

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10052

研究課題名（和文）ムコ多糖症発症における小胞体機能の役割解明と治療戦略への応用

研究課題名（英文）The role of the endoplasmic reticulum in Mucopolysaccharidosis type II

研究代表者

金本 聡自（Kanemoto, Soshi）

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90611913

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：日本を含む東アジアにおいて発症事例の多い 型ムコ多糖症（ハンター症候群）の発症機構を解明すべく研究を行った。ハンター症候群の原因遺伝子はイズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）をコードする遺伝子である。これまでにハンター症候群患者から同定された変異遺伝子型を用い、培養細胞系におけるIDSの動態を検討した。野生型IDSは翻訳後リソソームまで送り届けられるものの、変異型IDSは翻訳後ただちに分解されることを明らかにした。また、変異型IDSの分解はプロテアソーム系を介していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムコ多糖症の治療法としては、対症療法に加えて、根治を目指すために酵素補充療法や造血幹細胞移植などの方法がとられる。しかし、根治療法にもそれぞれに利点と難点があることに加えて、中枢神経や骨など、効果が表れない組織もある。そのため、従来とは異なるアプローチによる治療戦略の確立が期待されている。本研究成果により、ハンター症候群の発症機構の一端を明らかにできた。プロテアソーム系を調節するという新たな切り口からのムコ多糖症治療戦略構築に貢献できる可能性が拓けた。

研究成果の概要（英文）：Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is one of the lysosome diseases, which is designated as an intractable disease in Japan. Although the gene encoding iduronate 2-sulfatase (IDS) is identified as the causative gene for MPS II, the molecular pathogenesis for MPS II is still not fully understood. In this study, causative mechanism was investigated with several mutant types of IDS gene overexpressing in the human cell line HeLa cells. As a result, normal type of IDS was transported from the endoplasmic reticulum (ER) to the lysosome in order to function as an enzyme which degrades glycosaminoglycan, while mutant IDS was accumulated in the ER and then was rapidly degraded by proteasome machinery. The inhibition of the degradation of mutant IDS by proteasome led to the recovery of the enzymatic activity of mutant IDS in part.

研究分野：医化学

キーワード：ムコ多糖症 ライソソーム病 小胞体 小胞体関連分解 イズロン酸-2-スルファターゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ムコ多糖症はライソゾーム病の一種として知られ、ムコ多糖を分解するライソゾーム酵素が欠損あるいは機能低下することで全身にムコ多糖が蓄積することで発症する。日本を含む東アジアにおいては型ムコ多糖症として分類されるハンター症候群の発症事例が多いことが知られている。ハンター症候群の原因遺伝子はイズロン酸-2-スルファターゼをコードする遺伝子であることが判明しており、これまでに多数の変異遺伝子型が既に同定されている。イズロン酸-2-スルファターゼは、生合成の際に小胞体にて翻訳後修飾を受け、ゴルジ体を経由してライソゾームへ運搬されると考えられている。ライソゾームに運搬された後、ムコ多糖の一種であるヘパラン硫酸やデルマタン硫酸を分解する酵素として働く。そのため、ハンター症候群発症者の細胞内ではヘパラン硫酸やデルマタン硫酸が分解されず蓄積することになる。また、尿中にヘパラン硫酸、デルマタン硫酸が大量に排泄されることも知られている。

### 2. 研究の目的

ハンター症候群の発症要因の一つとして、変異型イズロン酸-2-スルファターゼ (IDS) の発現が小胞体機能不全を引き起こしている可能性を考え、その検証を行った。具体的には、1) 変異型 IDS 酵素が不良タンパク質として小胞体内に蓄積してしまいライソゾームまで輸送されないこと、2) 不良タンパク質として認識された変異型 IDS が分解されることで酵素の欠損もしくは機能低下を招くこと、について調査し、それを改善する方法を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa 細胞に対し、野生型のイズロン酸-2-スルファターゼ (IDS) および複数種の変異型 IDS をそれぞれ遺伝子導入し、IDS タンパク質の発現量を比較検討するためにウェスタンブロッティングを行う。また、IDS の細胞内局在を調べるために免疫蛍光染色を行う。

(2) 野生型および変異型 IDS タンパク質の安定性を調べるために、タンパク質翻訳阻害剤シクロヘキシミドを用い、タンパク質の分解速度を調べるチェイスアッセイ実験を行う。

(3) 変異型 IDS タンパク質の分解がどこで行われているか明らかにするため、プロテアソーム阻害剤やリソソーム阻害剤を用いて分解経路を検討する。

(4) IDS タンパク質の分解に関わる分子を同定するためにタンパク質の分解に関連する分子のノックダウンによる機能阻害を行い、IDS の分解を制御する分子を同定する。

(5) 野生型および変異型 IDS タンパク質の IDS 酵素活性を比較検討する。さらに、変異型 IDS タンパク質の分解を抑制した場合に酵素活性に影響を及ぼすか調べる。

### 4. 研究成果

(1) 野生型および変異型 IDS タンパク質の発現量を比較検討するために HeLa 細胞に野生型および変異型 IDS を遺伝子導入し、ウェスタンブロッティングを行った。野生型 IDS を発現させたサンプルでは分子量 55kDa の成熟型に加えて、分子量 75kDa の前駆体型のバンドを検出した。変異型 IDS は発症する症状の重度によって軽症型の変異タイプと重症型の変異タイプに分けられる。それぞれ 4 種類ずつの軽症型 (R48P, A85T, W337R, Q531X 型) および重症型 (P86L, S333L, S349I, R468Q 型) の変異 IDS を発現させたサンプルでウェスタンブロッティングを行ったところ、いずれも分子量 75kDa の前駆体型のバンドは検出されたものの、成熟型のバンドはほとんど検出されなかった。軽症型の一部の変異 IDS (A85T および Q531X 型) については、成熟型のバンドが検出されるサンプルもあったが、発現量は野生型に比べて著しく低かった。

野生型および変異型 IDS の細胞内での局在パターンを解析した。IDS に対する抗体を用いて免疫染色を行い、細胞内小器官のマーカー分子であるカルネキシン (小胞体)、GM130 (シス-ゴルジ)、LAMP2 (リソソーム) との二重免疫染色によって局在を判定した。野生型 IDS の大部分は、LAMP2 と共局在するものが多く、大部分がリソソームに分布していることが伺えた。一部の野生型 IDS は GM130 と共局在しており、輸送過程の IDS タンパク質と考えられた。一方、変異型 IDS はカルネキシンと共局在しており、翻訳後は小胞体内に貯留し、ゴルジ体やリソソームへ輸送されていないことが分かった。

(2) IDS タンパク質を強制発現させた培養細胞に対しタンパク質翻訳阻害剤シクロヘキシミド処理することで新規タンパク質合成を停止し、既に翻訳されたタンパク質の発現量を経時的に観察することで、タンパク質の安定性を調べた (チェイスアッセイと呼ぶ)。野生型 IDS サンプルについては、前駆体型の 75kDa のバンドは経時的に減少したが、55kDa の成熟型バンドは経時的に増加した。このことは野生型 IDS が時間経過とともに成熟型へと変換され、成熟型に変

換された後は安定して発現していることを示している。一方、変異型 IDS として、A85T 型および R468Q 型を発現させたサンプルは、前駆体型の 75kDa のバンドが速やかに消失したものの、55kDa サイズの場所にはバンドを検出することはなかった。すなわち、変異型 IDS は軽症型の A85T タイプおよび重症型 R468Q タイプのいずれもタンパク質として不安定であり、生合成後は速やかに分解を受けることが示唆された。

(3) 変異型 IDS は不安定で生合成後速やかに分解を受けていることから、どこで分解されるのかを明らかにするために、タンパク質分解機構に対する阻害剤を用いて、変異 IDS の分解経路を調べた。プロテアソーム系の阻害剤として MG132 を、リソソーム系の阻害剤としてクロロキンをを用いた。(2) で行ったチェイスアッセイ試験で用いたシクロヘキシミド処理と同時に、MG132 あるいはクロロキン処理を行い、タンパク質の発現量の経時変化を追った。変異型 IDS の A85T タイプおよび R468Q タイプはシクロヘキシミド単独処理では、時間経過とともに速やかに発現量が減少するが((2)の結果参照)、MG132 を同時処理すると分解速度が著しく減退し、薬剤処理後 24 時間経過しても開始時点の発現量から約 50% のタンパク質が残存していた。一方、クロロキン処理ではそのような効果は見られず、シクロヘキシミドと同時処理しても変異型 IDS タンパク質は速やかに分解され消失した。この結果から、変異型 IDS は軽症型および重症型いずれもプロテアソーム系で分解されることが明らかとなった。

(4) 小胞体に蓄積した不良タンパク質が分解される際、小胞体関連分解(ER-associated degradation; ERAD)と呼ばれる分解機構で分解されることが知られる。ERAD は、小胞体内腔に蓄積した不良タンパク質を小胞体内から引きずり出して、細胞質領域に存在するプロテアソーム系に不良タンパク質を受け渡して分解する機構である。変異型 IDS がプロテアソーム系で分解されることが分かったことから、変異型 IDS は ERAD の系によって小胞体内部からプロテアソームに受け渡されていることが考えられる。ERAD では分解する標的タンパク質にユビキチンを付加する E3 リガーゼが働くことで最終的にプロテアソーム系で分解を受ける。変異型 IDS にユビキチンを付加する E3 リガーゼを同定するために、これまでに ERAD の際にはたらく E3 リガーゼとして報告されている分子についてノックダウンを行った。ノックダウンした E3 リガーゼは HRD1, RNF5, RNF145, RNF185, AMFR, MARCH, TMEM129 の 7 種類である。これらのうち、HRD1 をノックダウンすると、変異型 IDS の A85T タイプおよび R468Q タイプの前駆体型の発現量が 5 倍程度増加した。一方、残りの 6 種類の E3 リガーゼのノックダウンでは、前駆体型の増加は見られなかった。このことから変異型 IDS は HRD1 によってユビキチン修飾を受け、ERAD で分解されていることが明らかとなった。

さらに、HRD1 をノックダウンした際の変異型 IDS の細胞内局在を免疫染色によって調べた。重症型の R468Q タイプは HRD1 をノックダウンしても小胞体に局在していた。しかしながら、軽症型の A85T タイプは HRD1 をノックダウンすると、一部リソソームへ局在する割合が増加した。

(5) ERAD の系、すなわちプロテアソーム系による分解経路をブロックすると変異型 IDS タンパク質の分解が免れることが分かった。さらに、軽症型の変異(A85T タイプ)だと一部のタンパク質はリソソームまで輸送されることも分かった。一方で、重症型の変異(R468Q タイプ)は生合成後の分解は抑制されるものの、タンパク質は小胞体にとどまり、リソソームまでは輸送されなかった。そこで、分解を免れた変異型 IDS がヘパラン硫酸やデルマタン硫酸を分解する酵素活性を有するか検討した。プロテアソーム系をブロックしていない定常状態において、野生型 IDS の酵素活性を 100% とすると、軽症型タイプの変異 IDS の酵素活性は 0.2-2.4% の活性しか持たず、重症型タイプの変異 IDS の酵素活性は全くないあるいはほぼ 0 に近い活性であると報告されている(引用文献)。HRD1 をノックダウンして変異型 IDS の酵素活性を測定したところ、軽症型の A85T タイプは、ノックダウンしない状態に比べて酵素活性が約 1.5 倍程度上昇した。一方、重症型の R468Q タイプの場合は、HRD1 をノックダウンしない場合とノックダウンした場合で酵素活性に有意な差は見られなかった。このことから、軽症型の変異については、プロテアソームをブロックすることで、ある程度酵素活性を回復させることが期待できる。

引用文献: K Sukegawa-Hayasaka et al., J Inherit Metab Dis., 2006 Dec;29(6):755-61. doi: 10.1007/s10545-006-0440-7.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Osaki Y, Saito A, Kanemoto S, Kaneko M, Matsuhisa K, Asada R, Masaki T, Orii K, Fukao T, Tomatsu S, Imaizumi K	4. 巻 9
2. 論文標題 Shutdown of ER-associated degradation pathway rescues functions of mutant iduronate 2-sulfatase linked to mucopolysaccharidosis type II.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Dis.	6. 最初と最後の頁 808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-0871-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Maeoka Y, Wu Y, Okamoto T, Kanemoto S, Guo XP, Saito A, Asada R, Matsuhisa K, Masaki T, Imaizumi K, Kaneko M.	4. 巻 294
2. 論文標題 NFAT5 up-regulates expression of the kidney-specific ubiquitin ligase gene Rnf183 under hypertonic conditions in inner-medullary collecting duct cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 101-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Matsuhisa K, Ohtake Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 ER Stress and Disease: Toward Prevention and Treatment.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1337-1343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1248/bpb.b17-00342.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito A, Cai L, Matsuhisa K, Ohtake Y, Kaneko M, Kanemoto S, Asada R, Imaizumi K.	4. 巻 144
2. 論文標題 Neuronal activity-dependent local activation of dendritic unfolded protein response promotes expression of brain-derived neurotrophic factor in cell soma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 35-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.1111/jnc.14221.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wu Y, Guo XP, Kanemoto S, Maeoka Y, Saito A, Asada R, Matsuhisa K, Ohtake Y, Imaizumi K, Kaneko M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Sec16A, a key protein in COPII vesicle formation, regulates the stability and localization of the novel ubiquitin ligase RNF183.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0190407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1371/journal.pone.0190407.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohtake Y, Matsuhisa K, Kaneko M, Kanemoto S, Asada R, Imaizumi K, Saito A.	4. 巻 375
2. 論文標題 Axonal Activation of the Unfolded Protein Response Promotes Axonal Regeneration Following Peripheral Nerve Injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 34-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 金本聡自、今泉和則	4. 巻 90
2. 論文標題 小胞体ストレスと疾患	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 51-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.14952/SEIKAGAKU.2018.900051	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura T, Bando Y, Nakazawa H, Kanemoto S, Yoshida S.	4. 巻 126
2. 論文標題 Pathological changes in mice with long term cuprizone administration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 229-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2019.03.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎陽介、金本聡自、齋藤敦、今泉和則
2. 発表標題 小胞体関連分解によるムコ多糖症原因分子イズロン酸-2-スルファターゼの活性化抑制機構
3. 学会等名 日本生化学会 中国・四国支部会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----