

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07332

研究課題名(和文) 小胞体タンパク質品質管理を制御するサイトソル由来の還元力伝達経路

研究課題名(英文) Reducing power from cytosol controls ER protein quality control

研究代表者

寶関 淳 (Hoseki, Jun)

京都先端科学大学・バイオ環境学部・准教授

研究者番号：40423058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体における異常タンパク質の分解には、ミスフォールドタンパク質のジスルフィド結合を還元するための還元力が必要である。出芽酵母において、その還元力として、サイトソルに局在するタンパク質であるチオレドキシンが利用できることがわかり、この還元力を小胞体内へと受け渡すのに関わる遺伝子を同定した。一方、チオレドキシンによる小胞体への還元力供給は、ヒト培養細胞では観察されず、酵母特異的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体レドックスの恒常性維持はタンパク質品質管理に必須であり、その破綻は小胞体ストレスを引き起こし、様々な疾患の発症と関連する。本研究の成果は、小胞体レドックスの恒常性維持における新たな因子を加えるものであり、小胞体タンパク質品質管理におけるレドックス制御・維持機構を明らかにするという細胞生物学的な観点においても、小胞体ストレスに起因する神経変性疾患や糖尿病等の発症やその治療戦略を考える上でも重要な成果といえる。

研究成果の概要(英文)：Reducing power for reduction of disulfide bonds of misfolded proteins is required for their degradation. Thioredoxin localized in the cytosol is available as the reducing power in budding yeast. Genes were identified for involving in transfer of the reducing power of thioredoxin into the ER. This mechanism seems to be specific to budding yeast, which was not observed in human culture cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：レドックス 小胞体 チオレドキシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小胞体は分泌タンパク質及び膜タンパク質のフォールディング及び成熟の場である。小胞体は細胞内で合成されるタンパク質の約 3 割を占める大量のタンパク質を扱うため、厳格な品質管理機構を有している。正しくフォールドしたものだけが分泌経路へと送られ、そうでないものは小胞体内に留められ、分子シャペロンの助けで再びフォールディングされる。それでもどうしても正しくフォールドできなかったものは識別され、サイトゾルへ逆行輸送後、ユビキチン・プロテアソーム系で分解される。この一連の分解系は小胞体関連分解(ERAD: ER-associated degradation)と呼ばれる。このようなタンパク質品質管理機構がストレス等により破綻した状態は小胞体ストレスと呼ばれ、神経変性疾患をはじめとする様々な疾患発症の原因と考えられている。

小胞体でフォールディング及び成熟されるタンパク質の多くは、構造形成や機能発現のためにジスルフィド結合形成を必要とする。そのため、小胞体はジスルフィド結合形成に適した酸化的な環境にある。その一方で、ERAD においては、サイトゾルへの逆行輸送に先立ってミスフォールドタンパク質のジスルフィド結合を還元する必要がある。サイトゾルで合成される細胞内の主要なレドックス因子であるグルタチオンは、小胞体のミスフォールドタンパク質におけるジスルフィド結合を還元するための主要な還元力と考えられてきた。その一方で、酵母や哺乳類培養細胞において、小胞体におけるグルタチオンの減少や分解が小胞体タンパク質品質管理に影響を与えないという報告がなされてきた。そのため、グルタチオンに代わる小胞体への還元力供給経路の存在が示唆されたが、その実体は不明であった。

2. 研究の目的

最近、出芽酵母において、グルタチオン合成系の律速酵素遺伝子である GSH1 に加え、グルタチオンと並ぶサイトゾルの主要な還元力である thioredoxin (Trx) の遺伝子 TRX2 を欠損した $\Delta gsh1\Delta trx2$ 株では、生育に必要な最低限のグルタチオンのみを含む培養条件下において、 $\Delta gsh1$ 株と比べ、システインを有するミスフォールドタンパク質の ERAD による分解が遅延し、その生育も遅延した。しかも、この表現型は小胞体内のグルタチオンを分解しても維持された。したがって、サイトゾルに局在する Trx2 の還元力がグルタチオンに依存せず、小胞体内腔へと伝達され、小胞体タンパク質品質管理に寄与していることが示唆された。

本研究では、出芽酵母においてサイトゾルに局在する Trx から小胞体内腔へと還元力を伝達する経路において必要なタンパク質を同定し、Trx 由来の還元力伝達機構を明らかにすることを目的とした。さらに、これら還元経路に関わる因子の過剰発現や欠損による小胞体ストレス惹起及び小胞体タンパク質品質管理に対する影響を解析し、この新規還元力経路による小胞体タンパク質品質管理の制御機構を明らかにする。

ヒト培養細胞で Trx 還元酵素の阻害が小胞体内でのタンパク質の正しいジスルフィド結合形成を抑制することを Neil Bulleid らのグループが明らかにした。したがって、Trx の新生鎖のフォールディングへの関与が示唆され、本研究にて同定する、出芽酵母におけるサイトゾル Trx2 由来の還元力を小胞体内腔へ伝達する機構がヒト細胞にも保存されていると示唆された。そこで、本経路がヒトにおいても保存されているかについても解析を行った。

3. 研究の方法

出芽酵母において、MS 解析によりサイトゾル Trx2 とジスルフィド依存的に結合する小胞体膜タンパク質候補遺伝子のスクリーニングを行った。そのために Trx2 活性部位である CXXC モチーフ後半の Cys を Ala に置換した CA 変異体を発現する株を作製した。CA 変異体は基質タンパク質とのジスルフィド結合切断を促進する Cys を欠くことで、ジスルフィド結合中間体を安定化させる。可溶化したマイクロソーム画分において免疫沈降し、小胞体膜上でジスルフィド依存的に結合する Trx2 結合タンパク質を MS 解析により同定した。なお、CXXC モチーフの Cys を共に Ala に置換し、ジスルフィド結合できない AA(AXXA)変異体をコントロールとした。これらの遺伝子をそれぞれ破壊し、 $\Delta trx2$ と同様な ERAD 及び生育における遅延を示すかにより、Trx2 由来の還元経路に必要なタンパク質の同定を行った。その中からサイトゾル側でチオレドキシシンと結合するのに必要なシステインを持ちかつ生物種間で保存されている遺伝子を同定し、その破壊株を作製し、これら破壊株において小胞体内にミスフォールドタンパク質を発現させることで小胞体ストレスを誘導した際に、チオレドキシシン破壊株と同様な生育阻害が観察される遺伝子の同定を行った。また、ヒト培養細胞において Trx 過剰発現が小胞体ストレスの緩和に寄与するかについても解析を行った。

4. 研究成果

サイトゾルに局在する Trx2 とジスルフィド結合を介して結合するタンパク質を MS 解析による同定を行い、Trx2 の CA 変異体と結合するが、AA 変異体とは結合しないタンパク質が 364 個同定された。そのうち、サイトゾルあるいは膜貫通ドメインのサイトゾル側表面付近に生物種間で保存されたシステインを持つ小胞体膜タンパク質が 9 個見いだされた。これらの候補から Trx2 の還元力を小胞体内腔へと受け渡すのに必要な小胞体膜タンパク質を同定するため、これら候補遺伝子を $\Delta gsh1$ 株において破壊し、ERAD や生育に与える影響を解析し、チオレドキシシン

破壊株と同様な生育阻害が観察される遺伝子を同定した。しかしながら、これらの遺伝子破壊株において小胞体内にミスフォールドタンパク質を発現させた際の表現型が安定しなかったため、親株が元々持つ遺伝子修復系遺伝子の変異を修正した株を作製した。この親株にて再度上記の遺伝子破壊株を作製することで、Trx2 破壊株と同様な生育阻害が観察された遺伝子を同定することができた。

ヒト培養細胞においても Trx の過剰発現による小胞体ストレス緩和効果を、代替の還元力になり得るグルタチオン合成阻害条件下においても観察した。しかしながら、ヒト培養細胞において Trx は小胞体ストレスの緩和には寄与せず、Trx による小胞体への還元力供給は酵母特異的であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 若林 万紗也、由里本 博也、竇関 淳、阪井 康能
2. 発表標題 メタノール資化性酵母 <i>Candida boidinii</i> における小胞体内酸化還元状態の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野龍一、竹谷友之、由里本博也、竇関 淳、緒方英明、嶋 盛悟、阪井康能
2. 発表標題 メタノールセンサー宿主細胞を用いたメタン酸化触媒の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木 健悟、藤村 多嘉朗、奥 勇紀、阪井 康能、竇関 淳
2. 発表標題 プロテアソーム阻害に伴う小胞体レドックス状態の還元機構
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 絵里子、竇関 淳、阪井 康能
2. 発表標題 ERAD に必要なチオレドキシソム由来の還元力伝達に伴う小胞体膜タンパク質の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----