

異常な形質膜タンパク質を除去する新しい品質管理機構

沖米田 司

1. はじめに

遺伝子変異やストレスにより生じる異常膜タンパク質は、多くの場合、細胞に有害であるため、細胞内タンパク質品質管理機構 (protein quality control: QC) により、速やかに除去・分解される。異常膜タンパク質は主にタンパク質合成の場である小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) で生じやすいため、現在まで小胞体品質管理機構 (ER QC) について広く研究が行われ、その詳細な分子機構が理解されてきた。しかし、一部の異常膜タンパク質は ER QC に認識されず、形質膜に発現する。また、細胞表面に発現している機能的な膜タンパク質は熱や炎症などのストレスにより傷害を受け、異常膜タンパク質となる。これらの異常膜タンパク質は速やかに形質膜から除去されるが、その詳細な分子機構は不明であった。本稿では、最近明らかになった形質膜の異常タンパク質を除去する品質管理機構 (peripheral QC) について紹介する。

2. 形質膜の異常膜タンパク質

分泌経路において、多くの異常膜タンパク質は小胞体にとどまり、小胞体品質管理機構により分解されるが、post-ER compartments においても構造異常タンパク質は選択的に認識され分解されることが知られている (図 1)。たとえば、酵母や哺乳類細胞において、異常タンパク質はゴルジ体から液胞/リソソームへ選別輸送後、分解される¹⁾。また、いくつかのトランスポーターや受容体 (レセプター) などの膜タンパク質は形質膜から速やかに除去・分解されることが報告されている²⁾ (表 1)。酵母において、フェロモン受容体 Ste2 やプロトンポンプ Pma1 の温度感受性変異体は制限温度下においてユビキチン化により、速やかに

形質膜からエンドサイトーシスされ、リソソームで分解される³⁾。また、アミノ酸トランスポーター Gap1 もスフィンゴ脂質非存在下において、速やかにユビキチン化を受け、エンドサイトーシス後、リソソームで分解される⁴⁾。哺乳類細胞においては、膜貫通領域に変異があるドパミン受容体 (DRD4 M345T 変異体) やバソプレッシン受容体 (V2R W164S 変異体) は細胞表面から速やかに分解され、その結果、注意欠陥・多動性障害や腎性尿崩症の原因となる^{5,6)}。また、細胞質領域に変異がある胆汁トランスポーターである bile salt export pump (BSEP E297G 変異体など) や塩素チャネルである CFTR (Δ F508 変異体など) も形質膜から速やかに除去・分解される⁷⁻⁹⁾。形質膜または post-Golgi compartments に局在する BSEP, DRD4, V2R および CFTR 変異体では、ユビキチン化レベルの増加が観察され、形質膜での安定性が低く、速やかに除去・分解されることが報告されている²⁾。さらに、ユビキチン活性化酵素 (E1) の不活性化により、異常形質膜タンパク質の分解が阻害されることから、細胞表面の異常膜タンパク質の安定性がユビキチン化によって制御されることが考えられる。

3. 嚢胞性線維症関連タンパク質 CFTR

CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) は上皮細胞のアピカル形質膜に発現する膜タンパク質であり、塩素チャネルとして機能する ABC トランスポーターである。CFTR の異常は白人間で頻度が高い遺伝病、嚢胞性線維症 (cystic fibrosis: CF) の原因となる¹⁰⁾。正常な CFTR タンパク質は小胞体でフォールディング後、ゴルジ体で複合糖鎖修飾を受け成熟型となり、形質膜に発現する。一方、大部分の CF 患者 (90%) でみられる Δ F508-CFTR 変異体は正しくフォールディングできず、その大部分は未成熟型として ER QC により認識され、小胞体に局在化される¹¹⁾。その後、シャペロン介在性ユビキチンリガーゼ CHIP、小胞体膜結合型ユビキチンリガーゼ RMA1 および Gp78/AMFR により Δ F508-CFTR 変異体はユビキチン化され、細胞質のプロテアソームにより小胞体関連分解 (ER-associated degradation: ERAD) される¹¹⁾。一方、一部の Δ F508-CFTR は形質膜に発現し塩素チャネルとして機能するほか、CF の治療薬として開発された“コレクター”

関西学院大学理工学部生命科学科生命医化学専攻 (〒669-1337 兵庫県三田市学園 2-1)

Peripheral quality control mechanism eliminating aberrant proteins from the plasma membrane

Tsukasa Okiyoneda (Department of Bioscience, School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University, 2-1 Gakuen, Sanda, Hyogo 669-1337, Japan)

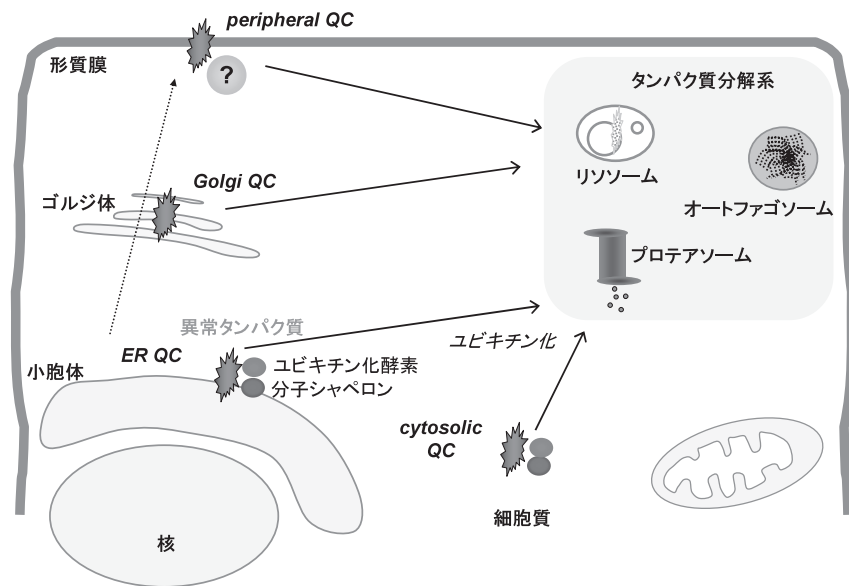


図1 細胞内タンパク質品質管理機構

表1 形質膜タンパク質品質管理の基質タンパク質と関連する疾患

形質膜タンパク質	遺伝因子, 環境因子	疾患, 病態
BSEP (bile salt export pump)	E297G, D482G	進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型 (PFIC2)
CFTR	$\Delta F508$	嚢胞性線維症 (CF)
NHE6 (Na/H exchanger 6)	$\Delta 255-256$	Angleman 症候群
MLC1	多数の遺伝子変異	巨脳症性白質脳症 (MLC)
hERG (K^+ チャネル)	低 K^+	long QT 症候群
DRD4 (ドパミン受容体)	M345T	注意欠陥・多動性障害 (ADHD)
V2R (バソプレッシン受容体)	W164S	腎性尿崩症

と呼ばれる化合物処理や低温培養 (26~30℃) によっても $\Delta F508$ -CFTR は形質膜に発現する¹²⁾。しかしながら、形質膜に発現した $\Delta F508$ -CFTR は安定性が非常に悪く、速やかに形質膜から除去・分解される¹¹⁾。

以前の研究で①形質膜に局在する $\Delta F508$ -CFTR においてユビキチン化の亢進がみられること、②ユビキチン融合 CFTR は速やかに形質膜から除去されること、③ $\Delta F508$ -CFTR がユビキチン結合エンドソームアダプター複合体 (ESCRT) の構成因子である Hrs, STAM, TSG101 と結合すること、④ユビキチン活性化酵素 (E1) の不活性化が $\Delta F508$ -CFTR の形質膜からの分解を抑制することから、ユビキチン化が $\Delta F508$ -CFTR の形質膜からの除去・分解を促進することが明らかとなっていた^{7,8)}。したがって、ユビキチン化の抑制は $\Delta F508$ -CFTR の形質膜での安定性や発現レ

ベルを改善し、CF の新規治療戦略になる可能性が考えられる。しかしながら、形質膜に局在する $\Delta F508$ -CFTR がどのようにユビキチン化されるのか、その分子機構はまったく不明であった。

4. 形質膜の $\Delta F508$ -CFTR のユビキチン化

まず我々は形質膜に局在する $\Delta F508$ -CFTR は小胞体に局在する場合と同様に構造異常を持つためにユビキチン化されるのではないかと考え、CFTR の構造状態を調べるためにプロテアーゼ限定分解実験を行った。低温 (26℃) 培養により、 $\Delta F508$ -CFTR を形質膜に蓄積させ、形質膜に局在する成熟型 $\Delta F508$ -CFTR を含むミクロソームを精製し、CFTR のトリプシン感受性を検討した。その結果、26℃ で

はΔF508-CFTRは正常CFTRと同様にトリプシン耐性であったが、低温培養後、37℃で2〜3時間インキュベートすると、成熟型ΔF508-CFTRは小胞体に局在する未成熟型と同様にトリプシン感受性となった。したがって、形質膜のΔF508-CFTRは26℃では構造的に安定であるが、37℃では部分的に変性することが示唆された。さらに種々の解析により、ΔF508-CFTRの変性状態に依存して成熟型ΔF508-CFTRのユビキチン化が増加し、エンドサイトーシスが促進されることがわかった。したがって、ΔF508-CFTRは構造異常に依存してユビキチン化され、形質膜から速やかに除去されることが考えられた¹³⁾。

次に、形質膜に局在する構造異常CFTRを特異的にユビキチン化する分子の同定を試みた。タンパク質のユビキチン化はE1・E2・E3の三つの酵素の連鎖反応で起こるが、特に多様なE3酵素(ユビキチンリガーゼ)が基質選択性を決定する。そこで、形質膜の構造異常なΔF508-CFTRのユビキチンリガーゼを同定するために、まず以下の可能性を考えた。①細胞内局在は異なるが、同じ基質であるということから、小胞体に局在する未成熟型ΔF508-CFTRのユビキチンリガーゼ(CHIP, Rml1, Gp78)の関与。②異なる基質であるが、同じ細胞内局在であるということから、形質膜のシグナル受容体(EGF受容体など)のユビキチンリガーゼ(Cbl, Nedd4, MARCHなど、リン酸化依存的であり構造異常との相関は不明)の関与。これらの候補ユビキチンリガーゼを低分子干渉RNA(siRNA)を用いてノックダウンし、ΔF508-CFTRの形質膜安定性を指標にHeLa細胞を用いてスクリーニングを行った。その結果、分子シャペロン結合性ユビキチンリガーゼであるCHIP(C-terminus of Hsc70-interacting protein)が構造異常なΔF508-CFTRの形質膜安定性を制御することを発見した。さらに、CHIPとともに機能するE2酵素であるUbcH5cノックダウンでもCHIPノックダウンと同様な効果がみられることから、UbcH5c-CHIPが形質膜の構造異常CFTRのユビキチン化を制御することが示唆された。CHIP変異体の実験から、CHIPのユビキチンリガーゼ活性(U-box)が異常CFTRの形質膜からの除去に必要であること、さらに、CHIPの分子シャペロン(Hsc70, Hsp70, Hsp90)結合に必要なTPRドメインが形質膜の異常CFTRとの結合に必須であることがわかった。したがって、CHIPは分子シャペロンを介して、形質膜の異常CFTRと結合し、ユビキチン化を制御する可能性が考えられた¹³⁾。

5. 異常形質膜タンパク質の認識機構

次に、CHIPと形質膜の異常CFTRとの結合を制御する分子シャペロンの同定を試みた。CHIPと結合する可能性のある分子シャペロンおよびコシャペロンをsiRNAで

ノックダウンし、形質膜の異常CFTRの安定性を指標に再びスクリーニングを行った。その結果、分子シャペロンHsc70およびHsp90A, Hsc70のコシャペロンDNAJA1(Hdj2), DNAJB2(Hsj1)およびBAG-1, Hsp90のコシャペロンであるAHSA1(Aha1), Hsc70-Hsp90複合体形成に関与するコシャペロンHOP(Hsp90/Hsp70 organizing protein)が異常CFTRの形質膜からの除去に関与することがわかった。さらに、これらの分子をノックダウン後、成熟型ΔF508-CFTRのユビキチン化レベルを検討した結果、ユビキチンリガーゼCHIPに加えて、これらのシャペロンおよびコシャペロンのノックダウンは、成熟型ΔF508-CFTRのユビキチン化レベルを劇的に減少させた。さらに、精製タンパク質を用いた*in vitro*ユビキチン化実験の結果、E1, E2(UbcH5)およびE3(CHIP)存在下ではユビキチン化が起こらず、Hsc70を加えることで成熟型ΔF508-CFTRのユビキチン化が起こること、さらにHsc70存在下でも分子シャペロンと結合できないCHIP-K30A変異体では成熟型ΔF508-CFTRのユビキチン化が起こらないことから、分子シャペロンであるHsc70がCHIPによる成熟型ΔF508-CFTRのユビキチン化に必須であることがわかった。したがって、Hsc70を含めたシャペロン複合体が形質膜の異常タンパク質を認識し、ユビキチン化酵素CHIP-UbcH5がユビキチン化を行うことが明らかとなった¹³⁾(図2)。

6. おわりに

最近の研究から形質膜の異常タンパク質を除去するperipheral QC機構の一端が明らかになってきた。細胞質領域に構造異常を有する形質膜タンパク質は細胞質の分子シャペロン・コシャペロンに認識され、シャペロン結合性ユビキチンリガーゼCHIPにより、ユビキチン化される。ユビキチン化された異常形質膜タンパク質は速やかに細胞内に取り込まれ、エンドソームでESCRT複合体に認識された後、リソソームでタンパク質分解される(図2)。このperipheral QC machineryは異常CFTRだけではなく、G共役型受容体(GPCR)であるV2RやDRD4変異体などの異常膜タンパク質のユビキチン化および形質膜からの除去・分解にも関与する^{2,14)}。分子シャペロンであるHsc70が認識分子であることを考えると、CHIPは構造異常を持つさまざまな形質膜タンパク質の品質管理に関与することが考えられる。興味深いことに、このperipheral QCのメカニズムは小胞体や細胞質でのタンパク質品質管理と同様な分子機構である¹¹⁾。したがって、異なる細胞内コンパートメントにおいても異常タンパク質の認識およびユビキチン化は少なくとも部分的に同様な機構原理で起こる可能性がある。しかしながら、CFを引き起こすT70-CFTR変異体はER QCに認識されず正常に形質膜に発現するが、ユ

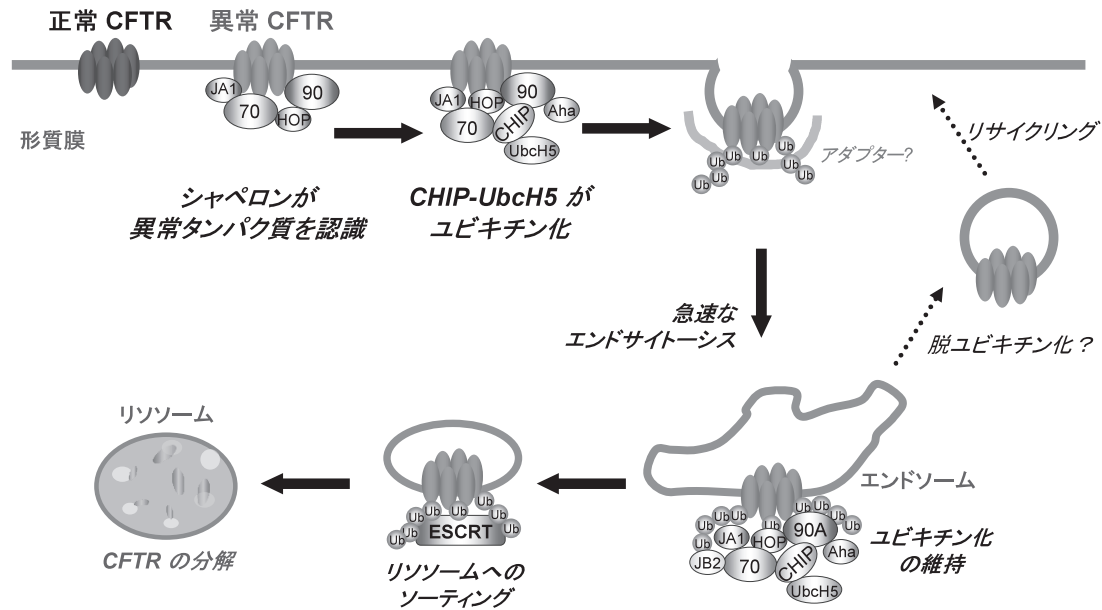


図2 形質膜タンパク質品質管理の分子機構

ビキチン化により形質膜から速やかに分解される¹⁵⁾。したがって、peripheral QC は ER QC が認識できない異常膜タンパク質を認識し除去・分解する能力を持ち、それによって細胞のタンパク質恒常性 (proteostasis) の維持に重要な役割を果たすことが考えられる。しかし、どのように peripheral QC は ER QC が認識できない構造異常を認識するのか？ 細胞外や膜貫通領域に構造異常を持つ形質膜タンパク質はどのように認識され、ユビキチン化されるのか？ CHIP 以外にどのようなユビキチンリガーゼが peripheral QC に関与するのか？ ユビキチン化を受けた形質膜タンパク質はどのようなアダプター分子に認識されて細胞内に取り込まれるのか？ peripheral QC 研究はまだまだ始まったばかりであり、多くの不明な点が残されている。今後のさらなる網羅的な解析により、peripheral QC の分子機構を理解することは CF を含めた異常形質膜タンパク質が関与するさまざまな疾患の病因理解およびその治療法の開発に深く貢献できると信じている。

謝辞

本研究はマギル大学 (カナダ) 医学部生理学科 Gergely Lukacs 研究室で行われたものであり、Lukacs 教授およびラボメンバー、さらに共同研究者のマギル大学 Jason Young 准教授およびボン大学 (ドイツ) Jorg Hohfeld 教授に心より感謝申し上げます。

- 1) Chang, A. & Fink, G.R. (1995) *J. Cell Biol.*, **128**, 39-49.
- 2) Okiyonedo, T., Apaja, P.M., & Lukacs, G.L. (2011) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23**, 483-491.

- 3) Gong, X. & Chang, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9104-9109.
- 4) Lauwers, E., Grossmann, G., & Andre, B. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 3068-3080.
- 5) van den Ouweland, A.M., Dreesen, J.C., Verdijk, M., Knoers, N.V., Monnens, L.A., Rocchi, M., & van Oost, B.A. (1992) *Nat. Genet.*, **2**, 99-102.
- 6) Swanson, J., Oosterlaan, J., Murias, M., Schuck, S., Flodman, P., Spence, M.A., Wasdell, M., Ding, Y., Chi, H.C., Smith, M., Mann, M., Carlson, C., Kennedy, J.L., Sergeant, J.A., Leung, P., Zhang, Y.P., Sadeh, A., Chen, C., Whalen, C.K., Babb, K. A., Moyzis, R., & Posner, M.I. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4754-4759.
- 7) Sharma, M., et al. (2004) *J. Cell Biol.*, **164**, 923-933.
- 8) Glozman, R., Okiyonedo, T., Mulvihill, C.M., Rini, J.M., Barriere, H., & Lukacs, G.L. (2009) *J. Cell Biol.*, **184**, 847-862.
- 9) Hayashi, H. & Sugiyama, Y. (2009) *Mol. Pharmacol.*, **75**, 143-150.
- 10) Riordan, J.R. (2008) *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 701-726.
- 11) Lukacs, G.L. & Verkman, A.S. (2012) *Trends Mol. Med.*, **18**, 81-91.
- 12) Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P.D., Burton, B., Stack, J.H., Straley, K.S., Decker, C.J., Miller, M., McCartney, J., Olson, E.R., Wine, J.J., Frizzell, R.A., Ashlock, M., & Negulescu, P.A. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 18843-18848.
- 13) Okiyonedo, T., Barriere, H., Bagdány, M., Rabeh, W.M., Du, K., Höhfeld, J., Young, J.C., & Lukacs, G.L. (2010) *Science*, **329**, 805-810.
- 14) Apaja, P.M., Xu, H., & Lukacs, G.L. (2010) *J. Cell Biol.*, **191**, 553-570.
- 15) Benharouga, M., Haardt, M., Kartner, N., & Lukacs, G.L. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 957-970.

著者寸描

●沖米田 司（おきよねだ つかさ）



関西学院大学理工学部生命科学科生命医化学専攻准教授。薬学博士（熊本大学）。

■略歴 1975年熊本県に生る。98年熊本大学薬学部卒業。2003年同大学大学院薬学研究科修了。同年科学技術振興事業団SORST研究員（英国ケンブリッジ大学医学部）。04年熊本大学医学薬学研究部博士

研究員。06年 Sickkids Hospital Research Institute（カナダ）博士研究員。08年マギル大学（カナダ）医学部生理学科リサーチアソシエイト。13年関西学院大学理工学部生命科学科准教授（現職）。

■研究テーマと抱負 膜タンパク質の形質膜発現量を規定する分子機構の解明と創薬応用研究。病態に関わる膜タンパク質の発現機能を特異的に制御するメカニズムを広く理解し、創薬研究へ発展させたい。

■ホームページ http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/d_biosci/index.html

■趣味 サッカー観戦，料理。