

学位論文題名

Characterization of the Plasma Membrane Targeting
and the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation
of Bovine Anion Exchanger 1

(牛アニオン交換輸送体1の細胞膜輸送と
小胞体関連分解分子機構の性状解析)

学位論文内容の要旨

小胞体 (ER) で合成された膜内在性タンパク質は、多くの分泌タンパク質と同様、ER における品質管理機構の作用で選別を受けながら細胞内の目的部位に輸送される。構造に異常のあるポリペプチドは、細胞質でユビキチン-プロテアソームシステムにより分解される (ER 関連分解、ERAD)。哺乳動物細胞における ERAD の分子機構は、従来、主に嚢胞性線維症の原因タンパク質である cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) と、その $\Delta F508$ 変異体 ($\Delta F508$ -CFTR) を中心に進められてきた。本研究は、CFTR とは仕組みが異なることが示唆されるアニオン交換輸送体 AE1 (band 3) の ERAD についてその性状を明らかにすることを目的とした。

ERAD は、ER における認識、ER から細胞質への逆行輸送、ならびにユビキチン-プロテアソーム系によるポリペプチドの分解からなる一連のプロセスである。第1章では、ERAD 関連分子による認識に関わる AE1 の分子内領域を特定する一助として、C 末端細胞質内領域に焦点を充てた検討を行った。ヒト AE1 の C 末端 11 アミノ酸残基欠損変異体は、細胞膜輸送異常を来し、家族性尿細管性アシドーシスの原因となることが知られる。まず、この C 末端細胞質内ドメイン (Phe⁸⁹¹-...-Val⁹⁰³-COO) の 11、18、28 各アミノ酸残基を欠失させた牛 AE1 変異体 (それぞれ $\Delta Ct11$ 、 $\Delta Ct18$ 、 $\Delta Ct28$) の HEK293 細胞における細胞内分布を調べたところ、 $\Delta Ct11$ と $\Delta Ct18$ は野生型 (WT) と同程度に細胞膜に分布したのに対し、 $\Delta Ct28$ は ER に滞留した。 $\Delta Ct28$ が Lys⁹⁰³ 以降の配列を欠く変異体であることから、種間で配列が保たれ、また炭酸脱水酵素 II 結合部位 (L905DADD) を含む近傍領域 Glu⁹⁰¹-...-Asp⁹⁰⁹ のアミノ酸置換変異体を作製して ER 滞留の有無とターンオーバーを解析した。その結果、Glu⁹⁰¹、Leu⁹⁰²、Leu⁹⁰⁵、ならびに Asp⁹⁰⁶ の Ala 置換変異体が細胞膜に移行せず ER に留まった。これら ER 滞留変異体のターンオーバーは WT のそれと著しくは異ならなかったが、いずれもプロテアソーム阻害剤 lactacystin 存在下での延長が認められた。この領域の配列が数カ所異なるマウス AE1 の各アミノ酸置換変異体でも同様の結果が得られた。これらの結果から、AE1 の ER 滞留、あるいは ER 以降の細胞内輸送に関わる認識に C 末端細胞質内ドメインの EL (K/Q) (L/C) LD (A/G) DD 配列の構造が関与することが明らかになった。

第2章では、従来の研究から示唆される、AE1 の ERAD がユビキチン非依存性であること、またプロテアソーム阻害時に細胞質内凝集体アグリソーム (aggresome) を形成しないことについて遺伝性球状赤血球症の原因となる牛 AE1 のナンセンス変異体 R664X AE1 を用いた検討を行った。 $\Delta F508$ -CFTR の ER 滞留が見られる HEK293 細胞のプロテアソーム系を lactacystin で阻害すると、 $\Delta F508$ -CFTR は微小管依存性に中心小体周囲で大きなアグリソームを形成するが、R664X AE1 の局在は変化せず ER に留まり、アグリソームには全く分布が認められなかった。ところが、両者を同時に発現させてプロテアソームを阻害すると、R664X AE1 は $\Delta F508$ -CFTR とともに中心

小体周囲で中間径フィラメントに囲われたアグリソームに局在した。この細胞では、R664X AE1 が Δ F508-CFTR と特異的に結合していることが免疫沈降法で明らかになった。これらの結果は、AE1 の ERAD の一連の過程が Δ F508-CFTR のそれと異なり ER 膜上で生じること、両者の相互作用により Δ F508-CFTR の ERAD 関連分子群の作用が AE1 の ER から細胞質への移行を生じることが明らかになった。

以上のように、本研究は、牛 AE1 の ERAD と細胞膜輸送に関する細胞質内ドメインの特定領域の関与とその ERAD が ER 膜上において生じることとを明らかにした。これらの知見は哺乳動物細胞の ER における膜内在性タンパク質の品質管理機構における未知分子機構の存在を示唆するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 葉 睦
副 査 教 授 稲 波 修
副 査 教 授 木 村 和 弘
副 査 准教授 佐 藤 耕 太

学 位 論 文 題 名

Characterization of the Plasma Membrane Targeting and the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation of Bovine Anion Exchanger 1

(牛アニオン交換輸送体 1 の細胞膜輸送と
小胞体関連分解分子機構の性状解析)

哺乳動物細胞における小胞体関連分解(ERAD)の分子機構研究は、主に嚢胞性線維症の原因タンパク質である cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)と、その $\Delta F508$ 変異体($\Delta F508$ -CFTR)を対象に進められてきた。本研究は、CFTR とは仕組みが異なることが示唆される牛アニオン交換輸送体 AE1 (band 3)の ERAD についてその性状を明らかにすることを目的としたものである。

第 1 章では、ERAD 関連分子による認識に関わる AE1 の分子内領域を特定する一助として、C 末端細胞質内領域に焦点を充てた検討を行った。まず、この領域の 11、18、28 各アミノ酸残基を欠失させた牛 AE1 変異体(それぞれ $\Delta Ct11$ 、 $\Delta Ct18$ 、 $\Delta Ct28$)の HEK293 細胞における細胞内分布を調べ、 $\Delta Ct11$ と $\Delta Ct18$ が野生型(WT)と同程度に細胞膜に分布したのに対し、 $\Delta Ct28$ は ER に滞留することを示した。次いで $\Delta Ct28$ が欠く、種間で配列が保たれ、また炭酸脱水酵素 II 結合部位(L905DADD)を含む近傍領域 E901-D909 のアミノ酸置換変異体を作製して ER 滞留の有無とターンオーバーを解析し、E901、L902、L905、ならびに D906 のアラニン置換変異体が細胞膜に移行せず ER に留まることを見出した。これら ER 滞留変異体のターンオーバーはいずれもプロテアソーム阻害剤 lactacystin 存在下での延長が認められた。この領域の配列が数カ所異なるマウス AE1 の各アミノ酸置換変異体でも同様の結果が得られた。これらの結果は、AE1 の ER 滞留、あるいは ER 以降の細胞内輸送に関わる認識に C 末端細胞質内ドメインの EL(K/Q)(L/C)LD(A/G)DD 配列の関与を明らかにしたものである。

第 2 章では、遺伝性球状赤血球症の原因となる牛 AE1 のナンセンス変異体 R664X AE1 を用いて、従来の研究から示唆される、AE1 の ERAD がユビキチン非依存性であること、またプロテアソーム阻害時に細胞質内凝集体アグリソーム(aggresome)を形成しないことについて検討した。 $\Delta F508$ -CFTR の ER 滞留が見られる HEK293 細胞のプロテアソーム系を lactacystin で阻害すると、 $\Delta F508$ -CFTR は微小管依存性に中心小体周囲で大きなアグリソームを形成するが、R664X AE1 の局在は変化せず ER に留まりアグリソームには全く分布しなかった。ところが、両者を同時に発現させてプロテアソームを阻害すると、R664X AE1 の分布が変化し、

$\Delta F508$ -CFTR とともにアグリソームに局在した。さらに、免疫沈降法により、この細胞では R664X AE1 が $\Delta F508$ -CFTR と特異的に結合していることを示した。これらの結果は、AE1 の ERAD の一連の過程が $\Delta F508$ -CFTR のそれと異なり ER 膜上で生じることと、両者の相互作用により $\Delta F508$ -CFTR の ERAD 関連分子群の作用が AE1 の ER から細胞質への移行を生じることが明らかにしたものである。

以上のように、本研究は、牛 AE1 の ERAD と細胞膜輸送に細胞質内領域の特定構造が関与すること、ならびにその ERAD が CFTR とは異なり ER 膜上において生じることが示されたものであり、広く ER における膜内在性タンパク質の品質管理分子機構の解明に貢献するものである。したがって、審査員一同は、上記博士論文提出者安達啓一の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科博士論文審査等に合格と認めた。