

## 論文の内容の要旨

論文題目 高親和性コリントランスポーターCHT1は  
ユビキチンリガーゼ Nedd4-2 によって制御される

氏名 山田治彦

アセチルコリンを神経伝達物質とするコリン作動性神経は、交感・副交感神経節前神経、副交感神経節後神経、運動神経など、主要な末梢神経を構成する。中枢神経系にも広く存在し、学習・記憶、睡眠・覚醒などに関わっている。アルツハイマー病ではコリン作動性神経の脱落が顕著であることが知られている。

高親和性コリントランスポーター(CHT1)はコリン作動性神経に特異的に発現し、アセチルコリンの前駆体であるコリンを  $\text{Na}^+$  依存的に細胞外から細胞内へ取り込む。神経細胞はコリンを合成できないので、この輸送はアセチルコリン合成に必要不可欠な過程で、その律速段階でもある。CHT1 のノックアウトマウスはアセチルコリン合成能を欠き、致死である。CHT1 のクローニングによって、その細胞内局在や輸送などの機能制御に関する研究が可能となった。CHT1 は細胞表面で機能するにも拘わらず、培養細胞に発現させると大部分が細胞内小器官に存在し、神経細胞では主にシナプス小胞に存在する。CHT1 の細胞表面への移行あるいは細胞表面からの細胞内への移行がアセチルコリンの合成速度を制御すると考えられる。CHT1 分子の活性化や細胞表面への移行促進が可能になれば、アルツハイマー病などのコリン作動性神経変性疾患への効果的な治療につながる可能性がある。

トランスポーター、受容体、イオンチャネルなどの膜タンパク質の細胞内と細胞表面

間の輸送は特定の輸送シグナル、あるいはリン酸化、糖鎖付加、ユビキチン化などの翻訳後修飾などによって制御される。ユビキチン化は、ユビキチンを標的タンパク質に連結させる反応を触媒する3種類の酵素の連続的な反応により起こる。ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン連結酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)である。基質特異性を主に決定するのはE3である。ヒトゲノムには617個のE3をコードする遺伝子が存在すると予測されており、E3は基質タンパク質へのユビキチンの連結方式の違いにより、主にRING型とHECT型の2つに分類される。ヒトのE3遺伝子の約94%がRING型に属し、約5%がHECT型に属すると予測されている。HECT型のE3であるNedd4ファミリーには、この祖先であるNedd4と遺伝子重複で進化的に遅れて現れたと考えられるNedd4-2などがある。Nedd4-2はドーパミントランスポーター、興奮性アミノ酸トランスポーター1などの神経伝達物質トランスポーターの細胞表面の発現や輸送、活性などを制御すると報告されている。本研究ではCHT1のユビキチン化あるいは細胞表面への発現が、Nedd4-2によって制御されているかどうかを明らかにすることを目的とした。

CHT1とNedd4-2が相互作用するかどうかを確かめるため、FLAGタグを付加したCHT1とMycタグを付加したNedd4-2をHEK293細胞に一過性に共発現させ、細胞を可溶化し共免疫沈降を行った。その結果、両者は相互作用していることが明らかになった。

次にNedd4-2がCHT1の活性にどのような影響を及ぼすかを調べた。Nedd4-2とCHT1をHEK293細胞に一過性に共発現させ、<sup>3</sup>Hで標識したヘミコリニウム-3([<sup>3</sup>H]HC-3)結合活性を調べた。HC-3は細胞膜不透過性のCHT1特異的阻害剤で、[<sup>3</sup>H]HC-3との結合実験により細胞表面のCHT1発現量を定量できる。[<sup>3</sup>H]HC-3の最大結合量( $B_{max}$ )は、CHT1にNedd4-2を共発現させないときに比べ( $B_{max} = 120 \pm 32$  fmol/mg protein: Control)、Nedd4-2を共発現させると約50%減少した( $B_{max} = 61 \pm 20$  fmol/mg protein: +Nedd4-2) (図1A)。[<sup>3</sup>H]HC-3への平衡解離定数( $K_d$ )は、Nedd4-2の共発現の有無によらず殆ど変化がなかった( $K_d = 8.7 \pm 2.3$  nM: Control,  $K_d = 9.4 \pm 4.4$  nM: +Nedd4-2) (図1A)。Nedd4-2を共発現させたときの[<sup>3</sup>H]コリン取り込みの最大速度( $V_{max}$ )は、Nedd4-2を共発現させないときに比べ( $V_{max} = 210 \pm 10$  pmol/min/mg protein:

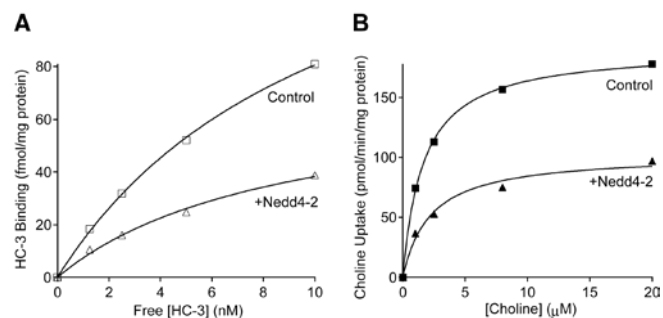


図1 HEK293細胞に一過性にCHT1のみを発現させたとき(Control)、あるいはNedd4-2を共発現させたとき(+Nedd4-2)の、[<sup>3</sup>H]HC-3結合活性の濃度依存性(A)、及び[<sup>3</sup>H]コリン取り込み活性の濃度依存性(B)。独立した3回の実験のうち代表的な一例を示した。

Control)、約 50%減少した( $V_{\max} = 95 \pm 4$  pmol/min/mg protein: +Nedd4-2) (図 1B)。  
 $[^3\text{H}]$ コリンへの親和性( $K_m$ )は、Nedd4-2 を共発現させたとき( $K_m = 1.8 \pm 0.2$   $\mu\text{M}$ : +Nedd4-2)と、Nedd4-2 を共発現させないとき( $K_m = 2.5 \pm 0.5$   $\mu\text{M}$ : Control)との間には有意な変化はなかった (図 1B)。これらの結果は、CHT1 に対する HC-3 とコリンの親和性は Nedd4-2 の共発現で影響されず、Nedd4-2 の共発現は細胞表面の機能的な CHT1 発現量を減少させることを示している。

細胞表面の CHT1 発現量は内在性 Nedd4-2 による影響を受けているかどうか調べるため、Nedd4-2 に対する低分子干渉 RNA(siRNA)を発現するベクターを作製し、CHT1 を安定的に発現する HEK293 細胞に一過性にトランスフェクトした。48 時間後に細胞を溶解して回収し、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、Nedd4-2 siRNA をトランスフェクトした細胞の Nedd4-2 タンパク質の発現量はコントロール siRNA をトランスフェクトした細胞に比べ、減少していることが確認された。Nedd4-2 siRNA をトランスフェクトした細胞ではコントロールに比べ、 $[^3\text{H}]$ HC-3 結合活性も  $[^3\text{H}]$ コリン取り込み活性も約 20%増加した。これらの結果は、内在性 Nedd4-2 が細胞表面の機能的な CHT1 発現量を負に制御していることを示している。

Nedd4-2 による CHT1 のユビキチン化が細胞表面で起きているかどうか調べるため、CHT1 と FLAG-Nedd4-2 を HEK293 細胞に一過性に共発現させた。細胞膜不透過性のアミン反応性ビオチン化試薬を用いて細胞を処理しビオチン化を行った。ビオチン化された細胞表面タンパク質をアビジンビーズにより分離・回収した。抗 CHT1 抗体を使ってウエスタンブロッティングを行った結果、CHT1 のみを発現させたときは、主に単一の分子種(約 60 kDa)が検出された(図 2A、レーン 2)。一方、Nedd4-2 を共発現させると、この分子種の量は減少し、高分子量側(> 250 kDa)の分子種の量が増加した (図 2A、レーン 3)。リガーゼ活性を欠いた Nedd4-2 変異体 C962S を共発現させた場合にこの変化は観察されなかった (図 2A、レーン 4)。60 kDa の分

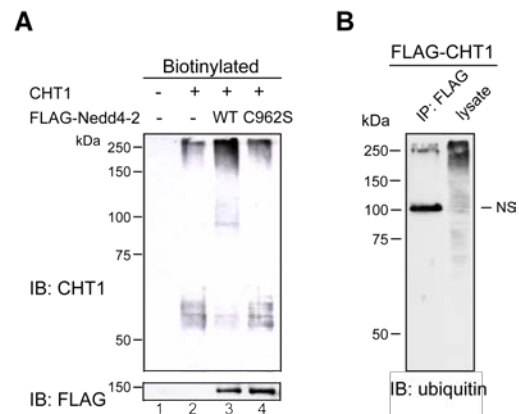


図 2 Nedd4-2 は細胞表面の CHT1 のユビキチン化を亢進させる。  
 A, CHT1 と FLAG-Nedd4-2 を HEK293 細胞に一過性に共発現させた。細胞を膜不透過性のアミン反応性ビオチン化試薬である Sulfo-NHS-SS-Biotin (1.0 mg/ml)で 4°C、1 時間処理した。細胞を溶解し、ビオチン化されたタンパク質をアビジンビーズで分離・回収した。SDS-PAGE を行い、抗 CHT1 抗体でウエスタンブロッティングを行った。ビオチン化された細胞表面の CHT1 は、CHT1 のみを発現させたときは主に約 60 kDa に検出されたが (レーン 2)、Nedd4-2 野生体(WT)を共発現させたときは主に高分子量側に現れた (レーン 3)。リガーゼ活性を欠いた変異体 C962S を共発現させた場合にこの変化は観察されなかった (レーン 4)。抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-Nedd4-2 WT および C962S の発現を確認した (レーン 3, 4)。B, FLAG-CHT1 を HEK293 細胞に一過性に発現させた。細胞を溶解し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い、抗ユビキチン抗体でウエスタンブロッティングを行った。IB はウエスタンブロッティングに用いた一次抗体を示す。IP は免疫沈降に用いた抗体を示す。NS は非特異的なバンドを示す。

子種はユビキチン鎖が付加していないが、> 250 kDa の分子種はユビキチン鎖が付加したものと考えられる。事実、> 250 kDa のバンドは抗ユビキチン抗体で検出された (図 2B)。これらの結果は、細胞表面の CHT1 がユビキチン化されることを示している。

膜タンパク質の細胞内リジン残基はユビキチン化のターゲットとして知られている。どの細胞内リジン残基が CHT1 の活性の制御に関わっているかを明らかにすることを試みた。ヒト CHT1 には細胞内に 13 か所のリジン残基が存在すると予想される。予備的実験として、単一のリジン残基をアルギニンに置換した 13 個の変異体の cDNA を作製し、HEK293 細胞に一過性に発現させ、 $[^3\text{H}]$ HC-3 結合活性、及び $[^3\text{H}]$ コリン取り込み活性を調べた。この結果を元に、CHT1 の複数か所の細胞内リジン残基をアルギニンに置換した変異体系列 3KR, 5KR, 10KR, 11KR, 13KR を作製した (3KR は細胞内の 3 か所のリジン残基をアルギニンに置換したことを示す)。これらの変異体を HEK293 細胞に一過性に発現させ、 $[^3\text{H}]$ HC-3 結合活性、及び $[^3\text{H}]$ コリン取り込み活性を測定した。その結果、リジン残基の置換数が増大するにつれ (3KR, 5KR, 10KR)、 $[^3\text{H}]$ HC-3 結合活性も $[^3\text{H}]$ コリン取り込み活性も増加することが分かった。この結果は、少なくとも CHT1 の細胞内の 10 個のリジン残基は、CHT1 の活性を減少させることなく、アルギニン残基に置換されうること、これらの活性上昇の原因が置換されたリジン残基のユビキチン化を阻害したことである可能性を示している。一方、さらに追加した K104R 及び K124R の置換 (11KR から 13KR) では、 $[^3\text{H}]$ HC-3 結合活性も $[^3\text{H}]$ コリン取り込み活性とも大きく減少した。この結果は、K104 及び K124 は CHT1 の活性、あるいは細胞表面への発現に関与している可能性を示している。

以上の結果は、(1) CHT1 とユビキチンリガーゼ Nedd4-2 が相互作用していること、(2)Nedd4-2 を共発現させると細胞表面の機能的な CHT1 発現量が減少すること、(3) 内在性 Nedd4-2 の発現を抑制すると細胞表面の機能的な CHT1 発現量が増加すること、(4)細胞表面の CHT1 はユビキチン化されること、(5)CHT1 のユビキチン化を受け得る細胞内リジン残基をアルギニンに置換すると細胞表面の機能的な CHT1 発現量が増加すること、を示している。これらの結果は、細胞表面の機能的な CHT1 の発現は Nedd4-2 によって制御されることを示している。生体内で CHT1 と Nedd4-2 の相互作用を阻害することができれば、細胞表面の機能的な CHT1 発現量が増加し、脳内のアセチルコリン量が増加することが期待できる。コリン作動性神経変性疾患の治療薬の開発につながる可能性が考えられる。