

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06110

研究課題名(和文) 分子間ジスルフィド結合を介した小胞体マンノシダーゼEDEMの活性調節機構

研究課題名(英文) Regulation of ER-localized mannosidase EDEM2 via the intermolecular disulfide bond

研究代表者

岡田 徹也 (Okada, Tetsuya)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：70378529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体における不要糖タンパク質の分解は、タンパク質に付加されたN型糖鎖からのマンノース刈り込みにより制御される。本研究では、マンノース刈り込みの第1ステップの実行酵素候補であるEDEM2がTXNDC11と分子間ジスルフィド結合を形成することを見出し、TXNDC11がEDEM2の機能に必須なパートナー分子であることを明らかにした。また、これまで困難であったEDEM2-TXNDC11複合体の酵素活性の生化学的な検出に初めて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によるEDEM2-TXNDC11複合体のマンノシダーゼ活性検出により、遺伝子破壊解析の知見から我々が提唱していた小胞体のマンノース刈り込みの分子機構が生化学的にも立証された。小胞体における不要タンパク質の分解は、細胞の生命活動において不可欠な機構である。TXNDC11によるEDEM2の活性制御の発見とEDEMタンパク質の酵素活性の測定法の確立により、その分子機構の理解がより深まると期待される。

研究成果の概要(英文)：Mannose trimming of N-glycan regulates endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of misfolded glycoproteins. In this study, we found that EDEM2, a putative ER-localized mannosidase, was stably disulfide-bounded to TXNDC11, an ER-localized protein with five thioredoxin-like domains. This covalent association was essential for mannose trimming and glycoprotein degradation. We also clearly demonstrated for the first time that EDEM2-TXNDC11 complex purified from culture cells had mannosidase activity against N-glycan in vitro.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：小胞体 マンノシダーゼ タンパク分解

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小胞体に局在する糖タンパク質が分解される場合、アスパラギン残基に付加された N 型糖鎖の構造が分解シグナルとして機能する(図 1)。すなわち、マンノースを 9 個有する糖鎖(M9 型糖鎖)の B 鎖から 1 個のマンノースが刈り込まれ(第 1 ステップ)、続いて、M8B 型糖鎖から 1~3 個のマンノースが刈り込まれる(第 2 ステップ)と、その構造を認識するレクチン OS-9 が結合し、糖タンパク質は分解へと導かれる。EDEM タンパク質は、マンノシダーゼホモロジードメインを有する小胞体局在性のタンパク質であり、哺乳動物では EDEM1、EDEM2、EDEM3 の 3 つが存在する。我々は、ヒト HCT116 細胞を用いた逆遺伝学的解析により、マンノース刈り込みの第 1 ステップには EDEM2 が必須であり、第 2 ステップには EDEM3 あるいは EDEM1 が必須であることを明らかにしてきた(J. Cell Biol. 2014; 206, 347-356)。この知見は 3 つの EDEM タンパク質がマンノシダーゼであることを強く示唆している。一方で、精製した EDEM タンパク質を用いて酵素活性を検出した例はなく、とりわけ EDEM2 についてはマンノシダーゼ活性を持たないという報告も存在する(Glycobiology 2005; 15, 421-436)。そのため、EDEM タンパク質がマンノシダーゼであることを実証するためには、酵素活性を生化学的に検出することが不可欠であった。

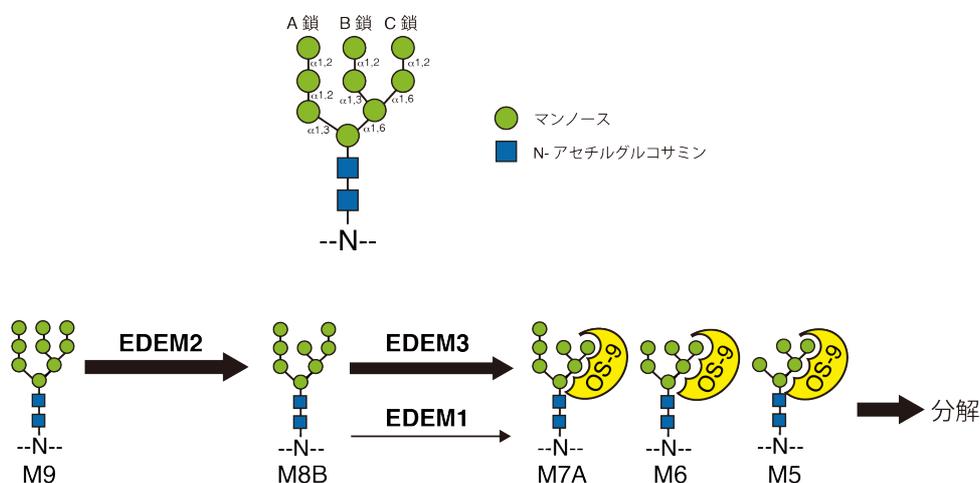


図 1 小胞体におけるマンノースの刈り込み機構

2. 研究の目的

EDEM タンパク質の出芽酵母ホモログである Htm1p がマンノシダーゼ活性を発揮するには、プロテインジスルフィドイソメラーゼ PDI を必要とする。そこで、EDEM2 の酵素活性の実証を目的として、EDEM2 と相互作用することが知られていたチオレドキシニン様タンパク質 TXNDC11 に着目し、TXNDC11 の機能解明、および EDEM2-TXNDC11 複合体の酵素活性の検出を目指した。

3. 研究の方法

(1) プラスミド DNA の作成

タンパク質発現用のプラスミド DNA の作成およびアミノ酸点変異導入は、一般的な分子生物学的手法を用いて行った。

(2) TXNDC11 欠損細胞の作成

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法により、HCT116 細胞の TXNDC11 遺伝子に薬剤耐性マーカーを挿入する遺伝子破壊を行った。

(3) EDEM2-TXNDC11 複合体の精製

EDEM2 を欠損する HCT116 細胞にプロテイン A および TEV プロテアーゼ認識配列を付加した EDEM2 (EDEM2-TAP), および Flag タグを付加した TXNDC11 を発現させた。EDEM2 は小胞体内の可溶

性タンパク質であることから、精製効率を高めるために、本研究で同定した可溶性 TXNDC11 を発現させた。細胞を溶解したのち、プロテイン A に結合する IgG ビーズを用いて EDEM2-TAP と可溶性 TXNDC11 の複合体を精製し、TEV プロテアーゼを作用させて EDEM2-TAP からプロテイン A を切断することで、高純度の EDEM2-TXNDC11 複合体を溶出した。M9 型の合成糖鎖を基質として、EDEM2-TXNDC11 複合体のマンノシダーゼ活性の測定を行った。

4. 研究成果

(1) EDEM2 の機能に必須なシステイン残基の同定

Htm1p が酵素活性を発揮するためにはシステイン残基が重要であることが知られている。そこで、EDEM2 のシステイン残基に点変異を導入し、その影響を調べた。EDEM2 を欠損した細胞ではモデル構造異常糖タンパク質である mCD3- δ - Δ TM-HA のマンノース刈り込みが停止するため、mCD3- δ - Δ TM-HA の分子量がわずかに大きくなる。野生型 EDEM2 を EDEM2 欠損細胞に発現させると分子量シフトは解消されるが、65 番目、408 番目、558 番目のシステイン残基をそれぞれアラニンに置換した変異体 EDEM2 では解消されなかった。したがって、これら 3 つのシステイン残基が EDEM2 の機能に必須であることが明らかになった。Htm1p との構造比較から、マンノシダーゼホモロジードメイン内にある 65 番目と 408 番目のシステイン残基は、分子内ジスルフィド結合を形成すると考えられた。

(2) EDEM2 と TXNDC11 は安定な分子間ジスルフィド結合を形成する

TXNDC11 は CXXC モチーフからなるチオレドキシンドメインを有することから、EDEM2 と分子間ジスルフィド結合を形成する可能性が考えられた。その可能性を検討したところ、実際に両者が安定な分子間ジスルフィド結合を形成することを見出した。また、EDEM2 欠損細胞および TXNDC11 欠損細胞のいずれにおいても当該複合体が消失した。すなわち、EDEM2 と TXNDC11 は互いに主要な結合分子であることが明らかとなった。

次に、TXNDC11 および EDEM2 のシステイン残基に点変異を導入し、両者の分子間ジスルフィド結合形成への影響を調べた。その結果、EDEM2 の 558 番目のシステインと TXNDC11 の 692 番目のシステインがジスルフィド結合を形成することを見出した。上述のように、EDEM2 の 558 番目のシステイン残基は EDEM2 の活性に必要であったことから、TXNDC11 との結合が EDEM2 の機能に必須であることが示唆された。

(3) TXNDC11 は EDEM2 の機能に必須なパートナー分子である

EDEM2 が欠損した HCT116 細胞では、モデル分解基質である ATF6 や mCD3- δ - Δ TM-HA のマンノース刈り込みが起らず、両者の分解が遅延する。そこで、TXNDC11 欠損細胞を作成し、TXNDC11 欠損細胞における ATF6 および mCD3- δ - Δ TM-HA のマンノース刈り込みと分解効率を調べた。その結果、EDEM2 欠損細胞と同じく、TXNDC11 欠損細胞においてマンノース刈り込みが停止し、ATF6 や mCD3- δ - Δ TM-HA の分解も遅延した。野生型 TXNDC11 を TXNDC11 欠損細胞に発現させると、マンノース刈り込みと分解が回復したが、EDEM2 と分子間ジスルフィド結合を形成できない TXNDC11 (C692S) 変異体では回復しなかった。これらのことから、TXNDC11 は EDEM2 の機能に必須なパートナー分子であると結論した。

また、TXNDC11 欠損細胞では、野生型細胞に比べて EDEM2 の発現量が低下した。TXNDC11 欠損細胞の EDEM2 はトリプシンに対する高い感受性を示したことから、TXNDC11 が欠損することにより EDEM2 のコンフォメーションが変化したと考えられた。すなわち、TXNDC11 の役割の 1 つは、EDEM2 の構造を正常に維持することであると考えられた。

(4) 選択的翻訳開始機構により、TXNDC11 は膜型と可溶性の 2 種類の分子として発現する

TXNDC11 を還元条件でウエスタンブロット解析すると、分子量の異なる 2 つのバンドが検出された。この要因を詳細に解析した結果、TXNDC11 の mRNA は機能的な 2 つの開始コドンを持っていることが明らかとなった。TXNDC11 は N 末端側に疎水性領域を有するが、2 つの開始コドンのうち上流側から翻訳された場合はこの疎水性領域が膜貫通ドメインとして機能し、下流の開始

コドンから翻訳された場合は当該疎水性領域がシグナル配列として機能することも判明した。すなわち、2つの開始コドンの存在により、TXNDC11 は膜型と可溶型の2種類のタンパク質として発現することが明らかとなった。

(5) EDEM2-TXNDC11 複合体はマンノシダーゼ活性を有する

TXNDC11 は EDEM2 の機能に必須なタンパク質であることが明らかとなったことから、EDEM2 と TXNDC11 の複合体を培養細胞から精製し、合成糖鎖に対する酵素活性を測定した。野生型 EDEM2 と TXNDC11 からなる複合体については、M9 型糖鎖を M8 型に効率よく変換する活性が検出された(図 2)。したがって、EDEM2 が酵素活性を有することが生化学的に初めて実証された。また、M8B 型糖鎖から M7 型糖鎖への変換はわずかに認められたのみであったことから、遺伝子破壊解析の結果から提唱したモデルと合致して、EDEM2 はマンノース刈り込みの第 1 ステップを特異的に実行する活性を有することが明らかとなった。一方、TXNDC11 と結合できない EDEM2 (C558A) 変異体については、わずかな酵素活性が認められたのみであった(図 2)。この結果は、細胞系で得られた解析結果と良く一致した。以上のことから、生化学的解析においても、TXNDC11 が EDEM2 の機能に必須なパートナー分子であることが実証された。

24 時間反応

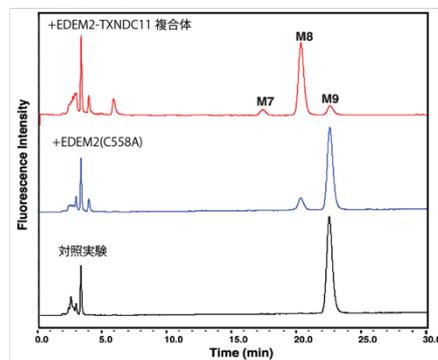


図 2 EDEM2-TXNDC11 複合体のマンノシダーゼ活性測定

また、本研究で採用したプロテイン A と TEV プロテアーゼによる 2 段階精製法が EDEM2 の酵素活性測定に有効であったことから、本手法を EDEM3 および EDEM1 にも適用し、EDEM3 および EDEM1 の精製タンパク質を得て、その酵素活性の測定も行なった。EDEM3 および EDEM1 については TXNDC11 とのジスルフィド結合形成が認められなかったことから、それぞれ単独で細胞に一過性発現させて精製を行い、酵素活性を測定した。その結果、EDEM3 と EDEM1 には M8B 糖鎖を M5 糖鎖まで変換する活性が認められた。すなわち、本研究により、EDEM タンパク質の酵素活性を生化学的に検出する手法が確立された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 George Ginto, Ninagawa Satoshi, Yagi Hirokazu, Saito Taiki, Ishikawa Tokiro, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Imami Koshi, Ishihama Yasushi, Kato Koichi, Okada Tetsuya, Mori Kazutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 EDEM2 stably disulfide-bonded to TXNDC11 catalyzes the first mannose trimming step in mammalian glycoprotein ERAD	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e53455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.53455	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ginto George, Satoshi Ninagawa, Tokiro Ishikawa, Tetsuya Okada, Kazutoshi Mori
2. 発表標題 A Role of a Thioredoxin Protein on EDEM2 Mannosidase Activity
3. 学会等名 The 91st Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻 生物物理学教室 ゲノム情報分野 http://www.upr.biophys.kyoto-u.ac.jp
--

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
---------	---------