

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01432

研究課題名(和文)小胞体に蓄積した構造異常タンパク質に対処する2つの機構の認識メカニズム解明

研究課題名(英文) Analysis of recognition mechanisms of misfolded proteins accumulated in the endoplasmic reticulum

研究代表者

森 和俊 (Mori, Kazutoshi)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：70182194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：生命活動の担い手であるタンパク質がその機能を果たすためには、その高次構造が正しくなければなりません。逆に、構造異常タンパク質は細胞にとって有害です。細胞内小器官である小胞体に蓄積した構造異常タンパク質は小胞体関連分解によって処分されますが、その仕組みの一端を解明しました。構造異常糖タンパク質の場合、糖鎖の形状が認識されて分解されます。この分解の第一段階を開始すると考えていた酵素EDEM2が、TXNDC11という別のタンパク質と複合体を形成している時のみ酵素活性を発揮することを証明しました (eLife, 2020)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EDEM2というタンパク質は、期待される酵素活性を試験管内で発揮しないと2005年に報告されていました。遺伝子破壊細胞の解析により、EDEM2が構造異常糖タンパク質の小胞体関連分解における第一段階に関与することを我々が見出し、従来のモデルを一新する提唱を2014年に行いました。しかし、試験内の結果と細胞内の結果とが矛盾していました。今回、その矛盾を複合体形成の観点を用いて解決しました。小胞体関連分解は60種以上の疾患の発症に関係しており、これらの治療への道につながる成果です。

研究成果の概要(英文)：Protein must gain correct tertiary and quaternary structure to fulfill its function assigned by the genetic code. Misfolded proteins are harmful to the cell. Misfolded proteins accumulated in the endoplasmic reticulum (ER), an organelle, are dealt with ER-associated degradation (ERAD). We unraveled a mechanism of ERAD. In the case of misfolded glycoproteins, the structure of N-glycan is recognized for degradation. We proposed that an enzyme termed EDEM2 initiates the first step of ERAD of misfolded glycoproteins. We demonstrated that EDEM2 indeed catalyzes the first step, only when complexed with TXNDC11 (eLife, 2020).

研究分野：分子生物学

キーワード：構造異常タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞間コミュニケーションにとって極めて重要な分泌タンパク質や膜タンパク質が高次構造を形成する小胞体に、構造異常タンパク質が蓄積すると2つのメカニズムが駆動し、対処する。申請者の長年に亘る研究から、構造異常タンパク質の量をモニターして対応するのが小胞体ストレス応答であり、構造異常タンパク質の質をモニターして対応するのが小胞体関連分解であると考えている。後者の場合、細胞にとって極めて有害な構造異常タンパク質が出現すると、通常の手順を踏まずに強制分解する。一方、構造異常糖タンパク質を分解する際には、アスパラギン残基に結合したN結合型糖鎖(マンノース9個、M9)から、マンノース8個(M8)、マンノース7個(M7)へとマンノースが刈り込まれることが必要である。これらのマンノース刈り込み酵素には諸説あったが、代表者はヒトの培養細胞を用いたゲノム編集を行い、第1段階(M9→M8)にはEDEM2が、第2段階(M8→M7)にはEDEM3/1が必要であることを示し(1)、従来のモデルを一新した。しかしながら、単離精製したEDEM2にはマンノース刈り込み活性がないという報告(2,3)と矛盾していた。

2. 研究の目的

EDEM2の酵母ホモログであるHtm1pも、単独ではマンノース刈り込み活性を示さないが、PDIというチオレドキシタンパク質と複合体を形成するとマンノース刈り込み活性を示すことが報告されていた(4)。本研究の目的は、EDEM2のパートナータンパク質を同定し、EDEM2がマンノース刈り込み活性を有することを証明することである。

3. 研究の方法

EDEM2を非還元SDS電気泳動にかけると、高分子量の位置にもバンドが検出されることを見出していた。本研究を開始する前に、構造異常糖タンパク質の小胞体関連分解に関与する遺伝子のゲノムワイドなスクリーニングが行われ、TXNDC11というチオレドキシタンパク質が同定されていた(5)。そこで、TXNDC11がEDEM2のパートナータンパク質であることを細胞レベルで証明し、EDEM2-TXNDC11複合体を精製し、マンノース刈り込み活性の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) EDEM2を非還元SDS電気泳動にかけた時に得られる高分子量のバンドは抗TXNDC11抗体と反応した。

(2) EDEM2には8個のシステイン残基が存在する。それぞれをアラニンに置換し、EDEM2破壊細胞に導入すると、C65A、C408A、C558Aの3つでは構造異常糖タンパク質の小胞体関連分解が行われなかった。C65とC408はマンノース刈り込み酵素ホモロジドメインに存在することから、酵素活性に直接必要なジスルフィド結合を形成していると考えた。一方、C558はその外に存在し、C558AにはTXNDC11は結合しなかった。

(3) ゲノム編集によりTXNDC11破壊細胞を作製した。この破壊細胞では、EDEM2を非還元SDS電気泳動にかけた時に得られる高分子量のバンドが消失した。同時にこの破壊細胞では、構造異常糖タンパク質の小胞体関連分解が行われず、M9型糖鎖が蓄積した。

(4) TXNDC11には24個のシステイン残基が存在する。それぞれをセリンに置換し、TXNDC11破壊細胞に導入すると、C692Sでは、EDEM2を非還元SDS電気泳動にかけた時に得られる高分子量のバンドが消失した。同時にこの細胞では、構造異常糖タンパク質の小胞体関連分解が行われなかった。よってEDEM2のC558とTXNDC11のC692がジスルフィド結合を介して共有結合していると考えた。

(5) EDEM2はTXNDC11と複合体を形成しているときに、単独の時よりもトリプシン抵抗性を示し、TXNDC11の有無により、コンフォメーションが変化することがわかった。

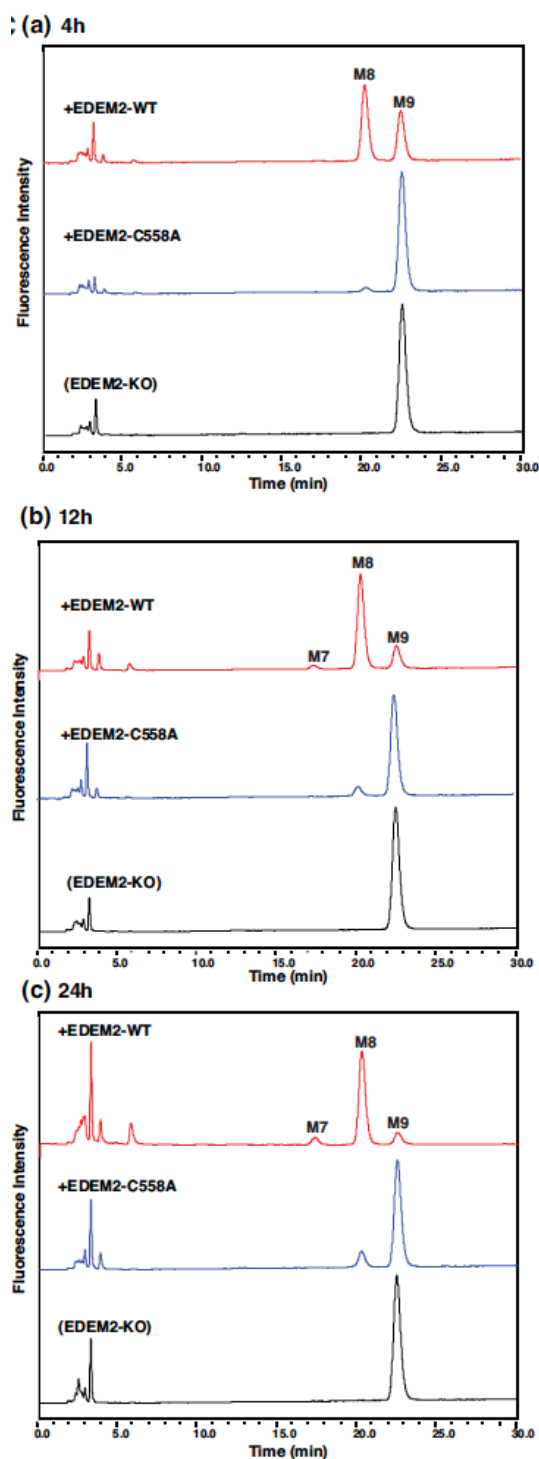
(6) TXNDC11はウェスタンブロットにおいて、常にダブレットのバンドとして検出された。翻訳開始がM1とM58の2カ所で行われる可能性を考え、それぞれアラニンに置換してTXNDC11破壊細胞に導入した。その結果、M1Aでは下側のバンドのみ、M58Aでは上側のバンドのみが検出され、仮説の正しさが証明された。M1A導入細胞、M58A導入細胞共に、構造異常糖タンパク質の小胞体関連分解が正常に行われていた。M58Aは、その直ぐC末端側に存在する疎水性領域が膜貫通ドメインとして機能し、膜タンパク質として存在した。一方M1Aの場合、M58の直ぐC末端側に存在する疎水性領域がシグナルペプチドとして機能し、シグナルペプチドが切断されると可溶性タンパク質として存在したが、たまたま切断されないと膜タンパク質として存在した。このことは、シグナルペプチダーゼが作用すると考えられるA87をフェニルアラニンに置換し、シグナルペプチダーゼが作用しない変異体を作製して解析することにより証明した。

(7) TAP (tandem affinity purification) tag を付けた野生型およびC558A変異型EDEM2を作

製し、半分程度可溶性タンパク質として発現する M1A 変異型 TXNDC11 とともに EDEM2 破壊細胞に導入し、IgG Sepharose ビーズを用いて精製した。予想通り、C558A 変異型 EDEM2 の場合、EDEM2 のみが精製された。一方、野生型 EDEM2 の場合、EDEM2-TXNDC11 複合体が精製された。これら精製物を pyridylamine (PA) で標識した M9 と反応させ生成物を HPLC で解析した。その結果、下図に示す様に様に、EDEM2-TXNDC11 複合体は経時的に PA-M9 を PA-M8 に変換し、24 時間後ではほとんどの PA-M9 が PA-M8 に変換された。一方、EDEM2 単独では、これまでの報告通り、PA-M9 を PA-M8 に変換する活性をほとんど示さなかった。

[考察] 酵母 Htm1p の場合、基質の 10% 程度を加水分解しており、本研究で得られたロバストなマンノース刈り込み活性は EDEM ファミリータンパク質の中で初めて得られた結果である。以前の研究(1)と本研究(6)により、EDEM2 が構造異常糖タンパク質を小胞体関連分解する際の開始マンノース刈り込み酵素であることが確定した。

1. Ninagawa, S., Okada, T., Sumitomo, Y., Kamiya, Y., Kato, K., Horimoto, S., Ishikawa, T., Takeda, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., and Mori, K. (2014) EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *J. Cell Biol.* **206**, 347-356
2. Mast, S. W., Diekman, K., Karaveg, K., Davis, A., Sifers, R. N., and Moremen, K. W. (2005) Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins. *Glycobiology* **15**, 421-436
3. Shenkman, M., Ron, E., Yehuda, R., Benyair, R., Khalaila, I., and Lederkremer, G. Z. (2018) Mannosidase activity of EDEM1 and EDEM2 depends on an unfolded state of their glycoprotein substrates. *Commun. Biol.* **1**, 172
4. Gauss, R., Kanehara, K., Carvalho, P., Ng, D. T., and Aebi, M. (2011) A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* **42**, 782-793
5. Timms, R. T., Menzies, S. A., Tchasovnikarova, I. A., Christensen, L. C., Williamson, J. C., Antrobus, R., Dougan, G., Ellgaard, L., and Lehner, P. J. (2016) Genetic dissection of mammalian ERAD through comparative haploid and CRISPR forward genetic screens. *Nat. Commun.* **7**, 11786
6. George, G., Ninagawa, S., Yagi, H., Saito, T., Ishikawa, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Imami, K., Ishihama, Y., Kato, K., Okada, T., and Mori, K. (2020) EDEM2 stably disulfide-bonded to TXNDC11 catalyzes the first mannose trimming step in mammalian glycoprotein ERAD. *eLife* **9**, e53455



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 G. George, S. Ninagawa, H. Yagi, T. Saito, T. Ishikawa, T. Sakuma, T. Yamamoto, K. Imami, Y. Ishihama, K. Kato, T. Okada and K. Mori	4. 巻 9
2. 論文標題 EDEM2 Stably Disulfide-bonded to TXNDC11 Catalyzes the First Mannose Trimming Step in Mammalian Glycoprotein ERAD	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e53455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.53455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 B. Jin, T. Ishikawa, M. Taniguchi, S. Ninagawa, T. Okada, S. Kagaya and K. Mori.	4. 巻 45
2. 論文標題 Development of a rapid in vivo assay to evaluate the efficacy of IRE1-specific inhibitors of the unfolded protein response using medaka fish.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Struct. Funct.	6. 最初と最後の頁 23-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.19032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 H. Koba, S. Jin, N. Imada, T. Ishikawa, S. Ninagawa, T. Okada, T. Sakuma, T. Yamamoto and K. Mori.	4. 巻 45
2. 論文標題 Reinvestigation of disulfide-bonded oligomeric forms of the unfolded protein response transducer ATF6.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Struct. Funct.	6. 最初と最後の頁 9-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.19030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 L.H.W. Kung, L. Mullan, J. Soul, P. Wang, K. Mori, J.F. Bateman, M.D. Briggs, R.P. Boot-Handford	4. 巻 21
2. 論文標題 Cartilage endoplasmic reticulum stress may influence the onset but not the progression of experimental osteoarthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis Res. Ther.	6. 最初と最後の頁 206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-019-1988-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 T.-M. Jao, M. Nangaku, C.-H. Wu, M. Sugahara, H. Saito, H. Maekawa, Y. Ishimoto, M. Aoe, T. Inoue, T. Tanaka, B. Staels, K. Mori	4. 巻 95
2. 論文標題 ATF6 downregulation of PPAR promotes lipotoxicity-induced tubulointerstitial fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney Int.	6. 最初と最後の頁 577-589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2018.09.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Forouhan, K. Mori, and R.P. Boot-Handford	4. 巻 70
2. 論文標題 Paradoxical roles of ATF6 and ATF6 in modulating disease severity caused by mutations in collagen X	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Matrix Biol.	6. 最初と最後の頁 50-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matbio.2018.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 T. Ishikawa, S. Ansai, M. Kinoshita and K. Mori	4. 巻 8
2. 論文標題 A Collection of Transgenic Medaka Strains for Efficient Site-directed Transgenesis Mediated by phiC31 Integrase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 G3: Genes, Genomes, Genetics	6. 最初と最後の頁 2585-2593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1534/g3.118.200130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Sasaki, A. Kuboyama, M. Mita, S. Murata, M. Shimizu, J. Inoue, K. Mori, and R. Sato	4. 巻 293
2. 論文標題 The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 10322-10332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Ishikawa, T. Toyama, Y. Nakamura, K. Tamada, H. Shimizu, S. Ninagawa, T. Okada, Y. Kamei, T. Ishikawa-Fujiwara, T. Todo, E. Aoyama, M. Takigawa, A. Harada and K. Mori	4. 巻 216
2. 論文標題 UPR Transducer BFB2H7 Allows Export of Type II Collagen in a Cargo- and Developmental Stage-Specific Manner.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 1761-1774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201609100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Ishikawa, M. Kashima, A. J. Nagano, T. Ishikawa-Fujiwara, Y. Kamei, T. Todo, and K. Mori	4. 巻 6
2. 論文標題 Unfolded Protein Response Transducer IRE1-mediated Signaling Independent of XBP1 mRNA Splicing Is Not Required for Growth and Development of Medaka Fish.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e26845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.26845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Sugimoto, S. Ninagawa, S. Yamano, T. Ishikawa, T. Okada, S. Takeda and K. Mori	4. 巻 42
2. 論文標題 SEL1L-dependent Substrates Require Derlin2/3 and Herp1/2 for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Struct. Funct.	6. 最初と最後の頁 81-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.17007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件(うち招待講演 26件/うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Kazutoshi Mori
2. 発表標題 Dynamics of function and regulation of the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 Scientific seminar at Peking-Tsinghua Center for Life Scienc (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazutoshi Mori
2. 発表標題 Dynamics of function and regulation of the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 iCeMS Retreat 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazutoshi Mori
2. 発表標題 Roles of the unfolded protein response in cancer
3. 学会等名 Cancer Research UK Beatson International Cancer Conference “Protein Dynamics in Cancer” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazutoshi Mori
2. 発表標題 Multiorganelle zones present in the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 International symposium on organelle zones: opening a new era of cell biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体ストレスと 疾患
3. 学会等名 全国国立病院院長協議会関東信越支部勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御 のダイナミクス
3. 学会等名 2019年NCGM (国立国際医療研究センター研究所) 冬季リトリート (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御 のダイナミクス
3. 学会等名 自治医科大学・教育委員会主催大学院特別講義 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御 のダイナミクス
3. 学会等名 第 2 7 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御 のダイナミクス
3. 学会等名 第 5 1 回日本小児感染症学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御 のダイナミクス
3. 学会等名 第 6 回JCRベーシックリサーチカンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御 のダイナミクス
3. 学会等名 金沢大学十全医学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御 のダイナミクス
3. 学会等名 第 1 8 回日本抗加齢医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 Dynamics of function and regulation of the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 ASEAN-JAPANゲノム医療研究推進会議 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御のダイナミクス
3. 学会等名 第27回日本Cell Death学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御のダイナミクス
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 The antipsychotic olanzapine targets proinsulin to endoplasmic reticulum-associated degradation by inducing its misfolding in a pancreatic cell line
3. 学会等名 International symposium on "Proteins: from the Cradle to the Grave" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御のダイナミクス
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 Dynamics of function and regulation of the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 International Conference on Ageing Biology and Chinese Society of Ageing Biology Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小 胞体の機能と制御のダイナミクス
3. 学会等名 第 2 1 回菅原・大西記念癌治療増感研究シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御のダイ ナミクス
3. 学会等名 第 1 0 回山梨医学フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 The Unfolded Protein Response through Evolution
3. 学会等名 EMBO Conference “Protein Quality Control: Success and failure in health and disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御のダイナミクス
3. 学会等名 第22回日本病態プロテアーゼ学会学術集会・シンポジウム「小胞体/オートファジー制御と疾患」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体の機能と制御のダイナミクス
3. 学会等名 日本農芸化学会・関西・中四国・西日本支部合同大阪大会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 The unfolded protein response: to mammals and beyond
3. 学会等名 Endoplasmic reticulum functions in physiology and pathology (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 Dynamics of function and regulation of the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 The 65th Annual meeting of Japanese association for dental research (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 和俊
2. 発表標題 小胞体ストレス応答から生命の基盤が見えてきた～がんをはじめとする難治性疾患征圧へ今まさに挑まんとする～
3. 学会等名 日本臨床腫瘍薬学会学術大会2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>eLifeにメダカ個体解析論文 http://www.upr.biophys.kyoto-u.ac.jp/blog/elife_paper_Paris メダカ BBF2H7 解析結果を JCB に上梓 http://www.upr.biophys.kyoto-u.ac.jp/blog/bbf2h7_jcb 小胞体ストレスの原因タンパク質に応じて異なるストレスセンサーが活性化 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/170512_1.html</p>

6. 研究組織		
氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考