

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32686

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14731

研究課題名(和文)核膜と小胞体の機能的連携

研究課題名(英文)Functional zones in the nuclear envelope and endoplasmic reticulum

研究代表者

後藤 聡 (GOTO, Satoshi)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：60280575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体で合成される脂質の一つであるGPIは、ある種のタンパク質と共有結合を形成し、そのタンパク質をラフトに局在化させる重要な役割を担う。ほとんどのGPI合成酵素は小胞体に局在するにも関わらず、PigBと呼ばれる酵素だけが核膜に局在することを私達は見出した。本研究では、PigBが小胞体でなく核膜に局在する必要があるかを明らかにするため、酵素活性は保持しつつ小胞体に局在するPigB(小胞体型)を作製した。PigB(核膜型)はPigB変異体をレスキューできたが、PigB(小胞体型)はできなかった。これより、小胞体膜と核膜は連続しているにも関わらず、PigBは核膜に局在する必要があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Glycophosphatidylinositol (GPI), a glycolipid synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) is a key molecule to anchor proteins to the plasma membrane. We previously found that one of the GPI synthesis enzymes PigB is localized to the nuclear envelope (ER) whereas the other enzymes are in the ER. In this study, we examined whether the ER localization of PigB is required for its function. We first generated ER-localizing PigB (ER type) that has normal activity. The PigB (ER type) did not rescue lethality of pigB mutation whereas PigB (NE type) fully rescued it. This result shows that the ER localization of PigB is essential for its function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：GPI 核膜 小胞体 品質管理 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

小胞体の膜上では様々な脂質が合成されており、小胞体は膜脂質の一大工場となっている。また、その小胞体と核膜は連続した膜として構成されているため、小胞体と核膜上にある脂質は自由に移動することができると考えられている。

小胞体で合成される GPI (Glycosylphosphatidylinositol) は、ある種のタンパク質と共有結合を形成し、そのタンパク質を膜に係留する。そのような蛋白質は GPI 結合型タンパク質と呼ばれる。私達は、偶然にも GPI の合成酵素の 1 つである PigB が核膜に局在していることを見出した。さらに面白いことに、PigB 以外の GPI 合成酵素は、核膜ではなく小胞体に分布していた。では、なぜ PigB は核膜に局在しているのだろうか、そもそも核膜に局在する必要があるのだろうか。

2. 研究の目的

本研究では、PigB が小胞体でなく核膜に局在する必要があるかを明らかにする。

3. 研究の方法

PigB 内の核膜へ局在するための配列を同定する。その配列に変異を導入することで、核膜以外に局在する PigB (核膜非局在型) を作成する。私達はすでに PigB を欠失した個体は致死になることを見出している。そこで、PigB (小胞体局在型) を、PigB 欠失個体で発現させ、致死性をレスキューできるか検討する。レスキューされなければ、PigB の核膜局在が生体に必須であることがわかる。

4. 研究成果

(1) PigB 内の核膜局在配列の同定

Drosophila PigB (dPigB) は、*Drosophila* の個体と細胞では核膜に局在する。一方、human PigB (hPigB) は、*Drosophila* 個体と細胞、mammalian 細胞では小胞体に局

在する。そこで、dPigB と hPigB のキメラタンパク質を作製し、その局在を調べた。その結果、dPigB の 1-31, 101-159, 262-282, 300-352 のアミノ酸配列が核膜局在に必要十分であることがわかった。

(2) PigB (小胞体局在型) の作製

dPigB の核膜局在が必要であることを調べるために、活性を保持した小胞体局在型 PigB を作製した。具体的には、dPigB の 319-336 のアミノ酸配列を hPigB の相同箇所 (379-391) に交換したところ、そのキメラタンパク質は小胞体に局在した。さらにその活性を調べるために、内在性の PigB を欠失した mammalian 細胞 (CHO 細胞) に、このキメラタンパク質を発現させた。PigB 欠失細胞は、細胞表面に存在するはずの GPI 結合タンパク質が細胞内に留まったままになる。PigB 欠失細胞に発現させたキメラタンパク質は小胞体に局在し、かつ GPI 結合タンパク質は正しく細胞表面に局在した。この結果より、作製したキメラタンパク質は正しい活性を保持していることがわかった。以後、このキメラタンパク質を PigB (小胞体局在型) と呼び、以下の実験に使用した。

(3) PigB (小胞体局在型) による PigB 欠失個体のレスキュー実験

本来の dPigB は核膜に局在するので、dPigB (核膜局在型) と呼ぶ。PigB を欠失した *Drosophila* 個体は致死になるが、この PigB 欠失個体に、dPigB (核膜局在型) を発現させると致死性が回復することがわかった。同じ条件で、PigB 欠失個体に、PigB (小胞体局在型) を発現させても致死性は回復しないことがわかった。この結果は、活性を保持した PigB

であっても、核膜になければ正しく機能しない可能性を示唆している。

次に、dPigB（核膜局在型）とPigB（小胞体局在型）の発現量を調べたところ、mRNAは同程度発現していたが、タンパク質レベルでは、PigB（小胞体局在型）のほうが著しく減少していた。PigB（小胞体局在型）による致死性の回復度が低いのは、そもそもPigB（小胞体局在型）タンパク質の発現量が少ないからかもしれない。そこで、dPigB（核膜局在型）のタンパク質の発現量を減少させ、同じタンパク質量で、dPigB（核膜局在型）とPigB（小胞体局在型）を比較した。その結果、PigB（小胞体局在型）による回復度は、dPigB（核膜局在型）には及ばないことがわかった。この結果より、やはりPigBは核膜になければ正しく機能しないことがわかった。

(4) 小胞体局在によるPigBの不安定化さて、上記の実験より、PigB（小胞体局在型）は*Drosophila* 個体においてタンパク質レベルの発現量が少ないことが示された。このことから、PigB（小胞体局在型）は翻訳効率が低下している、または小胞体ではPigBタンパク質は積極的に分解されている、またはその両方である可能性が考えられた。私達は、積極的な分解について検討するため、プロテアソームおよびライソソームの阻害剤添加により、PigB（小胞体局在型）の分解が抑制されるかを検討した。PigB（小胞体局在型）を発現させた*Drosophila* 組織に、プロテアソームの阻害剤であるMG132を加えてもPigB（小胞体局在型）は検出されなかったが、ライソソームの阻害剤であるbafilomycinを加えると、一部のPigB（小胞体局在型）が検出された。このことは、PigB（小胞体局在型）

はライソソームで積極的に分解されていることを示している。

積極的なタンパク質分解としては、正しくフォールディングできなかった異常な構造のタンパク質を検出、分解する品質管理機構が有名である。しかし、本来局在すべき細胞内領域から逸脱した場合に分解される機構は知られていない。本研究結果は、そのような分解機構の存在を示した点も新しい。

(5) 結語

核膜と小胞体は一つながりの膜で構成されているので、PigBが合成に関与する糖脂質GPIは、核膜と小胞体膜を自由に拡散できると考えられている。したがって、PigBは核膜であろうが小胞体膜であろうが、その膜内にある限りは正しく機能すると考えられた。しかし、本研究によって、PigBは核膜に局在しないと正しく機能しないという驚くべき結果を得た。なぜPigBは核膜に局在する必要があるかは、今後解くべき大きな問題である。

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1件)

Spätzle-processing enzyme-independent activation of the Toll pathway in *Drosophila* innate immunity.

Yamamoto-Hino, M. and Goto, S.

Cell Struct. Funct., 41, 55-60 (2016)

DOI:

<http://doi.org/10.1247/csf.16002>

査読有

[学会発表](計10件)

Miki Yamamoto-Hino, Eri Katsumata, Emiko Suzuki, Yusuke Maeda, Taroh Kinoshita, Satoshi Goto
Nuclear envelope localization of

PIG-B is essential for glycosyl-phosphatidylinositol synthesis in *Drosophila*
Gordon Research Conference, Glyco-lipid and Sphingolipid Biology
February 11-16, 2018 Hotel Galvez, Galveston, TX

Satoshi Goto, Miki Yamamoto-Hino
Posttranslational zones in the ER and Golgi apparatus
生命科学系学会合同年次大会(ワークショップ、オーガナイザー)
2017年12月6日から2017年12月9日
神戸ポートアイランド(兵庫)

Miki Yamamoto-Hino, Eri Katsumata, Emiko Suzuki, Yusuke Maeda, Taro Kinoshita, Satoshi Goto
Nuclear envelope localization of PIG-B is essential for GPI anchor synthesis in *Drosophila*
生命科学系学会合同年次大会(口頭発表)
2017年12月6日から2017年12月9日
神戸ポートアイランド(兵庫)

Miki Yamamoto-Hino, Eri Katsumata, Emiko Suzuki, Yusuke Maeda, Taro Kinoshita, Satoshi Goto
Nuclear envelope localization of PIG-B is essential for GPI anchor synthesis in *Drosophila*
生命科学系学会合同年次大会(ポスター発表)
2017年12月6日から2017年12月9日
神戸ポートアイランド(兵庫)

後藤聡
糖鎖およびリン酸修飾の基盤となる選

別輸送ゾーンの分子機構と生理機能の解析
新学術領域研究「オルガネラ・ゾーン」
公開キックオフ・シンポジウム
2017年10月5日
東京大学小柴ホール(東京)

山本(日野)美紀、前田祐輔、木下タロウ、後藤聡
GPI 合成酵素 PIG-B の細胞内局在に関する解析
第69回日本細胞生物学会大会(ポスター)
2017年6月13日から2017年6月15日
仙台国際センター(宮城)

Miki Yamamoto-Hino, Satoshi Goto
Localization of PIG-B involved in GPI anchor synthesis in *Drosophila*
The 4th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (Poster)
2017年5月8日から2017年5月11日
Osaka University, Osaka, Japan

後藤聡、山本(日野)美紀
小胞体・核膜に存在する GPI 修飾局域
第89回日本生化学会大会(シンポジウム)
2016年9月25日から2016年9月27日
仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城)

Sawako Kase, Miki Yamamoto-Hino, Satoshi Goto
Screening of glycosyltransferase involved in innate immunity in *Drosophila*
第12回日本ショウジョウバエ研究会(ポスター発表、大会世話役、後藤聡)
2016年9月9日から2016年9月11日

立教大学（東京）

後藤聡、山本（日野）美紀、近藤周、上田龍

小胞体・ゴルジ体の翻訳後修飾局域

第68回日本細胞生物学会大会第11回日本ケミカルバイオロジー学会年会（口頭発表、シンポジウム、オーガナイザー、後藤聡、吉田秀郎）

2016年6月15日から2016年6月17日
京都テルサ（京都）

6．研究組織

(1)研究代表者

後藤 聡（GOTO, Satoshi）
立教大学・理学部・教授
研究者番号：60280575

(2)研究分担者

(3)連携研究者

山本 美紀（YAMAMOTO, Miki）
立教大学・理学部・助教
研究者番号：40301783