

令和 3 年 4 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06216

研究課題名(和文)小胞体における構造異常タンパク質の分解への基質運搬機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of how misfolded proteins are delivered to retrotranslocation complex for ER-associated degradation

研究代表者

蜷川 暁 (Ninagawa, Satoshi)

京都大学・理学研究科・特定助教

研究者番号：80647991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体は、インスリンなどの分泌タンパク質、また膜タンパク質を合成する場である。その合成の際には、一定量の不良タンパク質が産生されるため、それを分解する機構が存在している。その分解機構の特徴として、小胞体の分解基質を小胞体膜を通過させて細胞質のプロテアソームによって分解することが挙げられる。本研究では、小胞体内腔から小胞体膜へと分解基質をリクルートする分子メカニズムを中心に解析を行い、OS9とXTP3Bという分子が重複した機能を果たしていることを明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、小胞体の構造異常タンパク質がどのように分解されるかを明らかにすることを主眼としている。その成果として糖鎖依存分解経路の中心因子であるOS9とXTP3Bの機能的な重複が分かった。これにより、アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとする60以上ものヒトの疾患と関わりと報告されたこの小胞体関連分解機構の分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。将来的に、ヒト疾患への新たな治療法や予防法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the endoplasmic reticulum (ER) secretory and membrane proteins are synthesized. During the synthesis, some proteins cannot fold properly. Such misfolded proteins are degraded via proteasome in the cytosol. In this study, I focus on how misfolded proteins are delivered from ER lumen to ER membrane and revealed the redundant roles of OS9 and XTP3B for substrate degradation.

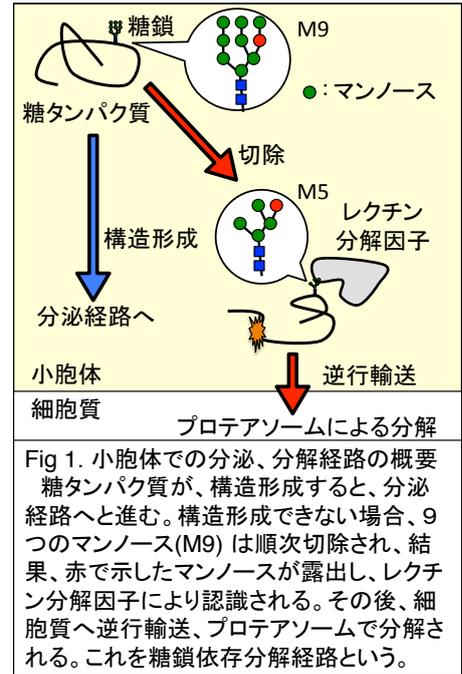
研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体関連分解 構造異常タンパク質

1. 研究開始当初の背景

小胞体の構造異常タンパク質は小胞体関連分解によって処理される。特徴として小胞体のタンパク質が膜を通過し、細胞質のプロテアソームで分解されることが挙げられる。

この小胞体関連分解において重要な役割をするのが N 型糖鎖である。N 型糖鎖は 3 つのグルコース、9 つのマンノース、2 つの N-アセチルグルコサミン(G3M9)からなる。G3M9 から M9 の糖鎖を持つタンパク質は、糖鎖を認識するレクチン様小胞体シャペロンなどによって構造形成が試みられる。一方で、M9 から N 型糖鎖のマンノースが刈り込まれていくと、糖鎖が分解シグナルとして機能し、レクチン様小胞体関連分解因子によって分解へと導かれる (Fig. 1) (Ninagawa et al., 2021 Biochim Biophys Acta Gen Subj)。この N 型糖鎖依存分解経路は、酵母からヒトまで保存されている主要な分解経路である。高等動物において、そのマンノース刈り込み酵素の実体は 2001 年から議論され続けてきたが、報告者らが遺伝子破壊株を作製し、M9→M8 は EDEM2 が、M8 からの糖鎖刈り込みは EDEM1/3 が行うことを明確に示した (Fig. 2) (Ninagawa et al., 2014 JCB)。この刈り込み酵素の同定は、酵母の結果から予測されたモデルを大きく変えた。そして (α) 糖鎖の刈り込みが行われた後に、どのように分解に導かれる



のか?は、残された重要課題の 1 つとして挙げられる。酵母では、レクチン因子 Yos9 が刈り込まれた糖鎖に結合し、分解に導く。高等動物では、共通したドメイン構造を持つためホモログとされる、可溶性レクチン OS-9、XTP3B がある (Fig. 3)。これらの機能が重複し、共に分解に効くという報告 (Bernasconi et al., 2010 JCB) と、OS-9 のみが分解を促進し、XTP3B は分解に寄与しない (Christianson et al., 2008 NCB) もしくは、分解を抑制する (Fujimori et al., 2013 FEBS J) という報告があり、議論されている。また (β) Fig. 2 の刈り込み酵素において、EDEM2 が中心的な役割を果たしていることが分かっていたが、その in vitro 活性は検出されておらず、その活性の検出をもって、モデルの確立に至るとされていた。

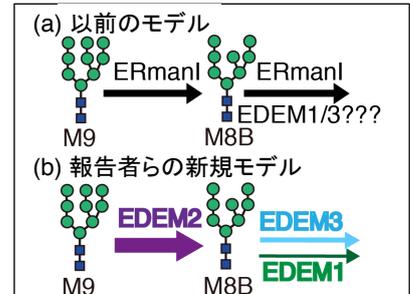


Fig. 2 小胞体の糖鎖切除モデル。以前のモデル (a) では、M9からは ERmanI が、M8Bからは、それに加えて EDEM1/3 も切除しているとされていた。ただし特に EDEM1 の酵素活性の有無は、長く議論されていた。報告者らの遺伝学的解析結果は、M9からは EDEM2 が、M8からは EDEM3/1 が切除していることを明確に支持する (b)。内在性 ERmanII は Golgi にあると報告され (Pan et al., 2011 MBoC)、小胞体での ERmanI の貢献は低い。

2. 研究の目的

課題 (α) の解決を行うため、内在性 OS9 と XTP3B の機能を解明する (Fig. 3)。これらの因子は Mannose 6-phosphate receptor homology domain (MRH) を持ち N 型糖鎖を認識することが示唆されているためこれを中心に解析する。また課題 (β) を解析するために、EDEM2 の酵素活性発揮する in vitro での条件を決定し、実際に EDEM2 の酵素活性を測定することを目的とする。

3. 研究の方法

OS9 と XTP3B の内在性遺伝子機能解析を行うために、Single KO 細胞、Double KO 細胞を作成し、解析を行う。手法としては、タンパク質の合成を止める薬剤シクロヘキシミドを用いるシクロヘキシミドチェイス法を用いる。また OS9 には一つしか MRH がないが、XTP3B には N 末端の MRH1 と C 末端の MRH2 の 2 つが存在するため、これらの機能を解析するためにその変異体を用いる。

また課題 (β) の解析を進めたいが、EDEM2 は、単独では酵素活性がない (Mast et al., 2005 Glycobiol) または微弱 (Shenkman et al., 2018 Commu Biol) ということが言われているため、EDEM2 が何かと複合体を形成し、酵素活性を発揮していることを想定している。その複合体形成のパートナー分子を同定し、EDEM2 と複合体を形成した状態で精製し、その in vitro 活性を測定する。

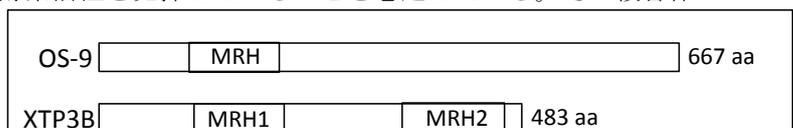


Fig-3. OS-9とXTP3Bの模式図

OS-9とXTP3Bは1次配列の相同性は、5%であるが、両者ともに糖鎖を認識するレクチンとして機能するMannose 6-phosphate receptor homology domain (MRH)を持つ。

4. 研究成果

(1). 小胞体関連分解因子、OS9、XTP3B の解析

内在性レベルの XTP3B、OS9 の機能を調べるために、XTP3B KO、OS9 KO、OS9/XTP3B Double KO において分解基質 ATF6 に関して、タンパク合成を止めるシクロヘキシミドで分解を見ると、XTP3B KO ではあまり WT と変わらなかったが、OS9 KO では、分解が少し遅延し、Double KO 細胞では、分解が大幅に抑制された。これは OS9 と XTP3B の機能が重複していることを示している。さらに 100 アミノ酸程度の分子量が小さい可溶性タンパク質 CD3 δ - Δ TM-HA についても分解曲線を DKO 細胞において調べると、下方にバンドが検出され、これが分解されず残ってきていた。これは、DKO 細胞では、糖鎖トリミングが進んだ分解基質が分解されていないことを意味する。OS9 と XTP3B が、糖鎖トリミングの進んだ基質の分解を促進していることがわかる。またこの下方のバンドの出現を利用して、XTP3B の MRH ドメインの解析を XTP3B に関して行なった。下方バンドが出現することは、そのバンドが示す分解基質が分解されず残っていることにつながる。XTP3B の全長型を入れ戻した際には、機能的な XTP3B が下方のバンド(糖鎖トリミングの進んだ分解基質)を分解へと導いているため、下方のバンドが消失した。MRH2 の変異体 XTP3B-R468A では、やはり下方のバンドが無くなったが、MRH1 の変異体である XTP3B-R207A 変異体では、XTP3B を入れ戻さない状態と同じであった。これは、XTP3B の MRH1 が基質分解に重要であることを意味している。現在、これらの結果をまとめるべく、解析を継続している。

(2). 小胞体におけるマンノーストリミング酵素 EDEM2 の in vitro マンノシダーゼ活性の解析

EDEM2 はなにかと複合体を形成し、その酵素活性を発揮することが考えられたので、EDEM2 を非還元状態において電気泳動すると、上方にバンドが確認された。還元状態ではそのバンドは確認されなかった。これは実際に EDEM2 がジスルフィド結合依存的に何かと複合体を形成していることを意味した。そして過去の論文から(Tim et al., 2016 Nat Communi)、EDEM family と結合するとされたチオレドキシシン様タンパク質の一つ TXNDC11 に着目し解析を行った。TXNDC11 の KO 細胞を作成すると、非還元 SDS-PAGE を行った際、EDEM2 の上方のバンドが消失した。これは EDEM2 が TXNDC11 とジスルフィド結合を介して結合していることを意味する。そして TXNDC11 の KO 細胞では、EDEM2 の細胞内酵素活性が消失していた。ここに TXNDC11 の全長を導入すると、EDEM2 の酵素活性が戻ったが、EDEM2 とジスルフィド結合できない TXNDC11-C692S 点変異体では、その活性は戻らなかった。これは細胞内において TXNDC11 が EDEM2 とジスルフィド結合形成することが EDEM2 の酵素活性発揮に重要であることを意味する。そこで当初の目的通り、EDEM2 と TXNDC11 の両者を精製し、遊離糖鎖 M9 と反応させると、M9 から M8 への変換が見られた。TXNDC11 とジスルフィド結合形成出来ない EDEM2-C558A 点変異体では、酵素活性はほぼ確認できなかった(Fig. 7)。これは EDEM2 において初めて in vitro での M9 から M8 への酵素活性の例となった。また酵母から高等動物の EDEM family においても、どの糖鎖からどの糖鎖へと変換が起

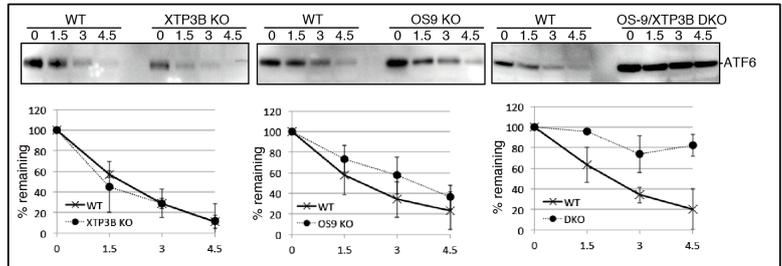


Fig 4. XTP3B KO, OS9 KO, OS9/XTP3BのDouble KO細胞における糖鎖依存分解基質ATF6の分解速度。

シクロヘキシミドによりタンパク合成をとめ、時間経過ごとのATF6の量を定量した。XTP3B KOでは分解に影響がなかったが、OS9 KOでは、分解が少し遅延した。Double KO細胞では、分解が大幅に遅延した。これはOS9とXTP3Bの機能が重複していることを示す。

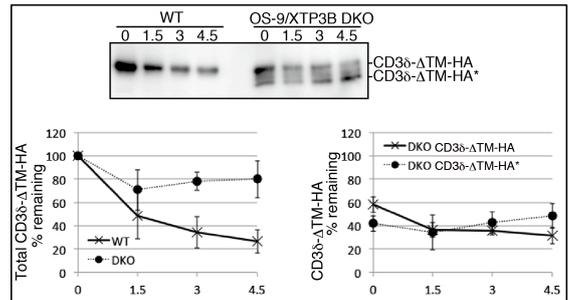


Fig 5. OS9/XTP3BのDouble KO細胞における糖鎖依存分解基質CD3 δ - Δ TM-HAの分解速度。

シクロヘキシミドによりタンパク合成をとめ、時間経過ごとのCD3 δ - Δ TM-HAを定量した。Double KO細胞では、糖鎖トリミングのよく進んだバンドが分解されず残ってきている。これはOS9とXTP3Bが糖鎖トリミングの進んだ基質を分解へと導くことを示す。

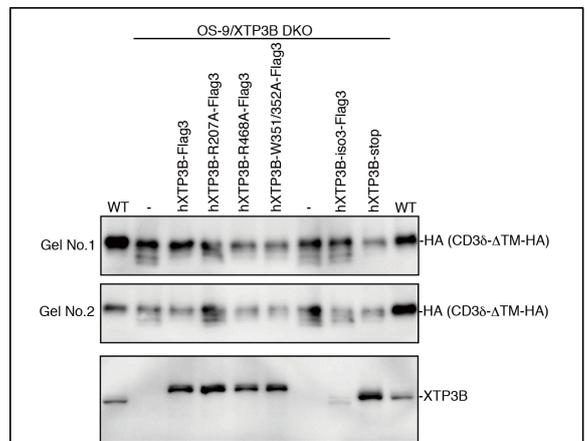


Fig 6. OS9/XTP3BのDouble KO細胞にXTP3BのMRH1の機能中心ドメインの変異体R207A、MRH2の変異体R468Aを戻し、どのドメインが重要か調べた。糖鎖のトリミングが進んだ分解基質のバンドはfull length、R468A変異体を戻すとなくなるが、R207A変異体では、あまり戻らなかった。MRH2よりもMRH1がトリミングの進んだ基質の分解に重要であると分かる。

いるか分かる世界初の研究となった(George*, Ninagawa* et al., 2020 eLife)。この EDEM2 の *in vitro* 酵素活性の解析により、報告者らが 2014 年に立てた小胞体のマンノーストリミングモデルが確立できてきたと考えている(Fig. 2)。その後の反響を待ちたい。

(3). 第二世代抗精神病薬オランザピン (商品名: ジプレキサ) は、統合失調症などの症状を効率的に抑え、2010 年には世界の薬のシェアの 14 位を誇り、現在でもよく使われている。ただしこのオランザピンの副作用として糖尿病を引き起こすことが分かっている。これまでは、オランザピン誘発性の糖尿病は、食欲亢進に伴う体重増加、それに続くインスリン抵抗性によって説明されてきた。しかし中には、肥満を伴わない非典型的な糖尿病も誘発されることが共同研究者である臨床医 長嶺先生らによって報告されていた。そこでその原因解明を分子生物学的な手法や生化学的手法によって行った。

糖尿病と密接に結びつく因子は膵臓から分泌される唯一の血糖降下ホルモンであるインスリンである。そこでオランザピンが直接膵β細胞に作用しインスリンに何か影響をあたえている可能性を考え検証した。非還元状態の SDS-PAGE により、オランザピンがインスリンの前駆体であるプロインスリンの適切な構造形成を妨げていることを明らかにした。さらにはその構造異常が引き起こされたプロインスリンが、小胞体関連分解によって分解されていることも分かった。これによりオランザピンが膵β細胞からのインスリン分泌を阻害することを明らかにした(Fig. 8)(Ninagawa et al., 2020 eLife)。この成果は、今後より適切なオランザピンの処方と服用につながると期待している。

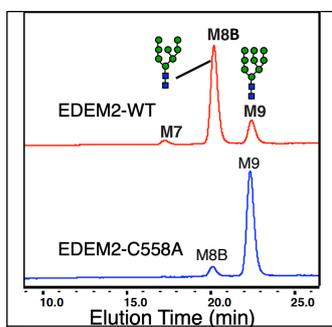


Fig. 7 TXNDC11と複合体を形成したEDEM2-WTを精製すると、M9→M8Bへの切除活性を検出することが出来た。

TXNDC11と-S-S-結合形成が出来ないEDEM2-C558A mutantでは*in vitro*活性は検出できなかった。

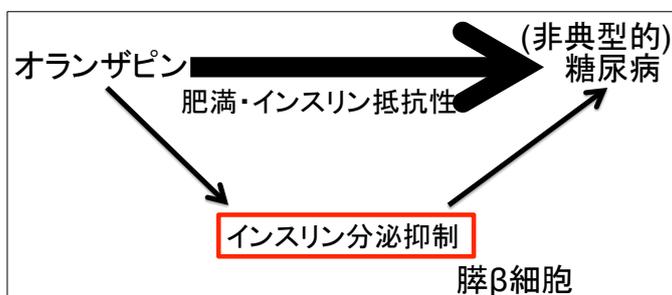


Fig. 8 第二世代抗精神病薬オランザピンは、従来は肥満やインスリン抵抗性を介して(非典型的)糖尿病を引き起こすとされてきた。本研究によってオランザピンが膵β細胞に直接作用し、(プロ)インスリンの構造異常を引き起こすことで、インスリンの分泌を抑制するという新たな経路を明らかにできた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 George Ginto, Ninagawa Satoshi, Yagi Hirokazu, Saito Taiki, Ishikawa Tokiro, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Imami Koshi, Ishihama Yasushi, Kato Koichi, Okada Tetsuya, Mori Kazutoshi	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 無
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 Ninagawa Satoshi, Tada Seiichiro, Okumura Masaki, Inoguchi Kenta, Kinoshita Misaki, Kanemura Shingo, Imami Koshi, Umezawa Hajime, Ishikawa Tokiro, Mackin Robert B, Torii Seiji, Ishihama Yasushi, Inaba Kenji, Anazawa Takayuki, Nagamine Takahiko, Mori Kazutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Antipsychotic olanzapine-induced misfolding of proinsulin in the endoplasmic reticulum accounts for atypical development of diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e60970
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.60970	査読の有無 無
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 Ninagawa Satoshi, George Ginto, Mori Kazutoshi	4. 巻 1865
2. 論文標題 Mechanisms of productive folding and endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins and non-glycoproteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129812 ~ 129812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2020.129812	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蜷川 暁、多田 誠一郎、井ノ口 健太、今見 考志、梅澤 元、石川 時郎、岡田 徹也、Mackin Robert、鳥居 征司、石濱 泰、穴澤 貴行、長嶺 敬彦、森 和俊
2. 発表標題 第二世代抗精神病薬オランザピンは、ジスルフィド結合の形成異常を起因としたプロインスリンの小胞体関連分解を誘発する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蜷川 暁、多田 誠一郎、奥村 正樹、井ノ口 健太、木下 岬、金村 進吾、今見 考志、梅澤 元、石川 時郎、Robert Mackin、鳥居 征司、石濱 泰、稲葉 謙次、穴澤 貴行、長嶺 敬彦、森 和俊
2. 発表標題 第二世代抗精神病薬オランザピンは、膵β細胞において、小胞体でのプロインスリンの構造形成阻害と、それに伴う分解を誘発し、非典型的な糖尿病を惹起する
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蜷川 暁
2. 発表標題 抗精神病薬オランザピンは、副作用としてプロインスリンのミスフォールディングとその分解を惹起する
3. 学会等名 第43回 分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蜷川 暁、Ginto George、矢木 宏和、斎藤 泰輝、住友 嘉樹、石川 時郎、佐久間 哲史、山本 卓、今見 考志、石濱 泰、加藤 晃一、岡田 徹也、森 和俊
2. 発表標題 EDEM2酵素活性発揮には、TXNDC11とのジスルフィド結合形成が必要である
3. 学会等名 第39回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蜷川 暁
2. 発表標題 遺伝子破壊法を用いた小胞体関連分解機構の解明
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蜷川暁、多田誠一郎、奥村正樹、井ノ口健太、木下岬、金村進吾、今見考志、梅沢元、石川時郎、岡田徹也、Robert Mackin、鳥居征司、石濱泰、稲葉謙次、穴澤貴行、長嶺敬彦、森和俊
2. 発表標題 抗精神病薬オランザピンによって、プロインスリンは分子間ジスルフィド結合を介した構造異常が誘発され、小胞体関連分解によって処理される
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蜷川 暁、Ginto George、矢木 宏和、住友 嘉樹、神谷 由紀子、石川 時郎、武田 俊一、佐久間 哲史、山本 卓、加藤 晃一、岡田 徹也、森 和俊
2. 発表標題 高等動物における N 型糖鎖トリミングを基軸とした小胞体関連分解機構 の解析
3. 学会等名 第38回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蜷川 暁、Ginto George、矢木 宏和、今見 考志、石濱 泰、石川 時郎、佐久間 哲史、山本 卓、武田 俊一、加藤 晃一、岡田 徹也、森 和俊
2. 発表標題 小胞体タンパク質品質管理機構の中心を担うN型糖鎖依存 / 非依存小胞体関連分解経路の分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Ninagawa, Tetsuya Okada, Koshi Imami, Hajime Umezawa, Tokiro Ishikawa, Seiji Torii, Robert B. Mackin, Yasushi Ishihama, Takahiko Nagamine and Kazutoshi Mori
2. 発表標題 第二世代抗精神病薬オランザピンがインスリン分泌不全を引き起こし、糖尿病を誘起する分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蜷川 暁、杉本 岳大、小野田 麻由、岡田 徹也、石川 時郎、佐久間 哲史、山本 卓、森 和俊
2. 発表標題 ヒト遺伝子破壊株を用いた小胞体関連分解レクチン因子OS-9、XTP3Bの機能解析
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Ninagawa, Tetsuya Okada, Imami Koshi, Hajime Umezawa, Tokiro Ishikawa, Seiji Torii, Robert B. Mackin, Yasushi Ishihama, Takahiko Nagamine and Kazutoshi Mori
2. 発表標題 The antipsychotic olanzapine targets proinsulin for endoplasmic reticulum-associated degradation in a pancreatic cell line
3. 学会等名 京都産業大学タンパク質動態研究所・新学術領域「新生鎖の生物学」合同国際シンポジウムProteins: From the Cradle to the Grave
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------