

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19306

研究課題名(和文)小胞体膜タンパク質の品質管理に関わる新規因子の遺伝学的探索と生化学的解析

研究課題名(英文)Genetic and biochemical analysis of the ER quality control of membrane proteins

研究代表者

中務 邦雄(Nakatsukasa, Kunio)

名古屋市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：90547522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体の構造異常タンパク質はサイトゾルのプロテアソームによって除去される。この分解系はendoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD)と呼ばれている。本研究では膜貫通の異常タンパク質に着目して、分解メカニズムを解析した。酵母の遺伝学的手法と生化学的手法を併用することで、(1)生体膜における膜タンパク質の安定性の実験的、理論的考察、(2)膜タンパク質分解の生理的意義の考察、(3)レトロトランスロコン複合体の変異解析を行った。その他、(4)哺乳類におけるERADについて共同研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞には立体構造の形成に失敗した異常タンパク質を特異的に認識して分解する品質管理の仕組みが備わっている。本研究では、小胞体の膜に存在する異常タンパク質に着目し、出芽酵母の遺伝学、生化学的手法を駆使して、分解の仕組みを詳細に解析した。本研究で得られた成果は、異常タンパク質の蓄積を防ぐ方法論の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Misfolded or unassembled proteins in the endoplasmic reticulum (ER) are degraded by the proteasome. This process is referred to as ER-associated degradation or ERAD. In this study, we analyzed the mechanisms of membrane protein degradation during ERAD: (1)Experimental and theoretical analysis to predict membrane protein insertion in yeast cells; (2)Physiological role of the ERAD of membrane proteins; (3)Genetic analysis of the retrotranslocation complex. (4)We also performed collaborative research to study ERAD in mammals.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：小胞体 膜タンパク質 ユビキチン プロテアソーム 分解

1. 研究開始当初の背景

小胞体に構造異常タンパク質が蓄積すると、UPR (Unfolded Protein Response) によって分子シャペロンの発現が誘導され、異常タンパク質の修復が行われる。修復できなかった異常タンパク質は細胞質へ送り返され、ユビキチン・プロテアソーム系によって分解される。この分解系は真核生物に広く保存されており、ERAD (ER-associated degradation) と呼ばれている。ERAD はヒトにおいては様々な病態と関連することから、分解経路の解析が精力的に進められている。ERAD における最重要の課題は、異常タンパク質を小胞体から細胞質へ輸送する「レトロトランスロケーション」と呼ばれる反応の機構である。これまでの研究から、小胞体内腔に存在する異常タンパク質は、小胞体膜の Hrd1 ユビキチンリガーゼ複合体を介して細胞質へ輸送されることが明らかにされつつある。一方、小胞体膜を貫通する膜タンパク質の分解経路の研究は遅れている (図 1)。細胞質側に露出したループがプロテアソームによって「裁断 (clipping)」される可能性、膜貫通ドメインが膜から細胞質へ「抽出 (extraction)」される可能性の両方が考えられる。しかし、「抽出」はエネルギー的に不利な反応であり、未知の因子の寄与が予想される。ユビキチン・プロテアソーム系を介した膜タンパク質の分解メカニズムの解明は、小胞体だけでなく全てのオルガネラに関連する一般的な課題である。

2. 研究の目的

申請者は、膜タンパク質がユビキチン化された後、細胞質へ抽出されることを初めて *in vitro* で証明し (Cell 2008) それを簡便にモニターできる分画アッセイ系を開発した (PLOS ONE 2016)。本研究では、これらのアッセイ系を使って、ERAD における膜タンパク質分解のメカニズムの解析を目的とした。

3. 研究の方法

出芽酵母の Ste6* は 12 回膜貫通ドメインをもつ ERAD のモデル基質で、小胞体のユビキチンリガーゼ Doa10 に依存してプロテアソーム分解される。申請者は、酵母の破碎液を遠心によって膜と細胞質に分離した。それぞれの画分から Ste6* を変性条件下で免疫沈降 (IP) した後、抗ユビキチン化抗体でウエスタンブロットリング (WB) を行った。その結果、細胞質に抽出されたユビキチン化 Ste6* の検出に成功した (PLOS ONE 2016)。ユビキチン化された膜タンパク質を細胞質に抽出する駆動力を生み出すと考えられる AAA-ATPase Cdc48/p97 の変異株において、同様のアッセイを行うと、確かに抽出に欠損が見られた。さらに、Cdc48 を小胞体膜にリクルートする Ubx2 の破壊株でも同様に欠損が見られた。以上の結果から、このアッセイ系が膜タンパク質抽出の評価系として使用できることが確認された。

本研究では、上述のアッセイ系に加え、酵母の遺伝学的手法と生化学的手法を併用することで、(1) 生体膜における膜タンパク質の安定性の実験的、理論的考察、(2) 膜タンパク質分解の生理的意義の考察、(3) レトロトランスロコン複合体の変異解析を行った。その他、(4) 哺乳類における ERAD について共同研究を行った。

4. 研究成果

(1) 生体膜における膜タンパク質の安定性の実験的、理論的考察

膜タンパク質のプロテアソーム分解において、膜貫通ドメインの安定性が分解にどのような影響を及ぼすか、系統的に調べられた例は少ない。そこで、人工キメラタンパク質を作製して解析を行った。このキメラタンパク質は 2 回の膜貫通ヘリックスをもち、サイトゾル側の C 末端には、Ste6* 由来の構造的に不安定なドメインが融合されている。このキメラタンパク質は ERAD に依存して分解されることが確認された。次に、2 つ目の膜貫通ヘリックスのアミノ酸を置換することで、小胞体膜における安定性を実験的・理論的に解析した。その結果、膜挿入エネルギーと細胞内での分解効率には強い相関がみられなかった。しかし分子動力学シミュレーションで予想された水素結合の数と分解効率には相関がみられた。膜貫通ドメインにおける変異、特に病態と関連する変異が、タンパク質の安定性にどのような影響を及ぼすか、さらなる解析が必要であると考えられた (Guerrero et al., 2019)。

(2) 膜タンパク質分解の生理的意義の考察

Pmr1 はゴルジ体の P-type ATPase であり、カルシウムとマンガンの輸送に関わっている。Pmr1 を欠損した酵母はキレート剤である EGTA に感受性を示す。本研究では、Pmr1 欠損株の EGTA 感受性が、ERAD の欠損によって部分的に回復することを見出した。この結果は、ERAD がゴルジ体におけるカルシウムとマンガンの恒常性維持に参与する可能性を示唆するものであった。ERAD の欠損が Pmr1 欠損株の EGTA 感受性を回復させるメカニズムは不明である。しかし、ERAD の生理基質として知られる Cdc1 の過剰発現が Pmr1 欠損株の EGTA 感受性を回復させることが知られている。Cdc1 は ERAD のネイティブな基質である可能性も報告されていることから、ERAD の欠損で蓄積した Cdc1 が Pmr1 欠損株の EGTA 感受性を回復させた可能性が考えられた (Nakatsukasa,

(3)レトロトランスロコン複合体の変異解析

ERADにおいて、小胞体のHrd1 ユビキチンリガーゼ複合体は、異常タンパク質の認識、ユビキチン化、レトロトランスロケーションにおいて、中心的な役割を担っている。特にHrd1の膜貫通ドメインは、基質の認識とレトロトランスロケーションに直接関与している。ERADのモデル基質の一つであるSec61-2は小胞体の順方向の膜透過装置Sec61の変異体である。Sec61-2は25では安定であり、細胞は増殖できる。しかし、Sec61-2は38でHrd1依存的に分解・除去されるため、細胞は致死となる。ところが、HRD1を欠損させると、Sec61-2は分解されず安定化するので、細胞は38でも増殖できるようになる。本研究ではこの特徴を利用して、Hrd1の膜貫通領域のうち、機能に必須なアミノ酸残基をスクリーニングした。その結果、Hrd1自身を不安定化させる残基、Hrd1複合体の形成に必要な残基が同定された。膜貫通領域におけるアロステリックな相互作用がHrd1複合体の形成を制御していることが示唆された(Nakatsukasa et al., 2022)。

(4)その他、国内研究者との共同研究

上記以外に、肝臓において摂食時に惹起される小胞体ストレスの役割(Sasako et al., 2019)、ミトコンドリアに誤局在したペルオキシソームタンパク質の分解機構(Matsumoto et al., 2019)、小胞体SELENOSタンパク質の分解におけるCu15 ユビキチンリガーゼの役割(Okumura et al., 2020)など、国内の研究者とERADに関して様々な共同研究を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kusama Kino, Suzuki Yuta, Kurita Ena, Kawarasaki Tomoyuki, Obara Keisuke, Okumura Fumihiko, Kamura Takumi, Nakatsukasa Kunio	4. 巻 25
2. 論文標題 Dot6/Tod6 degradation fine-tunes the repression of ribosome biogenesis under nutrient-limited conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103986 ~ 103986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.103986	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 Nakatsukasa Kunio, Wigge Sylvia, Takano Yuki, Kawarasaki Tomoyuki, Kamura Takumi, Brodsky Jeffrey L.	4. 巻 68
2. 論文標題 A positive genetic selection for transmembrane domain mutations in HRD1 underscores the importance of Hrd1 complex integrity during ERAD	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 227 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-022-01227-1	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 Nakatsukasa K.	4. 巻 22(3)
2. 論文標題 Potential Physiological Relevance of ERAD to the Biosynthesis of GPI-Anchored Proteins in Yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031061	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 Okumura F., Fujiki Y., Oki N., Osaki K., Nishikimi A., Fukui Y., Nakatsukasa K., and Kamura T.	4. 巻 23(3)
2. 論文標題 Cul5-type Ubiquitin Ligase KLHDC1 Contributes to the Elimination of Truncated SELENOS Produced by Failed UGA/Sec Decoding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100970	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 Guerriero C.J., Gomez Y.K., Daskivich G.J., Reutter K.R., Augustine A.A., Weiberth K.F., Nakatsukasa K., Grabe M., and *Brodsky J.L.	4. 巻 117
2. 論文標題 Harmonizing Experimental Data with Modeling to Predict Membrane Protein Insertion in Yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 668-678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.07.013.	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 該当する

1. 著者名 Matsumoto S., Nakatsukasa K., Kakuta C., Tamura Y., Esaki M., and *Endo T.	4. 巻 76
2. 論文標題 Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 191-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.07.006.	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 Sasako T., Ohsugi M., Kubota N., Itoh S., Okazaki Y., Terai A., Kubota T., Yamashita S., Nakatsukasa K., Kamura T., Iwayama K., Tokuyama K., Kiyonari H., Furuta Y., Shibahara J., Fukayama M., Enoku K., Okushin K., Tsutsumi T., Tateishi R., Tobe K., Asahara H., Koike K., *Kadowaki T. & *Ueki K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Hepatic Sdf211 controls feeding-induced ER stress and regulates metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08591-6	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10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 草間幾乃, 中務邦雄
2. 発表標題 A possible novel mechanism for the regulation of ribosome biogenesis under starvation conditions
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 川原崎智之, 中務邦雄
2. 発表標題 Maintenance of metabolic homeostasis by the proteasomal degradation of cytosolically mislocalized citrate synthase.
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 中務邦雄
2. 発表標題 細胞質に誤局在したクエン酸合成酵素の分解による代謝恒常性の維持
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 中務邦雄
2. 発表標題 栄養ストレス条件下におけるリボソーム生合成の調節機構
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 川原崎 智之2、森山 昭彦2、○中務 邦雄1
2. 発表標題 可溶性の代謝酵素の分解におけるAAA ATPase Cdc48/p97の役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ○松本 俊介1、角田 千香1、中務 邦雄2、田村 康3、江崎 雅俊4、遠藤 斗志也1
2. 発表標題 2つのAAA-ATPアーゼによるミトコンドリア外膜に誤局在したテイルアンカータンパク質の分解機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ○中務 邦雄
2. 発表標題 小胞体および小胞体から形成される膜系を舞台とした膜タンパク質の分解経路
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 Kunio Nakatsukasa
2. 発表標題 Regulation of metabolic pathways by the ubiquitin-proteasome system
3. 学会等名 International Symposium - Proteins: From the Cradle to the Grave (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~nakatsukasa/lab.html

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