

2020年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	TRPML1 に結合するリン脂質擬態分子 IRBIT の機能解析
キーワード	①リソソーム、②カルシウム (Ca ²⁺)、③転写因子 EB (TFEB)

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	コジマ ヒロユキ 小島 拓之	所属等	昭和薬科大学 薬学部 特任助教
プロフィール	2014年3月、昭和薬科大学を卒業し、薬剤師免許を取得。同年4月、同大学大学院4年制博士課程（医薬分子化学研究室）に入学。大学院在学中は、核内受容体を標的とした共有結合型リガンドと蛍光プローブの開発に従事。2018年3月、博士課程を修了し、博士（薬学）の学位を取得。2018年4月、昭和薬科大学（薬物治療学研究室）に特任助教として着任。現在は、リソソーム機能の調節メカニズムに関する研究に従事。専門分野は、創薬化学、ケミカルバイオロジー、構造生物学、細胞生物学など。		

1. 研究の概要

リソソームは生体分子の分解・再利用を行う細胞内小器官で、リソソーム膜上のイオンチャネルがイオン濃度を調節することで正常に機能している。しかしながら、リソソームのイオンチャネル活性を制御する分子の報告例は少なく、イオンチャネルがリソソーム機能を調節する分子メカニズムには不明な点が多い。私はこれまでに、リソソームのCa²⁺チャネルであるTRPML1の新規結合分子としてIRBITを同定していた。本研究では、TRPML1活性に対するIRBITの影響を解析することで、リソソームにおけるIRBITの生理機能を解明することを目的とした。本研究では、IRBITがリン酸化依存的にTRPML1に結合することを見出した。また、IRBIT KO HeLa細胞では、TRPML1が活性化していることを見出した。さらに、IRBIT KO細胞では、Ca²⁺依存的にTFEBの核移行が促進し、リソソーム関連タンパク質の発現量と機能が亢進していることを明らかにした。本研究の結果から、IRBITはリン酸化依存的にTRPML1に結合してCa²⁺チャネル活性を抑制し、TFEBを介したリソソームの過剰な活性化を抑制していることが示唆された。

2. 研究の動機、目的

リソソームの機能低下は、異常なタンパク質の蓄積を引き起こし、パーキンソン病やアルツハイマー病、ライソゾーム病といった神経変性疾患の発症に関与する。神経変性疾患は、根本的な治療法がなく、医薬品の貢献度や患者の治療満足度が低い病気である。現在、新たな治療戦略として、リソソーム活性化剤の開発が期待されているが、医薬品としての成功例はない。その理由として、リソソームのイオン輸送体活性を制御する分子の同定例は少なく、リソソーム機能を制御する分子メカニズムに関して不明な点が多いことが挙げられる。

IRBIT (IP₃R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate) はIP₃受容体やNa⁺/HCO₃⁻共輸送体をはじめとする複数のイオン輸送体活性を調節することで、細胞内イオンホメオスタシスを制御している。IRBITはN末端に多重リン酸化部位を有し、リン酸化パターンの違いによって結合タンパク質が異なる。また、リン酸化されたIRBITはリン脂質の構造を模倣していると考えられ、リン脂質結合タンパク質に高い親和性を示す。これまでに、リソソームに局在するIRBITの結合分子は報告されていなかった。そこで、リン脂質に親和性を示すリソソームのイオンチャネルとIRBITの結合を調べた結果、私はIRBITの新規結合分子としてTRPML1 (transient receptor potential mucopolipin 1) を同定した。TRPML1はリソソーム

に局在する Ca^{2+} チャネルであり、リソソームの活性化に関与する。以上の知見から、IRBIT が TRPML1 の Ca^{2+} チャネル活性を調節することでリソソームのタンパク質分解活性を制御していることが強く示唆された。本研究では、TRPML1 の Ca^{2+} チャネル活性に対する IRBIT の機能を解析することで、IRBIT がリソソームのタンパク質分解活性を制御する分子メカニズムの解明に取り組んだ。

3. 研究の結果

(1) IRBIT と TRPML1 の結合解析

共免疫沈降法で IRBIT と TRPML1 の結合を検討した結果、IRBIT が TRPML1 に結合することを見出した。TRPML1 は N 末端領域 (1-69) にリガンド結合部位を有し、 $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ が結合すると Ca^{2+} チャネルが活性化する。一方で、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ が結合すると不活化される。そこで、IRBIT が TRPML1 の N 末端領域に結合するのかが GST pull down assay で検討した。その結果、IRBIT が TRPML1 の N 末端領域に結合することが明らかになった。また興味深いことに、S68A 変異型 HA-IRBIT (非リン酸化体) は GST-TRPML1 に結合しなかった。以上の結果から、IRBIT はリン酸化依存的に TRPML1 の N 末端領域に結合することが示唆された。

(2) TRPML1 の Ca^{2+} チャネル活性に対する IRBIT の機能解析

TRPML1 活性に対する IRBIT の影響を評価するため、IRBIT をノックダウン (KD) または過剰発現した HeLa 細胞の Ca^{2+} イメージングを行った。まず、siRNA で IRBIT を KD した EGFP-TRPML1 安定発現細胞の Ca^{2+} イメージングを行った。その結果、IRBIT KD 細胞ではコントロールと比較して TRPML1 からの Ca^{2+} 放出量が増加した。

次に、HA-IRBIT と EGFP-TRPML1 を共発現した HeLa 細胞の Ca^{2+} イメージングを行った。その結果、HA-IRBIT はコントロールと比較して、TRPML1 からの Ca^{2+} 放出量を減少させた。一方で、S68A 変異型 HA-IRBIT は野生型に比べて、TRPML1 に対する抑制効果が弱い傾向を示した。以上の結果から、IRBIT はリン酸化依存的に TRPML1 の Ca^{2+} チャネル活性を抑制していることが示唆された。

(3) IRBIT 欠失細胞 (IRBIT KO 細胞) におけるリソソームの機能解析

TRPML1 から放出された Ca^{2+} は TFEB の核移行を促進し、リソソームの生合成を高めることで、リソソームのタンパク質分解活性を上昇させることが報告されている。そこで、TFEB の細胞内局在とリソソーム機能に対する IRBIT の影響を解析することにした。

免疫細胞染色で TFEB の細胞内局在を解析した結果、IRBIT KO 細胞では TFEB の核移行が促進していた。次に、TFEB の標的遺伝子の mRNA およびタンパク質発現を解析した結果、IRBIT KO HeLa 細胞ではリソソーム関連タンパク質 (*Ctsb*, *Ctsd*, *Lamp1*, *Mcoln1*, *Tfeb*) の発現量が顕著に増加していた。最後に、蛍光試薬を用いてリソソームのタンパク質分解活性を評価した。その結果、IRBIT KO 細胞では、リソソームのタンパク質分解活性が上昇していることが明らかになった。

以上の研究成果については、第 72 回日本細胞生物学会大会と ASCB/EMBO Meeting で発表を行った。

4. 研究者としてのこれからの展望

本研究から、IRBIT は TRPML1 の Ca^{2+} チャネル活性を抑制することで、リソソーム機能を負に制御していることが示唆された。今後は、IRBIT の発現量を低下させた神経変性疾患モデルマウスの解析を行い、IRBIT が神経変性疾患治療薬の新規創薬ターゲットになりうるのかを検証したい。さらに、本学が保有する化合物ライブラリーを活用して IRBIT の阻害剤を見出し、神経変性疾患治療薬としての可能性を追求していきたい。

私は本研究に従事する前は、有機化学をベースに、核内受容体をターゲットとした共有結合型リガンドや蛍光ラベル化剤の開発に取り組んでいたが、細胞生物学に関する実験経験はほとんどなかった。本研究を通じて、細胞生物学に関する知識・技術を修得することができた。また、細胞で起きている現象を自分自身で観察しながら、未解明の謎を解き明かしていく経験を

通じて、生命の複雑さと精巧さを実感した。今後も、生命現象を有機化学の視点から捉え、生体反応の理解と制御を可能とする化学プローブの開発に取り組んでいきたいと考えている。将来的には、①希少疾患の発症メカニズム解明、②創薬ターゲットの探索、③医薬品候補化合物の創製に取り組み、創薬研究の発展に貢献していきたい。

5. 社会（寄付者）に対するメッセージ

パーキンソン病やアルツハイマー病といった神経変性疾患では、異常タンパク質の蓄積が認められ、患者由来の組織ではタンパク質の分解を担っているリソソームの機能が低下している。このような神経変性疾患は、根本的な治療法がなく、医薬品の貢献度や患者の治療満足度が低い。現在、新たな治療戦略として、リソソームの分解機能を活性化して、病気の原因となる異常タンパク質の分解を促進する方法が試みられている。私は本奨励金の支援のもと、IRBIT がリソソームの機能を抑制していることを明らかにした。このことから、IRBIT は神経変性疾患治療薬の新たな創薬ターゲットになりうる。今後は、IRBIT の機能を阻害する薬剤をスクリーニングし、神経変性疾患治療薬の開発につなげていきたい。本研究を遂行するにあたり、ご支援を頂きました日本私立学校振興・共済事業団の関係者各位ならびにご寄付を頂いた皆様に厚く御礼申し上げます。今後とも、ご支援賜りますよう宜しくお願い申し上げます。