

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05031

研究課題名(和文) TRIM-SUMO-プロテアソーム経路：新たな膜蛋白質異常認識・分解機構の実証

研究課題名(英文) TRIM-SUMO-11S proteasome pathway: a possible axis for ubiquitylation-independent endoplasmic reticulum-associated degradation of AE1 mutants

研究代表者

稲葉 睦 (INABA, Mutsumi)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：00183179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：アニオン交換輸送体バンド3変異体R664X AE1の小胞体関連分解(ERAD)は、Ub化非依存性である。本研究では、それがSUMO化にも非依存性であり、かつプロテアソーム系への関与が知られるTRIM28等のTRIMファミリータンパク質に関与が認められず、いわゆるTRIM-SUMO-11S経路は関与しないことが明らかになった。さらに、R664X AE1の分解は、そのN末端側細胞質ドメインの構造とディスロコンDerlinsの作用が不可欠なこと、26S (20S + 19S)プロテアソームが働くことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、様々な疾患病態、抗原提示、あるいはプロテアソームの構造解析から、小胞体関連分解の仕組みとして、従来のUb-26Sプロテアソーム系に加えて新たにUb非依存性プロテアソームの普遍性が認識されている。R664X AE1のUb非依存性小胞体関連分解の仕組みの解明は、その先駆けとして、多様な疾患や小胞体機能異常が関わる疾患の病態・治療法研究の基盤を築く独創的な学術的意義と社会的有用性をもつ。

研究成果の概要(英文)：The ER-associated degradation (ERAD) of R664X AE1 is characteristic because it appears to occur on the ER membrane in a ubiquitylation-independent manner. The TRIM-SUMO-11S pathway was alternative for the ERAD of R664X AE1. However, the present study demonstrated that SUMOylation and TRIM family proteins including TRIM28 had no essential roles in the ERAD of R664X AE1. The present study also showed that the cytoplasmic domain of AE1 was important in dislocation through the dislocon Derlins and recognition/degradation by 26S proteasomes.

研究分野：獣医学、生化学、細胞生物学、血液学

キーワード：小胞体関連分解 膜タンパク質 プロテアソーム ユビキチン SUMO シャペロン 疾患

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 膜内在性・貫通性タンパク質の ERQC/ERAD の研究は、複数回膜貫通型(ポリトープック)タンパク質である出芽酵母の Ste6\*やヒトの嚢胞性線維症 (CF)原因遺伝子産物  $\Delta$ F508-CFTR を対象に行われており、これらの認識/Ub 化/分解に関わる分子群の同定と、小胞体 (ER) から細胞質への逆行輸送を行う仕組みの解析によって、ER シャペロンである calnexin、BiP、CHIP E3 リガーゼによる Ub 化、AAA<sup>+</sup>-ATPase p97 によるプロテアソームへの誘導、Derlin-1 による逆行輸送”dislocon”形成などの知見がもたらされた。重要なのは、Ste6\*、 $\Delta$ F508-CFTR がいずれも、1) Ub 依存性に分解されること、2) ポリペプチド全体が ER から一度丸ごと放出されてから 26S プロテアソームによる分解を受けること(基質認識と逆行輸送は全く別の過程である)、さらに 3) プロテアソーム機能が低下すると細胞質に不溶性凝集体 aggresome を形成することの 3点である。

(2) 牛球状赤血球症で生じる変異バンド 3 分子=R664X AE1 の ERAD は、上記とは全く異なる性質をもつ。つまり、R664X AE1 は Ub 化非依存性で、細胞質への丸ごとの放出は認められず、aggresome の形成も生じない。R664X AE1 のプロテアソーム分解は、Ub シグナル無しに ER 膜上で生じることが想定され、特異的な ERQC/ERAD 経路が存在すると考えられる。しかし、これらは推測に止まり、分子機序は不明である。一方、近年、プロテアソーム分解に対する Ub 様の翻訳後修飾である SUMO 化と関連分子である TRIM ファミリーの作用が注目されている。そこで働くプロテアソームは、通常の 26S (20S と 19S の複合体)ではなく、11S プロテアソームが関わるとされる。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、ポリトープック膜タンパク質の Ub 非依存性 ERAD に TRIM ファミリータンパク質による SUMO 修飾と SUMO による基質認識が関わり、ER 膜上でのプロテアソーム分解が生じることを検証することを目的とする。

(2) 具体的には、1) R664X AE1 に TRIM28、あるいは関連分子による SUMO 修飾が生じること、その SUMO 化が 11S プロテアソームによる分解を生じ得ることを検証する。2) 分解の場について、R664X AE1 が、そのポリペプチド全体が細胞質に輸送されることなく、ER の細胞質側膜上で逆行輸送とリンクして生じることを明らかにする。3) こうした仕組みが普遍的であることを、Ub 化非依存性の他の基質を用いて検証する。

### 3. 研究の方法

(1) TRIM28-SUMO-11S プロテアソーム経路の解明：R664X AE1 と TRIM28 の関連因子をタンパク質相互作用解析によって明らかにする。R664X AE1 の SUMO 修飾の証明と TRIM28 および SUMO 発現干渉による R664X AE1 分解への影響を検討する。また、各プロテアソームとインヒビターの作用、細胞内動態を解析し、11S プロテアソームの特異性を実証する。

(2) 場の解明：11S プロテアソームによる分解が ER 膜上で生じることを生体内タンパク質相互作用の解析によって明らかにする。

(3) 普遍性の検証：TRIMsiRNA ライブラリの作製および異なる変異導入や別基質に対する網羅的解析を行い、TRIM-SUMO-11S プロテアソーム経路の ERQC/ERAD における普遍性を検証する。

なお、初年度から 2 年目の研究過程で TRIM ファミリー/SUMO 化の関与が否定的な知見が得られたため、11S プロテアソームの関与の検証は実施せず、それ以降は、新たに関与が示唆された PLTCM1 の ER シャペロンとしての役割、ならびにプロテアソーム分解の場としての ER 膜と基質構造、特に AE1 の細胞質側構造に焦点を充てた検討に注力した。

### 4. 研究成果

#### (1) TRIMI ファミリータンパク質の働き

R664X AE1 との相互作用が示唆される TRIM28 に加え、ER への分布や ERAD との関連が知られる TRIM13、TRIM59、TRIM21 について、HEK293 細胞に一過性発現させた R664X AE1 に対する影響、相互作用を検討した。

R664X AE1 含量は、TRIM28、TRIM13 の共存下で有意に減少(各 53%±27%、49%±6%)、TRIM21、TRIM59 の共存で有意に増加(各 160%±17%、316%±63%)した(図 1)。ただし、siRNA による TRIM28 の発現抑制でも R664X AE1 含量に同様の減少が認められ、TRIM28 の影響は不明確であった。一方、Ub 依存性 ERAD で分解される CFTR は、TRIM59 共存下で 175%±15%に増加したが、他の TRIM による量的変動は認められなかった。また、HEK293 細胞に発現させたこれらの TRIM タンパク質は ER への分布を示すが、同じく ER に分布する R664X AE1 と共発現させると両者の共在は見られず、免疫沈降反応による R664X AE1 との結合も認められなかった。Figure 2 に、TRIM28、CLPTM1 等との免疫沈降反応の結果を示す。CLPTM1 は R664X AE1 との結合を示す一方、TRIM28 には結合が全く認められない(図 2)。

#### (2) SUMO 化の検証

HEK293 細胞に一過性発現させた R664X AE1 は免疫プロット法/免疫沈降法で抗 SUMO 抗体と反応せず SUMO 付加によるサイズの変化も認められなかった。無細胞タンパク質合成系で合成した R664X AE1、ならびに赤血球膜の AE1 を SUMO 化酵素 (Aos1/Uba2 あるいは UbcH9) を用いて

修飾することを試みたが、SUMO1～SUMO3 のいずれについても SUMO 化は認められなかった。また SUMO 化への関与を想定した TRIM28 は核に局限した分布を示し、その一過性発現/発現抑制は R664X AE1 含量に影響しないことが明らかになった (Figure 3)。これらの結果から、TRIM-SUMO 系は R664X AE1 の ERAD に関与する可能性を否定するに至った。

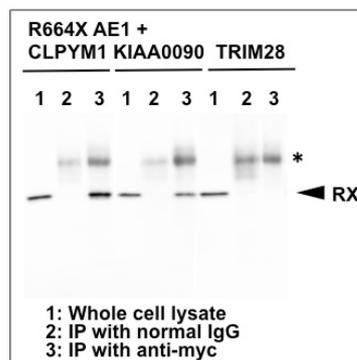
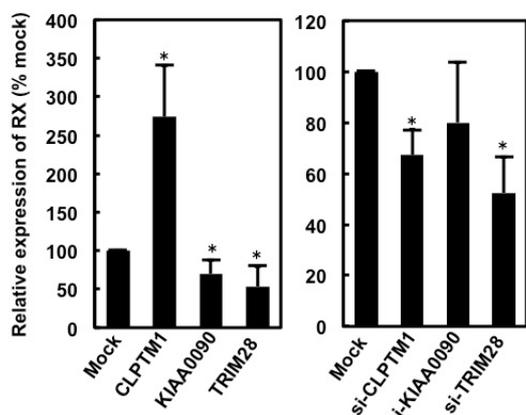


図 1. R664X AE1 含量に対する TRIM28、CLPTM1 図 2. R664X AE1 と TRIM28、CLPTM1 の結合の影響

### (3) R664X AE1 を分解するプロテアソームの解析

網状赤血球ライセートを用い、ここに単離した 20S と 19S を添加すると R664X AE1 の分解が進み、プロテアソーム阻害剤 lactacystin を加えるとその消失が観察された。したがって、R664X AE1 は 20S+19S、即ち 26S プロテアソームの分解を受けることが明らかになった。

### (4) 新規 ER シャペロン候補 CLPTM1 の作用

HEK293 細胞に R664X AE1 と CLPTM1-myc を一過性発現させると、これらはともに ER に分布した。正常な AE1 (WT AE1) は主に細胞膜への分布が観察された。抗 myc 抗体を用いて免疫沈降反応を行ったところ、R664X AE1、WT AE1 はいずれも免疫沈降産物中に検出され、それらの発現総量の 5%～6%が CLPTM1 と結合していると考えられた。また、ラクタシチンでプロテアソームを阻害した細胞では、CLPTM1 と結合している AE1 の量の増加が認められた。細胞の R664X AE1 含量は、CLPTM1-myc を同時に発現させた場合、単独で発現させた時の 2.7 倍と有意に増加した。これは、R664X AE1 を単独で発現する細胞にラクタシチン作用させた時の R664X AE1 含量の増加 (2.1 倍) を上回るものであった。一方、WT AE1 の場合、CLPTM1-myc の共発現による含量の有意な増加は認められなかった (Figures 1 and 2)。

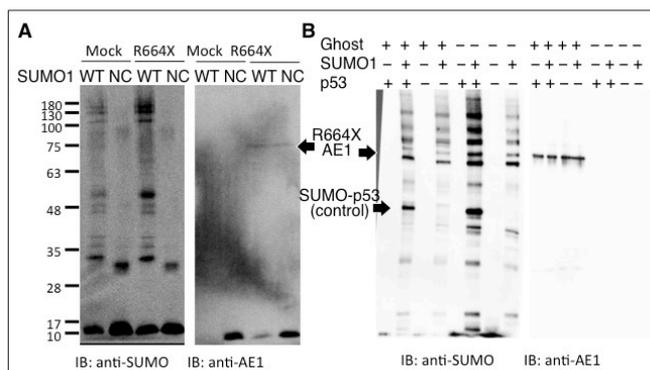


図 3. R664X AE1 の SUMO 化の検証: AE1 (RX 変異、野生型) は SUMO 修飾を受けない。

R664X AE1 に N-結合型糖鎖付加が生じるように改変した P661S/R664X AE1 を HEK293 細胞に一過性発現させると、その 95%が糖鎖付加体として、5%は糖鎖のないポリペプチドとして検出された。細胞に CLPTM1 を同時に発現させると、その含量は糖鎖付加の有無に関わらず単独発現細胞の 1.9 倍であった。この細胞で抗 myc 抗体による免疫沈降を行ったところ、P661S/R664X AE1 発現総量の 3%が免疫沈降産物中に検出されたが、興味深いことに、そのほとんど全てが糖鎖付加を受けていない P661S/R664X であった。

以上の結果から、CLPTM1 が小胞体で R664X AE1 と直接、あるいは間接に結合すること、その結合は糖鎖に非依存的で R664X AE1 のポリペプチド自体の認識によって生じること、そして、この小胞体における CLPTM1 との相互作用が R664X AE1 の ERAD/プロテアソーム分解の進行を制御し得ることが明らかになった。これらの結果は、機能未知の CLPTM1 が R664X AE1 の ERAD に抑制的に作用する ER シャペロンであることを示唆する新しい知見である。

### (5) 分解の場と基質構造の関連

ER のトランスロコンである Derlin-1、-2 と RX AE1 の相互作用に焦点をあて、EGFP-RX AE1、RX AE1-EGFP、ΔCD AE1 など RX AE1 の修飾体についてその構造/ER における膜トポロジーと Derlins による認識との関連を検討した。その結果、本来の細胞質ドメインをもつ RX-AE1 と RX AE1-EGFP はいずれもほぼ 100%が ER に分布し、プロテアソーム分解を阻害しても、その分布に変化は生じなかった。

一方、細胞質ドメインのN末端側を修飾したEGFP-RX AE1は50%の細胞でERの複数箇所大きな集積像を呈した。プロテアソームの阻害によりその割合は80%に増加し、Derlin-1、-2、あるいはその両者の発現を抑制すると、この細胞内分布自体は変化しないものの、細胞内含量に著しい増加がみられた。また、細胞質ドメインを欠くΔCD AE1はERには認められず細胞質に点状の分布を示し、一部の細胞ではアグリソーム様凝集塊を形成した。さらにDerlin-1、-2の発現を抑制すると凝集塊をもつ細胞の大幅な増加、細胞内含量の可溶性/非可溶性画分における著増が認められた。これらの結果から、RX AE1の逆行輸送にはDerlin-1とDerlin-2の両者が不可欠であること、ならびにRX AE1の細胞質ドメインが細胞質への逆行輸送/Ub非依存性のプロテアソーム分解に際して何らかの認識を受けることが判明した(Figure 4)。

なお、ER膜上での分解の直接的/特異的に実証するため、ER内の逆行輸送/分解中間産物を検出する実験系を新たに構築することとし、現在、必要な分子を安定に発現する細胞を作製している。

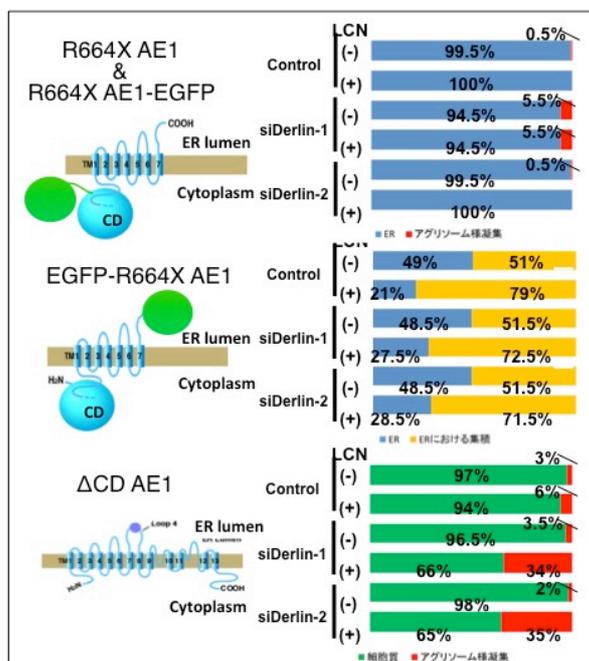


図4. ERに局在するR664X AE1のプロテアソーム分解/と細胞質への逆行輸送は、細胞質ドメインの構造修飾(あるいは細胞質ドメインの有無)により変化する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Yamazaki, J., Jelinek, J., Hisamoto, S., Tsukamoto, A., Inaba, M. (2018) Dynamic changes in DNA methylation patterns in canine lymphoma cell lines demonstrated by genome-wide quantitative DNA methylation analysis. *Vet. J.* 231, 48-54. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.tvji.2017.11.007
- ② Tani, A., Yamazaki, J., Nakamura, K., Takiguchi, M., Inaba, M. (2017) Case report: congenital methemoglobinemia in a cat with the reduced NADH-cytochrome b5 reductase 3 activity and missense mutations in CYB5R3. *Jpn. J. Vet. Res.* 65, 201-206. (査読あり)  
doi: 10.14943/jjvr.65.4.201

[学会発表] (計4件)

- ① Takuya Tsumita, Benjaporn Kiatpakdee, Kota Sato, Kensuke Takada, Mutsumi Inaba. A possible role of TSP02 in erythroid cell maturation. 2018 Red Cell Club Meeting, October 26, 2018. Yale University School of Medicine.
- ② Benjaporn Kiatpakdee, Takuya Tsumita, Akito Yamamoto, Leo Kawata, Kota Sato, Yoshikazuz Sugimoto, Kensuke Takada, Jumpei Yamazaki, Mutsumi Inaba. Impaired erythroid maturation in dogs due to the mutations of the TSP02 gene through an altered cholesterol redistribution. ConBio 2017 (第90回日本生化学会大会)、2017年12月8日、神戸国際会議場.
- ③ Benjaporn Kiatpakdee、山本章人、山崎淳平、高田健介、稲葉睦: Functional analysis of possible roles of TSP02 in erythroid cell maturation. 第160回日本獣医学会学術集会、2017年9月13日、鹿児島大学農学部.
- ④ 原田優真、大津航、佐藤詩織、宮川将司、山崎淳平、佐藤耕太、稲葉睦: 牛 R664X 変異 AE1 の ERAD に対する KIAA0090 と TRIM28 の影響. 第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月7日、日本大学生物資源科学部 (藤沢).

[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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/lmm/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：高田 健介  
ローマ字氏名：TAKADA, Kensuke  
所属研究機関名：北海道大学  
部局名：大学院獣医学研究院  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：40570073

研究分担者氏名：山崎 淳平  
ローマ字氏名：YAMAZAKI, Jumpei  
所属研究機関名：北海道大学  
部局名：大学院獣医学研究院  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：20732902

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。