新規アニオンチャネル GPHR による ゴルジ装置 pH ホメオスタシス

前田 裕輔

要約：細胞質や細胞内小器官（オルガネラ）は脂質二重膜によってお互いに隔離されているコンパートメントであり、固有の環境やタンパク質・脂質成分を保持することで異なった生合成代謝やシグナル応答を効率よく制御している。すなわちオルガネラの環境を調節維持することはその機能にとって非常に重要であり、それ故、厳密に調節されている。そういった環境因子の1つが pH である。分泌経路のゴルジ装置、分泌小胞、分泌顆粒や、エンドサイトーシス経路のエンドソーム、リソソームなどのオルガネラの内腔はそれぞれ固有の酸性 pH に保たれていて、その異常で様々な疾患が発症することからオルガネラや細胞・個体にとって、pH 調節は重要なホメオスタシスの1つであると言える。酸性オルガネラの pH は液胞型プロトンポンプ、カウンターイオンチャネル（コンダクタンス）、プロトンリークの3者のバランスで調節されていると考えられているが、液胞型プロトンポンプを除いて分子レベルではほとんど理解されていない。最近、我々はゴルジ装置に発現する新規タンパク質 GPHR (*Golgi pH Regulator*) を同定し、その機能がアニオンチャネルであり、ゴルジ装置で初めて同定されたカウンターコンダクタンスとして pH 調節に必須であることを示した。さらにその変異細胞の解析から GPHR 欠損がゴルジ装置の pH 上昇をプライマリーな原因とするタンパク質輸送障害、糖鎖修飾不全、ゴルジ装置形態異常をもたらすことを明らかにした。GPHR の発見を契機として酸性オルガネラの pH 調節機構への理解をより深め、pH 異常が病因である疾患に対する新たな創薬の開発への突破口となることを期待している。

細胞や生物は、増殖・分化、代謝、シグナル応答など数多くの複雑な反応を時間的、空間的な調節機構によって非常に巧妙かつ効率的に調節している。空間的な調節機構としてタンパク質の局所的な局在や細胞の分画（コンパートメント）化が使われている。細胞質をはじめ、小胞体、核、ミトコンドリア、ゴルジ装置、エンドソーム、リソソーム、ペルオキシソームなどのオルガネラは脂質二重膜によってお互いに隔離されているコンパートメントであり、固有の環境やタンパク質・脂質成分を保持することで異なった生合成代謝やシグナル応答を効率よく制御している。つまりオルガネラの環境の調節維持は重要なホメオスタシスの1つであり、その因子の1つである pH も厳密に調節されている。たとえば細胞質では、代謝活動で生産される酸（プロトン）を細胞内外のナトリウム濃度勾配を利用して細胞外に排出する Na^+/H^+ 交換輸送系や CO_2 ガスを利用した $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送系などによって、その pH を中性付近に調節する。一方、ゴルジ装置、分泌小胞、分泌顆粒、エンドソーム、リソソームなどの分泌経路やエンドサイトーシス経路に位置するオルガネラは、酸性オルガネラと呼ばれるが、その内腔側は pH 4.5~6.5 程度の酸性に保たれ、大まかに言ってタンパク質の流れに沿ってより酸性側に傾く pH 勾配を形成している(1, 2) (図1)。それらのオルガネラを酸性に保つ生理的意義は、個体レベルではほとんど解明されていないが、細胞レベルでは酸性化を阻害する薬剤を用いることで、酸性 pH 勾配がタンパク質の輸送や糖鎖修飾にとって重要であるということが示された(1)。作用機序の異なる阻害薬を用いることで阻害薬でしばしば問題となる副作用の問題は回避できていると考えられるが、オルガネラ特異性は無いために観察

キーワード：ゴルジ装置, pH, イオンチャネル, 輸送, 糖鎖修飾
 大阪大学 微生物病研究所 免疫不全疾患研究分野／大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 糖鎖免疫学
 (〒565-0871 吹田市山田丘 3-1)
 E-mail: ymaeda@biken.osaka-u.ac.jp 原稿受領日：2011 年 1 月 24 日, 依頼原稿
 Title: pH homeostasis of the Golgi apparatus by GPHR, a novel anion channel. Author: Yusuke Maeda

図1 酸性オルガネラのpHとその制御

分泌経路やエンドサイトーシス経路に位置するオルガネラはそれぞれ固有の、概ねタンパク質の流れに沿ってより酸性に傾く酸性pHを維持している（左図：pH値は大体の値）。それらのpHは液胞型プロトンポンプ、カウターイオンチャネル、プロトンリークのバランスで制御されている（右図）。

される表現型がどの酸性オルガネラの異常によるものか区別できないという問題は残っている。

一般に、酸性オルガネラのpHは液胞型プロトンポンプ、カウターイオンチャネル、プロトンリークの3者のバランスで調節されていると考えられている(3-5) (図1)。液胞型プロトンポンプは8種類のサブユニットからなる細胞質複合体V1セクターと6種類のサブユニットからなる膜貫通複合体V0セクターの両者から形成される大きな複合体であり、全ての酸性オルガネラの唯一のプロトンソースと考えられている(6)。V0セクターのaサブユニットはa1からa4の4種類のアイソフォームが存在しその中の1つが複合体に組み込まれる。ヒトにおいてはa2サブユニットの異常でゴルジ装置の機能障害による糖鎖修飾不全や輸送障害を伴う皮膚弛緩症Ⅱ型を、a3サブユニットの異常で破骨細胞の機能障害による大理石病を、a4サブユニットの異常で遠位尿細管アシドーシスを、さらに液胞型プロトンポンプのシャペロン分子VMA21の異常でX連鎖性自己食空胞性ミオパチーを発症することが報告されている(7-10)。aサブユニットの違いによって異なった疾患が発症するのは、それらのアイソフォームの発現がオルガネラ・細胞・組織によって異なっていることによると考えられる。いずれにせよ、pHの上昇がそれらの病因の1つであると考えられる。プロトンポンプはオルガネラ内腔にプロトンを搬入させ酸性化するが、その結果プロトンの濃度勾配によって膜電位が生じ、さらなるプロトンの搬入にとって負

荷となる。カウターイオンチャネルは、陰イオン（クロライドイオン）の流入か陽イオン（ナトリウムまたはカリウムイオン）の流出によってその膜電位を打ち消しプロトンポンプの効率を改善する役割を持つ。膜電位を測定すると殆どゼロに近いことからカウターイオンチャネルは実際に機能していると考えられるが、分子レベルでは一部のCICファミリータンパク質と後述するGPHRを除いて殆ど分かっていない。エンドサイトーシス系では主にクロライドイオンがカウターイオンとして酸性化に寄与していると考えられており、そのクロライドチャネルとしてCICファミリータンパク質がよく研究されている(11)。CIC3-CIC7はエンドソーム～リソソーム系に局在しカウターイオンチャネルとして機能して酸性化に必要であると考えられてきた。CIC5はデント病、CIC7は大理石病の原因遺伝子であることが知られている(12, 13)。実際、CIC3, CIC4, CIC5のノックアウトまたはノックダウンによってエンドソームのpHが上昇することが示された(14-16)。しかしながら、CIC6やCIC7のノックアウトマウスでは、リソソーム蓄積症や大理石症などの症候を示すにも拘らずそれらが局在するリソソームのpHは正常であった(17, 18)。さらに最近、CIC4, CIC5, CIC7は単なるイオンチャネルではなく $H^+/2Cl^-$ 交換輸送体として働く(19-21)ことや、クロライドチャネルのみの特性を示すCIC5やCIC7の変異体をそれぞれのノックアウトマウスに発現させても症状の一部しか回復しないことが明らかになってきており(22)。

CIC ファミリータンパク質のカウンターイオンチャネルとしての役割についてはさらなる研究が必要である。プロトンリークは、オルガネラ内腔からのプロトン排出（漏出かもしれない）を意味し、プロトンポンプ阻害薬で細胞を処理するとオルガネラの pH が速やかに上昇することや熱力学的研究から求められる pH と実際の pH の解離からその存在が示されているが、生理的意義については明確ではない。その分子的メカニズムとして、 Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE) ファミリーの中で酸性オルガネラに局在する NHE6 から NHE9 の 4 分子がプロトンリークとして機能している可能性が示されている。酸性オルガネラは、それぞれ異なった pH に調節されているが、どうやってこれらの 3 者でうまく調節されているのか、なぜ異なった pH が必要かという大きな疑問は依然としてほとんど判っていないと言ってもよく、今後の進展が待たれる。

ゴルジ装置の pH 調節も液胞型プロトンポンプ、カウンターイオンチャネル、プロトンリークの 3 者のバランスで調節され、クロライドイオンがカウンターイオンとして機能していると考えられていた。我々は分泌経路のタンパク質輸送を制御する因子を同定する過程で、ゴルジ装置のカウンターイオンチャネルを初めて同定する事が出来たのでここに報告する (23)。

変異細胞は、筆者が考案した新しい輸送モニタリングシステムを用いて輸送の遅れを指標に樹立された。温度感受性 VSV-G (vesicular stomatitis virus G-protein) タンパク質、FLAG タグと蛍光タンパク質の融合タンパク質をレポータータンパク質として用い、非許容温度でレポータータンパク質を小胞体に蓄積させた後、許容温度にシフトすることで同調した小胞体からの輸送をモニターすることができ、一定時間後に細胞表面に到達したレポータータンパク質を抗 FLAG 抗体で染色しフローサイトメトリで定量分析した。このアッセイシステムとハムスター CHO 細胞の変異原処理の組み合わせで得られた変異細胞の 1 つ C27 のタンパク質輸送障害は、新生タンパク質のエンドグリコシダーゼ H 耐性獲得時期および顕微鏡観察によるレポータータンパク質の細胞内輸送の解析により、小胞体からゴルジ装置まで、またはゴルジ装置内での輸送障害がその一因であることが示された (23)。C27 変異細胞の責任遺伝子を同定するために輸送遅滞の回復を指標に発現クローニング法を行ない、その責任遺伝子 *GPHR* (後述) を同定した。タグをつけた *GPHR* は主にゴルジ装置に発現していた。*GPHR* 欠損 C27 細胞では輸送障害に加え、2 つの異常表現型が観察された (図 2)。1 つは糖鎖修飾異常であり、タンパク質の N 型糖鎖・O

図2 GPCR 欠損によるゴルジ装置の酸性化障害とそれによって起こる異常表現型

GPHR 欠損により、ゴルジ装置・TGN の酸性化障害が起こる (左図)。その pH 上昇により、CHO 細胞ではタンパク質の輸送障害 (A)・糖鎖修飾異常 (B)・ゴルジ装置の形態異常 (C) が引き起こされる。(A) 許容温度にシフトしてからの各々の時間でのレポータータンパク質の細胞表面発現量。輸送キネティクスを示す。(B) SDS-PAGE における DAF (CD55) と urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) の電気泳動。分子量の違いは糖鎖修飾異常による。(C) GPCR 欠損細胞におけるゴルジ装置の電顕像。層板構造が消失し、著しい小胞化が見られる。(文献 23 より改変)

型糖鎖のみならず CHO 細胞唯一のガングリオシドである GM3 の糖鎖修飾も異常が観察された。レクチン染色により、複数の種類の未熟 N 型糖鎖の増大が認められ、複数の糖転移反応の異常が起こっていることを示していた。これらは、1 種類の糖転移酵素の異常では説明できず、反応の場であるゴルジ装置の機能異常を疑い、またタンパク質輸送障害を示すことと併せて前述の酸性化阻害薬に見られる異常表現型に類似していることから、ゴルジ装置の環境の重要な因子である pH の異常を疑った。そこで実際にゴルジ装置の pH を測定した。この測定のために、ゴルジ局在タンパク質 GPP130 (シス～メディアルゴルジ槽)、GlcNAc-transferaseI (メディアル～トランスゴルジ槽)、TGN38 (トランスゴルジネットワーク) のいずれかのゴルジ装置局在シグナルと pH 感受性蛍光タンパク質 pHluorin の融合タンパク質を作製しゴルジ装置に発現させ pH を測定した。その結果、期待通りにいずれのレポータータンパク質を用いても 0.35 から 0.5 程度の pH 上昇が認められた (図 2)。興味深いことに、エンドソーム・リソソーム系の異常は認めなかった (23)。酸性阻害薬がすべての酸性オルガネラの pH を非特異的に上昇させ、分泌経路のみならずエンドサイトーシス経路でのタンパク質輸送を阻害することと対照的にゴルジ装置に異常が限局していた。これは、GPHR がエンドサイトーシス系に発現していないからだと考えられる。幾つかの酸性化阻害薬でゴルジ装置の形態異常が誘発されることが報告されていたので、GPHR 欠

損細胞のゴルジ装置の構造を調べてみることにした。もともと光顕レベルで、典型的なリボン様構造の減少と断片化、核周囲からより末梢側へ分散傾向が認められていたが、電顕にて正常細胞では 3～5 層からなる極性をもつ層板構造が変異細胞では全てのゴルジ槽で著しい小胞・空胞化が観察された (図 2)。この像はモネンシンで処理したときと類似しており、pH の上昇を支持する結果であった。これらの解析から、発現クローニング法に同定された遺伝子を *GPHR* (*Golgi pH Regulator*) と命名した。

それでは GPHR の機能は何であろうか？ GPHR は 455 アミノ酸から成るゴルジ装置に局在するおそらくは 9 回膜貫通領域をもつタンパク質であったが、既知のドメインは認められなかった (図 3)。また GPHR タンパク質は 3 量体を形成していた (23)。前述したように、pH はプロトンポンプ、カウンターイオンチャネル、プロトンリークの 3 者のバランスで維持されており、C27 変異細胞では GPHR が発現していないことで pH が上昇することとその予想される構造から、GPHR はカウンターイオンチャネルであると考えた。パッチクランプ法はチャネル活性を測定する一般的な方法であるが、残念なことに GPHR は強制発現をさせても細胞表面にはほとんど発現せず、パッチクランプ法を用いることはできなかった。そこで 2 重タグをつけた GPHR を 2 つのアフィニティカラムで高度に精製したあと人工脂質膜に組み込んで lipid planar bilayer システムを用いてイオンチャネルの活性を測定した (図 3)。

図3 GPHR はアニオンチャネルとして機能する

(A) SOSUI プログラムから予想される GPHR の構造。三量体として機能する。(B) 精製されたりコンビナント GPHR のチャネル活性を 150 mM/150 mM の KCl 溶液中で planar lipid bilayer の系を用いて測定した。(C) (B) のデータを電圧-電流プロットしたもの。約 400 pS のコンダクタンスを示した。(文献 23 より改変)

その結果, GPHRは期待通りに約 400 pS というかなり大きいコンダクタンスを示す陰イオンチャネルの活性を有することが判明した. チャネルは5~6 程度のサブステートを取り電位依存性を示した. 3 量体構造が複数のサブステートに関係しているのかもしれない. 電位依存性の生理的意義は不明であるが, ゴルジ装置の膜電位がほぼゼロであるという事実を考慮すると実際には電位依存性は考える必要がなく常時オープンステートであると考えられる. このことは, カウンターイオンチャネルとして機能する上で合理的だと考えられる. ゴルジ装置にはCICファミリーは局在しておらず, GPHRがゴルジ装置で固定された初めてのカウンターイオンチャネルであった.

おわりに

今回我々はゴルジ装置特異的に pH 異常を示す新規変異細胞を樹立・解析することによって, カウンターイオンチャネル GPHR がゴルジ装置の pH 調節ならびに酸性 pH 依存的なタンパク質輸送や糖鎖修飾に必須の役割を果たしていることを分子レベル・細胞レベルで証明した. 今後, GPHR 欠損 C27 細胞や GPHR のノックアウト・ノックダウンを用いて, pH 異常によりこれらの異常表現型が起こるメカニズムを明らかにし, さ

らに個体での GPHR やゴルジ装置の酸性 pH の生理的役割を解明していきたいと考えている. 同時に酸性オルガネラの pH 調節機構をよりよく理解することで, pH 異常がその病因である疾患に対する新たな創薬への突破口となることを期待している.

文 献

- 1) Weisz OA. *Int Rev Cytol*. 2003;226:259-319.
- 2) Paroutis P, et al. *Physiology (Bethesda)*. 2004;19:207-215.
- 3) Demaurex N, et al. *J Biol Chem*. 1998;273:2044-2051.
- 4) Llopis J, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6803-6808.
- 5) Schapiro FB, et al. *J Biol Chem*. 2000;275:21025-21032.
- 6) Marshansky V, et al. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20:415-426.
- 7) Frattini A, et al. *Nat Genet*. 2000;25:343-346.
- 8) Kornak U, et al. *Hum Mol Genet*. 2000;9:2059-2063.
- 9) Kornak U, et al. *Nat Genet*. 2008;40:32-34.
- 10) Ramachandran N, et al. *Cell*. 2009;137:235-246.
- 11) Jentsch TJ. *J Physiol*. 2007;578:633-640.
- 12) Lloyd SE, et al. *Nature*. 1996;379:445-449.
- 13) Kornak U, et al. *Cell*. 2001;104:205-215.
- 14) Hara-Chikuma M, et al. *J Biol Chem*. 2005;280:1241-1247.
- 15) Hara-Chikuma M, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329:941-946.
- 16) Mohammad-Panah R, et al. *J Biol Chem*. 2003;278:29267-29277.
- 17) Kasper D, et al. *EMBO J*. 2005;24:1079-1091.
- 18) Poet M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:13854-13859.
- 19) Picollo A, et al. *Nature*. 2005;436:420-423.
- 20) Scheel O, et al. *Nature*. 2005;436:424-427.
- 21) Graves AR, et al. *Nature*. 2008;453:788-792.
- 22) Novarino G, et al. *Science*. 2010;328:1398-1401.
- 23) Maeda Y, et al. *Nat Cell Biol*. 2008;10:1135-1145.

著者プロフィール

前田 裕輔 (まえだ ゆうすけ)

大阪大学 微生物病研究所 免疫不全疾患研究分野／大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 糖鎖免疫学, 准教授.
◇1995 年, 大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了 (第一内科). '97 年より大阪微生物病研究所木下タロウ教授の教室の助手, '02 年より同准教授. これまで主に GPI アンカー型タンパク質の研究を行ってきた. その間 ('99~'01 年) サンディエゴ UCSD の Malhotra 教授の教室に留学. ゴルジ装置を中心としてタンパク質輸送の研究に従事した. 今回, ゴルジ装置の pH ホメオスタシスの研究を契機として今後, この pH ワールドの解明にチャレンジしたいと考えている.