

【目的】 ムコ多糖症VI型は、リソソーム病の一種であり、硫酸化多糖の分解に必要なアシルサルファターゼ B (ARSB) の変異により起こる希少難病である。多数の変異が知られているが、その多くは ARSB タンパク質のフォールディングや安定性に異常があると考えられている。そのような変異体は、フォールディングの場合である小胞体において品質管理機構により認識され、リソソームへの輸送は許されずに分解され、結果としてリソソームにおける硫酸化多糖の分解が滞る。このようなフォールディング異常に起因する疾患に対して、フォールディングを促進する薬理的シャペロンが治療法として期待されている。薬理的シャペロンとは、リガンドとして小胞体の変異体タンパク質に結合し、その構造を正常に近い形に安定化することで、品質管理機構の通過を促す化合物であり、部分的に機能を保った変異体タンパク質のリソソームへの輸送を助け、変異による機能低下を緩和することができる。ゴーシェ病など一部の疾患では、薬として実用化されているが、ムコ多糖症VI型では薬理的シャペロンは見つかっていない。筆者等はムコ多糖症VI型に対する薬理的シャペロンの探索を行っているが、その中で ARSB の細胞内局在を簡便に可視化できないことに課題を感じていた。フォールディング異常を起こしたリソソームタンパク質は小胞体に溜まることから、変異体が小胞体に留まっているか、リソソームに届いたかを可視化することは、薬理的シャペロンの評価に有用であり、筆者等は膜タンパク質 Niemann Pick type C1 (NPC1) において局在を指標として薬理的シャペロンを見出すことに成功している。このような局在を指標とする探索方法は、膜タンパク質では有効に用いられているが、ARSB を含めたリソソーム酵素では成功例がほとんどない。本研究では、ARSB の可視化が困難な理由として、(1) リソソーム移行シグナルが弱いこと、(2) 蛍光タンパク質をリソソーム内腔側に配置することの難しさ、を想定し、図に示すように NPC1 の部分構造を用いて擬似的に膜タンパク質化することで解決することを試みた。

【方法および結果】 NPC1 は N 末端ドメイン (NTD) と第一膜貫通領域、そして C 末端尾部だけでも明確なリソソーム局在を示すことから、N 末端ドメインを ARSB に置換することで、ARSB を膜に係留するタグとして利用した。これにより、蛍光タンパク質 GFP は、酸性条件で消光・分解されるリソソーム内ではなく、膜を隔てて細胞質側に配置することができた。融合タンパク質としても ARSB の酵素活性は維持されることは確認できたものの、細胞内局在は小胞体局在であった。小胞体局在を起こす可能性として、ARSB の sulfatase modifying factor 1 (SUMF1) による翻訳後修飾が不十分な可能性や、ARSB に含まれていた一塩基置換の影響、シグナルペプチド配列の影響等を検討したものの、依然として小胞体局在のままであった。エピトープタグとして FLAG タグのみを導入した ARSB においてもリソソーム局在は見られなかったことから、フォールディング効率が低いなど、ARSB 配列自体に小胞体に保持されやすい性質がある可能性が疑われる。局在の可視化法としては、他のリソソームタンパク質での検証が必要と考えられる。

リソソーム酵素を膜に係留する蛍光タンパク質タグのデザイン

