

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380191

研究課題名（和文）トランスポーター病に関与する蛋白質間相互作用の網羅的検出による分子病態の解明

研究課題名（英文）Clarification of molecular basis of transporter diseases by the comprehensive detection of protein-protein interactions.

研究代表者

佐藤 耕太（SATO KOTA）

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：50283974

研究成果の概要（和文）：「トランスポーター病」はトランスポーターやチャネルの異常が原因となる疾患の総称である。我々は、犬赤血球に見られるグルタミン酸トランスポーター欠損症をそのモデルとして用い、GLAST 型グルタミン酸トランスポーターの細胞内輸送異常の原因を解明するために、細胞内輸送に関与する蛋白質相互作用を網羅的に解析した。GLAST には PDZ ドメイン蛋白質である NHERF1 および NHERF2 が結合し、これらが細胞膜へ至る過程において小胞体およびゴルジ体以降の細胞内小器官特異的に結合をすることが明らかとなった。これらの相互作用は GLAST の細胞表面発現レベルを変動させることから、PDZ ドメインを介するこれらとの相互作用が GLAST の細胞内輸送異常に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Transporter diseases are caused by disorders of various membrane transporter and channel proteins. We analyzed the comprehensive protein-protein interactions that alter intracellular traffic of transporters by utilizing the hereditary defects of glutamate transporter GLAST in Japanese dog red cells as a model of the transporter disease. The PDZ domain proteins NHERF1 and NHERF2 interacted with the GLAST proteins in the endoplasmic reticulum and the post-Golgi compartments during the traffic to the plasma membrane, respectively. Since coexpression of these proteins altered the cell surface expression level of GLAST, it is suggested that the interaction of PDZ domain proteins with GLAST is associated with the disorder of intracellular trafficking of GLAST.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：臨床獣医学

キーワード：トランスポーター、蛋白質間相互作用、アダプター蛋白質

1. 研究開始当初の背景

ヒトの嚢胞性線維症の原因が、Cl⁻チャネル（CFTR）の遺伝的変異であることが発見されて以来、多くのトランスポーター病が見出され、さらに、ヒトの高齢化疾患関連遺伝

子のうち約 10%がトランスポーターに関連することが報告された。このことは、トランスポーターの異常が遺伝性疾患のみならず、生活習慣病などの common disease の原因となることを示唆しており、トランスポーター異

常の分子メカニズムの解明が多くの疾患を制圧するうえで非常に重要であることを示している。トランスポーター病では、変異CFTRのような異常蛋白質による疾患の分子メカニズムの解明は進んでいるものの、遺伝的変異や転写レベルの異常を伴わずに最終的な細胞表面発現が低下し発症するトランスロケーション（膜移行）異常の分子メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。近年、多くのトランスポーターが他の蛋白質と相互作用し、表面発現が変化することが明らかにされているが、具体的にどの蛋白質とどの蛋白質が実際に相互作用しているのかについては不明な点が多く、これを検出することが大きな課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、現状の蛋白質間相互作用の網羅的解析法では検出困難な相互作用を見出すために、新たな方法論に基づく、哺乳動物細胞内における相互作用をより良く再現できる新規蛋白質間相互作用検出システムの確立と検証、およびそれを応用したトランスポーター病の分子基盤の解明を試みた。

具体的な課題は以下の4点である。

- (1) 細胞・組織特異的 shRNA レンチウイルスライブラリーの作製
- (2) 蛋白質間相互作用検出システムの確立と検証
- (3) 新規蛋白質間相互作用の検出とトランスポーター病関連候補遺伝子の決定
- (4) トランスポーター病関連候補遺伝子の機能と中枢神経疾患の分子病態の解明

本研究の目的は、新たな蛋白質間相互作用を見出し、原因不明のトランスポーター病の病態解明に資することである。

3. 研究の方法

本研究では新たな蛋白質相互作用を発見するために、レンチウイルスノックダウン系による網羅的蛋白質相互作用検出システムを確立し、つづいて次年度以降に相互作用する候補分子を決定する一方、トランスポーター病の原因遺伝子の決定と分子病態解明に関する検討を細胞レベルおよび生体レベルで実施した。

4. 研究成果

(1) GLAST 発現細胞株の確立

モデル蛋白質として GLAST 型グルタミン酸トランスポーターを用い、安定発現細胞株を樹立した。これらの分子は、赤芽球系細胞 K562 あるいは人腎由来 HEK293 細胞において主に細胞膜に局在する一方、細胞内エンドソームにも分布し、表面ビオチン化法による解析から細胞内～細胞膜表面をリサイクリングしていることが明らかとなった。このリサ

イクリングの過程は small GTPase の一種である ARF6 の機能を阻害することにより、抑制されることから、これらの分子間相互作用が GLAST の細胞内小胞輸送に重要な役割を果たしていることが示唆された。

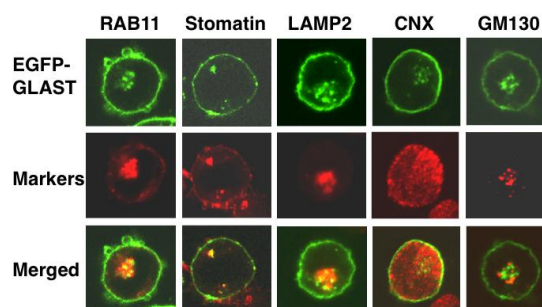


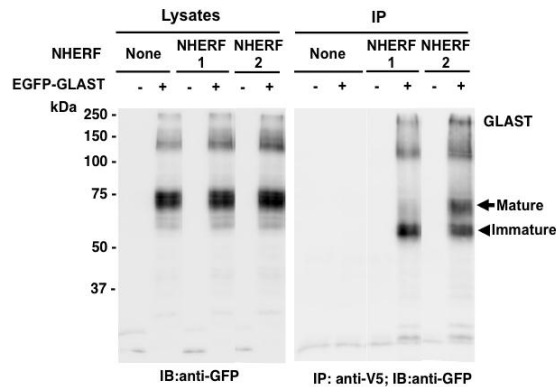
図1. GLAST 発現赤芽球細胞株における GLAST 蛋白質の細胞内分布. GFP 融合 GLAST をレンチウイルスベクターを用いて赤芽球系細胞株 K562 細胞に導入した。GLAST は細胞膜のみならずリサイクリングエンドソームマーカーである RAB11 と局在を共にしたものの、リソソーム (LAMP2)、小胞体 (Calnexin; CNX)、あるいはゴルジ体 (GM130) と局在が一致しなかった。

(2) GLAST と相互作用する蛋白質の同定

shRNA ライブラリーについては、上記膜蛋白質分子特異的な shRNA は抑制効果を示したものの、HEK293 細胞 cDNA 由来制限酵素消化断片を用いた shRNA レンチウイルスライブラリーを上記恒常的発現細胞株に適用した場合、明らかな抑制は見られなかった。

そこで、すでに犬赤血球における酸化抵抗性異常に関与する多型として報告した犬 GLAST 型グルタミン酸トランスポーターをトランスポーター病の標的分子として、野生型および変異型 GLAST 分子と相互作用する結合蛋白質の探索を試みた。GLAST 発現細胞株として赤芽球系細胞 K562 あるいは人腎由来 HEK293 細胞を用い、免疫沈降法を応用し GLAST 結合タンパク質の探索を実施したところ、2種の PDZ ドメイン蛋白質 NHERF1 および NHERF2 が GLAST 分子の C 末端に結合することが明らかとなった。この相互作用は結合する GLAST 分子の糖鎖成熟度に差異が見られることから、それぞれ異なる細胞内小器官において相互作用し、GLAST の細胞表面発現を調節しているものと考えられた。また、このほかにも新規結合蛋白質と考えられる分子を検出した。

図2. GLAST 蛋白質と PDZ ドメイン蛋白質 NHERF1 および NHERF2 都の相互作用. GFP 融合 GLAST 蛋白質および N 末端 V5 タグ配列付加 NHERF1 あるいは NHERF2 を HEK293T 細胞に一過性に導入し、抗 V5 抗体にて免疫沈降を



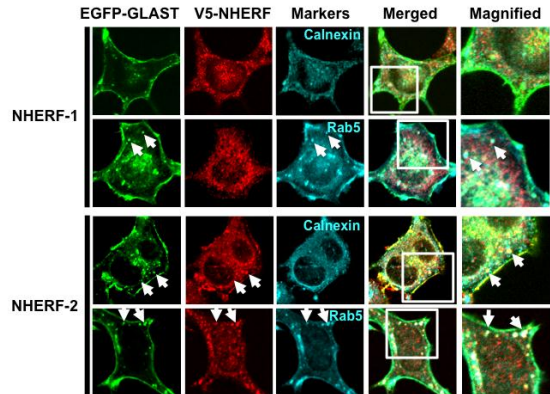
行い、抗 GFP 抗体により免疫沈降物中の GLAST 蛋白質を検出した。NHERF1 と共沈した GLAST は未成熟型の N 結合型糖鎖を付加している一方、NHERF2 は成熟型糖鎖を付加した分子とも相互作用している。

(3) PDZ ドメイン蛋白質の GLAST の細胞内輸送に及ぼす影響

2 種の PDZ ドメイン蛋白質 NHERF1 および 2 が GLAST 分子の C 末端に結合することを明らかにしたことから、この蛋白質間相互作用のグルタミン酸トランスポーターの表面発現調節機構に及ぼす影響を、生化学的および形態学的手法により解析した。

従来これらの PDZ ドメイン蛋白質は主に細胞膜における足場蛋白質として機能し、トランスポーター分子の細胞膜への局在に関与すると考えられてきた。しかしながら、本研究において、これらの分子の結合が細胞内小器官特異性特異的に起こり、それぞれの小器官間の細胞内輸送に影響することが示唆された。NHERF1 は主に小胞体で、NHERF2 は細胞膜でグルタミン酸トランスポーターと相互作用するものと考えられた。また、小胞体の NHERF1 を含むトランスポーター複合体は、250 kDa の新規アダプター蛋白質と相互作用することを見出し、新たな細胞表面発現調節機構の分子基盤の解明に寄与するものと考えられた。また、NHERF2/グルタミン酸トランスポーター複合体は初期エンドソームにも分布し、small GTPase の一種である Rab5 と共局在したことから、NHERF2 は細胞膜から初期エンドソームへのエンドサイトーシスの過程を促進するものと考えられた。以上の結果より、PDZ ドメイン蛋白質を含む新たなトランスポーター複合体と Rab ファミリー small GTPase の相互作用によるトランスポーターの細胞内小胞輸送の調節の分子機構の一部が解明され、この複合体の形成機構がトランスポーター病に関与することが示唆された。

図 3. GLAST 蛋白質と NHERF1 あるいは NHERF2 の細胞内局在。GLAST 蛋白質は主に細胞膜に分布するが、NHERF2 と細胞内の小胞様構造と共局在する様子が観察された。この部位は初期エンドソームマーカーである Rab5 のシグナルとほぼ一致し、NHERF2 が GLAST のエンドサイトーシスに NHERF2 が関与していることが示された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

①Wang, C.C., Sato, K., Otsuka, Y., Otsu, W., Inaba, M. (2012) Clathrin-mediated endocytosis of mammalian erythroid AE1 anion exchanger facilitated by a YXXΦ or a noncanonical YXXXΦ motif in the N-terminal stretch. *J Vet Med Sci.* 74: 17-25. 査読有.

<http://dx.doi.org/10.1292/jvms.11-0345>

②Wang, C.C., Sato, K., Otsuka, Y., and Inaba, M. (2011) Cell surface expression and internalization of the murine erythroid AE1 anion exchanger tagged with an extracellular FLAG epitope. *Jpn J Vet Res.* 59: 157-164. 査読有.

<http://hdl.handle.net/2115/47728>

③Komatsu, T., Arashiki, N., Otsuka, Y., Sato, K., Inaba, M. (2010) Extrusion of Na, K-ATPase and transferring receptor with lipid raft-associated proteins in different populations of exosomes during reticulocyte maturation in dogs. *Jpn. J. Vet. Res.* 58: 17-27. 査読有.

<http://hdl.handle.net/2115/43054>

④ Komatsu, T., Sato, K., Otsuka, Y., Arashiki, N., Tanaka, K., Tamahara, S., Ono, K., Inaba, M. (2010) Parallel reductions in stomatin and Na, K-ATPase through the exosomal pathway during reticulocyte maturation in dogs: stomatin as a genotypic and phenotypic marker of high K⁺ and low K⁺ red cells. *J. Vet. Med. Sci.* 72:893-901. 査読有.

<http://dx.doi.org/10.1292/jvms.10-0030>

⑤Arashiki N, Otsuka Y, Ito D, Yang M, Komatsu T, Sato K, Inaba M. (2010) The covalent modification of spectrin in red cell membranes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem*

Biophys Res Commun. 391:1543-1547. 査読有.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.121>

⑥Adachi H, Ito D, Kurooka T, Otsuka Y, Arashiki N, Sato K, Inaba M. (2009) Structural implications of the EL(KIQ)(L/C)LD(A/G)DD sequence in the C-terminal cytoplasmic tail for proper targeting of anion exchanger 1 to the plasma membrane. Jpn J Vet Res. 57:135-146. 査読有.
<http://hdl.handle.net/2115/39935>

[学会発表] (計 13 件)

①王 振吉、佐藤 耕太、大津 航、大塚 弥生、稲葉 睦. アニオン交換輸送体 AE1 のクラスリン依存性エンドサイトーシスを規定する N 末端領域の YXXΦあるいは YXXXΦシグナル配列モチーフ. (第 84 回日本生化学会大会、2011.9.23. 国立京都国際会館、京都市)

②佐藤 耕太、大津 航、大塚 弥生、稲葉 睦. PDZ ドメイン蛋白質 NHERF-1 および NHERF-2 によるグルタミン酸トランスポーター-GLAST の細胞表面発現調節. (第 152 回日本獣医学会学術集会 2011.9.19. 大阪府立大学、堺市)

③王 振吉、大津 航、大塚 弥生、佐藤 耕太、稲葉 睦. アニオン交換輸送体 AE1 の細胞内への輸送を規定する N 末端領域配列の同定 (第 33 回日本膜学会年会 2011.5.13. 東京・産業技術総合研究所臨海副都心センター別館 11 階、東京都)

④王 振吉、大津 航、大塚 弥生、佐藤 耕太、稲葉 睦. 細胞質内ドメイン YXX・配列によるマウス Anion Exchanger 1 (AE1) の細胞内への小胞輸送制御. (第 150 回日本獣医学会学術集会 2010.9.17. 帯広畜産大学、帯広市)

⑤桂島 勇輔、大津 航、大塚 弥生、佐藤 耕太、稲葉 睦. R664X 変異 Anion Exchanger 1 の小胞体関連分解における Bap31 と derlin-1 の働き. (第 150 回日本獣医学会学術集会 2010.9.17. 帯広畜産大学、帯広市)

⑥佐藤 耕太、大津 航、大塚 弥生、稲葉 睦. GLAST 型グルタミン酸輸送体発現赤芽球細胞株の確立と GLAST 分子の細胞内分布の解析. (第 32 回日本膜学会年会 2010.5.13. 東京・産業技術総合研究所臨海副都心センター別館 11 階、東京都)

⑦大塚 弥生、大村 俊弥、大津 航、黒木 一仁、森田 光夫、佐藤 耕太、稲葉 睦. 牛赤血球膜グライコフォリン A&B : 性状と血液型抗原との関連. (第 148 回日本獣医学会学術集会、2009.9.25. とりぎん文化会館、鳥取市)

⑧佐藤 耕太、大津 航、王 振吉、大塚 弥生、稲葉 睦. 犬 GLAST 型グルタミン酸輸送体遺伝子の赤芽球における転写活性に関与するプロモーター配列. (第 148 回日本獣医学会学術集会、2009.9.26. とりぎん文化会館、鳥取市)

⑨大津 航、大塚 弥生、佐藤 耕太、稲葉 睦. 赤血球型 AE1 の膜トラフィック : N 末端領域 ΦXΦXΦ配列による ER-Golgi 間輸送制御. (第 148 回日本獣医学会学術集会、2009.9.26. とりぎん文化会館、鳥取市)

⑩佐藤 耕太、大津 航、王 振吉、大塚 弥生、稲葉 睦. 赤芽球における犬 GLAST 型グルタミン酸輸送体遺伝子プロモーターの短鎖脂肪酸による活性化. (第 82 回日本生化学会大会 2009.9.23. 神戸ポートアイランド、神戸市)

⑪大津 航、大塚 弥生、佐藤 耕太、稲葉 睦. 赤血球型 AE1 膜トラフィック : N 末端領域 ΦXΦXΦ配列による ER-Golgi 間輸送制御. (第 82 回日本生化学会大会 2009.9.23. 神戸ポートアイランド、神戸市)

⑫大塚 弥生、大村 俊弥、新敷 信人、小松 智彦、黒木 一仁、佐藤 耕太、稲葉 睦. 牛赤血球膜グライコフォリン A&B : 性状と血液型抗原との関連. (第 31 回日本膜学会年会、2009.5.22. 東京理科大学森戸記念館、東京都)

⑬大津 航、大塚 弥生、佐藤 耕太、稲葉 睦. 赤血球型 AE1 膜トラフィック : N 末端領域 ΦXΦXΦ配列による ER-Golgi 間輸送制御. (第 31 回日本膜学会年会、2009.5.22. 東京理科大学森戸記念館、東京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 耕太 (SATO KOTA)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：50283974

(2) 研究分担者

稲葉 睦 (INABA MUTSUMI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：00183179

(3) 連携研究者

山本 雅之 (YAMAMOTO MASAYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50166823