



Extracellular α -synuclein impairs sphingosine 1-phosphate receptor type 3 (S1PR3)-regulated lysosomal delivery of cathepsin D in HeLa cells

西田, 晋

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8878号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490103>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Extracellular α -Synuclein impairs sphingosine 1-phosphate receptor type 3 (S1PR3)-regulated lysosomal delivery of cathepsin D in HeLa cells

細胞外 α シヌクレインは HeLa 細胞においてスフィンゴシン 1 リン酸受容体 3 型 (S1PR3) を介したカテプシン D のリソソームへの輸送を阻害する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
生化学・シグナル統合学分野（生化学）
(指導教員：鈴木聡教授)

西田 晋

背景

パーキンソン病 (PD) はアルツハイマー病に次いで 2 番目に頻度の高い進行性神経変性疾患であり、黒質のドパミン神経細胞の選択的な消失と残存神経細胞内のレビー小体と呼ばれる α -シヌクレイン (α -Syn) 陽性の線維性タンパク質沈着を特徴とする。PD 病態の進行のメカニズムとして、細胞からエクソサイトーシスやエクソソームによって分泌された細胞外 α -Syn が、エンドサイトーシスによって他の細胞内に取り込まれて凝集・蓄積することで α -Syn が細胞から細胞へと伝播していくメカニズムが考えられている。しかし、この α -Syn の細胞間の伝播のメカニズムについてはいまだ詳細に明らかにはなっていない。

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) はスフィンゴシンキナーゼ (SphK) の産物であり、細胞の成長、生存、分化、運動性、細胞骨格組織の構造変化、神経伝達物質の放出、エンドソームの成熟、トランスゴルジネットワークにおける細胞表面への輸送小胞の形成など、様々な生物学的プロセスに幅広い影響を及ぼす脂質メディエーターである。S1P の機能は多くの場合、5 種類の S1P 特異的 G タンパク質共役型受容体 (S1P 受容体 1-5 型) を介して発現し、細胞や組織ごとの発現パターンや共役する G タンパク質の違いによりそれぞれの特徴的な機能を発揮する。我々はこれまでに細胞外 α -Syn が S1P 受容体 1 型 (S1PR1) と G タンパク質の共役を阻害することを見出していたが、この生理学的、病理学的意義は不明であった。

細胞内に蓄積した α -Syn を分解するプロテアーゼであるカテプシン D はインスリン様成長因子 II/マンノース 6 リン酸受容体 (IGF-II/M6P 受容体) によりゴルジ体からエンドソームに輸送され、その後リソソームに運ばれることで活性を示すようになる。IGF-II/M6P 受容体はエンドソームでカテプシン D と解離し、エンドソームからゴルジ体に逆行輸送されて再利用されるため、この逆行輸送は正常なリソソーム機能の維持のために重要である。ごく最近、我々は S1P 受容体 3 型 (S1PR3) とそれに共役する G タンパク質が、IGF-II/M6P 受容体のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送を制御することを介してカテプシン D のリソソームへの輸送を制御し、その活性調節に寄与することを明らかにした (西田ら、プレプリント)。そこで、本研究では細胞外 α -Syn が S1PR3 と G タンパク質の共役を阻害し、IGF-II/M6P 受容体の逆行輸送の妨害およびそれに伴うカテプシン D の活性低下が生じる可能性を検証した。

結果

1. 細胞外 α -Syn(A53T)は S1PR3 と G タンパク質の共役を阻害する

S1PR1 と S1P 受容体 2 型 (S1PR2) を発現する SH-SY5Y 細胞では細胞外 α -Syn が S1PR1 と G タンパク質の共役を特異的に阻害することをこれまでに我々は見いだしている。今回 S1PR3 への細胞外 α -Syn の影響を調べるにあたっては、S1PR3 を発現している HeLa 細胞をモデル細胞として用いた。また以前の研究において野生型の α -Syn に比べて、遺伝性 PD の原因として知られる点変異体である α -Syn(A53T)のほうが S1PR1 と G タンパク質の共役阻害効果が大きかったことから α -Syn(A53T)を使用して実験を行った。その結果、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いたアッセイにより S1PR1 と同様に S1P 刺激時に生じる S1PR3 と G タンパク質の共役が細胞外への α -Syn(A53T)の添加で阻害されることが示された。

2. 細胞外 α -Syn(A53T)はリソソームプロテアーゼであるカテプシン D の活性を抑制する

我々はこれまでに S1PR3 と共役する G タンパク質のシグナル阻害がカテプシン D の活性を抑制することを明らかにしてきた。そのため、細胞外 α -Syn(A53T)は S1PR3 と G タンパク質の共役阻害を介してカテプシン D の活性を抑制するのではないかと考え、細胞外 α -Syn(A53T)添加後のカテプシン D 活性を測定したところ、その活性は低下していた。また、リソソームでの分解によって蛍光を発する試薬である DQ-BSA を用いたアッセイを行ったところ、細胞外 α -Syn(A53T)添加によって蛍光シグナルが低下したことから、細胞外 α -Syn(A53T)添加によるリソソームのタンパク質分解能の低下が示された。

3. 細胞外 α -Syn(A53T)は IGF-II/M6P 受容体のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送を阻害する

次に細胞外 α -Syn(A53T)添加によるカテプシン D の活性低下が IGF-II/M6P 受容体の輸送を介しているのではないかと考え、細胞外 α -Syn(A53T)添加時の IGF-II/M6P 受容体の局在を調べたところ、ゴルジ体マーカーである Golgin97 との共局在が減少し、エンドソームに局在する逆行輸送因子である VPS35 との共局在は増加していた。この結果から IGF-II/M6P 受容体のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送が阻害された可能性を考え、IGF-II/M6P 受容体の細胞内ドメインと CD8 の細胞外ドメインの融合タンパク質を安定発現させた細胞株に対し

て、抗 CD8 抗体を結合させるパルスラベル実験で細胞膜から TGN への逆行輸送を評価したところ、細胞外 α -Syn(A53T)添加によって IGF-II/M6P 受容体と Golgin97 との共局在は減少していた。これらの結果から細胞外 α -Syn(A53T)添加は IGF-II/M6P 受容体のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送を阻害することが示された。

考察

今回の研究では細胞外 α -Syn(A53T)が S1PR3 と G タンパク質の共役阻害を介して IGF-II/M6P 受容体のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送の阻害とそれに伴うカテプシン D の活性低下を引き起こすことを示した。この結果より、病因細胞から分泌された α -Syn が健常な細胞へエンドサイトーシスによって取り込まれ、S1PR3 が制御する IGF-II/M6P 受容体の逆行輸送を阻害することによってリソソーム機能不全を引き起こし、細胞内の内因性 α -Syn の蓄積を促進し、PD 病態を進行させるという仮説が導かれる。

この仮説を検証していくためには HeLa 細胞ではなく、神経細胞を用いた実験が必要であるが、一般的に神経変性疾患の研究で用いられる SH-SY5Y 細胞には S1PR3 が発現していないことが分かっている。興味深いことにこの SH-SY5Y 細胞において、細胞外 α -Syn(A53T)は IGF-II/M6P 受容体の逆行輸送を障害しなかった（西田ら、未発表データ）。この結果は細胞外 α -Syn によるカテプシン D の輸送障害に S1PR3 が必要であることを示唆している。一方で、ラットの神経細胞で S1PR3 が発現していることや、ドパミン作動性となるように分化誘導させたヒト神経細胞株で S1PR3 の発現が未分化のそれと比べて顕著に上昇すると報告されていることから、生理的な条件では神経組織で S1PR3 が発現し、細胞外 α -Syn の影響を受けるのではないかと考えられる。

以上のように本研究では細胞外 α -Syn が S1PR3 を介した IGF-II/M6P 受容体の逆行輸送を阻害することにより、カテプシン D のリソソームへの輸送を妨害することを示した。これは細胞外 α -Syn がリソソーム機能障害とその結果生じる α -Syn 凝集体の増加による伝播サイクルを引き起こす可能性を示しており、PD の病態進行メカニズムについて新たな仮説を示すことができた。今後、S1PR3 を発現する神経細胞や S1PR3 ノックアウトマウスを用いてその仮説を検証することで、S1P シグナルの制御が PD の新規治療法へと発展する可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3373 号	氏 名	西 田 晋
論 文 題 目 Title of Dissertation	細胞外 α シヌクレインは HeLa 細胞においてスフィンゴシン 1 リン酸受容体 3 型 (S1PR3) を介したカテプシン D のリソソームへの輸送を阻害する Extracellular α-Synuclein impairs sphingosine 1-phosphate receptor type 3 (S1PR3)-regulated lysosomal delivery of cathepsin D in HeLa cells		
審 査 委 員 Examiner	主 査 古屋敷 智之 Chief Examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner 副 査 松本 理器 Vice-examiner		

(要旨は 1, 0 0 0 字 ~ 2, 0 0 0 字程度)

【目的】

パーキンソン病 (PD) は、 α -シヌクレイン (α -Syn) 陽性の線維性タンパク質沈着が細胞内に生じることを特徴とする進行性神経変性疾患である。細胞内に蓄積した α -Syn を分解するプロテアーゼであるカテプシン D はインスリン様成長因子 II/マンノース 6 リン酸受容体 (IGF-II/M6P 受容体) によりゴルジ体からエンドソームに輸送され、その後リソソームに運ばれることで活性を示すようになる。IGF-II/M6P 受容体はエンドソームでカテプシン D と解離し、エンドソームからゴルジ体へ逆行輸送されて再利用されるため、この逆行輸送は正常なリソソーム機能の維持のために重要である。ごく最近、我々はスフィンゴシン 1 リン酸受容体 3 型 (S1PR3) とそれに共役する G タンパク質が、IGF-II/M6P 受容体のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送を制御することを介してカテプシン D のリソソームへの輸送を制御し、その活性調節に寄与することを明らかにした。またこれまでに我々は細胞外 α -Syn がスフィンゴシン 1 リン酸受容体 1 型 (S1PR1) と G タンパク質の共役を阻害することを明らかにしてきた。そこで、本研究では細胞外 α -Syn が S1PR3 と G タンパク質の共役を阻害し、IGF-II/M6P 受容体の逆行輸送の妨害およびそれに伴うカテプシン D の活性低下が生じる可能性を検証することを目的とした。

【方法・結果】

1. 細胞外 α -Syn(A53T)は S1PR3 と G タンパク質の共役を阻害する

S1PR1 と S1P 受容体 2 型 (S1PR2) を発現する SH-SY5Y 細胞では細胞外 α -Syn が S1PR1 と G タンパク質の共役を特異的に阻害することをこれまでに我々は見いだしている。今回 S1PR3 への細胞外 α -Syn の影響を調べるにあたっては、S1PR3 を発現している HeLa 細胞をモデル細胞として用いた。また以前の研究において野生型の α -Syn に比べて、遺伝性 PD の原因として知られる点変異体である α -Syn(A53T)のほうが S1PR1 と G タンパク質の共役阻害効果が大きかったことから α -Syn(A53T)を使用して実験を行った。その結果、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いたアッセイにより S1PR1 と同様に S1P 刺激時に生じる S1PR3 と G タンパク質の共役が細胞外への α -Syn(A53T)の添加で阻害されることが示された。

2. 細胞外 α -Syn(A53T)はリソソームプロテアーゼであるカテプシン D の活性を抑制する

我々はこれまでに S1PR3 と共役する G タンパク質のシグナル阻害がカテプシン D の活性を抑制することを明らかにしてきた。そのため、細胞外 α -Syn(A53T)は S1PR3 と G タンパク質の共役阻害を介してカテプシン D の活性を抑制するのではないかと考え、細胞外 α -Syn(A53T)添加後のカテプシン D 活性を測定したところ、その活性は低下していた。また、リソソームでの分解によって蛍光を発する試薬である DQ-BSA を用いたアッセイを行ったところ、細胞外 α -Syn(A53T)添加によって蛍光シグナルが低下したことから、細胞外 α -Syn(A53T)添加によるリソソームのタンパク質分解能の低下が示された。

3. 細胞外 α -Syn(A53T)は IGF-II/M6P 受容体のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送を阻害する

次に細胞外 α -Syn(A53T)添加によるカテプシン D の活性低下が IGF-II/M6P 受容体の

輸送を介しているのではないかと考え、細胞外 α -Syn(A53T)添加時の IGF-II/M6P 受容体の局在を調べたところ、ゴルジ体マーカーである Golgin97 との共局在が減少し、エンドソームに局在する逆行輸送因子である VPS35 との共局在は増加していた。この結果から IGF-II/M6P 受容体のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送が阻害された可能性を考え、IGF-II/M6P 受容体の細胞内ドメインと CD8 の細胞外ドメインの融合タンパク質を安定発現させた細胞株に対して、抗 CD8 抗体を結合させるパルスラベル実験で細胞膜から TGN への逆行輸送を評価したところ、細胞外 α -Syn(A53T)添加によって IGF-II/M6P 受容体と Golgin97 との共局在は減少していた。これらの結果から細胞外 α -Syn(A53T)添加は IGF-II/M6P 受容体のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送を阻害することが示された。

【結論】

今回の研究では細胞外 α -Syn(A53T)が S1PR3 と G タンパク質の共役阻害を介して IGF-II/M6P 受容体のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送の阻害とそれに伴うカテプシン D の活性低下を引き起こすことを示した。この結果より、病因細胞から分泌された α -Syn が健常な細胞へエンドサイトーシスによって取り込まれ、S1PR3 が制御する IGF-II/M6P 受容体の逆行輸送を阻害することによってリソソーム機能不全を引き起こし、細胞内の内因性 α -Syn の蓄積を促進し、PD 病態を進行させるという仮説が導かれる。

以上、本研究は、細胞外 α -Syn が S1PR3 を介した IGF-II/M6P 受容体の逆行輸送を阻害することでカテプシン D のリソソームへの輸送を妨害することを明らかにしたものであり、細胞外 α -Syn がリソソーム機能障害とその結果生じる α -Syn 凝集体の増加による伝播サイクルを引き起こす可能性を示しており、PD の病態進行メカニズムを理解する上で重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。