

平成 26 年 11 月 12 日

## 神経難病 CMT 病の原因タンパク質が細胞内に蓄積する仕組みの一端を解明 ～変異タンパク質が小胞体に蓄積する疾患の発症機序解明や創薬への期待～

### 【概要】

シャルコー・マリー・トゥース (Charcot-Marie-Tooth disease: CMT) 病は下腿と足の筋萎縮と感覚障害を特徴とする遺伝性の神経難病であり、2,500 人に 1 人の割合で発症すると報告されている遺伝性疾患です。これまでに複数の原因遺伝子が見つかっておりますが、根本的な治療法は現在までに確立されていません。

今回、国立大学法人群馬大学(高田邦昭学長)・生体調節研究所(岡島史和所長)・細胞構造分野の佐藤健教授、原太一准教授の研究グループは、この CMT 病発症の原因となる**変異 PMP22 タンパク質** (PMP22) が細胞内に蓄積するメカニズムの一端を明らかにしました。通常、正常な PMP22 (野生型 PMP22) はタンパク質合成工場である「**小胞体**」において合成後、細胞表面(細胞膜)へと輸送され、神経細胞を保護するミエリンの形成に働きます。しかしながら、遺伝子変異によって生じる**変異 PMP22 タンパク質** (変異 PMP22) は「**小胞体**」に蓄積することにより**細胞毒性を示し、細胞を変性させる**ことが知られていました。小胞体に蓄積した変異 PMP22 を小胞体から分解、除去したり、小胞体以降へと輸送させる(追い出す)ことができれば、病状を緩和できると期待されます。しかしながら、なぜ変異 PMP22 が小胞体に蓄積してしまうのかについてはこれまでほとんど明らかとなっておりませんでした。

今回、私達はこれらの変異 PMP22 の小胞体における分解に関連する因子として新たに **Hrd1** と **gp78** を同定しました。また、私達は変異 PMP22 の 1 種である PMP22(L16P)の小胞体蓄積に関わる 2 つの因子、**Rer1** と**カルネキシン**を発見しました。これら 2 つの因子を同時に機能抑制すると変異 PMP22 タンパク質の小胞体蓄積が劇的に緩和され、細胞膜等へと輸送されるようになることが明らかとなりました。本研究は、CMT 病のみならず変異タンパク質が小胞体に蓄積する様々な疾患の原因解明および新たな創薬ターゲットを提案し、治療薬の開発にも役立つと期待されます。

### 【ポイント】

- ・ 小胞体に蓄積した PMP22 の分解に関わる因子として Hrd1 と gp78 を発見した。
- ・ CMT 病の原因タンパク質である変異 PMP22 の小胞体蓄積に関わる因子として、カルネキシンと Rer1 を発見した。

本研究結果は、英国オンライン科学誌 Scientific Reports 電子版に（英国時間の11月11日午前10時（英国時間）付）で掲載予定です。

Rer1 and calnexin regulate endoplasmic reticulum retention of a peripheral myelin protein 22 mutant that causes type 1A Charcot-Marie-Tooth disease

Taichi Hara（原太一）, Yukiko Hashimoto（橋本由紀子）, Tomoko Akuzawa（阿久澤共子）, Rika Hirai（平井里香）, Hisae Kobayashi（小林久江）, and Ken Sato（佐藤健, 責任著者）

（群馬大学 生体調節研究所 細胞構造分野）

#### 【研究背景】

細胞膜タンパク質や細胞内の膜構造を構成する膜タンパク質の多くは、まず小胞体（タンパク質生産工場のような場所）で合成後、ゴルジ体（タンパク質加工工場のような場所）を経て、目的地である細胞膜（細胞表面）や各膜構造へと輸送されます（図1、左）。小胞体では新たに合成されたタンパク質に糖を付加したり、正しく折りたたむなどした後、厳しい品質管理が行われ、正常なタンパク質のみを小胞体から、ゴルジ体、そしてそれ以降の目的地へと輸送しています（図1、左）。しかしながら、この品質管理機構が逆に疾患を引き起こすケースが知られています（図1、右）。例えば遺伝性の腎性尿崩症などでは、本来、細胞膜に存在し尿濃縮に働く膜タンパク質に変異が生じた結果、タンパク質活性を保持しているにも関わらず小胞体品質管理機構によってトラップされてしまい、重篤な疾患を引き起こすことが知られています（図2）。また、変異膜タンパク質が小胞体に過剰に蓄積した結果、細胞傷害性を呈するケースも知られています。このように変異膜タンパク質が小胞体に蓄積してしまうことが原因の疾患は多数報告されていますが、変異が生じた膜タンパク質がなぜ小胞体に蓄積してしまうのか、そのメカニズムはほとんど明らかとなっていませんでした。そこで本研究では、変異膜タンパク質 PMP22 が小胞体に蓄積することが原因と考えられている神経難病、シャルコー・マリー・トゥース（CMT）病に着目し、変異 PMP22 の小胞体蓄積機構について解析を行いました。

#### 【研究手法と結果】

シャルコー・マリー・トゥース(Charcot-Marie-Tooth disease: CMT)病は下腿と足の筋萎縮と感覚障害を特徴とする遺伝性の神経難病で、2500人に1人

の割合で発症することが報告されている遺伝性疾患です（図3）。50%以上のCMT病において、PMP22タンパク質の発現量の増加が認められます（図4）。また、PMP22の遺伝子変異により変異PMP22が小胞体に蓄積すると、より重篤なCMT病の症状を呈することが明らかになっています。PMP22は神経細胞を保護するシュワン細胞の分化やミエリンの形成に働いている膜タンパク質であり、小胞体で合成後、細胞膜へと輸送されます。しかしながら、遺伝子変異によりアミノ酸置換が生じると小胞体に蓄積し、その機能を果たすことができなくなります（図5）。また、ある種の優性変異の場合は小胞体に過剰に蓄積することにより、シュワン細胞の細胞死を引き起こすことが知られています（図5）。これらの結果として神経細胞が脱落し、筋萎縮などにより歩行障害など生活に大きな支障がでることが問題となります。

そこで、変異PMP22の小胞体蓄積のメカニズムを簡便に解析するために、正常なPMP22（野生型という）と2種の優性変異PMP22 [L16P（16番目のロイシンがプロリンに置換）、G150D（150番目のグリシンがアスパラギン酸に置換）]に緑色蛍光タンパク質（GFP）を融合し、HeLa細胞における局在性（居場所）を解析しました。その結果、野生型PMP22は速やかに小胞体から細胞膜やリソソームに輸送されるのに対し、各変異PMP22はほとんど小胞体に蓄積していました（図5）。最近の研究から小胞体中存在するPMP22のタンパク量を低下させるとCMT病の症状が改善することが明らかになりつつあります。そこで私たちは、まず小胞体においてPMP22の分解に働く分子メカニズムについて解析を行いました。その結果、Hrd1とgp78という2つの因子が野生型もしくは変異PMP22の小胞体における分解に関与することを見出しました（図6）。これらはタンパク質にユビキチンという目印を付加して分解を促進する因子であり、これらの機能を低下させると野生型もしくは変異PMP22の小胞体におけるタンパク量が顕著に増加しました。

次に、私たちは変異PMP22が小胞体に残留する分子メカニズムについて解析しました。私たちはまずRer1というゴルジ体タンパク質に着目しました（図7）。これまでの研究から、私たちはこのRer1が小胞体から輸送されてきた変異タンパク質などをゴルジ体から小胞体に送り返すことによって小胞体に蓄積させる因子であることを明らかにしてきました。そこで、このRer1のヒト遺伝子を遺伝子ノックダウン法により機能低下させたところ、小胞体に蓄積していたPMP22 L16P変異体の一部が細胞膜やリソソームへと輸送されるようになることが明らかとなりました（図8）。次に、小胞体において野生型PMP22と結合し、PMP22の構造形成に関与することが報告されているカルネキシンに着目し、解析を行いました（図9）。カルネキシンは野生型PMP22よりも変異PMP22とより強く結合し、小胞体の一部に蓄積させているとの報告もあります。そこで、ヒト・カ

ルネキシン遺伝子の機能を低下させてみたところ、予想に反し変異 PMP22 の小胞体蓄積に違いは認められませんでした (図 1 0)。そこで、私達はカルネキシンの機能低下によって変異 PMP22 が小胞体から搬出されても、Rer1 によって捕捉されゴルジ体から小胞体へと送り返されている可能性を考えました。この仮説を証明するために、Rer1 とカルネキシンを同時に機能低下させ、変異 PMP22 の小胞体局在への影響を調べました。その結果、Rer1 とカルネキシンを同時に機能低下させると、変異 PMP22 (L16P) の小胞体蓄積が劇的に緩和され、より細胞膜やリソソームへと輸送されるようになることが明らかとなりました (図 1 1)。また、カルネキシンと Rer1 は両者とも変異 PMP22 を認識し結合することが明らかとなりました。以上のことから、① カルネキシンは小胞体において変異 PMP22 と結合し小胞体に蓄積させる ② Rer1 は小胞体から漏れでてきた変異 PMP22 をゴルジ体において認識し小胞体へと送り返す、という 2 段階のプロセスによって疾患関連変異 PMP22 を小胞体に蓄積させていることが判明しました (図 1 2)。

#### 【今後の展望】

今回の研究から、これまで不明であった CMT 病の発症機構および新たな創薬ターゲットを提案することができました。近年、PMP22 のタンパク質量を低下させることで、CMT 病の症状が緩和できるという報告がなされてきています。今回発見した PMP22 タンパク質の分解機構を促進することによって、PMP22 の過剰な蓄積によって生じる毒性を軽減できる可能性があります。また、PMP22 を小胞体から搬出する (追い出す) 方法は、既存の治療戦略とは全く違う仕組みであり、変異 PMP22 のようにタンパク質の量の変化ではなく小胞体に蓄積することでより重篤な CMT 病を発症するタイプの疾患に対しても、より効果的な治療法や治療薬の開発に結びつくものと期待されます (図 1 3)。つい最近、私たちは網膜色素変性症の原因タンパク質である変異ロドプシンの小胞体蓄積にも Rer1 が関与することを明らかにしています。本研究は CMT 病だけでなく、変異膜タンパク質が小胞体に蓄積する様々な疾患の原因を解明する糸口になる可能性があります。

本研究は内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム (NEXT) のご支援による研究です。

連絡先 : 群馬大学生体調節研究所 細胞構造分野

佐藤健, 原太一 電話 : 027-220-8843 (佐藤) , 8842 (原)

FAX: 027-220-8844 E-mail: [sato-ken@gunma-u.ac.jp](mailto:sato-ken@gunma-u.ac.jp)

図1

## 小胞体蓄積における品質管理機構

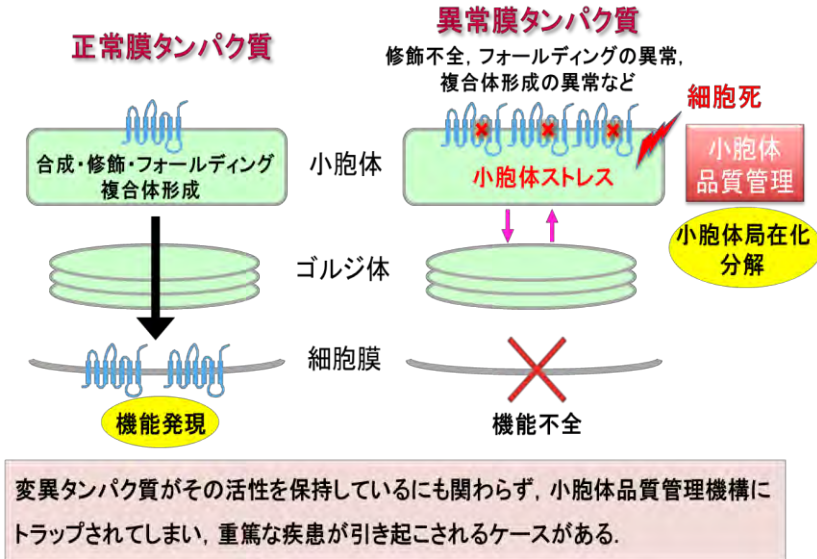


図2

## 変異膜タンパク質の小胞体蓄積によって生じる疾患の例

遺伝子	機能	症状	膜貫通領域における変異	参考文献
AQP2	水チャンネル	腎性尿崩症	G175Rなど	Kuwahara et al, 1998
SUR1	サルフォネルウレア受容体	高インスリン血症	V187Dなど	Yan et al., 2004
HERG	カリウムチャンネル	不整脈, 突然死	Y611Hなど	Zhou et al., 1998
SCN5A	ナトリウムチャンネル	不整脈, 突然死	G1740Rなど	Baroudi et al, 2004
PMP22	ミエリンタンパク質	シャルコー・マリー・トウス病	G150Dなど	Nael and Suter, 1999
V2R	V2 パソプレシン受容体 (Gタンパク質共役受容体)	腎性尿崩症	V206Dなど	Robben et al., 2005
opsin	光受容器細胞色素 (Gタンパク質共役受容体)	網膜色素変性症	L40Rなど	Mendes al., 2005

異常膜タンパク質の小胞体局在化の分子メカニズムは  
ほとんど解明されていない

図3

## Charcot-Marie-Tooth病 (CMT)

遺伝性の末梢神経障害  
 遺伝性運動感覚性ニューロパチー(HMSN)とも言われる  
 日本では1万人に1人、欧米では2500人に1人  
 原因遺伝子は30以上で、遺伝形式・臨床症状は多様  
**現在、有効な治療薬がない疾患のひとつである。**

下肢遠位部から始まる筋力低下・筋萎縮が主体  
 感覚障害は軽度  
 呼吸、視覚、聴覚や首、肩の筋肉にも障害が起こりうる  
 声帯麻痺を生じるタイプもある  
 発症年齢・遺伝形式はタイプにより異なる  
 徐々に進行し歩行困難となるが、生命予後は良好

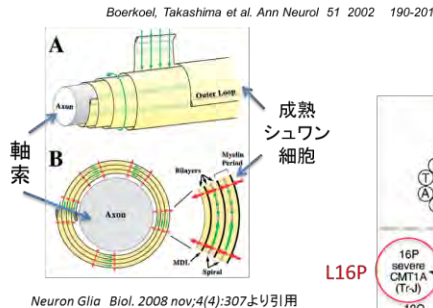
図4 PMP22の遺伝子異常がCMT病の原因となっている

(CMT1 or 2 患者 計153例)

17p12重複 (PMP22を含む領域)	79	51.6%
GJB1(Cx32)遺伝子異常	11	7.2%
MPZ遺伝子異常	5	3.3%
PMP22遺伝子異常	5	3.3%
EGR2遺伝子異常	1	0.65%
PRX遺伝子異常	1	0.65%
NEFL遺伝子異常	1	0.65%
MTMR2遺伝子異常	0	0%
遺伝子異常見つからず	50	32.7%

### PMP22

180アミノ酸からなる膜4回貫通タンパク質。ミエリン構成タンパク質の一つであり、他のミエリン構成タンパク質などとヘテロフィリック、あるいは自身のホモフィリックな相互作用を介してミエリン細胞膜同士の接着を促進し、ミエリン構造の形成と維持に働いていると考えられる。



末梢神経細胞の軸索を取り巻くシュワン細胞で機能するPMP22の遺伝子重複および遺伝子変異等によって引き起こされる。

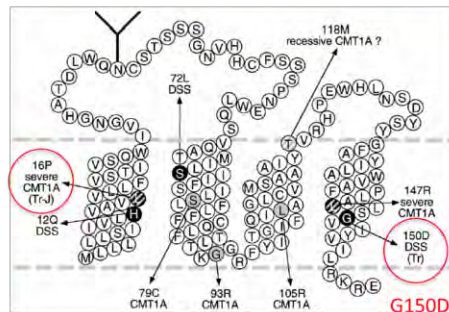
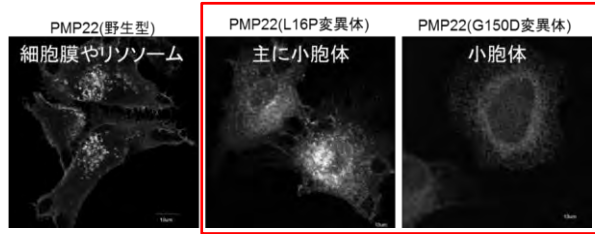


図5

疾患関連変異PMP22は  
主に小胞体に局在する



小胞体にPMP22が蓄積すると、

PMP22が細胞膜へ輸送されずにミエリン形成に異常を生じる  
PMP22が小胞体に蓄積しシュワン細胞死を誘導する

➡ CMT病の発症

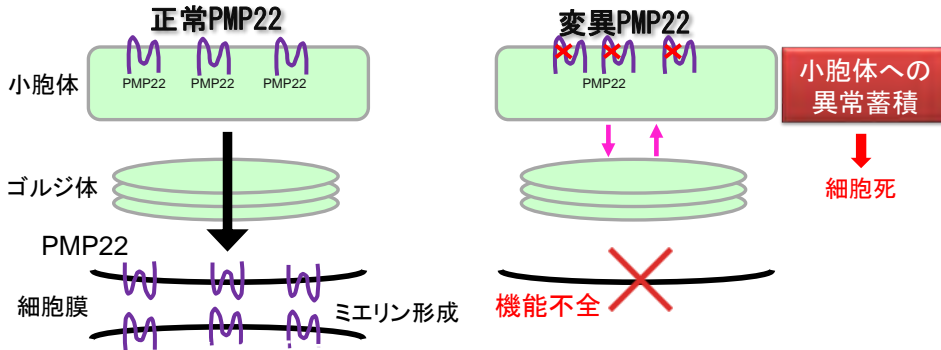


図6 小胞体における変異PMP22の分解のメカニズム

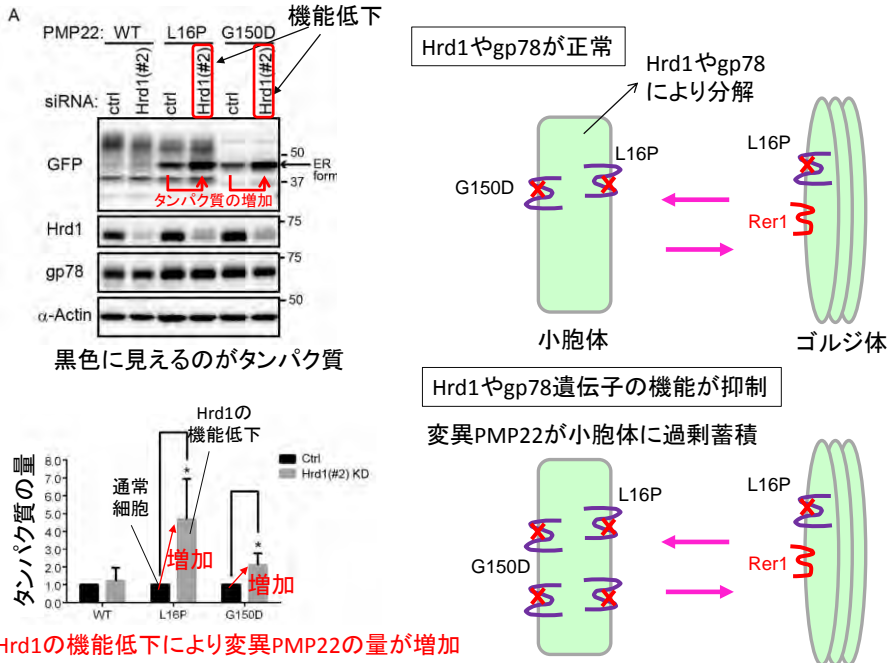


図7

## Rer1p は膜タンパク質の小胞体局在化を制御する

- ✓ 酵母において小胞体膜タンパク質の局在化に必要な新規因子として発見 (Sato, et al., 1995, 1996, 2001)
- ✓ 酵母からヒトにまで高度に保存された膜タンパク質
- ✓ 膜タンパク質の品質管理においても標的タンパク質の認識と小胞体局在化を制御する (Sato, et al., 2003, 2004)
  - 膜貫通領域に変異をもつ異常タンパク質 (変異ロドプシンの小胞体蓄積)
  - 複合体形成していない膜タンパク質 (鉄輸送複合体,  $\gamma$ セクレターゼ複合体など)

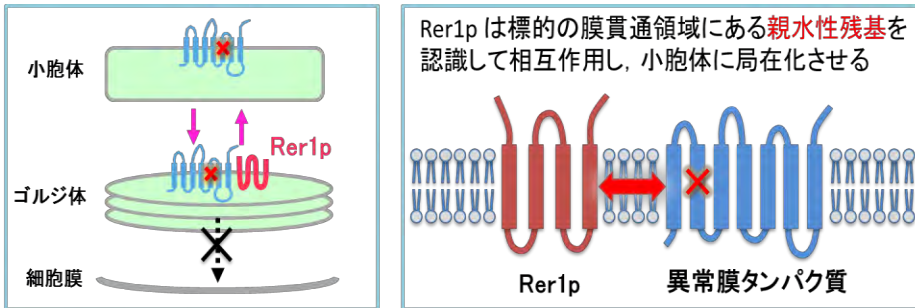


図8

Rer1遺伝子の働きを低下させるとL16P変異体が小胞体から細胞膜やリソソームへと輸送されるようになる

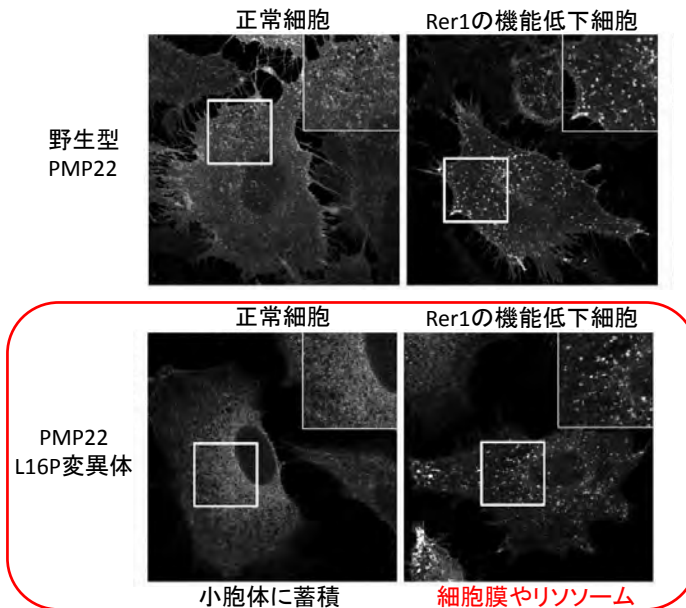




図9

カルネキシンは折り畳みの不完全なタンパク質を認識し、小胞体に留める

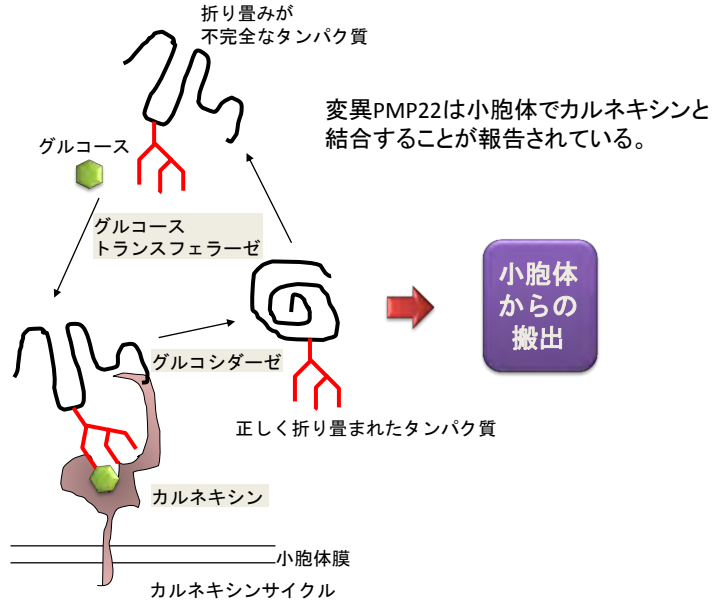


図10

カルネキシン遺伝子の発現を低下させてもL16P変異体の小胞体局在に違いはない

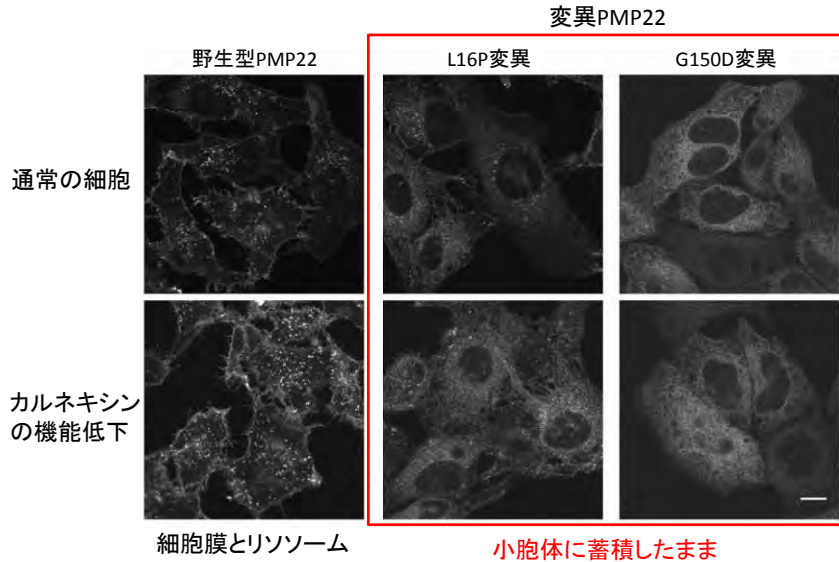


図11 カルネキシンとRer1遺伝子の働きを同時に低下させると、L16P変異体が劇的に小胞体から細胞膜へと輸送されるようになる

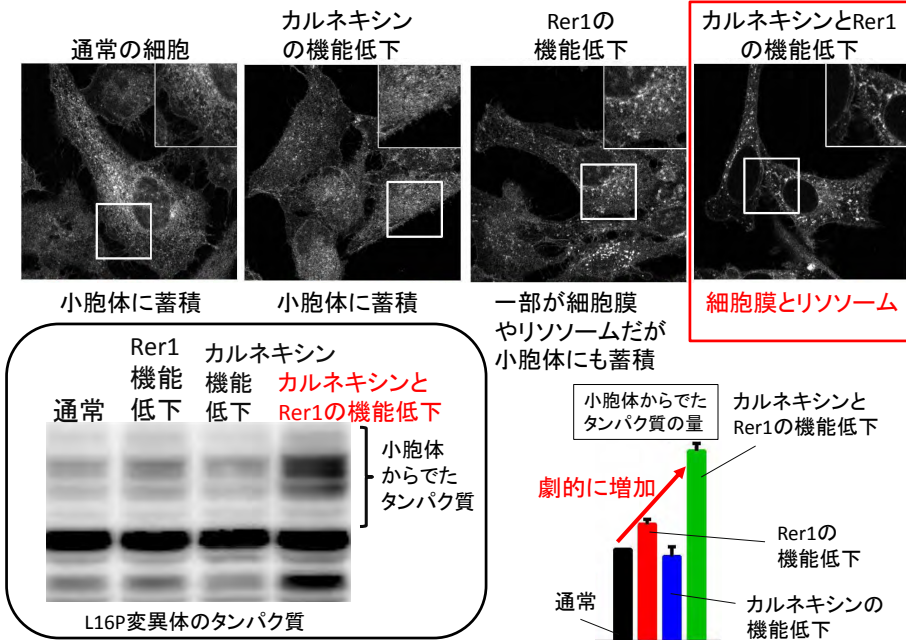


図12 カルネキシンとRer1によるPMP22のL16P変異体の小胞体蓄積のメカニズム

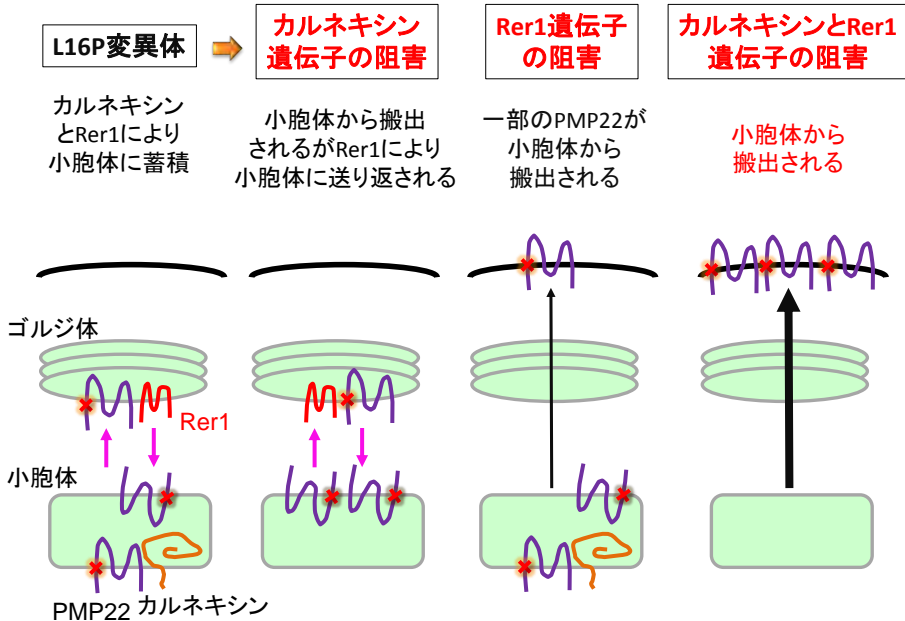


図13

PMP22の小体局在化の解除や分解の促進によりCMT病の治療応用が期待できる

