

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19002

研究課題名(和文) 初期ゴルジ品質管理機構の生理的役割と分子機構の解析

研究課題名(英文) Physiological role and molecular mechanism of early Golgi quality control system

研究代表者

原 太一 (Hara, Taichi)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：00392374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Rer1は、ゴルジ体における細胞膜タンパク質の品質管理に関わると考えられている。しかしながら、哺乳類におけるRer1の生理的役割や細胞膜タンパク質の品質管理における分子機構は不明な点を多く残している。本研究では、Rer1遺伝子欠損マウスを作成し、その表現型を解析した。Rer1遺伝子欠損マウスは胎生致死となり、Rer1がマウス初期胚発生に必須の役割を果たすことを見出した。また、Rer1がある種の疾患関連変異膜タンパク質の小胞体局在化を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Rer1 has been suggested to be involved in the quality control of plasma membrane proteins in the Golgi apparatus. However, its physiological roles and molecular mechanisms in mammal remained to be elucidated. In this study, we generated Rer1 deficient mice and analyzed the phenotype. We confirmed that Rer1 deficient mice were embryonic lethal, indicating that Rer1 has an essential role in mouse early development. We also found that Rer1 regulates the ER retention of some kind of disease-associated membrane proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タンパク質品質管理機構 初期胚発生 ゴルジ体 細胞膜タンパク質 小胞体 疾患関連変異膜タンパク質 遺伝子欠損マウス Rer1

1. 研究開始当初の背景

新たに合成された細胞膜タンパク質は小胞体品質管理システムによって厳密に品質管理されており、正しいフォールディングや複合体を形成したもののだけが輸送小胞に積まれて小胞体からゴルジ体へと運搬される。一方、一部の立体構造が不完全なタンパク質や複合体を形成しない単体のタンパク質は、小胞体からゴルジ体へと搬出されてしまう場合がある。

酵母 Rer1p は、ゴルジ体に輸送されてきたある種の小胞体膜タンパク質や膜貫通領域に変異を持つ膜タンパク質、複合体形成に失敗した膜タンパク質をゴルジ体で認識し、COPI 小胞を介して再び小胞体へと差し戻す分子選別装置として機能することが明らかになっていた(図1)。

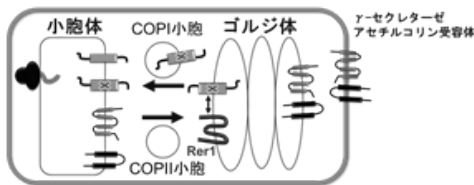


図1. Rer1による膜タンパク質の分子選別機構
Rer1は様々な膜タンパク質の膜貫通領域における極性残基を認識し、ゴルジ体シス領域から小胞体へと送り返すことで、①小胞体膜タンパク質の局在化、②膜タンパク質の複合体形成の制御、③変異膜タンパク質の小胞体局在に機能する。

また、研究開始時には、国内外のグループの培養細胞を用いた解析から、Rer1 が -セクレターゼやアセチルコリン受容体の複合体形成に機能することが報告された (Spasic et al., JCB, 2007; Kaether et al. EMBO Rep, 2007; Tanabe et al., JBC 2012, Park et al., JBC, 2012)。さらに、アルツハイマー病の9割を占める孤発性アルツハイマー病の進行に応じて、Rer1 の発現量が低下することが報告され、Rer1 の異常とアルツハイマー病の発症との関連に注目が集まった (Koen et al., Brain, 2010)。一方、哺乳類においては、Rer1 が変異膜タンパク質の品質管理に関与するかについての報告はなかった。また、Rer1 の生理機能についての知見は乏しく、特に Rer1 欠損マウスを用いた個体レベルでの解析が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究では Rer1 遺伝子欠損マウスを作成し、Rer1 の生理的役割を明らかにすることを目指す。また、哺乳類における変異膜タンパク質の品質管理への Rer1 の関与と、その分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Rer1 欠損マウスの作成

Rer1 遺伝子欠損マウスは gene trap 法により作成した。すなわち、Rer1 遺伝子領域に gene trap カセット [SA(splice acceptor)-IRES(internal ribosomal entry site)-βgeo(LacZ とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子から構成される)] が挿入されることにより、Rer1 遺伝子の発現を阻害する(図2)。組換え ES 細胞 (EUCOMM より入手) を用いて、ネオマイシン耐性遺伝子をプロンプとしたサザンブロットングを行い、Rer1 遺伝子領域にトラップベクターが挿入されていることを確認した。gene trap カセットの挿入を確認した ES 細胞を、マイクロマニピュレーターを用いて胚盤胞に注入し、仮親の子宮に移植し、キメラマウスを作成した。トランスジーンが germ line に導入されたキメラマウスから、ヘテロマウス ($Rer1^{+/geo}$) を得た。ヘテロマウス同士の交配により、Rer1 遺伝子欠損マウス ($Rer1^{geo/geo}$) の作成を試みた。

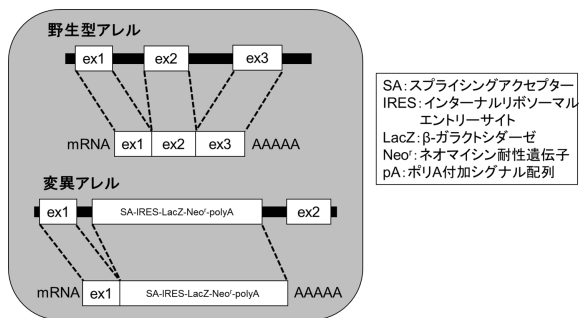


図2.
プロモータートラップ法による遺伝子ノックアウト

(2) Rer1 の分子機構解析

酵母 Rer1p は膜貫通領域に変異をもつ膜タンパク質の小胞体局在化にはたらくことが知られている。しかしながら、哺乳動物において、Rer1 が変異膜タンパク質の小胞体局在化にはたらくという報告はなかった。そこで、

膜貫通領域に変異をもつことで発症する難病の疾患関連変異膜タンパク質に着目し、その小胞体局在化における Rer1 の関与を検討した。まずは、疾患関連変異膜タンパク質を安定的に発現する HeLa 細胞株を樹立した。樹立した HeLa 細胞において、Rer1 の発現をノックダウンし、疾患関連変異膜タンパク質の小胞体局在化に変化を認めるものをスクリーニングした。局在の変化が認められた変異膜タンパク質については、Rer1 との相互作用を検討した。

4. 研究成果

(1) Rer1 欠損マウスの作成

C57BL/6 由来の組換え ES 細胞を ICR や BALB/c マウスの胚盤胞に注入し、高いキメラ率のマウスを得た (写真 1)。

写真 1



得られたキメラマウスを C57BL/6 マウスと交配し、ES 細胞由来のトランスジーンを有するヘテロマウス ($Rer1^{+/geo}$) を得た。ヘテロマウス同士を交配し、ホモ接合体の変異マウスの作成を試みたが、Rer1 遺伝子ホモ欠損マウスは得られなかった。そこで、胎生 13.5 日において、Rer1 ホモ遺伝子欠損胚の存在を検討したが認められず、着床痕のみの早期吸収胚が高頻度に観察された (写真 2)。

写真 2 (矢印は着床痕を示す)



これらの結果から、Rer1 欠損マウスは初期胚発生期に胎生致死となること示唆された。

今後、Rer1 欠損胚の発生異常の詳細を解析することで、初期発生における Rer1 の生理的役割を明らかにできると考えている。

(2) Rer1 の分子機構解析

網膜色素変性症の原因となる変異ロドプシン (G51R) の小胞体局在化に Rer1 が関わることを明らかにした (Yamasaki et al., Sci Rep., 2014)。また、Rer1 は野生型ロドプシンの細胞内輸送にも関与することが示唆された。Rer1 の発現を低下させると、小胞体に局在した変異ロドプシンの一部が細胞膜へ輸送された。Rer1 は、ゴルジ体において変異ロドプシンを認識し、小胞体へ送り返すことで、小胞体に局在化させていると考えられた。

PMP22 (peripheral myelin protein 22) は末梢神経のミエリン構成タンパク質のひとつであり、ミエリン細胞同士の接着を促進することで、神経細胞を保護するミエリンの形成にはたらくしている。遺伝子変異によって生じる変異 PMP22 は小胞体に蓄積し、遺伝性神経難病であるシャルコー・マリー・トゥース病の発症の原因となることが知られている。われわれは疾患関連変異 PMP22 (L16P) の小胞体局在化機構について解析を行った (Hara et al., Sci Rep., 2014)。変異 PMP22 は小胞体シャペロンであるカルネキシンと結合することが報告されていた。そこで、HeLa 細胞に変異 PMP22 を発現させ、変異 PMP22 の小胞体局在におけるカルネキシンの役割を検討した。これまでの報告と同様に、変異 PMP22 はカルネキシンと相互作用することを確認した。しかしながら、カルネキシンをノックダウンしても、変異 PMP22 の小胞体蓄積に変化は認められなかった。また、Rer1 をノックダウンしても、若干の PMP22 は小胞体から排出されるものの、その大部分は小胞体に局在したままであった。そこで、カルネキシンと Rer1 を同時にノックダウンすることを試みた。その結果、変異 PMP22 が小胞体から劇的に排出されることを見出した (図 3)。変異 PMP22 は Rer1 とも結合することから、カルネキシンの発現低下によって変異 PMP22 が小胞体から排出された場合には、ゴルジ体において Rer1 が変異 PMP22 を認識する可能性が示

唆された。Rer1 によって認識された変異 PMP22 は、小胞体に送り返されることで、小胞体に局在化されると考えられた。以上の結果から、変異 PMP22 の小胞体局在化は、小胞体とゴルジ体の 2 つの異なる品質管理機構によって制御されることが示唆された(図 4)。さらに、小胞体に局在化した変異 PMP22 の分解に関連する因子として Hrd1 と gp78 を発見した。

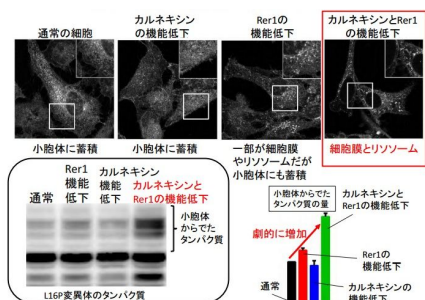


図 3 カルネキシンと Rer1 の発現低下による変異 PMP22 の小胞体蓄積解除

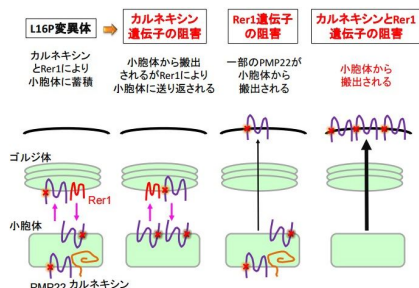


図 4 カルネキシンと Rer1 による変異 PMP22 の小胞体局在化のメカニズム

(3) 考察

本研究課題において、マウス初期胚発生における Rer1 の生物学的重要性を示すことができた。また、Rer1 が疾患関連変異膜タンパク質をゴルジ体において認識し、小胞体へ逆行輸送させることで、その品質管理に機能することが明らかとなった。Rer1 は α -セクレターゼやアセチルコリン受容体の複合体形成にも関わるということが報告されている。これらの知見を総合すると、Rer1 がゴルジ体における膜タンパク質の品質管理の一端を担っており、哺乳類において重要な生理的役割を果たしている可能性が示唆された。今後は、Rer1 による膜タンパク質のゴルジ体品質管理機構が、初期発生のどのようなイベントに

関わるのかを解析し、Rer1 によって制御される標的膜タンパク質を明らかにすることで、初期発生制御における新たな分子機構を明らかにすることが期待される。本研究中に作成した有用な研究試料を駆使して、引き続き未解明の課題に取り組みたい。

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2件)

Yoshii SR, Kuma A, Akashi T, Hara T, Yamamoto A, Kurikawa Y, Itakura E, Tsukamoto S, Shitara H, Eishi Y, Mizushima N. (2016) Systemic Analysis of Atg5-Null Mice Rescued from Neonatal Lethality by Transgenic ATG5 Expression in Neurons. *Dev Cell*. 39(1):116-30. doi:10.1016/j.devcel.2016.09.001. 査読有

Sakaguchi A, Sato M, Sato K, Gengyo-Ando K, Yorimitsu T, Nakai J, Hara T, Sato K, Sato K. (2015) REI-1 is a guanine nucleotide exchange factor regulating RAB-11 localization and function in *C. elegans* embryos. *Dev Cell*. 35(2):211-21. doi: 10.1016/j.devcel.2015.09.013. 査読有

[学会発表](計6件)

原太一、橋本由紀子、阿久澤共子、平井里香、小林久江、佐藤健
疾患関連変異膜タンパク質の小胞体局在化における初期ゴルジ品質管理機構の役割
第 38 回日本分子生物学会, 第 88 回日本生化学会 合同大会(兵庫県神戸市)
2015 年 12 月 1 日 ~ 12 月 4 日

原太一、橋本由紀子、阿久澤共子、平井里香、小林久江、佐藤健
疾患関連変異膜タンパク質の小胞体局在化における初期ゴルジ品質管理機構の役割
第 10 回臨床ストレス応答学会大会第(東京都小金井市)
2015 年 11 月 6 日 ~ 11 月 7 日

Taichi Hara, Yukiko Hashimoto, Tomoko Akuzawa, Rika Hirai, Hisae Kobayashi, and Ken Sato
Rer1 and calnexin regulate endoplasmic reticulum retention of a peripheral myelin protein 22 mutant that causes type 1A Charcot-Marie-Tooth disease
第 58 回日本神経化学学会大会(埼玉県大宮市)
2015 年 9 月 11 日 ~ 9 月 13 日

Taichi Hara, Yukiko Hashimoto, Tomoko Akuzawa, Rika Hirai, Hisae Kobayashi, and Ken Sato

Rer1 and calnexin regulate endoplasmic reticulum retention of a peripheral myelin protein 22 mutant that causes type 1A Charcot-Marie-Tooth disease
第 38 回日本神経科学大会（兵庫県神戸市）
2015 年 7 月 28 日～7 月 31 日

佐藤健、山崎章徳、前島郁子、原太一
疾患原因タンパク質が小胞体に蓄積する分子メカニズム
第 6 7 回日本細胞生物学会大会
（東京都江東区）
2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日

原太一、橋本由紀子、阿久澤共子、平井里香、小林久江、佐藤健
Rer1 と カ ル ネ キ シ ン は Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病の発症と関連する変異 PMP22 の小胞体蓄積を抑制する
第 6 7 回日本細胞生物学会大会
（東京都江東区）
2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原 太一 (HARA TAICHI)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号：392374

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし