

2014年度個人特別研究費A 研究成果概要

所属・職・氏名：理工学部 生命医化学科・准教授・沖米田 司

研究課題：脱ユビキチン化による膜タンパク質トラフィック制御の解明

研究期間：2014年4月1日～2015年3月31日

研究成果概要

ABC トランスポーター CFTR は肺や消化器などの上皮細胞の管腔側アピカル形質膜に発現する膜タンパク質であり、cAMP 依存性塩素チャンネルとして機能する。CFTR は感染防御因子として非常に重要な機能を果たすが、遺伝子変異や環境ストレスにより CFTR の発現・機能が阻害されると、慢性感染症を引き起こし、嚢胞性線維症 (CF)の原因となる。CF は白色人種間で頻度が高い致死性の遺伝病であり、根本的な治療法はなく致死性であるため、新規治療法の開発が世界中で強く望まれている。CF の主な原因は $\Delta F508$ 変異であり、 $\Delta F508$ -CFTR タンパク質はフォールディング異常を起こし、細胞内品質管理 (QC) により分解シグナルであるユビキチン化され、分解除去されるため、形質膜に発現できず CF を引き起こす。また、 $\Delta F508$ -CFTR は一部、形質膜へ発現し機能するが、形質膜での安定性が悪く、すぐに分解除去されてしまう (Sharma M et al, J Cell Biol. 2004)。従って、小胞体および形質膜に存在する $\Delta F508$ -CFTR の安定性を増加させる事により、その形質膜発現および機能を改善する事が、CF の新規治療戦略に重要であると考えられる。

申請者はこれまでに形質膜に局在する異常膜タンパク質を除去する形質膜タンパク質品質管理 (peripheral QC) の分子機構を世界で初めて明らかにし、形質膜の $\Delta F508$ -CFTR は分子シャペロン Hsc70 および Hsp90 に認識され、シャペロン結合ユビキチンリガーゼ CHIP によりユビキチン化される結果、形質膜から速やかに分解除去される事を明らかにした (Okiyoned T et al, Science. 2010, Okiyoned T et al, Curr Opin Cell Biol. 2011)。しかしながら、CHIP ノックダウン条件においても CFTR の形質膜からの分解を完全に阻害できない事 (Okiyoned T et al, Science. 2010) から、CHIP を含めた複数のユビキチン化酵素が形質膜に存在する CFTR のユビキチン化に関与する可能性が考えられた。さらに、タンパク質のユビキチン化レベルはユビキチン化酵素だけではなく、ユビキチンを基質タンパク質から取り除く脱ユビキチン化酵素 (deubiquitinating enzyme: DUB) によっても制御されるが、現在まで形質膜の CFTR のユビキチン化を制御する DUB 分子は同定されていない。

本研究では形質膜の $\Delta F508$ -CFTR をモデル基質タンパク質として、形質膜タンパク質品質管理 (peripheral QC) に関わる DUB 分子の同定とその分子機構の解明を行うことで、様々な病態に関わる peripheral QC の分子機構の解明を目指した。

CFTR の形質膜発現量を簡便に定量するために、CFTR の細胞外ドメインに HA tag を導入した

CFTR-HA を構築し, tetracycline 誘導性ヒト CF 患者気道上皮細胞由来 CFBE 細胞を樹立した. 96 ウェルプレートでの HA 抗体を用いた ELISA 法により CFTR 膜発現の定量法を行ったが, エッジ効果などにより, データのばらつきに大きな問題が生じた. そこで, 無標識で細胞表面の CFTR 発現を直接定量化するために, 細胞外領域に Horse Radish Peroxidase (HRP) tag を融合した CFTR-HRP を構築し, 安定発現する tetracycline 誘導性ヒト CF 患者気道上皮細胞由来 CFBE 細胞を樹立した. HRP tag は HA tag と比較して, 分子量が 34 kDa と非常に大きいため, CFTR の形質膜発現, 膜安定性, チャネル機能などのフェノタイプに影響する可能性が懸念された. そこで, HRP tag の影響を検討するために, ELISA 法, および, CFTR 機能解析実験を行った結果, HRP tag は CFTR のフェノタイプに影響しないことが確認された. 次に, $\Delta F508$ -CFTR-HRP 発現 CFBE 細胞を用いた 96 穴プレートでの評価を行った. 細胞外の HRP 活性を指標に CFTR 膜発現を評価した結果, $\Delta F508$ -CFTR の膜発現を改善する化合物の効果を再現良く確認できた. また, ハイスループット評価系の指標となる Z' -factor も 0.6 以上であり, ハイスループットアッセイに適した評価系が確立できた.

次に, $\Delta F508$ -CFTR の形質膜発現を制御する DUB を同定するために, 市販の DUB 阻害薬ライブラリーを用いて, $\Delta F508$ -CFTR の形質膜発現を指標にスクリーニングを行った. その結果, proteasome 結合型 DUB である UCH-L5 および USP14 の阻害薬は, $\Delta F508$ CFTR 変異体の形質膜発現を増加させた. ELISA 法による $\Delta F508$ -CFTR 形質膜安定性を評価した結果, UCH-L5 および USP14 の阻害薬は $\Delta F508$ -CFTR 形質膜安定性を増加させた. さらに, UCH-L5 および USP14 の DUB 阻害は $\Delta F508$ CFTR 変異体のエンドサイトーシスを阻害した. 同様に, 免疫蛍光染色法を用いて, 形質膜からエンドサイトーシスされた $\Delta F508$ CFTR 変異体を共焦点レーザー顕微鏡で可視化した結果, UCH-L5 および USP14 の阻害薬は $\Delta F508$ CFTR 変異体を形質膜へ蓄積させた. 以上の結果より, proteasome 結合型 DUB である UCH-L5 および USP14 は恐らく脱ユビキチン化能を介して, 構造異常膜タンパク質である $\Delta F508$ CFTR のエンドサイトーシス, および, その形質膜安定性と膜発現量を制御するという新しい分子機構の可能性が示唆された.