

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：22604

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24112007

研究課題名(和文) ユビキチン識別タンパク質によるポリユビキチン鎖情報のデコード機構とその役割

研究課題名(英文) Function of ubiquitin-associated domain proteins for decoding polyubiquitin signaling.

研究代表者

川原 裕之(Hiroyuki, Kawahara)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：70291151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 63,700,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体への組み込み不全を起こした膜タンパク質は、シグナル配列のプロセッシングを受けないまま、凝集性ポリペプチドとして細胞質に留まる。このような凝集性タンパク質の品質管理は最近まで実体が不明であった。我々は、不良膜タンパク質が細胞質でどのように処理されるのかを探る過程で、UBA型タンパク質UBQLN4を中核的な因子として同定した。UBQLN4は、BAG6と複合体を形成して、新合成されたばかりの不良膜タンパク質をユビキチン依存的代謝系に導く。ヒトゲノムにコードされた全タンパク質の約1/5が膜タンパク質であることを考慮すると、膨大な量の凝集性ポリペプチドがこの複合体の標的となっていることが想定される。

研究成果の概要(英文)：Most of transmembrane proteins are integrated into the ER by virtue of a signal sequence-mediated co-translational process. However, a substantial portion of transmembrane proteins fail to access the ER, resulting in the production of cytosolically mislocalized polypeptides. Their appropriate recognition and removal are of the utmost significance to avoid potential proteotoxic stress. Here, we identified UBA domain protein UBQLN4 for the elimination of such newly synthesized defective polypeptides. Using a model transmembrane domain protein whose degradation occurs at a pre-ER incorporation process, we show that UBQLN4 recognizes misassembled proteins in the cytoplasm for targeting to the proteasome pathway. Importantly, UBQLN4 recognized not only the model defective transmembrane substrate but also a pool of endogenous defective proteins that were induced by compromising the signal recognition particle.

研究分野：生化学 細胞生物学

キーワード：ユビキチン プロテアソーム タンパク質の品質管理 膜タンパク質 BAG6 UBQLN4 UBAドメイン ポリユビキチン認識

1. 研究開始当初の背景

小胞体への組み込み不全を起こした膜 / 分泌タンパク質は、シグナル配列のプロセッシングを受けないまま、ポリユビキチン化凝集性ポリペプチドとして細胞質に留まる。最近、このような「細胞質」性凝集タンパク質の品質管理プロセスが注目されており、古くから知られる小胞体「内」タンパク質品質管理 (ERAD など) と対比させて、プレエンブティブ (pre-emptive : 予防的) なタンパク質品質管理と命名された。一方、この経路の特異性を決定するメカニスティックな実体は最近まで多くが不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内のポリユビキチン鎖情報を読み取る UBA 型ユビキチン識別タンパク質群を中核に、細胞内タンパク質代謝の恒常性維持を司る新機構を提案することを目指して、研究展開を行った。

3. 研究の方法

細胞内のポリユビキチン鎖情報を読み取る UBA 型ユビキチン識別タンパク質をコードする遺伝子を網羅的にクローニングすることを起点に、これらの機能を自在に操作することにより、細胞内の新合成膜タンパク質の代謝に対する影響を広く評価する実験系を作り上げた。さらに、UBA 型ユビキチン識別タンパク質と相互作用する新因子を、質量分析などの手法を駆使することで見だし、ユビキチン化タンパク質認識の特異性獲得の分子機構について考察を深めた。

4. 研究成果

本研究では、小胞体から弾き返された凝集性膜タンパク質が細胞質でどのように処理されるのかを探る過程で、プレエンブティブ品質管理の中核的な因子として、UBA 型ユビキチン識別タンパク質 UBQLN4 を同定した

(Suzuki & Kawahara, EMBO Rep. 2016)。

UBQLN4 は、ユビキチン様タンパク質 BAG6 と複合体を形成して、新合成されたばかりの不良膜タンパク質を特異的に認識し、ユビキチン依存的代謝系に導く (Suzuki & Kawahara, EMBO Rep. 2016) 。 BAG6 は多様なユビキチン受容体群が結合する足場として機能しているが、UBQLN4 が BAG6 複合体に特異性を付与する重要な役割を果たしていることも判明した。ヒトゲノムにコードされた全タンパク質の約 1/3 が膜タンパク質 (あるいは分泌タンパク質) であることを考慮すると、膨大な量の凝集性ポリペプチドが日常的に産生され、UBQLN4-BAG6 複合体のクライアントとして処理されていることが想定されている状況である。

また、UBQLN4-BAG6 複合体は、分泌タンパク質インシュリンの遺伝性不良前駆体 (プレプロインシュリン) のポリユビキチン化にも必須であることを最近見いだした (鈴木理滋ら、投稿準備中) 。このように、BAG6 を中核とした新しいユビキチン識別複合体の変異が、疾患発症の原因となりうることの証拠を本研究で多く示しつつある。さらに、水島恒裕教授 (兵庫県立大) 、ならびに加藤龍一准教授 (高エネルギー加速器研究機構) との共同研究で、新合成不良ポリペプチドと高い親和性を持つ新しい領域を同定し、これを BUILD ドメインと命名した (Tanaka et al., FEBS J. 2016) 。 BUILD ドメインは、隣接したユビキチン様ドメインとタンデムに並び、共同して疎水性を露出したポリユビキチン化ポリペプチドを峻別する。また、BUILD ドメイン自身がユビキチン類似の立体構造を持つユニークなドメインであることを水島教授と共同研究にて明らかにした (Tanaka et al., FEBS J. 2016) 。

一方、BAG6 複合体の機能は、異常膜タンパク質の代謝に留まらない。BAG6 は、ユビキチン様タンパク質 Ubl4a と複合体を形成す

ること、トランスロコンや SNARE 膜小胞輸送、小胞体依存性タンパク分解(ERAD)・オートファジーなどの中核的プレーヤーを構成するテイルアンカー(TA)型膜タンパク質群の生合成プロセスにも重要な役割を担っている。TA タンパク質の生合成を支配する酵母 GET 複合体の立体構造は 2009 年に報告されたが、BAG6 と酵母 GET5 ホモログ Ubl4a とから構成される多細胞 TA タンパク質アッセンブリマシーナリーの構造は全くのフロンティアであった(酵母ゲノムには BAG6 ホモログが存在していない)。川原らは、本研究で、TA タンパク質の生合成とユビキチン依存的分解、いずれにも関わる Ubl4a-BAG6 複合体の会合ドメインを新しく同定・定義した(Kuwabara et al., J. Biol. Chem. 2015)。さらに、加藤准教授との共同研究で、Ubl4a-BAG6 複合体形成領域の X 線結晶構造解析に初めて成功した(Kuwabara et al., J. Biol. Chem. 2015)。これは、多細胞生物 TA タンパク質アッセンブリ因子として史上初となる快挙であり、長年の懸案であったヒト TA タンパク質の全く新しい生合成・品質管理機構を提示するものである。

不良ポリペプチドの代謝を担う新しい因子として、我々は本領域の開始に前後して BAG6 タンパク質の関与を提案した(Minami et al., J. Cell Biol. 2010; Kawahara et al., J. Biochem. 2013)。本領域の研究を通じて、BAG6 がユビキチン識別タンパク質群を中核とする(複数種の)新規複合体を形成し、それらが膜/分泌タンパク質の生合成と品質管理を両面から支える全く新しい超分子システムを形成する新概念を提示しつつある。今後、このシステム間の連携破綻に伴うタンパク質動態の異常と病理を併せて解明することが必要な新段階に入りつつあると考えられる。

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 6 件)

1. Suzuki, R. and *Kawahara, H. (2016) UBQLN4 recognizes mislocalized transmembrane domain proteins and targets these to proteasomal degradation. *EMBO Rep.* 17, 842-857. doi: 10.15252/embr.201541402.
2. Tanaka, H., Takahashi, T., Xie, Y., Minami, R., Yanagi, Y., Hayashishita, M., Suzuki, R., Yokota, N., Shimada, M., Mizushima, T., Kuwabara, N., Kato, R., and *Kawahara, H. (2016) A conserved island of BAG6/Scythe is related to ubiquitin domains and participates in short hydrophobicity recognition. *FEBS J.* 283, 662-677. doi: 10.1111/febs.13618.
3. Takasugi, T., Saito, T., Asada, A., Kawahara, H. and *Hisanaga, S.-I. (2016) Two degradation pathways of the p35 Cdk5 activation subunit, dependent and independent of ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 291, 4649-4657. doi: 10.1074/jbc.M115.692871
4. Yamaki, Y., Kagawa, H., Hatta, T., Natsume, T., and *Kawahara, H. (2016) The C-terminal cytoplasmic tail of hedgehog receptor Patched1 is a platform for E3 ubiquitin ligase complexes. *Mol. Cell. Biochem.* 414: 1-12. doi:10.1007/s11010-015-2643-4
5. Kuwabara, N., Minami, R., Yokota, N., Matsumoto, H., Senda, T., *Kawahara, H., and *Kato, R. (2015) Structure of a BAG6 (Bcl-2-associated athanogene 6)-Ubl4a (ubiquitin-like protein 4a) complex reveals a novel binding interface that functions in tail-anchored protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* 290, 9387-9398. doi: 10.1074/jbc.M114.631804.
6. *Kawahara, H., Minami, R. and Yokota, N. (2013) BAG6/BAT3: Emerging roles in quality control for nascent polypeptides. *J. Biochem.* 153, 147-160. doi: 10.1093/jb/mvs149

[学会発表](計 5 6 件)

1. 川原 裕之 (2016)「ユビキチン識別タンパク質による新合成膜タンパク質の運命決定」科研費新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」領域会議 平成28年11月17日, ガトーキングダムサッポロ、北海道札幌市
2. 川原 裕之 (2016)「新合成膜タンパク質の品質管理を担う新しい分子機構」平成

- 28年12月26日,筑波大学大学院生命環境科学研究科、茨城県つくば市
3. 山本昂季、川原裕之 (2016) 「ミスローカライズした HLA の代謝における BAG6 の機能」第 89 回日本生化学会大会 平成 28 年 9 月 27 日、仙台国際センター, 仙台市
 4. 鈴木理滋、川原裕之 (2016) 「UBQLN 4 による膜タンパク質品質管理機構の解明」第 89 回日本生化学会大会 平成 28 年 9 月 27 日、仙台国際センター, 仙台市
 5. 戸島麻子、川原裕之 (2016) 「BAG6-Ubl4a 複合体による不良膜タンパク質の品質管理機構」第 89 回日本生化学会大会 平成 28 年 9 月 26 日、仙台国際センター, 仙台市
 6. 高橋俊樹、川原裕之 (2016) 「BAG6 による不良タンパク質認識機構の解明」第 89 回日本生化学会大会 平成 28 年 9 月 26 日、仙台国際センター, 仙台市
 7. 林下瑞希、川原裕之 (2016) 「ミトコンドリアを標的とした BAG6 新規機能の探索」第 39 回日本分子生物学会大会 平成 28 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜, 横浜市
 8. 坂山亮太、川原裕之 (2016) 「BAG6 は膜タンパク質 Tim-3 を量的に制御する」第 39 回日本分子生物学会大会 平成 28 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜, 横浜市
 9. 川原 裕之 (2015) 「ER膜に到達できなかった新合成膜タンパク質の運命：ユビキチン識別タンパク質による選択的認識と代謝」科研費新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」領域会議 平成27年12月18日, 南房総富浦ロイヤルホテル、千葉県南房総市
 10. 川原 裕之 (2015) 「新合成膜タンパク質の品質管理を担うBAG6複合体 -タンパク質生合成と分解を繋ぐ新機構-」第 30 回 Science Seminar、平成27年11月12日、北海道大学理学部、札幌市
 11. Suzuki, R. and Kawahara, H. (2015) UBQLN is essential for quality control of mislocalized proteins. Cold Spring Harbor Meeting 2015, " The Ubiquitin Family ", Cold Spring Harbor Laboratory, April 21-25, 2015, NY, USA
 12. Watanabe, A., Yokota, N., Takeo, S., Aigaki, T., and Kawahara, H. (2015) Functional analysis of BAG6 and Ubl4a in Drosophila melanogaster. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会合同年会 平成 27 年 12 月 1 - 4 日、神戸ポートアイランド, 神戸市
 13. Tsuchiya, Y., Suga, K., and Kawahara, H. (2015) A study of BAG6 complex in controlling vesicle transport. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会合同年会 平成 27 年 12 月 1 - 4 日、神戸ポートアイランド, 神戸市
 14. 川原 裕之 (2014) 「ER膜に到達できなかった新合成膜タンパク質の運命：ユビキチン識別タンパク質による選択的認識と代謝」科研費新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」領域班会議 平成 26 年 12 月 11 日-13 日、愛知県蒲郡市
 15. 川原裕之 (2014) 「新合成ポリペプチドの運命を決する BAG6 複合体 - 不良膜タンパク質を標的モデルとして」平成 26 年 12 月 26 日 第一回首都大-医学研交流セミナー
 16. A. Noguchi, N. Yokota, H. Kawahara (2014) Post-mitotic degradation of ZFP36L1 and ZFP36L2 is under control of C-terminal phosphorylation. Cold Spring Harbor Meeting, The Cell Cycle, May 13-17, 2014
 17. R. Suzuki and H. Kawahara (2014) UBQLN4 is essential for the degradation of

- mislocalized membrane proteins. International Meeting for New Aspects of the Ubiquitin Research. November 11, International Institute for Advanced Studies.
18. T. Takahashi and H. Kawahara (2014) BAG6 modulates the localization and turnover of polytopic transmembrane receptor protein. International Meeting for New Aspects of the Ubiquitin Research. November 11, International Institute for Advanced Studies.
 19. Y. Yamaki, H. Kagawa, T. Hatta, Y. Saeki, T. Natsume, K. Tanaka and H. Kawahara (2014) Cullin-2-based E3 ligase functionally associates with hedgehog receptor Patched1. International Meeting for New Aspects of the Ubiquitin Research. November 11, International Institute for Advanced Studies.
 20. 田中花実、川原裕之、横田直人(2014)「タンパク質品質管理システムにおけるTRC35/BAG6相互作用の意義」第37回日本分子生物学会年会 平成26年11月25日-27日 パシフィコ横浜
 21. 牛尾ちづる、川原裕之、南亮介(2014)「ポリグルタミン凝集体我々を与えるBAG6^ΔUbl4a複合体への影響」第37回日本分子生物学会年会 平成26年11月25日-27日 パシフィコ横浜
 22. 土屋悠吾、須賀圭、川原裕之(2014)「小胞輸送系の制御におけるBAG6複合体の機能解明」第37回日本分子生物学会年会 平成26年11月25日-27日 パシフィコ横浜
 23. 八巻優佳、川原裕之(2014)「ヘッシホック受容体 Patched 1 と相互作用するユビキチン化酵素群の同定とその機能解析」第87回日本生化学会年会 平成26年10月15日(水)~18日 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都
 24. Kawahara, H. (2013) BAG6 is essential for selective elimination of aggregation-prone defective proteins. "The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles", 35th Naito Conference平成25年7月22-25日 ガトーキングダム札幌
 25. 川原裕之(2013)「新合成ポリペプチドの品質管理を担うBAG6複合体- その構造解明に向けて -」物構研談話会 2013年1月7日(月)加速器研究機構(筑波)構造生物学研究センター
 26. 川原 裕之 (2013) 日本生化学会シンポジウム講演 「BAG6複合体による新しい新合成ポリペプチドの品質管理機構 BAG6 complex regulates the biogenesis of aggregation-prone membrane proteins.」第86回 日本生化学会 年会 平成25年9月11-13日 パシフィコ横浜
 27. 川原裕之、南亮介、横田直人(2013)新合成ポリペプチドの品質管理を担うBAG6複合体- その構造解明に向けて -」物構研談話会 2013年1月7日(月)加速器研究機構(筑波)構造生物学研究センター
 28. 鈴木 理滋, 福田 有里, 横田 直人, 川原 裕之(2013)「UBQLN4によるタンパク質品質管理機構The function of UBQLN4 in protein quality control」第86回 日本生化学会 年会 平成25年9月11-13日 パシフィコ横浜
 29. 鈴木 理滋, 福田 有里, 横田 直人, 川原 裕之(2013)「UBQLN4によるタンパク質品質管理機構The function of UBQLN4 in protein quality control」第86回 日本生化学会 年会 平成25年9月11-13日 パシフィコ横浜
 30. 林下 瑞希, 横田 直人, 川原 裕之(2013)「新規BAG6複合体構成因子の同定と解析 Analysis of novel BAG6 interacting proteins」第86回日

- 本生化学会 年会 平成25年9月11-13日 パシフィコ横浜
31. 鈴木理滋、横田直人、川原裕之「新合成タンパク質の品質管理におけるBAG6結合タンパク質UBQLN4の役割」第12回日本蛋白質科学会、平成24年6月21日 名古屋国際会議場
 32. 川原裕之、横田直人「ユビキチン識別タンパク質複合体による新合成ポリペプチド鎖の品質管理」平成24年度発足 新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー:拡大するタンパク質制御システム」Kick-offシンポジウム平成24年9月26日 京大医学部
 33. 林下瑞希、横田直人、川原裕之 (2012) 「BAG6 新奇スプライシングバリエーションの同定と解析」第35回日本分子生物学会年会、12月11日～14日、福岡国際会議場
 34. 川原裕之 (2012) 「BAG6-プロテアソーム複合体を介した易凝集性タンパク質の品質管理」シンポジウム「プロテアソーム:タンパク質分解の分子基盤と疾患・バイオロジー」オーガナイザー、村田茂穂、川原裕之 第85回日本生化学会大会 2012年12月14日、福岡国際会議場
 35. 田中啓史、川原裕之 (2012) 「BAG6/Scythe/BAT3による新合成不良タンパク質の識別機構」第85回日本生化学会大会 2012年12月14日-16日、福岡国際会議場
 36. 池尻昂史、横田直人、川原裕之 (2012) 「免疫応答における BAG6 タンパク質の意義」第85回日本生化学会大会 2012年12月14日-16日、福岡国際会議場
 37. 中村文香、川原裕之 (2012) 「BAG6による核内タンパク質代謝を定量するシステムの開発」第85回日本生化学会大会 2012年12月14日-16日、福岡国際

会議場

38. 川原裕之、横田直人「ユビキチン識別タンパク質複合体による新合成ポリペプチド鎖の品質管理」平成24年度発足 新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー:拡大するタンパク質制御システム」Kick-offシンポジウム平成24年9月26日 京大医学部
39. 川原裕之、南亮介、横田直人「易凝集性タンパク質の品質管理におけるBAG6複合体の役割 BAG6 is essential for selective elimination of aggregatin-prone proteins.」第12回日本蛋白質科学会 年会ワークショップ「in vivo 蛋白質科学:構造形成と分解」平成24年6月21日 名古屋国際会議場

他 17 件

〔図書〕(計 2 件)

1. *Kawahara, H. (2015) 特集「ユビキチンシステムの制御と疾患 -その理解と回復に向けて-」ユビキチンによるタンパク質品質管理と疾患」*The World of UBQUITIN* 文部科学省新学術領域「ユビキチンネオバイオロジー」ニュースレター、第3巻 p.60-64.
2. *川原 裕之 (2016) 「ユビキチン結合ドメイン」*生化学* 第88巻第3号, p.426

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.comp.tmu.ac.jp/saisei/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川原 裕之 (KAWAHARA, Hiroyuki)

首都大学東京・大学院理工学研究科・生命科学専攻 教授

研究者番号: 70291151

(2)研究分担者

横田 直人 (YOKOTA, Naoto)

首都大学東京・大学院理工学研究科・生命科学専攻 助教

研究者番号: 40610564