

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19208027
 研究課題名 (和文) ERから細胞膜へ：膜骨格裏打ちユニット小胞の細胞内トラフィックと疾患
 研究課題名 (英文) From the ER to the plasma membrane: Vesicular transport of membrane skeleton units and the diseases
 研究代表者
 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

研究成果の概要 (和文)：細胞膜構造の機能的構築・形成メカニズムの解明と疾患分子病態解明への応用を目標に、「膜骨格はいかにして作られるのか」を具体的目的に据えた解析を行った。膜タンパク質 AE1 と先天性溶血性貧血の原因となるその変異体を利用した小胞体 ER における足場タンパク質アンキリンとの相互作用、ER からの小胞輸送を規定する特定のアミノ酸配列の解明等により、小胞体における膜骨格ユニット形成の可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：The long-range goal of this project is to investigate the mechanism for assembly and functional organization of the red cell membrane skeleton. Here, we analyzed the synthesis, quality control, interaction with an erythroid scaffolding protein ankyrin in the endoplasmic reticulum (ER), and the ER exit signal of anion exchanger 1 (AE1) and its mutants. The results obtained together indicate that the membrane skeletal network is assembled in the ER membrane as a small unit followed by vesicular transport to the plasma membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2007年度 | 19,700,000 | 5,910,000 | 25,610,000 |
| 2008年度 | 9,100,000 | 2,730,000 | 11,830,000 |
| 2009年度 | 9,500,000 | 2,850,000 | 12,350,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 38,300,000 | 11,490,000 | 49,790,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：細胞膜、小胞体、トラフィック、膜骨格、疾患、赤血球膜、遺伝

1. 研究開始当初の背景

(1) 膜骨格の意義：役割と疾患

膜骨格 membrane skeleton は、細胞膜の内側を網目状に裏打ちして物理的安定性と柔軟性を付与し細胞膜を支える構造である。膜骨格は、スペクトリン、ジストロフィン、ある

いはフォドリンなど、よく似た構造の紐状蛋白質間の“横”方向のつながりと、これらと膜内在性蛋白質との“縦”方向のつながりによって形成される。膜骨格の機能的構築に関わる分子の異常は、筋ジストロフィーや溶血性貧血を初めとする細胞・組織の機能異常や

崩壊による様々な先天性疾患の原因となる。

(2) 赤血球膜骨格をモデルとした仮説

赤血球膜には膜骨格の典型的な構造を見ることが出来る。スペクトリンが、短いF-アクチンで、“横”につなげられた網目状構造を作り、アンカー蛋白質（アンキリンやプロテイン4.1）を介する“縦”のつながりによって、膜貫通性蛋白質であるAE1 (anion exchanger 1, band 3)やグライコフォリン C (GPC)と連結され脂質二重層を裏打ちしている。「膜骨格はどのような分子機序で形成されるのか？」という疑問は、膜骨格機能に大きく依存した赤血球の生理、および貧血に結びつく病態を把握するための最も重要な課題のひとつとして、また普遍的な膜疾患病態研究の大きな解決目標である。仮説のひとつは従来の定説、即ち「赤芽球分化前期に作られる、“横”につながる骨格蛋白質を、後期に細胞膜上に出現するAE1が“縦”のつながり形成のトリガーとなって連結し、膜脂質二重層を裏打ちする」であり、もうひとつの考え方が、代表者が提唱する“ユニット仮説”、即ち、「何らかの膜内在性タンパク質あるいはAE1が関わる“縦”と“横”のつながりが小規模なユニットとして小胞体(ER, endoplasmic reticulum)膜上に形成され、次に遊離した裏打ちユニット小胞が細胞内トラフィックを経て細胞膜に融合しリモデリングによって全体が構築される」という考え方である。

2. 研究の目的

膜骨格の“縦”のつながりに焦点を置いて、上記“ユニット仮説”を実証し、加えて“GPCによるAE1の代償作用”の検証を行い、赤血球膜骨格機能的構築の分子機構解明を完成段階に導くことを目的とする。具体的には、既報の培養細胞発現系等を利用し、ERにおける膜骨格の足場タンパク質（アンカータンパク質）のAE1、あるいはGPCとの相互作用、そしてそれらが小胞輸送により細胞表面に運ばれることを実証する。また、GPCのノックアウトマウス(*GPC^{-/-}*)、AE1とGPCのダブルノックアウトマウス(*AE1^{-/-}GPC^{-/-}*)、ならびに赤芽球系分化早期からAE1を過剰発現するトランスジェニックマウス(*AE1tg*)を作成し、それらの赤血球における膜骨格形成と赤血球病態の有無等を解析することで、上記実験系の生体内検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞への膜骨格遺伝子導入によるユニット小胞の動態解析：赤芽球系培養細胞(MELhipod, K562)、HEK293、HeLa細胞、あるいは正常骨髄由来赤芽球前駆細胞(*lin⁻TER119⁺CD71⁺*)に緑色蛍光色素(GFP)で標識したAE1、その“縦”連結パートナーのアンキリン、グライコフォリンCと同じく

プロテイン4.1、さらに膜骨格の主体となるスペクトリンを個々に発現させ、個々の細胞内動態。ならびにタンパク質間の相互作用を解析する。免疫組織化学的手法でタンパク質の発現と細胞内局在を、また、定量RT-PCRで各mRNAの発現量を検討する。タンパク質の局在は、共焦点レーザー顕微鏡/デコンボリューション蛍光顕微鏡を用い、小器官(ER、Golgi、リソソーム等)、および細胞骨格(微少管、中間径フィラメント、F-アクチン)のマーカーと比較して細胞内局在を明らかにする。

(2) ERからの小胞輸送に関わる分子内情報の解析：AE1の細胞質内領域における存在を前提とし、N-、あるいはC-領域の各種変異体を上記同様の培養細胞に発現させ細胞内分布/動態を解析する。

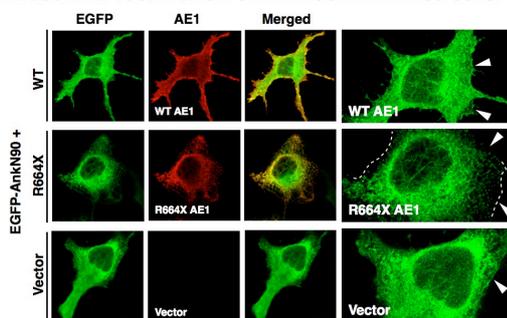
(3) 遺伝子改変マウスの作出：AE1とGPCの遺伝子改変マウス(C57BL6/J系統)の作製を行う。*AE1^{-/-}*は、研究協力者A. Chishti (Univ. Illinois at Chicago)から供与を受けたものを用いる。*GPC^{-/-}*と*AE1^{-/-}*との交配によりダブルノックアウト系統マウスを作成し、これらのマウス由来骨髄赤芽球前駆細胞における細胞骨格タンパク質の解析を行う。

4. 研究成果

(1) ERにおける膜骨格基本構造の形成

①ERにおけるAE1とアンキリンの相互作用：HEK293細胞に正常(WT)AE1、ならびにER滞留を示すR664X AE1とEGFP-AnkN90を発現させ、それぞれの細胞内分布を解析した。EGFP-AnkN90は、単独では細胞質に小胞状分布(部分的にERに一致)したのに対し、AE1との共発現下では、WT、R664X各々との相互作用を反映して主に細胞膜、あるいはERに観察された(図1)。即ち、アンキリンとAE1の結合(膜骨格の基本構造形成)がERで生じ得ることが示された(Inaba et al., 投稿中)。

Intracellular localization of AnkN90 in HEK293 cells

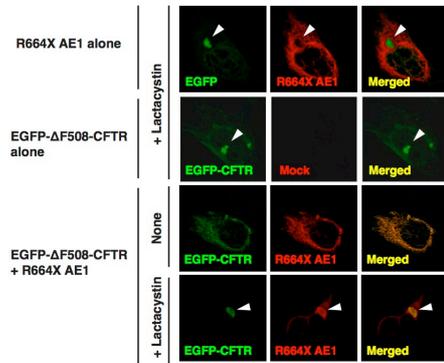


Expression of WT AE1 increases targeting of AnkN90 to the plasma membrane, whereas R664X AE1 causes ER retention of AnkN90.

図1. ERにおけるAE1とアンキリンの共在
②AE1とCFTRの相互作用：R664X AE1はERでユビキチン非依存性、糖鎖非依存性、かつ細胞質への逆行輸送なしにプロテアソームによる分解を受けた(ERAD, ER-associated

degradation)。これは CFTR の認識・分解機構とは全く異なる特徴である。ところが両者の共存時には、AE1 のプロテアソーム分解は CFTR と同様の ERAD の特徴を示した (図 2) (Adachi et al., 2010)。これは、AE1 と CFTR の特異的結合によるものであり、細胞膜における相互作用が既に ER において形成されていることを示すものでもある。

Possible association of ΔF508-CFTR with R664X AE1



Association of CFTR with R664X AE1

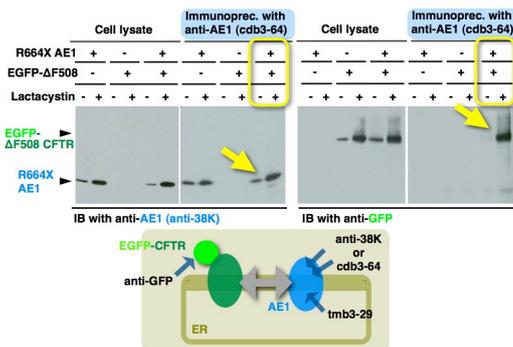


図 2. ER における AE1 と CFTR の相互作用
(2) ER-ERGIC 間小胞輸送を規定する AE1 分子内モチーフ

ヒト AE1 の C 末端 Δ11 変異体 (Ct Δ11) は小胞輸送の異常により尿細管性アシドーシスを生じる。これに対して牛 AE1 の Ct Δ11 は WT と同様に細胞膜に運ばれた。種々の動物由来 AE1 の Ct Δ11 にも小胞輸送の有無がみられた。①C 末端構造の影響: C 末端細胞質テール各種変異体の細胞内分布、安定性の解析から種間保存性の高い EL (K/Q) (L/C) LD (A/G) DD 配列が細胞膜トラフィックに重要なことを明らかにした。同時に、この配列と C 末端配列の意義は異なること、AE1 にはいくつかの異なる細胞膜トラフィックシグナルが存在する可能性が示された (Adachi et al., 2009)。

②N 末端構造内疎水性クラスター配列: N 末端細胞質ドメインの欠失、置換変異体、ならびに Ly49E をモデルとした検討から、N 末端近傍の ΦXΦXΦ 配列が ER と ERGIC の間の COPII 小胞による小胞輸送を規定することを明らかにした (図 3)。この輸送にはアダプタータンパク質 Sar1 と微小間構造が関与する (Otsu et

al., 投稿準備中; 生化学会等発表)。

③AE1 の細胞膜発現と細胞内輸送: K562、HEK293 細胞に mAE1L4-FLAG を発現させ、細胞表面に発現した AE1 を抗 FLAG 抗体で標識した後、細胞内輸送を解析した。mAE1L4-FLAG は、ER から Golgi を経て糖鎖の修飾を受けて細胞膜に発現、その後、細胞内に小胞化して取り込まれた後、分解を受けた。AE1 の N 末端細胞質ドメイン内の特定の YXXΦ 配列を破壊すると、この細胞内小胞への輸送の遅延がみられた。ところが、mAE1L4-FLAG の細胞質ドメインをこの特定 YXXΦ 配列を欠く牛 AE1 の配列に置換しても細胞内輸送には影響がなかった。したがって、この細胞内輸送にもいくつかの独立したシグナルの存在が示唆された (Wong et al., 投稿準備中)。

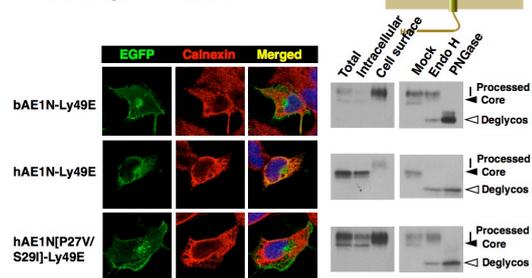
(3) マウス生体における解析

GPC^{-/-}の作出を試みたが、致死性であるらしくホモ個体は得られていない。胎生時期の解析を行うべく継続している。したがって AE1^{-/-}GPC^{-/-}についても作出は実際上困難であり、目標は達成できていない。したがって、上述の培養細胞系における解析を主体として行った。

(4) 赤血球膜グライコフォリンの解析

①牛赤芽球系細胞 ER における細胞膜構造形成を解析する基礎データとして、GPC に加え、牛の GPA、GPB の遺伝子とタンパク質としての実体を解明した。いずれの分子も遺伝子のポリモルフィズムがあり、特に GPB では遺伝子重複によるいくつかのバリエーションが存在した。これらの分子は実際には赤血球膜で 400 kDa 以上の高分子複合体として存在すること、そこには CD58 と AE1 が含まれることを明らかにした。この複合体が ER で形成されるか否かを検討中である。

Role of the ΦXΦXΦ motif in traffic of AE1N-Ly49E chimeras



A human AE1 mutant, EGFP-hAE1AC11-P27V/S29I, in which the ΦXΦXΦ motif was introduced showed expression in the plasma membrane with high efficiency and N-glycan processing, whereas the AC11 mutant was retained in the ER.

図 3. ER-ERGIC 間小胞輸送を規定する AE1 の細胞質ドメイン内疎水性クラスター配列

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 1 1 件)

- ①Adachi, H., Takao Kurooka, Wataru Otsu, and Inaba, M. (2010) The forced aggresome formation of a bovine anion exchanger 1 (AE1) mutant through association with DF508-cystic fibrosis transmembrane conductance-regulator upon proteasome inhibition in HEK293 cells. *Jpn. J. Vet. Res.* **58**, in press (査読有)
- ②Komatsu, T., Arashiki, N., Otsuka, Y., Sato, K., and Inaba, M. (2010) Extrusion of the Na,K-ATPase and the transferrin receptor in different population of exosomes with lipid raft-associated proteins during reticulocyte maturation in dogs. *Jpn. J. Vet. Res.* **58**, 17-27 (査読有)
- ③Watanabe, Y., Hiraoka, W., Igarashi, M., Ito, K., Shimoyama, Y., Horiuchi, M., Yamamori, T., Yasui, H., Kuwabara, M., Inagaki, F., and Inanami, O. (2010) A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 522-528 (査読有)
- ④Komatsu, T., Sato, K., Otsuka, Y., Arashiki, N., Tanaka, K., Tamahara, S., Ono, K., and 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**, in press (Mar 10, Epub ahead) (査読有)
- ⑤Arashiki, N., Otsuka, Y., Ito, D., Yang, M., Komatsu, T., Sato, K., and Inaba, M. (2010) 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)
- ⑥Nagasaki, K., Ikoma, T., Katsuda, S., Tonegawa, T., Tanaka, J., Ohyama, M., Hayashida, K., Nakamura, T., Sato, H., Ito, S., Sasaki, N., and Agui, T. (2009) Amelioration of anemia in the ICGN mouse, a renal anemia model, with a subcutaneous bolus injection of erythropoietin adsorbed to hydroxyapatite matrix. *J. Vet. Med. Sci.* **71**, 1365-71. (査読有)
- ⑦Adachi, H., Ito, D., Kurooka, T., Otsuka, Y., Arashiki, N., Sato, K., and Inaba, M. (2009) Structural implications of the EL(K/Q)(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)
- ⑧Nunomura, W., Parra, M., Hebiguchi, M., Sawada, K., Mohandas, N., and Takakuwa, Y. (2009) Marked difference in membrane-protein-binding properties of the two isoforms of protein 4.1R expressed at early and late stages of erythroid differentiation. *Biochem. J.* **417**, 141-148 (査読有)
- ⑨Abe, K., Shimizu, R., Pan, X., Hamada, H., Yoshikawa, H. and Yamamoto, M. (2009) Stem cells of GATA1-related leukemia undergo pernicious changes after 5-fluorouracil treatment. *Exp. Hematol.* **37**, 435-445 (査読有)
- ⑩ Otsuka, Y., Ito, D., Kustuoka, K., Arashiki, N., Komatsu, T., and Inaba, M. (2008) Expression of α -hemoglobin stabilizing protein and cellular prion protein in a subclone of murine erythroleukemia cell line MEL. *Jpn. J. Vet. Res.* **56**, 75-84 (査読有)
- ⑪ Sato, K., Otsuka, Y., Arashiki, N., Komatsu, T., Wang, C.-C., Tamahara, S., and Inaba, M. (2008) Identification of genes for two major sialoglycoproteins, glyophorin A and glyophorin C in canine red cell membranes. *Jpn. J. Vet. Res.* **55**, 103-114 (査読有)
- [学会発表] (計 11 件)
- ①田中正太郎、高桑雄一：蛍光相関分光法を用いた膜骨格蛋白質 protein 4.1 の細胞内動態の観察、日本膜学会第 32 年会、2010 年 5 月 14 日、産業技術総合研究所臨界副都心センター
- ② Otsuka, Y., Otsu, W., Arashiki, N., Kurogi, K., Sato, K., Inaba, M. : Characterization of glyophorins A and B involved in the major high molecular weight sialoglycoprotein in bovine red cell membranes. 日本生化学会第 82 回大会、2009 年 10 月 23 日、神戸ポートアイランド
- ③Otsu, W., Otsuka, Y., Kurooka, T., Sato, K., Inaba, M. : The role of the N-terminal region of the cytoplasmic domain containing the $\Phi X \Phi X \Phi$ sequence in the trafficking of erythroid anion exchanger 1 to the plasma membrane. 日本生化学会第 82 回大会、2009 年 10 月 23 日、神戸ポートアイランド
- ④大塚弥生、新敷信人、黒木一仁、佐藤耕太、稲葉 睦：牛赤血球膜グライコフォリンの同定：高分子多型と血液型抗原の形成、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 25 日、鳥取とりぎん会館

- ⑤ Inaba, M., Otsu, W., Otsuka, Y., and Sato, K. The role of the N-terminal region of the cytoplasmic domain containing the $\Phi X\Phi X\Phi$ sequence in the trafficking of erythroid anion exchanger 1 to the plasma membrane. Gordon Research Conferences, Red Cell, June 25, 2009, New England University, MA, USA.
- ⑥ 大塚弥生、新敷信人、小松智彦、大津航、黒木一仁、佐藤耕太、稲葉 睦：牛赤血球グライコフォリン A&B：性状と血液型抗原との関連、日本膜学会第30年会、2009年5月22日、東京理科大学森戸記念館
- ⑦ 大津航、安達啓一、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉 睦：赤血球 AE1 の膜トランスポート：N末端 $\Phi X\Phi X\Phi$ 配列によるER-Golgi間輸送制御、日本膜学会第30年会、2009年5月22日、東京理科大学森戸記念館
- ⑧ 大津航、安達啓一、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉 睦：AE1 の細胞内輸送における細胞質内領域モチーフの役割、日本生化学会第80回大会、2008年12月11日、神戸ポートアイランド
- ⑨ 稲葉 睦：手法で語る生体膜研究、日本膜学会第29年会、2008年5月16日、東京理科大学森戸記念館
- ⑩ 大津航、安達啓一、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉 睦：AE1 の細胞内輸送を規定する細胞質ドメインの疎水性クラスター、日本膜学会第29年会、2008年5月16日、東京理科大学森戸記念館
- ⑪ 稲葉 睦：牛の遺伝性球状赤血球症：バンド3 (AE1) 欠損に基づく病態と応用研究 (シンポジウム「血液学研究における疾患動物モデルの作製と応用」)、第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会合同総会、2007年10月11日、パシフィコ横浜

[図書] (計1件)

- ① Inaba, M. and Messick, J. B. (2010) Chapter 29: Erythrocyte membrane defects. In Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed. (Weiss, D. and Wardrop, K. J. eds.), pp. 187-195, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA.

[その他]

ホームページ等

- ① 主催関連研究会：獣医臨床遺伝研究会、URL: <http://square.umin.ac.jp/jsacg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

安居院 高志 (AGUI TAKASHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：00212457

稲波 修 (INANAMI OSAMU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：10193559

大塚 弥生 (OTSUKA YAYOI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・博士研究員
研究者番号：30396303

渡邊 信久 (WATANABE NOBUHISA)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：70212321

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

高桑 雄一 (TAKAKUWA YUICHI)

東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：40113740

大田 寛 (OHTA HIROSHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号：50431333

梅村 孝司 (UMEMURA TAKASHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：00151936

日笠 喜朗 (HIKASA YOSHIKI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30165071