

37. 疾患膜タンパク質の細胞内蓄積に働く新規品質管理機構

佐藤 健

群馬大学 生体調節研究所 細胞構造分野

Key words : 小胞体, 疾患原因膜タンパク質, Rer1, ゴルジ体品質管理機構

緒言

細胞膜等で働く膜タンパク質はまず小胞体において合成され、その後、ゴルジ体を經由してそれぞれの目的地へと輸送される。この際、新たに合成された膜タンパク質はいわゆる品質管理機構によって精査され、正しいフォールディングや糖鎖修飾等を受けたもののみが目的地へと輸送される。この品質管理機構は細胞機能にとって非常に重要であるが、遺伝性腎性尿崩症や高インスリン血症等のある種の遺伝病では、本来、細胞膜に存在し尿濃縮に働く AQP2 や SUR1 等の膜タンパク質に変異が生じた結果、活性を保持しているにも関わらず品質管理機構によって小胞体にトラップされてしまい、重篤な疾患を引き起こすことが知られている¹⁾。また、網膜色素変性症や筋萎縮と感覚障害を呈するシャルコー・マリー・トゥース (CMT) 病等では、それぞれロドプシンや PMP22 等の変異膜タンパク質が小胞体に過剰に蓄積した結果、細胞傷害性を呈する²⁻³⁾。このように変異膜タンパク質が小胞体に蓄積してしまうことが原因の疾患は多数報告されているが、疾患原因膜タンパク質を選別し、小胞体に留める分子機構については依然として不明な点が多い。

我々は、この分子機構を制御する候補因子として、出芽酵母において小胞体膜タンパク質の膜貫通領域を認識し、初期ゴルジ体から小胞体へと送り返すゴルジ体膜タンパク質 Rer1⁴⁻⁸⁾に注目し、この哺乳類ホモログについて解析を行ってきた。その結果、我々は Rer1 が網膜色素変性症や CMT 病の原因となるロドプシン G51R 変異体や PMP22 L16P 変異体の小胞体蓄積に関与することを明らかにしてきた⁹⁻¹⁰⁾。

本研究では、まず様々な疾患原因膜タンパク質の動態をモニターする疾患モデル細胞を作製し、それぞれの局在性における Rer1 依存性について検討した。また、Rer1 の遺伝子欠損マウスを作製し、動物個体における初期ゴルジ体品質管理機構の生理機能について明らかにすることを目指した。さらに、トランスゴルジ網 (TGN) もしくは細胞膜において変異膜タンパク質を認識しリソソームへと輸送する新規の品質管理機構の存在についても検討した。

方法、結果および考察

1. 疾患原因膜タンパク質の小胞体局在化における Rer1 の機能解析

まず様々な疾患原因膜タンパク質に蛍光タンパク質を融合した疾患モデル細胞ライブラリーを作製した。これまでに報告のあるロドプシンの 14 種類の疾患原因変異体を作製し、細胞外に存在する N 末端側には FLAG タグ、細胞質側には緑色蛍光タンパク質 (GFP) を結合した融合タンパク質を HeLa 細胞において発現させた安定発現株を作製した (図 1)。これらの細胞を透過処理せずに抗 FLAG 抗体染色を行ったところ、M44T、G90D 変異体は主に細胞膜に局在し、その他の 14 種類に関しては小胞体における蓄積が観察された。これらを発現させた細胞に対して、Rer1 の発現抑制実験を行った。その結果、G51R 変異体は小胞体から細胞膜への移行が見られるものの、その他の変異体については顕著な変化は観察されなかった。また、小胞体関連分解因子である Hrd1 の発現抑制により小胞体蓄積変異体が細胞膜へ移行するとの報告があったので、Hrd1 についても発現抑制実験を行った。しかしながら、作製したロドプシン変異体の局在性に関しては顕著な変化が見られなかった。一方、Rer1 依存的に小胞体に蓄積する PMP22 の L16P 変異体に加え、M69R、L147R 変異体と GFP の融合タンパク質を発現する HeLa 細胞を作製し、Rer1 の発現抑制実験を行ったところ、これらに関しても局在変化は観察されなかった。これらのことから、Rer1 と平行して、もしくは非依存的に

働く小胞体局在化機構の存在が示唆された。今後、これらの疾患モデル細胞を活用することで、疾患膜タンパク質を小胞体に蓄積させる新たな分子機構が明らかになると期待される。

Control	細胞膜	細胞膜/小胞体	小胞体	小胞体
Rer1 KD	細胞膜	細胞膜/小胞体	小胞体	細胞膜
Hrd1 KD	細胞膜	細胞膜/小胞体	小胞体	小胞体
ロドプシン 変異体	WT, M44T, G90D	T58R, G109R, L125R, K296E	P23H, L40R, L46R, P53R, V87D, G89D, C110Y, G114D, A164E	G51R

図1. ロドプシン変異体の細胞内局在性

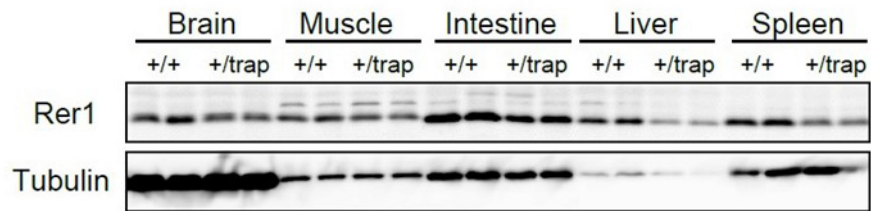
Control siRNA と Rer1 及び Hrd1 に対する siRNA によるノックダウンを行った際の各ロドプシン変異体の細胞内局在性を示す。

2. Rer1 欠損マウスを用いた初期ゴルジ体品質管理機構の生理機能の解析

まずマウス個体における Rer1 の発現組織について解析したところ、Rer1 は脳を含む多くの臓器で発現がみられた (図 2A)。次に Rer1 欠損マウスを作製し、哺乳動物個体における Rer1 の生理機能について解析した。その結果、Rer1 ホモ欠損マウスは胎生 E6.5 前後で発生異常を示し致死となった (図 2B)。そこで、野生型及び Rer1 欠損胚より胚性幹細胞 (ES 細胞) を樹立し、初期分化過程における Rer1 の役割について細胞レベルでの解析を行った。樹立した ES 細胞の未分化マーカーの発現や増殖などは、野生型と Rer1 欠損 ES 細胞で顕著な違いは認められなかったが、ES 細胞から胚様体を形成し分化を誘導すると Rer1 を欠損した胚様体においてアポトーシスを伴う分化異常が観察された。これらの結果から、Rer1 が初期分化過程の細胞間コミュニケーションの制御に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

一方、Rer1 は脳に発現が見られることから、脳特異的な Rer1 欠損マウスを作製したところ出生した。これらのマウスの脳は野生型マウスと比べ小さく、重量が低い傾向があった。Rer1 は β アミロイドの産生や Notch の活性化に働く γ -セクレターゼの複合体形成にも関与することが示唆されているので、脳における γ -セクレターゼ複合体の量および活性を測定したところ、顕著な低下が観察された。そこで、Rer1 欠損細胞における γ -セクレターゼ複合体の構成因子の発現量を検討したところ、Rer1 の欠損により γ -セクレターゼ構成因子の顕著な減少が認められた。また、細胞表面における γ -セクレターゼ複合体の発現量も減少していた。この細胞表面における γ -セクレターゼ複合体量の減少は、細胞表面への輸送異常によるものではなく、複合体量の減少によると考えられた。また、Rer1 欠損細胞では、 γ -セクレターゼ構成因子がリソソームに輸送されていた。これらの結果から、Rer1 は複合体を形成できずに単体で輸送された γ -セクレターゼ構成因子をゴルジ体で認識し、小胞体へ送り返すことで γ -セクレターゼ複合体の形成を促進する可能性が示唆された (論文投稿中)。

A



B

Genotype	Stage			
	Blastocyst	E9.5	E13.5	Adult
+/+	3	4	3	14
+/trap	2	8	8	23
trap/trap	3	0	0	0
Resorption		5	5	

図2. Rer1 のマウス個体における生理機能の解析

- (A) 野生型マウス (+/+) と Rer1 遺伝子ヘテロ欠損マウス (+/trap) の組織における Rer1 タンパク質の発現。Rer1 は脳を含む多くの組織で発現している。
 (B) Rer1 遺伝子欠損マウスは胎生致死となる。

3. TGN もしくは細胞膜に存在する未知の品質管理機構の解析

家族性低マグネシウム血症の原因遺伝子の1つとして *Claudin16* (*Cldn16*) が同定されており、これまでに20種類以上の変異が報告されている。この *Cldn16* は細胞と細胞の間のタイトジャンクションを構成する細胞膜タンパク質であり、マグネシウムイオンチャネルとしての機能を持つ。このうち、G121R 変異体は細胞膜に輸送されず、ゴルジ体から直接リソソームに輸送されてしまうことが報告されている。そこで、この変異体に GFP を融合し、HeLa 細胞において発現させたところ、細胞内のユビキチン陽性の膜構造に蓄積することが判明した (図3)。

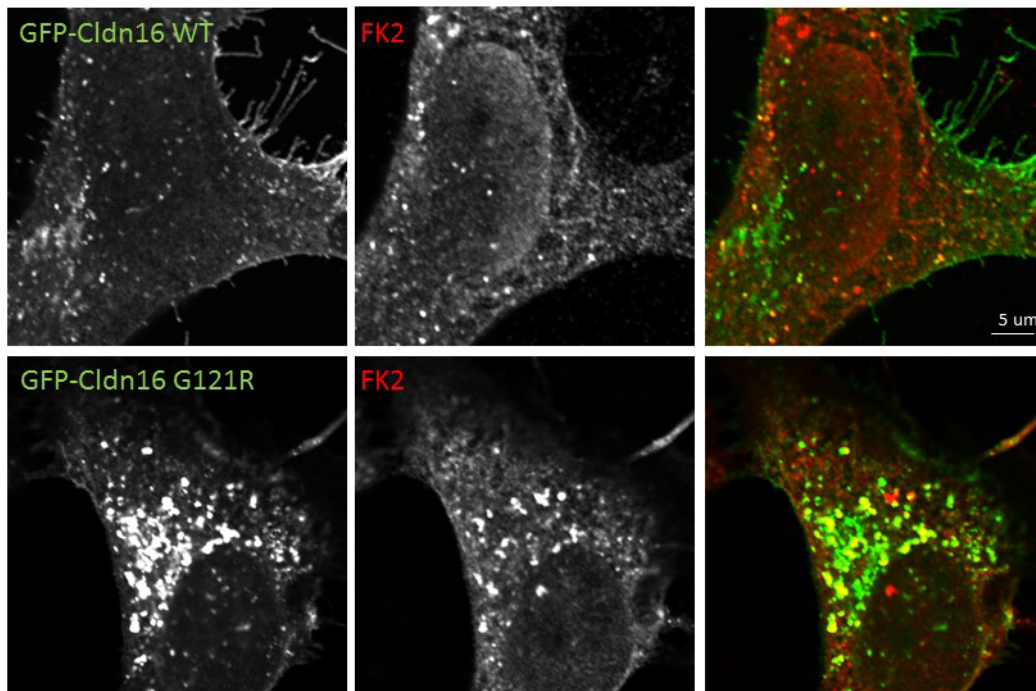


図 3. Cldn16-G121R は細胞内においてユビキチン陽性の構造に局在する
 Cldn16 の野生型 (WT) は主に細胞膜に局在するのに対し、Cldn16 G121R 変異体は
 FK2 抗体によって染色されるユビキチン陽性の構造に顕著に局在している。

そこで、G21R 変異体に存在する潜在的なユビキチン化部位に変異を導入したところ、細胞膜における局在性が回復した (図 4)。このことから、ゴルジ体からリソソームへの変異膜タンパク質のソーティングにはユビキチン化が関与することが示唆された。現在、このユビキチン化に働く因子を探索中である。

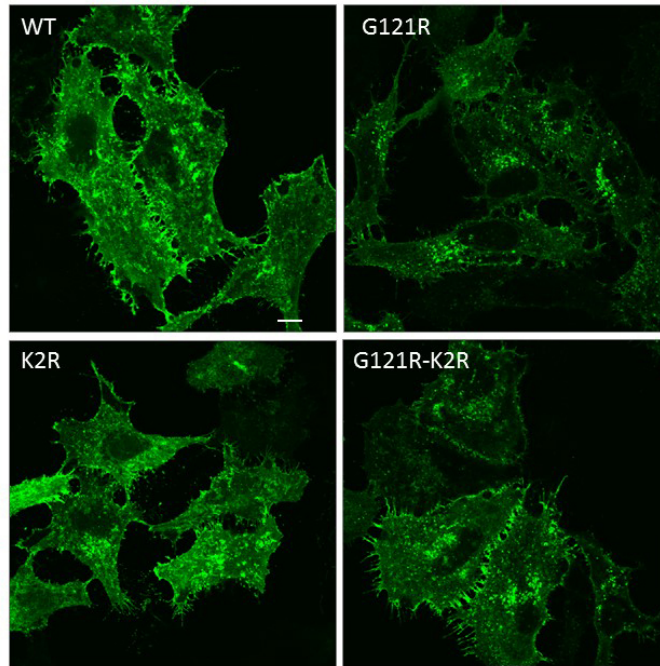


図 4. Cldn16-G121R のユビキチン陽性構造における蓄積にはリジン残基が重要である
 Cldn16 G121R 変異体はユビキチン陽性の膜構造に蓄積するが、Cldn16 G121R 変異体に存在する 2 つのリジン残基をアルギニン残基 (K2R) に置換すると野生型 (WT) と同様に細胞膜に局在するようになった。Scale Bar: 5 μ m.

本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Conn PM, Ulloa-Aguirre A, Ito J, Janovick JA. G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. *Pharmacol Rev.* 2007;59(3):225-50. PubMed PMID:17878512. 17878512.
- 2) Mendes HF, van der Spuy J, Chapple JP, Cheetham ME. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. *Trends Mol Med.* 2005;11(4):177-85. PubMed PMID: 15823756.
- 3) Naef R, Suter U. Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism of PMP22 point mutations in peripheral neuropathies. *Neurobiol Dis.* 1999;6(1):1-14. PubMed PMID: 10078969.
- 4) Sato K, Nishikawa S, Nakano A. Membrane protein retrieval from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum (ER): characterization of the RER1 gene product as a component involved in ER localization of Sec12p. *Mol Biol Cell.* 1995;6(11):1459-77. PubMed PMID: 8589449.
- 5) Sato K, Sato M, Nakano A. Rer1p as common machinery for the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(18):9693-8. PubMed PMID: 9275186.
- 6) Sato K, Sato M, Nakano A. Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatomer. *J Cell Biol.* 2001;152(5):935-44. PubMed PMID: 11238450.
- 7) Sato K, Sato M, Nakano A. Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol Biol Cell.* 2003;14(9):3605-16. PubMed PMID: 12972550.
- 8) Sato M, Sato K, Nakano A. Endoplasmic reticulum quality control of unassembled iron transporter depends on Rer1p-mediated retrieval from the golgi. *Mol Biol Cell.* 2004;15(3):1417-24. PubMed PMID: 14699055.

- 9) Yamasaki A, Hara T, Maejima I, Sato M, Sato K, Sato K. Rer1p regulates the ER retention of immature rhodopsin and modulates its intracellular trafficking. *Sci Rep.* 2014;4:5973. doi: 10.1038/srep05973. PubMed PMID: 25096327.
- 10) Hara T, Hashimoto Y, Akuzawa T, Hirai R, Kobayashi H, Sato K. Rer1 and calnexin regulate endoplasmic reticulum retention of a peripheral myelin protein 22 mutant that causes type 1A Charcot-Marie-Tooth disease. *Sci Rep.* 2014;4:6992. doi: 10.1038/srep06992. PubMed PMID: 25385046.