

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 佐藤 信彦

腎近位尿細管のエンドサイトーシス/エンドゾーム内の酸性化において、2Cl/H 交換輸送体 CLC-5はV-ATPaseと共に初期エンドゾーム膜上に発現して重要や役割を演じると共に、そのコードする遺伝子(*CLCN5*)の変異は高分子量蛋白尿を特徴とする伴性劣性遺伝子疾患 Dent 病の原因の1つと考えられている。本研究では、Dent 病の発症機序や諸説あるとされる CLC-5 のエンドゾーム酸性化の機序を明らかにするため、典型的な Dent 病患者より同定された E211Q 新規変異体を wild-type CLC-5 及び、Cl チャネルである人工変異体 E211A と比較しながら、その電気生理学的機能特性、エンドゾーム酸性化に与える影響について解析を試みたものであり以下の結果を得ている。

1. アフリカツメガエル卵母細胞 (*Xenopus oocytes*) 発現系において 2 電極膜電位固定法を用いて各 CLC-5 変異体の電気生理学的機能解析を行ったところ、wild-type CLC-5 では強い外向き整流性を示し、E211Q と E211A では整流性のない直線的な電流を認めた。細胞外溶液の pH の変化に対して同様に Cl 電流をそれぞれ測定したところ、細胞外溶液の  $[H^+]$  増加が Cl/H 交換輸送機能にとって抑制的に作用するため、wild-type CLC-5 では pH5.4 の酸性下で約 30%の電流の減少(vs. pH7.4)を認めたが、E211A と E211Q では電流の変化を認めなかった。

2 同様に *Xenopus oocytes* 発現系において pH 感受性微小電極を用いて、Oocyte 膜表面における局所の pH 測定を行った。+80mV の脱分極パルスによる連続刺激を行うと wild-type CLC-5 では比較的小さな電流にも関わらず大きな pH の低下( $0.29 \pm 0.05$  unit)を認め、刺激時間、刺激強度依存性も認めた。一方、E211Q と E211A ではそのような pH の変化を認めなかった。

3 1,2 より wild-type CLC-5 が Cl/H 交換輸送体として機能していることが確認されると共に、E211Q 新規変異体では wild-type CLC-5 の Cl/H 交換輸送機能が失われ、Cl チャネルである E211A と同様の挙動を示すことがわかった。

4 HEK293 細胞強制発現系において、蛍光色素 (BCECF/AM)を用いた細胞内 pH 測定により V-ATPase 活性の測定を行った。NH<sub>4</sub>Cl パルスと Na-free HEPES 溶液還流により HEK293 細胞内に  $[H^+]$  を負荷した後、低浸透圧性 Na-free HEPES 溶液で還流すると protein kinase C を介するとされる V-ATPase の活性化により、Na 非依存性の pH 回復

が確認された。各 CLC-5 construct を強制発現させた HEK293 細胞でこの V-ATPase 活性を測定したところ、それぞれ wild-type CLC-5 ( $0.59 \pm 0.08$  pH/unit/min)、E211A ( $0.28 \pm 0.04$  pH/unit/min)、E211Q ( $0.22 \pm 0.01$  pH/unit/min) で wild-type >> E211A  $\simeq$  E211Q > Vector の順に V-ATPase を活性化させることがわかった。

5. 4 より得られた V-ATPase 活性の序列に対して Western blotting による蛋白発現量の半定量分析では、細胞膜分画の V-ATPase B2 subunit は導入遺伝子の種類や、低浸透圧溶液還流による発現量の変化を認めず、細胞全体の CLC-5 の発現量はむしろ E211Q で多かった。

6 4,5 より CLC-5 は V-ATPase を活性化し、中でも wild-type CLC-5 がその機能的最大活性化に必要であることが示唆された。

7 pH 感受性 GFP 変異体 VAMP2-pHluorin と各 CLC-5 construct を共発現させた HEK293 細胞強制発現系において、共焦点顕微鏡観察によるエンドゾーム内 pH 測定を行ったところ、wild-type CLC-5 (pH  $6.25 \pm 0.05$ )、E211A (pH  $6.67 \pm 0.05$ )、E211Q (pH  $6.67 \pm 0.04$ )、Vector (pH  $6.90 \pm 0.05$ ) で、4 の V-ATPase 活性の序列と同様に wild-type >> E211A  $\simeq$  E211Q > Vector の順にエンドゾーム内の酸性化を認めた。また、V-ATPase の特異的阻害剤である bafilomycin の添加は各 construct 間のエンドゾーム pH の差異を消失させた。

8 VAMP2-pHluorin は CLC-5 と同様にエンドゾーム膜と細胞膜に分布しよく一致していた。また、各 CLC-5 construct の間でも分布様式に差は認めなかった。

9 7,8 より CLC-5 は V-ATPase の活性化を介してエンドゾーム内を酸性化し、wild-type CLC-5 で最大の酸性化を認めることがわかった

10 1~9 より CLC-5 の 2Cl/H 交換輸送機能は効率的なエンドゾーム酸性化に必要であることが示唆された。

以上、本論文は *Xenopus* Oocytes 発現系と HEK293 細胞発現系において、典型的な Dent 病症例より同定された CLC-5 E211Q 新規変異体の解析から、E211Q 新規変異体が wild-type CLC-5 の Cl/H 交換輸送機能を喪失し Cl チャネルとして機能していること、CLC-5 が V-ATPase 活性化を介してエンドゾーム内を酸性化し、2Cl/H 交換輸送体である wild-type において最も効率の良い酸性化が行われることを明らかにした。E211 は gating glutamate という CLC-5 イオン輸送の核であり、Dent 病の原因遺伝子である *CLCN5* の変異が 150 以上同定されている中、gating glutamate E211 の変異はこれまでヒトでは報告されていなかった。本研究はヒトで初めて報告された gating glutamate 部位の新規変異

体 E211Q を解析することにより、Dent 病発症機序および CLC-5 によるエンドゾーム酸性化機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。