

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06996

研究課題名(和文)小胞体マンノシダーゼEDEMの基質特異性と異常タンパク質選別機構

研究課題名(英文) Substrate recognition mechanism of the endoplasmic reticulum-localized mannosidase EDEM

研究代表者

岡田 徹也 (Okada, Tetsuya)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：70378529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖タンパク質の分解に必要なマンノーストリミングは、EDEMファミリータンパク質(EDEM1/2/3)により実行される。本研究では、マンノーストリミングにおけるEDEM2の機能的意義を明らかにするとともに、EDEM2の酵素活性に必須な3つのシステイン残基を同定した。さらにEDEM2の機能を制御するパートナー分子の候補も見いだした。また、構造異常の度合いが強い糖タンパク質は、EDEMタンパク質によるマンノーストリミングに依存せずに強制的に分解されることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Mannose trimming in the endoplasmic reticulum required for glycoprotein degradation is carried out by the EDEM family proteins (EDEM 1/2/3). In this study, we clarified the functional significance of EDEM2 in the mannose trimming reaction and identified three cysteine residues essential for the mannosidase activity of EDEM2. We also identified an candidate for the partner protein of EDEM2. In addition, we found that severely misfolded glycoproteins are forcibly degraded even in the absence of EDEM-mediated mannose trimming.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タンパク質分解 マンノシダーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質や分泌タンパク質を合成する小胞体では、新生タンパク質の厳密な品質管理が行われている。すなわち、小胞体で正しい高次構造を獲得したタンパク質だけがそれぞれの働くべき場所へ輸送され、正しい高次構造を取らないタンパク質は小胞体関連分解と呼ばれる機構により、不良品として処分される。小胞体で合成されるタンパク質の多くは、3個のグルコース、9個のマンノース、2個のN-アセチルグルコサミンからなるコア糖鎖(G3M9)が特定のアスパラギン残基に付加された糖タンパク質であり(図1)、タンパク質の品質管理においてはこのN型糖鎖が重要な役割を果たす。新規に合成された糖タンパク質は、N型糖鎖がG3M9からM9に変換される過程でカルネキシンサイクル等によるフォールディング促進を受け、ここで正しい構造を獲得したタンパク質のみがその後の輸送経路へと送り込まれる。一方、正しくフォールディングできない場合には、さらに2~4個の α 1,2結合マンノースが刈り取られ、 α 1,6結合マンノースが露出する(図1:マンノーストリミング)。この α 1,6結合マンノースが露出した糖鎖をレクチンOS-9が認識して結合すると、構造異常タンパク質として細胞質へ引き出され、プロテアソームにより分解される。このように、分解すべき糖タンパク質は、N型糖鎖のマンノーストリミングを介して選別される。

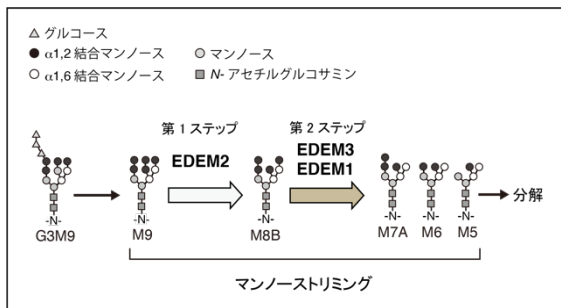


図1 小胞体におけるアスパラギン(N)結合型糖鎖のトリミング

高等真核生物には、小胞体局在性 α 1,2-マンノシダーゼの候補として、小胞体マンノシダーゼI、EDEM1、EDEM2、EDEM3の4種類が存在する。我々は、ニワトリDT40細胞およびヒトHCT116細胞株を用いた遺伝子破壊解析により、これまで重要と考えられてきた小胞体マンノシダーゼIは小胞体内マンノーストリミングにほとんど寄与しないこと、マンノーストリミングの第1ステップ(9個のマンノースを持つ糖鎖からマンノース1個をトリミングする反応)は主にEDEM2により行われ、続く第2ステップはEDEM3あるいはEDEM1(EDEM3の寄与がより大きい)により行われること、3つのEDEMによるマンノーストリミングが不安定糖タンパク質ATF6の分解に必須であることを明らかにした(引用文

献①)。従来、EDEM2はマンノシダーゼ活性を持たない分子と捉えられてきたことから、これらの成果はそれまでのモデルを一新し、小胞体マンノーストリミングの実行酵素を対象とした解析を可能にするものであった。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では、EDEMファミリータンパク質の機能を明らかにすることを目的とした。具体的には、EDEMファミリータンパク質のノックアウト細胞を活用して、小胞体関連分解におけるマンノーストリミングの意義をより詳細に明らかにするとともに、EDEMファミリータンパク質の酵素活性や基質認識がどのような分子機構で制御されるかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

ゲノム編集法の1つであるTALEN(Transcription Activator-Like Effector Nucleases)法を活用して、薬剤耐性マーカーをターゲット遺伝子のエキソンに挿入することにより、HCT116細胞(EDEM1/2/3トリプルノックアウト細胞の樹立)およびHEK293細胞(EDEM2ノックアウト細胞の樹立)においてEDEMファミリー遺伝子を破壊した。さらに、これらの遺伝子ノックアウトにより、モデル糖タンパク質であるATF6 α 、NHK、CD3 δ - Δ TM、EMC1の糖鎖トリミングや分解がどのような影響を受けるかをパルスチェイス実験やシクロヘキシミドチェイス実験により調べた。

また、EDEMタンパク質の酵母ホモログであるHtm1pのマンノシダーゼ活性には、分子内ジスルフィド結合が必須であることが知られている。そこで、EDEM2のシステイン残基に網羅的な点変異を導入し、EDEM2のマンノシダーゼ活性に関与するシステイン残基が存在するか調べた。EDEM2をノックアウトしたHCT116細胞ではモデル異常糖タンパク質のマンノーストリミングが起こらないが、野生型EDEM2を過剰発現させるとマンノーストリミングが回復する。この表現型回復能力を指標に、点変異の効果を評価した。

点変異解析の結果、EDEM2の活性には複数のシステイン残基が必須であることが判明したことから、ジスルフィド結合形成に関わる種々のPDI様タンパク質とEDEM2の相互作用について、免疫沈降法により検討した。さらに、相互作用が見られた分子のノックアウト細胞を作成し、マンノーストリミングや小胞体関連分解への影響を解析した。

4. 研究成果

(1)シビアな構造異常を持つ糖タンパク質の強制分解機構

HCT116細胞において、EDEM1/2/3トリプルノックアウト(EDEM-TKO)細胞の樹立に成功した。EDEM-TKO細胞においては、モデル分解基質として用いた糖タンパク質ATF6 α の分

解が、野生型 HCT116 (WT) 細胞と比較して有意に遅延した (図 2)。また、EMC1 (図 4) や CD3 δ - Δ TM の分解も同様に遅延した。これらの結果は、マンノーストリミングが広範な糖タンパク質の分解に必要なことを示している。

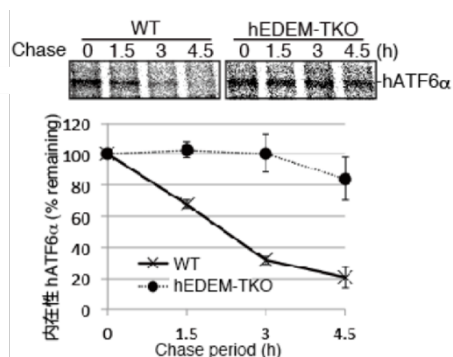


図 2 EDEM-TKO 細胞における ATF6 α の分解

一方、意外なことに、別のモデル分解基質である NHK については、EDEM-TKO 細胞において初期の分解遅延が観察されたものの、最終的には野生型細胞と有意差なく分解された (図 3)。

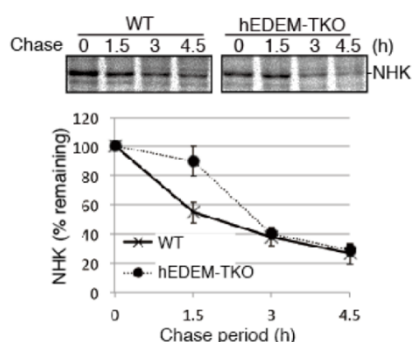


図 3 EDEM-TKO 細胞における NHK の分解

NHK のマンノーストリミングは、EDEM-TKO において予想通り阻害されていた。また、マンノーストリミングの阻害剤であるキフネンシンで野生型 HCT116 細胞を処理しても、同様の結果が得られた。NHK は、 α 1 アンチトリプシンの変異体であり、遺伝的変異による C 末端領域の欠落と非天然アミノ酸配列の挿入を有することから、マンノーストリミングの有無とは無関係に、タンパク質部分の構造異常の度合いが糖タンパク質の分解に寄与する可能性が考えられた。そこで、強制的な構造異常を引き起こす変異を EMC1 に導入し、分解への影響を検討した。その結果、構造異常部位を挿入すると、これらの糖タンパク質は NHK と同様に EDEM-TKO 細胞においても最終的に分解されるようになった (図 4)。このことから、シビアな構造異常部位を持つ糖タンパク質をマンノーストリミング非依存的に分解する機構の存在が示唆された。小胞体関連分解は、糖鎖依存的分解経路と糖鎖非依存的

分解経路の 2 つに大別されると考えられているが、今回の解析結果は、分解基質の構造異常度合いによって両者が密接に連携することを示唆している。

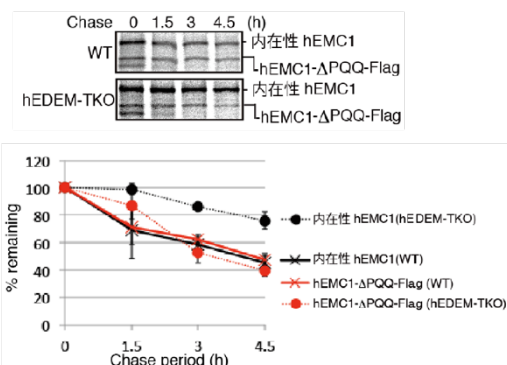


図 4 EDEM-TKO 細胞における EMC1 とその変異体の分解

(2) EDEM2 機能の普遍性

EDEM2 の活性を生化学的に解析するためには、リコンビナントタンパク質の調製が必要不可欠である。そこでタンパク質発現に汎用される HEK293 細胞において、TALEN 法を用いた EDEM2 遺伝子のノックアウトを行った。HCT116 細胞の場合と同様に、EDEM2 ノックアウト 293 細胞では、ATF6 α や CD3 δ - Δ TM のマンノーストリミングが起こらず、ATF6 α の分解も遅延した。このことから、EDEM2 の機能が細胞種によらず普遍的であることが実証された。

さらに、His タグを付加した EDEM2 (EDEM2-His) を EDEM2 ノックアウト 293 細胞に安定的に導入したところ、CD3 δ - Δ TM のマンノーストリミングが回復した。この結果は、細胞内に発現した EDEM2-His が酵素活性を有することを示している。この安定発現細胞から EDEM2-His を精製することにより、EDEM2 の酵素活性を生化学的に解析することが可能となると期待される。

(3) EDEM2 によるトリミングの意義

EDEM3 の過剰発現は、糖タンパク質のマンノーストリミングを促進することが報告されている。実際に、野生型 HCT116 細胞に、CD3 δ - Δ TM と EDEM3 を過剰発現させると、CD3 δ - Δ TM のマンノーストリミングが顕著に促進された。一方、EDEM2 を欠損した HCT116 細胞に CD3 δ - Δ TM と EDEM3 を過剰発現させても、CD3 δ - Δ TM のマンノーストリミングは促進されなかった。すなわち、EDEM3 による 2 段階目のマンノーストリミングには、EDEM2 による第一段階目のトリミングが必須であることが示された。この結果は、EDEM2 がマンノーストリミングを開始するという我々のモデルを強く支持するものであり、各 EDEM タンパク質が厳密な基質特異性を有することを示唆している。

(4) EDEM2 の機能調節

EDEM2 が有するシステイン残基に点変異を導入し、その影響を検討した結果、EDEM2 のマンノシダーゼホロモジドメインに存在する2つのシステイン残基がマンノシダーゼ活性に必要であることが明らかとなった。このシステイン残基は進化的に強く保存されている。EDEM タンパク質の酵母ホモログである Htm1p はマンノシダーゼホロモジドメイン内で分子内ジスルフィド結合を形成することが報告されており、EDEM タンパク質においても同様の機能制御機構が存在すると考えられた。さらに、EDEM2 の C 末端領域に存在するシステイン残基も EDEM2 の活性に必須であることを見いだした。

Htm1p は、システインジスルフィドイソメラーゼである Pdi1p と相互作用することにより活性制御を受けることが報告されている。そこで、種々の PDI 様タンパク質と EDEM2 の相互作用を免疫沈降法により検討した。その結果、EDEM2 と安定な複合体を形成する PDI 様分子を同定することに成功した。同定した結合分子の機能を明らかにするために、HCT116 細胞において、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子破壊を行い、遺伝子破壊株を得た。その結果、同定した EDEM2 結合分子の遺伝子破壊により、①EDEM2 タンパク質の発現量が有意に低下すること、②マンノーストリミングが阻害されること、③モデル分解糖タンパク質である ATF6 の分解が遅延すること、が明らかとなった。これらの結果は EDEM2 ノックアウト細胞の表現型と一致している。以上のことから、同定した分子は、EDEM2 の機能に必須なパートナー分子であり、EDEM2 は複合体を形成して酵素活性を発揮する可能性が強く示唆された。今後、当該分子に着目した解析を行うことにより、EDEM2 の活性がどのように調節されるか明らかになると期待される。

<引用文献>

①Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, Ishikawa T, Takeda S, Sakuma T, Yamamoto T, Mori K. (2014) EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannosetrimming step. *J Cell Biol.* 206: 347-356

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 3 件)

①Sugimoto T, Ninagawa S, Yamano S, Ishikawa T, Okada T, Takeda S, Mori K. (2017)

SEL1L-dependent Substrates Require Derlin2/3 and Herp1/2 for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation. *Cell structure and Function.* 42:81-94

査読あり

DOI:10.1247/csf.17007

②岡田徹也、蜷川暁、森和俊
糖タンパク質の小胞体関連分解におけるマンノーストリミング機構

生化学、2016、88 巻、pp257-260 査読あり

DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880257

③Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Horimoto S, Sugimoto T, Ishikawa T, Takeda S, Yamamoto T, Suzuki T, Kamiya Y, Kato K, Mori K. (2015) Forcible destruction of severely misfolded mammalian glycoproteins by the non-glycoprotein ERAD pathway. *J Cell Biol.* 211: 775-784 査読あり
DOI:10.1083/jcb.201504109

[学会発表] (計 2 件)

①蜷川暁、岡田徹也、住友嘉樹、堀本賢、鈴木匡、武田俊一、佐久間哲史、山本卓、神谷由紀子、加藤晃一、森和俊
分解執行局域における新展開
第 68 回日本細胞生物学会 2016 年 6 月 15 日-6 月 17 日

②杉本岳大、蜷川暁、山野晋平、石川時郎、岡田徹也、武田俊一、森和俊
Derlin2/3 および Herp1/2 は SEL1L 依存的な構造異常タンパク質分解経路に必要な第 3 8 回日本分子生物学会年会、第 8 8 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 1 日-12 月 4 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
なし

[その他]
ホームページ等
<http://www.upr.biophys.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
岡田 徹也 (OKADA Tetsuya)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：70378529

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし