

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06220

研究課題名(和文) ユビキチン化反応による小胞体の柔軟な形状変化

研究課題名(英文) A novel regulation of the endoplasmic reticulum morphology by ubiquitination

研究代表者

梶保 博昭 (Hiroaki, Kajiho)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：70401221

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)：小胞体のチューブ構造は連結してネットワークを形成しており、このネットワークは特異的に局在する膜変形タンパク質によって支えられている。小胞体は細胞分裂期やストレスを受けた際に柔軟に形状を変化させている。この際に小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質が分解されることが必要であるがその分子メカニズムは未だ解明されていない。本研究課題により、チューブ構造の連結部に局在するタンパク質lunaparkがチューブ構造の連結に関わるタンパク質p66をユビキチン化することを示した。この結果から、lunaparkによるp66へのユビキチン化が小胞体のネットワーク形成に重要である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体でのユビキチン化反応は一般的にはタンパク質の品質管理機構として用いられる。本研究課題により、lunaparkによるユビキチン化反応が小胞体の形状変化に重要であることが明らかとなり、小胞体でのユビキチン化反応が新たな役割を持つことを提唱できた。

筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病などの神経変性疾患の際には小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質の量が変わり、小胞体の形状が異常になることが報告されている。本研究課題により、lunaparkの機能異常が神経変性疾患の発症に関わる可能性が考えられる。今後、lunaparkをターゲットとした神経変性疾患に対する創薬への応用が十分考えられる。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER) tubules connect each other by three-way junctions, resulting in formation of the network. The tubular ER network is shaped by the ER membrane-shaping proteins. The tubular ER network undergoes constant remodeling, especially during cell division or under stressed conditions. During remodeling of the tubular ER network, the ER membrane-shaping proteins have to be degraded. However, the molecular mechanism of the degradation of the ER membrane-shaping proteins remains unknown. We found that lunapark, a ubiquitin ligase localizing at three-way junctions of the tubular ER network, ubiquitinates p66, one of the ER membrane-shaping proteins involved in connecting the ER tubules. Our studies implicate that lunapark and p66 play important roles in generating and stabilizing the three-way junctions for the proper tubular ER network formation.

研究分野：生化学

キーワード：小胞体 ユビキチンリガーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内には核・小胞体・ゴルジ体・エンドソームなど様々な細胞小器官(オルガネラ)がある。中でも小胞体は核膜から続いて滑面/粗面小胞体という2種類の異なるオルガネラが連続する特徴を持つ。滑面小胞体は細胞質に張り巡らされたチューブ構造をとり、リボソームを多く結合する粗面小胞体はシート構造をとっている。このような小胞体の特徴的な構造は滑面/粗面小胞体それぞれに特異的に局在する膜変形タンパク質によって支えられている。

一方、小胞体は細胞分裂期やストレスを受けた際にチューブ構造が減りシート構造が主になる。このように小胞体は必要に応じて柔軟に形状を変化させなくてはならない。この際に小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質が選択的に分解されることが必要であるがその分子メカニズムは未だ十分解明されていない。

2. 研究の目的

小胞体でのタンパク質の分解経路としてオートファジーを介して小胞体そのものを分解するERファジーに加え、ユビキチン-プロテアソーム系が知られている。これまでに、チューブ構造の小胞体に局在するLunapark(Lnp)が自己ユビキチン化することを見出した。さらにLnp結合因子としてCAND1(Cullin Associated and Neddylation Dissociated 1)を同定し、Lnpの自己ユビキチン化がCAND1によって抑制されることを見出した。また小胞体のチューブ構造にCAND1が必要であることも明らかにした。以上の結果より、CAND1によるLnpの自己ユビキチン化の調節が小胞体のチューブ構造に関わる可能性を示した。

しかし、小胞体のチューブ構造はLnp以外にも多くの膜貫通タンパク質によって支えられている。したがって、Lnpは自己をユビキチン化するだけでなく、小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質もユビキチン化して分解することによって小胞体の形状変化が起きることが想定される。そこで本研究課題ではこれらの問題を解き明かし、Lnpのユビキチンリガーゼ活性による小胞体の柔軟な形状変化の分子機構を明らかにすることを本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

(1)Lnpがユビキチン化する小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質の探索

mycタグを付与した小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質、FLAGタグを付与したLnp(Lnp-FLAG)、HAタグを付与したユビキチン(HA-Ub)をヒト胎児腎細胞HEK293細胞に発現させた。可溶性画分を90°Cで5分処理してタンパク質間の結合を解離させた後に、抗myc抗体によりmycタグを付与した小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質を免疫沈降した。免疫沈降画分を抗HA抗体によりイムノプロットした。

(2)Lnpによるp66へのユビキチン化(in vitro)

Lnpがp66を直接ユビキチン化しているかを調べた。ユビキチン化反応は細胞質で行われることから、膜タンパク質の場合はその細胞質ドメインで行われる。そこで、p66の細胞質ドメインをPCRによって作成しpET-28a(+)ベクターに組み込んだ。大腸菌をIPTG存在下で培養することでHisタグが付与したp66(His-p66細胞質ドメイン)を誘導し、Niレジンで精製した。一方、Lnp-FLAGをHEK293細胞に発現した後に、可溶性画分を抗FLAG抗体により免疫沈降した。免疫沈降画分からLnp-FLAGをFLAGペプチドによって溶出し精製した。Lnp-FLAG、His-p66細胞質ドメインをユビキチン化反応に必要なE1、E2、ATPとHA-Ub存在下で反応させた。反応物をNiレジンと混合し、洗浄後レジンに結合しているHis-p66細胞質ドメインを抗HA抗体によりイムノプロットした。

(3)Lnpの細胞内局在がp66へのユビキチン化に与える影響

LnpのN末端領域に存在する両親媒性ヘリックスの点変異体(I25D、L28D)をPCRによって作成した。Lnp野生型、I25D、L28D-FLAGをmyc-p66とHA-Ubと共にHEK293細胞に発現させた。(1)と同様の方法により細胞内でのmyc-p66へのユビキチン化を調べた。また、Lnp野生型、I25D、L28D-FLAGをHEK293細胞から精製し、(2)と同様の方法によりin vitroでのHis-p66細胞質ドメインへのユビキチン化を調べた。

(4) Lnp によってユビキチン化される p66 内のアミノ酸の探索

p66 に含まれるリジンをアルギニンに置換した点変異体を PCR により作成した。myc-p66 の野生型および変異体を Lnp-FLAG, HA-Ub と HEK293 細胞に発現させた。(1)と同様の方法により細胞内での myc-p66 へのユビキチン化を調べた。また、His-p66 細胞質ドメインの野生型および変異体を大腸菌から精製し、(2)と同様の方法により *in vitro* での Lnp による His-p66 細胞質ドメインへのユビキチン化を調べた。

(5) p66 のユビキチン化が小胞体のネットワーク形成に与える影響

siRNA に耐性 (siRNA により分解されるのを防ぐためにアミノ酸は変えずに塩基配列だけ変えたもの)となる p66 を PCR によって作成した。ヒト由来骨肉腫細胞 U2OS 細胞に p66 に対する siRNA を導入した。2 日後に myc-siRNA 耐性 p66 の野生型または 4 箇所のリジンをアルギニンに置換した変異体と、小胞体の構造を観察するために GFP-Sec61 β を同時に発現させた。翌日に U2OS 細胞を PFA により固定し、抗 myc 抗体による免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1)Lnp がユビキチン化する小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質の探索

培養細胞内で小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質が Lnp によってユビキチン化されるかを調べた。myc タグがついた小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質を Lnp-FLAG と HA-Ub と HEK293 細胞に発現させ、抗 myc 抗体により免疫沈降した。免疫沈降画分を抗 HA 抗体によりイムノプロットした。その結果、小胞体のチューブ構造の連結反応に関わる約 66kDa の膜変形タンパク質 (p66) では、抗 HA 抗体によるイムノプロットでのラダー状のバンドが Lnp-FLAG の発現によって増加した。この増加は他の小胞体のチューブ構造を支えるタンパク質では見られなかった。この結果より、Lnp がこの分子を特異的にユビキチン化していることが示唆された。

(2)Lnp による p66 へのユビキチン化 (*in vitro*)

Lnp が p66 を直接ユビキチン化しているかを調べるため、*in vitro* でのユビキチン化アッセイを行った。Lnp-FLAG と His-p66 細胞質ドメインを精製して、ユビキチン化反応に必要な E1, E2, ATP, HA-Ub と反応させた。反応物を Ni レジンと混合し His-p66 細胞質ドメインをブルダウンした。洗浄後レジンに結合しているタンパク質を抗 HA 抗体によりイムノプロットした。その結果、Lnp-FLAG の存在下では抗 HA 抗体によるイムノプロットでラダー状のバンドが見られた。このラダー状のバンドの強度は Lnp-FLAG の量を増やすにしたがって強くなった。この結果より、Lnp は p66 を直接ユビキチン化していることがわかった。

(3)Lnp の細胞内局在が p66 へのユビキチン化に与える影響

Lnp は小胞体のチューブ構造が連結する部位 (three-way junction) に局在して安定化している。Lnp の three-way junction への局在が p66 へのユビキチン化に重要であるかを調べた。Lnp の N 末端領域の細胞質領域には両親媒性ヘリックスがある。この両親媒性ヘリックスに変異 (I25D または L28D) を加えると three-way junction に局在できず小胞体のチューブ構造全体へと分布することが報告されている。そこで、細胞内での Lnp 野生型, I25D, L28D-FLAG による p66 へのユビキチン化反応を (1) で行った方法で調べた。Lnp I25D, L28D-FLAG を発現させた場合、抗 HA 抗体によるイムノプロットでのラダー状のバンドが野生型に比べて減弱した。このユビキチン化の減弱は Lnp が three-way junction に局在できなくなったからではなく、ユビキチンリガーゼ活性自体が減弱しているために起きた可能性が考えられる。そこで、Lnp I25D, L28D-FLAG を精製して、His-p66 細胞質ドメインへのユビキチン化反応を (2) で行った方法で調べた。その結果、Lnp I25D, L28D-FLAG は野生型と同様に His-p66 細胞質ドメインをユビキチン化した。これらの結果より、培養細胞での Lnp の three-way junction への局在が p66 へのユビキチン化に重要であることがわかった。

(4) Lnp によってユビキチン化される p66 内のアミノ酸の探索

p66 の中で、どのアミノ酸が Lnp によってユビキチン化されるかを調べた。p66 に含まれるリジンをアルギニンに置換した様々な点変異体を作成し、細胞内での Lnp-FLAG による p66 へのユビキチン化反応を(1)で行った方法で調べた。その結果、p66 の 4 箇所のリジンをアルギニンに置換した変異体では、Lnp によるユビキチン化が顕著に減弱した。さらに、この変異を導入した His-p66 細胞質ドメインを作成し、in vitro での Lnp によるユビキチン化反応を(2)で行った方法で調べた。その結果、野生型に比べて変異体では Lnp によるユビキチン化が減弱した。以上の結果から、p66 の 4 箇所のリジンが Lnp によりユビキチン化されている可能性が示唆された。

(5) p66 のユビキチン化が小胞体のネットワーク形成に与える影響

Lnp による p66 へのユビキチン化が、小胞体のネットワーク形成に重要な役割を調べた。U2OS 細胞に p66 に対する siRNA を導入するとネットワーク形成が抑制されるため、three-way junction の数が減る。ここに siRNA 耐性の p66 の野生型を発現させると three-way junction の数が回復する。一方、siRNA 耐性の p66 の 4 箇所のリジンをアルギニンに置換した変異体を発現させると three-way junction の数が回復しなかった。以上の結果より、p66 のユビキチン化は小胞体のネットワーク形成に重要であることが示唆された。

【まとめ】

本研究により Lnp が p66 をユビキチン化することが小胞体のネットワーク形成に重要であることがわかった。p66 は小胞体のチューブ構造の連結に関わる分子であり、Lnp は three-way junction に局在して安定化する分子である。さらに、CAND1 は Lnp に結合して Lnp のユビキチンリガーゼ活性を抑制する。以上のことより、p66、Lnp、CAND1 により three-way junction が形成されるメカニズムとして、チューブ構造が p66 を介して連結され、three-way junction が形成される。Lnp が three-way junction に局在し、p66 をユビキチン化する。ユビキチン化された p66 はプロテアソームへと運ばれ分解される。Lnp は CAND1 と複合体を形成することでユビキチンリガーゼ活性が低下する。Lnp-CAND1 複合体が three-way junction に留まり安定化する、というモデルを想定している(図 1)。

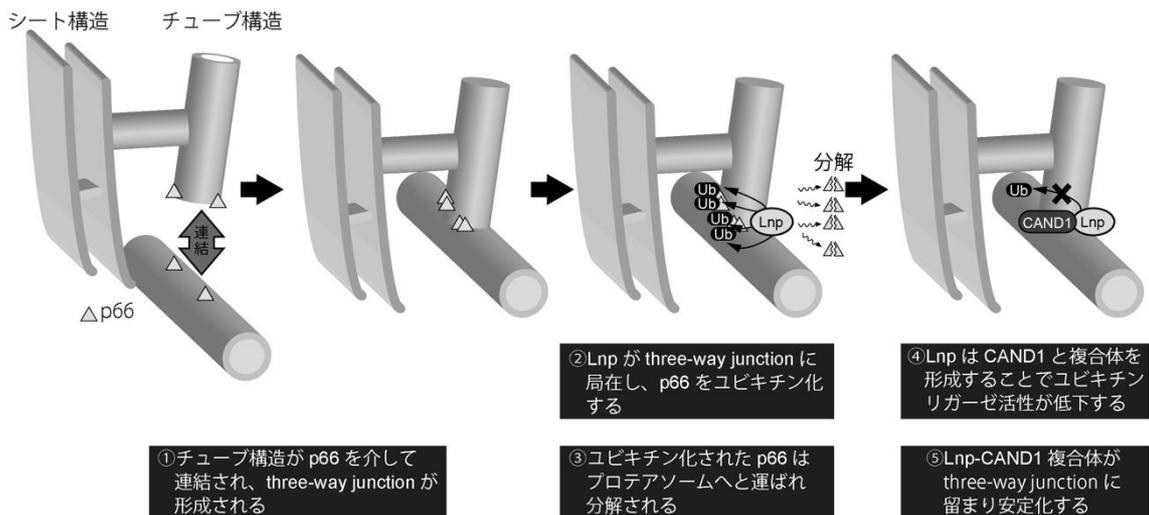


図 1 p66、Lnp、CAND1 により three-way junction が形成されるメカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Kajiho Hiroaki, Yamamoto Yasunori, Sakisaka Toshiaki	4. 巻 9
2. 論文標題 CAND1 regulates lunapark for the proper tubular network of the endoplasmic reticulum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49542-x	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶保 博昭, 山本 泰憲, 匂坂 敏朗
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼ活性による小胞体網目構造の新しい形態調節機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶保 博昭, 山本 泰憲, 匂坂 敏朗
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼ活性による小胞体チューブ構造の新しい形態調節機構
3. 学会等名 第18回生命科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶保 博昭, 山本 泰憲, 姜山, 匂坂 敏朗
2. 発表標題 小胞体の網目構造を調節する因子の多量体化機構
3. 学会等名 第65回 日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学大学院医学研究科 生理学・細胞生物学講座 膜動態学分野
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/membrd/>

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
連携研究者	匂坂 敏朗 (SAKISAKA TOSHIAKI) (80359843)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	

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