

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者 平野 清子

遺伝子情報がポリペプチド鎖へと翻訳された後、機能する立体構造の形成、機能する部位への配置、他の成分との適切な相互作用などが行われるまでにどのような機構が関与しているかは、ヒトを含め個体のゲノムが解析された後のいわゆるポストゲノムの課題が喧伝される以前より、重要課題の一つとして位置づけられる。このような機構の中では、小胞体(ER)に存在する、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)制御機構に関しては、いくつもの酵素やシャペロンの局在が報告され、その機構が解析されている。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。高次構造形成の失敗に終わった(misfolding)タンパク質を認識して元に戻し再び、その再度の機会を促進し、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。一方、この制御機構ルートに乗らなかったタンパク質は分解され、除去される仕組みもある。間違ったフォールディングをしたタンパク質は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。中でも、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。

しかしながら、先行研究においては糖鎖付加のないタンパク質のフォールディングについての品質管理機構は殆ど解明されていない。本論文では、糖鎖付加のないタンパク質、アクアポリン2(AQP2)について、そのER品質管理制御機構の解明を試みた。AQP2は*in vivo*で遠位尿管上皮細胞の細胞質内に存在し、アルギニンバソプレシンの刺激に応じて、細胞表面に移行し、水を再吸収する。先行研究により、ヒトの疾患腎性尿崩症(NDI)ではAQP2の変異20種以上が原因であることが知られている。変異株AQP2、T126M、R187C、E258K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 oocyto*およびCHO細胞を用いた発現系で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報告されている。しかしながら、変異AQP2の分解経路については未だ不明である。本研究では、これら3種類のAQP2変異株、T126M、R187C、E258Kをラット肝細胞クローン9細胞に発現させた。培養ラット肝細胞クローン9細胞がAQP2を産生していないことを確認し、ついで、野生株及び変異株を強制発現した細胞について検討した。野生株AQP2の培養ラット肝細胞クローン9での局在は、AQP2が本来分布する腎集合管細胞と同様であることが判明した。培養インキュベータの乾燥により、細胞質内

の AQP2 が細胞表面に移行することが見られ、培養ラット肝細胞クローン 9 において、強制発現 AQP2 が生理的な機能を果たしていることを確認した。これを対照として、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ーチェイス実験を行った。

変異株 AQP2、T126M および R187C は ER 内のみならず、プレゴルジ intermediates (ER からシスーゴルジへの輸送をつかさどる輸送小胞内)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 の発現では、ER の構造変化は見られなかったが、プレゴルジ intermediates 構造が拡大していた。変異株 AQP2、T126M を強制発現した細胞の 30–40%において Mallory 体様構造の形成が確認された。プロテアソームの阻害剤を投与した場合、Mallory 体様構造を形成する割合が増加した。変異株 AQP2、E258K の細胞内局在は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 に対する抗体を用いた、三重抗体標識にて、ゴルジ装置内およびエンドソーム/リソソーム内と同定された。

クローン 9 細胞中において野生株及び変異株 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。半減期は野生株 AQP2 で 5.2h、AQP2 変異株 T126M で 1.6h、R187C で 2.8h、そして E258K で 1.8h であった。野生株は変異株 AQP2 と比較して安定であることがわかった。野生株及び変異株 AQP2、E258K においては糖付加のない 29kDa の型がほとんどであり、32kDa 糖鎖付加型は 30 分以下のパルスで、痕跡程度、観察された。一方、ER 内保留型である変異株 AQP2、T126M および R187C では、32kDa の糖鎖付加型が 29kDa の型に比べてより安定であった。変異株 AQP2、T126M および 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によって認識され、ER 内部へより長く保留される可能性が推測される。

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ー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ュリンを用いた場合には、この変異株 AQP2 の分解の抑制は見られなかった。変異株 AQP2、E258K においては、Lactacystin およびクロロキュリンのどちらも、その分解を抑制した。変異株 AQP2、T126M を発現している系にプロテアソームの阻害剤を投与した場合、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。免疫電顕を用いた検討から、この構造は Mallory 体様の構造（ヒトのアルコール性肝疾患で見られる、中間径フィラメント、ケラチンを包含した細胞内構造体）をしていることが確認された。

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* AQP2 発現系は、AQP2 の動態を研究することに適した系である。2) AQP2 遺伝子の変異の位置により、細胞内局在に二つの型があることが判明した。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である。3) 野生株及び変異株 AQP2 はともに、

分子量 32kDa の高マンノース型オリゴ糖付加型及び 29kDa の無付加型として生成される。野生株及び変異株 E258K では 29kDa 型が、ER 内及びプレゴルジ intermediates 内保留型変異株変異株 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 AQP2、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示された。これは糖鎖無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 体様構造が misfolding タンパク質の蓄積によって形成される可能性が示唆された。

以上のように本論文では培養細胞系を用いたタンパク質の品質管理について、新しい知見が得られた。これらの発見がアルツハイマー病を含め、難治の疾患の原因の機構解明への新しい糸口となるものと期待される。本研究は何人かの研究者との共同研究として推進されたものであるが、論文内容に対する貢献において、論文提出者が第一であることが確認された。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。