

神経変性疾患のタンパク質病理におけるエンドソームの普遍的役割の解明

徳田栄一

日本大学薬学部 臨床医学研究室

【研究目的】

タンパク質凝集体の細胞間伝播は、様々な神経変性疾患に見られる共通の病理現象である。凝集体は伝播の過程で酸性オルガネラ「エンドソーム」に集合し、エンドソームから脱出する。本研究では、ALS または認知症に関連するタンパク質凝集体「SOD1・TDP-43・タウ」に焦点を当て、これら凝集体がエンドソームから脱出する仕組みを解明し、エンドソームから拡大する凝集体の伝播を阻止する手法の基本原理を構築する。上記の目的を達成するため、以下の研究計画を行う。

- ①エンドソームの H⁺吸収による凝集体の脱出
- ②運動神経のエンドソームにおける H⁺制御因子的特定とその制御による脱出阻止
- ③メンブレンフリーなタウ凝集体のエンドソーム脱出の仕組み

【研究結果および研究経過】

- ①エンドソームの H⁺吸収による凝集体の脱出（担当者：徳田）

ドラッグデリバリーにおいて、薬物を標的部位に送達させるためには、エンドソームからの脱出が必須となる。このため、薬物送達学の分野では、エンド

ソーム脱出の基本原理が構築されており、それは塩基性アミノ酸によるエンドソームの H⁺吸収に基づく。H⁺吸収によりエンドソームの H⁺が減少すると、水の大量流入とエンドソーム膜の損傷が起こり、薬物がエンドソームから細胞質へと脱出する。本計画では、上記の H⁺吸収の理論を拡張し、タンパク質凝集体のエンドソーム脱出の仕組みに迫った。

まず、Protein Data Bank に収載されている SOD1 (7VZF) および TDP-43 (7Q3U) 凝集体の立体構造から、塩基性アミノ酸が各凝集体の溶媒表面に位置することを確認した。次に、各凝集体の塩基性アミノ酸を Sulfo-EGS[ethylene glycol bis(sulfosuccinimidyl succinate)] で化学修飾し、エンドソームでの H⁺吸収を低下させた凝集体を作製した。これら凝集体を運動神経モデル細胞に添加すると、エンドソームの膜損傷マーカー GAL-3 量が低下し、エンドソームから細胞質へと脱出する凝集体が減少した。つまり、塩基性アミノ酸による H⁺吸収は、SOD1 と TDP-43 凝集体に共通した脱出機構であると判明し、当初の計画を達成できた。現在、上記の知見を発展させ、どの塩基性アミノ酸が H⁺吸収の本体であるか特定するため、各塩基性アミノ酸を欠損させた変異体を用いて、同様の実験を進めている。

②運動神経のエンドソームにおける H⁺制御因子的特定とその制御による脱出阻止 (担当者: 徳田)

SOD1 および TDP-43 凝集体のエンドソームでの H⁺吸収を低下させることで、凝集体のエンドソーム脱出、それに続く、細胞間伝播を阻止できると考えた。エンドソームの H⁺量は供給/排出ポンプにより調節されている。これらポンプに

は様々なアイソフォームが存在するが、局在や発現様式は細胞群ごとに異なる
と指摘されている [Park, 2022 Nat Commun]。本共同研究を開始した時点で、運
動神経のエンドソームにおける H⁺制御因子は未同定であったため、まず、H⁺制
御因子の特定から着手した。

スピнкаラム法を用いて、運動神経モデル細胞からエンドソームを単離し、
既知のエンドソーム H⁺制御因子の存在をウェスタンブロット法で網羅的に確認
したところ、H⁺排出ポンプ CLC6 を特定できた。CLC6 の過剰発現はエンドソーム
の H⁺量を低下させるため [Zhang, 2023 Sci Adv]、現在、CLC6 発現ベクターに
より CLC6 を増加させた運動神経では、凝集体のエンドソーム脱出が抑制される
か調べている。

一方、スピнкаラム法で単離可能なエンドソームの収量は、細胞数 3×10^7 から
約 70 μg と微量である。現在、限外ろ過による濃縮などで収量を改善し、さらな
る H⁺制御因子の特定を目指している。

③メンブレンフリーなタウ凝集体のエンドソーム脱出の仕組み（担当者：田中
融）

膜小胞エクソソームに包まれたタウ凝集体は、伝播の過程でエンドソームか
ら脱出する [Polanco, 2021 Acta Neuropathol]。本共同研究では、タウ凝集体
「自体に」エンドソーム脱出作用が備わっているか、仮に脱出する場合、SOD1
や TDP-43 のように塩基性アミノ酸による H⁺吸収が脱出に関与するか検討した。
タウとそのリン酸化酵素を動物細胞に共発現させ、リン酸化タウを単離した。
タウ溶液のイオン環境を調節し、タウのリン酸化修飾を保持したまま凝集化さ

せることに成功した。また、タウ凝集体のエンドソーム脱出を可視化する系として、蛍光共鳴 FRET を利用したタウバイオセンサーの培養系を構築した。