

## 2016年度 個人特別研究費 研究成果報告書

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：閉塞性肺疾患原因膜タンパク質の選択的エンドサイトーシス機構の解明

研究期間：2016年4月1日～2017年3月31日

研究成果概要 (2,000字程度)

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) や生活習慣病の慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の原因となる。CF は全世界に 7 万人の患者が存在し、患者の寿命中央値は 39 歳である。また、COPD は全世界で 8000 万人の患者が存在し、対症療法が行われるが、毎年 300 万人の患者が死亡している。COPD は今後 10 年間で 30% 増加することが予測されており、今後さらなる社会問題に発展すると考えられる。現在、これらの難治性閉塞性肺疾患の有効な根治療法は確立されていないため、新規治療薬の開発が急務である。

CF や COPD 病態における CFTR 膜発現異常の原因は、CFTR エンドサイトーシスの亢進である。形質膜の CFTR は、遺伝子変異 (CF) やタバコ煙 (COPD) により、タンパク質の構造変化を引き起こし、その結果、エンドサイトーシスされる。細胞内に取込まれた CFTR はリソソームで分解されるため、形質膜 CFTR の発現減少が起こり、CF や COPD 病態を引き起こす。我々の予備実験の結果、非特異的エンドサイトーシス阻害剤処理により、形質膜の CFTR 変異体の発現および機能が增加することを見いだした。従って、CFTR 選択的なエンドサイトーシス阻害は、CFTR の膜発現・機能を改善し、CF や COPD などの難治性閉塞性肺疾患の根治療法になる可能性がある。病態時における CFTR エンドサイトーシスのシグナルとして、ユビキチン化が報告されているが、ユビキチン化された CFTR エンドサイトーシス機構は不明である。そこで本研究では、形質膜やエンドサイトーシス小胞において、病態時に見られるユビキチン化 CFTR に選択的に結合するタンパク質を網羅的に解析し、CF や COPD 病態における CFTR 選択的エンドサイトーシス機構の解明を目的に、実験手法の確立を行った。

形質膜に存在する CFTR を選択的に標識するために、野生型 CFTR および CF 患者で最も頻度が高くユビキチン化を受ける  $\Delta F508$  CFTR の細胞外領域に Halo tag を導入した発現コンストラクト (Halo-CFTR, Halo- $\Delta F508$  CFTR) を作製し、BHK 細胞に安定高発現させた。ウエスタンブロット法の結果、先行研究での CFTR 発現と同様に Halo-CFTR は未成熟型および成熟型の 2 本のバンドが検出され、Halo- $\Delta F508$  CFTR は、未成熟型の 1 本のバンドが検出された。また、低温処理 (26° C) および CFTR corrector VX-809 処理により、Halo- $\Delta F508$  CFTR は未成熟型お

よび成熟型の2本のバンドが検出された。CHX chase 実験の結果、Halo-CFTR は、低温処理 (26° C) または CFTR corrector VX-809 処理された Halo-ΔF508 CFTR よりも安定であり、先行研究の知見と一致した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡による Halo-CFTR 細胞内局在解析の結果、Halo-CFTR は生理的溫度において形質膜に発現し、Halo-ligand により形質膜の Halo-CFTR の選択的ビオチン化に成功した。一方、Halo-ΔF508 CFTR は 37° C 培養において、形質膜に局在せず、大部分が小胞体に局在した。しかしながら、低温処理 (26° C) および CFTR corrector VX-809 処理により、Halo-ΔF508 CFTR は形質膜に発現し、Halo-ligand により選択的ビオチン化された。以上の結果より、Halo tag は CFTR および ΔF508 CFTR の性質 (表現型) には影響せず、Halo tag により選択的に形質膜に局在する CFTR を標識できることが明らかとなった。形質膜に存在する Halo-CFTR および Halo-ΔF508 CFTR タンパク質を選択的に単離するために、BHK 細胞に膜不透過 Halo-ligand (PEG-Biotin Halo ligand) を処理し、Halo-CFTR および Halo-ΔF508 CFTR をビオチン化した。なお、Halo-ΔF508 CFTR においては、低温処理 (26° C) による形質膜発現誘導条件も行った。細胞を可溶化後、neutravidin agarose を用いて、ビオチン化された Halo-CFTR および Halo-ΔF508 CFTR を単離し、ウエスタンブロット法で確認した。その結果、cell lysate では、Halo-CFTR および低温培養 Halo-ΔF508 CFTR において、未成熟型および成熟型の2本のバンドが検出されたが、neutravidin agarose による単離後、成熟型が主に検出された。従って、本手法により、形質膜に存在する CFTR を単離できると考えられた。

CF患者由来気道上皮細胞 CFBE において、形質膜に存在する CFTR 複合体を選択的に単離するために、Halo-CFTR および Halo-ΔF508 CFTR を組換えレンチウイルスを用いて CFBE 細胞に導入した。2週間の薬剤選択後、Halo-CFTR または Halo-ΔF508 CFTR を安定発現する CFBE 細胞の樹立を行った結果、Halo-CFTR または Halo-ΔF508 CFTR を安定発現する CFBE 細胞を樹立した。Halo-CFTR および Halo-ΔF508 CFTR 発現をウエスタンブロット法および免疫蛍光染色法で解析した結果、その発現を確認できた。COPD病態におけるCFTR down-regulation を模倣するために、細胞外領域にhorse radish peroxidase (HRP) を付加させた CFTR-HRP を安定発現する CFBE 細胞に酸化ストレス誘導剤である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> または 緑膿菌の外毒素 pyocyanin を 37° C, 1日処理した。その後、形質膜に存在する野生型CFTRの形質膜発現量をそのHRP活性を指標に定量した。その結果、pyocyanin 処理により濃度依存的に CFTR 形質膜発現量の低下が見られた。また、Western blotting 法において、pyocyanin 処理により成熟型CFTRの発現低下が観察された。従って、緑膿菌外毒素 pyocyanin により CFTR 膜発現および機能低下が起こることが示唆された。

以上、本研究により、形質膜に存在する CFTR を選択的に標識し、単離する実験手法を確立した。さらに、COPD 病態を模倣した CFTR down-regulation および 後天的 CFTR 機能異常のモデルを構築した。今後、本評価系を用いて、難治性閉塞性肺疾患における CFTR エンドサイトーシスの分子機構の解明を行うことで、新しい難治性閉塞性肺疾患の新規治療戦略を提起したい。