

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292177

研究課題名(和文) ユビキチン非依存性膜蛋白質小胞体品質管理の謎と偽ロンポイド分子ダーリンの役割

研究課題名(英文) Roles of pseudo-rhomboid protein Derlins in the Ub-independent ER-associated degradation of membrane proteins

研究代表者

稲葉 睦 (INABA, Mutsumi)

北海道大学・(連合) 獣医学研究科・教授

研究者番号：00183179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：AE1変異体R664X AE1の小胞体関連分解(ERAD)は、Ub化に非依存性で細胞質への逆行輸送なしにER膜上で生じる。偽ロンポイドDerlinsに焦点を充てて、異なる細胞内動態を示すR664X、R845X、CD各変異体の分解におけるその役割を解析した。Derlin-1,2、それらのキメラはいずれもR664X AE1と相互作用し、またDerlin-1,2の発現阻害はR664X AE1の分解を抑制した。R845X、CDもR664Xと同様にDerlinsの発現抑制でその分解は阻害された。これらの結果から、Derlinsは逆行輸送の違いを超えて膜蛋白質のERADに関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：The ER-associated degradation (ERAD) of R664X AE1 is characteristic because it occurs in the ER membrane in a Ub-independent manner. The roles of pseudo-rhomboid proteins, Derlin-1 and -2 in the ERAD of mutant membrane proteins were investigated in the cells expressing R664X, R845X, and CD mutants. Derlins 1 and 2 and their chimeric proteins associated with R664X AE1 and reduction of Derlins caused significant decreases in the contents of R664X AE1. Although R664X or R845X and CD showed remarkable difference in the intracellular distribution resembling their distinct retrotranslocation, breakdown of these mutants were reduced when the expression of Derlins was inhibited. These findings demonstrate that Derlins play key roles in the ERAD of membrane proteins despite of the difference in retrotranslocation from the ER of the substrates.

研究分野：分子医学

キーワード：小胞体関連分解 膜蛋白質 遺伝性疾患 小胞体品質管理

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体(ER)における品質管理(ERQC)と蛋白質分解(ERAD)は、細胞内蛋白質の動態調節と恒常性維持に不可欠な役割を果たしている。ERQC/ERAD は、不良品分子の除去はもちろん、余剰な分子の除去、抗原提示、コレステロール合成、代謝エネルギー確保のための蛋白質分解、転写制御等に積極的に活用され、細胞内蛋白質の動態調節と恒常性維持に必須の役割を果たす。したがって、その異常は様々な疾患の原因となり、疾患原因解明、治療・予防法開発に向けて、ERQC/ERAD の役割と仕組みの解明が世界中で精力的に行われている。既にアルツハイマー病、パーキンソン病、ALS、嚢胞性線維症(CF)、アンチトリプシン病、糖尿病、免疫異常、癌等、多くの疾患への関与が知られるとともに、プロテアソーム阻害剤の抗癌剤や免疫抑制剤としての利用など、ERQC/ERAD 研究の必然性は益々高まっている。

酵母の Ste6\* やヒト CF 原因遺伝子産物 F508-CFTR を対象とした膜内在性・貫通性蛋白質の ERQC/ERAD の研究から、これら膜内在性蛋白質がいずれも 1) Ub 依存性に分解されること、2) ER から一度丸ごとのポリペプチドとして放出されてから 26S プロテアソームによる分解を受けること(基質認識と逆行輸送は全く別の過程である)、さらに 3) プロテアソーム機能が低下すると細胞質に不溶性凝集体 aggresome を形成すること、という共通する特徴が明らかにされている。ところが、申請者らは、変異バンド 3 分子=R664X AE1 (牛球状赤血球症の原因遺伝子異常産物) のプロテアソーム分解は、Ub 化に非依存性で、細胞質への丸ごとの放出は認められず、aggresome の形成も生じないものであることを示した。つまり、R664X AE1 のプロテアソーム分解は、Ub シグナル無しに ER 膜上で生じ、その認識と逆行輸送は同一の過程であることが示された。また、R664X AE1 と F508-CFTR を共在させると、両者の結合により R664X の動態が変化して細胞質に移動し aggresome を形成するようになる。これらの知見は、両者の ERAD の機序が異なることを明示するものであった。

そこで、R664X AE1 と相互作用する分子をプルダウン法で集めて FT-MS/MS で解析したところ、BiP、HSP70、p97 に加え、ダーリン-1 (Derlin-1) とそのパラログである Derlin-2 や CLPTM1、KIAA0090 等の機能未知蛋白質が同定された。Derlin-1 は、抗原提示に関わる ER 膜内在性蛋白質であり、活性中心を失った "偽" rhomboid プロテアーゼ(-セクレターゼと同様の膜内在性プロテアーゼ)であり、その膜内在ドメインで CFTR と、また C 末端部分で p97 と結合して逆行輸送を促進することが、ちょうど報告された。また、我々と同様に、Ub 非依存性なポリトローピック蛋白質の ERQC/ERAD に関するデータが蓄積されていた。

### 2. 研究の目的

変異型 AE1 アニオン輸送体 (R664X AE1) の Ub 非依存性プロテアソーム分解に関する知見をもとに、偽ロンボイドプロテアーゼであることが判明した ER 膜蛋白質 Derlins の役割に焦点をあて基質膜蛋白質の認識と ER から細胞質プロテアソームへの受け渡しのメカニズムを解明することを目的とする。具体的には、

- 1) R664X AE1 の Derlin-1、Derlin-2 に対する選択性とその分子機序、ER から細胞質側への逆行輸送の仕組みを明らかにすること、
- 2) R664X AE1 ポリペプチド全体が細胞質に輸送されることなく、逆行輸送と同時に ER 膜上でプロテアソームによる分解が進行すること、ならびに、
- 3) このプロセスが新しい ERQC/ERAD 経路として普遍的であることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

培養細胞発現系 (HEK 細胞) を用い、基質-Derlins-プロテアソーム複合体についてプルダウン法と LC-MS/MS 解析により ER における基質認識・逆行輸送の選択性に関わる分子群を同定した。そこで AE1 の ERAD における役割が示唆された Derlin-1,2 に焦点を充て、変異体 Derlins を導入した細胞や siRNA 法により Derlins 発現を抑制した細胞を用いて、Derlins の R664X AE1 分解における役割、選択的相互作用の解析、他の ER 分子との相互作用の解析を行った。

また、数種の AE1 構造変異体を作製し、上記と同様の解析を行って、基質側構造の違いによる ERAD の仕組みの変化を検討した。

### 4. 研究成果

1. R664X AE1 を発現させた HEK 細胞を用いて、プルダウン法/LC-MS/MS 法により、これと相互作用する ER 関連分子として p97/VCP、Derlin-1、Derlin-2、calnexin、FIT、CLPTM1 等を同定した。

これらのうち、まず Derlin-1 と Derlin-2 に焦点を充て、ER からの逆行輸送に関与するとされる p97/VCP とこれら Derlins の相互作用を解析した。その結果、SHP ボックスをもつ Derlin-1 の C 末端細胞質領域と結合する一方、Derlin-2 のそれとの結合は全く認められず、Derlin-1 と Derlin-2 の作用機構が本質的に異なることが示唆された。同時に、Derlin-1 と Derlin-2 の膜内在性領域/C 末端領域を組み換えたキメラ蛋白質 Der1/2 と Der2/1 を作製し、これらと R664X AE1 とともに HEK 細胞に発現させたところ、いずれの Derlin とも R664X AE1 との免疫共沈が認められ、これらの相互作用が示された。

2. siRNA を用いて Derlins-1、あるいは Derlin-2 の発現を抑制したところ、いずれの場合も、R664X AE1 の細胞内含量は増加し、R664X AE1 のプロテアソーム分解が抑制され

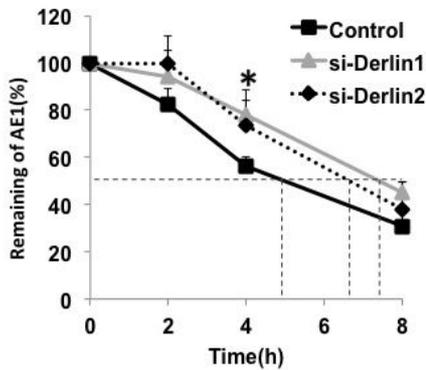


図1 Derlin-1,2 の発現抑制による R664X AE1 分解の阻害

た。しかし、Derlin-1 と Derlin-2 とに有意な違いは認められなかった (図 1)。一方、R664X AE1 の N-結合型糖鎖修飾変異体 R664X/P661S の分解に対する Derlins siRNA の影響を検討した結果、Derlin-1 の siRNA では R664X、R664X/P661S のプロテアソーム分解が同等の影響を受けたのに対し、Derlin-2 の siRNA では、主に糖鎖修飾型 R664X/P661S の分解が抑制された。これは、Derlin-2 と calnexin との何らかの相互作用を示唆している。

3. これらの結果から、Derlin-1 と Derlin-2 は、いずれも R664X AE1 を認識・結合して、そのプロテアソーム分解に関与することが明らかになった。しかし、p97/VCP や calnexin など、他の ER シャペロンとの相互作用は Derlin-1 と Derlin-2 とで異なること、また基質となる AE1 の構造の違いがその要因のひとつとなり得ることが示された。

4. そこで、基質側構造の違いによる分解過程の相違を探索することを目的に、細胞質ドメインを欠く CD AE1、R664X AE1 同様の premature termination 変異体である R826C AE1、R845X AE1 を作製、HEK293 細胞に発現させて分解動態と細胞内分布を解析した。

R845X AE1 は、R664X AE1 と類似の細胞内分布、即ち小胞体 ER における滞留を示し、プロテアソーム阻害により分解が抑制されたが、その分布に変化は見られなかった (図 2)。R826C AE1 変異体は、細胞内分布が不明確、かつ細胞生存率が低く解析が困難であった。一方、CD AE1 は、小胞体近傍、あるいは

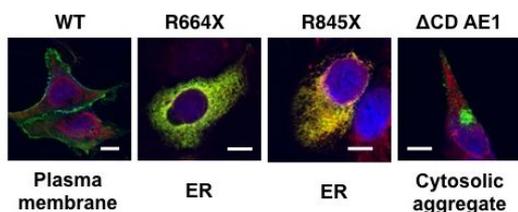


図2 AE1 の各種変異体と、その細胞内分布

は細胞質領域に不溶性凝集塊アグリソームを形成し、プロテアソームを阻害するとその増加が認められた。これらの結果から、R845X と CD AE1 は、いずれも R664X AE1 同様にプロテアソームによる分解を受けることが示された。R664X と R845X が小胞体に止まって分解されるのに対し CD は、F508-CFTR 同様、小胞体から細胞質に逆行輸送で引き抜かれてからプロテアソーム分解を受ける可能性が示された。これは、R664X、R845X と CD とでは逆行輸送の過程と分解の場が異なることを示している (表 1)。

R845X と CD AE1 の分解は、siRNA による Derlin-1 の抑制時と Derlin-2 の抑制時とで明確な違いが認められなかった。また、R845X AE1、CD AE1 はプロテアソーム阻害時にイムノプロットでのラダー形成が認められないことから、いずれも Ub 化を受けないことが示唆された。これらの結果は、上記の R664X AE1 と同様であり、変位の違いによりプロテアソーム分解の場は異なるものの、AE1 の ERAD は Ub 化を受けずに認識・分解される仕組みであると思われる (図 3)。

表 1 AE1 各種変異体のプロテアソーム分解の特徴

|                 | R664X AE1 | R845X AE1 | ΔCD AE1    |
|-----------------|-----------|-----------|------------|
| 変異部位            | 膜内在性ドメイン  | 膜内在性ドメイン  | 細胞質ドメイン    |
| 細胞内分布           | ER        | ER        | ER/cytosol |
| プロテアソーム分解       | ○         | ○         | ○          |
| Derlin-1,-2 の関与 | ○         | ?         | ○          |
| アグリソーム形成        | ×         | ×         | ○          |

ポリペプチド全長はERから出ない      全長がERから出る

5. 基質蛋白質の分解と Ub 依存性の相違に関わるプロテアソームタイプの解析を行うため、19S, 20S、および 26S プロテアソームの R664X AE1 に対する基質分解に関する特異性と程度の検討を行った。野生型 (WT) AE1 および Ub 依存性の小胞体関連分解を呈することがわかっている 508-CFTR をコントロールとして比較したところ、いずれのプロテアソームにおいても有意な差を認められなかった。また、20S の阻害剤であるラクタシスチン、19S の阻害剤であるグルコサミンを用いた細胞に対する影響を検討した実験においても有意な差が認められず、基質プロテアソーム分解に関わる他の必須因子の存在やそれ以外のプロテアソーム (11S など) の関連が示唆された。即ち、AE1 変異体の ERAD には、従来知られるものを含め、複数のプロテアソームや Derlin 分子群、他の ER/細胞質因子の関与が考えられるが、その同定には至っていない。

6. 一方で、Derlins の小胞体膜における分解機能の重要性を検討するためには、in vitro 環境における小胞体膜上の基質蛋白質

の発現および検討が必要である。そこで、microsome のみを抽出する方法である semi-permeabilized cell (SP cell) の作製の検討を行った。その結果、Derlin-1 および Derlin-2 の siRNA による発現抑制効果を保持した HEK293 細胞から microsome 成分のみを抽出することに成功した。現在、in vitro 翻訳系により、合成した R664X AE1 とこの SP cell 由来の microsome を用いて in vitro における小胞体膜に組み込まれた R664X AE1 を再現し、Derlin-1,2 の発現抑制の影響を検討している。

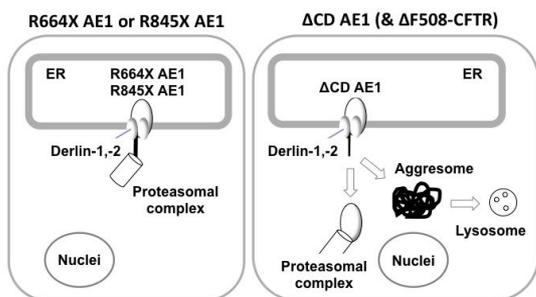


図3 AE1 の ERAD における複数の仕組み

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Yamamori, T., Ike, S., Bo, T., Sasagawa, T., Sakai, Y., Suzuki, M., Yamamoto, K., Nagane, M., Yasui, H., and Inanami, O (2015) Inhibition of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein 1 (Drp1) impairs mitochondrial fission and mitotic catastrophe after x-irradiation. *Mol. Bio. Cell* 26, 4607-4617. (査読あり)

Ogawa, M., Uchida, K., Yamato, O., Inaba, M., Uddin, M. M., and Nakayama, H. (2014) Neuronal loss and decreased GLY-1 expression observed in the spinal cord of Pembroke Welsh Corgi dogs with canine degenerative myelopathy. *Vet. Pathol.* 51, 591-602. (査読あり)

Sato, K., Otsu, W., Otsuka, Y., and Inaba, M. (2013) Modulatory roles of NHERF1 and NHERF2 in cell surface expression of the glutamate transporter GLAST. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 839-845. (査読あり)

Otsu, W., Kurooka, T., Otsuka, Y., Sato, K., and Inaba, M. (2013) A new class of endoplasmic reticulum export signal X X for transmembrane proteins and its selective interaction with Sec24C. *J.*

*Biol. Chem.* 288, 18521-18532. (査読あり)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/Imm/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

稲葉 睦 (INABA, Mutsumi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号: 00183179

##### (2) 研究分担者

佐藤 耕太 (SATO, Kota)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号: 50283974

山盛 徹 (YAMAMORI, Toru)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号: 00512675

##### (3) 連携研究者

なし