

副腎白質ジストロフィー：ALDPの構造・機能とミスセンス変異ALDPの細胞内動態

高橋 則正, 守田 雅志,* 今中 常雄

Adrenoleukodystrophy: Structure and Function of ALDP, and Intracellular Behavior of Mutant ALDP with Naturally Occurring Missense Mutations

Norimasa TAKAHASHI, Masashi MORITA,* and Tsuneo IMANAKA

Department of Biological Chemistry, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama City 930-0194, Japan

(Received August 7, 2006)

Adrenoleukodystrophy (ALD) is an inherited disorder characterized by progressive demyelination of the central nervous system and adrenal dysfunction. The biochemical characterization is based on the accumulation of pathognomonic amounts of saturated very long-chain fatty acid (VLCFA; $C > 22$) in all tissues, including the brain white matter, adrenal glands, and skin fibroblasts, of the patients. The accumulation of VLCFA in ALD is linked to a mutation in the *ALD* (*ABCD1*) gene, an ABC subfamily D member. The *ALD* gene product, so-called ALDP (*ABCD1*), is thought to be involved in the transport of VLCFA or VLCFA-CoA into the peroxisomes. ALDP is a half-sized peroxisomal ABC protein and it has 745 amino acids in humans. ALDP is thought to be synthesized on free polysomes, posttranslationally transported to peroxisomes, and inserted into the membranes. During this process, ALDP interacts with Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane protein (PMP), the complex targets Pex3p on the peroxisomal membranes, and ALDP is inserted into the membranes. After integration into the membranes, ALDP is thought to form mainly homodimers. Here, we chose nine arbitrary mutations of human ALDP with naturally occurring missense mutations and examined the intracellular behavior of their ALDPs. We found that mutant ALDP (S606L, R617H, and H667D) was degraded together with wild-type ALDP by proteasomes. These results suggest that the complex of mutant and wild-type ALDP is recognized as misfolded proteins and degraded by the protein quality control system associated with proteasomes. Further, we found fragmentation of mutant ALDP (R104C) on peroxisomes and it was not inhibited by proteasomes inhibitors, suggesting that an additional protease(s) is also involved in the quality control of mutant ALDP. In addition, mutation of ALDP (Y174C) suggests that a loop between transmembrane domains 2 and 3 is important for the targeting of ALDP to peroxisomes.

Key words—adrenoleukodystrophy; ALDP (*ABCD1*); missense mutation; targeting; degradation; proteasome

1. はじめに

副腎白質ジストロフィー (adrenoleukodystrophy, ALD) は、大脳における広範囲な脱髄と副腎不全を特徴とする重篤な神経変性疾患であり、厚生労働省の特定疾患に認定されている。病型は小児大脳型 ALD, 思春期大脳型 ALD, adrenomyeloneuropathy (AMN), 成人大脳型 ALD, 成人小脳脳幹型, Addison 単独型などの臨床型が存在するが、変異型と表現型との相関は認められない。典型的な小児大脳

型 ALD では 5 から 15 歳で発症する。多くは行動異常や性格変化などで見い出され、痙性麻痺、視力低下、聴力低下などを経て、数年で植物状態に陥る。¹⁻⁴⁾ 生化学的特徴としては、血中、脳白質や副腎皮質を始めとする種々の組織における炭素数 22 以上の極長鎖脂肪酸 (very long chain fatty acid; VLCFA) の蓄積が挙げられる。

極長鎖脂肪酸は主としてペルオキシソームで β 酸化されることより、本疾患はペルオキシソーム病の 1 つであると推定された。実際 ALD は、ペルオキシソーム病の中で最も頻度の高い疾患であり、男児 2—3 万人に 1 人の頻度で発症する X 連鎖性劣性遺伝形式の遺伝性疾患である。⁵⁻⁷⁾ 当初 ALD 皮膚線維芽細胞において、極長鎖脂肪酸 CoA 合成酵素

富山大学大学院医学薬学研究部分子細胞機能学研究室 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

*e-mail: masa@pha.u-toyama.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム GS2 で発表したものを中心に記述したものである。

活性が低下していることより、本酵素の遺伝子変異が ALD の原因ではないかと考えられていた。しかしながら、1993 年 Aubourg らによりポジショナルクローニングにより同定された遺伝子は、ペルオキシソーム ABC タンパク質 70 kDa peroxisomal membrane protein (PMP70) と相同性の高い、ABC タンパク質をコードしていた。^{8,9)} 彼らにより、この遺伝子は *ALD*、コードされるタンパク質は adrenoleukodystrophy protein (ALDP) と命名された。またペルオキシソーム ABC タンパク質は ABC ファミリー D に分類されるので、ALDP は ABCD1 と呼ばれる。

ALD の発症機構に関しては、その詳細なメカニズムは不明であるが、ALDP の変異により中枢神経系に異常蓄積した極長鎖脂肪酸が、ミエリン膜の不安定化を引き起こし、遊離したミエリン膜断片がミクログリアやアストロサイトを活性化し、¹⁰⁾ 産生された炎症性サイトカインや一酸化窒素が脱ミエリン化を引き起こしていると考えられている。¹¹⁾ 本稿では大学院シンポジウム「遺伝子解析による疾病発症のメカニズム解明及び創薬」において発表した内容を基に、ALDP の機能とミスセンス変異 ALDP の細胞内動態の解析について触れ、創薬の可能性を考えてみたい。

2. ALDP の構造と機能

ヒト ALD 遺伝子は、X 染色体 q28 に位置し、全長 21 kb で 10 個のエキソンからなり、ATP-binding cassette (ABC) タンパク質ファミリーに属する分子量約 83 kDa のペルオキシソーム膜タンパク質 ALDP をコードしている。ALDP はハーフサイズの ABC タンパク質であり、ペルオキシソーム膜に局在している。その構造は、Fig. 1 に示すように疎水性に富むドメインを持つ N 末端側半分がペルオキシソーム膜を 6 回貫通し、親水性に高い C 末端側半部分を細胞質側に露出するトポロジーを取っていると推定されている。実際 ALDP の C 末端ドメインが細胞質側を向いていることは、単離ペルオキシソームをプロテアーゼ処理することにより示唆されている。¹²⁾ 機能的ドメインについてみると、細胞質側に配向した領域に ABC タンパク質でよく保存された Walker A, B モチーフを持つ。また Walker B モチーフの直前に、ABC タンパク質に特徴的な 19 アミノ酸からなる C sequence を持つ。また第 5,

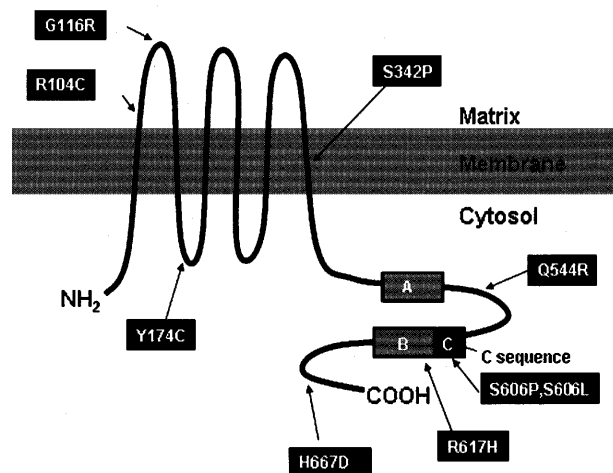


Fig. 1. A Putative Secondary Structure of ALDP and the Location of Naturally Occurring Missense Mutations

Six transmembrane domains (TMDs) are located in the NH₂-terminal half of the protein, and Walker A, B and ABC signature sequence (C sequence) are located in COOH-terminal half of the protein. The nine amino acids substitutions in the X-ALD patient are indicated. Mutation of R104C and G116R is located in loop 1 between TMD1 and 2. Y174 is in loop 2 between TMD2 and 3. S342P and Q544R are located in TMD6 and helical region between Walker A and B, respectively. S606P and S606L are in ABC signature motif. R617H and H667D are located in Walker B region and in COOH-terminal region, respectively.

6 膜貫通領域の間に、基質輸送に係わると考えられている Glu-Ala-Ala (EAA) 様モチーフを持つ。これらの領域のアミノ酸配列は、ABC タンパク質間でよく保存されている。ペルオキシソーム ABC タンパク質は、multidrug resistance protein (MDR) や cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) などの ABC タンパク質と比較してちょうど半分のサイズであり、ホモ若しくはヘテロ 2 量体を形成していると推定される。Aubourg らのグループは、酵母 two-hybrid system や免疫沈降実験を行い、ALDP は ALDP 若しくは他のペルオキシソーム ABC タンパク質 PMP70 や ALD-related protein (ALDRP) と C 末端領域に存在するヌクレオチド結合ドメイン (NBD) を介してホモでもヘテロダイマーでも形成し得ることを報告している。¹³⁾ 一方、Guimaraes らはマウス肝ペルオキシソームを用いた免疫沈降法により ALDP が大部分ホモダイマーとして存在していたことを報告している。¹⁴⁾ われわれはラット肝臓ペルオキシソームの各 ABC タンパク質の存在量を詳しく検討したところ、PMP70 と ALDP は約 7 : 1 で ALDRP や PMP70-related protein (P70R) はほとんど検出されなかった。また PMP70 と ALDP はそれぞれ複合体を形

成しているものの互いの共沈は認められず,¹⁵⁾ さらにペルオキシソーム膜からトリプシン処理で遊離した PMP70 の NBD がホモダイマーとして存在していることを確認した。¹⁶⁾ これらの事実からわれわれは少なくともラット肝臓ペルオキシソーム膜では PMP70 や ALDP はその大部分がホモダイマーとして存在していると考えている。

ALDP などのペルオキシソーム ABC タンパク質は、細胞質中の遊離型ポリソームで生合成されたのち、ペルオキシソームに輸送され、ペルオキシソーム膜上で機能単位であるダイマーを形成すると考えられている (Fig. 2)。われわれは以前培養細胞での [³⁵S] メチオニンのパルスチェイス実験や *in vitro* 輸送系を用いた実験により、PMP70 が post-translational にペルオキシソームに運ばれて膜に組み込まれることを報告した。¹⁷⁾ 疎水性の高い膜タンパク質がどのようにして post-translational にペルオキシソームに輸送されるかは不明であったが、われわれは遊離型ポリソームで翻訳中の PMP70 にペルオキシソーム形成因子の 1 つであるシャペロン様タンパク質 Pex19p が結合し可溶性の複合体を形成

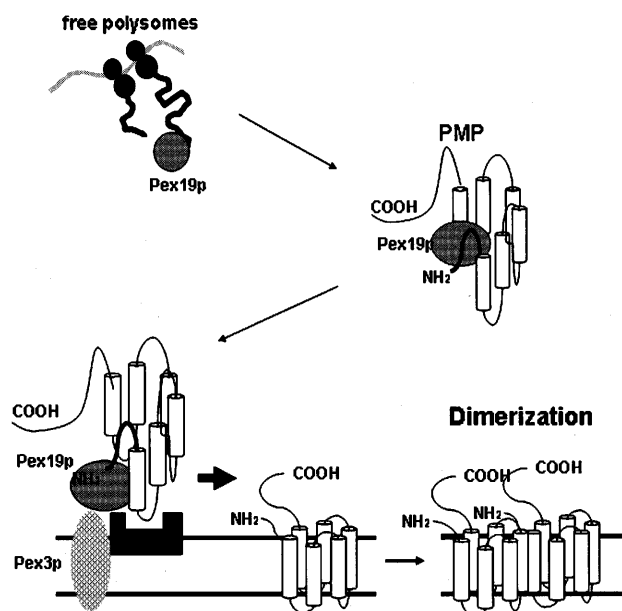


Fig. 2. Targeting and Insertion of PMP into Peroxisomal Membrane

Peroxisomal membrane proteins (PMP) including ALDP and PMP70 are thought to be synthesized on free polysomes and posttranslationally transported to peroxisomes, and inserted into the membranes. During this process, PMP interacts with Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of PMP and the complex is targeted to Pex3p on the peroxisomal membranes and then PMP seems to be inserted into the membranes through contact with a putative receptor protein. After integration into the membranes, ALDP is thought to form mainly homodimer.

すること,^{18,19)} その複合体はペルオキシソーム膜上の Pex3p と相互作用し、PMP70 に存在するペルオキシソーム局在化シグナルを介してペルオキシソーム膜へと移行することを見出した (Fig. 2)。よって ALDP の場合も同様な仕組みにより、ペルオキシソーム膜へと局在化すると考えている。ヒト ALDP の場合、膜貫通領域 1 (TMD1) の N 末端側に隣接する 66—87 位のアミノ酸に Pex19p が選択的に結合することが示されている。²⁰⁾ また種々の欠失を持つ ALDP を培養細胞に発現させ、その局在化を解析することにより、Pex19p との結合領域を含む TMD が ALDP のペルオキシソーム局在化に必須であることが示唆されている。²¹⁾

ALDP の機能に関しては、PMP70²²⁾ や酵母ペルオキシソーム ABC タンパク質 Pxa1p/Pxa2p²³⁾ が、長鎖脂肪酸 CoA の輸送に関与していることが報告されていること、また ALD では極長鎖脂肪酸の β 酸化の減少が認められることから、ALDP は極長鎖脂肪酸若しくは極長鎖脂肪酸 CoA のペルオキシソーム内への輸送に関与していると予想される。実際、ヒト線維芽細胞やグリオーマ細胞において RNAi を用いて ALDP をノックダウンすると、細胞の極長鎖脂肪酸 β 酸化が選択的に低下した。しかしながら、これらの実験はあくまで極長鎖脂肪酸の代謝を指標にした実験であり、ALDP が直接輸送する物質はまだ同定されていないのが現状である。

ABC タンパク質はその TMD が ATP の結合・加水分解のサイクルにより構造変化を起こし、基質結合部位の親和性を変化させ基質を排泄若しくは取り入れていると考えられている。最近バクテリア ABC タンパク質 HisP,²⁴⁾ DNA の複製に係わる Rad50/Mre11/Nbs1 複合体の Rad50 触媒ドメインと Mre11,²⁵⁾ バクテリアの MDR 様タンパク質 MsbA²⁶⁾ 及び BtuCD²⁷⁾ が結晶化された。これらのモデルでは、ATP 結合・加水分解による C sequence を含む領域の構造変化がそのタンパク質の機能発現を直接コントロールしていることが示されている。

われわれはラット肝ペルオキシソームを用いて、8-azido- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ や 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で photoaffinity ラベルすることにより、PMP70 や ALDP が ATP を結合し加水分解することを明らかにし

た.¹⁵⁾最近 ALDP を昆虫細胞 Sf21 に大量発現する系を構築し, ALDP が ATPase 活性を持つことを実証した.²⁸⁾また ATP 結合・加水分解に伴うラット肝臓ペルオキシソーム膜 PMP70 の構造変化をトリプシン感受性の違いを利用して調べた.¹⁶⁾その結果, ATP 結合・加水分解に伴って NBD の helical domain の構造が大きく変化することを示した. よって ALDP の場合も, このような ATP の結合・加水分解による NBD の構造変化が TMD に存在すると考えられている基質認識部位に伝わり, ペルオキシソーム内へ基質を輸送すると考えられる. 今後, 輸送の詳細な解析にはプロテオリポソーム系での解析が望まれる.

3. ALD 遺伝子の変異

ALD 遺伝子異常は, サザンブロット解析で見い出される欠失が認められる例もあるが, 多くの場合は小欠失や点変異であり, ALD 遺伝子の様々な部位に変異が認められる.⁵⁾現在までに多くの遺伝子異常が解析されている. このうちフレームシフト変異が 28%, ノンセンス変異が 8%, アミノ酸欠失が 4%, エキソン欠失が 4%, 最も多いミスセンス変異が 56% を占める (リストは <http://www.x-ald.nl> を参照). ミスセンス変異の頻度は, TMD1, 2 や EEA 様ドメインを含む TMD4, NBD 及び C 末端側の 650—700 位のアミノ酸領域に比較的高い. このことは, これらの領域が ALDP の機能に重要な役割を持つ可能性を示唆している. また興味深いことに, ALD 患者線維芽細胞における ALDP の蛍光抗体法や immunoblot 解析において, 変異 ALDP の約 50% は検出されず, 約 15% は発現が低下している. よって, 変異 ALDP の多くは, 生合成後細胞内で分解されている可能性がある. ALD 遺伝子のミスセンス変異を持つ ALDP が ABC タンパク質としての機能を欠損する以外に, タンパク質のミスフォールディングが細胞内のタンパク質品質管理機構により認識され, 選択的に分解を受けている可能性, 又は変異によりペルオキシソームへの局在化機構が異常をきたし, ミスターゲッティングが引き起こされる可能性が考えられる. しかしながら, 生合成された変異 ALDP がどのようなメカニズムで選択的に分解されるかは不明である.

4. ミスセンス変異を持つ ALDP の細胞内動態——過性発現による解析

ALD 患者の持つ変異 ALDP の機能, 細胞内局在性, 細胞内における安定性を解析することは, ALDP の各ドメインの機能を知る上で有用な情報を提供すると思われる. 特にミスセンス変異は, たった 1 つのアミノ酸変異による異常であるので特に興味深い. われわれは ALD 患者で報告されているミスセンス変異の中から, TMD から 4 つ (R104C, G116R, Y174C, S342P), NBD から 4 つ (Q544R, S606P, S606L, R617H), C 末端部位から 1 つ (H667D) を任意に選び (Fig. 1), その機能と細胞内動態を解析した. これらの実験は, 大学院シンポジウムで報告したので, 詳しく述べたいと思う.

ALDP はペルオキシソームにおける極長鎖脂肪酸の β 酸化に関与していることが知られている. 実際に ALD 患者由来の線維芽細胞では極長鎖脂肪酸の β 酸化活性が正常な線維芽細胞と比べて約 50—70% 程度減少している. そこで野生型及び変異型 ALDP の機能を確認するため, ALDP を発現していない ALD 患者由来線維芽細胞に, N 末端に His タグを付加した野生型と変異型 ALDP を一過性に発現し, [^{14}C] lignoceric acid を基質として極長鎖脂肪酸 β 酸化活性の測定を行った. その結果, ALDP 欠損線維芽細胞の極長鎖脂肪酸 β 酸化活性は, 正常細胞の約 50% まで減少していたが, 野生型 His-ALDP を発現させると正常と同程度にまで活性が回復した. このことから発現させた野生型 His-ALDP は ALDP と同等の機能を持つことが確認された. 一方, 9 種類のミスセンス変異 ALDP を発現した線維芽細胞では極長鎖脂肪酸 β 酸化活性の増加は認められなかった. よって, これらのミスセンス変異 ALDP は機能を欠くことが確認された.

ついで, 野生型及び変異型 His-ALDP を発現した ALD 患者線維芽細胞を回収し, 変異型 ALDP の発現量を immunoblotting により定量化し解析した (Table 1). なお ALDP の発現量は, ペルオキシソームの指標酵素であるカタラーゼの発現量で補正した. その結果, 変異型 ALDP (R104C, G116R, Y174C, S342P, Q544R, S606P) は, 野生型とほぼ同程度の発現量を示した. 一方, 変異型 ALDP (S606L, R617H, H667D) では発現量が野生型の発

Table 1. Expression and Localization of Missense ALDPs

| Mutant | Transient | | | Stable | |
|---------------------------------------|------------|--------------|--------------------|------------|--------------|
| | Expression | Localization | β -Oxidation | Expression | Localization |
| Wild | + | Px | + | + | Px |
| R104C, G116R S342P, Q544R S606P | + | Px | - | + | Px |
| Y174C | + | mis | - | + | mis |
| S606L | + | Px | - | - | - |
| R617H | ± | - | - | na | na |
| H667D | + | - | - | - | - |

Wild and Mutant His-ALDPs or ALDP-GFPs were transiently expressed in X-ALD fibroblasts and stably expressed in CHO cells, respectively. Wild type and each mutant ALDP were analyzed by immunoblotting and the amount of mutant ALDP was quantified by LAS 1000 plus (Fuji Film). The data were expressed as relative ratio of mutant ALDP to that of wild ALDP (+ > + > ± > -). Distribution of mutant ALDPs was detected by immunofluorescence using anti-ALDP monoclonal antibody and Fluorolink Cy3 labeled anti-mouse IgG. VLCFA β -oxidation was analyzed using [14 C] lignoceric acid as substrate. X-ALD fibroblasts expressing wild His-ALDP (+) showed the restoration of the β -oxidation activity but did not show any restorations when expressing mutant His-ALDPs (-). Px : peroxisomal localization, mis : mislocalization, (-) : not detectable, na : not analyzed.

現量と比べて約 50%程度減少していた。なお、各 ALDP ポジティブの細胞は約 30%程度であり、各細胞間での発現効率に有意な差は認められなかった。このことから、ALDP の発現量が減少していた 3 つの変異 ALDP は細胞内での安定性が低下していると推察された。また興味深いことに S606P と S606L は同じ部位の変異にも係わらず、置換したアミノ酸によって発現量には差が認められた。

ついで、変異型 His-ALDP の細胞内局在を蛍光抗体法で確認した。変異型 ALDP (R104C, G116R, S342P, Q544R, S606P, S606L) では ALDP がカタラーゼの局在と一致したことから、正常にペルオキシソームへ局在していることが確認された。一方、変異型 ALDP (Y174C, H667D) では局在が一致せず、ALDP が他の細胞内小器官へ間違っ て輸送されていると考えられた。変異型 ALDP (R617H) では ALDP の発現が認められなかった。変異型 ALDP (R104C, G116R, S342P, Q544R, S606P) では野生型とほぼ同程度のタンパク量が発現し、ペルオキシソームへの局在も確認されたので、これらの変異型 ALDP は合成されたのちに正常にペルオキシソームに運ばれるが、ペルオキシソーム膜においてその機能 (ATP 結合・加水分解若しくは基質輸送) に異常を持つことが推察された。特に R104C, G116R, S342P は TMD に存在することから ALDP の基質輸送能が変化していると考えられる。一方、NBD に存在する Q544R, S606P は ATP 結合・加水分解に影響を与えている可能性が考えられる。また

S606P, S606L は変異が同じ部位でも構造的に安定性が異なっていた。Roerig らは S606L の変異型 ALDP は、ATP との親和性が低下している一方で ATP 加水分解は正常に行われていると報告している。²⁹⁾ このことは ALDP と ATP の親和性が ALDP の安定性にも影響を及ぼしている可能性を示している。S606L と S606P の安定性の違いと機能の関係は ALDP の機能を知る上でも興味深い点であり、今後さらに検討を行う必要がある。一方、Y174C の変異型 ALDP は正常に発現するにも係わらず、ペルオキシソームへ局在せず他の細胞内小器官へミスターゲッティングした。これまでにペルオキシソームへの局在化シグナルを欠くペルオキシソーム膜タンパク質は、非特異的にミトコンドリアや小胞体に移行することが知られている。^{30,31)} よって、ALDP の TMD2—3 の間のループは、ペルオキシソームへの局在化に重要な役割を果たしている可能性が推察される。Pex19p 存在化での *in vitro* タンパク質翻訳系において、ALDP (Y174C) は Pex-19p に結合できるので、ALDP の N 末端 67—164 に存在するペルオキシソーム移行に係わる領域が ALDP の何らかの構造変化によってマスクされるのかもしれない。

5. ミスセンス変異を持つ ALDP の細胞内動態—安定過剰発現細胞を用いた解析

ヒト変異型 ALDP の一過性発現により得られた結果をより詳細に解析するため、変異型 ALDP を CHO 細胞に安定発現した細胞を作製した。変異型

ALDP については ALDP の C 末端に GFP (green fluorescent protein) を融合させた変異 ALDP-GFP を発現させるとともに、野生型ヒト ALDP を CHO 細胞に共発現させた (CHO 細胞にも内在性の ALDP が発現しているが、本実験に用いた抗体が交差しないため、ヒト ALDP を発現させた)。GFP 融合タンパク質は内在性のタンパク質との区別が容易であること、安定発現細胞の取得が容易にできることなどの利点がある。この実験では、ペルオキシソームに正常に輸送される変異型 ALDP (R104C, G116R, S606P)、ペルオキシソームに局在しない変異型 ALDP (Y174C)、発現量が低下している変異型 ALDP (H667D) を選んだ。これら安定過剰発現細胞における ALDP-GFP の細胞内局在性をみると、その分布は一過性発現させた His-ALDP と同様であった。

得られた安定発現細胞よりオルガネラ粗分画を調製し、ショ糖密度勾配遠心分離法により各フラクションに分けたのち、SDS-PAGE 及び immunoblotting により変異 ALDP の局在について解析を行った (Fig. 3)。ペルオキシソームマーカーとしてペルオキシソーム膜タンパク質である PMP70 とペルオキシソームの主要なマトリックスタンパク質であるカタラーゼを用いた。野生型 ALDP を安定過剰発現している細胞において、カタラーゼ活性並びに PMP70 が主としてフラクション 3 及び 4 に存在することより、この分画にペルオキシソームが回収されたことが示唆された。また約 110 kDa の分子サ

イズを持つ ALDP-GFP 並びに 83 kDa の野生型 ALDP は、ペルオキシソームマーカーとほぼ同じ分布を示していたことからペルオキシソームに局在していることが示唆された。また変異型 ALDP-GFP (G116R, S606P) も同様の分布を示した。

一方、変異型 ALDP-GFP (H667D) を安定過剰発現している細胞の場合は、ALDP-GFP のバンドは検出されなかった (Fig. 3)。興味深いことに、PMP70 は検出されたが、共発現させた野生型 ALDP のバンドも検出されなかった。また変異型 ALDP (S606L) についても同様であった。これらの結果は、変異型 ALDP (H667D, S606L) は PMP70 とではなく、野生型 ALDP と複合体を形成し、両者が分解される可能性を示唆している。ABC タンパク質の機能発現に重要である TMD や NBD 以外の C 末端部位での変異がタンパク質の安定性に影響を及ぼすことは興味深い。ALDP の C 末端部位である 600—700 アミノ酸での変異が X-ALD を引き起こす頻度が高いことから、ALDP の C 末端部位はタンパク質の安定性に重要な役割を担っている可能性がある。Liu らは ALDP のダイマー化には C 末端部位 (AA.631—745) が重要であると報告している。¹³⁾ H667D や S606L のような変異は、それ自身あるいは野生型 ALDP とミスfoldしたダイマーを形成し、異常タンパク質として認識され分解されると考えられる。一方、変異型 ALDP-GFP (R104C) はペルオキシソーム分画に回収されるものの、フラグメント化していること

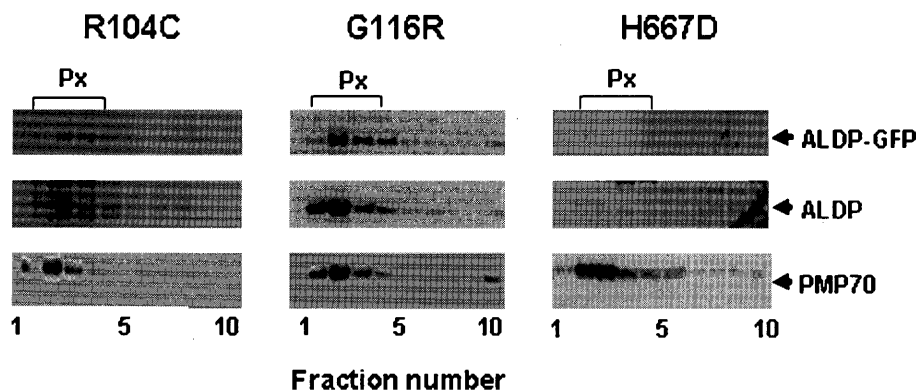


Fig. 3. Subcellular Localization of Wild Type and Mutant ALDP-GFP in CHO

ML fraction (mitochondria and light mitochondrial fraction) from CHO cells expressing wild type ALDP and each mutant ALDP-GFP (R104C, G116R, H667D) were fractionated by equilibrium density centrifugation on sucrose. Distribution of peroxisomes was determined by catalase activity. An aliquot of each fraction from top (1) to the bottom (10) of the sucrose gradient was removed for immunoblotting analysis. Anti-human ALDP monoclonal antibody and anti-PMP70 polyclonal antibody against C-terminal 14 amino acids were used for immunoblotting. Dots in the electrophoretogram in R104C shows the band corresponding to ALDP-GFP fragments.

が明らかになった。これらのフラグメントは、0.1 M sodium carbonate 処理によって抽出されないことより、ペルオキシソーム膜に挿入されたままであることが示唆された。変異型 ALDP (Y174C) の場合、ペルオキシソーム分画に回収された ALDP-GFP は少量であった。

6. 変異型 ALDP の分解過程の解析

新生タンパク質が正しいフォールディングを受けることは、そのタンパク質の正常な機能発現のために必須である。遺伝子変異などが存在すると、タンパク質がミスフォールディングされる。このミスフォールドタンパクが細胞外へ分泌されたり、細胞内に蓄積したりすると生体にとって極めて有害になるため、このようなタンパクはプロテアソーム、リソソーム等によって迅速に分解される。ちなみに、嚢胞性線維症の原因タンパク質 CFTR は細胞膜イオンチャネルとして機能する ABC タンパク質であるが、変異 CFTR は小胞体膜からプロテアソームにリクルートされ分解されることが報告されている。^{32,33)} しかしながら、変異型 ALDP を始めとして、ペルオキシソーム膜タンパク質についての解析はほとんど行われていない。

変異型 ALDP の一過性発現と安定過剰発現実験より、ALDP (S606L, R617H, H667D, R104C) は、プロテアーゼにより分解されていると推定された。そこで、ALDP-GFP (H667D) を発現している CHO 細胞に各種プロテアーゼ阻害剤を処理し、解析を行った。その結果、プロテアソーム阻害剤である lactacystin を処理した細胞では ALDP-GFP 及び ALDP のバンドが出現した (Fig. 4)。一方、leupeptin, AEBSF, E64d には効果がなかった。また他のプロテアソーム阻害剤である MG132 も有効であった。さらにプロテアソーム阻害剤により分解を逃れた変異型 ALDP-GFP (H667D) の細胞内局在を蛍光抗体法で観察すると、ペルオキシソームに局在していることが確認された。一方、変異型 ALDP (R104C) のフラグメント化は上記プロテアーゼ処理では阻害されなかった。

さらに ALD 患者由来細胞の内因性変異 ALDP の分解とプロテアソーム分解系の関与について確認するため、変異型 ALDP (R617H) を持つ患者由来線維芽細胞を用いてタンパク分解の阻害実験を行った。その結果、lactacystin と MG132 処理により、

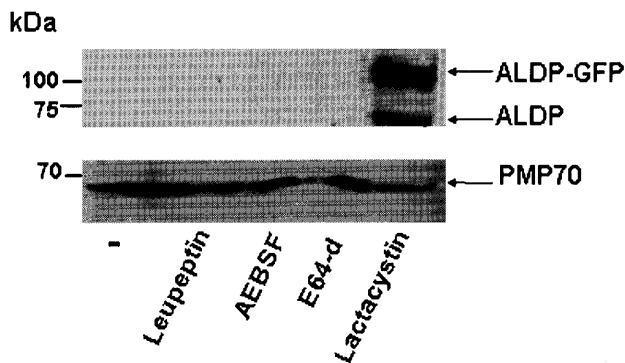


Fig. 4. Effect of Protease Inhibitors on the Stability of ALDP-GFP (H667D) and Wild Type ALDP in CHO Cells

CHO cells co-expressing wild type ALDP and ALDP-GFP (H667D) were cultured with each protease inhibitors. After 20 h, the cell homogenates (100 µg of protein) were prepared and subjected to immunoblotting. Protease inhibitors used were leupeptin (50 µM), AEBSF (300 µM), E64-d (10 µM) and lactacystin (10 µM).

ALDP のバンドが出現した。以上の結果より、ペルオキシソーム膜上にはミスフォールドしたタンパク質を認識する仕組みが存在し、プロテアソーム及び他のプロテアーゼを介して排除していることが示唆された。

一方、山田らは ALD 患者線維芽細胞を [³⁵S]メチオニンでパルスチェイスすることにより、変異型 ALDP (G512S, R660W) の分解が E-64 と leupeptin により抑制されることを報告している。³⁴⁾ 彼らの実験ではプロテアソーム阻害剤については実験していないので、プロテアソームの関与は不明であるが、変異型 ALDP の分解には、複数のプロテアーゼが関与している可能性がある。

7. おわりに

ALD は、ペルオキシソーム膜上に存在する ABC タンパク質の 1 つである ALDP の機能不全に起因する疾患で、中枢神経における進行性脱髄と副腎不全、脳や血漿中における極長鎖脂肪酸の蓄積を特徴とする。ALDP は遊離型ポリソームで生合成され、Pex19p と結合し、ペルオキシソームへと局在化し、ダイマーを形成して機能していると考えられている (Fig. 2)。本研究では ALD 患者でみついているミスセンス変異 ALDP の変異の位置と細胞内局在化や安定性及び存在様式にどのような関連性があるかを解析するため、ALD 患者で報告されているミスセンス変異を、ALDP を欠損している ALD 患者線維芽細胞及び CHO 細胞に発現し解析を行った。

その結果より、ミスセンス変異 ALDP は以下に示すように 4 種類の細胞内動態を持つことが示された (Fig. 5). 1) 野生型と同様にペルオキシソームに局在するがその機能が阻害されている変異 (R104C, G116R, S342P, Q544R, S606P), 2) ペルオキシソームへの局在化に障害がある変異 (Y174C), 3) 変異によりタンパク質の安定性が低下しプロテアソームでの分解を受けるが、一部ペルオキシソームに局在する変異 (S606L), 4) 変異によりタンパク質の安定性が低下しプロテアソームで選択的に分解を受け、細胞内でほとんど確認できない変異 (R617H, H667D) の 4 種類のパターンである.

発現量も局在化も正常な変異では、ABC タンパク質としての機能に直接関与している機能ドメインの障害が起こっていると推察される. この中で G116R, S342P は TMD に位置しており、基質の認識や輸送に障害があると推察される. また Q544R, S606P は ATP との結合・加水分解に関与する NBD に位置している. このような変異は、ALDP の ABC タンパク質としての機能を解析するために有益と考えられる.

発現量は正常だが局在化に異常が認められた Y174C は、TMD2 と 3 の間のループ 2 に位置しており、この領域が ALDP のペルオキシソームへの

ターゲティングに必要であることを示している. ALDP のターゲティングに必要な領域は 67—164 番目のアミノ酸に存在することが報告されている.²⁰⁾ このことから、Y174C の変異による構造変化のため、ターゲティングシグナルがマスクされているのかもしれない. このタイプの変異は ALDP のペルオキシソームへの局在化を調べる上で重要と考えられる.

ALDP の変異で最も多いミスセンス変異ではその多くが細胞内で分解を受けている. R617H 及び H667D では発現量の著しい低下が認められる. 特に安定発現した CHO では immunoblot で検出できなかった. ミスフォールドタンパク質の分解システムの 1 つにプロテアソームによる分解系がある. このタンパク質分解は、生物の様々な高次機能の制御や環境ストレスに応答した恒常性の維持 (ストレス応答, タンパク質の品質管理など) に必須な役割を担っている. しかし、小胞体を経由して合成される分泌タンパク質や膜タンパク質に比べて、小胞体を経由しない細胞内タンパク質の品質管理機構はあまり報告されていない. ALDP は遊離のポリソームから直接ペルオキシソームに輸送されるが、この過程でどのように R617H, H667D などの変異が認識され、プロテアソーム系が働いているか興味深い.

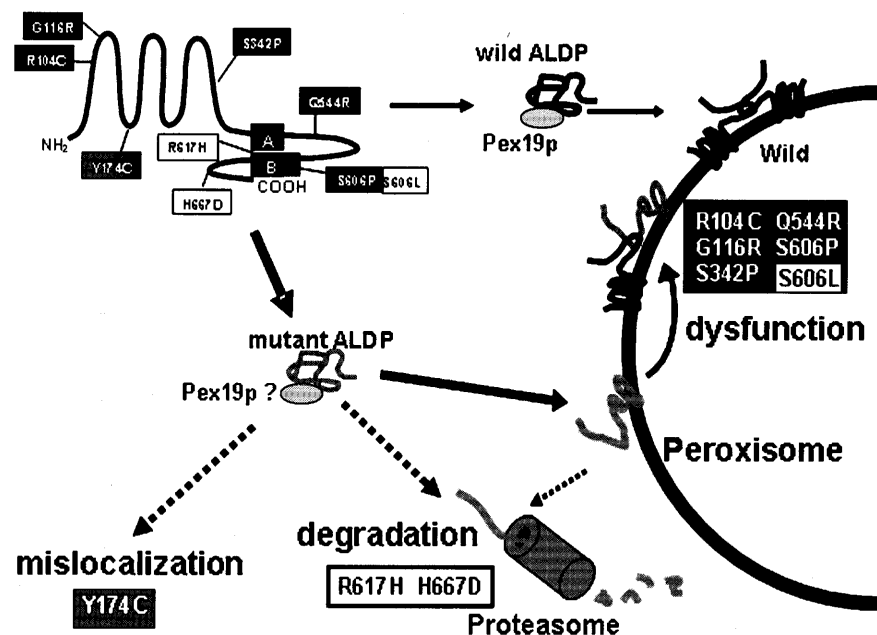


Fig. 5. Intracellular Fate of Missense ALDPs

ALDP is synthesized on free polysomes and posttranslationally transported to peroxisomes with the help of Pex19p and Pex3p. Some mutant ALDPs (R104C, G116R, S342P, Q544R and S606P) are normally inserted into the peroxisomal membrane, and others were mislocalized (Y174C) or degraded by proteasome (S606L, R617H and H667D).

プロテアソームによる分解を逃れた一部の変異 ALDP はペルオキシソームに局在する可能性があることが示唆された。もし ALDP の変異部位が機能ドメイン (NBDs 等) 以外の部位である場合、局在や安定性を回復することによってタンパク質の機能も回復する可能性があるかもしれない。嚢胞性線維症の原因タンパク質 CFTR の変異体 ($\Delta 508$) はプロテアソーム分解系で速やかに分解される。最近、4-フェニルブチレート (4PBA) が変異 CFTR を安定化し、その機能を回復することが報告された。³⁵⁾ この効果は 4PBA が変異型 CFTR のケミカルシャペロンとして働き、変異 CFTR を小胞体関連分解から保護し、CFTR の膜輸送を補助することによる。変異 ALDP においても、変異の位置によってはシャペロン様の機能を持つ薬剤を見出すことができれば ALD 治療に有用かもしれない。

本研究からミスセンス変異 ALDP の ABC タンパク質としての機能不全のみならず、ミスターゲッティングやプロテアソームを介した分解が ALD の疾患と関連していることが示唆された。今後、各タイプの変異 ALDP を詳細に検討し、ABC タンパク質としての機能ドメインの解析、局在化機構の解析、さらに変異 ALDP の品質管理機構についての解析を展開したい。

謝辞 本研究に際し、ヒト線維芽細胞及び ALD 患者由来繊維芽細胞を供与いただいた岐阜大学医学部鈴木康之教授、九州大学医学部古谷博和助教授に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Dobois-Dalcq M., Feigenbaum V., Aubourg P., *Trends Neurosci.*, **22**, 4-12 (1999).
- 2) Smith K. D., Kemp S., Braiterman L. T., Lu J.-F., Wei H.-M., Geraghty M., Stetten G., Bergin J. S., Pevsner J., Watkins P. A., *Neurochem. Res.*, **24**, 521-535 (1999).
- 3) Bezman L., Moser A. B., Raymond G. V., Rinaldo P., Watkins P. A., Smith K. D., Kass N. E., Moser H. W., *Ann. Neurol.*, **49**, 512-517 (2001).
- 4) Moser H., Dubey P., Fatemi A., *Curr. Opin. Neurol.*, **17**, 263-269 (2004).
- 5) Kemp S., Pujol A., Waterham H. R., van Geel B. M., Boehm C. D., Raymond G. V., Cutting G. R., Wanders R. J. A., Moser H. W., *Hum. Mutat.*, **18**, 499-515 (2001).
- 6) Takemoto Y., Suzuki Y., Tamakoshi A., Onodera O., Tsuji S., Hashimoto T., Shimozawa N., Orii T., Kondo N., *J. Hum. Genet.*, **47**, 590-593 (2002).
- 7) Suzuki Y., Takemoto Y., Shimozawa N., Imanaka T., Kato S., Furuya H., Kaga M., Kato K., Hashimoto N., Onodera O., Tsuji S., *Brain Dev.*, **27**, 353-357 (2005).
- 8) Mosser J., Douar A. M., Sarde C. O., Kioschis P., Feil R., Moser H., Poustka A. M., Mandel J. L., Aubourg P., *Nature*, **361**, 726-730 (1993).
- 9) Mosser J., Lutz Y., Stoeckel M. E., Sarde C. O., Kretz C., Douar A. M., Lopez J., Aubourg P., Mandel J. L., *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 265-271 (1994).
- 10) Cimini A., Bernardo A., Cifone M. G., Di Marzio L., Di Loreto S., *Glia*, **41**, 3-14 (2003).
- 11) Di Biase A., Di Benedetto R., Fiorentini C., Travaglione S., Salvati S., Attorri L., Pietraforte D., *Neurochem. Int.*, **44**, 215-221 (2004).
- 12) Contreras M., Sengupta T. K., Sheikh F., Aubourg P., Singh I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **334**, 369-379 (1996).
- 13) Liu L. X., Janvier K., Berteaux-Lecellier V., Cartier N., Benarous R., Aubourg P., *J. Biol. Chem.*, **274**, 32738-32743 (1999).
- 14) Guimaraes C. P., Domingues P., Aubourg P., Fouguet F., Pujol A., Jimenez-Sanchez G., Sa-Miranda C., Azevedo J. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1689**, 235-243 (2004).
- 15) Tanaka A. R., Tanabe K., Morita M., Kurisu M., Kasiwayama Y., Matsuo M., Kioka N., Amachi T., Imanaka T., Ueda K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 40142-40147 (2002).
- 16) Kashiwayama Y., Morita M., Kamijo K., Imanaka T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 1245-1251 (2002).
- 17) Imanaka T., Shiina Y., Takano T., Hashimoto T., Osumi T., *J. Biol. Chem.*, **271**, 3706-3713 (1996).
- 18) Kashiwayama Y., Asahina K., Shibata H., Morita M., Muntau A. C., Roscher A. A., Wanders R. J. A., Shimozawa N., Sakaguchi

- M., Kato H., Imanaka T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1746**, 116–128 (2005).
- 19) Shibata H., Kashiwayama Y., Imanaka T., Kato H., *J. Biol. Chem.*, **279**, 38486–38494 (2004).
- 20) Landgraf P., Mayerhofer P. U., Polanetz R., Muntan A. C., Roscher A. A., Holzinger A., *Eur. J. Cell Biol.*, **82**, 401–410 (2003).
- 21) Halbach A., Lorenzen S., Landgraf C., Volkmer-Engert R., Erdmamm R., Rottensteiner H., *J. Biol. Chem.*, **280**, 21176–21182 (2005).
- 22) Imanaka T., Aihara K., Takano T., Yamashita A., Sato R., Suzuki Y., Yokota S., Osumi T., *J. Biol. Chem.*, **274**, 11968–11976 (1999).
- 23) Verleur N., Hetteema E. H., van Roemund C. W. T., Tabak H. F., Wanders R. J. A., *Eur. J. Biochem.*, **249**, 657–661 (1997).
- 24) Hung L. W., Wang I. X., Nikaido K., Liu P. Q., Ames G. F., Kim S. H., *Nature*, **396**, 703–707 (1998).
- 25) Hopfner K. P., Karcher A., Craig L., Woo T. T., Carney J. P., Tainer J. A., *Cell*, **105**, 473–485 (2001).
- 26) Chang G., Roth C. B., *Science*, **293**, 1793–1800 (2001).
- 27) Locker K. P., Lee A. T., Rees D. C., *Science*, **269**, 1091–1098 (2002).
- 28) Morita M., Kurisu M., Kashiwayama Y., Yokota S., Imanaka T., *Biol. Pharm. Bull.* (in press).
- 29) Roerig P., Mayerhofer P., Holzinger A., Gartner J., *FEBS Lett.*, **492**, 66–72 (2001).
- 30) Brosius U., Dehmel T., Gartner J., *J. Biol. Chem.*, **277**, 774–784 (2002).
- 31) Jones J. M., Morrell J. C., Gould S. J., *J. Cell Biol.*, **153**, 1141–1150 (2001).
- 32) Jensen T. J., Loo M. A., Pind S., Williams D. B., Goldberg A. L., Riordan J. R., *Cell*, **83**, 129–135 (1995).
- 33) Gelman M. S., Kannegaard E. S., Kopito R. R., *J. Biol. Chem.*, **277**, 11709–11714 (2002).
- 34) Yamada T., Shinnoh N., Kobayashi T., *Neurochem. Res.*, **22**, 233–237 (1997).
- 35) Rubenstein R. C., Egan M. E., Zeitlin P. L., *J. Clin. Invest.*, **15**, 2457–2465 (1997).