

皮膚細胞を保護するタンパク質の分泌機構の解明と 分泌促進因子の探索

同志社大学生命医科学部

野口 範子

PARK7/DJ-1 is a multifunctional protein which is involved in gene transcription regulation and anti-oxidative defense. DJ-1 plays an important role in protection against UV irradiation and oxidative stress in the skin. Although DJ-1 lacks the secretory signal sequence, it is secreted and plays important physiological and pathophysiological roles. Whereas secretory proteins lacking the endoplasmic reticulum-targeting signal sequence are secreted from cells by the unconventional secretion mechanism, the specific processes responsible for DJ-1 secretion across the plasma membrane have remained unclear. In the present study, we found that DJ-1 secretion was increased by treatment with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) via the unconventional secretory pathway in human neuroblastoma SH-SY 5Y cells and mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. We also found that 6-OHDA-induced DJ-1 secretion was suppressed in *Atg5*-, *Atg9*-, or *Atg1611*- deficient MEF cells or ATG16L1 knockdown SH-SY 5Y cells, indicating that the autophagy-based unconventional secretory pathway is involved in DJ-1 secretion. We moreover observed that 6-OHDA induced decrease in glutathione levels, which was suppressed by pretreatment with antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC), and that NAC treatment suppressed autophagy and DJ-1 secretion. We also observed that 6-OHDA-induced autophagy was associated with activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1) via a pathway which was independent of mechanistic target of rapamycin kinase (mTOR). Collectively these results suggest that 6-OHDA enhances oxidative stress followed by AMPK-ULK1 pathway activation and induction of secretory autophagy for the unconventional secretion of DJ-1.

1. 緒言

DJ-1 は生体の酸化ストレス防御に重要な因子であり、DJ-1 の発現量が低下すると細胞は酸化ストレスに脆弱になる。逆に発現量が増加すると、高レベルの酸化ストレス下でも細胞は生存できる。また、DJ-1 は酸化ストレス下で自身が酸化され、酸化DJ-1 を生じる。DJ-1 は全身のどの細胞にも広く発現分布するタンパク質であり、その機能にはほかにも、転写調節能、シャペロン活性、プロテアーゼ活性等、多機能タンパク質として知られる。さらにDJ-1 をコードする遺伝子PARK7は家族性パーキンソン病の原因遺伝子として注目されており¹⁾、国内外で盛んに研究されている。パーキンソン病の発症・進展には酸化ストレスが関与すると考えられているが、DJ-1 はドーパミン産生神経細胞の酸化ストレスの緩和に働き、その機能喪失はパーキンソン病の発症に関与すると考えられている。

皮膚は、紫外線 (UV) 等の外因性因子により障害を受けやすく、酸化ストレス障害の多い臓器の一つに挙げられる。くり返しUVを浴びることで皮膚老化が促進するが、UVにより発生した活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) は、脂質の過酸化やタンパク質の変性等の酸化障害を引き起こす。これまで我々は、角層中でDJ-1 が高濃度存在

する細胞はUVや活性酸素による障害に強い抵抗性を示すことを明らかにしてきた²⁾。さらにヒトの皮膚レベルで観察したところ、角層中DJ-1 レベルの高い被験者のほうが、UVにより変化した皮膚の色素沈着が早期に回復し、赤みや紅斑が早期に低下することを見出しており、皮膚におけるDJ-1 レベルが酸化ストレス耐性を示す優れたバイオマーカーとなることが明らかとなっている²⁾。

DJ-1 は主に細胞質に存在するが、細胞外に分泌されることも知られている。細胞外では抗酸化因子やシグナル伝達等のはたらきを示すと考えられている。通常、細胞外に分泌されるタンパク質はアミノ末端側にシグナル配列をもち、小胞体やゴルジ体を経由して、小胞輸送により細胞外へと分泌される典型的経路をたどる。一方で、サイトカインであるインターロイキン-1 β (IL-1 β)やIL-12等のシグナル配列をもたない細胞質局在タンパク質も、細胞外へ分泌されることが知られており、これらの分泌経路は非典型的経路と呼ばれている^{3,4)}。非典型的経路により分泌されるタンパク質には生理的に重要な役割を果たすタンパク質が多く含まれているにもかかわらず、水溶性である細胞質局在タンパク質がどのように脂質二重層である細胞膜を通過して細胞外に分泌されるか、その分泌機構は未知な点が多い。DJ-1 はシグナル配列をもたないことから、小胞を介さない非典型的な経路によって分泌されると考えられるが、その分泌機構は不明であった。そこで本研究において我々は、皮膚の酸化ストレス防御において重要な役割を果たすと考えられるDJ-1の細胞外分泌メカニズムについて解析することを目的とした。また、その分泌を促進する化合物を見出すことで、細胞防御タンパク質の分泌促進による皮膚の健康増進法を開発することを目指した。



The secretion mechanism of skin cell-protecting protein

Noriko Noguchi

Faculty of Life and Medical Sciences,
Doshisha University

2. 方法

2.1. 細胞とその培養法

ヒト神経芽細胞種 (SH-SY5Y) 細胞は ECACC から購入した。マウス野生型 MEF 細胞および *atg5*^{-/-} MEF 細胞⁵⁾ は、水島昇教授 (東京大学) からご供与いただいた。 *atg9*^{-/-} と *atg1611*^{-/-} MEF 細胞^{6,7)} は、審良静男教授 (大阪大学) からご供与いただいた。基礎培地として DMEM/F12 培地を用い、10% FBS と抗生物質を添加した。培養は 37°C、5% CO₂ 環境下で行った。

2.2. 細胞処理と分泌評価法

分泌誘導刺激として、6-hydroxydopamine (6-OHDA) を用いた。6 ウェルプレートで培養した細胞に対して、50-100 μM 6-OHDA で 3 時間処理し、さらに serum-free 培地で 2 時間培養した。N-acetylcysteine (NAC) 処理は、2mM NAC で 2 時間前処理を行った。処理後、細胞と培養上清をそれぞれ回収し、細胞から可溶性バッファー (10mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 5mM EDTA-2Na, protease inhibitor cocktail) を用いて、whole cell lysate を回収した。培養上清は、遠心後、回収した上清 1mL に 1mg の BSA と終濃度 10% Trichloroacetic acid (TCA) を加え、TCA 沈殿により濃縮を行い、サンプルバッファーに溶解し、SDS-PAGE 用サンプルとした。タンパク質は BCA 法により定量し、SDS-PAGE、二次元 PAGE、ウェスタンブロット法により解析した。また、Lactate dehydrogenase (LDH) 法を用いて、培養上清中の LDH 活性を測定することにより、細胞膜破綻の判定を行った。

2.3. 細胞内還元型 Glutathione (GSH) 量の測定

6 ウェルプレートで培養した細胞に対して、刺激を行い、回収した細胞を 0.2M 過塩素酸溶液で溶かし、氷上で 30 分インキュベートした。遠心後、上清を 1M CH₃COONa を用いて pH3 付近になるよう調整し、フィルターろ過後、SC-5ODS カラムを用いて HPLC により定量した。エレントとして 99% 0.1M sodium phosphate buffer, pH2.5, 1% methanol, 100mg/L sodium octanesulfonate, and 50mg/L EDTA-2Na 溶液を用い、標品として還元型 GSH を用いた。

2.4. 免疫細胞染色、電子顕微鏡観察

カバーガラス上で培養した細胞を、冷メタノールで固定、BSA でブロッキング後、一次抗体として抗 DJ-1 抗体、抗 LC3 抗体、二次抗体として Alexa 標識抗体を用いて染色後、Zeiss LSM710 共焦点顕微鏡を用いて、細胞を観察した。また、電子顕微鏡観察の場合、細胞は 2% グルタルアルデヒドで固定し、JEM-1200 EX による TEM 観察を行った。

3. 結果

3.1. 6-OHDA 処理は、酸化ストレス依存的に DJ-1 の分泌を促す

細胞からの分泌メカニズムを明らかにするため、評価系が確立している SH-SY5Y を用いた。分泌誘導刺激として、内在性のカテコールアミン作動性神経毒であり、パーキンソン病発症モデル化合物として広く用いられている 6-OHDA を用いた。その結果、6-OHDA の濃度依存的 (0-100 μM) に DJ-1 の細胞外分泌が亢進した (図 1A)。また、6-OHDA 刺激下においても、通常小胞体に存在する ribophorin 1 (RPN1) (図 1A) や細胞質に存在する LDH

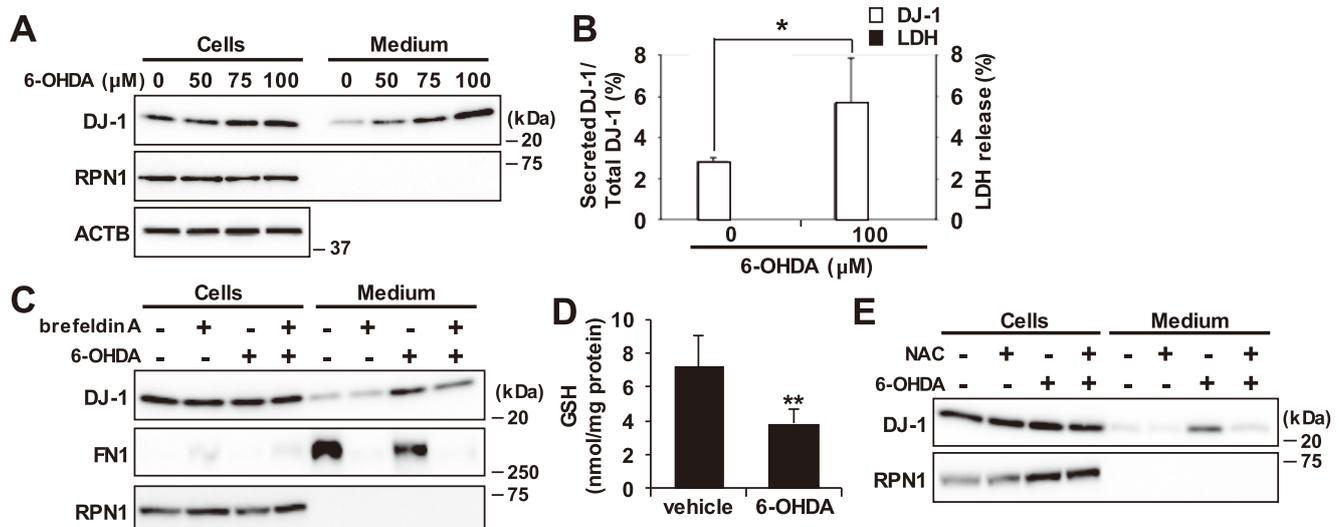


図1 (A) SH-SY5Y細胞における6-OHDA刺激によるDJ-1分泌への影響。(B) 6-OHDA刺激によるDJ-1分泌とLDH releaseに対する影響。n=3; mean±S.D.; *, p<0.05. (C) 6-OHDA誘導性DJ-1分泌亢進に対するbrefeldin Aの影響。(D) 細胞内GSH含量。n=5; mean±S.D.; **, p<0.01. (E) 6-OHDA誘導性DJ-1分泌亢進に対するNACの影響。

活性の培養上清中での上昇が認められなかったことから(図1B)、DJ-1分泌が膜破綻によるものではないことが確認された。分泌経路について、典型的分泌経路の阻害剤であるBrefeldin Aを用いて解析したところ、Brefeldin Aの共処理は、6-OHDA誘導性のDJ-1分泌に影響を与えなかった一方で、典型的経路により分泌されることが知られているfibronectin 1 (FN1)の分泌は顕著に減少していたことから、DJ-1は非典型的経路により分泌されていることが明らかとなった(図1C)。

6-OHDAは速やかにH₂O₂と6-OHDA quinoneに分解され、細胞内酸化ストレスを上昇させることが知られていることから、細胞内のGSH濃度を測定した。その結果、100 μM 6-OHDA刺激により、GSH濃度が有意に減少していることを確認した(図1D)。そこで細胞内GSH濃度を増加させることが可能なN-acetyl cysteine (NAC)で前処理を行うと、6-OHDAにより亢進したDJ-1の分泌が抑制された(図1E)。以上の結果から、6-OHDAによる酸化ストレスの上昇がDJ-1の分泌を亢進させることが示唆された。

3. 2. DJ-1の分泌を促す6-OHDA刺激は、オートファジーを誘導する

さらに詳細な6-OHDA誘導性のDJ-1分泌機構を明らかにするため、非典型的な分泌機構への関与が指摘されているオートファジーに着目した。オートファジー進行のマーカーとしてLC-3のI型からII型への変化を解析したと

ころ、6-OHDAの濃度依存的にLC3-IIが増加していることが確認された(図2A)。そこでDJ-1分泌に対するオートファジーの関与を明らかにするため、オートファジー研究でよく用いられている野生型MEF細胞に6-OHDA刺激を行い、DJ-1の分泌に対する影響を調べた。その結果、6-OHDA濃度依存的にDJ-1の分泌が亢進した(図2B)。また、培養上清中のLDH活性の上昇は起きていなかった(data not shown)。さらに75 μM 6-OHDA刺激で、LC3-II型の増加が確認された(図2C)。そこで、電子顕微鏡観察を行ったところ、6-OHDA刺激を加えた細胞では、隔離膜やオートファゴソーム、オートリソソームと考えられる構造が観察された(図2D)。また、蛍光顕微鏡を用いて免疫細胞染色を行ったところ、6-OHDA刺激によりDJ-1とLC3が共局在することが観察された(図2E)。以上の結果から、DJ-1の分泌を促す6-OHDA刺激下では、オートファジーも誘導されていることが明らかとなった。

3. 3. DJ-1の分泌は、オートファジー欠損MEF細胞で抑制される

次にDJ-1分泌に対するオートファジーの関与を明らかにするため、オートファジー進行に必要な因子であるAtg5、Atg9、Atg16L1をそれぞれ欠損したMEF細胞を用いて、6-OHDAの効果を検証した。その結果、野生型(WT)細胞と比べ、Atg5欠損細胞(図3A)やAtg9、Atg16L1欠損細胞(data not shown)において、LC3-II型が減少するとともに、6-OHDA刺激によるDJ-1の

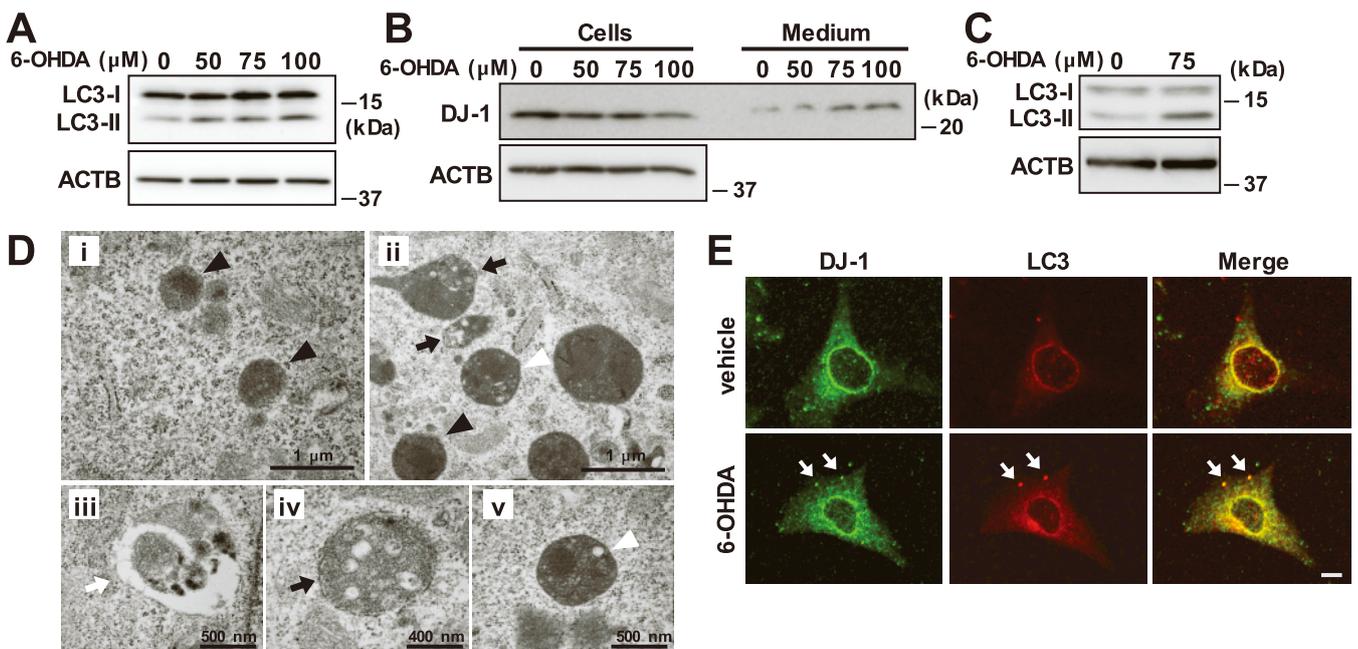


図2 (A) SH-SY5Y細胞における6-OHDA刺激によるLC3への影響。(B, C) MEF細胞における6-OHDA刺激によるDJ-1分泌(B)、LC3(C)への影響。(D) MEF細胞における6-OHDA刺激時の電子顕微鏡観察。i: コントロール刺激、ii-v: 6-OHDA刺激、iii: 隔離膜、iv: オートファゴソーム、v: オートリソソーム。(E) MEF細胞における6-OHDA刺激時の免疫細胞染色。

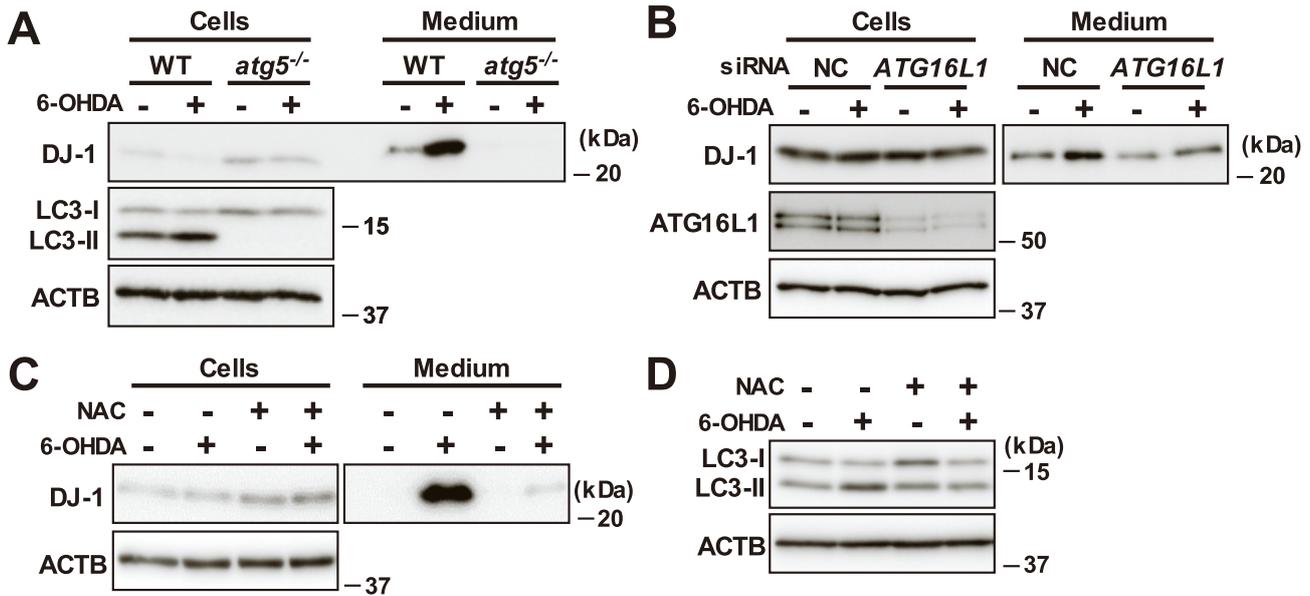


図3 (A) WTおよびatg5^{-/-}MEF細胞における6-OHDA 刺激によるDJ-1分泌への影響。(B) SH-SY5Y細胞におけるATG16L1ノックダウンによるDJ-1分泌への影響。(C、D) WT MEF細胞における6-OHDA誘導性DJ-1分泌亢進 (C)、LC3 (D) に対するNACの影響。

分泌亢進が観察されなかった。さらに、siRNAによりATG16L1をノックダウンしたSH-SY5Y細胞においても、同様に6-OHDA誘導性DJ-1分泌が抑制された(図3B)。これらの結果から、オートファジーの進行が、6-OHDA誘導性のDJ-1非典型的分泌に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

また、MEF細胞においても、NACの前処理は6-OHDA誘導性DJ-1分泌亢進を抑制し(図3C)、LC3-II型の増加も抑制していた(図3D)ことから、酸化ストレスの上昇が、オートファジーの誘導やDJ-1の分泌に関与していることが明らかとなった。

3. 4. AMPKとULK1の活性化が、6-OHDA誘導性のオートファジーやDJ-1分泌亢進に重要である

そこで6-OHDAによる酸化ストレスの上昇が、なぜオートファジーを誘導するのか明らかにするために、オートファジーのシグナル伝達経路と酸化ストレスの双方に含まれる制御因子であるAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)とその下流のunc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1)の活性化(リン酸化)、およびオートファジーの負の制御因子であるmechanistic target of rapamycin kinase (mTOR)の活性に着目した。その結果、比較対象として用いたmTORの阻害剤であるrapamycin処理は、AMPKやULK1のリン酸化に影響を与えずに、mTORの標的であるp70S6Kのリン酸化を抑制した(図4A)。一方で6-OHDA刺激は、AMPKのThr172のリン酸化とULK1のSer555のリン酸化を誘導したが、p70S6Kのリン酸化には影響していなかった。

さらにNAC前処理はAMPKのリン酸化を抑制したことから、6-OHDA誘導性酸化ストレスがmTOR非依存的にAMPK、ULK1のリン酸化を引き起こしていることが示された(図4B)。またAMPKの活性化は、AMP:ATP比により調節されていることから、AMPとATPレベルを解析したところ、6-OHDA刺激はAMP:ATP比を上昇させていた(図4C)。

次に6-OHDA誘導性オートファジーやDJ-1の分泌に対するULK1阻害剤MRT68921の効果を検討した。その結果、MRT68921の共処理は、6-OHDAによるLC3-II型の増加を抑制するとともに(図4D)、DJ-1の分泌亢進も抑制した(図4E)。これらの結果から、AMPK-ULK1経路の活性化が6-OHDA誘導性のオートファジーやDJ-1の分泌亢進に関与していることが示された。

3. 5. トレハロースはオートファジーやDJ-1分泌を促す

最後に6-OHDA以外の刺激でもDJ-1の分泌が亢進するか検証した。天然の糖質であり皮膚の保湿効果があることが知られるトレハロースは、AMPK-ULK1経路を活性化し、mTOR非依存的にオートファジーを誘導することが知られていること^{8,9)}から、DJ-1の分泌に対する効果を検討した。その結果、トレハロース処理は濃度依存的にLC3-II型の増加を誘導し(図5A)、200mMトレハロースは6-OHDAと同程度にDJ-1の分泌を亢進した(図5B)。

4. 考 察

本研究ではDJ-1の分泌メカニズムを明らかにするため

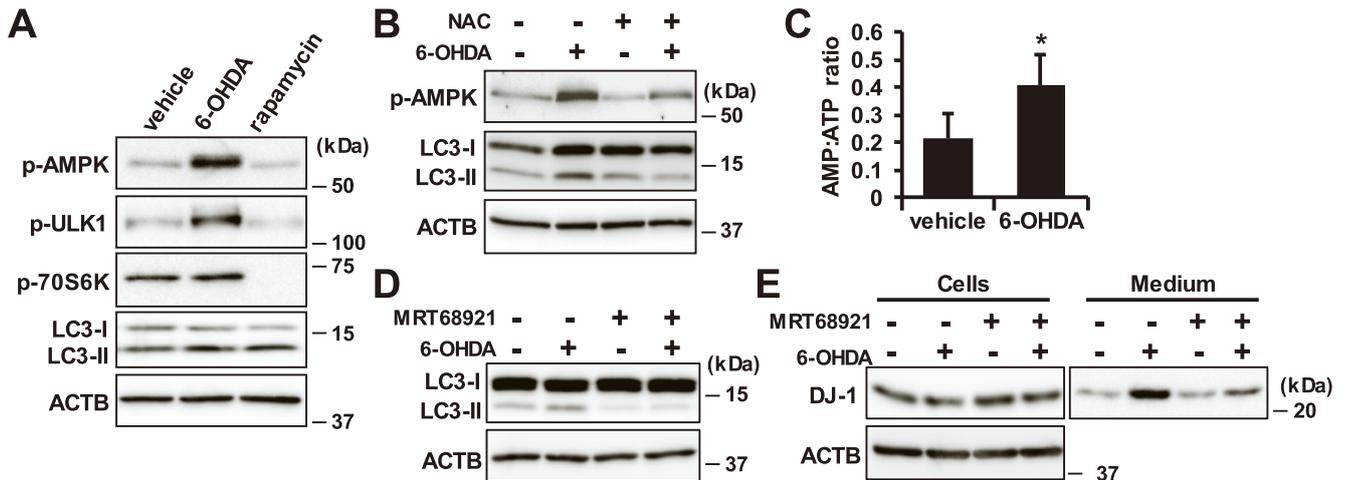


図4 (A) WT MEF細胞における6-OHDA 刺激によるAMPK、ULK1、p70S6Kのリン酸化への影響。(B) WT MEF細胞における6-OHDA とNAC共処理によるAMPKのリン酸化とLC3に対する影響。(C) WT MEF細胞における細胞内AMP:ATP比。n = 3; mean ± S.D.; *, p < 0.05. (D、E) SH-SY5Y細胞における6-OHDA とMRT68921共処理によるLC3 (D) とDJ-1分泌 (E) に対する影響。

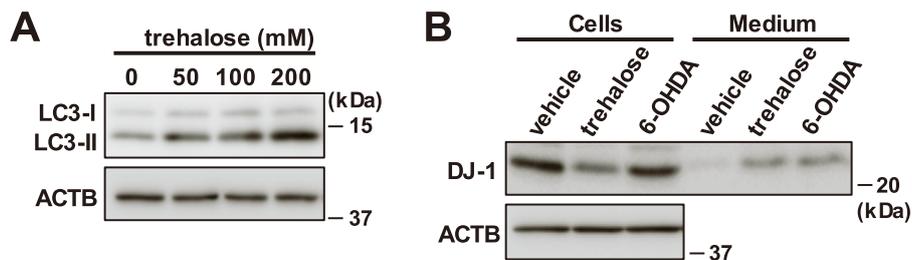


図5 (A) WT MEF細胞におけるトレハロース刺激によるLC3 (A) と、DJ-1 分泌(B) に対する影響。

に神経細胞と線維芽細胞を用いた。その結果、6-OHDA による細胞内酸化ストレス上昇がAMP : ATP比率を変化させ、AMPKを活性化させたことで、オートファジーの進行に関わるULK1のリン酸化が起き、分泌性オートファジーによるDJ-1の分泌が起きることを見出した。これらの結果から通常細胞質に存在するDJ-1の分泌機構として、オートファジー性の小胞に囲まれ、その後小胞が細胞膜と融合することでDJ-1の細胞外への非典型的分泌が起こるという可能性が示唆された(図6)。また、DJ-1分泌促進剤として、化粧品原料としても用いられるトレハロースを同定した。なお本報告書は文献10の内容をもとに作成した。

今回我々が新規に明らかにした分泌性オートファジーによるDJ-1の分泌機構が、UV刺激による酸化ストレスの上昇に伴う皮膚細胞からのDJ-1の分泌に関わるか今後明らかにする必要がある。また、本研究で見出したトレハロースをはじめ、DJ-1の分泌を促進する化合物の探索や、DJ-1とともに分泌されるタンパク質の同定やその機能が明らかになれば、皮膚細胞の保護タンパク質の分泌促進につながることを期待される。

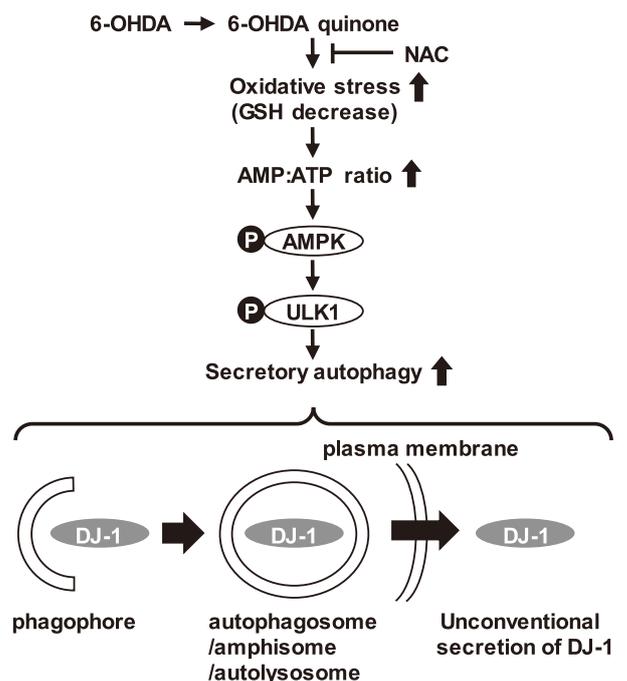


図6 6-OHDA刺激によるDJ-1の非典型的分泌機構の模式図

(引用文献)

- 1) Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256-259, 2003.
- 2) Ishiwatari S, Takahashi M, Yasuda C, Nakagawa M, Saito Y, Noguchi N, Matsukuma S. The protective role of DJ-1 in ultraviolet-induced damage of human skin: DJ-1 levels in the stratum corneum as an indicator of antioxidative defense. *Arch. Dermatol. Res.* 307, 925-935, 2015.
- 3) Zhang M, Schekman R. Unconventional secretion, unconventional solutions. *Science* 340, 559-61, 2013.
- 4) Malhotra V. Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. *EMBO J.* 32, 1660-1664, 2013.
- 5) Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036, 2004.
- 6) Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106, 20842-20846, 2009.
- 7) Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 456, 264-268, 2008.
- 8) DeBosch BJ, Heitmeier MR, Mayer AL, Higgins CB, Crowley JR, Kraft TE, Chi M, Newberry EP, Chen Z, Finck BN, et al. Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Sci. Signal* 9, 21, 2016.
- 9) Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 282, 5641-5652, 2007.
- 10) Urano Y, Mori C, Fuji A, Konno K, Yamamoto T, Yashirogi S, Ando M, Saito Y, Noguchi N. 6-Hydroxydopamine induces secretion of PARK7/DJ-1 via autophagy-based unconventional secretory pathway. *Autophagy* 14, 1943-1958, 2018.