欠乏症における分泌障害と細胞内分解

小出 武比古*

Secretion Defect and Intracellular Degradation as a Cause of Protein Deficiency

Takehiko KOIDE

Key words : Protein deficiency, Secretion defect, Molecular chaperone, Intracellular degradation, Endoplasmic reticulum

Secretory proteins like plasma proteins are co- or post-translationally processed in many ways on their way of secretion. Many genetic diseases are due to low levels of proteins caused partly by a secretion defect or intracellular degradation. In this review article, such intracellular events of abnormal proteins as a cause of protein deficiency are discussed.

Quality control of newly synthesized protein takes place in the endoplasmic reticulum. Some molecular chaperones are shown to be involved in this quality control mechanism. For example, calnexin, a membrane-bound ER protein is known to function in glucose trimming of plasma glycoproteins. Whether or not the molecular chaperones recognize both normal and abnormal proteins equally is not known yet. But, only abnormal proteins are selectively degraded by some intracellular protease(s), primarily by those of the endoplasmic reticulum.

1. 血漿タンパク質欠乏症の原因

血漿タンパク質欠乏症は、Table 1 に示したような原因が想定される。先ず、①遺伝子が完全に（又は大部分が）欠失している場合や、②遺伝子の転写調節領域あるいはエクソン・イントロンのスプライシング領域における変異である。これらの場合には転写レベルで大きな異常があり、mRNA が量的かつ質的に正常に合成されないために、翻訳レベルにおいても異常タンパク質が全く合成されなかったり、合成低下

となり、結果として、分泌量の低下になる。

原因の③と④は、基本的には転写レベルでの大きな異常はなく、したがって、異常タンパク質の合成が正常でありながら、合成された分子が主として高次構造的に異常であるために正常に細胞外へ分泌されず、欠乏症となるものである。その細胞内現象の1つは、③細胞内での分解であり、他の1つは④分泌障害による細胞内蓄積である。さらに、筆者の知る限りではこれまでに実証された例はまだないが、異常タンパク質が、⑤正常に分泌された後に、血中で速や

* 姫路工業大学理学部生命科学科〔〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地 1479-1〕: Department of Life Science, Faculty of Science, Himiji Institute of Technology 1479-1, Kanaji, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-12

Table 1 Causes for Plasma Protein Deficiency

1. Complete (or Major) Deletion of the Gene
2. Mutation in the Regulatory Region of the Transcription in the Gene or Mutation in the Splicing Region of the Exon-Intron Boundary.
3. Intracellular Degradation
4. Secretion Defect and Intracellular Accumulation
5. Quick Breakdown in the Blood Flow
6. Quick Clearance from the Blood Flow by Binding to the Receptor

かに分解されたり、⑥レセプターとの結合性が高く、速やかに血中からクリア（エンドサイトーシス）されるために血中抗原量が低く定量されるということも欠乏症の原因として考えられる。

本稿では、以上述べた血漿タンパク質欠乏症の原因のうち、③の細胞内分解と④の分泌障害（細胞内蓄積）について考える。

2. 糖タンパク質の分泌過程における糖鎖のプロセッシングと品質管理

血漿タンパク質の大多数は糖タンパク質であり、ペプチド鎖の合成途上 (co-translational) や合成後 (post-translational) に種々の修飾を受ける。最も一般的にみられるアスパラギン結合型の複合型糖鎖の生合成は、まずドリコール (Dol) に $\text{Glc}_3 \cdot \text{Man}_9 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{P-P-Dol}$ の形で 14 糖がピロリン酸エステル結合したオリゴ糖コアが、ペプチド鎖の合成途上、粗面小胞体に局在するオリゴ糖転移酵素によってペプチド鎖中の Asn-Xaa-Ser/Thr 配列（ただし、Xaa は Pro 以外のアミノ酸残基）の Asn 残基に転移されて開始される (**Fig. 1**)。小胞体内ではその後、 α -グルコシダーゼ I および II によって非還元末端から順に 3 個のグルコースがすべて除かれ (グルコーストリミング, glucose trimming), さらに α -マンノシダーゼ I によって 1~2 個のマンノースが除かれて (マンノーストリミング, mannose trimming) 高マンノース型となる。ポリペプチド鎖はこの間に適正に folding されてゴルジ体に移行し、さらに糖鎖のプロセッシングを受けていく¹⁾。しかし、何らかの異常によりポリペプチド鎖の folding が不完全なものは、UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase によって再び 1 個のグルコースが付加 (reg-

lucosylation) された後、小胞体膜結合性の分子シャペロンであるカルネキシン (calnexin, 後述) と結合し、適正に folding された後にグルコースが除かれて (deglycosylation), ゴルジ体へと移行する²⁾。cis ゴルジにおいて、さらにマンノシダーゼ I によってマンノースが除かれた後、medial ゴルジにおいて N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼとマンノシダーゼ II によってプロセッシングを受けると、エンドグリコシダーゼ H (endo H) に対して抵抗性となる¹⁾。このエンドグリコシダーゼ H への感受性の差は細胞内におけるタンパク質の局在箇所の推定に有効である。

このような過程を経て分泌される糖タンパク質の小胞体における folding と品質管理について、Helenius らは次のような 4 つの段階から成るモデルを提唱している²⁾³⁾。1) 段階的なグルコースのトリミング (glucose trimming), 2) 分子シャペロン・カルネキシンのモノグルコース糖鎖への結合, 3) 不完全に folding されたグルコース無結合状態の糖ペプチド糖鎖へのグルコースの再付加 (reglucosylation), 4) folded 糖ペプチド鎖のグルコース再付加 - 脱グルコースサイクルからの遊離である (**Fig. 1**)。このような小胞体でのグルコーストリミングおよびマンノーストリミング段階での異常がタンパク質欠乏症の原因の 1 つと考えられているが、このことを明らかにしたい場合、一般的には、各グリコシダーゼの特異的阻害剤 (castanospermine, 1-deoxynojirimycin, 1-deoxymannojirimycin など, **Fig. 1**) を発現細胞の培養液中に共存させ、異常タンパク質の分解が阻止（細胞内に蓄積）されるかどうか調べられている。

Fig. 1 Glucose trimming and reglucosylation model of quality control in the endoplasmic reticulum. (Modified from Hebert, DN et al, Cell 81: 425, 1995)

Symbols; ▲, glucose; ○, mannose; □, N-acetyl glucosamine.

CAS, castanospermine; dNJM, 1-deoxynojirimycin; dMJM, 1-deoxymamojirimycin.

3. ペプチド鎖の折りたたみと分子シャペロンの関与

分泌タンパク質は、ペプチド鎖の合成途上 (co-translation) にシグナルペプチド部分が小胞体の膜を通過して内腔に入る。シグナルペプチダーゼによってシグナルペプチドが切断されたのち、小胞体内においてペプチド鎖の折りたたみ (folding)、糖鎖付加 (前述)、サブユニットの会合および分子内 (または分子間) ジスルフィド結合の形成などが行われるが、これらの際、分子シャペロン (molecular chaperone) と呼ばれる小胞体タンパク質の助けを借りる。分子シャペロンとは、新生タンパク質が無定形なポリペプチド鎖から一定の高次構造を有する機能タンパク質となる上記のプロセスを助け、完成の後に離れていくタンパク質のことである。folding 前の新生ポリペプチド鎖では、本来分子の内部に埋もれて存在するべき疎水性アミノ酸残基の側鎖が表面に露呈された状態にあり、そのままに放置するとその様な領域同士が疎水結合してポリペプチド同士が会合 (aggregate) して

しまう。分子シャペロンはこのような部位に一時的に結合して正常な folding を助ける。分子シャペロンとしては、大腸菌の GroEL や DnaK が広く知られているが、哺乳類小胞体局在の分子シャペロンとして知られているものをいくつか Table 2 に示した。

BiP (GRP 78) は、Hsp 70 群に属する唯一の小胞体内タンパク質で、最初、グルコース飢餓によって誘導されるストレスタンパク質 (Glucose-Regulated Proteins; GRP) の 1 つとして GRP 78 と命名されたが⁴⁾、その後に免疫グロブリン重鎖に結合するタンパク質 (Immunoglobulin Heavy-chain Binding Protein) として BiP と命名されて以後⁵⁾、BiP という呼び名が一般的である。BiP は種々の薬物によって誘導されるが、結果的には、小胞体内に unfolded タンパク質が蓄積されることによって BiP が誘導されてくることから⁶⁾、品質管理機構における BiP は、免疫グロブリンなど特定のタンパク質だけでなく、広く新生タンパク質の折りたたみを助ける分子シャペロンとして機能すると同時に、非会合状態の新生ポリペプチド

Table 2 Some Mammalian Molecular Chaperones and Their Association with Secretory Proteins

Family	Molecular Chaperone	Example of Associated Protein
HSP family	BiP (GRP 78)	Immunoglobulin L-chain, H-chain Protein C
	GRP 94	Immunoglobulin L-chain, H-chain Protein C
Ca-binding protein family	Calnexin (p 88)	Class I major histocompatibility molecules T-cell antigen receptor (TCR) B-cell antigen receptor (membrane Ig) α_1 -Antitrypsin Apolipoprotein B-100 Transferrin C3 component Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Major secretory protein in MDCK* cells (gp 80) Vesicular stomatitis virus G protein
	Calreticulin	Transferrin (nascent)
PDI family	PDI	Procollagen IgM Lysozyme (mutants)

*) MDCK : Madin-Darby canine kidney

の小胞体内分解にも関与していると考えられている⁷⁾。GRP 94 は BiP (GRP 78) と同時に見つけられたグルコース飢餓によって誘導されるストレスタンパク質で⁴⁾、BiP と同じく小胞体内に unfolded タンパク質が蓄積されることによって誘導されてくる。カルネキシン (p 88, 88 kD) は、最初、シグナルシーケンスレセプター (SSR) と会合する Ca^{2+} 結合性の小胞体膜タンパク質として同定されたが⁸⁾、レクチン様の性質を有し、上に述べたように折りたたみ前の糖タンパク質のモノグルコース糖鎖 ($\text{Glc}_1 \cdot \text{Man}_9 \cdot \text{GlcNAc}_2$) を認識して結合する⁹⁾。もう 1 つの Ca^{2+} 結合性分子シャペロンであるカルレティキュリン (calreticulin) は小胞体内腔に存在するタンパク質で、カルネキシンとのホモロジーも高く、シャペロン機能もカルネキシンとの類似性が極めて高いことが、ごく最近明らかにされた¹⁰⁾。PDI (protein disulfide isomerase) や PPI (peptidyl-prolyl isomerase) などの酵素も分子シャペロンとしての機能をもつことが明らかにされている¹¹⁾。PDI は 55 kDa のポリペプチドが二量体として機能する多機能性のタンパク質で、ポリペプチド鎖中 2 個所に

CGHC モチーフが存在する¹²⁾。CXXC モチーフはジスルフィド結合形成反応を触媒する酵素の活性部位と考えられており、この部位の 2 残基のシステインを化学修飾すると disulfide isomerase 活性は失われるが、PDI のペプチド結合能は変わらないこと、さらに、PDI はジスルフィド結合を持たないタンパク質に対してもシャペロン活性を発揮することから、disulfide isomerase 活性とシャペロン活性は独立したものと考えられている¹³⁾。正常な新生タンパク質の folding に機能するこれらの分子シャペロンが、小胞体の品質管理機構という異常タンパク質の分解にも関与するのは非常に興味のあるところであるが、その作用機構はこれからの研究課題である。

分子シャペロンの検出は、一般的には、細胞膜透過性の架橋剤により架橋し、当該異常タンパク質の特異抗体によって分子シャペロンとの複合体を免疫沈降させたのち、架橋剤の S-S 結合を還元することによって、シャペロンを解離させ、SDS-PAGE 後、抗シャペロン抗体で同定するという方法でおこなわれ、架橋剤としてはもっぱら DSP [dithiobis (succinimidyl

propionate)〕が用いられている。

4. 小胞体内タンパク質分解とプロテアーゼ

細胞内のプロテアーゼとしては、リソソームプロテアーゼ（カテプシン類）と細胞質に存在する巨大分子プロテアソームがよく知られているが、小胞体内からもよく知られたシグナルペプチダーゼ以外にこれまでに ER-60 プロテアーゼ（または ER 60）¹⁴⁾ と ER-72 プロテアーゼ（または ER 72）¹⁵⁾ と命名された 2 種類のプロテアーゼが単離されている。いずれも、ウシ血清アルブミン、PDI、カルレティキュリンなどを分解するが、カゼイン分解活性はない。一般的なシステインプロテアーゼ阻害剤である N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal (ALLN)、N-acetyl-Leu-Leu-methioninal (ALLM)、E-64、ロイペプシンなどによって阻害されることからシステインプロテアーゼに属すると考えられているが、構造的には前述の PDI ファミリーに属し、ER-60 プロテアーゼには 2 個所、ER-72 プロテアーゼには 3 個所の CGHC モチーフが存

在する¹⁴⁾¹⁵⁾。

小胞体内におけるタンパク質分解の一部にシステインプロテアーゼが関与していることは、膜透過性の阻害剤を用いた培養細胞系での研究^{16)~19)} からほぼ間違いないが、はたしてこの ER-60 プロテアーゼと ER-72 プロテアーゼが関与しているかどうかは、今後に残された問題である。さらに、小胞体におけるタンパク質分解にセリンプロテアーゼの関与を示唆する報告もされている²⁰⁾。細胞内でのタンパク質分解に関与するプロテアーゼの識別は、通常各種のインヒビターによる分解阻止効果によって行われているが、よく用いられるインヒビター類を **Table 3** に示した。また、プロテアーゼの種類に関係なく、小胞体での分解であることを特定するためには、分泌タンパク質のゴルジ体への移行を阻止する brefeldin A (BFA) がもつぱら用いられている。brefeldin A は 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度でゴルジ体を消失させ、小胞体に吸収させてしまうことにより、プレゴルジ以降のタンパク質移行を阻止する作用を示す²¹⁾。

Table 3 Inhibitors of Intracellular Degradation

Inhibitors	Main Function	Example of Degradation-protected Proteins
Diamide	Thiol oxidizer	HMG-CoA reductase, TCR subunits Protein C (warfarin-treated)
ALLM	Cysteine protease inhibitor	Protein C (warfarin-treated), TCR subunits Lysozyme (mutant)
ALLN	Cysteine protease inhibitor	HMG-CoA reductase, Apoprotein B-100 Protein C (warfarin-treated), Lysozyme (mutant)
TLCK	Serine protease inhibitor	Asialoglycoprotein receptor (ASGR)
TPCK	Serine/Cysteine protease inhibitor	Asialoglycoprotein receptor (ASGR)
Phenanthroline	Metalloprotease inhibitor	Ribophorin I, TCR subunits
Dichloro isocoumarin (DCI)	Serine protease inhibitor	
E-64	Cysteine protease inhibitor	
Cycloheximide	Protein synthesis inhibitor	HMG-CoA reductase, ASGR (second step)
Chloroquine	Lysosomotropic agent	
Ammonium chloride	Lysosomotropic agent	
Leupeptin	Serine/Cysteine protease inhibitor	
Brefeldin A	Membrane transport inhibitor	Protein C (warfarin-treated) in HepG2 cell

Table 4 Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation

Example of Protein Degradation	Cause of Degradation	Associated Molecular Chaperone or Protease
Immunoglobulin L-chain	Unassembled subunit	BiP, Serine protease
T-cell antigen receptor (α , β , γ subunit)	Unassembled subunit	Calnexin
Class I major histocompatibility molecules	Glycosylation defect	TAP*, (Proteasome)
Asialoglycoprotein receptor (ASGR)	Unassembled subunit	Cysteine protease (first step)
(H 2 a, H 2 b subunit)		
α 1-Antitrypsin Z-variant (E 342 K)	Mutation	Calnexin
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)	Mutation	Proteasome
Ribophorin I	Truncated form	Metalloprotease & Cysteine protease
Protein C (Warfarin-treated)	Insufficient Gla formation	Cysteine protease
Protein C Nagoya	Frameshift Mutation	BiP & GRP 94
HMG CoA reductase	Metabolic regulation	Cysteine protease (ER60/ER72?)
Apolipoprotein B-100	Metabolic regulation	Cysteine protease
Lysozyme (mutant)	Mutant	PDI, ER-60 Cysteine protease
Type I-Procollagen α 1-chain	Mutation	BiP

*) TAP : Transporter associated with antigen presentation

したがって、brefeldin A 存在下で分解が影響を受けず、細胞内蓄積が無ければ、分解はプレゴルジ以前で起こっていると考えられる。

5. 新生タンパク質の細胞内分解例

小胞体内品質管理機構によって分解される新生タンパク質は遺伝的変異体だけでなく、正常にオリゴマーを形成できなかった非会合サブユニットも数多く知られている。このような例も含めて新生タンパク質（高次構造未完成なポリペプチド）の小胞体内分解例を **Table 4** に示した。免疫グロブリン²⁰⁾、Asialoglycoprotein receptor (ASGR)²²⁾、T-cell antigen receptor (TCR)²³⁾ などは正常なオリゴマー形成ができなかった非会合サブユニットの代表的分解例である。

おわりに

遺伝性疾患の主要な原因の1つであるタンパク質欠乏症における新生異常タンパク質の細胞内分解について分子シャペロンとプロテアーゼの面から種々述べたが、このような研究はごく最近始められたばかりであり、糖タンパク質におけるグルコーストリミングのモデル以外は分

子シャペロンの役割についてはっきりと述べられたものではなく、個々の事例の集積という現状である。そのレベルにおいても、まだ異常タンパク質を認識する分子シャペロンとそれを分解するプロテアーゼの両方がはっきりと同定された例はない。さらにまた、このような新生タンパク質の細胞内分解はこれまで主として小胞体内プロテアーゼによると考えられてきたが、ごく最近小胞体内における CFTR の分解に細胞質プロテアーゼであるプロテアソームの関与を示唆する報告も出始めており²⁴⁾²⁵⁾、少し混乱状態に入るかも知れないが、発展期にある研究分野にはよく起こる現象であり、今後の展開が注目される。

謝 辞：本ミニシンポジウムの機会を与えていただいた第18回日本血栓止血学会大会会長の岩永貞昭先生に、厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Kornfeld R, Kornfeld S: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann Rev Biochem* **54**: 631-664, 1985.
- 2) Hammond C, Braakman I, Helenius A: Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose

- trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 913-917, 1994.
- 3) Hebert DN, Foellmer B, Helenius A: Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**: 425-433, 1995.
  - 4) Shiu PPC, Pouyssegur J, Pastan I: Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma Virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 3840-3844, 1977.
  - 5) Haas IG, Wabl M: Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* **306**: 387-389, 1983.
  - 6) Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething M-J, Sambrook J: The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **332**: 462-464, 1988.
  - 7) Knittler MR, Dirks S, Haas IG: Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: Quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1764-1768, 1995.
  - 8) Wada I, Rindress D, Cameron PH, Ou W-J, Doherty II JJ, Louvard D, Bell AW, Dignard D, THomas DY, Bergeron JJM: SSRA and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **266**: 19599-19610, 1991.
  - 9) Ware FE, Vassilakos A, Peterson PA, Jackson MR, Lehrman MA, Williams DB: The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man₉ GlcNAc₂ oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem* **270**: 4697-4704, 1995.
  - 10) Wada I, Imai S, Kai M, Sakane F, Kanoh H: Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms. *J Biol Chem* **270**: 20298-20304, 1995.
  - 11) Otsu M, Omura F, Yoshimori T, Kikuchi M: Protein disulfide isomerase associates with misfolded human lysozyme in vivo. *J Biol Chem* **269**: 6874-6877, 1994.
  - 12) Noiva N, Lennarz WJ: Protein Disulfide Isomerase. Multifunctional Protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **267**: 3553-3556, 1992.
  - 13) Cai H, Wang C-C, Tsou C-L: Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J Biol Chem* **269**: 24550-24552, 1994.
  - 14) Urade R, Nasu M, Moriyama T, Wada K, Kito M: Protein degradation by the phosphoinositide-specific phospholipase C- α family from rat liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **267**: 15152-15159, 1992.
  - 15) Urade R, Takenaka Y, Kito M: Protein degradation by ERp72 from rat and mouse liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **268**: 22004-22009, 1993.
  - 16) Wileman T, Kane LP, Terhorst C: Degradation of T-cell receptor chains in the endoplasmic reticulum is inhibited by inhibitors of cysteine proteases. *Cell Regul* **2**: 753-765, 1991.
  - 17) Inoue S, Simoni RD: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and T cell receptor α subunit are differentially degraded in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **267**: 9080-9086, 1992.
  - 18) Tokunaga F, Wakabayashi S, Koide T: Warfarin causes the degradation of protein C precursor in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **34**: 1163-1170, 1995.
  - 19) Otsu M, Urade R, Kito M, Omura F, Kikuchi M: A possible role of ER-60 protease in the degradation of misfolded protein in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **270**: 14958-14961, 1995.
  - 20) Gardner AM, Aviel S, Argon Y: Rapid degradation of an unassembled immunoglobulin light chain is mediated by a serine protease and occurs in a pre-Golgi compartment. *J Biol Chem* **268**: 25940-25947, 1993.
  - 21) Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J, Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure.

- J Cell Biol **116** : 1071-1080, 1992.
- 22) Wilkstrom L, Lodish HF : Unfolded H2b asialoglycoprotein receptor subunit polypeptides are selectively degraded within the endoplasmic reticulum. J Biol Chem **268** : 14412-14416, 1993.
- 23) Kearse KP, Williams DB, Singer A : Persistence of glucose residues on core oligosaccharides prevents association of TCR α and TCR β proteins with calnexin and results specifically in accelerated degradation of nascent TCR α proteins within the endoplasmic reticulum. EMBO J **13** : 3678-3686, 1994.
- 24) Ward CL, Omura S, Kopito RR : Degradation of CFTR by the ubiquitin- proteasome pathway. Cell **83** : 121-127, 1995.
- 25) Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR : Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. Cell **83** : 129-135, 1995.
-