

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06175

研究課題名(和文)小胞体ストレスにおける予防的品質管理の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of ER stress-induced preemptive quality control

研究代表者

門脇 寿枝(Kadowaki, Hisae)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40568200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレスに晒された細胞は、主に2つの戦略により恒常性を回復する。ひとつは、小胞体内の不良タンパク質の軽減のため、リフォールディングと小胞体関連分解(ERAD)が活性化される。他方は、翻訳抑制とmRNA分解である。しかし、これらは完全でなく、逃れて合成されたタンパク質の小胞体への移行は、更なる負荷となる。これを軽減する機構として、予防的品質管理(ERpQC)が働く。ERpQCは、小胞体タンパク質を細胞質で翻訳し、即座に分解する機構であり、本研究より、ERpQCの異常は小胞体に限らず、細胞質のタンパク質品質管理をも破綻させ、凝集タンパク質による様々な病態に関与する可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、小胞体ストレス時の翻訳では、シグナル配列を認識するSRPがトランスロコンと結合したDerlinにリクルートされることで、小胞体タンパク質の運命を小胞体内への輸送から細胞質での分解へと変えることを明らかとした。この運命決定機構の解明は、既知の小胞体への共翻訳輸送に加え、新たな生物学的事象の発見に繋がると期待される。ERpQCは新規合成の小胞体タンパク質の分解により、小胞体へのタンパク質輸送を制限し、ストレスから回復するシステムである。この分子機構を示した本研究は、全真核生物に共通する翻訳と共役した新たな分解機構を提示し、小胞体品質管理機構にも新規概念を提示する点で生物学的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Cells restore homeostasis by countering endoplasmic reticulum (ER) stress through two main strategies. One is the activation of refolding and ER-associated degradation (ERAD) to mitigate unfolded and misfolded proteins in the ER. The other is translational attenuation and mRNA degradation. However, these systems are not perfect and the translocation of escaped and synthesised proteins into the ER is a further burden. ER stress-induced preemptive quality control acts as a system to ameliorate this situation. ERpQC is a mechanism by which ER proteins are translated and immediately degraded in the cytosol. This study revealed that ERpQC dysfunction disrupts not only ER but also cytoplasmic protein quality control and may be involved in various pathological conditions caused by protein aggregation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス タンパク質分解 新規合成タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内新規合成タンパク質のうち、約 1/3 は適切な折畳みが行われず、翻訳後すぐにユビキチン・プロテアソームシステム (UPS) により分解されるとの報告がある (Schubert *Nature* 2000)。一方、翻訳途中のポリソームの約 8 割は、何らかの細胞小器官の脂質二重膜に結合し (Palade *Science* 1975)、全タンパク質の約 1/3 は小胞体を通るといわれている。特に、ブタ膵臓を用いた実験では 86% もの新規合成タンパク質が小胞体へ挿入されることが示されている (Jamieson *J. Cell Biol.* 1965)。これらの知見から、リボソームの多くは、小胞体膜上や近傍で翻訳を行い、そこで産生されるタンパク質の多くが、不良タンパク質として即座に分解されると推察される。従って、小胞体膜上での新規合成タンパク質の翻訳と共役した分解機構を解明することは、真核細胞の機能維持システムさらには、その破綻による病態分子メカニズムの解明に繋がると期待される。

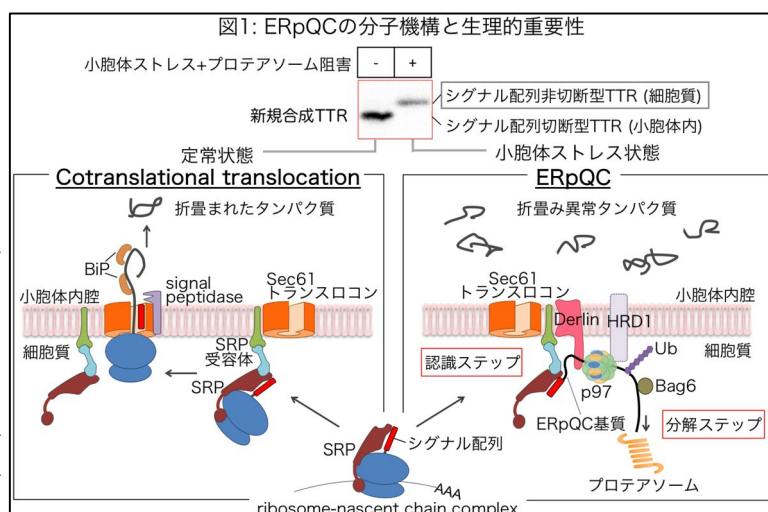
## 2. 研究の目的

小胞体ストレスに晒された細胞は、主に 2 つの戦略により小胞体ホメオスタシスを回復する。ひとつは、既に小胞体に挿入された不良タンパク質の軽減のため、小胞体シャペロンによるリフォールディングと小胞体関連分解 (ER-associated degradation: ERAD) が活性化される。他方は、小胞体が機能発揮できる許容範囲の維持のための、PERK を介した翻訳抑制と IRE1 を介した mRNA 分解である。しかし、この翻訳抑制および mRNA 分解は全てのタンパク質合成を低下させるには及ばず、実験的には細胞全体の約半分の新規合成が維持されたままである (Kang *Cell* 2006, Kadowaki 未発表、以下点線は申請者らの論文)。このことは、小胞体ストレス条件下での小胞体シャペロンや ERAD 分子を動員する必要性から合理的である。ただし、翻訳抑制や mRNA 分解を逃れた新規合成タンパク質のうち、小胞体品質管理に関与しない分泌タンパク質などの小胞体への移行は、小胞体に更なる負荷をかけることになる。これを軽減するシステムとして、小胞体の予防的品質管理 “ER stress-induced pre-emptive quality control (ERpQC)” が働く (図 1)。

申請者らは、これまで未解明であった ERpQC の分子機構と生理的重要性を世界に先駆けて明らかにしてきた。タンパク質合成の盛んなヒト肝癌由来 HepG2 細胞において、定常状態では Transthyretin (TTR) や 1-antitrypsin (1AT) などの分泌タンパク質は、小胞体内でフォールディングされ細胞外へと分泌される。しかし、過剰なタンパク質合成や小胞体ストレスにより、新規合成 TTR や 1AT は小胞体内腔に挿入されることなくシグナル配列非切断型のまま細胞質へ産生され、そのまま UPS で分解される (Kadowaki *Cell Rep.* 2015, Kadowaki 未発表, 図 1)。興味深いことに、BiP、PDI などの小胞体シャペロンの多くは、小胞体ストレス下でも翻訳され小胞体へと移行する。つまり、分泌タンパク質の小胞体挿入が選択的に阻害されることで、ストレス時の小胞体内でのフォールディング許容量を維持していると考えられる。このように ERpQC のメカニズムは、小胞体ストレス時に小胞体タンパク質の運命が翻訳時輸送 (cotranslational translocation) から分解経路へと変更されると考えられ、「認識ステップ」と「分解ステップ」に大別される (図 1)。

には小胞体膜タンパク質 Derlin が、には小胞体膜型 E3 リガーゼ HRD1 と細胞質のシャペロン補助因子 Bag6 と AAA-ATPase p97 が必要であることを報告した (Kadowaki *Cell Rep.* 2015, Kadowaki *Sci. Rep.* 2018, 図 1)。

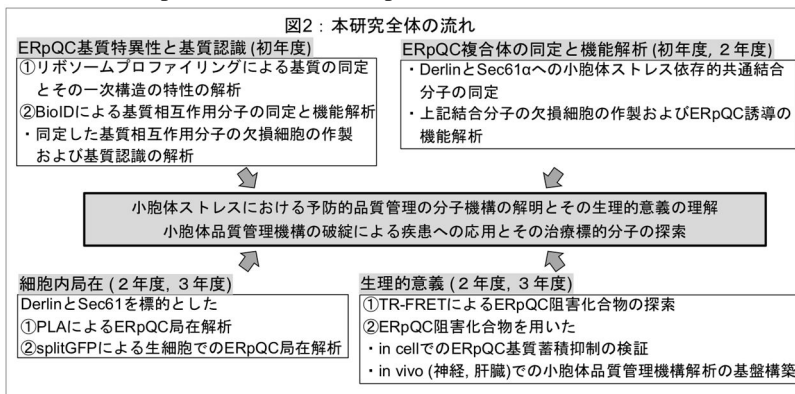
これらの知見を元に、本研究では小胞体ストレスにおける予防的品質管理の分子機構を更に明らかにすることで、リ



**ポソーム上の新規合成タンパク質が小胞体負荷軽減のため、小胞体内への輸送から細胞質での分解へと運命決定されるメカニズムを解明するとともに、ERpQCの生体内での重要性とその機能破綻による疾患の病態機構の解明を目指す。**

### 3. 研究の方法

現在までに、ERpQCの分子機構としては、小胞体膜上でSec61トランスロコンにリクルートされたDerlinを介し、小胞体内への輸送から細胞質での分解に運命変更された分泌タンパク質が、小胞体膜上でHRD1によってユビキチン化され、Bag6・p97によって細胞質のプロテアソームに運ばれて分解されることを報告した(図1)。しかし、依然としてERpQC基質特異性やDerlinの上流でribosome-nascent chain complex(RNC)上のERpQC基質を認識する因子については不明である。さらに、同じ小胞体膜上の分解システムであるERpQCとERADの違いや、生体内のどこで、いつ、ERpQCが働き、その機能破綻はどのような疾患と関連するかなど未解明な点が多く残されている。本研究は、下記項目に従って進める(図2に研究全体の流れを示す)。



#### ERpQC基質特異性と基質認識

**基質の同定** : ERpQC基質特異性の普遍性を見出すために網羅的に基質探索を行う。申請者らは小胞体ストレス時にDerlinがリボソームタンパク質と結合することを明らかとしている(夏目徹博士・産総研との共同研究)。そこでproximity-specific ribosome profilingの手法(Calvin *Science* 2014)により、小胞体ストレス時にDerlinに近接したリボソームを特異的に回収し、ERpQC誘導時に翻訳されたmRNAを解析することで基質を同定する(岩崎信太郎博士・理研との共同研究)。得られた基質の一次構造を基質でない小胞体シャペロンのもものと比較し特異性を明らかにする。

**基質相互作用分子の同定と機能解析** : 基質認識因子の特定のために基質相互作用分子を同定する。申請者らは既に、近位依存性ピオチン標識(BioID)を用い、ERpQC基質であるNHKに高活性ピオチンリガーゼ TurboIDを付加したNHK-Turboの安定発現細胞において、小胞体ストレス依存的にNHKと相互作用した分子を探索し(堂前直博士・理研との共同研究)リボソームやRNAに結合する分子を多数同定している(未発表)。これらの分子の基質認識への関与を知るため、各因子欠損細胞を作製しERpQCにおける必要性を検証する。

**ERpQC複合体の同定と機能解析** ERpQC複合体には、Derlin, HRD1, Sec61, SRPが含まれることを報告しており、特にSec61, SRPはERAD複合体では認められない。そこでDerlinとSec61に小胞体ストレス依存的に共通して結合する分子を質量分析により解析することで、ERpQC特異的因子を同定する。既に、Derlin結合分子については解析を終えている(夏目博士との共同研究, 未発表)。得られた分子の欠損細胞を作製し、ERpQC誘導の変化を観察する。

#### 細胞内局在

**PLAによるERpQC局在解析**: ERpQC基質分解は小胞体への挿入阻害が起点となることから、粗面小胞体上の現象と予想される。そこで基質(シグナル配列前にFlagを付加したTTR)の蓄積、およびDerlin, Sec61との共局在をproximity ligation assay(PLA)にて解析する。現在までにDerlin-1-FlagとSec61α-HA, Flag-TTRとDerlin-1-HAの近接可視化に成功しており、今後各遺伝子へのタグノックイン細胞において細胞内在性レベルで検証する。

**生細胞におけるERpQC局在解析**: PLAによる細胞内在性レベルでのERpQC局在を生細胞で時空間的に解析する。そのため、split GFPを用いてDerlinとSec61トランスロコンの分子間相互作用の変化を小胞体ストレス依存的に解析する。

## 生理的意義

**ERpQC阻害化合物の探索**：生理的意義解明のため、ERpQCのみを特異的に阻害する実験系が必要である。分解関連分子は、ERADと共通しているため、認識ステップを阻害する必要がある。そこで、Bag6やp97の欠損細胞において観察されるERpQC基質蓄積を阻害する化合物を探索する。既にFlag-TTR-HAを用いたタグ抗体のtime-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) 法によるスクリーニングの構築を開始している（一條秀憲博士・東大創薬との共同研究）。系確立後、スクリーニング（約23万化合物）を実施する。

**阻害化合物によるERpQCの生理的役割の解明**：スクリーニングで得られた化合物について、in cellでERpQC基質の選別阻害が可能か検証する。その後、確立済みの初代神経組織培養系（大脳皮質：Nishitoh *Genes Dev.* 2002, 脊髄：Nishitoh *Genes Dev.* 2008）ならびにマウス肝臓を用いて、ERpQC阻害効果を解析する。これによって得られる知見を将来実施するin vivo解析の研究基盤とする。

## 4. 研究成果

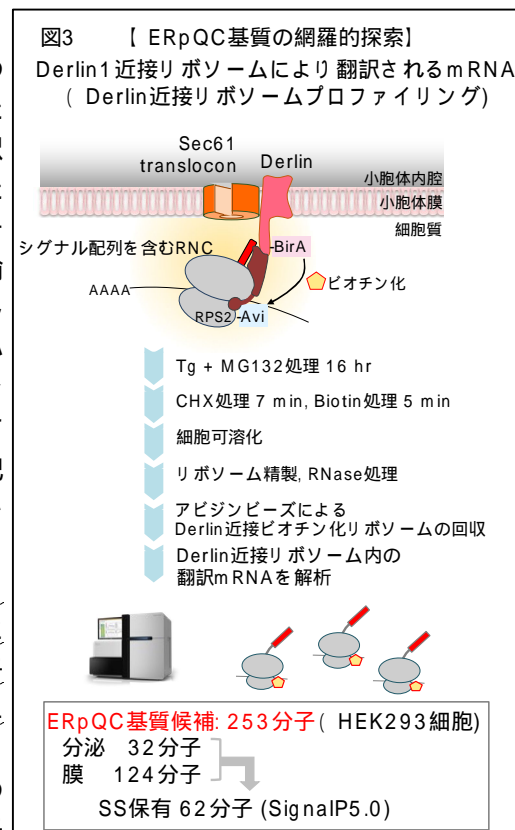
### ERpQC基質特異性と基質認識

**基質の同定**：proximity-specific ribosome profilingの手法により、小胞体ストレス時にDerlinに近接したリボソームを特異的に回収し、ERpQC誘導時に翻訳されたmRNAを解析することで基質の探索を行った（岩崎信太郎博士・理研との共同研究、図3上）。その結果、Derlinに近接するリボソームは小胞体に輸送される分泌や膜タンパク質などのmRNAを翻訳していた（図3下）。また、シグナル配列を持つ群と小胞体残留シグナル配列（品質管理に重要な小胞体シャペロンなどにあるKDEL配列）を持つ群に分けて解析した結果、Derlin近接リボソームはシグナル配列を持つ群、すなわち分泌タンパクなどのmRNAをより優先的に翻訳していた（未発表）。以上の結果は、小胞体ストレス時に、小胞体内へ翻訳時輸送される分子群（小胞体品質管理に必要な分子）と、ERpQCによりDerlinを介して細胞質で翻訳時分解される分子群（主に分泌・膜タンパク質など）が、何らかのメカニズムで選別されていることを予想させる。

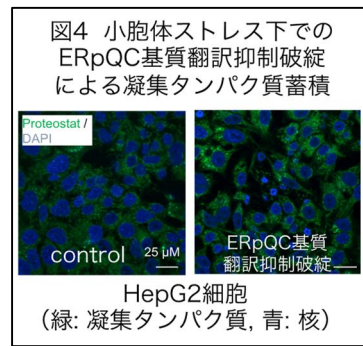
**基質認識分子の同定と機能解析**：基質認識因子の特定のために、研究開始当初は、基質相互作用分子の同定を予定していたが、基質の認識は、Derlinの細胞質領域にSRPが結合する前の翻訳初期に行われる可能性が高い。そこで、ERpQC基質タンパク質合成中のリボソーム新生鎖複合体（RNC）に結合する分子を基質認識因子として探索することを試みた。手法としては、ERpQCモデル基質であるNHKのシグナル配列前のN末端にFlagタグを付加したものを細胞に発現させ、シクロヘキシミド処理によりmRNA上で翻訳中のリボソームを固定化後に可溶化した。続いて、リボソーム精製により、モノソーム画分を回収し、抗Flag抗体にて免疫沈降ならびにWBを行った結果、合成途中のFlagタグを有すERpQC基質の検出まで至った。今後、ERpQC基質でないものをコントロールとして細胞に発現させ、ERpQC基質特異的にRNCに結合する分子を質量分析により同定する。

### ERpQC複合体の同定と機能解析

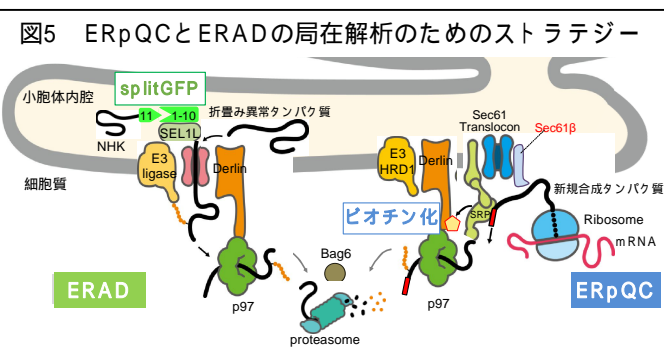
ERAD複合体とERpQC複合体では、Derlin, HRD1, p97, Bag6など共通する分子が多く見られるが、ERpQC複合体では、小胞体ストレス依存的にDerlinとSRPならびにSec61の結合が認められる。小胞体ストレス誘導性Derlin結合分子を質量分析により解析した結果、翻訳関連分子が多数同定された（夏目博士との共同研究、未発表）。すなわち、小胞体ストレス時には、Derlinに



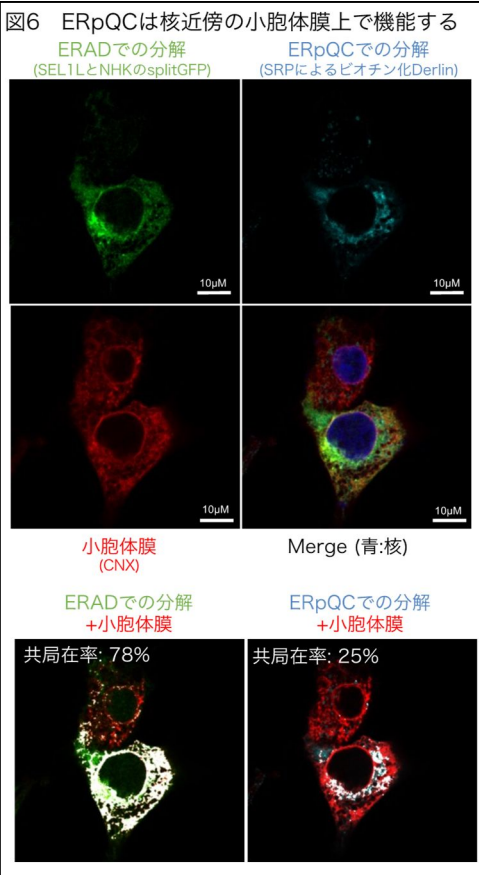
より小胞体から細胞質へと輸送先を変更した分泌タンパク質が、Derlin 上で翻訳され、即時分解されていると考えられる。さらなる解析結果より、ERpQC では、Derlin にリクルートされた翻訳関連分子により ERpQC 基質のみ特異的に翻訳抑制が行われることが分かった。興味深いことに、この翻訳抑制が機能しないと、ERpQC 基質が過剰に細胞質で合成され、プロテアソーム活性に負荷がかかり、細胞質タンパク質の品質維持が破綻して凝集タンパク質が蓄積することが明らかとなった（投稿準備中、図4）。



細胞内局在 ERpQC と ERAD の局在を同一細胞内で比較するために、研究開始当初の計画を変更し、Biotin Avi Tag システムによる近接依存性標識と splitGFP の手法を用いた（図5）。具体的には、ERAD 基質でもある NHK の C 末端に GFP11、ERAD 複合体の構成因子 SEL1L の小胞体内腔側の N 末端に



GFP1-10 を融合し、NHK と SEL1L の結合により形成される全長 GFP を ERAD の局在とした（図5左）。ERpQC の局在可視化のためには、Derlin の細胞質領域 C 末端にピオチン化酵素により認識される Avi Tag、Derlin の C 末端に結合する SRP の N 末端にピオチン化酵素 BirA を融合した。BirA-SRP の近接によりピオチン化された Derlin-Avi は、細胞固定後ストレプトアビジンによる染色で検出可能であり、ERpQC の局在とした（図5右）。両者を、同一細胞内で観察した結果、小胞体膜において、ERpQC は ERAD と比較して、より核近傍の小胞体膜上に局在している傾向が強かった（図6、未発表）。これは、ERpQC が核周辺の限られた小胞体膜上でのみ誘導される品質管理機構である可能性を示唆する。



### 生理的意義

ERpQC阻害化合物の探索：生理的意義解明のため、ERpQCのみを特異的に阻害する実験系として、研究開始当初は、ERAD, ERpQC両者に関連する分子Bag6, p97の欠損細胞において観察されるERpQC基質蓄積を阻害する化合物の探索を予定していた。しかし、研究過程において、Derlinの細胞質領域欠失変異体ではSRPが結合できずに、ERpQC誘導が認められないことが明らかとなったことから、DerlinとSRPの結合阻害により、ERpQC阻害化合物の探索を試みている。

個体における ERpQC の生理的役割の解明：ERpQC 阻害化合物を未取得のため、予定を変更し、研究過程で明らかとなった ERpQC 基質の翻訳抑制機構について個体レベルでの検討を行った。その結果、ERpQC の翻訳抑制を阻害すると、個体レベルでの運動機能に異常があることが分かってきた（投稿準備中）。今後は、ERpQC の制御が個体の運動機能維持に重要な生理的状況を明らかにするため、小胞体に負荷をかけた個体や、老化した個体での ERpQC の翻訳制御と運動機能について解析を進め、ERpQC の生理的意義について理解を深めたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugiyama T, Murao N, Kadowaki H, Nishitoh H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Chemical chaperones ameliorate neurodegenerative disorders in Derlin-1-deficient mice via improvement of cholesterol biosynthesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific reports	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） 10.1038/s41598-022-26370-0	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 Sugiyama T, Murao N, Kadowaki H, Takao K, Miyakawa T, Matsushita Y, Katagiri T, Futatsugi A, Shinmyo Y, Kawasaki H, Sakai J, Shiomi K, Nakazato M, Takeda K, Mikoshiba K, Ploegh HL, Ichijo H, Nishitoh H	4. 巻 24
2. 論文標題 ERAD components Derlin-1 and Derlin-2 are essential for postnatal brain development and motor function.	5. 発行年 2021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.2021.102758	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 門脇寿枝, 西頭英起	4. 巻 94
2. 論文標題 褐色脂肪組織における小胞体-ミトコンドリア間クロストークシグナルを介した熱産生	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 97-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940097	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10件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体ストレス応答における翻訳時分解を介したタンパク質品質維持機構
3. 学会等名 令和5年度日本生化学会 九州支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 門脇寿枝、西頭英起
2. 発表標題 小胞体ストレス応答における翻訳時分解を介したプロテオスタシス制御
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 門脇寿枝
2. 発表標題 小胞体ストレス依存的な翻訳時分解を介したプロテオスタシス制御機構
3. 学会等名 第17回日本臨床ストレス応答学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 門脇寿枝
2. 発表標題 小胞体膜上でのストレス依存的な翻訳時分解の分子機構
3. 学会等名 第16回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 門脇寿枝
2. 発表標題 小胞体膜上でのストレス依存的な翻訳時分解の制御機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体膜上での翻訳分解の制御機構
3. 学会等名 第15回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の翻訳制御機構
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体の予防的品質管理における新生タンパク質の翻訳制御
3. 学会等名 第15回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体膜上での翻訳時分解の制御機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 門脇寿枝
2. 発表標題 小胞体膜上でのタンパク質分解ゾーンの解明
3. 学会等名 新学術領域 第4回オルガネラゾーン若手の会
4. 発表年 2022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