

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440096

研究課題名(和文)小胞体におけるタンパク質品質管理機構の研究

研究課題名(英文)Study on the protein quality control mechanism in the endoplasmic reticulum

研究代表者

細川 暢子 (Hosokawa, Nobuko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：00263153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内でタンパク質が機能するためには、正しい高次構造を形成する必要がある。正しい高次構造形成に失敗したミスフォールドタンパク質は細胞内で分解されるが、しばしば細胞内で凝集体を形成するなど細胞機能を障害し、場合によっては疾病の原因となることがある。本研究では、正しい高次構造をもつタンパク質を作り出す仕組みである「タンパク質の品質管理機構」についての解析を行った。小胞体内でのタンパク質凝集を抑制するタンパク質や、小胞体でミスフォールドしたタンパク質の分解に関わる酵素や複合体の作用機構を分子レベルで解析した。

研究成果の概要(英文)：Newly synthesized proteins obtain its native conformations by the assistance of chaperone proteins and folding enzymes, while polypeptides that failed to fold correctly are disposed by the intracellular degradation machinery. This mechanism is named as protein quality control. Misfolded proteins are prone to aggregate, and accumulation of these abnormal species frequently impairs cellular function, causing conformational diseases. In the present study, we analyzed the molecular mechanisms of protein quality control system in mammalian endoplasmic reticulum (ER), focusing on the proteins that inhibit aggregation formation in the ER, and the membrane complex in the ER that plays the central role in ER-associated protein degradation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 タンパク質品質管理 シャペロンタンパク質 タンパク質分解 小胞体関連分解 動物細胞

1. 研究開始当初の背景

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質生合成の場であり、正しく折りたたまれたタンパク質のみを分泌経路へ送り出すという品質管理機構を備えている (Hartl *et al.*, 2011, Nature)。折りたたみに失敗したタンパク質は小胞体から細胞質に逆行輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される。この分解機構は小胞体関連分解 (ERAD: ER-associated degradation) と呼ばれている (Smith *et al.*, 2011, Science; Brodsky, 2012, Cell)。

小胞体で生合成されるタンパク質の多くは糖鎖修飾を受けており、ペプチド部分を認識するシャペロンタンパク質とともに、糖鎖をトリミングする酵素や糖鎖構造を認識するレクチンが、糖タンパク質のフォールディングや分解に重要な働きをする (Hebert & Molinari, 2012, TiBS)。申請者らはタンパク質品質管理に重要なレクチン様分 EDEM (ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein) (Hosokawa *et al.*, 2001, EMBO Rep; Oda *et al.*, 2003 Science; Hosokawa *et al.*, 2010 Glycobiology) や、分解基質の糖鎖を認識する新規小胞体レクチン OS-9、XTP3-B をクローニングして機能解析を行い (Hosokawa *et al.*, 2009, JBC; Fujimori *et al.*, 2013, FEBS J)、分解のシグナルとなる糖鎖構造の決定ならびにタンパク質品質管理機構の解明を進めてきた。

小胞体ストレス応答は、小胞体内にミスフォールドしたタンパク質が蓄積することによって引き起こされる細胞応答で (Walter & Ron, 2011, Science)、小胞体タンパク質品質管理に関わる分子は、上述のレクチン様分子 EDEM や小胞体レクチン OS9 を含めて、小胞体ストレス応答によってその発現が誘導されてくるものが多い。申請者らは小胞体ストレスで誘導されてくる遺伝子のスクリーニングを行い、このような遺伝子産物のうち、未だ機能が明らかにされていないタンパク質の解析も進めている (Nagasawa *et al.*, 2007, EMBO Rep)。さらに哺乳類における小胞体膜上のユビキチンリガーゼ複合体の解析を行い、小胞体から細胞質への逆行輸送

機構の解析も進めている (Iida *et al.*, 2011, JBC)。本研究では、これらの研究を進展させて、小胞体タンパク質品質管理機構の解明をめざす。

2. 研究の目的

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質を生合成する細胞内小器官である。小胞体では正しい高次構造を形成したタンパク質のみを分泌し、高次構造形成に失敗した異常タンパク質は分泌せずに小胞体にとどめておき細胞内で分解するという、タンパク質品質管理機構が働いている。本研究では、シャペロンタンパク質や酵素、レクチン、小胞体ストレス応答によって発現誘導を受ける新規タンパク質、小胞体膜に存在するユビキチンリガーゼ複合体の機能を解析することによって、小胞体におけるタンパク質品質管理機構のメカニズムを包括的に理解し、小胞体と細胞質をつなぐタンパク質逆行輸送機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

小胞体ストレスで著明に発現誘導を受けるタンパク質の機能解析を行うに当たって、培養細胞に発現させたモデル基質の分解や凝集体形成状態を、ウェスタンブロット法や細胞の代謝ラベル法、免疫細胞染色法を用いて解析した。また、相互作用するタンパク質の同定に当たり、共同研究を行って nanoLC-MS 解析を実施した。さらに大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を発現させて精製し、*in vitro* でのタンパク質の機能解析を行った。

小胞体関連分解に関わるレクチン様分子 EDEM ファミリータンパク質の機能解析に関しても、相互作用するタンパク質を同定するため、pull-down 法によって共沈降するタンパク質を検出して、MS 法を用いてこのタンパク質を同定した。これらのタンパク質との相互作用は、免疫共沈降法を用いて解析し、糖タンパク質のマンノーストリミングに及ぼす影響はモデル糖タンパク質の泳動度を指標として解析した。In vitro における酵素活性検出に当たっては、哺乳類培養細胞に発現させた EDEM タンパク質を精製して使用した。

小胞体膜に存在する HRD1-SEL1L ユビ

キチンリガーゼ複合体の機能解析においては、様々な変異体を作成して各ドメインの機能を解析するとともに、siRNA法を用いて内在性タンパク質をノックダウンして機能解析を行った。複合体形成状態は、免疫共沈降法やショ糖密度勾配遠心法を用いて解析した。

4. 研究成果

小胞体ストレスで顕著な発現誘導を受けるタンパク質 SDF2L1 およびそのホモログタンパク質 SDF2 について、細胞内における局在を明らかにするとともに、小胞体におけるタンパク質品質管理に果たす役割を検討した。その結果、SDF2、SDF2L1 ともに小胞体に局在するレジデントタンパク質であること、SDF2 は恒常的に発現していることが示された。また、これらのホモログタンパク質は、小胞体内でタンパク質凝集を抑制する機能をもつことが明らかになった。細胞内で相互作用するタンパク質を調べたところ、小胞体に存在するシャペロンタンパク質の1つである ERdj3 と強く結合することが示された。特に SDF2 に関しては、内在性の ERdj3 タンパク質をノックダウンすると SDF2 タンパク質自体の発現量も減少することから、両者の結合がタンパク質の安定性に重要であることが示された。

ERdj3 は BiP シャペロンサイクルにおいて、アンフォールドした基質に結合して BiP に基質を受け渡すと同時に、BiP の ATPase 活性を促進して、タンパク質の高次構造形成を促進していると考えられている。そこで、BiP と結合することができない ERdj3 変異体を用いて実験を行ったところ、ミスフォールドしたモデル基質は BiP に受け渡されることなく、ERdj3-SDF2L1 に保持されていることがわかった。以上の結果から、SDF2 および SDF2L1 は ERdj3 と複合体を形成して、小胞体内でのタンパク質凝集を抑制することでタンパク質品質管理に寄与していることを明らかにすることができた。

大腸菌を用いて、SDF2 および SDF2L1 リコンビナントタンパク質を精製することができた。SDF2L1 リコンビナントタンパク質とミスフォールドした基質は非常に強

い親和性を持って結合することが明らかになったが、*in vitro* の実験系において、タンパク質凝集抑制効果を検出することができなかった。凝集抑制効果を示すためには、ERdj3 などの他のタンパク質を必要とする可能性も考えられ、今後の課題である。以上の研究成果をまとめて論文として発表した(Fujimori *et al.*, 2017, *Genes to Cells*, *in press*)。

さらに本研究において、ヒト SDF2 および SDF2L1 のリコンビナントタンパク質を用いて結晶構造を解析することができた。結晶構造に基づいてこれらのホモログタンパク質の機能解析を行う基盤を構築することができた。

糖タンパク質の品質管理において、小胞体における糖鎖のトリミングが重要な働きをする。ミスフォールドした糖タンパク質からマンノースがトリミングされることが分解のシグナルとなる。この過程でマンノシダーゼとして働くタンパク質については、その作用機序を明らかにするため、酵素活性の特異性を決める必要がある。哺乳類の EDEM タンパク質については、マンノシダーゼとして機能すると考えられているものの、*in vitro* (試験管内)における酵素活性は報告されていない。そこで本研究において *in vitro* における酵素活性の検出を試みた。細胞内に発現させた場合にマンノシダーゼ活性が顕著に検出できることから EDEM3 に焦点を当てた。EDEM3 が酵素活性を発揮するためには別のパートナータンパク質を必要とする可能性が考えられたので、EDEM3 と結合する細胞内タンパク質を検出することにした。EDEM3 タンパク質を pull-down して共沈降するタンパク質を検出し、MS 解析を行ってタンパク質を同定した。培養細胞に発現させた場合両者の強い結合を検出することができ、また、共発現によって糖タンパク質からのマンノーストリミングを促進することが明らかになった。本タンパク質は EDEM3 の酵素活性を促進する機能を持つと考えられる。

培養細胞に発現させた EDEM3 タンパク質を精製して *in vitro* のアッセイに使用した。本研究において、酵素活性を低下させる新たな変異体を得ることができた。糖タ

ンパク質からのマンノーストリミングを効率よく検出するための基質の検討や、精製した糖鎖に対する酵素活性の検出が今後の課題である。

小胞体膜には、HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体が存在する。HRD1-SEL1Lを中心に様々なタンパク質が集まって大きな複合体を形成し、小胞体内でミスフォールドしたタンパク質の認識から、細胞質に引き出されてプロテアソームで分解される過程において中心的な役割を担っていると考えられている。一方でこの ERAD 機構が過剰に働くと、生合成途上の未成熟なタンパク質までもが分解されるため、細胞にとって不都合が生じる。そこで酵母においても哺乳類細胞においても、HRD1-SEL1L 複合体の発現量を制御する仕組みが存在することが知られている。

私たちは、ヒト SEL1L は不安定なタンパク質で、単独で発現させた SEL1L タンパク質は速やかに分解されること、このとき ERAD 基質も巻き込んで速やかに分解していることを報告した (Iida et al., 2011, JBC)。そこで本研究においては、この分子メカニズムについて検討した。SEL1L は小胞体内腔に大きなドメインを持った 1 回膜貫通型タンパク質である。そこで、SEL1L を小胞体内腔ドメインと膜貫通領域に分けて発現する変異体を作成し、各領域の機能を検討した。その結果、膜貫通領域が不安定性を有しており、小胞体内腔ドメインは安定に発現することが明らかになった。SEL1L の膜貫通領域は HRD1 の膜貫通領域と結合することによって安定化された。さらに、SEL1L および HRD1 両タンパク質の膜貫通領域を介した結合が、ミスフォールドしたタンパク質の ERAD を適切に処理するのに必要であることが明らかになった。SEL1L 小胞体内腔ドメインだけを発現させると、この変異体は ERAD 基質と結合して保持し、その結果基質の分解は阻害された。さらに HRD1 のユビキチンリガーゼ欠失変異体を用いて検討し、HRD1-SEL1L 複合体が小胞体内でミスフォールドしたタンパク質を認識し、サイトゾル側における基質のユビキチン化につなぐ役割を担うことを強く示唆する結果を得た。以上の成果

を論文にまとめて発表した (Hosokawa and Wada, 2016, FEBS J)。

単独で発現させた SEL1L タンパク質自身も ERAD によって分解される。またプロテアソーム阻害剤を添加すると、SEL1L 分解中間体断片が検出される。このことは、機能的な HRD1-SEL1L 膜タンパク質複合体が形成される過程において、生合成直後の SEL1L タンパク質が速やかに分解されてしまわないように保証する機構の必要性を示唆する。私たちは SEL1L タンパク質の分解を阻害する機構について検討し、これを担うと考えられる分子を同定することができた。HRD1-SEL1L 複合体は多くのミスフォールドタンパク質の分解に関与しており、機能的な複合体を発現させて維持する機構は ERAD の制御において重要である。このメカニズム解明は小胞体におけるタンパク質品質管理機構の根幹となる重要な課題である。

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 2 件)

Hosokawa N* and Wada I.: Association of the SEL1L protein transmembrane domain with HRD1 ubiquitin ligase regulates ERAD-L. *FEBS J.*: **283**, 157-172 (2016)
doi: 10.1111/febs.13564

Fujimori T, Suno R, Iemura S, Natsume T, Wada I, Hosokawa N*: Endoplasmic reticulum proteins SDF2 and SDF2L1 act as components of the BiP chaperone cycle to prevent protein aggregation. *Gnens to Cells*: in press (2017)

(*: corresponding author)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 細川暢子、和田郁夫: SEL1Lタンパク質の分解機構. 第68回日本細胞生物学会大会(口頭発表) (2016.6.17、京都市)
- ② 細川暢子、和田郁夫: 小胞体膜に存在するHRD1-SEL1Lユビキチンリガーゼ複合体の機能解析. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生

- 学会大会合同大会) (口頭及びポスター発表) (2015.12.1-4、神戸市)
- ③ 田中雄大、藤森力、宮崎恵理、花房賢、寿野良二、山崎正幸、細川暢子：小胞体シャペロンタンパク質SDF2L1の機能解析. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会) (ポスター発表) (2015.12.1-4、神戸市)
- ④ 細川暢子：小胞体関連分解を担うHRD1-SEL1Lユビキチンリガーゼ複合体の機能解析. 第34回日本糖質学会年会 (口頭発表、招待講演) (2015.8.1、東京)
- ⑤ 細川暢子、藤森力：新規小胞体シャペロンタンパク質の機能解析. 第66回日本細胞生物学会大会 (口頭およびポスター発表) (2014.6.11、奈良市)
- ⑥ Koide T, Ishii A, Hosokawa N, Nishi A: Molecular and genetic analyses of a QTL for increased home-cage activity exclude *Edem1* from the candidate genes (高自発活動マウスの分子遺伝学的解析により *Edem1* は候補遺伝子より除外される) 第37回日本神経科学大会 (ポスター発表) (2014.9.11-13、横浜市)

[図書] (計 1 件)
 分担執筆

Hosokawa N*, Suzuki T*. N-glycans and Quality control of proteins. In "Sugar Chains. Decoding the Function of Glycans" (Eds. T. Suzuki, K. Ohtsubo, N. Taniguchi) Springer 1-20 (2015)
 (*: corresponding author)

[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：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等
 研究所ホームページ
 京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
 (細胞機能調節学分野)
<http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/research/lab11/>

研究室ホームページ
 京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
 (細胞機能調節学分野)
<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/bf01/j/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 暢子 (HOSOKAWA, Nobuko)
 京都大学・ウイルス再生医科学研究所・
 准教授
 研究者番号：00263153

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

()