

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870312

研究課題名(和文)小胞体E3ユビキチンリガーゼ複合体の動態解析

研究課題名(英文) Analysis of a dynamic behavior of the E3 ubiquitin ligase in the endoplasmic reticulum

研究代表者

中務 邦雄 (Nakatsukasa, Kunio)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90547522

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)：レトロトランスロケーションを駆動するサイトゾルのAAA-ATPase Cdc48/p97の機能が低減すると、Hrd1が26Sプロテアソーム、ユビキチン化基質、Hrd3などを含む、レトロトランスロケーション中間体を形成することを報告した(Mol. Biol. Cell 2013)。Hrd3の光架橋実験では、Hrd3と架橋されるタンパク質が部位特異的に複数個見られたが、Hrd1と同定するには至らなかった。現在実験系をスケールアップしてHrd1の検出を試みている。またHrd3の膜貫通領域がストレス条件下において重要な働きを果たすという仮説のもと、研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：Inactivation of Cdc48p/p97 stalled retrotranslocation and triggered formation of a complex that contains the 26S proteasome, Cdc48p/p97, ubiquitinated substrates, select components of the Hrd1 complex, and the luminal recognition factor, Yos9p. We proposed that the actions of Cdc48p/p97 and the proteasome are tightly coupled during ERAD. Our data also support a model in which the Hrd1 complex links substrate recognition and degradation on opposite sides of the ER membrane. Based on these results, we performed in vivo site-specific crosslinking experiments. Non-natural photo-reactive amino acids were incorporated into Hrd3 in yeast to detect cross-linked Hrd1. Although we could detect some cross-linked products with Hrd3, it is currently unclear if these are Hrd1-Hrd3 crosslinked products. We are now trying to scale up the system to better detect Hrd1. In addition, we are analyzing a role of the transmembrane domain of Hrd3 especially under the stress conditions.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：小胞体 タンパク質 品質管理機構 ユビキチン 分解

## 1. 研究開始当初の背景

分泌タンパク質および細胞膜タンパク質は、小胞体で高次構造を形成する。しかし小胞体には高次構造を形成して「成熟したタンパク質」だけでなく、高次構造を形成する途中の「未熟なタンパク質」、さらには、高次構造の形成に失敗した「異常タンパク質」が共存している。小胞体は恒常性を維持するために、異常タンパク質だけを特異的に認識して、サイトゾルへ送り返し、ユビキチン・プロテアソームシステムによって除去する仕組みを備えている。この分解系は ERAD (ER-associated degradation) と呼ばれており、酵母から高等動物までよく保存されている (Nakatsukasa and Brodsky, *Traffic* 2008 総説)。品質管理機構および ERAD が破綻すると、異常タンパク質が小胞体に蓄積して、リウマチや神経変性疾患など、様々な病態の引き金になることが知られている。また、ERAD の系はウイルスに依存した MHC class I の分解やトキシンの分解にも関わっている。

ERAD の経路の解析は出芽酵母で特に進んでいる。基質の構造異常部位がサイトゾル側にある膜タンパク質は、ERAD-C 経路を通り、Doa10 E3 リガーゼによってユビキチン化を受ける (Nakatsukasa et al., 2008 *Cell; Methods in Mol. Biol.* 2010)。一方、構造異常部位が膜貫通領域にある膜タンパク質は ERAD-M、小胞体内腔の異常タンパク質は ERAD-L 経路を通り、どちらも Hrd1 E3 リガーゼによってユビキチン化を受ける。

ERAD-L 経路において、基質は小胞体内腔で認識される。認識を担うのは Hrd1 と結合している 1 回膜貫通タンパク質 Hrd3、および Hrd3 とサブコンプレックスを形成している Yos9 (レクチン様タンパク質)、Hsp70 (BiP) などである。しかし Hrd1 E3 リガーゼの RING ドメイン、E2 酵素、およびプロテアソームは全てサイトゾル側にある。すなわち、内腔で認識された基質はサイトゾルへ逆行輸送 (レトロトランスロケーション) されなければならない。一般的にタンパク質の膜透過反応には、タンパク質を通す“孔”が存在する。レトロトランスロケーションを促進する孔の候補として Derlin family、Sec61、Hrd1 など過去 10 年以上にわたり多くの候補が挙げられてきたが、現在もそれぞれの候補を支持する論文が未だ報告されている。

ごく最近、光架橋性の非天然アミノ酸を利用した *in vivo* 部位特異的光架橋反応法によって、Hrd1 は基質と直接的に相互作用することが示された (Tom Rapoport ら)。Hrd1 は基質と直接的に相互作用することが示された初めてのコンポーネントであり、この結果から Hrd1 の 6 回膜貫通領域が孔を形成すると見るむきもあるが、未だ決定的な証拠とはいえず、さらなる解析が必要である。

我々はレトロトランスロケーションを駆動するサイトゾルの AAA-ATPase Cdc48/p97 の機能が低減すると、Hrd1 が 26S プロテアソ

ーム、ユビキチン化基質、Hrd3、Yos9 などを含む、巨大なレトロトランスロケーション中間体を形成することを見出した。この結果は、小胞体内腔における基質の認識と、サイトゾルにおけるプロテアソームによる分解が、Hrd1 そのものによって物理的にリンクされていることを示す。すなわち、Hrd1 がレトロトランスロケーションを促進する因子であることを強く示唆している。しかしながら、基質が Hrd3-Yos9-Hsp70 の基質認識サブコンプレックスから Hrd1 へどのように受け渡されるのか、それに伴って Hrd1-Hrd3 がどのような相互作用変化を起こしうるのかなど、Hrd1 複合体が基質を内腔からサイトゾルのプロテアソームへ移行させる具体的なメカニズムは全く明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

我々の長期的な目標は、レトロトランスロケーションにおける“孔”の確定、素過程 (基質受け渡し機構) の解析、ERAD の制御機構の解明である。本研究では、いま最も有力な孔の候補である Hrd1、および Hrd1 と結合している基質認識サブユニット Hrd3 に着目して、Hrd1-Hrd3 の直接的な相互作用に必要なアミノ酸を、*in vivo* 部位特異的光架橋反応法によって同定することを目的とした。さらに、基質のフラックスを変化させて、Hrd1-Hrd3 の相互作用状態の変化を追跡する。因子間の相互作用ダイナミクスをアミノ酸レベルで解析する手法を確立することによって、レトロトランスロケーションにおける Hrd1 複合体の構造変化、基質の膜透過機構の解明につながる研究を目指した。

## 3. 研究の方法

### Hrd1-Hrd3 相互作用を検出する *in vivo* 部位特異的光架橋反応法の確立

既報の先行研究から、レトロトランスロケーションにおいて、Hrd3 から Hrd1 へ基質が受け渡された後、サイトゾルへ輸送されると考えられている。しかし受け渡しに伴う Hrd1-Hrd3 相互作用のダイナミックな変化は全く解析されていない。我々は、Cdc48/p97 変異によってレトロトランスロケーションを停止させると、Hrd1 と Hrd3 の結合が強くなることを免疫沈降実験によって初めて示した。Hrd3 は C 末端側近傍に 1 回膜貫通領域をもつ。申請者は変異解析によって、Hrd3 の 690 番目アミノ酸周辺が Hrd1 との相互作用に必要であることを明らかにした。二次構造予測プログラムから、この領域は  $\alpha$  ヘリックスを形成していると予測された。一方ランダム変異導入によって、Hrd1 の 6 回の膜貫通領域のうち 1, 2 番目が Hrd3 との相互作用に必要であることも明らかにした。すなわち、これらの領域は Hrd1-Hrd3 の直接的な結合に関与している可能性が高い。そこで平成 25 年度前半は、Hrd1 と Hrd3 の予想結合領域に非天然の光架橋性アミノ酸を導入して、

Hrd1-Hrd3 の直接的な相互作用の検出を試みた。in vivo 部位特異的光架橋反応法は大腸菌膜透過装置の解析、ミトコンドリアの膜透過装置の解析などで実用化されている。ハーバード大学の Tom Rapoport らは、ERAD のモデル基質に光架橋性アミノ酸を導入して、Hrd1 複合体との相互作用を解析した(研究の学術的背景参照)しかし、ERAD における因子間の相互作用の解析に本手法を適用するのは、本研究が初めてである。

具体的には、光架橋性アミノ酸を導入するアミノ酸残基のコードンを、アンバー終始コドン(TAG)に置換して、この変異コンストラクトをアンバーサプレッサー-tRNA(アンバーコードンに対するアンチコードンをもつ)とともに酵母で発現させた。培地に光架橋性側鎖をもつパラベンゾイルフェニルアラニン(BPA)を加えると、アンバーコードンの位置に BPA が導入される。細胞に UV を照射して架橋反応を行った後、BPA を導入したタンパク質を変性条件下で免疫沈降した。例えば Hrd3 に BPA を導入した場合は、架橋されて共沈した Hrd1 を抗 Hrd1 抗体によるウエスタンブロットングで検出した。同様に、Hrd1 の 1, 2 番目の膜貫通領域にも BPA を導入して、UV 照射、免疫沈降を経て、架橋された Hrd3 を抗 Hrd3 抗体によって検出した。

本実験で起こりうるトラブルと解決方法は以下のように計画した。

(1) 先行研究および予備実験から、BPA の導入効率は 10%前後(部位によっては数%)と予想される。生理条件に近い量の BPA 導入タンパク質を得るには、あらかじめ過剰発現させる必要がある。過剰発現の方法を検討した結果、Hrd3 を自身のプロモーターからマルチコピープラスミド発現させると、ほぼ内在性に近い量の BPA 導入 Hrd3 が得られることがわかりつつある。

(2) 部位によって BPA の導入効率は異なることが予想される。BPA が導入されたタンパク質量をもとに架橋産物量を見積もるため、ウエスタンブロットングの定量は厳密に行う必要がある。そこで化学発光ではなく蛍光標識二次抗体などを用いて定量性を確保する。

(3) 部位によっては BPA の導入がタンパク質の機能を損なう可能性もある。ただし Hrd3 は Hrd1 を安定化させることが知られており、もし Hrd3 が機能を失うと Hrd1 の発現量が著しく現象する。これを指標に、BPA 導入 Hrd3 の機能も見積もることができる。

(4) 架橋が全く観察されない場合は、予想とは異なる他の領域で Hrd1 と Hrd3 が相互作用している可能性を探るため、BPA を導入するアミノ酸領域を拡大する。Hrd1 および Hrd3 の全領域について 10-20 アミノ酸ごとに BPA を導入し、光架橋によって相互作用する部位を絞り込む。

以上の方法によって、Hrd1 と Hrd3 が直接相互作用するアミノ酸部位のマッピングを

行う。

基質の流入に伴う Hrd1-Hrd3 相互作用の変化の解析

Hrd1 複合体への基質の流入を阻止した条件下、または基質を停滞させた条件下で、Hrd1-Hrd3 相互作用マップの変化を調べる。基質の流入の阻止は、Hrd3 と結合している基質認識因子 Yos9 および Hsp70 などの変異体を用いる。Yos9 を欠損させると少なくとも基質は Hrd1 へ流れ込まなくなると考えられている。Hsp70 を欠損させると、基質は小胞体内腔で凝集する。一方、基質の滞留は Cdc48/p97 変異、およびプロテアソームの変異を利用する。これらの条件下で、Hrd1 と Hrd3 が直接相互作用するアミノ酸部位の変化、あるいは相互作用強度の変化を調べる。特に先述の通り、Cdc48/p97 変異によってレトロトランスロケーションを停止させると、Hrd1 と Hrd3 の結合が強くなることを既に免疫沈降実験によって示しているため、相互作用するアミノ酸部位、相互作用強度に変化があることが期待される。

本手法において、例えば Hrd3 に BPA を導入して免疫沈降した場合、抗 Hrd3 抗体でウエスタンブロットングを行うと、Hrd1 以外の因子が架橋されたバンドが観察される可能性も充分にある。平成 24 年度までの研究から、Hrd1 複合体を構成する因子の抗体は全て揃えてあるので、架橋産物の同定を試みる。新奇因子である場合は、架橋反応をスケールアップして質量分析による同定を行う。当該因子の ERAD への関与は、破壊株におけるモデル基質の分解アッセイ、Hrd1 複合体との相互作用などを指標に調べる。

#### 4. 研究成果

我々はレトロトランスロケーションを駆動するサイトゾルの AAA-ATPase Cdc48/p97 の機能が低減すると、Hrd1 が 26S プロテアソーム、ユビキチン化基質、Hrd3、Yos9 などを含む、巨大なレトロトランスロケーション中間体を形成することを見出していた。この研究は本申請課題を進める上で土台となる研究だったので、本研究期間の前半はこの論文発表に集中した。最終的に Molecular Biology of the Cell 誌に受理された(A stalled retrotranslocation complex reveals physical linkage between substrate recognition and proteasomal degradation during ER-associated degradation: Nakatsukasa et al., Mol. Biol. Cell 2013)。

次に我々は研究の方法に記した通り、酵母細胞内で Hrd3 に光架橋性アミノ酸を導入して、Hrd1 との結合の検出を試みた。Hrd3 と架橋されるタンパク質が部位特異的に複数個見られたが、Hrd1 と同定するには至らなかった。現在免疫沈降の系をスケールアップして Hrd1 の検出を試みている。また我々は、変異解析によって、Hrd3 の 690 番目アミノ酸

周辺が Hrd1 との相互作用に必要であることを明らかにしていた。Hrd3 の C 末端にある膜貫通領域(690 番目アミノ酸以降 C 末端側)を欠損しても ERAD に欠損は見られないことが知られている。現在この膜貫通領域がストレス条件下において重要な働きを果たすという仮説のもと、研究を進めている。本研究を足がかりに、レトロトランスロケーションにおける Hrd1 複合体の構造変化、基質の膜透過機構についてさらに解析を進めていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Nakatsukasa, K., Brodsky, J.L., and Kamura, T. (2013). A stalled retrotranslocation complex reveals physical linkage between substrate recognition and proteasomal degradation during ER-associated degradation. *Molecular biology of the cell* 24, 1765-1775, S1761-1768.

Okumura, F., Okumura, A., Nakatsukasa, K., and Kamura, T. (2013). [Regulation of cellular functions by Elongin BC based E3 ubiquitin ligase]. *Seikagaku*. The Journal of Japanese Biochemical Society 85, 76-88.

Nakatsukasa, K., Kamura, T., and Brodsky, J.L. (2014). Recent technical developments in the study of ER-associated degradation. *Current opinion in cell biology* 29, 82-91.

Nakatsukasa, K., Kanada, A., Matsuzaki, M., Byrne, S.D., Okumura, F., and Kamura, T. (2014). The nutrient stress-induced small GTPase Rab5 contributes to the activation of vesicle trafficking and vacuolar activity. *The Journal of biological chemistry* 289, 20970-20978.

〔学会発表〕(計 3 件)

Nakatsukasa K.

細胞小器官におけるタンパク質分解系 東北大学大学院薬学研究科 2013年度 学外非常勤講師(稲田利文教授招聘)

Nakatsukasa K., Nishimura T., and Kamura T. 複合体型 SCF<sup>Y1r224w</sup> E3 リガーゼの新奇基質 p40 の同定 2013 年度 第 86 回日本生化学会大会

Nakatsukasa K., Kamura T.

Subcellular fractionation analysis of the ubiquitinated polytopic substrates during ER-associated degradation 2013 年度 American Society for Cell Biology フィラデルフィア

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中務 邦雄 (NAKATSUKASA, Kunio)

研究者番号：9 0 5 4 7 5 2 2

(2) 研究分担者  
なし

研究者番号：

(3) 連携研究者  
なし

研究者番号：