

研 究 報 告 書

「オルガネラの pH によるタンパク質輸送の制御」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研究者：前田 裕輔

1. 研究のねらい

細胞は、生命の営みのために、細胞増殖・分化、エネルギー代謝、細胞成分の生合成・輸送、シグナル応答・伝達など数多くの複雑な反応を非常に巧妙に調節している。それらは時間的、空間的な調節機構を使うことによって効率的に達成されている。細胞のコンパートメント化、即ち細胞内小器官(オルガネラ)はそういった巧妙な空間的調節機構の一つであり、それぞれの機能・役割にとって最適な環境やタンパク質・脂質成分を保持している。その環境を規定する重要な因子の一つはpHである。細胞質が細胞内ホメオスターシスを維持する為に、代謝活動によって生産される酸(プロトン)を、 Na^+/H^+ 交換輸送系や $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送系によって、そのpHを中性付近に保っているという事はよく知られている。それに対して、分泌経路、エンドサイトーシス経路に位置するオルガネラであるゴルジ装置、分泌顆粒、エンドソーム、リソソームなどが各々固有の酸性pH、大雑把に言ってタンパク質の流れに沿ってより酸性になるpH勾配を維持しているという事実は意外と知られていない。しかしながら、この酸性pHの重要性は、酸性化阻害剤を用いた実験や、pH調節の破綻から生じる疾患の存在から明らかである。すなわち酸性化の阻害剤は細胞レベルでタンパク質輸送遅滞や糖鎖修飾不全を引き起こすし、酸性pHの調節・維持異常に起因するかまたはそれを伴う疾患として大理石病、デント病、遠位尿細管アシドーシス、皮膚弛緩症、XMEA(遺伝性ミオパシーの一つ)などが近年報告された。また癌細胞においてはしばしばゴルジ装置～エンドソーム系のpH上昇が起こっており、抗癌剤に対する感受性に関与することが報告されている。

このように個体・細胞にとって酸性 pH の調節が重要なホメオスターシスの一つ(酸性 pH ホメオスターシス)であると認識されつつあるが、その基本的機序に対する理解、即ち、どうやってその酸性 pH(勾配)が調節されているのか、なぜ酸性 pH の維持異常で様々な異常表現型が顕われ疾患の発症に結びつくのかという疑問に対する理解は依然として全く不十分である。

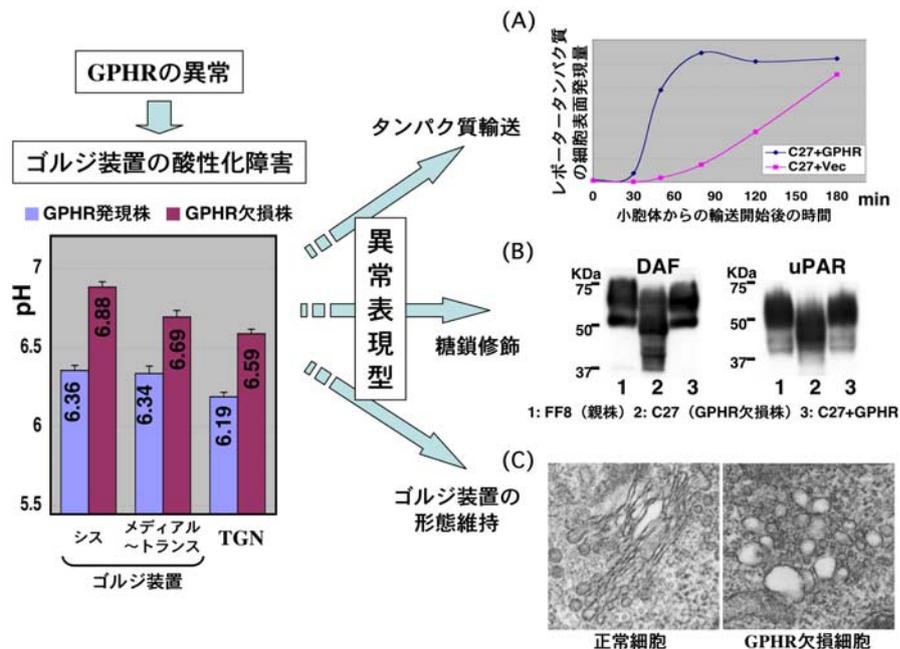
この研究課題を始めるにあたって、私はそれらの疑問に答えを与えてくれるかもしれない変異細胞を得ることが出来たので、変異細胞の解析を通じてゴルジ装置で酸性 pH が維持されているメカニズムの解明を、次いで、pH 調節・維持の異常が及ぼす影響を細胞や個体レベルで調べることでその機序や生理的重要性を解明していくことを試みた。

2. 研究成果

2-1 ゴルジ装置の pH 調節機構の解明

タンパク質の輸送を制御する因子の網羅的同定という研究の過程で非常に強い輸送遅滞を示すハムスターCHO細胞由来の変異細胞株を樹立することができた。このタンパク質の輸送アッセイ法は私が独自に開発したものであるが、輸送をモニターするためのレポータータンパク質(温度感受性vesicular stomatitis virus G protein (VSVGts)、FLAGタグと蛍光タンパク質(EGFP)の融合タンパク質)を用い、その細胞内の総発現量をEGFPの蛍光強度で、細胞表面の発現量を抗FLAG抗体染色することでセルソーターにより定量的に解析できる。変異細胞の原因遺伝子を同定するために、今度はタンパク質輸送が回復するという事を指標に、cDNAライブラリーを使った発現クローニングを行なった。その結果、新規膜タンパク質をコードする遺伝子を同定した。このタンパク質の役割を理解するために引き続き変異細胞の解析を行なった。変異細胞のいくつかの細胞膜タンパク質をSDS-PAGEで解析すると意外にもすべて分子量が減少していることが観察され、糖鎖修飾に異常があることが判明した。しかもこの糖鎖修飾異常は、タンパク質のN型、O型糖鎖と糖脂質の全てにわたって、しかもシアル酸

やガラクトースなどの複数の糖転移にまたがって見られ、単一の糖転移酵素の異常では説明ができないことが判った。この広範囲にわたる糖鎖修飾異常は糖転移酵素というよりはその場であるゴルジ装置の異常を強く示唆していた。このことは、電顕像でゴルジ装置の著しい変形(小胞・空胞化)が観察されたことから支持された。これらの異常表現型はそのプライマリーの異常がゴルジ装置の酸性化障害にあるのではないかと疑わせた。上述したように、分泌経路・エンドサイトーシス経路に位置するオルガネラは酸性化しているが、その酸性化を非特異的に阻害するような薬剤(モネンシン、バフィロマイシン、塩化アンモニウムなど)を投与すると同様な表現型が顕わることが報告されていたからである。そこでゴルジ装置のpHを直接測定することにした。pHに感受性のある蛍光タンパク質pHluorinはpH依存的に励起一発光スペクトラム特性が変化する。このpHluorinにゴルジ装置局在シグナルを付加して発現させ共焦点レーザー顕微鏡でpHを測定したところ、予想通りゴルジ装置のpHが正常細胞より0.3~0.5程度上昇していることが確認できた。原因タンパク質がゴルジ装置のpHを調節していることが判ったのでGPHR(Golgi pH Regulator)と命名した。他の酸性オルガネラであるエンドソーム・リソソームの酸性化には異常は認めなかったため、酸性化阻害剤と異なって初めてゴルジ装置特異的な障害だと言える。これは、GPHRの発現がゴルジ装置に局限しているという結果から説明された。

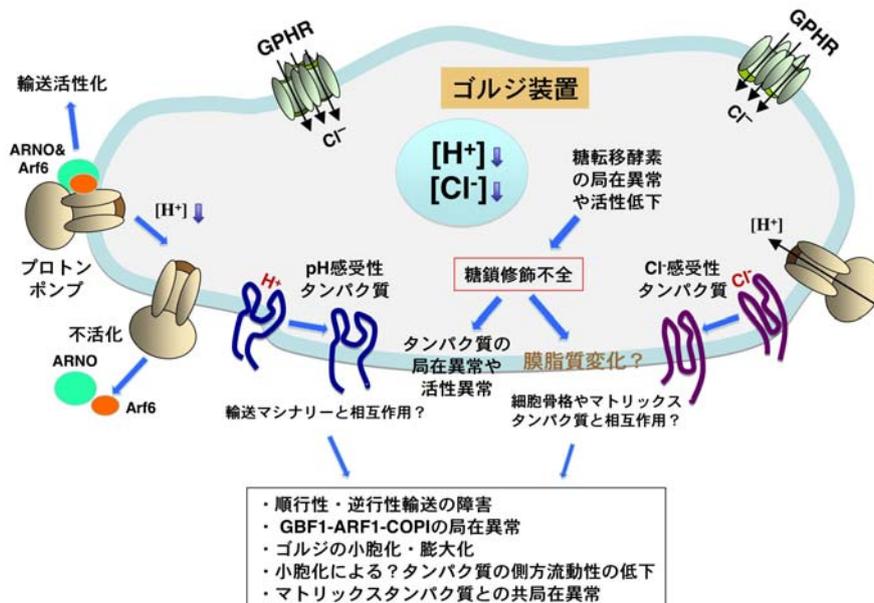


次に、GPHRの欠損でゴルジ装置のpHが上昇する機序、言い換えるとGPHRの機能を検討した。電気生理学的な解析から、酸性オルガネラのpHはプロトンポンプ、カウンターイオンチャンネル、プロトンリークの三者のバランスで維持されていると考えられている。プロトンポンプによる内腔へのプロトンの搬入は膜電位を形成し、更なるプロトンの搬入にとって負荷になる。カウンターイオンチャンネルは、陰イオン(クロライドイオン)を流入させるか陽イオン(ナトリウムイオン)を流出させることによってその膜電位を打ち消し、プロトンポンプが効率よくさらなるプロトンを搬入させることを可能にすると考えられている。変異細胞ではGPHRが発現していないこと、即ちloss of functionでpHが上昇すること、GPHRの構造が8回以上の膜貫通部分を持つことから、GPHRはカウンターイオンチャンネルであると考えた。パッチクランプ法を用いるために、細胞表面へ強制発現を試みたがほとんど発現を認めず、その方法は使えなかったため、人工脂質膜に高度に精製したGPHRを組み込んでイオンチャンネルの活性を測定するplanar lipid bilayer systemという方法を用いた。その結果、GPHRは確かに陰イオンチャンネルの活性を有することが判明した。これらの結果は、①ゴルジ装置における初めての力

ウンターイオンチャンネルの存在、②その障害によってゴルジ装置の pH が上昇することからカウターイオンチャンネルが pH の調節に必須であること、③ゴルジ装置の pH 上昇が、輸送障害・糖鎖障害を起こすのに十分であることを明確に証明した。

2-2 ゴルジ装置の酸性 pH によるタンパク質輸送の制御機構の解明

上述したように変異細胞の解析からゴルジ装置の酸性 pH は正常なタンパク質輸送(小胞輸送)にとって不可欠である。小胞輸送は多くの細胞質タンパク質によって調節されているので、どのようにゴルジ装置の内腔側で起こる pH の変化が感知され、内腔側から細胞質側に伝わっていき、小胞輸送マシナリーを制御するのか、というとても興味深い問題に遭遇する。当然、ゴルジ装置内腔側の pH を感受して細胞質側に情報を伝える分子、すなわち pH センサーが存在するということが予想され、当研究課題において pH センサーの同定に精力を注いだがかおよばず同定できなかった。しかしながら、タンパク質輸送障害に関する幾つかの知見を得ることができた。一つ目は、GPHR 欠損細胞では、上記の輸送アッセイ法で検出された順行方向の輸送障害に加え、ゴルジ装置から小胞体への逆行輸送が障害されているということである。これは、Brefeldi A を添加した時の逆行輸送を見ることで検証された。もともと順行輸送(小胞体からゴルジ装置)の輸送が障害されており、その二次的な現象である可能性も否定できないが、逆行輸送を司る COPI 小胞のゴルジ装置からの形成を制御する GBF1 (ARF1 のグアニンヌクレオチド交換因子)、ARF1 (低分子量 GTPase)、beta-COP のゴルジ装置への局在が減少し、より末梢側に分布している現象を見いだした。現在のところ、その機序は不明であるが、3者とも細胞質タンパク質であるのでこれらを pH 依存的にゴルジ膜へリクルートしているタンパク質が pH センサーとして機能している可能性も考えられ、非常に興味深い。二つ目は、GPHR 欠損細胞では、ゴルジ装置に局在するタンパク質の側方流動性が著しく悪くなっていることである。電顕でゴルジ装置の著しい小胞化が見られゴルジ装置そのものが細かく分断化されているためかも知れない。また、ゴルジ装置マトリックスタンパク質のノックダウンで同様にゴルジ装置に局在するタンパク質の側方流動性が悪くなることが最近報告されたが、この細胞では、ゴルジ装置膜タンパク質とマトリックスタンパク質の共局在が損なわれていることが判明した。今後、pH センサーの同定を含め輸送障害のメカニズムのより詳細な解析を続行していく予定である。



2-3 細胞・個体におけるゴルジ装置の酸性 pH の生理的役割の解明

ゴルジ装置の pH ホメオスタシスの生理的役割を理解するために2つの手段を用いた。一つは、マイクロアレイを用いた転写レベルのゲノムワイドなスクリーニングである。もう一つは、

GPHR ノックアウトマウスの作出である。

ゴルジ装置の酸性化障害の影響を網羅的に解析するためには、ハムスター由来の細胞は、遺伝子データベースが無いため適当ではない。そこで GPHR^{-/-}のマウス胎児線維芽細胞(MEF)を作成し、そのMEFがCHO由来の変異細胞と同様の異常表現型を示すことを確認したうえで、マイクロアレイを用いて転写産物解析を行なった。その結果、コレステロールの生合成に関与する遺伝子群の転写レベルが低下していることが判明した。実際、細胞内コレステロール量を測定すると有意に低下していた。SREBP2 という転写因子が多くのコレステロール生合成関連遺伝子の転写を制御しコレステロール生合成を調節していることはよく知られている。SREBP2 の活性化には、小胞体からゴルジ装置への輸送ならびにゴルジ装置で S1P、S2P という2つのプロテアーゼによるプロセッシングを必要としており、GPHR 欠損による輸送障害やゴルジ装置の機能障害で SREBP2 の活性化障害が起こっているという仮説を検証した。その結果、1)少なくともレポーターアッセイからは、通常培養時の SREBP2 活性の有意な低下を認めなかった、2)コレステロールの生合成の調節に多面的に関与していることが最近提唱されている Akt キナーゼの活性化レベルは低下していた、3)GPHR 欠損 MEF では、小胞体分画でのコレステロール量は正常であるが細胞膜分画のコレステロール量は低下しており、コレステロールの輸送・分布障害が示唆された、4)小胞輸送障害がコレステロール輸送・分布に関与しているかどうかを調べるために、小胞体からの COPII 小胞形成に必須の低分子量 GTPase の Sar1 変異体を用いた。小胞輸送を抑制する Sar1-H79G 変異タンパク質を発現する MEF 細胞でコレステロール量を測定したところ、有意な低下を認めたことから小胞輸送がコレステロール輸送・分布に関与していることが示唆された。現在、GPHR 欠損細胞では、コレステロールの分布異常が主要な原因ではないかと考え、その正当性・機序を解析中である。

ノックアウトマウスは、タンパク質の個体における役割を見ることにおいては非常に優れた方法である。GPHRの全身でのノックアウトでは胎生致死となった。そこで、その致死性を回避するためにコンディショナルノックアウトマウスが必要となり、そのためのGPHR^{lox}マウスを作成した。現在、Lck-Creマウス、K5(ケラチン5)-Creマウス、LysM-Creマウスなどとの交配により、コンディショナルノックアウトマウスを作成し、そのフェノタイプの解析を行っている。中でも、K5-Creマウスとの交配により作出されたマウスは、基底細胞の機能異常から生じる毛根機能の低下、皮膚バリアー機能の低下を示し、その結果、角質層などの肥厚と強い落屑を伴う魚鱗癬様症状を呈した。その分子メカニズムについては現在解析中である。このようにコンディショナルノックアウトマウスはゴルジ装置のpHホメオスタシスの生理的役割の解明と同時に疾患モデルマウスの作出としても有用であると思われる。

3. 今後の展開

酸性オルガネラの pH ホメオスタシスに関しては、まだまだ研究の進んでいない領域であり、解明していかなければならないことが山積している。その制御機構という面からは、特にゴルジ装置の内腔側で起こる pH の変化がどうやって感知され内腔側から細胞質側に伝わっていくのか、その細胞質側のターゲットは何かということについて解明されなければならない。このためには pH の変化から発信するシグナル伝達の最上流部分即ち、pH センサー付近の分子の同定が必須であり、現在精力的に行っているところである。また生理的機能という面からは、この pH ホメオスタシスとクロストークする他のシグナル伝達やホメオスタシスの同定が重要である。これは、pH ホメオスタシスの生理的役割を考える上で必須であり、また同時に酸性オルガネラの機能を知る上でも重要である。これには、トランスクリプトームやメタボロームなどの網羅的解析を今後も継続して行い解析していく予定である。すでに情報の得られている部分(たとえばコレステロール生合成異常など)に関しては、そのメカニズムの解析をなるべく早く終了できるように努力する。またコンディショナルノックアウトマウスについても迅速に解析を進め個体での役割を解明していく予定である。最後に、他の酸性オルガネラ(たとえばリソソーム)についても研究をすすめ、何故オルガネラ間で pH 勾配が必要なのかということや疾患との関連についての研究も推進していくことで、酸性オルガネラの pH ホメオスタシス

スの機能・役割を包括的に理解することができると考えており、当研究課題を基に更に発展させていくつもりである。

4. 自己評価

当研究課題の採択時にその目標として、1)ゴルジ装置の pH 調節機構の解明、2)このオルガネラ pH の異常細胞と正常細胞を比較することによりその局在・発現量・修飾が変化しているタンパク質を、既知のタンパク質のスクリーニングやプロテオミックスの手法によりシステムティックに同定する、3)それらのタンパク質の pH センシング機構や分泌経路オルガネラ(特にゴルジ体)の酸性 pH によるタンパク質輸送の制御機構を解明する、という3点を提案した。ゴルジ装置の pH 調節機構に関しては、ゴルジ装置でこれまで未発見であった新しいカウンターイオンチャンネル GPHR が同定でき、カウンターイオンチャンネルが確かに pH の酸性化に寄与しているということを明確に示すことができた。これは、これまでカウンターイオンチャンネルの意義についての様々な議論に一定の決着を持つことができたという意味で非常に重要である。2)に関しては、マイクロアレイを用いたゲノムワイドな解析によりコレステロールの生合成異常や免疫系遺伝子群の転写量異常を見出すことができ、コレステロール生合成異常についてはそのメカニズムを検討しそのモデルを提唱することができた。今後の研究の足掛かりとして十分な成果が得られたと考えている。3)に関しては pH センサーの同定までは至らなかったが酸性 pH によるタンパク質輸送の制御機構のメカニズムに関して、全体像と幾つかの興味深い観察を得ることができた。まだ十分に検討しきれない部分もあるがおおむね予定通りの成果が出せたと考えている。

さらに最初の提案ではなされていなかったが、GPHR のコンディショナルノックアウトマウスを作製したことで pH ホメオスタシスの個体での役割を検討できるようになった。GPHR 欠損細胞も含めて今後、これらを利用して、疾患との関連についても念頭に置きながら研究をより推進していくことが可能となったことは重要な成果であった。

5. 研究総括の見解

CHO 細胞から蛋白質輸送遅滞変異株を分離することから研究をスタートさせ、ゴルジ体の pH を調節する Golgi pH regulator (GPHR)を発見し、これがカウンターイオンチャンネルとしてゴルジ内腔の pH を低下させていること、更に GPHR の遺伝子破壊細胞において、糖鎖修飾、ゴルジ体の形態、コレステロール代謝が異常となることなど、オリジナリティーの高い優れた研究成果を挙げた。GPHR のノックアウトマウスも作成されており、今後、疾患との関連についても研究することが計画されており、更なる発展が期待できる。今後の研究の中で、コレステロールをはじめとする代謝物に関する研究を、メタボローム解析を含めて展開することも期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. <u>Maeda Y</u> , Ide T, Koike M, Uchiyama Y, Kinoshita T: GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. <i>Nat. Cell Biol.</i> 10(10): 1135-45, 2008.
2. Fujita M, <u>Maeda Y</u> , Ra M, Yamaguchi Y, Taguchi R, Kinoshita T: GPI-glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi. <i>Cell</i> 139(2): 352-365, 2009.

(2)特許出願
なし

(3)その他
招待講演

1. 前田 裕輔: 新規イオンチャネルGPHRによるゴルジ装置の酸性化は正常な糖鎖修飾に必要である 第 6 回糖鎖科学コンソーシアム(JCGG)シンポジウム 東京 2008.12.3
2. Maeda Y, Ide T, Koike M, Uchiyama Y, Kinoshita T: Acidification of Golgi apparatus is regulated by GPHR, a novel anion channel, and critical for glycosylation. BMB2008 シンポジウム「糖鎖による生体膜近傍の細胞機能制御機構」神戸 2008.12.10
3. 前田 裕輔、井出 徹、小池 正人、内山 安男、木下 タロウ: GPHRはゴルジ装置の酸性化・機能にとって重要な新規アニオンチャネルである 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム「細胞内輸送と代謝」岡山 2009.3.28
4. Maeda Y, Ide T, Koike M, Uchiyama Y, Kinoshita T: GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. 第83回日本薬理学会年会 シンポジウム「疾患と創薬の標的としての細胞内小器官イオン動態」大阪 2010.3.18

受賞

1. 平成22年度文部科学大臣表彰 科学技術賞 「蛋白質の糖脂質修飾に働く遺伝子群の解明とその医学応用研究」(2010年4月5日)

著作物

1. 前田 裕輔 「酸性オルガネラのpHホメオスタシス」“蛋白質 核酸 酵素” 54(9): 1141-9、2009.
2. 前田 裕輔 「ゴルジ装置の酸性化とその機能に必須である新規イオンチャネルGPHRの同定」“実験医学” 27(3):419-23、2009.
3. Maeda Y and Kinoshita T: The Acidic Environment of the Golgi Is Critical for Glycosylation and Transport. In Minoru Fukuda, editor: *Methods in Enzymology*, Vol. 480, Burlington: Academic Press, pp. 495-510, 2010.