

## 論文の内容の要旨

論文題目 Quality control of protein folding;

Intracellular distribution, trafficking, and degradation of mutant forms of aquaporin 2  
expressed in rat hepatocytes

(タンパク質フォールディングにおけるクオリティコントロール制御の研究；  
ラット肝細胞内での変異アクアポリン2の挙動、分泌及び分解)

氏名 平野 清子

小胞体(ER)には、タンパク質フォールディング(折り畳み)のクオリティコントロール(品質管理)制御機構に関わる、いくつもの酵素やシャペロンが局在している。これらの分子は、新規に生成された分泌及び膜タンパク質の高次構造の形成に深く関わっている。すなわち、ER内部には正しい高次構造をとっていない(misfolding)タンパク質を認識し、その成熟を促進し、正しい高次構造をとるもののみをゴルジ装置に輸送する制御機構が備わっている。また、misfoldingタンパク質が細胞質ゾルに分泌され、ユビキチン化された後にプロテアソームにて分解されるER associated degradation(ERAD)経路の存在も広く知られている。アスパラギン結合型オリゴ糖付加タンパク質の折り畳みについての品質管理制御機構は詳細に研究されている。すなわち、一連の制御機構の中においてグルコシダーゼ II、UDP グルコース：糖タンパク質 グルコシルトランスフェラーゼ、ER  $\alpha$ 1,2 マンノシダーゼ I 等の酵素や、カルネクシン及びカルレティキュリンといったレクチンが Erp57 等のシャペロン同様に、重要な役割を担っている。今日までに、様々な研究がこの制御機構の解明になされ、多くの新たな側面が明らかにされてきた。しかしながら、依然として、解明されていない数多くの疑問が残されている。

本研究においては、複数回膜貫通型タンパク質のER品質管理制御機構の解明を試みた。モデル系として、野生株及び変異株アクアポリン2(AQP2)を一定に発現させる、ラット肝細胞系を確立した。変異株

AQP2 は、腎性尿崩症 (NDI) を引き起こすことが知られている。一部の変異株 AQP2 については、それらの細胞内分布および生化学的性質が *Xenopus oocytes* および CHO 細胞を用いた発現系で明らかにされているものの、その分解経路については未だ不明である。そこで、我々は NDI を引き起こすことが報告されている 3 種類の変異株 AQP2、T126M、R187C そして E258K をラット肝細胞、クローン 9 細胞に発現させた。この 3 種類の変異株 AQP2 について、T126M 及び R187C が ER 内保留型、E258K がゴルジ装置内保留型であることが今日までに報告されている。これらの発現系を用いて、野生株及び変異株 AQP2 の細胞内局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光法、さらには免疫電子顕微鏡を用いて解析した。また、これら AQP2 のクローン 9 細胞中における代謝について、免疫沈降法を用いたパルス—チェイス実験を行った。

クローン 9 細胞中において野生株 AQP2 は、主にエンドソーム内分布し、一部細胞表面に局在することが確認された。また脱水状態において、野生株 AQP2 は細胞表面に移行することが観察された。これら一連の野生株 AQP2 の局在は、AQP2 が本来分布する腎集合管細胞と同様であり、この発現系がモデル系として適切であることが示された。一方、変異株 AQP2、T126M と R187C は ER 内のみならず、ER からシス—ゴルジへの輸送をつかさどる輸送小胞で形成される、プレーゴルジ intermediates 内に見いだされた。しかしながら、これら二つの変異株 AQP2 は、細胞表面およびエンドソーム内には観測されなかった。電子顕微鏡を用いた解析の結果、変異株 AQP2、T126M および R187C の発現による、ER の構造変化は見られなかったが、プレーゴルジ intermediates 構造が拡大していることが見い出された。また、変異株 AQP2、T126M において Mallory 体様構造が見い出された。30—40%の細胞において Mallory 体様構造の形成が確認された。さらに、プロテアソームの阻害剤を投与した場合、その割合は増加した。変異株 AQP2、E258K は ER 内及びプレーゴルジ intermediates 内には認められず、ゴルジ装置内およびエンドソーム/リソソーム内にて観察された。これらの局在は、AQP2、トランスフェリン、およびリソソームの膜タンパク質である LAMP1 の抗体を用いた、三重抗体標識にて同定した。

野生株及び変異株 AQP2 は、高マンノース型オリゴ糖が付加した分子量 32kDa の型と糖鎖の付加していない分子量 29kDa の型として細胞内で生成された。クローン 9 細胞中において野生株 AQP2 の半減期は 5.2h であり、変異株 AQP2 と比較して安定であることがわかった。変異株 AQP2 の半減期は、T126M が 1.6h、R187C が 2.8h、そして E258K が 1.8h であった。野生株及び変異株 AQP2、E258K においては 29kDa の型が優性であり、32kDa 糖鎖付加型は 30 分以上のパルスでのみ観察された。野生株及び変異株 AQP2、E258K の 29kDa の型が安定であるのと対照に、これらの 32kDa の型は半減期が非常に短く 1 時間以内にすべて消失した。しかし、ER 内保留型である変異株 AQP2、T126M と R187C は、逆に 32kDa の糖鎖付加型が 29kDa の型に比べてより安定であることが観測された。これらの結果から、変異株 AQP2、T126M と R187C において糖鎖付加型である 32kDa の型は、カルネクシン及びカルレティキュリン等の ER レクチンやシャペロンと相互作用することによって、ER 内部に長く保留していることが推測される。

野生株及び変異株 AQP2 の分解経路を探究するために、プロテアソームおよびリソソームの阻害剤を用いて、それら AQP2 の細胞内代謝をパルス—チェイス実験により調べた。プロテアソームの阻害剤、Lactacystin、MG132 および ALLN はすべて、変異株 AQP2、T126M の分解を抑制した。一方、リソソームの阻

害剤であるクロロキンをを用いた場合には、この変異株 AQP2 の分解の抑制は見られなかった。また、プロテアソームの阻害剤を投与した場合には、変異株 AQP2、T126M の細胞内局在が著しく変化することが、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光法解析によって明らかにされた。ER 構造に特異的な DiOC<sub>6</sub> を用いて、それらの ER 構造を観察した時、プロテアソームの阻害剤の投与後、変異株 AQP2、T126M の ER の網状構造が崩壊し、核周辺を含む一部分に非常に強い蛍光が観察された。これらの細胞構造の変化は、野生型 AQP 2 を発現させた細胞では確認されなかった。変異株 AQP2、E258K において、Lactacystin およびクロロキントもにその分解を抑制した。

以上の結果から、以下のことが結論づけられる。1) ラット肝細胞、クローン9細胞を用いた *in vitro* AQP 2 発現系は、これら野生株及び変異株 AQP 2 の細胞内局在及び代謝を研究することに適した系である。2) AQP 2 遺伝子の変異の位置により、これら変異株 AQP 2 の細胞内分布は著しく異なる。本研究において、変異株 AQP 2 の ER 内及びプレゴルジ intermediates 内保留型とゴルジ装置内及びエンドソーム/リソソーム内保留型の2つの異なる細胞内局在がより詳細にされた。3) 野生株及び変異株 AQP 2 はともに、分子量 32kDa の高マンノース型オリゴ糖が付加型及び 29kDa の糖鎖不加型として生成される。しかしながら、野生株及び変異株 E258K と ER 内及びプレゴルジ intermediates 内保留型変異株 AQP2、T126M 及び R187C では、32kDa 型と 29kDa 型の分解の速度が著しく異なる。野生株及び変異株 E258K では 29kDa 型が、変異株 AQP2、T126M 及び R187C では、32kDa 型の糖鎖付加型が安定である。4) ER 内及びプレゴルジ intermediates 内保留型変異株 AQP 2、T126M はプロテアソームに至る、ER associated degradation (ERAD) 経路によって分解されることが本研究で示された。また、これは糖鎖付加型複数回膜貫通型タンパク質で、ERAD 経路をたどることを示した最初の報告である。5) クローン9細胞中において変異株 AQP2、T126M を発現させた場合に Mallory 体様構造が見い出され、これらはプロテアソームの阻害においてその発現が促進された。これは、*in vitro* における Mallory 体様構造の形成の最初の報告例であり、Mallory 体様構造と misfolding タンパク質の蓄積によって形成されることが知られている aggresome の関係が示唆される。