

## 上皮膜輸送機能制御における 細胞骨格系アダプタータンパク質エズリンの役割

波多野 亮

### 1. はじめに

ERM (ezrin, radixin, moesin) タンパク質として知られるエズリン, ラディキシン, モエシンは1980年代に Bretscher<sup>1)</sup>, Tsukita<sup>2)</sup>, Lankes<sup>3)</sup> らによってそれぞれ同定されたタンパク質である。ERMタンパク質は、アクチン細胞骨格と原形質膜とをクロスリンクする機能を有するとともに、アクチンフィラメントの再構成を伴う細胞運動や接着などのさまざまな機能を調節するタンパク質として注目されてきた。培養細胞を用いたさまざまな研究に加え1990年代後半より遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* の機能解析が進み、さまざまな臓器におけるERMタンパク質の新たな役割の解明が進んでいる。本稿では、ERMタンパク質の中でもエズリンの生体内における役割に関して、筆者らの研究成果を含めて紹介する。

### 2. ERMタンパク質の生体内における役割

前述のように、エズリン, ラディキシン, モエシンはERMタンパク質と呼ばれ、N末端側にFERM (band 4.1, ezrin, radixin, moesin) ドメインを共通して持つband 4.1スーパーファミリーに属している<sup>4)</sup> (図1)。エズリン (cytovillin, または villin-2としても知られる) は1980年代に小腸の微絨毛や胎盤の合胞栄養芽層から同定された<sup>1)</sup>。ERMタンパク質はさまざまな臓器に発現しており、エズリンは主に胃, 小腸, 腎, 肺などに豊富に存在し、ラディキシンは肝臓, モエシンは肺や脾臓に多く発現している。エズリン, ラディキシン, モエシンは高いアミノ酸配列相同性を有しており (エズリンはラディキシンと75%, モエシンと74%), 類似した機能を持つと考えられている (図1)。培養細胞を用いた多くの *in vitro* の研究では、

ERMタンパク質間で機能的な重複 (redundancy) がみられることが知られているが、個体レベルでは発現する臓器や細胞が異なり、同じ細胞で発現している場合でも必ずしも他方が欠損したタンパク質の機能を補うとは限らない事例も報告されている<sup>5)</sup>。

エズリンはERMタンパク質の中でも上皮組織に主に発現しており、上皮細胞における微絨毛の形態形成や細胞内小胞の膜融合、細胞膜タンパク質の細胞膜発現安定性調節等のさまざまな機能を有すると考えられている。ERMタンパク質の中でも欠損することで生体に及ぼす影響が最も強く、エズリンを完全に欠損したマウスは誕生するものの、離乳期前後に死んでしまう。Saotomeらは発達期の腸管の吸収上皮細胞において微絨毛の短小化などとともに絨毛の形態に異常が生じることを報告している<sup>6)</sup>。後にCasalettoらはコンディショナルノックアウトマウスを用いて、成体のマウス腸管においてもエズリンを欠損させることで同様の異常がみられることを報告しており、エズリンが腸管の形態や機能制御において非常に重要な役割を持つことを示した<sup>7)</sup>。前述のようにエズリン完全欠損マウスは離乳期前後で死んでしまうことから、成体でのエズリンの欠損の影響はコンディショナルノックアウトマウスを用いることで解析が可能である。一方でTamuraらはエズリン遺伝子 (*Vil2*) のイントロン部位に変異カセットを導入することで、エズリンの発現を5%程度まで低下させたノック

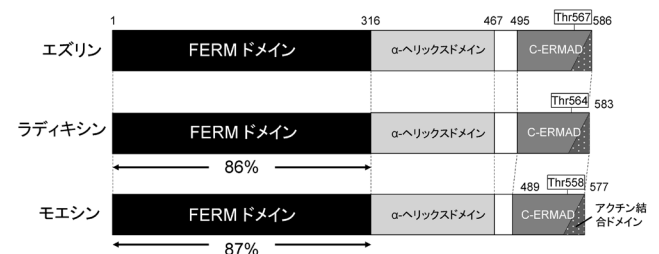


図1 ERMタンパク質の構造

N末端側にはband 4.1ファミリータンパク質に共通のFERM (band 4.1, ezrin, radixin, moesin) ドメインを持ち、C末端側にはC末端ERM結合ドメイン (C-terminal ERM associated domain) およびアクチン結合ドメインを持つ。ERM結合ドメインのトレオニンのリン酸化により活性化型となる。エズリンとのFERMドメインの相同性はそれぞれラディキシンが86%、モエシンが87%。

立命館大学薬学部分子生理学研究室 (〒525-8577 滋賀県草津市野路東1-1-1)

Functional roles of ezrin, a cytoskeletal adaptor protein in the regulation of epithelial transport

Ryo Hatano (College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, 1-1-1 Noji-Higashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880517

© 2016 公益社団法人日本生化学会

クダウンマウスを作製し、成体での胃酸分泌調節におけるエズリンの役割について解析を行っている<sup>8)</sup>。エズリンノックダウン (*Vil2<sup>kd/kd</sup>*) マウスは著しい成長障害を示すものの7%程度のマウスは離乳期以降も生存するため、成体マウスにおけるエズリン発現低下の影響を調べることが可能である。エズリンは胃壁細胞において発現し、胃酸分泌酵素H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの発現に影響することなく細管小胞と管腔膜の膜融合に関わる機能を持つことが示唆されており、*Vil2<sup>kd/kd</sup>*マウスでは胃酸分泌障害が起こり、無酸症を呈することが明らかにされた<sup>8)</sup>。一方で、Kikuchiらはラディキシンノックアウト (*Rdx<sup>-/-</sup>*) マウスでは毛細胆管における抱合型ビリルビン輸送体であるMRP2 (multidrug-resistance protein 2) の膜局在が低下し、高ビリルビン血症を発症することを報告している<sup>9)</sup>。モエシンに関しては、Doiらによるノックアウトマウス解析による当時の研究では明らかな異常が認められなかったが<sup>10)</sup>、肺気管支の組織修復機構における役割や、肝臓の星状細胞の炎症刺細胞遊走における役割、末梢リンパ球の恒常性の維持やリンパ球のリンパ臓器を介した移出入への関与についても報告されている<sup>5)</sup>。このように遺伝子改変マウスを用いた研究から、生体内におけるERMタンパク質の役割が明らかになりつつある。ERMタンパク質は生体内ではそれぞれ異なる組織・細胞に発現し、異なる役割を生体内で担っているものと考えられる。

### 3. *Vil2<sup>kd/kd</sup>* マウスで見つかった新たな表現型

エズリンに関しては、胃や小腸における機能解析が主に進められてきたが、他の臓器における役割については不明な点が多い。エズリンのノックアウトマウスにおける離乳期前後の致死は前述のように腸管での形態形成の異常がその主な原因であると考えられてきた。しかし、*Vil2<sup>kd/kd</sup>*マウスでは腸管の形態に必ずしも大きな変化がみられないのにも関わらず、成体までの生存率が7%程度と低く、著しい成長障害がみられる<sup>8)</sup>。エズリンは腎臓では近位尿細管や糸球体の足細胞にも発現していることが知られている。他、肝臓でのエズリンの発現はラディキシンやモエシンに比べて非常に低いものの、肝内胆管上皮細胞において特異的に発現しており、胆管の機能調節に関わることが考えられた。我々は、このような胃・小腸以外の臓器におけるエズリンの役割について検討を進めてきた。

#### 1) 腎臓におけるエズリンの機能とリン酸、カルシウム吸収の制御における役割

腎臓は血液中からさまざまな老廃物を体外に排出するとともに生体にとって栄養素として重要な糖やアミノ酸、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, リン酸などのさまざまな物質を再吸収す

る役割を担っている。近位尿細管には特に多くの種類のトランスポーターが発現しており、ここで生体に必要な栄養素の大部分が回収され、血液を通じて再び全身へと運ばれる。エズリンは腎臓では主にこの近位尿細管上皮細胞の管腔膜側において発現している。エズリンは分子内のFERMドメインを介してPDZ (postsynaptic density 95; discs large; zonula occludens-1) タンパク質であるNHERF1 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1) やNHERF2と相互作用することが知られており、NHERFがさまざまな膜輸送体の局在制御に関わることからエズリンもさまざまな膜輸送体分子の局在や機能制御に関わっていることが予想された。NHERF1のノックアウトマウスでは低リン酸血症を生じることが報告されており<sup>11)</sup>、我々の解析の結果、*Vil2<sup>kd/kd</sup>*マウスでも尿中へのリン酸排泄の亢進がみられ、血中リン酸濃度も低下していることが明らかになった<sup>12)</sup>。*Vil2<sup>kd/kd</sup>*マウスの成長障害には、骨形成において重要なリン酸やカルシウムのバランスの異常が関与していることが考えられる。リン酸の生体内バランスの維持には腎近位尿細管管腔側に発現するリン酸輸送体Npt2a (Na<sup>+</sup> dependent phosphate transporter 2A) およびNpt2cが重要な役割を担っている。Npt2aは細胞内C末端領域にPDZ結合モチーフを有し、NHERF1との相互作用を介してエズリンと相互作用することが知られており、エズリンの欠損はこれらのタンパク質の局在や機能に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。腎臓および十二指腸の刷子縁膜小胞 (brush border membrane vesicle: BBMV) 画分を用いたウェスタンブロット解析、および免疫蛍光染色による細胞内局在解析を行った結果、腎近位尿細管ではNpt2a, Npt2cおよび足場タンパク質であるNHERF1のBBMVにおける顕著な発現の減少とサブアピカル領域およびゴルジ体への蓄積が生じていることが明らかとなった。また*Vil2<sup>kd/kd</sup>*マウスの腎臓ではカルシウムの再吸収に明らかな異常は認められなかったが血中のカルシウム濃度低下がみられており、これには十二指腸でのカルシウム吸収を担うTRPV6 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 6) チャネルの小腸吸収上皮細胞における細胞膜発現量の低下が関わっていることを示した。*Vil2<sup>kd/kd</sup>*マウスでは骨密度の著しい低下もみられており、エズリンの欠損はこのようなリン酸やカルシウムの生体内バランス調節異常を引き起こすことによって“くる病”様の低リン酸血症を引き起こすものと考えられた。

#### 2) 肝内胆管におけるエズリンの役割

肝臓においてエズリンは胆管上皮細胞に限局して発現しており、ラディキシンやモエシンに比べて肝組織内における発現量が低いことからこれまでその役割は注目されてこなかった。我々は、*Vil2<sup>kd/kd</sup>*マウスが生後4週前後から肝機

能障害がみられるとともに、胆管周囲の線維化や胆管細胞増殖を伴う肝内胆汁うっ滞症を示すことを見いだした<sup>13)</sup>。肝臓内の胆管は胆汁を十二指腸に運ぶ単なる導管ではなく、胆汁の流動性制御やアルカリ性の調節を担う重要な機能を有しており、これらの機能の破綻は肝内胆汁うっ滞を伴う肝機能障害を引き起こすことが知られている。特に胆汁のアルカリ化は高い細胞毒性を有する胆汁酸グリシン抱合体のプロトン化を防ぐ役割を果たしている(図2)。胆汁酸はプロトン化を受けることによって脂溶性が高まり、容易に胆管上皮細胞膜を通過し細胞傷害を示すものと考えられている。このため胆管上皮細胞は管腔内に $\text{HCO}_3^-$ を分泌して胆汁酸のプロトン化を防ぐことで細胞表面をカバーし、胆汁酸による細胞傷害を防ぐ“biliary bicarbonate umbrella”と呼ばれる細胞防御機構を備えているものと近年考えられている<sup>14)</sup>。この機構の中心的な役割を担うのが、胆管上皮細胞の管腔側表面に発現している $\text{Cl}^-$ 輸送体であるCFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)と $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送体であるAE2(anion exchanger 2)である(図2)。CFTRは嚢胞性線維症(CF)の原因遺伝子でもあり、 $\text{Cl}^-$ の分泌を介して水分分泌を調節し、分泌液の粘稠度調節を担う重要な役割を有している。その機能異常は気道内液、腸管内液、腭液など全身の分泌液の粘度の上昇を引き起こし、管腔の閉塞を引き起こすことで胎便性イレウスや呼吸器感染リスク上昇に伴う呼吸不全といった重篤な症状を引き起こす。またCF患者では胆管機能障害を引き起こすことも知られている。CFTRは細胞内C末端領域にPDZ結合モチーフを有しており、前述の足場タンパク質NHERF1を介してエズリンと相互作用することが報告されている。またエズリンはcyclic adenosine 3',5'-monophosphate(cAMP)依存性protein kinase A(PKA)の足場としても機能し、CFTRのPKA依存性のリン酸化による活性化調節にも重要な役割を担う。一方でAE2はCFTRによって分泌された $\text{Cl}^-$ を利用して二次性能動輸送により管腔側へ $\text{HCO}_3^-$ を分泌する。AE2の欠損も原発性硬化性胆管炎を引き起こすことが報告されており、前述のように $\text{HCO}_3^-$ バリア形成障害がその原因であると推察される。AE2は細胞内C末端領域にPDZ結合モチーフを有しておらずNHERF1やエズリンとの関係性についてはこれまでに報告がないが、CFTR、AE2および水チャネルであるaquaporin1(AQP1)を含む細胞内小胞がcAMP依存的に胆管上皮細胞の管腔膜側に運ばれるものと考えられている。我々の研究結果では、*Vil2<sup>kd/kd</sup>*マウスの肝内胆管上皮細胞においてCFTRやNHERF1の管腔膜局在に異常がみられ、マウス由来の不死化胆管細胞を用いた*in vitro*の系でも不死化胆管細胞にアクチン結合ドメインを欠失しクロスリンカーとしての機能を持たないドミナントネガティブ(DN)型のエズリンを発現させることでCFTRやAE2、AQP1の管

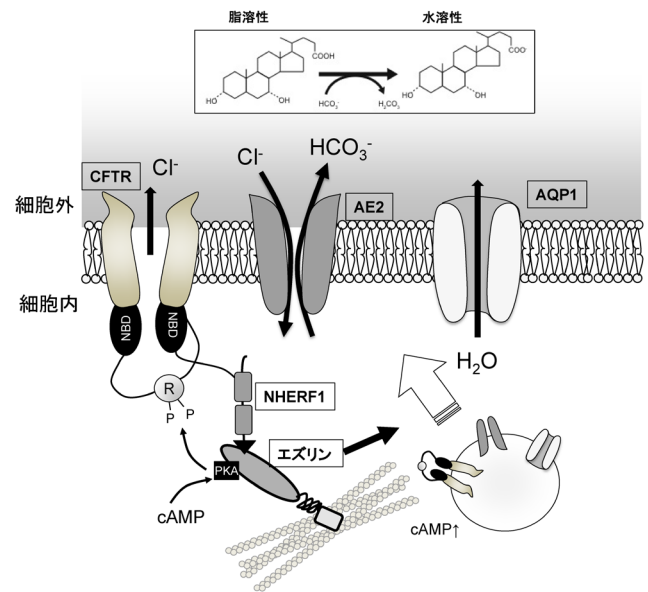


図2 肝内胆管におけるエズリンの役割と biliary bicarbonate umbrella

エズリンによるNHERF1とのタンパク質間相互作用を介したCFTRのアクチン細胞骨格との架橋、PKAの足場として機能することによるCFTRの活性調節を示している。またエズリンはCFTR、AE2、AQP1を含む小胞のトラフィッキングにも関わる可能性がある。CFTR、AE2の機能共役による $\text{HCO}_3^-$ の細胞外分泌によって胆汁酸のプロトン化を防ぎ細胞を保護する役割を果たしている(biliary bicarbonate umbrella)。NBD: nucleotide binding domain, R: regulatory domain, PKA: protein kinase A。

腔膜における発現量が低下することが明らかとなった。胆管上皮細胞では、基底膜側からのセクレチン受容体刺激を介した細胞内cAMPの上昇がCFTRやAE2、AQP1の管腔膜表面上における発現量を増加させるが(図2)、DN-エズリン発現細胞ではcAMP依存性のこれらの膜タンパク質の管腔膜発現が阻害された。また、DN-エズリン発現細胞ではcAMP依存的なCFTRのリン酸化にも障害を受けていることが明らかとなった。これらの結果はエズリンが胆管上皮細胞においてCFTR、AE2、AQP1の膜局在安定性や細胞内膜輸送、さらにAキナーゼアンカータンパク質(AKAP)としての役割を担う重要な分子であるということを示唆している。

本研究成果はエズリンが胆管上皮細胞においてCFTRを含む輸送体の局在制御に関わる重要な役割を担っていると同時に、CFTRとAE2を介して形成される“biliary bicarbonate umbrella”が胆管上皮細胞の機能維持において重要であることを示している。

#### 4. おわりに

現在までに多くの研究者らによって非常に多くのタンパク質がエズリンと相互作用することが報告されてきた。



Viswanathaらは、既知の相互作用タンパク質について取りまとめるとともに、網羅的な解析を行うことで新たな相互作用タンパク質の同定を試みている<sup>15)</sup>。彼らはヒト妊娠性絨毛がん細胞であるJeg-3細胞を用いてエズリンのコンホメーション変化に応じた相互作用タンパク質の違いなどを報告しており<sup>15)</sup>、新たな相互作用タンパク質の同定に成功している。これまでの我々の研究では、生体内においてエズリンが膜輸送体のメンブレントラフィッキングの制御にも重要な役割を担っていることを示唆する結果が得られているがどのようなタンパク質との相互作用を介しているかは明らかでなく、今後さらにさまざまなタンパク質との相互作用の可能性を考慮し詳細に解析する必要がある。

## 文 献

- 1) Bretscher, A. (1983) *J. Cell Biol.*, **97**, 425–432.
- 2) Tsukita, S., Hieda, Y., & Tsukita, S. (1989) *J. Cell Biol.*, **108**, 2369–2382.
- 3) Lankes, W., Griesmacher, A., Grünwald, J., Schwartz-Albiez, R., & Keller, R. (1988) *Biochem. J.*, **251**, 831–842.
- 4) Sauvanet, C., Wayt, J., Pelaseyed, T., & Bretscher, A. (2015) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **31**, 593–621.
- 5) Hirata, T., Nomachi, A., Tohya, K., Miyasaka, M., Tsukita, S., Watanabe, T., & Narumiya, S. (2012) *Int. Immunol.*, **24**, 705–717.
- 6) Saotome, I., Curto, M., & McClatchey, A.I. (2004) *Dev. Cell*, **6**, 855–864.
- 7) Casaletto, J.B., Saotome, I., Curto, M., & McClatchey, A.I. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 11924–11929.
- 8) Tamura, A., Kikuchi, S., Hata, M., Katsuno, T., Matsui, T., Hayashi, H., Suzuki, Y., Noda, T., Tsukita, S., & Tsukita, S. (2005) *J. Cell Biol.*, **169**, 21–28.
- 9) Kikuchi, S., Hata, M., Fukumoto, K., Yamane, Y., Matsui, T., Tamura, A., Yonemura, S., Yamagishi, H., Keppler, D., Tsukita, S., & Tsukita, S. (2002) *Nat. Genet.*, **31**, 320–325.
- 10) Doi, Y., Itoh, M., Yonemura, S., Ishihara, S., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 2315–2321.
- 11) Capuano, P., Bacic, D., Roos, M., Gisler, S.M., Stange, G., Biber, J., Kaissling, B., Weinman, E.J., Shenolikar, S., Wagner, C.A., & Murer, H. (2007) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **292**, C927–C934.
- 12) Hatano, R., Fujii, E., Segawa, H., Mukaisho, K., Matsubara, M., Miyamoto, K., Hattori, T., Sugihara, H., & Asano, S. (2013) *Kidney Int.*, **83**, 41–49.
- 13) Hatano, R., Akiyama, K., Tamura, A., Hosogi, S., Marunaka, Y., Caplan, M.J., Ueno, Y., Tsukita, S., & Asano, S. (2015) *Hepatology*, **61**, 1660–1671.
- 14) Beuers, U., Hohenester, S., de Buy Wenniger, L.J., Kremer, A.E., Jansen, P.L., & Elferink, R.P. (2010) *Hepatology*, **52**, 1489–1496.
- 15) Viswanatha, R., Wayt, J., Ohouo, P.Y., Smolka, M.B., & Bretscher, A. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 35437–35451.

## 著者寸描

### ●波多野 亮 (はたの りょう)

立命館大学薬学部分子生理学研究室助教。博士(医学)。

■略歴 2002年東北大学薬学部卒業。04年同大学院薬学研究科修士課程修了。08年同大学院医学系研究科博士課程終了。08年大阪大学大学院医学研究科特任研究員。10年立命館大学薬学部助手。11年日本学術振興会特別研究員PD。同年米国Yale大学医学部博士研究員。12年より現職。

■研究テーマと抱負 主に腎尿細管における足場タンパク質の役割やプロスタグランジンなどの脂質メディエーターの経細胞膜輸送に関する研究を進めています。