

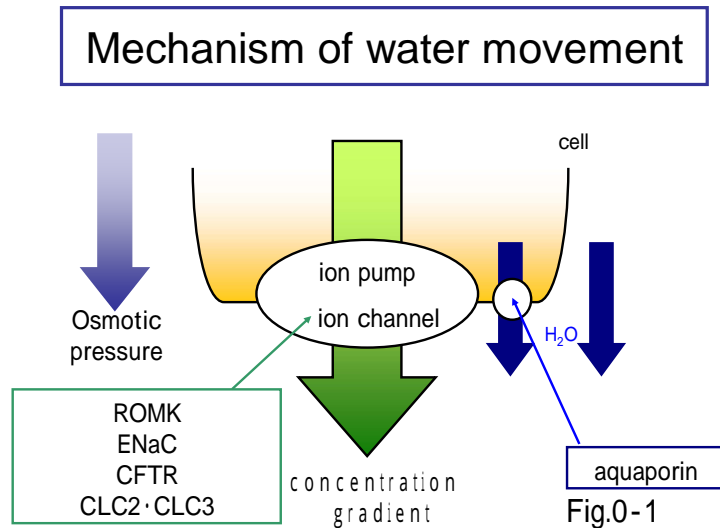
論文内容の要旨

論文題目

水輸送組織特異的に発現する細胞内塩素イオンチャネル関連蛋白質 parchorin の機能解析

氏 名 大森 聡子

[背景]



生体は脳脊髄液・消化液・尿など様々な臓器で大量の水輸送を行っており、水輸送は個体の生命活動維持にとって非常に重要な機能である。水輸送機構は細胞内外の電解質のバランスにより以下のように調整されている(Fig.0-1)。細胞が何らかの水輸送刺激を受けるとポンプやイオンチャネルが活

性化し、ナトリウム・カリウム・クロライドイオン等が細胞外に放出される。放出されたイオンは細胞膜を挟んで細胞内外に局所的な浸透圧差を形成し、この差によって水が細胞外へ輸送される。

イオン交換に関与する蛋白質には数多くのポンプやチャネルがあり、陰イオン交換に関

与するチャネルでは、気道上皮や汗腺等で水分分泌が著しく低下する嚢胞性線維症の原因遺伝子であり、気管支、汗腺、膵臓 に多く発現している CFTR(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)や電位依存性塩素イオンチャネル(CLIC)ファミリー内で、脳、肺 に発現が多く見られる CLC2 や心臓に多く見られる CLC3 があげられる。しかし CFTR 及び CLC2・3 が水輸送組織全てに発現しているとはいいがたく、例えば、CLC2 は脳脊髄液を産生する脈絡叢上皮細胞において、クロライドイオンを制御する主なチャネルと考えられていたが、ノックアウトマウスにおける解析より、脈絡叢上皮細胞でのクロライドイオン制御に主要な貢献をしているのは CLC2 はではないことが判明するなど、これらのチャネルが水分分泌活動普遍的に機能しているとは考えにくく、未知の陰イオンチャネルの存在が想定されている。

当研究室でウサギよりクローニングされ、胃酸分泌を行う壁細胞(parietal cell)と脳脊髄液を産生する脈絡叢(choroids plexus)に多く発現していることから parchorin と名づけられた蛋白質は、6 つのサブタイプから成り、C 末端に高い相同性を持つ chloride intracellular channel (CLIC)ファミリーの一員である。6 つのサブタイプとも水溶性蛋白質であるが、parchorin 以外は核に局在する CLIC1 をはじめとして、細胞小器官や細胞膜に強く局在している。また人工脂質二重膜へ組み込んだ CLIC1 が陰イオンチャネルの機能を示すことが報告されている。チャネル機能が確認されているのは CLIC1 のみであるが、parchorin を含む他のサブタイプも CLIC1 との相同性の高さにより、イオンチャネルの性質を示すことが予想されている。

```

mouse 1:-----MA 2
rabbit 1:NAETAEPFGGAPSPQGPPEGSALLEERPGEPPDAPGEASEGAAKAPSGEGAGAAKAGAT 60

mouse 3:--MTEPKVEVAPGSSQQQEGATTEPGE-PCRA--DLEQRESEAAEAERLIGAGVEA-R 57
rabbit 61:EESSGGRDDEGAGEQAADAGTESGG-ETEDAKGAQIEAEGPPEGTKA-HQ-LGEEGSGGK 117

mouse 58:ASGKEEG-GGGQDEGTGG-AQAQDPRTGPE-BETPGASGAPGEAAEAARDPEGAIPQGA 114
rabbit 118:QVE-ESGPDQELRGEAAAREEGCAAAAPAGQEEAVPQDSVDAEGSIDAG-SSVDAAGS 175

mouse 115:-EPPSAQQVQCHSGLISQGEAPEVPCDSRREPE---DPTASEA-GEAEESGQEAQGGGA 169
rabbit 176:VDLGGSIDAGC--S--MAGGSVDAG-C--SIDTGGSVDAAGSVDAGSIDTGRNVDAGGS 229

mouse 170:LGLQINPEVQCLAGDMNDEAPAGCPLESESEFGGGSSSPOFQDEAIEIVTTDIGNES 229
rabbit 230:IDAGGSVDAGC----SMDRECPAGCAHAGGPPDLGAGSPQPRSEAVVAAAEINCHSP 285

mouse 230:GELLAGASADAA-GEGLTLGKDGSEEAASEDAARVDAHENQDQGLQEEETGEEEAPEPEL 288
rabbit 286:GESVEDAAEEEAAGTTRPE---GSEDAAGED-----GDQGRPQETEQQAEKCEP-- 332

mouse 289:KCCCEGAIQ--EKPPDCSLDGEDAKNSTEHEEESCAELSNHLAEEPSVCGGELGRVNGRR 346
rabbit 333:-GRETQ-SEEEPRPDPSPGEEAASTRAAQPE-AELSNHLAEEGGCRCE--GPANGRG 387

mouse 347:ENFMLEEGDPGQEHDTLFLVR&YDGDGSEIGNCFFSQRLEFHLWLRGVFNVTIVDLKRR 406
rabbit 388:EDCEASEEGDPGQEHDTLFLVR&YDGDGSEIGNCFFSQRLEFHLWLRGVFNVTIVDLKRR 447

mouse 407:PADLQNLAPGTNPPFFMTFDGQVKTQVKNKIEEFLEEKLVPPRYPKLATQHPESNSAGNDVF 466
rabbit 448:PADLQNLAPGTNPPFFMTFDGQVKTQVKNKIEEFLEEKLVPPRYPKLATQHPESNSAGNDVF 507

mouse 467:AKFS&FIKNTKKDANEIYERMLHALKKLDSYLN SPLDDEIDADSSEDVTVSCKKFLDGD 526
rabbit 508:AKFS&FIKNTKKDANEIYERMLHALKKLDSYLN SPLDDEIDAVSTEDVTVSCKKFLDGD 567

mouse 527:ELTLADCNLLPRLHIIKIVAKKYRDFEFPPEHTGIWRYLNNAYARDEFNTCPADREIEH 586
rabbit 568:DLTLADCNLLPRLHIIKIVAKKYRDFEFPPEHTGIWRYLNNAYARDEFNTCPADREIEH 627

mouse 587:AYSDA&AKRMK 596
rabbit 628:AYSDA&AKRMK 637

```

Fig.1 クローニングしたマウスparchorin (上段)とウサギparchorin (下段)のアミノ酸配列の比較

- 部分は抗体作成時における抗原部位
- 部分はCLIC相同領域

parchorin はウサギでは顎下腺・乳腺など外分泌腺の導管や、腎臓ヘンレ係蹄の太い上行脚と遠位尿管、内耳等水を輸送する組織に特異的に発現し、水輸送活性の変化により発現量が変化する。また、他のサブタイプが膜に強く局在するのに対して、親水性の長いN末端を持つ parchorin は細胞質に多く局在し、刺激により細胞質から形質膜へ移動する。陰イオンチャネルと推定されている、CLIC ファミリー内でも parchorin は水輸送組織特異的に発現していること、また発現量が水輸送活性変化の影響を

受けていることにより、parchorin は水輸送の調整において重要な役割を担っていることも期待されるが、活性化のメカニズムや膜移行をはじめとした詳細な生理的機構は未だ明らかになっていない。

私は parchorin の機能解析を通じて水輸送機構の解明をすることを目的に、ノックアウトマウス作製に必要なマウス parchorin のクローニング及び、活性化メカニズムの解明に向けて parchorin 結合蛋白質の探索及び、parchorin 結合蛋白質の parchorin への影響を検討した。

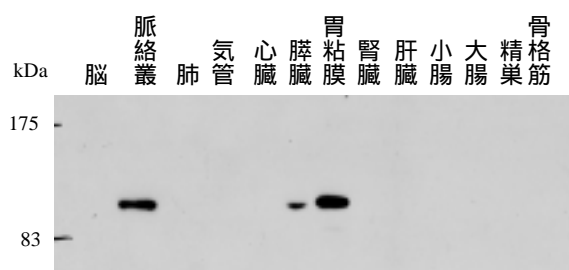


Fig.2 マウスにおけるparchorinの組織分布

[方法と結果]

1 マウス parchorin のクローニング

parchorin の機能解析にはマウス parchorin のクローニングが有効と考え、ウサギ parchorin に相似な部分を mouse genome から検索した後 primer を設定し、マウス脈絡叢由来 RNA を鋳型に RT-PCR 及び 3' RACE、5' RACE を行い、マウス parchorin をクローニングした (Fig.1)。CLIC 相同領域におけるウサギとマウスの相同性は 93%であった。しかし、N 末端側

(361aa)での相同性は 36%であり、全長におけるウサギとマウスの相同性は 56%であった。この配列を元に共同研究としてノックアウトマウスを作成し、表現型の解析中である。

また、クローニングした配列を元に抗体を作成し、蛋白質の発現を調べたところ、ウサギ parchorin での分布と同様に、マウス parchorin は脈絡叢及び胃粘膜に高発現していることがわかった (Fig.2)。

また、GFP-マウス parchorin が、ウサギ parchorin と同様に ATP 刺激や細胞外液 Cl⁻ 除去刺激により細胞質から形質膜へ移動することも確認した。

2 parchorin の結合蛋白質の探索

parchorin の細胞質から形質膜への移行に何らかの分子が関与しているのではないかと考え、parchorin の結合蛋白質を酵母 two hybrid 法により探索した。Parchorin の N 末端を bait とし、マウス全脳の cDNA ライブラリーから探索を行った。その結果、陽性クローンとして同定された 31 個のクローンから syntenin の全長を含む cDNA が同定された。

Syntenin は、細胞膜上での蛋白質複合体の構成蛋白質のひとつとして、また小胞輸送に関与していることが知られている 33kDa の大きさの蛋白質で、C 末端側に PDZ ドメインを 2 つ持つ蛋白質であり、核と細胞膜に多く局在している。また parchorin との共免疫沈降法により parchorin の CLIC 相同領域を除く N 末端と syntenin の PDZ ドメインを含む C 末端が結合することを確認した。これにより、syntenin は CLIC ファミリー普遍的ではなく、

parchorin 特異的な機能制御に関与していることが予測される。

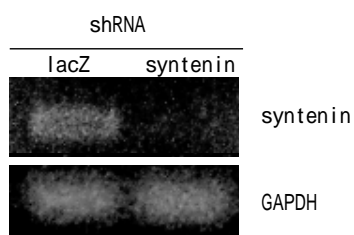


Fig.3 マウス培養脈絡叢に RNAi法によりsynteninノックダウンを行った際のmRNA量の変化

3 syntenin の parchorin に対する作用

parchorin への syntenin の関与を検討するために、RNAi 法を用いて syntenin を knock down した。マウス syntenin に対する shRNA を pENTER/U6 ベクターに組み込み、pAD/BLOCK-iT-DEST ベクターと in vitro で組み換え反応を行い、マウス syntenin shRNA アデノウイルスベクターを作成した。

Parchorin が高発現している脈絡叢の初代培養系に、作成したアデノウイルスを感染させたところ内因性 syntenin の mRNA が減少した (Fig.3)。そこで、syntenin ノックダウン時の培養脈絡叢を抗 parchorin 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、parchorin の細胞内局在が、細胞質及び形質膜 (syntenin ノックダウン前) から細胞質 (syntenin ノックダウン時) へと変化した (Fig.4)。これより、syntenin は parchorin と結合し、parchorin を形質膜上に留める働きをしていることが示唆された。

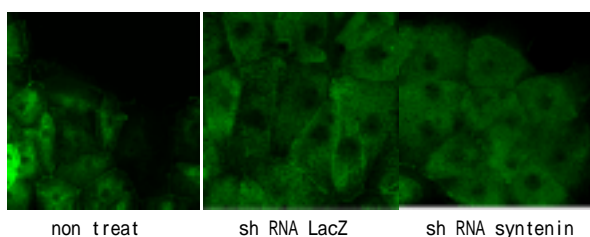


Fig.4 マウス培養脈絡叢に RNAi法により syntenin ノックダウンを行った際の内因性 parchorin の細胞内局在の変化

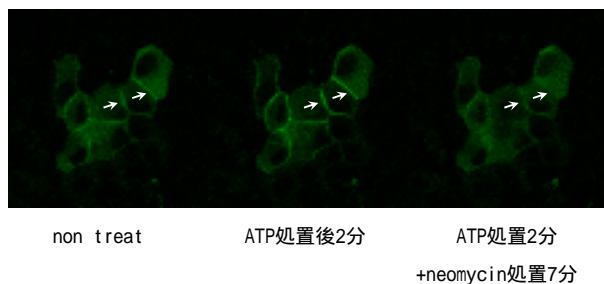
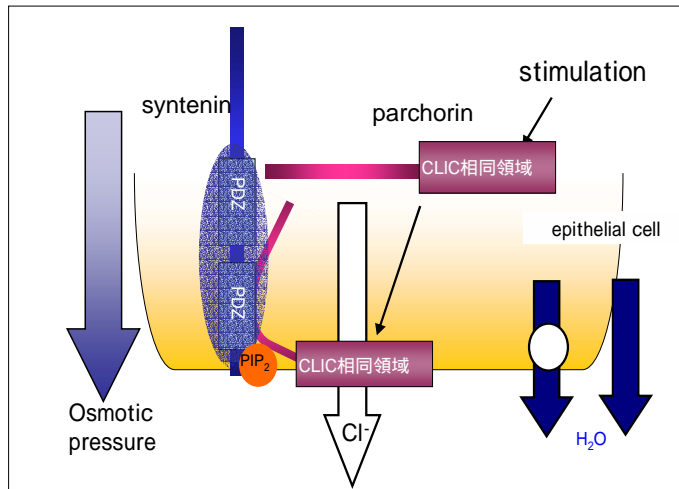


Fig.5 MDCK細胞に発現させた GFP-parchorin の neomycin 処置時の細胞内局在変化

ここで、parchorin と結合する syntenin の C 末端に存在する PDZ ドメインは PIP_2 と結合し、形質膜上での PIP_2 濃度が下がると、形質膜上の syntenin が細胞質へ移動することも知られている。そこで、 PIP_2 と結合する neomycin

を用いて形質膜上の PIP_2 濃度を下げた時の parchorin の動きを調べたところ、neomycin 投与後、MDCK 細胞に発現させた GFP-parchorin の形質膜上の局在が減少した (Fig.5)。以上より、syntenin を介した parchorin の形質膜への局在に PIP_2 が関与していることが示唆された。



[まとめ]

本研究において私は

- ・マウス parchorin のクローニングを行い、ノックアウトマウス作製に寄与した。

- ・ parchorin 結合蛋白質として syntenin を同定し、syntenin が parchorin の細胞内局在に

- ・ parchorin の形質膜への局在に PIP_2 が関与していることを示唆した。

以上より、刺激により parchorin は形質膜へ移行し、形質膜上で parchorin の N 末端と syntenin の C 末端が結合することにより parchorin を形質膜へ留める働きをしている。形質膜に局在した parchorin はそこで塩素イオンの放出活性を高めている働きをしていると推測される。

Syntenin と parchorin の膜移行の関連であるが、HEK293A 細胞に syntenin は発現しているものの、発現させた parchorin は膜移行を示さないことより、syntenin は parchorin の膜への局在の必要条件ではあるが、膜移行の十分条件ではないと推測される。Parchorin の膜移行メカニズムをはじめ、syntenin の水輸送機構への関与は更なる解析が期待される。