

85. ムコ多糖症に対するシャペロン薬探索基盤の構築

大金 賢司

お茶の水女子大学 基幹研究院 自然科学系 (理学部 化学科)

Key words : ムコ多糖症, ARSB, リソソーム, 薬理的シャペロン

緒言

リソソーム病は成人前に死に至ることが多い遺伝性難病であり、リソソームに含まれる代謝酵素の機能が遺伝子の変異により失われることに起因する。ムコ多糖症VI型もリソソーム病の一つであり、硫酸化多糖の分解に必要なアリルサルファターゼ B (ARSB) の変異により起こる。変異による機能欠損は、必ずしも触媒活性そのものが損なわれるわけではなく、小胞体で起こるフォールディングに異常をきたしている場合が多いことが、様々な遺伝性疾患で報告されている。このようなフォールディング異常を起こしたタンパク質は、小胞体の品質管理機構に捕まり分解されるため、本来局在すべきリソソームには届かない。その結果、部分的にであれ触媒活性を保持している変異体タンパク質のリソソームにおける量が減少するという量的な機能欠損が起きる。このようなフォールディング異常症の治療法として、シャペロン薬 (薬理的シャペロン) と呼ばれる低分子化合物が期待されている。シャペロン薬とは、変異酵素に結合する低分子化合物であり、フォールディング途上の酵素をより正常に近い立体構造に安定化することで、リソソームへ届く変異体タンパク質を増やし、量的な機能欠損を修正する化合物であり、ゴーシェ病など一部の遺伝性疾患で薬として承認されている。

筆者らは、現在 ARSB 変異により起こるムコ多糖症VI型に対するシャペロン薬候補の探索を進めているが、ARSB 変異体に対するシャペロン作用を評価する上で課題があることを感じている。フォールディング異常を起こしているかどうかの信頼性の高い指標と考えられる「小胞体へ蓄積するか、リソソームへ局在するか」を ARSB で明確に観察できないことであった。筆者らが研究しているリソソームの膜タンパク質 NPC1 では、蛍光タンパク質 GFP と融合させた状態でのシャペロン薬処理により非常に明確な局在変化が起これ、その局在変化を指標としたシャペロン活性の定量や化合物スクリーニングが可能であった [1, 2]。小胞体を出るかどうかシャペロン作用の優れた指標であるにも関わらず、リソソーム酵素では一般的に局在の観察が難しい傾向があり、局在を指標とした評価を行っている例は少ない [3]。このような難点は、蛍光タンパク質を用いたリソソーム酵素の解析における“落とし穴”としても指摘されている [4]。例えば、リソソーム内の酸性環境による蛍光の消光、リソソーム内のプロテアーゼによる蛍光タンパク質や融合部位の加水分解などである。これらはリソソーム酵素群に対するシャペロン薬探索において大きな障害と言える。

このような背景から本研究では、作業仮説として、NPC1 の膜貫通領域 1 本とリソソーム移行シグナルを含む配列を利用することで、リソソーム外に蛍光タンパク質を配置し、ARSB を擬似的に膜タンパク質化することで細胞内局在を容易に可視化できる、というものを考え、検討を行った。

方法と結果

1. リソソーム膜係留型蛍光タンパク質タグのデザイン

リソソーム酵素 ARSB のリソソーム局在が過剰発現系において観察できない理由として、(1) 蛍光タンパク質のリソソーム内への配置が適していないこと、および (2) ARSB に含まれるリソソーム移行シグナルが弱いこと、を想定した。これらを解決するため、NPC1 における知見を利用することとした。NPC1 は、N 末端ドメイン

ン (NTD) と第一膜貫通領域と C 末端尾部のみで明確なリソソーム局在を示す [2]。そこで、リソソームの膜タンパク質 NPC1 の第一膜貫通領域とリソソーム移行シグナルを利用し、(1) 蛍光タンパク質を細胞質側に配置し、(2) NPC1 のリソソーム移行シグナルを利用すること、を考えた (図 1)。また、融合による ARSB 酵素活性への影響という観点では、NPC1 の NTD と第一膜貫通領域の間には、ポリプロリン構造を持つ長いネック構造があることから、立体障害の影響は最小限であり ARSB の酵素活性への影響は小さいと考えた。

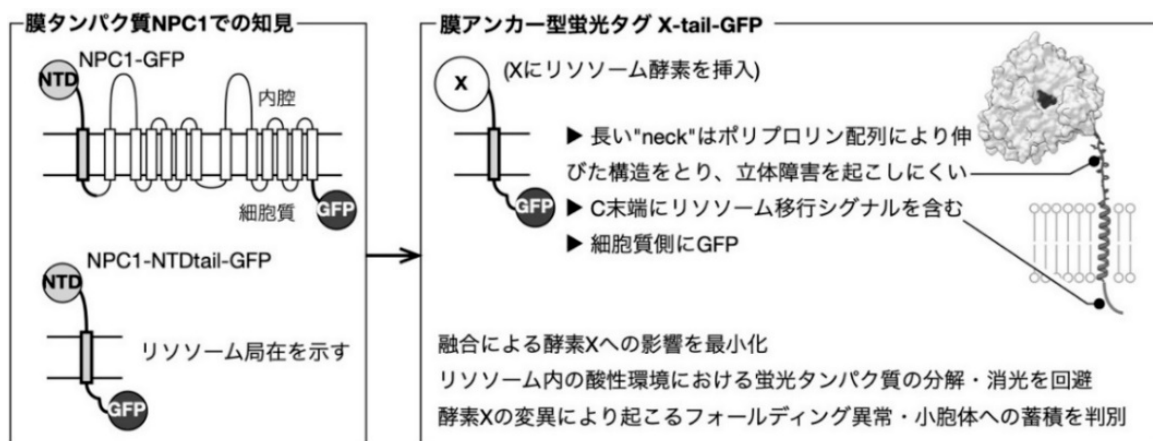


図 1. 膜アンカー型蛍光タグのデザイン

NPC1 での知見に基づき、リソソーム酵素を膜にアンカーする蛍光タグをデザインした。

2. リソソーム膜係留型蛍光タンパク質タグの ARSB への融合

NPC1 の NTD の ARSB への置換には、他のタンパク質の導入といった汎用性を考慮し、制限酵素を用いたサブクローニング法を用いた。作製済みの pCMV-NPC1-NTD-tailGFP のネック部分に制限酵素部位として NheI サイトを site-directed mutagenesis により導入し、開始コドン前に配置した AsiSI サイトと 2 か所で切り出すことで、ベクター側断片を調製した。ARSB フラグメントは、AsiSI サイトと NheI サイトを組み込んだプライマーで FLAG-ARSB を増幅することで調製し、上記ベクターに組み込むことで pCMV-FLAG-ARSB-tailGFP を作製した。

3. SUMF1 発現ベクターの作製

ARSB を含めたサルファターゼは、小胞体において SUMF1 (sulfatase modifying factor 1) による翻訳後修飾を受け、Cys がオキソアラニンへと変換されることがその触媒活性に必要である (図 2)。ARSB の過剰発現においては、SUMF1 による翻訳後修飾が不完全になることが考えられる。特に、小胞体の品質管理機構の認識にジスルフィド結合を形成していないシステインが関わる可能性が示唆されていることから、未修飾の触媒残基が残っているとリソソーム移行を阻害する可能性が考えられた [5]。そこで、ARSB と共に SUMF1 を共発現させ、その酵素活性および局在への影響を調べることにした。SUMF1 発現ベクターは、pENTR-SUMF1 (Kazusa DNA Res. Inst.) から PCR 増幅した断片を pCMV ベクターに組み込むことで作製した。

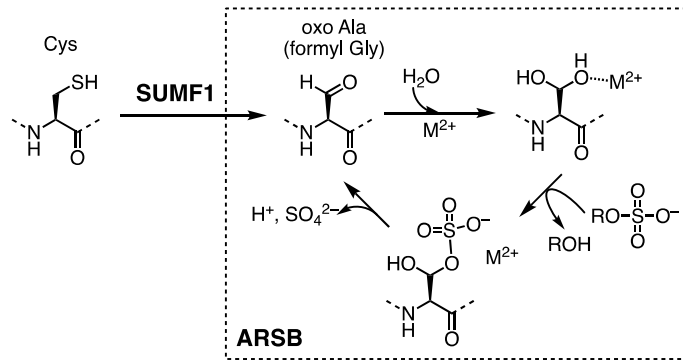


図 2. ARSB の触媒残基の SUMF1 による翻訳後修飾

ARSB を含めたサルファターゼは、触媒残基として Cys から生じるオキソアラニン/ホルミルグリシン (oxo Ala/formyl Gly) を持つ。この翻訳後修飾には、小胞体に存在する酵素 SUMF1 が必要である。

4. NPC1 のシグナル配列を持つ ARSB-tailGFP の作製

N 末端のシグナルペプチドの配列は、分泌タンパク質や膜タンパク質の合成効率に関わる。リソソーム局在を示す NPC1-NTD-tailGFP と、上記で作製した ARSB-tailGFP では、シグナルペプチド配列も異なる (図 3)。ここでは、ARSB のシグナルペプチド配列を NPC1 の配列に置換し、その影響を調べた。シグナル配列の置換は、NPC1 のシグナルペプチド配列を PCR 増幅したものを megaprimer として用いた MEGAWHOP クローニング法により作製した。

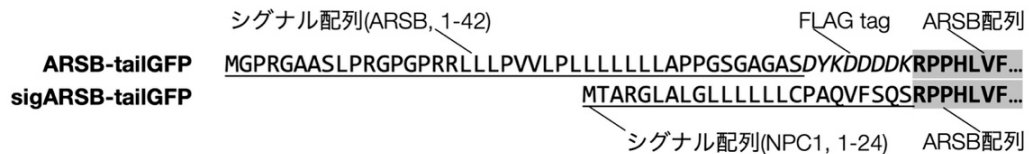


図 3. ARSB のシグナル配列の NPC1 シグナル配列による置換

ARSB-tailGFP の N 末端は、本来 ARSB が有するシグナル配列に続いて FLAG タグを挿入していた。sigARSB-tailGFP では、NPC1 のシグナル配列に置き換えた。

5. ARSB-tailGFP の酵素活性と細胞内局在

上記で作製した ARSB-tailGFP について、まず酵素活性がタグの融合後も保持されているか、確認を行った。それぞれの発現プラスミドを HEK293 細胞に一過性発現させ、その可溶化物中の ARSB 活性を 4-methylumbelliferyl sulfate (4-MUS) を発光性基質として測定した。図 4A に示すように、タグを融合していない ARSB に比べると若干の酵素活性の低下は見られるものの、ARSB-tailGFP も sigARSB-tailGFP もどちらも酵素活性を保っていることが確認された。長いリンカー配列があることで、立体障害等による酵素活性の低下は回避できたものと思われる。

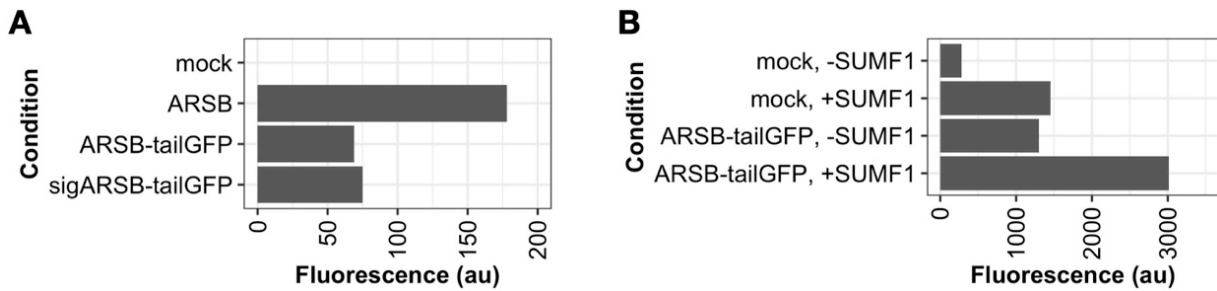


図 4. ARSB-tailGFP の酵素活性と、SUMF1 共発現の影響

HEK293 細胞にグラフに記載のタンパク質を一過性発現させ、4-MUS を用いてサルファターゼ活性を測定した。

- A) ARSB-tailGFP と sigARSB-tailGFP は、タグなしの ARSB と比べると酵素活性は低下しているものの、酵素としての機能を保持している。
- B) SUMF1 の共発現によるサルファターゼ活性の上昇。

次に、SUMF1 の共発現により酵素活性が上昇するか調べた。その結果、図 4B に示すように、SUMF1 の導入により内在性サルファターゼも ARSB-tailGFP も、酵素活性が上昇することが確認できた。これは SUMF1 が機能的な状態で発現できていること、および内在性の SUMF1 の量がサルファターゼの生合成に十分でないことが示唆される。なお、mock トランスフェクションにおいても SUMF1 の導入により酵素活性が上昇しているが、これは内在性の ARSB（および本反応条件で区別のできない内在性の ARSA）の活性が上昇したことによると考えられる。

6. ARSB-tailGFP の細胞内局在

ARSB-tailGFP を HEK293 細胞に一過性発現させ、その細胞内局在を蛍光顕微鏡にて観察した。ARSB-tailGFP は小胞体局在に特徴的なパターンを示し、そのパターンは SUMF1 の共発現によっても変化は見られなかった。また、シグナルペプチド配列を NPC1 型に置換した sigARSB-tailGFP も同様のパターンであった（図 5A）。同様に HEK293 に発現させた FLAG-ARSB を免疫蛍光染色法により観察した場合も同様の局在パターンであったことから、（少なくとも過剰発現系においては）ARSB 自体に小胞体にとどまりやすい性質があると考えられる。

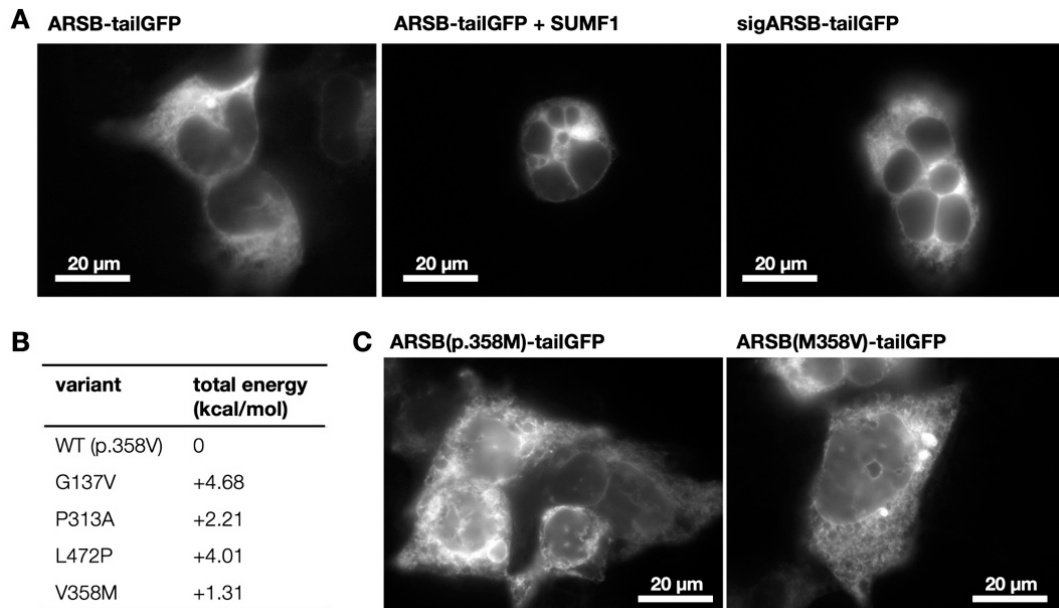


図 5. ARSB-tailGFP の細胞内局在

図に示した発現プラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus) により細胞内局在を観察した。

- A) ARSB-tailGFP 単独、および SUMF1 との共発現時の局在と、シグナルペプチド配列を NPC1 型に置換した sigARSB-tailGFP の局在。
- B) FoldX により、V358M の安定性への影響を見積もった。
- C) 358 番目のアミノ酸が Met の ARSB-tailGFP と、野生型とされる 358 番目が Val の ARSB-tailGFP の細胞内局在。

小胞体に留まる性質は、フォールディング異常を起こす疾患関連変異でよく見られるものである。本研究で用いている ARSB は、作成当時はムコ多糖症の原因とはならない SNP と報告されていた 358 番目のアミノ酸が Met となった配列を使用している [6]。その後の報告で、358Val が本来の野生型であり、358Met は軽度のムコ多糖症と関連することが示唆された [7]。そこで、この SNP が小胞体に留まる原因であるのか検証を行うこととした。この SNP がフォールディング異常を起こす可能性があるか、まず ARSB の結晶構造 (PDB:1FSU) をもとに、FoldX アルゴリズムによりこの置換のタンパク質の安定性・フォールディングへの影響を見積もった (図 5B)。明確な疾患関連変異ほどではないものの、358Val が Met となることでフォールディング効率が低下する可能性が示唆された [8]。そこで、部位特異的変異導入法により Val への置換をおこない、局在を観察した (図 5C)。当該 SNP を本来の野生型に戻した ARSB (M358V)-tailGFP も、依然小胞体局在であった。この SNP の影響で小胞体局在となっていた訳ではないと考えられる。

考 察

本研究では、ARSB が品質管理機構を通過したかどうかを見分けるための、蛍光タンパク質タグの探索を行った。リソソーム膜タンパク質 NPC1 の膜貫通領域とリソソーム移行配列を利用した融合タンパク質を作製したものの、ARSB のリソソームへの移行は観察されなかった。ARSB を含むサルファターゼ全般の成熟に必須な因子である SUMF1 の共発現や、ARSB に含まれる SNP の野生型への置換についても検討したが、リソソームへの局在は観察できていない。NPC1 の部分欠失変異体での知見から、今回用いた tailGFP 部位だけでリソソ-

ム移行に十分であることがわかっており、ARSB が本来リソソーム移行する際に使用しているマンノース-6-リン酸経路のキャパシティの低さは回避できる可能性が高い。しかしながら、本研究では ARSB は小胞体に留まっていた。残る可能性としては、用いた ARSB 自体のフォールディング効率が野生型であっても低いために小胞体から出ることができなかつたことが考えられる。

ARSB を含むサルファターゼは、成熟過程において小胞体において触媒部位の Cys がホルミルグリシンへと SUMF1 により変換される。小胞体の品質管理機構がフォールディング異常の指標として SS 結合を形成していない Cys のチオール基を用いている可能性が報告されていることから、SUMF1 が ARSB 成熟の律速段階となり、大部分が小胞体に留まっている可能性がある。この考えに基づき SUMF1 の共発現を行ったが、小胞体局在のままであった。酵素活性の上昇は観測されていることから、SUMF1 が機能していることは確認できているが、それでも CMV プロモーターにより発現させた ARSB の修飾には足りないか、あるいは ARSB 自体の性質によるものと推測される。

今回は ARSB の局在可視化を目指したが、本研究で作製した融合タンパク質タグは、他のリソソームタンパク質で有効かは、今後検討の価値があると考えている。小胞体局在となったのが ARSB 特有の現象であれば、他のリソソームタンパク質では有効に利用できる可能性があると思われる。他のサルファターゼに加えて、サルファターゼ以外のタンパク質での検討が必要と考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究は、お茶の水女子大学理学部化学科の矢口満理奈学士および北里大学薬学部の唐木文霞助教の協力のもと行った。

文 献

- 1) Shioi R, Karaki F, Yoshioka H, Noguchi-Yachide T, Ishikawa M, Dodo K, Hashimoto Y, Sodeoka M, Ohgane K. Image-based screen capturing misfolding status of Niemann-Pick type C1 identifies potential candidates for chaperone drugs. *PLoS One*. 2020 Dec 14;15(12):e0243746. doi: 10.1371/journal.pone.0243746. PMID: 33315900; PMCID: PMC7735562.
- 2) Ohgane K, Karaki F, Dodo K, Hashimoto Y. Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC1: implication for the existence of second sterol-binding site. *Chem Biol*. 2013 Mar 21;20(3):391-402. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.02.009. PMID: 23521797.
- 3) Patel S, Radhakrishnan D, Kumari D, Bhansali P, Setty SRG. Restoration of β -GC trafficking improves the lysosome function in Gaucher disease. *Traffic*. 2023 Oct;24(10):489-503. doi: 10.1111/tra.12911. Epub 2023 Jul 25. PMID: 37491971.
- 4) Huang L, Pike D, Sleat DE, Nanda V, Lobel P. Potential pitfalls and solutions for use of fluorescent fusion proteins to study the lysosome. *PLoS One*. 2014 Feb 21;9(2):e88893. doi: 10.1371/journal.pone.0088893. PMID: 24586430; PMCID: PMC3931630.
- 5) Leskelä TT, Markkanen PM, Alahuhta IA, Tuusa JT, Petäjä-Repo UE. Phe27Cys polymorphism alters the maturation and subcellular localization of the human delta opioid receptor. *Traffic*. 2009 Jan;10(1):116-29. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00846.x. Epub 2008 Oct 29. PMID: 19000170.
- 6) Garrido E, Cormand B, Hopwood JJ, Chabás A, Grinberg D, Vilageliu L. Maroteaux-Lamy syndrome: functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the arylsulfatase B gene. *Mol Genet Metab*. 2008 Jul;94(3):305-12. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.02.012. Epub 2008 Apr 10. PMID: 18406185.

- 7) Chistiakov DA, Savost'anov KV, Kuzenkova LM, Gevorkyan AK, Pushkov AA, Nikitin AG, Pakhomov AV, Vashakmadze ND, Zhurkova NV, Podkletnova TV, Mayansky NA, Namazova-Baranova LS, Baranov AA. Molecular characteristics of patients with glycosaminoglycan storage disorders in Russia. *Clin Chim Acta*. 2014 Sep 25;436:112-20. doi: 10.1016/j.cca.2014.05.010. Epub 2014 May 26. PMID: 24875751.
- 8) Buß O, Rudat J, Ochsenreither K. FoldX as Protein Engineering Tool: Better Than Random Based Approaches? *Comput Struct Biotechnol J*. 2018 Feb 3;16:25-33. doi: 10.1016/j.csbj.2018.01.002. PMID: 30275935; PMCID: PMC6158775.