

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370060

研究課題名(和文) 酸性オルガネラにおける pH ホメオスタシスの制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of pH homeostasis in acidic organelles

研究代表者

前田 裕輔 (MAEDA, YUSUKE)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：00294124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000 円、(間接経費) 4,740,000 円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ装置特異的な pH 上昇を主病態とする GPHR 欠損線維芽細胞の解析から、1) 糖鎖修飾異常は糖転移酵素の局在異常ではなく糖ヌクレオチドトランスポーターの活性低下や糖転移酵素複合体形成異常が主たる原因であること、2) コレステロール生合成酵素群の転写とコレステロール量がともに低下していることを報告し、そのメカニズムとして、膜接触場を介したコレステロール輸送が障害されその分布異常がおこっていること、3) 皮膚基底細胞特異的 GPHR ノックアウトマウスの解析から、基底細胞の空胞化や層板顆粒の形態・機能異常により表皮のホメオスタシスが破壊され異常な水分損失と毛根形成不全が起こること、を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：By analyzing GPHR-deficient mouse embryonic fibroblast (MEF) in which major pathology is a raised Golgi pH, we clarified 1) impaired glycosylation is caused by reduced activities of nucleotide-sugar transporter and aberrant complex formation of glycosyltransferases but not by mislocalization of glycosyltransferases, 2) both transcriptions of several genes involved in cholesterol biosynthesis and the amount of intracellular cholesterol are reduced in GPHR-deficient MEF and it is most likely that the phenotype is caused by abnormal cholesterol distribution due to the impaired cholesterol trafficking through the membrane contact site between the ER and Golgi apparatus, and 3) skin basal cell-specific gene targeting revealed that GPHR is essential for the homeostasis of the epidermis including the formation of lamellar bodies and for the barrier function.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ゴルジ装置 pH コレステロール 糖鎖修飾 輸送 膜コンタクト部位 GPHR

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は、生命の営みのために、細胞増殖・分化、エネルギー代謝、細胞成分の生合成・輸送、シグナル応答・伝達など数多くの複雑な反応を非常に巧妙に調節している。それらは時間的、空間的な調節機構を使うことによって効率的に達成されている。細胞のコンパートメント化、即ちオルガネラ(細胞内小器官)はそういった巧妙な空間的調節機構の一つであり、それぞれの機能・役割にとって最適な環境やタンパク質・脂質成分を保持している。その環境を規定する重要な因子の一つは pH である。細胞質が細胞内ホメオスタシスを維持する為に、代謝活動によって生産される酸(プロトン)を、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送系や  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送系によって、その pH を中性付近に保っているということはよく知られている。それに対して、分泌経路、エンドサイトーシス経路に位置する酸性オルガネラであるゴルジ装置、分泌顆粒、エンドソーム、リソソームなどが各々固有の酸性 pH、大雑把に言ってタンパク質の流れに沿ってより酸性になる pH 勾配を維持しているという事実は意外と知られていない。しかしながら、この酸性 pH の重要性は、酸性化阻害剤を用いた実験や、pH 調節の破綻から生じる疾患の存在から明らかである。具体的には、酸性化阻害剤によってタンパク質輸送の遅滞・停止や糖鎖修飾不全などが観察され、また酸性 pH の調節・維持異常に起因するかまたはそれを伴う疾患として大理石病、デント病、遠位尿細管アシドーシス、皮膚弛緩症などが近年報告されてきた。それらの知見により酸性 pH の調節が重要な細胞内ホメオスタシスの一つ(以下、pH ホメオスタシスと呼ぶ)であると認識されつつあるが、その基本的機序に対する理解、即ち、どうやってその酸性 pH (勾配)が調節されているのか、なぜ酸性 pH の維持異常で様々な異常表現型が顕われ疾患の発症に結びつくのかという疑問に対する理解は依然として全く不十分である。理解が十分に進んでいない理由として、酸性 pH の調節に関与する機構・分子が十分に解明されていないことに加えて、オルガネラの pH を外部から制御する方法や酸性化障害を示すモデル細胞・個体がなかったことが主たる原因と考えられる。

最近、当研究課題申請者はタンパク質の輸送を制御する因子の網羅的同定という研究の中で独創的なスクリーニング法を用いてゴルジ装置特異的に酸性化障害を示す初めての変異細胞株を樹立し、同時にその責任遺伝子 *GPHR* を発現クローニング法によって同定した。変異細胞株の解析により *GPHR* タンパク質がゴルジ装置に於いて初めて同定されたカウンターイオンチャネルでありゴルジ装置の酸性化に貢献し、タンパク質輸送のみならず糖鎖修飾やゴルジ体の形態維持に重要な役割を果たしていることを報告した。これは、ゴルジ装置の酸性 pH ホメオスタシスの様々な生理的役割を明らかにするために、*GPHR* 変異細胞やノックアウト(ダウン)マウス・細胞という優れたモデル細胞・個体を初めて持ち得たことを意味する。

## 2. 研究の目的

細胞内オルガネラの pH ホメオスタシスは、近年、疾患との関連からも注目されているが、技術的な困難さによりこれまであまり研究がなされていなかった。当研究課題は、申請者が最近樹立したゴルジ装置の pH 酸性化障害を示す変異細胞やノックアウトマウスなどを用いることによって、また独創的な方法でリソソームの pH 調節・維持障害を示す変異細胞株を新規樹立・解析することで、オルガネラ pH ホメオスタシスの生理的機能・調節機構に対する包括的理解、即ち、どうやってその酸性 pH (勾配)が調節されているのか、なぜ pH の調節・維持障害で様々な異常表現型が顕われ疾患の発症に結びつくのかという機序を明らかにしていくことを目的とする研究である。

## 3. 研究の方法

これまでの申請者の研究成果を土台として、独創的な方法を折り込み、ゴルジ装置とリソソームにおける pH 調節・維持障害を示す変異細胞株・マウスを樹立・解析することで、酸性オルガネラの pH ホメオスタシスの制御機構・生理的役割とその作用機構の解明に包括的・多角的にアプローチする。そのために(1)セルソーターによるリソソーム pH 測定法を用いその pH 異常変異細胞株を樹立・解析する。(2) *GPHR* 欠損細胞の表現型であるタンパク質輸送遅滞・コレ

ステロール生合成減少・糖鎖修飾異常の分子メカニズムを発現クローニング法・レポーターアッセイ法等を通じて解明する。また、マイクロアレイなどの網羅的解析法を通じて、他の異常表現型を明らかにする。

(3) *GPHR* のノックアウトマウスを作出・解析し、生体における pH ホメオスタシスの役割を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) セルソーターによるリソソーム pH 測定法を用いその pH 異常変異細胞株を樹立・解析する。pH に対して異なった感受性を示す 2 種類の蛍光物質 (カスケードブルーとオレゴングリーン 488) で標識されたデキストランを作成しリソソームの pH を測定した結果、pH 4 から pH 7 までの pH を測定できることを確認した。しかし、付着細胞を付着したまま測定した時と細胞をディッシュから剥がした時で pH に違いが見られるという問題点が新たに判明した。現在、この問題点の解明と対策を検討中である。

(2) *GPHR* 欠損細胞の表現型であるタンパク質輸送遅滞・糖鎖修飾異常・コレステロール生合成減少の分子メカニズムを解明する。まず、ゴルジ装置酸性化環境の細胞機能に対する影響をゲノムワイドに解析するために、*GPHR* 遺伝子破壊をおこなったマウスから線維芽細胞を樹立した。この線維芽細胞は、以前変異原を用いて作成した *GPHR* 機能欠損ハムスター卵巣細胞株と比べ、酸性化障害・輸送障害のいずれもやや軽度であったが、糖鎖修飾不全を含め、同様の表現型を有していた。このマウス線維芽細胞を主に用いた解析から

糖鎖修飾異常に関しては i) 糖鎖異常は様々な糖鎖修飾のステップでおこっていることが質量分析により明らかになった。ii) 糖鎖転移酵素並びに糖ヌクレオチドトランスポーターの影響を詳細に検討しこれまで報告されてきた糖鎖転移酵素の局在異常が主たる原因ではなく糖ヌクレオチドトランスポーターの活性低下や糖転移酵素複合体形成不全等が主たる原因であることを初めて明らかにした。特に糖ヌクレオチドトランスポーターの強制発現は糖鎖異常を部分的ではあるが改善した。これらの内容に関して現在論文執筆中である。

pH 酸性化障害におけるタンパク質輸送遅滞に必須の新規因子を同定した。この分子の強制発現は糖鎖修飾異常も改善した。その機序としてこの分子の強制発現はゴルジ装置の pH を正常化することが判明した。このことはこの分子の標的タンパク質を明らかにすることでゴルジ装置の酸性 pH 調節機構を解明できる可能性があり pH ホメオスタシスを理解する上で非常に重要である。現在、標的タンパク質の同定も含め研究を継続中である。

このマウス線維芽細胞の転写産物を全ゲノムマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、コレステロールの生合成に関与している複数の遺伝子の転写が *GPHR* 欠損線維芽細胞で低下していることが判明した。定量的 PCR でも同様に複数のコレステロール生合成・代謝関連遺伝子の転写低下を確認した。コレステロール量は、小胞体中存在する濃度センサー/転写因子系が生合成酵素群の転写に対し負制御をもつことで厳密にコントロールされており、*GPHR* 欠損細胞のように生合成酵素群の転写とコレステロール量の両者がともに低下していることは特異であり、そのメカニズムとして、i) コレステロール量に対する小胞体センサーの閾値の低下など低コレステロール量に対する *SREBP2* 転写因子の慢性的活性化抑制、または ii) ニーマンピック病 C 型に見られるようにコレステロールの輸送障害による細胞内全コレステロール量と小胞体コレステロール量の解離による転写活性の調節異常、を想定した。i) コレステロール調節遺伝子群の主要な調節転写因子として *SREBP2* がよく知られている。*SREBP2* 応答性のレポーター遺伝子を導入し低コレステロール環境に対する *SREBP2* の活性化応答をみることで検定した。その結果、*GPHR* 欠損線維芽細胞では *SREBP2* の顕著な活性化異常を認めなかった。また *SREBP2* と同様のメカニズムでプロッセイシングをうけ活性化されることが知られている *ATF6* 転写因子の小胞体ストレスに対する活性化も軽度の低下を認めるのみであり、*SREBP2* の活性化制御はおおむね正常であると思われた。ii) 小胞体で新しく生合成されたコレステロールの大部分は小胞体とトランスゴルジネットワーク (TGN) が非常に近接した膜接触部位と呼ば

れる部位を介して小胞輸送非依存的に小胞体から TGN に輸送されると考えられており、もしこの輸送が阻害されれば小胞体にコレステロールが蓄積されやすくなり、その結果、SREBP2 活性化抑制とコレステロール生合成関連遺伝子の転写レベルの低下を招く一方、TGN から輸送される形質膜のコレステロール量の低下と細胞内全コレステロールの低下がもたらされることが予想された。これは、ニーマンピック病 C 型の病態機序と同様である（ただしコレステロールセンサーが小胞体にあることで全コレステロール量というアウトプットは正反対であるが）。この仮説が正しければ小胞体と形質膜でのコレステロール量の分布異常が予想されるので、超遠心ショ糖密度勾配分画法にて細胞を分画しコレステロール含量を測定したところ、GPHR 欠損線維芽細胞では小胞体のコレステロール量は正常にも拘らず形質膜分画のコレステロール量は減少しており、この仮説に合致することが分かった。次に膜接触部位を介したコレステロールの輸送には TGN に局在するホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) が重要な役割を果たすと考えられているので、ゴルジ装置の酸性化障害が PI4P レベルに影響を与えているかを検討した。その結果、GPHR 欠損線維芽細胞では、PI4P の TGN 局在が損なわれていることが明らかになった。よって、コレステロールの生合成系遺伝子の転写量と細胞内コレステロール量の低下という表現型が、膜接触場を介したコレステロール輸送が TGN における PI4P レベルの低下によって障害されていることに起因する可能性を示した。これらの内容に関して現在論文執筆中である。今後、この可能性をより確実化すると同時に、このモデルに基づいて膜接触場を介したコレステロール輸送のより詳細なメカニズムを解明していく必要がある

(3) *GPHR* のノックアウトマウスを作成・解析し、生体における pH ホメオスタシスの役割を明らかにする・・・K5-Cre との交配による *GPHR* コンディショナルノックアウトマウスの異常表現型の詳細な解析を高知大学医学部皮膚科との共同研究で行なった。基底細胞の空胞化や層板顆粒の形態・機能異常により表皮のホメオスタシスが

破壊され異常な水分損失と毛根形成不全が起こることが明らかになった。この成果は当課題期間中に論文報告した (*J. Invest. Dermatol.* 132(8): 2019-25, 2012)。

オルガネラの pH ホメオスタシスの理解は、基礎学問的見地からは細胞の生命活動の根幹の解明という重要な進歩であるが、医学的見地からはその異常を伴う疾患の病態のより深い理解と治療法の発見につながる事が期待でき、今後この研究をより発展させていくことは社会的にも大変意義深いものであると云える。

#### 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 3 件)

Wang, Y., Y. Murakami, T. Yasui, S. Wakana, H. Kikutani, T. Kinoshita and Y. Maeda. 2013. Significance of GPI-anchored protein enrichment in lipid rafts for the control of autoimmunity. *J. Biol. Chem.*, 査読有 288:25490-25499.

DOI: 10.1074/jbc.M113.492611

Seong, J., Y. Wang, T. Kinoshita and Y. Maeda. 2013. Implication of lipid moiety in oligomerization and immunoreactivities of GPI-anchored proteins. *J. Lipid Res.*, 査読有 54:1077-1091.

DOI: 10.1194/jlr.M034421

Tarutani, M., K. Nakajima, Y. Uchida, M. Takaishi, N. Goto-Inoue, M. Setou T. Kinoshita, S. Sano, P. M. Elias and Y. Maeda. 2012. *GPHR*-dependent functions of the Golgi apparatus are essential for formation of lamellar granules and the skin barrier. 査読有 *J. Invest. Dermatol.*, 132:2019-2025, May 10.

DOI: 10.1038/jid.2012.100.

[学会発表](計 9 件)

前田 裕輔, 奥崎 大介, 木下 タロウ: 膜コンタクト部位の可視化および定量化による細胞内コレステロール輸送の調節機構の解明 (仮タイトル)、第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、2014 年 10 月 15 日 (京都) (発表確定)  
前田 裕輔: ゴルジ装置の酸性環境によるコレステロール代謝の調節機構の解

明 第25回尾の医学研究財団研究成果発表会、2014年6月7日（大阪）

前田 裕輔，奥崎 大介，木下 タロウ  
ゴルジ装置の酸性環境による細胞内コレステロールの生合成・輸送の調節 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月5日（神戸）

木下タロウ、前田裕輔、藤田盛久 タンパク質への付加後に起こる GPI アンカーの構造変化の機能的意義 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月4日（神戸）

神澤範行、村上良子、前田裕輔、木下タロウ哺乳動物のアルキルアシル型GPIアンカーの生合成機構 第86回日本生化学会大会 2013年9月13日（横浜）  
Jihyoung Seong, Yatao Wang, Taroh Kinoshita, Yusuke Maeda.  
Implications of lipid moiety in oligomerization and immunoreactivities of GPI-anchored proteins. The 3<sup>rd</sup> Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology. 2013年7月2日（埼玉県和光市）

前田 裕輔，奥崎 大介，木下タロウ  
ゴルジ装置の酸性環境による細胞内コレステロールの生合成・輸送の調節 - Regulation of cholesterol biosynthesis and trafficking by acidic environment of Golgi apparatus 第85回日本生化学会大会 2012年12月15日（福岡）

Yusuke Maeda. The mechanisms by which Golgi acidic pH regulates glycosylation. New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences. 2012年9月27-28日（東京）

前田 裕輔. ゴルジ装置のpH環境による糖鎖修飾の制御メカニズム How does Golgi pH regulate glycosylation? 第84回日本生化学会大会 2011年9月22日（京都）

〔その他〕

ホームページ等

免疫不全疾患研究分野へようこそ!

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/m-en-eki-huzen/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 裕輔 (MAEDA YUSUKE)  
大阪大学・微生物病研究所・准教授  
研究者番号：00294124

### (3) 連携研究者

神澤 範行 (KANZAWA NORIYUKI)  
大阪大学・微生物病研究所・特任助教  
研究者番号：40452461