et al.* 2019]。また、いわゆる Proteolysis-targeting Chimera (PROTAC) [Li X. and Song Y. 2020, Zeng S. *et al.* 2021, Békés M. *et al.* 2022] や Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Eraser (SNIPER) [Fan X and Wang YT. 2015, Banik SM. *et al.* 2020] などを用いた方法と類似の特異的タンパク質分解法として、オートファジーを利用した Autophagy-targeting chimera (AUTAC) といった手法も考案された [Takahashi D. *et al.* 2019, Takahashi D. and Arimoto H. 2020, Pei J. *et al.* 2021, Kocak M. *et al.* 2022]。このように、リソソームやポストリソソームの生物学に関しては、近年、基礎・臨床の両面で益々高い注目を集めるようになっている。我々、生物のリソソームの質・機能 (Quality of Lysosome) は、生活の質 (Quality of Life ; QOL) と密接に関連することが明らかとなってきているが、本研究によって得られた知見もまた、その全容解明のための一助となれば幸いである。

## 参考文献

1. Agrotis A, Pengo N, Burden JJ, Ketteler R. Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells. *Autophagy*. **2019**;15(6):976-997.
2. Awad O, Sarkar C, Panicker LM, Miller D, Zeng X, Sgambato JA, Lipinski MM, Feldman RA. Altered TFEB-mediated lysosomal biogenesis in Gaucher disease iPSC-derived neuronal cells. *Hum Mol Genet*. **2015**;24(20):5775-88.
3. Ballabio A, Bonifacino JS. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2020**;21(2):101-118.
4. Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol*. **2008**;28(18):5747-63.
5. Banik SM, Pedram K, Wisnovsky S, Ahn G, Riley NM, Bertozzi CR. Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins. *Nature*. **2020**;584(7820):291-297.
6. Bauer PO, Goswami A, Wong HK, Okuno M, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Matsumoto G, Kino Y, Nagai Y, Nukina N. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat Biotechnol*. **2010**;28(3):256-63.
7. Békés M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discov*. **2022**;21(3):181-200.
8. Birgisdóttir ÁB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci*. **2013**;126(Pt 15):3237-47.
9. Bissonnette CJ, Lyass L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Miller RJ, Kessler JA. The controlled generation of functional basal forebrain cholinergic neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells*. **2011**;29(5):802-11.
10. Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem*. **2010**;285(17):13107-20.
11. Caccamo A, Maldonado MA, Majumder S, Medina DX, Holbein W, Magrì A, Oddo S. Naturally secreted amyloid-beta increases mammalian target of rapamycin (mTOR) activity via a PRAS40-mediated mechanism. *J Biol Chem*. **2011**;286(11):8924-32.
12. Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC. Effects of all-

- trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*. **2009**;30(1):127-35.
13. d'Azzo A, Tessitore A, Sano R. Gangliosides as apoptotic signals in ER stress response. *Cell Death Differ*. **2006**;13(3):404-14.
  14. De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*. **1966**;28:435-92.
  15. de la Mata M, Cotán D, Villanueva-Paz M, de Laveria I, Álvarez-Córdoba M, Luzón-Hidalgo R, Suárez-Rivero JM, Tiscornia G, Oropesa-Ávila M. Mitochondrial Dysfunction in Lysosomal Storage Disorders. *Diseases*. **2016**;4(4):31.
  16. Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, Jiang H, Hirano M, Rampersaud E, Jansen GH, Donkervoort S, Bigio EH, Brooks BR, Ajroud K, Sufit RL, Haines JL, Mugnaini E, Pericak-Vance MA, Siddique T. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*. **2011**;477(7363):211-5.
  17. Enrich C, Rentero C, Hierro A, Grewal T. Role of cholesterol in SNARE-mediated trafficking on intracellular membranes. *J Cell Sci*. **2015**;128(6):1071-81.
  18. Fan X, Wang YT. SNIPER peptide-mediated degradation of endogenous proteins. *Curr Protoc Chem Biol*. **2015**;7(1):1-16.
  19. Fujita N, Saitoh T, Kageyama S, Akira S, Noda T, Yoshimori T. Differential involvement of Atg16L1 in Crohn disease and canonical autophagy: analysis of the organization of the Atg16L1 complex in fibroblasts. *J Biol Chem*. **2009**;284(47):32602-9.
  20. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol*. **2018**;20(3):233-42.
  21. Gegg ME, Schapira AH. Mitochondrial dysfunction associated with glucocerebrosidase deficiency. *Neurobiol Dis*. **2016**;90:43-50.
  22. Goode A, Butler K, Long J, Cavey J, Scott D, Shaw B, Sollenberger J, Gell C, Johansen T, Oldham NJ, Searle MS, Layfield R. Defective recognition of LC3B by mutant SQSTM1/p62 implicates impairment of autophagy as a pathogenic mechanism in ALS-FTLD. *Autophagy*. **2016**;12(7):1094-104.
  23. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. **2013**;495(7441):389-93.
  24. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*.

- 2006;441(7095):885–9.
25. Hidvegi T, Ewing M, Hale P, Dippold C, Beckett C, Kemp C, Maurice N, Mukherjee A, Goldbach C, Watkins S, Michalopoulos G, Perlmutter DH. An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science*. **2010**;329(5988):229–32.
  26. Ishibashi S, Yamazaki T, Okamoto K. Association of autophagy with cholesterol-accumulated compartments in Niemann-Pick disease type C cells. *J Clin Neurosci*. **2009**;16(7):954–9.
  27. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*. **2012**;151(6):1256–69.
  28. Jia J, Abudu YP, Claude-Taupin A, Gu Y, Kumar S, Choi SW, Peters R, Mudd MH, Allers L, Salemi M, Phinney B, Johansen T, Deretic V. Galectins control MTOR and AMPK in response to lysosomal damage to induce autophagy. *Autophagy*. **2019**;15(1):169–171.
  29. Jia J, Abudu YP, Claude-Taupin A, Gu Y, Kumar S, Choi SW, Peters R, Mudd MH, Allers L, Salemi M, Phinney B, Johansen T, Deretic V. Galectins Control mTOR in Response to Endomembrane Damage. *Mol Cell*. **2018**;70(1):120–135.
  30. Jia J, Claude-Taupin A, Gu Y, Choi SW, Peters R, Bissa B, Mudd MH, Allers L, Pallikkuth S, Lidke KA, Salemi M, Phinney B, Mari M, Reggiori F, Deretic V. Galectin-3 Coordinates a Cellular System for Lysosomal Repair and Removal. *Dev Cell*. **2020**;52(1):69–87.
  31. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. **2011**;7(3):279–96.
  32. Kauffman KJ, Yu S, Jin J, Mugo B, Nguyen N, O'Brien A, Nag S, Lystad AH, Melia TJ. Delipidation of mammalian Atg8-family proteins by each of the four ATG4 proteases. *Autophagy*. **2018**;14(6):992–1010.
  33. Kawashita E, Tsuji D, Kawashima N, Nakayama K, Matsuno H, Itoh K. Abnormal production of macrophage inflammatory protein-1alpha by microglial cell lines derived from neonatal brains of Sandhoff disease model mice. *J Neurochem*. **2009**;109(5):1215–24.
  34. Keilani S, Lun Y, Stevens AC, Williams HN, Sjoberg ER, Khanna R, Valenzano KJ, Checler F, Buxbaum JD, Yanagisawa K, Lockhart DJ, Wustman BA, Gandy S. Lysosomal dysfunction in a mouse model of Sandhoff disease leads to accumulation of ganglioside-bound amyloid- $\beta$  peptide. *J Neurosci*. **2012**;32(15):5223–36.

35. Kim J, Guan KL. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nat Cell Biol.* **2019**;21(1):63-71.
36. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* **2011**;13(2):132-41.
37. Kocak M, Ezazi Erdi S, Jorba G, Maestro I, Farrés J, Kirkin V, Martinez A, Pless O. Targeting autophagy in disease: established and new strategies. *Autophagy.* **2022**;18(3):473-95.
38. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol.* **2010**;12(3):213-23.
39. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* **2006**;441(7095):880-4.
40. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol.* **2005**;169(3):425-34.
41. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* **2004**;432(7020):1032-6.
42. Lee JS, Kanai K, Suzuki M, Kim WS, Yoo HS, Fu Y, Kim DK, Jung BC, Choi M, Oh KW, Li Y, Nakatani M, Nakazato T, Sekimoto S, Funayama M, Yoshino H, Kubo SI, Nishioka K, Sakai R, Ueyama M, Mochizuki H, Lee HJ, Sardi SP, Halliday GM, Nagai Y, Lee PH, Hattori N, Lee SJ. Arylsulfatase A, a genetic modifier of Parkinson's disease, is an  $\alpha$ -synuclein chaperone. *Brain.* **2019**;142(9):2845-59.
43. Li X, Song Y. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy. *J Hematol Oncol.* **2020**;13(1):50.
44. Li Z, Wang C, Wang Z, Zhu C, Li J, Sha T, Ma L, Gao C, Yang Y, Sun Y, Wang J, Sun X, Lu C, DiFiglia M, Mei Y, Ding C, Luo S, Dang Y, Ding Y, Fei Y, Lu B. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT-LC3 linker compounds. *Nature.* **2019**;575(7781):203-9.
45. Liao G, Yao Y, Liu J, Yu Z, Cheung S, Xie A, Liang X, Bi X. Cholesterol accumulation is associated with lysosomal dysfunction and autophagic stress in Npc1  $-/-$  mouse brain. *Am J Pathol.* **2007**;171(3):962-75.

46. Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, Kimura M, Komatsu M, Hattori N, Tanaka K. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol.* **2010**;189(2):211-21.
47. Matsui T, Jiang P, Nakano S, Sakamaki Y, Yamamoto H, Mizushima N. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *J Cell Biol.* **2018**;217(8):2633-45.
48. Matsuoka K, Tsuji D, Aikawa S, Matsuzawa F, Sakuraba H, Itoh K. Introduction of an N-glycan sequon into HEXA enhances human beta-hexosaminidase cellular uptake in a model of Sandhoff disease. *Mol Ther.* **2010**;18(8):1519-26.
49. Milovanovic D, Honigsmann A, Koike S, Göttfert F, Pähler G, Junius M, Müller S, Diederichsen U, Janshoff A, Grubmüller H, Risselada HJ, Eggeling C, Hell SW, van den Bogaart G, Jahn R. Hydrophobic mismatch sorts SNARE proteins into distinct membrane domains. *Nat Commun.* **2015**;6:5984.
50. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell.* **2004**;15(3):1101-11.
51. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* **2007**;3(6):542-5.
52. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* **2007**;21(22):2861-73.
53. Moreau K, Fleming A, Imarisio S, Lopez Ramirez A, Mercer JL, Jimenez-Sanchez M, Bento CF, Puri C, Zavodszky E, Siddiqi F, Lavau CP, Betton M, O'Kane CJ, Wechsler DS, Rubinsztein DC. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat Commun.* **2014**;5:4998.
54. Mortensen M, Ferguson DJ, Edelmann M, Kessler B, Morten KJ, Komatsu M, Simon AK. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010**;107(2):832-7.
55. Munson MJ, Allen GF, Toth R, Campbell DG, Lucocq JM, Ganley IG. mTOR activates the VPS34-UVRAG complex to regulate autolysosomal tubulation and cell survival. *EMBO J.* **2015**;34(17):2272-90.
56. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med.* **2007**;13(5):619-24.
57. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to

- impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* **2008**;183(5):795-803.
58. Nguyen HT, Lapaquette P, Bringer MA, Darfeuille-Michaud A. Autophagy and Crohn's disease. *J Innate Immun.* **2013**;5(5):434-43.
59. Nilsson P, Loganathan K, Sekiguchi M, Matsuba Y, Hui K, Tsubuki S, Tanaka M, Iwata N, Saito T, Saido TC. A $\beta$  secretion and plaque formation depend on autophagy. *Cell Rep.* **2013**;5(1):61-9.
60. Nys K, Agostinis P, Vermeire S. Autophagy: a new target or an old strategy for the treatment of Crohn's disease? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **2013**;10(7):395-401.
61. Oheda Y, Kotani M, Murata M, Sakuraba H, Kadota Y, Tatano Y, Kuwahara J, Itoh K. Elimination of abnormal sialylglycoproteins in fibroblasts with sialidosis and galactosialidosis by normal gene transfer and enzyme replacement. *Glycobiology.* **2006**;16(4):271-80.
62. Oji Y, Hatano T, Ueno SI, Funayama M, Ishikawa KI, Okuzumi A, Noda S, Sato S, Satake W, Toda T, Li Y, Hino-Takai T, Kakuta S, Tsunemi T, Yoshino H, Nishioka K, Hattori T, Mizutani Y, Mutoh T, Yokochi F, Ichinose Y, Koh K, Shindo K, Takiyama Y, Hamaguchi T, Yamada M, Farrer MJ, Uchiyama Y, Akamatsu W, Wu YR, Matsuda J, Hattori N. Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease. *Brain.* **2020**;143(4):1190-205.
63. Onorati AV, Dyczynski M, Ojha R, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer. *Cancer.* **2018**;124(16):3307-3318.
64. Pei J, Pan X, Wang A, Shuai W, Bu F, Tang P, Zhang S, Zhang Y, Wang G, Ouyang L. Developing potent LC3-targeting AUTAC tools for protein degradation with selective autophagy. *Chem Commun (Camb).* **2021**;57(97):13194-97.
65. Pérez-Cañamás A, Benvegnù S, Rueda CB, Rábano A, Satrústegui J, Ledesma MD. Sphingomyelin-induced inhibition of the plasma membrane calcium ATPase causes neurodegeneration in type A Niemann-Pick disease. *Mol Psychiatry.* **2017**;22(5):711-23.
66. Raben N, Roberts A, Plotz PH. Role of autophagy in the pathogenesis of Pompe disease. *Acta Myol.* **2007**;26(1):45-8.
67. Rama Rao KV, Kielian T. Astrocytes and lysosomal storage diseases. *Neuroscience.* **2016**;323:195-206.
68. Sango K, McDonald MP, Crawley JN, Mack ML, Tiffit CJ, Skop E, Starr CM, Hoffmann A, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. Mice lacking both subunits of lysosomal  $\beta$ -hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nat Genet.*

- 1996;14(3):348-52.
69. Sango K, Yamanaka S, Hoffmann A, Okuda Y, Grinberg A, Westphal H, McDonald MP, Crawley JN, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat Genet.* **1995**;11(2):170-6.
  70. Sano R, Annunziata I, Patterson A, Moshiah S, Gomero E, Opferman J, Forte M, d'Azzo A. GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* **2009**;36(3):500-11.
  71. Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampinato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A. A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet.* **2008**;17(1):119-29.
  72. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2013**;14(5):283-96.
  73. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, Chen CM, Clark LN, Condroyer C, De Marco EV, Dürr A, Eblan MJ, Fahn S, Farrer MJ, Fung HC, Gan-Or Z, Gasser T, Gershoni-Baruch R, Giladi N, Griffith A, Gurevich T, Januario C, Kropp P, Lang AE, Lee-Chen GJ, Lesage S, Marder K, Mata IF, Mirelman A, Mitsui J, Mizuta I, Nicoletti G, Oliveira C, Ottman R, Orr-Urtreger A, Pereira LV, Quattrone A, Rogaeva E, Rolfs A, Rosenbaum H, Rozenberg R, Samii A, Samaddar T, Schulte C, Sharma M, Singleton A, Spitz M, Tan EK, Tayebi N, Toda T, Troiano AR, Tsuji S, Wittstock M, Wolfsberg TG, Wu YR, Zabetian CP, Zhao Y, Ziegler SG. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med.* **2009**;361(17):1651-61.
  74. Skowyra ML, Schlesinger PH, Naismith TV, Hanson PI. Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science.* **2018**;360(6384):eaar5078.
  75. Stein A, Weber G, Wahl MC, Jahn R. Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature.* **2009**;460(7254):525-8.
  76. Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science.* **2009**;323(5913):474-7.
  77. Suzuki M, Fujikake N, Takeuchi T, Kohyama-Koganeya A, Nakajima K, Hirabayashi Y, Wada K, Nagai Y. Glucocerebrosidase deficiency accelerates the accumulation of proteinase K-resistant  $\alpha$ -synuclein and aggravates neurodegeneration in a

- Drosophila model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* **2015**;24(23):6675-86.
78. Takagi A, Kume S, Kondo M, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Haneda M, Chano T, Matsusaka T, Nagao K, Adachi Y, Chan L, Maegawa H, Uzu T. Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation. *Sci Rep.* **2016**;6:18944.
  79. Takahashi D, Arimoto H. Targeting selective autophagy by AUTAC degraders. *Autophagy.* **2020**;16(4):765-6.
  80. Takahashi D, Moriyama J, Nakamura T, Miki E, Takahashi E, Sato A, Akaike T, Itto-Nakama K, Arimoto H. AUTACs: Cargo-Specific Degradation Using Selective Autophagy. *Mol Cell.* **2019**;76(5):797-810.
  81. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* **2006**;126(4):663-76.
  82. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun.* **2008**;367(3):616-22.
  83. Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, Hikoso S, Takeda T, Mizote I, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nishida K, Shimizu T, Hori M, Komuro I, Takuji Shirasawa TS, Mizushima N, Otsu K. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy.* **2010**;6(5):600-6.
  84. Tatano Y, Fujinawa R, Kozutsumi Y, Takahashi T, Tsuji D, Takeuchi N, Tsuta K, Takada G, Sakuraba H, Itoh K. Tropoelastin regulates chemokine expression in fibroblasts in Costello syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* **2008**;372(4):681-7.
  85. Toshima T, Shirabe K, Fukuhara T, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Ikeda T, Okano S, Maehara Y. Suppression of autophagy during liver regeneration impairs energy charge and hepatocyte senescence in mice. *Hepatology.* **2014**;60(1):290-300.
  86. Uematsu M, Nishimura T, Sakamaki Y, Yamamoto H, Mizushima N. Accumulation of undegraded autophagosomes by expression of dominant-negative STX17 (syntaxin 17) mutants. *Autophagy.* **2017**;13(8):1452-64.
  87. Ungar D, Hughson FM. SNARE protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2003**;19:493-517.
  88. Wong YC, Holzbaur EL. Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2014**;111(42):E4439-48.
  89. Yamazaki T, Chang TY, Haass C, Ihara Y. Accumulation and aggregation of amyloid

beta-protein in late endosomes of Niemann-pick type C cells. *J Biol Chem.* **2001**;276(6):4454-60.

90. Zeng S, Huang W, Zheng X, Liyan Cheng, Zhang Z, Wang J, Shen Z. Proteolysis targeting chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: Recent progress and future challenges. *Eur J Med Chem.* **2021**;210:112981.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧にご指導、ご鞭撻下さいました、徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学域) 薬学研究科附属医薬創製教育研究センター 創薬生命工学分野 伊藤 孝司 教授、辻 大輔 助教(現 安田女子大学薬学部)に心より感謝致します。

本研究は、徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学域) 薬学研究科附属医薬創製教育研究センター 創薬生命工学分野にて行われたものであり、研究に際してご協力下さいました、研究室の諸氏に御礼申し上げます。

最後に、精神的・経済的支えとなり、深い理解をもって始終暖かく見守って下さいました、郷里の家族に心より感謝致します。

2023 年 1 月  
田中裕大