

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840065

研究課題名(和文)TALEN法による多重遺伝子破壊株を用いたヒト小胞体関連分解因子の網羅的機能解析

研究課題名(英文)Analysis of ER-associated degradation components by multiple knockout cell lines using TALEN

研究代表者

蜷川 暁(Ninagawa, Satoshi)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80647991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体のN型糖鎖からのマンノースの2ステップトリミングが糖鎖依存的分解経路に必須である。我々は最初のマンノーストリミングがEDEM2によって遂行され、次のマンノーストリミングがEDEM3/1によって遂行されるということを示した(Ninagawa et al., JCB 2014)。

またEDEM1/2/3をすべてKOしたEDEM triple KO細胞を用いて、シビアな構造異常糖タンパク質は糖鎖依存分解経路に加えて糖鎖非依存分解経路でも処分される」ことを立証した(Ninagawa et al., JCB 2015)。

研究成果の概要(英文)：Glycoproteins misfolded in the endoplasmic reticulum (ER) are subjected to ER-associated glycoprotein degradation. In this process, N-glycan mannose trimming is required. We clearly showed that this process is initiated by EDEM2 and completed by EDEM3/EDEM1. We also demonstrated that higher eukaryotes are able to extract severely misfolded glycoproteins from glycoprotein ERAD and target them to the non-glycoprotein ERAD pathway to maintain the homeostasis of the ER.

研究分野：細胞生物学

キーワード：EDEM mannose N-glycan 小胞体関連分解

## 1. 研究開始当初の背景

～小胞体関連分解概要～

小胞体は、全タンパク質の約 1 / 3 を占める分泌タンパク質及び、膜タンパク質が生合成される場である。これらのタンパク質は小胞体内で high mannose 糖鎖付加などの翻訳後修飾をうけた後、小胞体シャペロンなどの助けを借りて正しい立体構造を獲得し、ゴルジ体以降の分泌経路へと進む。タンパク質が高次構造を獲得できない時は、小胞体関連分解によって処分される。小胞体関連分解の過程では、小胞体の構造異常タンパク質が、小胞体膜へリクルートされた後、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。このように小胞体の恒常性は、タンパク質の立体構造形成と分解によって主に担われている。

### 小胞体関連分解の分解経路の分類

酵母の小胞体関連分解の解析結果を受けて、高等動物でも分解基質の特徴ごとに分解経路が違ってくるようになってきた。高等動物において現在までに示唆されている分解経路は、以下の 4 つである。

- a). 膜タンパク質      糖鎖      依存分解経路
- b). 膜タンパク質      糖鎖 非      依存分解経路
- c). 可溶性タンパク質      糖鎖      依存分解経路
- d). 可溶性タンパク質      糖鎖 非      依存分解経路

糖鎖依存分解経路では、タンパク質に修飾された high mannose 型糖鎖の mannose が切除されることで、下流の小胞体関連分解因子 OS-9 が分解基質の糖鎖を認識できるようになり、分解へと導かれる。また XTP3B という OS-9 のホモログタンパク質もこの過程にかかわっているかどうか議論されている。一方で糖鎖 非 依存分解経路は、糖鎖依存分解経路よりもより強力な分解活性をもつと考えられている。というのも、NHK-QQQ という糖鎖をなくした NHK の分解が非常に速く進むことから分かっている。さらにこの経路では、Herp1 が必須という報告があるが、他に必要な因子はわかっていない。また一般的な膜タンパク質の分解には SEL1L が必要なく、可溶性タンパク質の分解には SEL1L が必須であることから、膜と可溶性タンパク質の分解経路が違うことが示唆されている (Horimoto S\*, Ninagawa S\*, et al., 2013 J

Biol Chem, Bernasconi et al., 2010 J Cell Biol) \*Equal Contribution。このように基質の分解に必要な因子が違うことで、(a)(b)(c)(d)の 4 つの経路の存在が示唆されてきた。しかし、実際にそれぞれの分解経路でどの因子が必要なのか?という事は、未だ詳細な解析がなされていない。申請者らは小胞体関連分解因子破壊株の樹立、解析により、この問題を研究してきた。

## 2. 研究の目的

申請者らのこれまでの研究により糖鎖依存分解経路に EDEM が必要だということがわかってきている。次に可溶性タンパク質と膜タンパク質の分解経路において、それぞれの因子が必要か調べたい。

研究期間内に何をどこまで明らかにするか

6 種の family タンパク質からなる 13 種の遺伝子について、ヒト培養細胞系で、それぞれの Single KO 株および、family を構成する遺伝子を Double, Triple 遺伝子破壊した Multiple KO 株、計 22 種を作製する。KO 株の作製は、最新技術である TALEN 法を用いる。作製した 22 種の KO 株において、上記に示した(a)(b)(c)(d)の分解経路を代表する分解基質 4 種について分解に影響があるか体系的に調べる。

## 3. 研究の方法

6 種の family からなる 13 種の遺伝子について、TALEN(Transcriptional activator-like effector nuclease) 法によりそれぞれの Single KO 株、family 分子を Double, Triple 遺伝子破壊した Multiple KO 株、合計 22 種を作製するまた作製した KO 株において、4 つの分解経路を代表する 4 つの分解基質の分解に影響があるか Pulse Chase 法で体系的に調べる。

## 4. 研究成果

(1). TALEN 法を活用し、ヒト培養細胞を用いた EDEM1、EDEM2、EDEM3 の遺伝子破壊解析を行った。その後、細胞全体の糖鎖の成分を解析した。EDEM1 の遺伝子破壊細胞では、M8B の増加が見られた。EDEM3 の遺伝子破壊株では、M8B の増加が見られたが、EDEM1 の遺伝子破壊株よりも増加が顕著であった。また EDEM2 の遺伝子破壊株では、M9 の顕著な増加が見られた。今まで EDEM2 には活性がないという報告しかなかったので、非常に意外な結果であった。

つまり、各 EDEM タンパク質の酵素活性には基質特異性があることを発見し、糖鎖刈り込みの第 1 段階 ( 9 個のマンノースを持つ糖鎖からマンノース 1 個を刈り込む反応 ) は

EDEM2 により行われること、第 2 段階 ( 8 個のマンノースを持つ糖鎖からマンノースを 1 個以上刈り込む反応 ) は EDEM1 あるいは EDEM3 により行われること、従来は EDEM1 が最も重要な分子として捉えられていましたが、EDEM1 より EDEM3 の寄与が大きいことを明らかにした。さらに、EDEM2 による糖鎖刈り込みの開始が、構造異常糖タンパク質分解経路に必須であることも明らかにした (Ninagawa et al., 2014 JCB)。さらに分解への影響も検出すると、糖鎖を 3 つ持つ、小胞体膜結合型転写因子 ATF6 の分解は、WT と比べて、EDEM2, EDEM3, EDEM1 の順に遅延していた。これは分解への貢献度を表しており、EDEM それぞれのタンパク質の酵素活性の強さと相関していた。これらの結果により、EDEM1, EDEM2, EDEM3 が糖鎖トリミング酵素活性があるかどうか長年議論になっていたが、それに終止符をうち、それぞれ特異的な活性があるとわかった。

(2). さらに糖鎖依存分解経路の糖タンパク質分解への影響を精査しました。最新ゲノム編集技術である TALEN 法を駆使して EDEM1/2/3 の遺伝子破壊を行い、糖鎖依存分解経路が全く機能しない EDEM トリプルノックアウト細胞 (EDEM TKO 細胞) を作製した。糖鎖非依存分解経路はこの細胞において通常通り機能していることは確認している。

EDEM TKO 細胞では、ネイティブな一次構造を持つが不安定な糖タンパク質 ATF6、ATF6 (C)、CD3- - TM あるいは EMC1 の分解が、予想通り顕著に抑制された。一方、驚いたことに、1-アンチトリプシンの変異体であるモデル構造異常糖タンパク質 NHK については、初期の分解遅延が観察されたが、最終的には野生型細胞の場合と同様に分解された。この予想外の結果を受けて、我々は、NHK と NHK 以外の分解基質の挙動の違いは何に由来するのかという謎に迫ることにした。NHK は C 末端に大きな欠損領域が存在し、大きく構造が崩れていると考えられることから、「シビアな構造異常部位を有する糖タンパク質は糖鎖依存分解経路に加えて糖鎖非依存分解経路でも分解される」という仮説を立てた。

この仮説を検証するために、ATF6 (C)、CD3- - TM あるいは EMC1 に対してアミノ酸の挿入、欠失による構造異常部位を導入し、EDEM TKO 細胞においてそれらの分解速度を調べた。すると NHK と同様に、初期には分解遅延が見られたが、最終的には分解されるようになった。これらのことからシビアな構造異常部位を有する糖タンパク質は、糖鎖依存分解経路だけでなく糖鎖非依存分解経路でも分解されることが明らかになった (Ninagawa et al., 2015 JCB)。

本研究により、小胞体の不安定な糖タンパク質は糖鎖依存分解経路のみで処分され、シビアな構造異常を有する糖タンパク質は糖鎖依存分解経路と糖鎖非依存分解経路で確実に処理されることが示された。小胞体におけるタンパク質分解の基本機構は酵母からヒトまで保存されていますが、酵母では糖鎖非依存分解経路が機能しておらず、この分解システムは高等動物のみに存在していると考えられる。新たに発見されたこの精巧な対応策は、進化に伴って多様化した小胞体の負荷に対処するために獲得されたと考えられる。

また小胞体において構造異常タンパク質を分解処理する機構は、ヒトにとって極めて重要な役割を果たしていることが分かっている。実際に、この分解機構がアルツハイマー病を初めとした 60 以上の様々な疾患に関与することが報告されている。本研究の成果は、これら疾患の発症機構の解明やその予防にもつながると期待される。

#### 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)

岡田 徹也、蜷川 暁、森 和俊  
みにれびゅう 糖タンパク質の小胞体関連分解におけるマンノーストリミング機構  
生化学 (2016) Vol. 88, No.2, 257-260  
査読あり

Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Horimoto S, Sugimoto T, Ishikawa T, Takeda S, Yamamoto T, Suzuki T, Kamiya Y, Kato K, Mori K.

Forcible destruction of severely misfolded mammalian glycoproteins by the non-glycoprotein ERAD pathway.

The Journal of Cell Biology (2015) 211:775-84

doi: 10.1083/jcb.201504109.

査読あり

蜷川 暁、加藤 晃一、森 和俊  
糖鎖依存的構造異常タンパク質分解に必須な糖鎖刈り込み機構を解明

化学と生物 (2015) Vol.53, No.9, 571-573

査読あり

Faculty of 1000 選出、Top 10%論文

Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, Ishikawa T, Takeda S, Sakuma T, Yamamoto T, Mori K.

EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step.

Journal of Cell Biology (2014) 206:347-56.

doi: 10.1083/jcb.201404075.

査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

口頭発表(英語) 2014 SFG JSCR Joint Meeting  
(Hawaii)

2014 年 11 月 16 日 ~ 19 日 Chair;  
Christopher West, OUHSC

EDEM1/2/3 are 1,2-mannosidases  
essential for endoplasmic  
reticulum-associated degradation of  
glycoproteins

Satoshi Ninagawa, Tetsuya Okada, Yoshiaki  
Sumitomo, Yukiko Kamiya, Satoshi Horimoto,  
Tokiro Ishikawa, Shunichi Takeda,  
Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Koichi  
Kato, Kazutoshi Mori

Workshop 口頭発表(日本語); 第 33 回日本  
糖質学会 (名古屋大学)

2014 年 8 月 10 日 ~ 12 日 座長 松野健治(阪  
大) 北島健(名大) 鈴木匡(理研)

小胞体で新生タンパク質に付加された N 型糖  
鎖からのマンノーストリミングは EDEM2 によ  
って開始される

蜷川暁、岡田徹也、住友嘉樹、神谷由紀子、  
堀本賢、石川時郎、武田俊一、佐久間 哲史、  
山本卓、加藤晃一、森和俊

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蜷川 暁 (Satoshi Ninagawa)

京都大学大学院理学研究科 研究員

研究者番号: 80647991

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

。