

氏名 (生年月日) <sup>ほそ</sup>細 <sup>かわ</sup>川 <sup>こう</sup>晃 <sup>へい</sup>平 (1990年7月24日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第190号

学位授与の日付 2020年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 膜タンパク質CD81の分解機構の解明

論文審査委員 (主査) 教授 藤室 雅弘

(副査) 教授 芦原 英司

(副査) 教授 中山 祐治

## 論文内容の要旨

### 序章

ヒトの膜タンパク質は細胞の全タンパク質中の約30%、医薬品標的となるタンパク質の約60%を占めることが知られている。したがって膜タンパク質の安定性、分解や遺伝子発現調節機構の解明は、抗体医薬品や低分子医薬品の研究開発に貢献すると考えられる。CD81はN末端を細胞質内にもつ4回膜貫通型タンパク質であり、CD81の機能は膜タンパク質同士の会合により発揮していると考えられている。CD81はB細胞表面上で膜タンパク質複合体を形成し、またウイルスのエンベロープとの相互作用を介したウイルス感染、エクソソームの形成、受精の調節といった機能など、多くの細胞機能が示唆されている。一般に膜タンパク質の機能発現は、リガンドとの結合やリン酸化などの翻訳後修飾の他、膜タンパク質自身の発現と分解によって制御されている。

膜タンパク質の分解機構として、標的タンパク質のユビキチン (Ubiquitin; Ub) 化を介したプロテアソームまたはリソソームによる分解経路が知られている。翻訳後修飾分子であるUbはUb活性化酵素 (E1)、Ub結合酵素 (E2)、E3 Ubリガーゼ (E3) という3つの触媒酵素を介して標的タンパク質のリジン (K) 残基側鎖  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 基に共有結合する。共有結合したUbのK残基に新たなUbのC末端が共有結合する反応が繰り返されてポリUb鎖は形成される。ヒトにおいてE1は2種類、E2は約50種類、E3は約600種類存在している。E3はE2に結合したUbを基質に転移させる反応機構の違いによりHECT型とRING型に大別され、E2とE3の組み合わせによって、Ub分子内の7つのK残基 (K6、11、27、29、33、48、63) を介したポリUb鎖の結合様式の多様性が生まれる。この構造多様性が様々な細胞内の生理機能発現を可能にしている。ポリUb鎖の結合様式の中で最も有名なK48-linkedポリUb鎖は、26Sプロテアソームのサブユニットとの相互作用によってタンパク質分解シグナルとして働く。K63-linkedポリUb鎖はエンドサイトーシス、シグナル伝達、タンパク質間相互作用、選択的オートファジーなど、多種多様な細胞機能を与える。しかし、CD81のポリUb鎖結合様式やポリUb鎖の機能は不明である。

また興味深いことに、CD81のタンパク質発現は上皮細胞と比べてB細胞で亢進している。このことからCD81の発現増加は遺伝子発現の亢進、またはタンパク質分解の抑制が考えられるが、その機構は不明であり、さらにCD81の分解や遺伝子発現の機構は明らかになっていない。そこで本研究ではCD81の分解機構を明らかにした。

## 第1章 CD81の分解経路の同定

CD81がプロテアソームとリソソームのいずれの経路で分解されるのかを同定するため、プロテアソーム阻害剤ラクタシスチン、リソソーム阻害剤クロロキン、またはプロテアソームかつリソソーム阻害剤MG132を用いて細胞表面に存在するCD81の発現量を解析した。未処理やラクタシスチン処理に比べてクロロキンまたはMG132処理により細胞膜上でのCD81の発現が増加した。次にCD81の分解にUb化修飾が関与するか解析するため、上記の阻害剤を用いてCD81のポリUb化をCD81のプルダウンアッセイにより解析した。その結果、クロロキンまたはMG132処理によりCD81のポリUb化が亢進した。次にCD81のポリUb鎖の結合様式を解析するため、2つのUb変異プラスミド(Ub-K48とUb-K63)を用いてCD81のポリUb鎖を解析した。Ub-K48とUb-K63はUbのK48またはK63以外のK残基をそれぞれアルギニン(R)残基に置換したプラスミドである。その結果、CD81のポリUb化は野生型Ubに比べてUb-K48の発現により完全に消失し、Ub-K63の発現で減少したが完全に消失しなかった。このことからCD81はK48以外のポリUb鎖を形成されリソソームで分解されることが示唆された。さらにUbのK29、K48またはK63をRに置換したUb変異プラスミド(Ub-K29R、Ub-K48RまたはUb-K63R)を用いてCD81のポリUb鎖解析を行った。興味深いことに、Ub-K63Rに加えてUb-K29Rの発現によりCD81のポリUb化は減少した。以上の結果から、CD81はK63-またはK29-linkedポリUb化を介してリソソームで分解されることが明らかになった。

## 第2章 CD81のエンドサイトーシス経路の解析

次にリソソームによるCD81の分解経路を解析するため、クロロキン存在下でCD81の局在を解析した。その結果、CD81は初期エンドソームマーカーEEA1とリソソームマーカーLAMP1と共局在したが、オートファゴソームマーカーであるp62と共局在しなかった。したがって、リソソームによるCD81の分解はオートファジー非依存的であり、CD81はエンドサイトーシスを介して細胞内移行しリソソームで分解されることが考えられた。次にCD81のエンドサイトーシス機構を解析するため、クラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤CPMZ、カベオラ依存的エンドサイトーシス阻害剤MBCD、クラスリン・カベオラ非依存的エンドサイトーシス阻害剤スクロースを用いてCD81の分解阻害を解析した。その結果CPMZ処理により細胞表面に存在するCD81の発現は未処理に比べて上昇した。このことから、CD81はクラスリン依存的エンドサイトーシスを介して内部移行することが考えられた。

## 第3章 CD81のポリUb化機構

CD81の細胞内領域のN末端に2ヶ所のK残基(K8とK11)と細胞外領域に10ヶ所存在しており、一般に膜タンパク質の細胞内領域がUb化される。そこでCD81の細胞内領域のK残基をA(アラニン)に変えたKA変異プラスミド(CD81-K8AとCD81-K11A)を用いて、どのK残基にポリUb鎖が結合するのかをプルダウンアッセイにより解析した。その結果、K8にポリUb鎖が結合することが明らかになった。さらにCD81のKA変異体の安定性をシクロヘキシミドによるパルスチェイス実験で解析すると、野生型CD81とCD81-K11Aに比べてCD81-K8Aの半減期は延長した。このことから、CD81はK8を介したポリUb化を介して分解されることが明らかになった。またCD81の結合タンパク質の探索から膜結合型E3であるMARCHとGRAILの2種類がCD81のE3として報告されている。そこでMARCHファミリーに属しウイルス性E3であるK3とK5によってCD81が分解されるか解析した。その結果、CD81はK5によって分解された。さらにUb転移を促進するRINGドメイン構造を破壊したK5を発現させると、CD81の分解は阻害された。これらの結果から、CD81はK5を含むMARCHファミリーによってポリUb化され分解されることが想定された。

## 総括

本研究により、CD81 は細胞内領域 K8 に K63-または K29-linked ポリ Ub 化され、クラスリン依存的エンドサイトーシスを介して細胞内移行し、エンドソーム上の CD81 はリソソームと融合し分解されることを明らかにした。

## 審査の結果の要旨

### 《緒言》

CD81 は、2つの細胞外ドメインと3つの細胞内ドメインと4つの膜貫通領域で構成され、テトラスパニンファミリーに分類される膜タンパク質である。CD63 や CD9 等のテトラスパニン膜タンパク質は主に、細胞運動や細胞内シグナル伝達を介した細胞活性化を誘導することが知られている。一方、CD81 の機能は不明な点が多いが、B 細胞の分化と増殖に関与し、C 型肝炎ウイルスのウイルス受容体としての機能が報告されている。CD81 は B 細胞性リンパ腫の増殖を抑制する抗体スクリーニングによって発見されたことから、CD81 の蛋白質発現や分解機構の解析は抗腫瘍薬開発にも関連する重要な研究課題だと言える。しかし、CD81 の分解機構についてはほとんど研究がなされていないのが現状である。そこで、申請者は CD81 の分解機構について研究を実施し、その機構を明らかにした。なお、CD81 の分解機構に関する論文は、本学位論文が世界初の報告となる。

### 《審査結果の要旨》

第1章では、CD81 の細胞内分解経路がリソソーム経路であることを同定した。プロテアソーム阻害剤(ラクタシスチン)とリソソーム阻害剤(クロロキン)処理した細胞の CD81 の発現量をフローサイトメーターにより解析した結果、クロロキン処理により細胞膜上での CD81 の発現が増加したことから、CD81 はリソソーム経路で分解されることが示唆された。また、変異ユビキチン発現プラスミドを用いた免疫沈降実験により、CD81 は Lys63-linked、または Lys29-linked ポリユビキチン化修飾を受けるとリソソームで分解されることが明らかになった。第2章では、CD81 のエンドサイトーシス経路の解析を実施した。クロロキン処理した細胞の CD81 の局在を解析した結果、CD81 は初期エンドソーム蛋白質 EEA1 やリソソーム蛋白質 LAMP1 と共局在した。一方、CD81 はオートファゴソーム蛋白質 p62 と共局在しないことより、リソソームによる CD81 の分解はオートファジー非依存的であり、CD81 はエンドサイトーシスを介して細胞内移行することが示唆された。次に、クラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤、カベオラ依存的エンドサイトーシス阻害剤、クラスリン・カベオラ非依存的エンドサイトーシス阻害剤を用いて CD81 の分解阻害を解析した。その結果、CD81 はクラスリン依存的エンドサイトーシスを介して内部移行することが示された。第3章では、CD81 のポリユビキチン化部位とユビキチン化の触媒酵素の解析を実施した。CD81 の Lys 残基点変異体発現プラスミドを作成し、ユビキチンとの免疫沈降実験により、CD81 の N 末端側の 8 番目 Lys にポリユビキチン鎖が結合することを見出した。また、CD81 のポリユビキチン化部位を Ala に変異させた CD81-K8A 変異体は安定性が增强されたことから、CD81 の 8 番目 Lys のポリユビキチン化が引き金になり、CD81 は分解されることが示された。最後に、CD81 のポリユビキチン化を触媒する E3 酵素の同定を行った。そして、膜結合型 E3 である MARCH 型 E3 の K5 によって CD81 はポリユビキチン化修飾を受け、分解されることを明らかにした。

なお、副査と主査からのコメントと質疑に対して、申請者は本論文に追加の記述や考察を加える、過大な解釈を訂正する、表現を訂正する、詳細な条件を追記する等により、本論文を適切に修正した。

#### 《結論》

申請者は未だ不明であった CD81 の分解機構について研究を実施し、CD81 はポリユビキチン化修飾を受けると、CD81 はクラスリン依存的にエンドサイトーシス機構で細胞内移行しリソソーム内で分解されるという新規知見を得た。これは、CD81 の機能解析、B 細胞分化、ウイルス感染、さらには、CD81 を標的とした抗腫瘍薬開発などの CD81 に関する他の学術領域でも必要とされる知見であり、意義のある研究成果だと言える。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。