膜機能の異常と動物の疾患

稲葉 睦*・伊東大介・大田 寛

北海道大学大学院 獣医学研究科 臨床分子生物学教室 〒060-0818 北海道札幌市北区北18条西9丁目

Dysfunctions in Membrane Proteins and Inherited Diseases

Mutsumi Inaba*, Daisuke Ito and Hiroshi Ohta

Laboratory of Molecular Medicine, Department of Veterinary Clinical Sciences, Graduate
School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818

Genetic mutations of various membrane proteins cause a variety of inherited diseases. Here we show the recent progress in molecular pathogenesis for several membrane disorders in cattle. The R664X mutation in the *AE1* (anion exchanger 1) gene causes hemolytic anemia associated with dominant hereditary spherocytosis. The R664X *AE1* has a dominant negative effect on expression of wild-type *AE1* through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). The proteasomal degradation of R664X *AE1* is independent of N-glycosylation and occurs without ubiquitination at a demonstrable level. Moreover, proteasome inhibitors do not cause aggresome formation of R664X *AE1* but remarkably increase its retention in the endoplasmic reticulum, suggesting that the proteasome is required for retrotranslocation of mutant *AE1* in addition to degradation of the mutant. These characteristics are totally different from those observed in ERAD for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Recent findings on renal tubular dysplasia due to deficiency of the tight junction protein claudin-16 are also discussed.

Key words : membrane proteins / inherited diseases / *AE1* / ERAD / proteasome / claudin

1. はじめに

生体膜は脂質二重層と膜タンパク質から構成される。その機能は、多様な膜タンパク質の機能と性質に主に依存している。膜タンパク質には、脂質二重層を1回、あるいは複数回貫通する膜内在性タンパク質、糖脂質糖鎖を介して膜外側表面に分布するGPI結合型タンパク質、さらに、何らかのかたちで膜と相互作用する末梢性の膜タンパク質が存在する。過去、細胞の構造と機能に直接寄与するこれら膜タンパク質の遺伝子の変異が様々な疾患の原因となっていることが知られ、逆にそれをとおして膜タンパク質分子の機能が次々に明らかになってきた。Duchenne型筋ジストロフィーの原因となるdystrophinの異常は、古くから知られる球状赤血球症

hereditary spherocytosis (HS) などの研究と相まって、細胞膜を裏打ちする膜骨格の重要性を確立した。欧米人に多い嚢胞性線維症cystic fibrosisが、塩素イオンチャネルであるCFTRであることが明らかになり、そこから構造類似の膜内在性タンパク質群であるABCトランスポーターの研究が進んだ。近年では、水チャネルaquaporinの発見以来、これとは一見無関係な細胞運動や肥満、ガンなどとの関連が指摘されている。

本稿では、多様な分子異常と疾患のうち、アニオン交換輸送体*AE1*の異常による疾患、タイトジャンクションのタンパク質claudinの異常による疾患について、著者らの動物における疾患への取組を中心に概説する。

2. *AE1*の異常とERAD、膜トラフィック

2.1 *AE1*の遺伝子変異と疾患

*AE1*は、赤血球膜総タンパク質量の25%を占める

* Corresponding Author

Tel & Fax : 011-706-5580

e-mail : inazo@vetmed.hokudai.ac.jp

band 3として知られる分子量約100,000の膜内在性タンパク質であり、膜内外で Cl^- と HCO_3^- を交換輸送するとともに、膜骨格タンパク質を脂質二重層につなぎ止めて、膜構造を安定に維持する役割を果たしている。したがって、様々なAE1の遺伝子変異が、HSをともなった溶血性貧血、または尿細管性アシドーシス (dRTA)、あるいはその両者を引き起こす。HSは優性遺伝、またdRTAの多くは劣性遺伝である。

球状赤血球は、容積に比して膜表面積が低下した状態にある。HSにおける赤血球膜の喪失は、AE1含量の低下により膜脂質の安定性が低下するためとされる¹⁾。AE1の異常によるHSのヘテロ接合型患者赤血球 (ヒトではAE1遺伝子異常によるHSのホモ接合型)におけるAE1含量は、遺伝子変異によって異なるが、正常赤血球の50~80%に減少している。したがって、AE1の減少に応じた赤血球膜の喪失が生じ、優性のHSをもたらすと考えられる。しかし、なぜ変異ごとにAE1含量にこれほど差異があるのか? AE1ノックアウトマウスのヘテロ個体におけるAE1含量が正常の80~90%であるから²⁾、その程度は正常アレル由来のAE1で賄えるはずである。なぜ、それ以上の減少が生じ得るのか?

2.2 変異AE1の分解・除去とドミナントネガティブ作用

興味深いことに、これまで、HSの赤血球膜で、遺伝子変異により生じる異常なAE1分子が検出された例はない。即ち、これら異常な分子は、たとえ合成されても、赤血球膜に分布できずに分解・除去されていると考えられる。

牛のAE1変異、band 3^{Bov.Yamagata}は、AE1の664番目のArg残基 (ヒトAE1のArg⁶⁴⁶に相当) におけるナンセンス変異 (R664X変異) により、ヘテロ接合型ではAE1含量が70%に低下、またホモ接合型では完全に欠損して重篤な溶血性貧血を招く³⁾。骨髓の赤芽球系前駆細胞には変異アレル由来のmRNAが十分に存在するが、赤血球では異常分子はやはり全く検出されない。K562、あるいはHEK293にAE1遺伝子を導入すると正常なAE1 (WT) が細胞膜に分布する様子が観察される。一方、R664X AE1は、小胞体 (ER) に一致した分布を示し、細胞膜には認められない (Fig. 1)。また、合成されたR664X AE1はWTに比べて不安定で、プロテアソーム分解系により分解される。WT AE1とR664X AE1の両者を導入した細胞では、両者のオリゴマー形成、WTの分解促進と膜移行の低下が認められる。即ち、R664X AE1は、WTの細胞膜での安定発現に対してドミナントネガティブ

Fig. 1 Expression of WT and R664X AE1 in HEK293 cells. A, HEK293 cells stably expressing EGFP-WT and EGFP-R664X AE1 were reacted with anti-calnexin (Calnexin) followed by detection with a secondary antibody labeled with AlexaFluor 568. Bars = 10 μ m. B, cell-surface proteins in HEK293 cells transiently transfected with WT and R664X were biotinylated and polypeptides in total cell lysate (T) were separated into bound (B) and unbound (U) fractions on NutraAvidin beads followed by detection of AE1 by immunoblotting. C, HEK293 cells stably expressing EGFP-R664X AE1 were incubated with 10 μ M lactacystin for 8 hours and intracellular localization of the mutant was compared to calnexin (upper panel) and Ub (lower panel), indicating colocalization of R664X AE1 with calnexin but not with Ub. Bars = 10 μ m.

に作用し、発現を低下させることがわかる。

他のAE1変異のいくつかでも、これに類似した膜移行の異常やドミナントネガティブ作用がうかがえ

ることから、変異の種類によって程度の差異はあれ、こうしたメカニズムが優性のHSの病態に関わっていると考えられる。

2.3 膜内在性タンパク質のERAD

ERにおいて合成されたタンパク質の構造異常を認識し、プロテアソーム系で分解する、いわば品質管理の働きがERAD (ER-associated degradation) として知られる⁴⁾。可溶性タンパク質のプロテアソームによる分解については詳細な検討が行われてきた。一方、膜内在性タンパク質のERADについては、従来、ほぼCFTRのみを対象としてメカニズムの研究が進められている⁵⁾。その特徴のひとつは、一般的な可溶性タンパク質の分解と同様にユビキチン (Ub) 化を受けた後に細胞質に運ばれてプロテアソームにより分解されること、また分解が抑制された際に、細胞質の中心体領域で aggresome と呼ばれる凝集塊を形成することである^{6,7)}。R664X AE1 の分解が興味深いのは、CFTR と異なり、少なくとも検出可能なレベルで Ub 化が生じず、また aggresome の形成も観られない点である (Ito *et al.*, 投稿中)。プロテアソームのインヒビターを作用させると、R664X AE1 はむしろ ER に著しく蓄積する (Fig. 1) ことから、プロテアソーム自体が R664X を細胞質に引き出すことに関わるか、あるいはプロテアソームによる分解が ER 近傍で生じることが推測できる。

ERAD のもうひとつの一般的な原則は、ER の膜タンパク質である calnexin などによる N 結合型糖鎖構造の認識を受けることである。糖タンパク質である CFTR もこれに該当する。しかし、牛の AE1 は糖鎖を持たない。したがって、R664X AE1 の ERAD は少なくとも N 結合型糖鎖には非依存性であるといえる。糖鎖を持たないタンパク質と calnexin の相互作用の有無と意義にはまだ議論の余地があり^{8,9)}、詳細は不明である。

2.4 AE1 の膜トラフィック

R664X をはじめ、HS や dRTA を生じる AE1 変異に関する報告^{10,11)} からは、AE1 の正常な細胞膜への移行に必要な要素のひとつとして、その C-末端領域が重要なことが示唆される。この領域の様々なアミノ酸置換変異体の HEK293 細胞における発現実験からは、動物種間で保存されている ELXXLDADD と配列が重要なことが考えられる。偶然かもしれないが、aquaporin 1 の C-末端にも同様の配列が存在しており興味深い。また、このなかの LDADD 配列には炭酸脱水酵素が結合することが知られている。しかし、この配列だけで膜移行が規定されないことも事実で

Fig. 2 Claudin-16 deficiency in cattle. A, schematic illustration for the structure and function of the TJ consisting of transmembrane proteins occludin and claudins. B, immunohistochemical detection of claudin-16 at the TJ, indicated by colocalization with occludin, in developing renal tubules of *CLDN16*^{+/+} and *CLDN16*^{-/-} fetuses at 100 days of gestation. The representative tubules in *CLDN16*^{-/-} fetus shows clearly stained occludin at the apicalmost region, suggesting the formation of the TJ structure even in the absence of claudin-16. These tubules were confirmed to be positive for Tamm-Horsfall glycoprotein, a marker for the thick ascending limb of Henle's loop, in the serial frozen sections.

ある。なぜならば、ER に止まり膜移行しない変異体 (例えば K709X や N-末端側細胞質ドメインを欠失する変異体) に C-末端領域を連結しても、それらはやはり膜移行を生じないからである。この ELXXLDADD 配列が、AE1 分子内の他の領域と相互作用することが重要と思われるが解決には至っていない。

3. クローディン-16の欠損と尿細管形成異常

3.1 クローディン遺伝子の異常と疾患

クローディン claudin 分子群は、上皮細胞間のタイトジャンクション (TJ) を構成する主要な膜内在性タンパク質である。現在、20を超える遺伝子ファミリーであり、それぞれが臓器や組織に特異的な分布を示す。その役割は、TJにおける細胞間接着と細胞間の選択的な物質輸送 (傍細胞輸送) のためのバリア機能である^{12, 13)} (Fig. 2)。現在のところ、自然発症の疾患で異常が知られるのは、claudin-14の変異による難聴¹⁴⁾と claudin-16遺伝子の変異によるヒトの家族性低マグネシウム血症高カルシウム尿症 (FHHNC)¹⁵⁾と牛の腎尿細管形成不全¹⁶⁾に留まるが、今後、多くの疾患との関連が見出されることが思われる。

牛の尿細管形成不全は、claudin-16遺伝子の欠失によって生じ、若齢で尿細管の萎縮や低形成、間質性腎炎がみられ、腎不全が進行して多くは死に至る。

3.2 Claudin-16欠損症：尿細管形成不全はなぜ生じるか？

ヒトのFHHNCでは、尿細管における Mg^{2+} と Ca^{2+} の再吸収不全が主たる徴候であり、この病態に基づき、claudin-16は Mg^{2+} と Ca^{2+} を選択的に通すTJを形成することが明らかになった。牛では尿細管の構造異常が顕著である一方、 Mg^{2+} と Ca^{2+} の代謝には大きな異常がみられず、代償作用の存在がうかがえる。牛でもヒトやマウスと同様にclaudin-16は尿細管Henleの太い上行脚 (TAL) 部分に限局して分布する (Ohta *et al.*, 投稿中)。若齢の牛個体で尿細管形成に異常が認められることから、claudin-16が細胞間接着を介して尿細管形成に重要な役割をもつことが期待されたため、claudin-16遺伝子欠損 (*CLDN16*^{-/-}) と判定した受精卵を仮母牛に移植し、胎子期における尿細管形成解析を試みた。しかし、予想に反し、胎齢100, 180, そして出生間近の270日のいずれにおいても、*CLDN16*^{-/-}胎子腎の尿細管構造は正常胎子のそれと同等であり、TALを含め、組織構造形成はほぼ正常であった。ただし、同部位における他のclaudin分子の発現に変化が認められ、claudin-16の欠損と併せ、TJ機能に変化が生じることが想定される (Ohta *et al.*, 投稿中)。したがって、claudin-16が単独で尿細管の分化や形成に必須の機能を持つことは否定的である。尿細管の萎縮等の異常は、出生後、腎臓が実質的に機能を始めた段階で急速に生じるものと思われる。それには、本来、claudin-16が存在す

る領域におけるTJのバリア機能、即ち選択的な傍細胞輸送の異常が関わるものと推測される。

Claudin-14の変異による難聴では、TJにおける Na^{+} 透過を阻むclaudin-14の機能の異常によって、コルチ器官の細胞が膜電位を保てなくなり崩壊するとされる。Claudin-16欠損症でも、同様のメカニズムでTAL領域の上皮細胞が崩壊し、その影響が他の尿細管領域にも波及することが考えられる。

3.3 TJにおけるclaudinの機能：接着か、透過か？

隣り合う細胞間のTJで、claudin分子同士がどのように相互作用して、細胞間を接着し、あるいは物質透過の孔を形成しているのかはまだ不明である。上記のように、claudin-16やclaudin-14の異常の場合、疾患発症の糸口は、それらの分子の物質透過に関わる機能の異常にあり、接着における単独での役割は少ないように思われる。おそらくは、他のclaudin分子が共存する組織であるために、細胞間接着は他の分子が代償しているのであろう。一方、claudin-11のノックアウトマウスは、中枢神経ミエリンのTJ構造を完全に失い、神経症状を呈する¹⁷⁾。単独のclaudinで構成されるTJにおいては、その発現は必須のもので、occludinなど他のTJ構成タンパク質では補えないのであろう。

4. まとめ

変異膜タンパク質に関する若干の知見を述べた。タンパク質のフォールディングや分解、細胞内輸送のメカニズムは、現在の生体膜研究のなかでも大きな割合を占めているが、膜内在性タンパク質については端緒に着いたばかりといえる。当たり前のことだが、生体膜分子の動きや変化を確かに捕まえることがますます重要となる。

ヒトや動物のゲノム解析が進み、様々なゲノムマーカーが利用できる現在では、特定の単一遺伝子の異常に起因する疾患について原因遺伝子異常を同定すること自体は時間と労力を要するものの比較的容易である。本質的に重要なのは、その原因遺伝子の異常から、生体膜分子の機能や他の分子との相互作用、それらの細胞・生体活動への寄与を明らかにすることであろう。この意味で、ヒト、動物を問わず、疾患の病態に関する基礎知見は、現在も、そして今後も、膜タンパク質機能の解明に、さらには疾患の予防や治療にも、重要な役割を果たすはずである。

文 献

- 1) Tse WT, Lux SE : Hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. In *The metabolic & molecular bases of inherited disease*, 8th ed. (ed. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D), pp. 4665-4727, New York, McGraw-Hill (2001)
- 2) Peters LL, Shivdasani RA, Liu S-C, Hanspal M, John KM, Gonzalez JM, Brugnara C, Gwynn B, Mohandas N, Alper SL, Orkin SH, Lux SE : *Cell*, **86**, 917-927 (1996)
- 3) Inaba M, Yawata A, Koshino I, Sato K, Takeuchi M, Takakuwa Y, Manno S, Yawata Y, Kanzaki A, Sakai J, Ban A, Ono K, Maede Y : *J. Clin. Invest.*, **97**, 1804-1817 (1996)
- 4) Ellgaard L, Helenius A : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 181-191 (2003)
- 5) Ward CW, Omura S, Kopito RR : *Cell*, **83**, 121-127 (1995)
- 6) Johnston JA, Ward CL, Kopito RR : *J. Cell Biol.*, **143**, 1883-1898 (1998)
- 7) Gelman MS, Kannegaard ES, Kopito RR : *J. Biol. Chem.*, **277**, 11709-11714 (2002)
- 8) Danilczyk UG, Williams DB : *J. Biol. Chem.*, **276**, 25532-25540 (2001)
- 9) Farinha CM, Amaral MD : *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 5242-5252 (2005)
- 10) Toye AM, Bruce LJ, Unwin RJ, Wrong O, Tanner MJA : *Blood*, **99**, 342-347 (2002)
- 11) Toye AM, Banting G, Tanner MJA : *J. Cell Sci.*, **117**, 1399-1410 (2003)
- 12) Tsukita S, Furuse M, Itoh M : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 285-293 (2001)
- 13) Van Itallie CM, Anderson JM : *Physiology*, **19**, 331-338 (2004)
- 14) Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB : *Cell*, **104**, 165-172 (2001)
- 15) Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP : *Science*, **285**, 103-106 (1999)
- 16) Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Sasaki Y, Takami M, Shinkai Y, Kunieda T : *Genomics*, **68**, 229-236 (2000)
- 17) Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA : *Cell*, **99**, 649-659 (2004)

(Received 25 September 2005 ;

Accepted 27 September 2005)

著者略歴

稲葉 睦 (いなば むつみ)

1982年3月 北海道大学獣医学部
卒業1984年3月 北海道大学大学院獣医学
学研究科修士課程修了

1985年10月 同博士課程中途退学

1985年11月 北海道大学獣医学部 助手

1988年11月 同講師

1990年4月～1991年3月 Rush Presbyterian St. Luke's
Medical Center (シカゴ) 留学

1994年4月 東京大学農学部 助教授

1997年4月 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授

2002年9月 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

現在に至る

伊東 大介 (いとう だいすけ)

2002年3月 北海道大学獣医学部卒
業2002年4月 北海道大学大学院獣医学
学研究科博士課程入学2003年4月 日本学術振興会特別研
究員

現在に至る

大田 寛 (おおた ひろし)

2002年3月 麻布大学獣医学部卒業

2002年4月 北海道大学大学院獣医学
学研究科博士課程入学

現在に至る