実験技術

蛍光観察によるシャペロン介在性
オートファジー活性の評価

関 貴弘

要約：細胞内タンパク質分解系の一つであるオートファジー・リソソーム系にはリソソームに基質を運ぶ経路の違いにより、マクロオートファジー (MA)、ミクロオートファジー (mA) およびシャペロン介在性オートファジー (CMA) の3種類が存在している。これら3種類のうち、MAは特異的活性マーカーであるLC3-IIの発見を契機に、研究が爆発的に進展し、生理機能や疾患発症への関与が次々と明らかになっている。一方で、mAは酵母では研究が進んでいるものの、哺乳細胞におけるmAの実態は不明なままである。CMAについてはHsc70やLAMP2Aといった関連する分子は解明されたが、有用な活性マーカーがなく、簡便な活性評価法も存在しないため、MAに比べて研究が遅れを取っている。しかし、CMAは①細胞質タンパク質の30%が基質となる、②他の分解系と異なり哺乳細胞しか存在しない、という特徴を持っておりCMAは哺乳細胞の機能維持に不可欠であり、CMAの破綻が様々な疾患発症に繋がる可能性は高い。我々はCMAの基質として知られているGAPDHに多機能ラベリングシステムであるHaloTagを融合したものをCMAマーカーとし、蛍光顕微鏡で簡便にかつ一細胞レベルで詳細にCMA活性を評価することが可能な新規活性評価法を開発した。この新規CMA活性評価法はCMAの生理機能や疾患発症への関与解明に大きく寄与することが期待される。本稿はこの新規CMA活性評価法の詳細とこれを応用した神経変性疾患モデルにおけるCMA活性評価を行った結果を紹介する。

1. はじめに

生体はDNAに保存された遺伝情報から、RNAを介して合成されるタンパク質を機能分子として、様々な細胞機能が行われる (セントラルドグマ)。合成され

たタンパク質が不要になると分解を受けるが、このタンパク質分解は単に不要なものを分解するシステムと考えられていたため、19世紀から20世紀初頭にかけてはセントラルドグマに関する研究が盛んに行われる一方で、タンパク質分解についてはほとんど分かっていなかった。しかし、タンパク質分解がATP依存的に起こることが解明され、細胞がエネルギーを使って積極的にタンパク質を分解することが示唆されて以降、タンパク質分解系も広く注目を集めるようになった。その結果、タンパク質分解系はタンパク質の品質と量を管理することで、①機能性タンパク質の量を調節し、転写制御や細胞の増殖・分化などの機能に関与する、②外来性タンパク質を分解して抗原提示を行う、③飢餓状態時に細胞自身のタンパク質を分解して、新規タンパク質合成のためのアミノ酸補充を行う、④ストレスなどによって生じた異常タンパク質を分解し、細胞内浄化を行う、など様々な細胞機能に重要な役割を果たすことが解明されてきた(1)。

細胞内タンパク質分解系はユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の2種類に大別される (図1)。前者は分解されるタンパク質を小さなタンパク質であるユビキチンにより標識し、プロテアソームと呼ばれる巨大なタンパク質複合体に運ぶことで基質選択的な分解を行う (図1A)。オートファジー・リソソーム系は多くのタンパク質分解酵素を含む細胞小器官であるリソソームで細胞内タンパク質を分解する系であり、リソソームへタンパク質を運ぶ経路の違いにより、マクロオートファジー (MA)、ミクロオートファジー (mA) およびシャペロン介在性オートファジー (CMA) の3種類に大別される (図1B)。MAではオートファゴソームと呼ばれる脂質2重膜に細胞質タンパク質や細胞小器官が取り込まれる。オー

キーワード：タンパク質分解系、シャペロン介在性オートファジー、Hsc70、GAPDH、HaloTag

熊本大学大学院 生命科学研究部 薬物活性学分野 (〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1)

E-mail: takaseki@kumamoto-u.ac.jp 原稿受領日：2014年12月3日、依頼原稿

Title: Fluorescence-based method to assess the activity of chaperone-mediated autophagy Author: Takahiro Seki

図1 主要な細胞内タンパク質分解系

A: ユビキチン・プロテアソーム系。B: オートファジー・リソソーム系。オートファジー・リソソーム系はさらにマクロオートファジー (MA)、ミクロオートファジー (mA) およびシャペロン介在性オートファジー (CMA) の3つの経路に分類される。E1: ユビキチン活性化酵素, E2: ユビキチン結合酵素。

トファゴソームがリソソームと融合しオートリソソームとなり、リソソーム内のタンパク質分解酵素でタンパク質が分解を受ける(2)。MAは長らく酵母を用いた研究が中心であったが、2000年前後に水島らが哺乳細胞でのMA関連タンパク質を次々と同定したことから哺乳細胞における研究の契機となり、その中でもLC3-IIはMAの活性マーカーとして頻用され、MA研究の爆発的な進展に繋がった(2-4)。MAではオートファゴソームが細胞質基質をバルクで取り込むメカニズムであるため、非選択的なタンパク質分解系と考えられてきたが、近年の研究によりユビキチン化タンパク質や障害されたミトコンドリアなどをMAが選択的に分解することも解明された(5,6)。

タンパク質分解系の研究はユビキチン・プロテアソーム系とMAが中心であり、オートファジー・リソソーム系の残り二つの経路であるmAとCMAの研究は大幅に遅れている。mAに関しては酵母において研究が盛んであるものの、哺乳細胞でのmAのメカニズムは分かっていない(7)。CMAは、分子シャペロンであるHsc70が基質タンパク質を認識し、リソソーム膜上のLAMP2Aを介して基質をリソソームに取り込む、という選択的な分解系であることは分かっているが、CMAの活性制御メカニズムや生理機能や疾患との関連はほとんど分かっていない(8)。CMA研究の進展を妨げている要素として、簡便な活性評価系が存在しないことが挙げられる。CMA活性測定は組織や細胞か

ら精製したリソソームを基質と *in vitro* で反応させる、という方法が主に用いられているが、この方法は大量の組織が必要であり、一細胞レベルでの詳細なCMA活性の評価は困難である(9)。そこで、我々は蛍光観察により、一細胞レベルで簡便にCMA活性を測定する新規評価法の開発を行った(10)。

2. 新規 CMA 活性評価法の原理

我々はCMA基質の一つであるGAPDHにHaloTag (HT) と融合させたタンパク質 (GAPDH-HT) をCMAマーカーとして用いた。HTシステムはPromega社から販売されている多機能マルチラベリングシステムである(11)。その大きな特徴の一つは、HT融合タンパク質を発現する細胞に、蛍光色素で標識したHT ligandを添加すると、HTとHT ligandが共有結合し、HTを蛍光色素で任意のタイミングで標識できることである。また、HTとHT ligandとの反応は中性pH下では起こるが、酸性pH下では起こらない。そのため、GAPDH-HT発現細胞にHT ligandを処置すると酸性であるリソソーム内ではHTとは反応せず、細胞質のGAPDH-HTのみを標識することが可能である(図2A)。細胞質のGAPDH-HTは一定時間培養するとCMAによりリソソームへ運ばれる。本研究で用いた蛍光色素(tetramethylrhodamine (TMR), Oregon green (OG))はいずれも酸性条件下でも蛍光を発する性質があるため、GAPDH-HTのリソソームへの移行と蓄積を観察

図2 HaloTag (HT) システムを用いた CMA 活性評価の原理

A: 蛍光色素融合 HT ligand を用いた GAPDH-HT の標識。GAPDH-HT 発現細胞の培養上清に蛍光色素標識 HT ligand を加えると、HT ligand は細胞内に入り細胞質 (中性 pH) では HT と反応し、GAPDH-HT が蛍光標識される。しかし、この反応は酸性 pH では起こらないので、リソソーム内の GAPDH-HT は標識されない。よって、細胞質の GAPDH-HT のみを標識することが可能となる。B: 一定期間培養後の標識 GAPDH-HT のリソソーム移行の可視化。細胞質の GAPDH-HT はしだいに CMA を介してリソソームへ移行する。本研究で用いている蛍光色素は酸性 pH でも蛍光を発するため、標識 GAPDH-HT が細胞質からリソソームへの移行を可視化できる。(文献 10 より)

できる (図 2B)。GAPDH-HT のリソソーム移行を定量解析することで、蛍光標識から一定時間の間の CMA 活性を細胞一つ一つのレベルで観察することが可能となると考えた。

3. 培養細胞株および初代培養神経細胞における CMA 活性評価

GAPDH-HT を発現させた HeLa 細胞に TMR 融合 HT ligand を処置すると、直後では標識された GAPDH-HT は細胞質に局在していたが、21 時間培養後に細胞を観察すると、GAPDH-HT は細胞質に点状に集積していた (図 3A)。この集積した GAPDH-HT はリソソームのマーカーと強く共局在しており、一定時間の培養により GAPDH-HT は細胞質からリソソームへと移行することが確認された (10)。この移行への CMA の関与を検討するため、CMA 関連タンパク質である LAMP2A を siRNA でノックダウンした細胞で GAPDH-HT のリソソーム移行を定量解析したところ、GAPDH-HT のリソソーム移行は有意に減少していた (図 3B)。さらには、HT ligand 標識後から CMA を活性化することが知られている血清除去 (Serum(-))、 H_2O_2 、

図3 HeLa 細胞における GAPDH-HT を用いた CMA 活性評価

A: HT ligand 処置直後 (0 h) および 21 時間培養後の標識 GAPDH-HT。標識直後は GAPDH-HT は細胞質に均一に分布しているが、21 時間培養後すると一部の細胞で点状の局在を示す (矢印)。これはリソソームのマーカーと共局在した。Bar=20 μ m。B: GAPDH-HT のリソソーム移行に対する siRNA を用いた LAMP2A ノックダウンの効果。定量解析は一細胞あたりの GAPDH-HT のドットを数えることで行った。コントロールの nontargeting-siRNA を導入した細胞に比べ、LAMP2A-siRNA を導入した細胞では GAPDH-HT のリソソーム移行が有意に抑制された。** $P < 0.001$ vs. nontargeting-siRNA, unpaired t -test, $n = 50 \sim 80$ 。Bar=20 μ m。C: GAPDH-HT のリソソーム移行に対する CMA 活性調節処置の効果。CMA を活性化する処置 (血清除去 (Serum(-))、 H_2O_2 、mycophenolic acid (MPA)) により、GAPDH-HT のリソソーム移行は顕著 GAPDH-HT のリソソーム移行に対するに増大し、CMA を抑制する処置 (p38 阻害薬 (SB202190)、cycloheximide (CHX)) により、GAPDH-HT のリソソーム移行は抑制傾向があった。Bar=20 μ m。(文献 10 より)

mycophenolic acid (MPA) 処置を行い、21 時間後に固定した細胞を観察すると、GAPDH-HT のリソソーム移行は有意に増大し、逆に CMA を抑制することが知られている SB202190 (p38 MAPK inhibitor), cycloheximide 処置により GAPDH-HT のリソソーム移行は有意に減少した (図 3C)。

続いて、初代培養小脳プルキンエ細胞に発現させた GAPDH-HT を用いて同様の検討を行った。アデノウイルスベクターを用いて初代培養小脳プルキンエ細胞に発現させた GAPDH-HT を TMR 標識 HT ligand で標識すると、HeLa 細胞の時と同様に、標識直後は細胞質に均質に存在していたものが、一定時間培養後はリソソームへの局在を示した (図 4A)。点状の集積が多く観察される細胞体を用いて定量解析を行った結果、CMA を活性化する H_2O_2 , MPA, 6-nicotinamide (6-AN) により、GAPDH-HT のリソソーム移行が有意に増大した (図 4B)。以上の結果は、GAPDH-HT のリソソーム移行は CMA 活性を反映していることを示唆しており、培養細胞および初代培養神経細胞において、一細胞レベルで CMA 活性を評価できる新たな実験系の確

立に成功した。

4. 脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) モデル細胞における CMA 活性評価

脊髄小脳失調症 (SCA) は小脳失調による運動障害を主症状とする進行性の神経変性疾患であり、原因遺伝子の違いにより SCA1-36 に分類されている (12)。SCA14 はプロテインキナーゼ $C\gamma$ (γ PKC) のミスセンス変異が原因で発症する常染色体優性遺伝性の疾患であり、現在までに約 30 種類の変異が発見されている (13)。我々はこれまでに SCA14 を引き起こす変異を導入した γ PKC は野生型に比べて凝集しやすい性質を持ち、凝集体形成は小胞体ストレスやプロテアソームの機能低下を介してアポトーシスを誘導する、ということを解明した (13)。しかし、SCA14 患者の剖検例では γ PKC の凝集は観察されておらず、凝集体形成に依存しない機序でも神経変性が誘導されと考えられる (14)。このような機序を解明するため、我々は変異 γ PKC に強く結合するタンパク質として Hsc70 を同定した (10)。Hsc70 は CMA 関連タンパク質であり、変

図 4 初代培養小脳プルキンエ細胞における GAPDH-HT を用いた CMA 活性評価

A: HT ligand 処置直後 (0 h) および 24 時間培養後の標識 GAPDH-HT。GAPDH-HT はアデノウイルスベクターを用いてプルキンエ細胞に発現させた。HeLa 細胞の時と同様に、ligand 処置直後は細胞質に均一に局在するが、24 時間培養後には細胞体を中心にリソソームへの局在を示した。Bar=20 μ m。B: GAPDH-HT のリソソーム移行に対する CMA 活性調節処置の効果。一細胞体における GAPDH-HT ドットの数を実数することによって定量解析を行った。Vehicle 処置群 (Veh) と比較して、CMA を活性化する処置 (H_2O_2 , mycophenolic acid (MPA), 6-aminonicotinamide (6-AN)) により細胞体における GAPDH-HT のリソソーム移行が有意に増大した。* $P < 0.01$ vs. vehicle, unpaired t-test, $n = 30 \sim 60$ 。Bar=5 μ m。C: 脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) モデルにおける CMA 活性評価。 γ PKC-GFP を GAPDH-HT と共にアデノウイルスベクターを用いて小脳プルキンエ細胞に共発現させた。 γ PKC-GFP は野生型 (WT) および SCA14 で発見されたミスセンス変異を導入した変異体 (S119P, G128D) をそれぞれ発現させた。遺伝子導入 7 日後に蛍光標識 HT ligand 処置を行い、21 時間後に固定をした後、 γ PKC-GFP の凝集が見られないプルキンエ細胞細胞体の画像を共焦点顕微鏡で撮影した。野生型 γ PKC-GFP 発現細胞で見られた GAPDH-HT のリソソーム移行 (ドット化) が SCA14 変異 γ PKC-GFP 発現細胞では著明に減少していた。Bar=5 μ m。(文献 10 より)

異 γ PKC が Hsc70 と結合することで CMA 活性に影響するのではないかと想定し、初代培養小脳プルキンエ細胞に野生型および SCA14 変異 γ PKC-GFP を GAPDH-HT と共発現させ、CMA 活性の評価を行った。 γ PKC-GFP の凝集体が見られない細胞において、変異 γ PKC は野生型に比べ GAPDH-HT のリソソーム移行が有意に減少しており、変異 γ PKC は凝集体形成に依存しない機序で CMA 活性を低下させることが示唆された (図 4C)。このように、我々は確立した新規 CMA 活性評価法を用いて、神経変性疾患モデル細胞で CMA 活性の異常を観察することに成功した。本評価法は神経変性疾患やその他の疾患モデルにおける CMA 活性変化を調べる有用なツールになると考えられる。

5. おわりに

これまでの精製リソソームを用いた CMA 研究に比べ、我々の開発した新規活性評価法は一細胞レベルでの詳細な CMA 活性を蛍光観察で簡便に解析可能である。また、CMA 基質として選んだ GAPDH はどの細胞にも高発現するタンパク質であり、GAPDH-HT の過剰発現による細胞への影響は少ないと考えられる。HT システムの HT ligand は細胞膜を通過する性質を持つため、GAPDH-HT のトランスジェニックもしくはノックイン動物を作製することで、*in vivo* での CMA 活性評価に応用することも可能であり、様々な生理機能や疾患発症への関与解明に繋がることが期待される。

最近、Hsc70 を介して細胞質基質タンパク質を後期エンドソームに運び、リソソームでの分解に導く経路

が発見され、哺乳細胞での mA であると提唱された (15)。我々が開発した新規 CMA 評価法は Hsc70 に認識される GAPDH を基質として用いているため、CMA 活性だけでなく、mA 活性も検出する可能性が高い。実際に、CMA 関連タンパク質 LAMP2A のノックダウンにより、LAMP2A の発現はほぼ完全に抑制されたにも拘らず、GAPDH-HT の集積は部分的にしか抑制されなかった (図 3B)。この結果はこの評価系による GAPDH-HT の集積が CMA 以外を介して起こっている可能性を示しており、mA も検出するという仮説を支持するものである。本活性評価法を用いて CMA と mA をそれぞれ評価するためにはさらなる検討が必要だが、mA も CMA 同様に生理機能や疾患発症との関連は不明であるため、本活性評価法は CMA と mA の研究発展のブレイクスルーに繋がることが期待される。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 田中啓二. 日本栄養・食糧学会誌. 2011;64:221-228.
- 2) 渡邊(浅野) 貴子, 他. Diabetes Frontier. 2010;21:36-40.
- 3) Kabeya Y, et al. EMBO J. 2000;19:5720-5728.
- 4) Mizushima N, et al. Mol Biol Cell. 2004;15:1101-1111.
- 5) MacVicar T. Essays Biochem. 2013;55:93-104.
- 6) Svenning S, et al. Essays Biochem. 2013;55:79-92.
- 7) Li WW, et al. Cell Mol Life Sci. 2012;69:1125-1136.
- 8) Kaushik S, et al. Trends Cell Biol. 2012;22:407-417.
- 9) Kaushik S, et al. Method Enzymol. 2009;452:297-324.
- 10) Seki T, et al. PLoS One. 2012;7:e31232.
- 11) 永井健治. バイオテクノロジージャーナル. 2006;6:745-750.
- 12) Hersheson J, et al. Hum Mutat. 2012;9:1324-1332.
- 13) Seki T, et al. J Pharmacol Sci. 2011;116:239-247.
- 14) Chen DH, et al. Am J Hum Genet. 2003;72:839-849.
- 15) Sahu R, et al. Dev Cell. 2011;20:131-139.