

# リソソーム機能不全細胞からの リソソームの磁気分離とプロテオーム解析

Magnetic Separation of Lysosomes from Cells with Lysosomal dysfunction  
and Their Proteome Analysis

助成年度	令和5年度研究助成
助成番号	MZR2023003
研究期間	2023/4/01 ~ 2024/3/31
代表研究者	高橋 麻里
	北陸先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科
キーワード	リソソーム, リソソーム, 病磁性体ナノ粒子, エンドサイトーシス

## 1. 研究の背景と目的

リソソームは、全ての真核生物に共通して存在する細胞小器官であり、細胞内消化の場として機能している。個の生体分子分解システムは、単に生体分子を分解・再利用するためだけに機能しているのではなく、細胞内エネルギー状態のセンシングに機能していたり、また、近年においては、細胞内に侵入してきたバクテリアの分解産物をリソソームで感知することによって、自然免疫応答の活性化にも機能していることが明らかにされてきた。<sup>[1,2]</sup>さらに、リソソームに局在するタンパク質の変異が、多種多様な疾患の原因となること<sup>[3]</sup>から、リソソーム機能の理解は人類の健康にとって重要な課題の1つである。

そこで本研究では、リソソーム機能不全細胞からのリソソームの高純度磁氣的単離とその構成タンパク質のプロテオミクス解析を目的とした。具体的には、多機能磁性ナノ粒子をリソソーム機能不全細胞のリソソーム内腔に送達（ターゲティング）して帯磁させ、磁力によって迅速にリソソ

ームを単離精製し、単離したリソソームをプロテオミクス解析に供して構成タンパク質を同定することを目的とした。

## 2. 研究の内容・方法

まず、分子活性が不明なリソソーム病遺伝子群（神経セロイドリポフスチン症原因遺伝子である CLN3）を CRISPR-Cas9 によりノックアウト (KO) した培養細胞を樹立するための検討を行った。HEK293 細胞にベクターをトランスフェクションし、クローニングを行うことで CLN3-KO HEK293 を構築した。KO が成功しているかどうかを確認するため、DNA シーケンシングとウェスタンブロットを行った。

CLN3-KO HEK293 細胞の DNA シーケンシングでは KO が成功しているような結果が得られたものの、CLN3 の抗体を使ったウェスタンブロットでは CLN3 が検出された。このことは CLN3 抗体が非特異吸着を起こしているか、あるいは遺伝子編集による CLN3 KO が成功していないかのどちらかであ

る。そこで、以下の4つの実験を実施した。

1. オートファジーフラックスへの影響を調べる  
→ 既往の報告通り、顕著な異常は見られなかった。
2. リソソーム膜環境の評価 (Lamp1 の免疫染色)  
→ 小さいリソソームが増えている印象
3. ノックアウトレスキュー実験  
→ humanCLN3 の安定発現細胞を樹立し、上記表現系がレスキューできるか確認
4. ノックダウン実験  
→ siRNA を用いてノックダウンにより、同様な表現系が出るか確認

しかし、CLN3 の plasmid を用いていくつか実験を行った結果、マウスの細胞では発現するが、HEK293 では発現しないという問題に直面した。このようなことは経験したことがいまままでになく、難しい遺伝子であることが判明した。CLN3 KO の表現型に関して、HEK 細胞がそもそもオルガネラを見るのに適していないこともあるが、CLN3 は細胞レベルでは重要な機能をしていないという結論に至った。

上記の結果を受け、他の遺伝子 KO で検討を進めたほうが良いと判断し、ターゲットとするリソソーム病を、当初の神経セロイドリポフスチン症から、代表的なリソソーム病であるニーマンピック病 C1 に変更し、NPC1 遺伝子 KO マウス胚線維芽細胞 (MEF) を保有している研究者から MEF 細胞を譲渡していただき、その細胞を不死化して利用することとした。

### 3. 研究の成果

#### (1) マクロピノサイトーシスによる Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の MEF 細胞への導入検討

我々の以前の研究では、アミノデキストラン (aDxt) で表面被覆した Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒

子を COS1 細胞へマクロピノサイトーシスによって導入した。<sup>[4]</sup>そこで、MEF 細胞についても同様の方法により、ナノ粒子を導入しリソソームへ送達することを試みた。具体的には、培地に 100 µg/mL の濃度で分散させたナノ粒子を MEF 細胞に添加し、1 時間培養した後、上清を洗浄することで取り込まれなかったナノ粒子を洗い流し、更に 5 時間培養した。しかし、図 1 に示すように、COS1 細胞には効率的にナノ粒子が取り込まれ、リソソームへ送達されるものの、MEF 細胞ではナノ粒子の導入が見られなかった。この原因は細胞腫の違いによるものと思われるが、詳細は明らかでない。

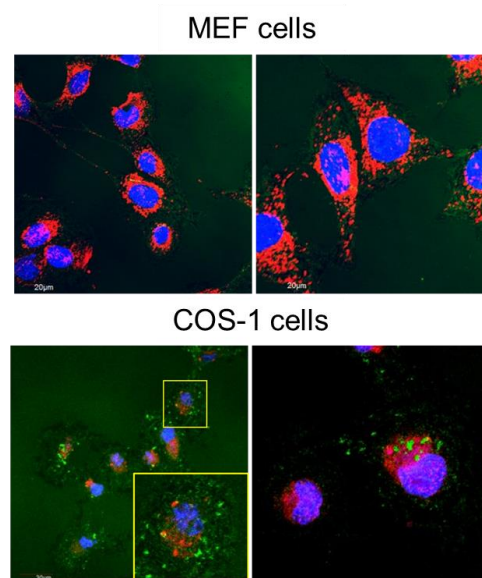


図1 aDxt 修飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子を細胞と共培養し洗浄した後、免疫染色を施した細胞の共焦点顕微鏡像。(上段) MEF 細胞、(下段) COS1 細胞。青は核 (DAPI 染色)、赤はリソソーム (LAMP1)、緑はナノ粒子のプラズモン散乱。COS1 細胞ではナノ粒子の取り込みとリソソームへの集積が見られるのに対し、MEF 細胞ではナノ粒子の取り込みが観察されなかった。

#### (2) シンクロナイズドエンドサイトーシスによる Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の MEF 細胞への導入検討

そこで、次の手段として、受容体媒介エンドサイトーシスによってリソソームへナノ粒子を送達することを検討した。本研究では MEF 細胞表面の上皮成長因子受容体 (EGFR) に特異的にナノ粒子を結合させてから、シンクロナイズドエンドサイトーシスによってリソソームへ送達すること

を考えた (図 2)。まず、MEF 細胞表面の EGFR にビオチン化上皮成長因子 (EGF) をエンドサイトーシスが抑制される温度 (4°C) において結合させた。その後、中性アビジンで表面修飾した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子を培地に添加し、4°C で 1 時間培養した。この時点では、ナノ粒子は MEF 細胞表面の EGFR に EGF を介して結合した状態が保たれており、まだ細胞内に取り込まれてはいない。その後、温度を 37°C に上げて培養することによって、一斉にエンドサイトーシスが起これ、ナノ粒子が MEF 細胞内に取り込まれると期待したが、結果として MEF 細胞内へのナノ粒子の取り込みは確認できなかった。考えられる要因としては、4°C では EGF の活性が低下しており、EGFR への結合が起これなかったことが挙げられる。

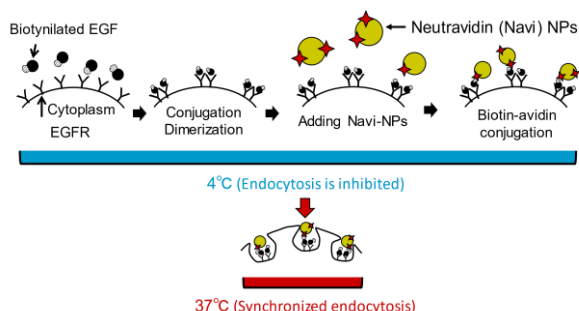


図 2 シンクロナイズドエンドサイトーシスの概念図

### (3) EGFR 媒介エンドサイトーシスによる Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の MEF 細胞への導入検討

シンクロナイズドエンドサイトーシスの利点は、原理的には細胞内へのナノ粒子の導入が一斉に起これるため、ナノ粒子の細胞内輸送も同期でき、ナノ粒子がリソソームへ到達した時点では、初期エンドソームや後期エンドソームに滞留しているナノ粒子はほとんど無く、磁気分離した際のリソソームの純度が高くなることである。しかし、上述のように 4°C では EGF の活性が低下し、EGFR への結合が起これなかった可能性が考えられるため、通常受容体媒介エンドサイトーシスによるナノ粒子の細胞内導入を検討した。具体的には、

ポリ L リジン (PLL) で表面修飾した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の表面に EGF を静電相互作用によって結合させ、その EGF 結合ナノ粒子を MEF 細胞に添加し、37°C で 1 時間培養することによって、エンドサイトーシスによる細胞内への導入を試みた。PLL は多くのアミノ基を持つカチオン性ポリマーであるため、バッファー中で正に帯電している。そこに EGF を添加すると静電相互作用によって PLL 修飾ナノ粒子の表面に EGF が結合する。EGF が結合したナノ粒子は MEF 細胞表面の EGFR に結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれると考えられる。その結果、COS1 細胞に比べるとわずかではあるが、ナノ粒子は MEF 細胞へ取り込まれていることを確認した (図 3)。

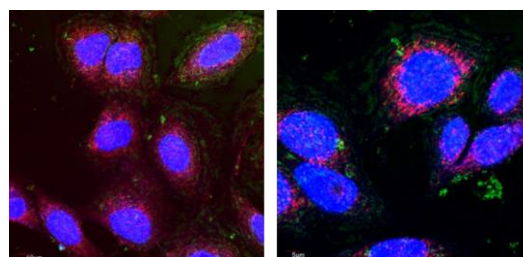


図 3 EGFR 媒介エンドサイトーシスによる Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の MEF 細胞への取り込み

## 4. 結び

当初、リソソーム病遺伝子群 (神経セロイドリポフスチン症原因遺伝子である CLN3) を CRISPR-Cas9 によりノックアウト (KO) した HEK293 細胞を樹立するための検討を行ったが、CLN3 KO の表現型に関して、HEK 細胞がそもそもオルガネラを見るのに適していないことと、CLN3 は HEK293 の場合は細胞レベルでは重要な機能をしていないという結論に至った。そこで、ターゲットとするリソソーム病を、神経セロイドリポフスチン症から、代表的なリソソーム病であるニーマンピック病 C1 に変更し、NPC1 遺伝子 KO マウス胚線維芽細胞 (MEF) に変更し、その細胞を不活化して利用することとした。

次に、この MEF 細胞に対し、我々の以前の COS1

細胞を用いた研究と同様に、aDxt で表面修飾した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子を導入しようとしたところ、COS1 細胞とは様相が異なり、MEF 細胞ではマクロピノサイトーシスによるナノ粒子の取り込みがほとんど起こらなかった。次の手段として、受容体媒介エンドサイトーシスによってリソソームへナノ粒子を送達することを考え、MEF 細胞表面の上皮成長因子受容体 (EGFR) に特異的にナノ粒子を結合させてから、シンクロナイズドエンドサイトーシスによってリソソームへ送達することを検討したが、これについても EGF の活性低下などの問題からうまくいかなかった。そこで、ポリ L リジン (PLL) で表面修飾した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の表面に EGF を静電相互作用によって結合させ、その EGF 結合ナノ粒子を MEF 細胞に添加し、37°C で 1 時間培養することによって、エンドサイトーシスによる細胞内への導入を試み、最終的にナノ粒子の MEF 細胞内への導入に成功した。

#### 5. 今後の研究方向性・課題

リソソーム機能不全細胞の構築に手間取り、最終的に MEF 細胞を利用することにしたが、今度は MEF 細胞へのナノ粒子の導入にも苦戦したため、当初の予定より研究に遅れが生じたものの、MEF 細胞へのナノ粒子の取り込み方法についてもある程度見通しが立ってきたため、今後は、NPC1 遺伝子 KO MEF 細胞と、通常の MEF 細胞の双方についてナノ粒子を取り込ませ、それぞれのリソソームへの送達条件を確立する。その後、各細胞からリソソームを単離し、プロテオーム解析に供する。

#### 6. 参考文献

[1] O. Takeuchi, S. Akira, *Cell*, **140**, 805, (2010)  
[2] N. Nakamura, J. R. Lill, Q. Phung, Z. Jiang, C. Bakalarski, A. de Mazière, J. Klumperman, M. Schlatter, L. Delamarre, I. Mellman, *Nature*, **509**, 240, (2014)

[3] F. M. Platt, A. d' Azzo, B. L. Davidson, E. F. Neufeld, C. J. Tiffitt, *Nat. Rev. Dis. Prim.*, **4**, 27, (2018)

[4] T. S. Le, M. Takahashi, N. Isozumi, A. Miyazato, Y. Hiratsuka, K. Matsumura, T. Taguchi, S. Maenosono, *ACS Nano*, **16**, 885 (2022)

#### 6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、一般財団法人向科学技術振興財団より多大なご支援を頂きましたことを深く御礼申し上げます。