

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16489

研究課題名(和文) リソソーム内腔のイオン動態に着目した神経型Gaucher病の病態研究

研究課題名(英文) Pathophysiological study of intra-lysosomal ion kinetics in neural type Gaucher disease

研究代表者

徳留 健太郎 (Tokudome, Kentaro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80805002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：pHおよび塩化物イオン濃度変化を捉えることのできる既存の蛍光蛋白質の改良とその神経型Gaucher病の病態解明を目的とし、申請者は改良された蛍光蛋白質が従来のものと比較した際に、pHの低下および塩化物イオンの存在下で蛍光の緩やかな低下を示すことを見出した。また、神経芽細胞に蛍光蛋白質を導入した際に、従来のものと比較し、改良した蛍光蛋白質は両イオン動態の変化に対して濃度依存的でかつ広範囲における蛍光強度の変化を捉えることにも成功した。さらに、本病態モデル細胞では、リソソーム内腔のpH上昇と塩化物イオンの上昇を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光蛋白質の多くはpH6以下の環境では消光することが報告されており、リソソームのような酸性環境下でのpHおよび塩化物イオンの変動を捉えることは困難であるとされていた。そのため、本研究で改良した蛍光蛋白質は上記の環境におけるイオン動態を捉えることが可能となり、さらに、神経型Gaucher病のような難治性のリソソーム関連疾患のイオン動態を捉えることのできる有力なツールとなりうることを期待している。加えて、本病態の新たな治療ターゲットとして上記のイオン動態を司るイオン輸送体を上げることが可能となるため、本病態の新たな治療薬開発にもつなげることができる。

研究成果の概要(英文)：The object of this study is to improve the function of fluorescent protein which can measure both pH and chloride ion and reveal the pathophysiology of neural type Gaucher disease focused on these ions' kinetics.

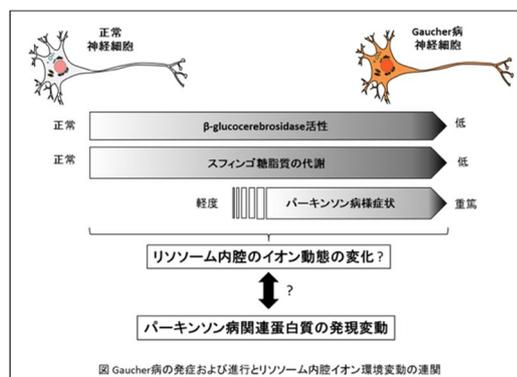
Introducing a mutation into the fluorescent protein attenuated the reduction of fluorescent intensity to pH reduction and increased chloride ion concentration compared to those of original one. Introduction of this protein into neuroblastoma cell, mutant protein can measure both ions broader than those of original ones with dose-dependency. Furthermore, Gaucher disease model cells showed lysosomal pH and chloride ion increase compared to normal cells.

研究分野：中枢神経薬理学

キーワード：Gaucher病 リソソーム イオン 塩化物イオン pH

### 1. 研究開始当初の背景

Gaucher 病はリソソーム病のうち最も患者数が多く、その有病率は約 5 万人に 1 人である。この疾患は、 $\beta$ -glucocerebrosidase (GBA) 遺伝子変異によるその酵素活性の低下により誘発される。この現象は、その酵素の基質であるスフィンゴ糖脂質 (グルコセレブロシドおよびグルコシルスフィンゴシン) のリソソーム内腔への過剰蓄積を惹起し、リソソーム内腔 pH の上昇と、それに引き続いて起こるリソソーム内加水分解酵素の機能低下を示す。その結果、リソソームによる細胞内の異物除去機構は破綻し、Gaucher 病で認められる臨床症状 (非神経症状: 肝肥大や血球減少症、神経症状: けいれん発作やパーキンソン病様症状) が現れる。



以前より、GBA の活性低下とパーキンソン病の関連性が注目されてきた。例えば、GBA 遺伝子変異はパーキンソン病のリスク因子の 1 つであることや、パーキンソン病モデルマウスの黒質内における  $\alpha$ -シヌクレインの異常蓄積は GBA の活性低下によって引き起こされることが報告されている (1, 2)。しかし、それでもなお、この関連性については不明な点が多い。

細胞内におけるリソソームの異物除去機能は、リソソーム内腔のイオン動態により調節されている。細胞内におけるリソソームの異物除去機能は、リソソーム内腔のイオン動態により調節を受ける。通常、リソソーム内腔は、リソソーム膜に発現する液胞型  $H^+$ ポンプ (V-ATPase) と電位依存性の  $Cl^-$ チャネル (CLC7) などにより酸性に維持されている。しかし、本病態における  $Cl^-$ チャネルによるリソソーム内 pH 維持にどのように寄与しているかについてはわかっていない。

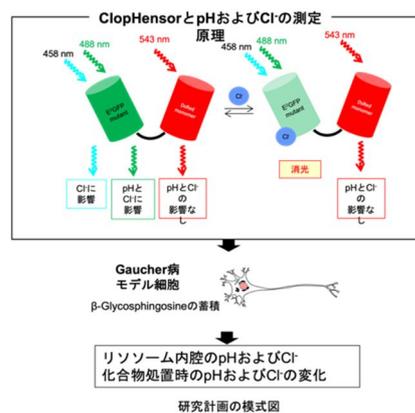
### 2. 研究の目的

本研究の目標は、細胞内 pH および  $Cl^-$  を同時に測定できる蛍光蛋白質 ClopHensor (3) を、細胞質内だけでなくリソソーム内でも使用できるように改良を加える。さらに、改良を加えた上記蛍光蛋白質を用い、Gaucher 病モデルのリソソーム内における pH および  $Cl^-$  の動態を捉えることである。

### 3. 研究の方法

リソソーム内腔の pH および  $Cl^-$  の同時測定に使用する ClopHensor の改良と、神経細胞へのその蛍光蛋白質の導入に着手した。

まず、ClopHensor を構成する  $E_2GFP$  に対して遺伝子変異を PCR 法によりそのプラスミド DNA に導入した。そして、各変異体のプラスミドを蛋白質発現系である BL21(DE3) に導入し、蛋白質発現を誘導した。その後、各  $E_2GFP$  変異体蛋白質をカラム精製し、その精製蛋白質の蛍光特性を蛍光光度計により評価した。具体的には、pH5.5 における  $Cl^-$  感受性を、458 nm で励起させた際の蛍光スペクトルの変化と等吸収点への影響について評価した。上記検討によって選ばれた  $E_2GFP$  変異体に対して、赤色蛍光蛋白質である DsRed をリンカーで結合させた ClopHensor を作成し、同様の評価を行った。



続いて、ClopHensor 変異体の細胞内における pH および  $Cl^-$  の変動による蛍光特性を共焦点レーザー顕微鏡で観察および撮影を行い、その輝度を指標に評価した。実際には、上記で作成した ClopHensor 変異体遺伝子をマウス神経芽細胞株である Neuro2a のリソソーム内腔に導入し、リソソーム内腔 pH もしくは  $Cl^-$  を固定した際における蛍光強度の変動を評価した (検量線の作成)。加えて、V-ATPase 阻害剤である VafilomycinA1 および CLC 阻害剤である DIDS を処置した際の本蛍光蛋白質の蛍光変化を捉えることにより、ClopHensor 変異体が機能するかどうかを確認した。

さらに、Neuro2a に GBA 阻害薬である condiritol  $\beta$ -epoxide (CBE) を処置した Gaucher 病モデルのリソソーム内腔に本蛍光蛋白質を導入した際の pH および  $Cl^-$  の挙動を捉えた。

### 4. 研究成果

#### (1) ClopHensor の改良

最初に ClopHensor を構成する E<sub>2</sub>GFP の変異体蛋白質を作成し、その蛍光特性について評価した。その結果、E<sub>2</sub>GFP の 149 番目への変異導入が Cl<sup>-</sup> 濃度上昇に対する蛍光強度の急激な低下を緩やかとすることが明らかとなった。しかしながら、pH5.5 のような酸性環境下では、励起波長 458 nm における蛍光強度の有意な上昇がどの変異体においても認められなかった。また、等吸収点 (pH の変動の影響を受けない吸収波長で、E<sub>2</sub>GFP の場合は 458 nm) はいずれの変異導入による影響を受けないことを確認した。さらに、この性質に関しては赤色蛍光蛋白質の DsRed を連結させて ClopHensor とした際も、この変異による蛍光特性は維持されており、実際に Kd 値が 149 番目の変異導入により約 2 倍高い値を示した。

以上の結果より、E<sub>2</sub>GFP の 149 番目への変異導入は、他の特性に影響を与えることなく、Cl<sup>-</sup> 濃度上昇による急激な消光を抑えることが可能とした。上記変異部位は、E<sub>2</sub>GFP が Cl<sup>-</sup> と結合に必要な 203 番目のチロシンとそれを取り囲むアミノ酸残基との水素結合に関係していることが推測されるが、それがこの変異を導入した際にどのような影響を受けるかについては現在のところ不明なままである (4)。今後の課題としては、上記変異体の性質を保ったより蛍光強度の高い変異体の作成を目指す予定にしている。

## (2) ClopHensor のリソソーム内への標識と機能評価

続いて、本蛍光蛋白質をマウス神経芽細胞である Neuro2a を導入し、リソソーム内で本蛍光蛋白質の機能を示すことを共焦点レーザー顕微鏡で撮影し、その輝度を指標に評価した。まず、この蛋白質がリソソームにターゲティングされているかどうかを蛍光免疫染色により確認した。その結果、本蛋白質がリソソーム膜蛋白質である LIMP2 と共局在を示すことから、リソソームに膜に発現することを確認した (図 1)。また、その蛍光特性をリソソーム内の pH および Cl<sup>-</sup> 濃度を固定した際の蛍光輝度の変化により評価した。従来の ClopHensor では、リソソーム内腔を pH4.5 に固定した際に、Cl<sup>-</sup> 濃度が低い環境でも蛍光強度比 (I<sub>458 nm</sub>/I<sub>543 nm</sub>) が低く、Cl<sup>-</sup> 濃度を上昇させてもその変化がほとんどなく、リソソーム内における Cl<sup>-</sup> 濃度の変化を捉えることが困難であった。一方で、上述変異体を導入した ClopHensor は、Cl<sup>-</sup> 濃度が低い環境でも蛍光強度比 (I<sub>458 nm</sub>/I<sub>543 nm</sub>) が ClopHensor の値よりも高く、Cl<sup>-</sup> 濃度の低下に伴い、その値も低下することから、上記蛍光蛋白質はリソソーム内腔のような酸性環境下でも蛍光変化を捉えることが可能であることが示された (図 2)。

また、その蛍光変化がリソソーム内腔 pH や細胞内の Cl<sup>-</sup> 濃度に影響を与える薬剤を処置した場合のリソソーム内腔のイオン動態を ClopHensor 変異体により捉えた。その結果、V-ATPase 阻害薬である BafilomycinA1 を処置した場合、リソソーム内 pH は 6 程度まで上昇した。また、Cl<sup>-</sup> チャネル阻害剤である DIDS の処置により、リソソーム内 Cl<sup>-</sup> 濃度は 50 mM 程度まで減少することが示され、ClopHensor 変異体がリソソーム内で機能し、イオン動態を捉えることが可能であることが明らかとなった。

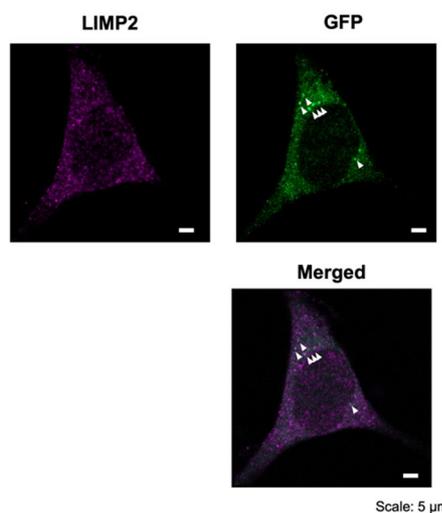


図1. ClopHensor変異体のリソソーム膜への局在

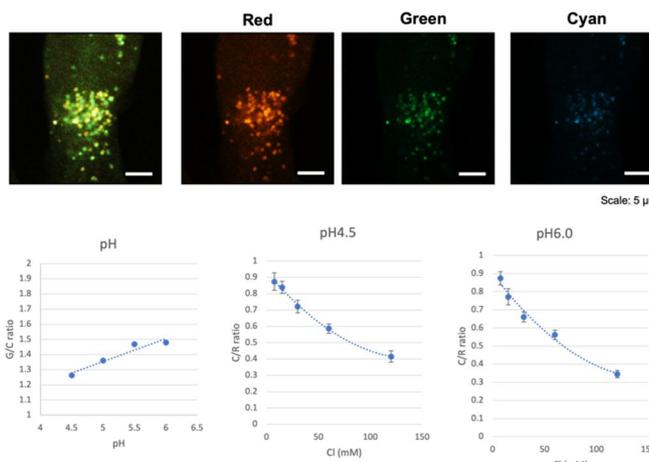


図2. ClopHensor変異体を用いたリソソーム内イオン動態の評価

## (3) Gaucher 病モデルにおけるリソソーム内イオン動態

最後に、Gaucher 病モデルのリソソーム内でのイオン濃度の変化を測定した。本研究では、マウス神経芽細胞株である Neuro2a に対して GBA 阻害剤である CBE を 8 日間処置した。このモデルではリソソーム内 pH の上昇やスフィンゴ糖脂質の蓄積が既に報告されている (5)。実際に、CBE の 8 日間処置で本病態モデルのリソソーム内 pH が 6 付近まで上昇することが本変異体蛍光蛋白質や Lysosenser の両方で確認した。そして、Cl<sup>-</sup> 濃度は対照群と比較して、有意な上昇を示した。本現象は、リソソーム膜に発現する CLC7 による Cl<sup>-</sup> の取り込みが亢進していることを意味し、本病態時にはリソソーム内の pH を上昇に対して上記輸送体の代償的な機能亢進が起こっていると推測される。今後、この仮説を立証すべく様々な検討が必要と考えられる。

## 引用

- (1) Sidransky E. *Mol Genet Metab.* 2005, 84(4):302-4.
- (2) Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, Sidransky E, Grabowski GA, Krainc D. *Cell.* 2011, 146(1):37-52.
- (3) Arosio D, Ricci F, Marchetti L, Galdani R, Albertazzi L, Beltram F. *Nat Methods.* 2010, 7:516-8.
- (4) R Nifosi, V Tozzini *Proteins.* 2003, 51(3):378-89.
- (5) Sillence DJ. *Mol Genet Metab.* 2013 , 9(2):194-200.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------