

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08183

研究課題名(和文) 形質膜タンパク質のプロテアソームへの新規ターゲティング機構の解明

研究課題名(英文) A targeting mechanism of membrane protein to proteasome

研究代表者

新里 直美(Niisato, Naomi)

京都学園大学・健康医療学部・教授

研究者番号：00237645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではERADで見られる“retrotranslocation”に相当するメカニズムが膜タンパク質の分解に関与しているという仮定に基づき研究を進めたところ、1) ENaC分解シグナル(p38活性阻害および下流のNedd4-2の活性化)により、p97というAAA+ ATPaseがENaCと共に形質膜に局在(集積)すること、2) ENaCはプロテアソームの構成因子と共局在が増大することが判明した。これらの結果より、ENaCがプロテアソームで分解される可能性が強く示唆され、そのメカニズムは“retrotranslocation”に類似したp97依存性のメカニズムだと考えられる。

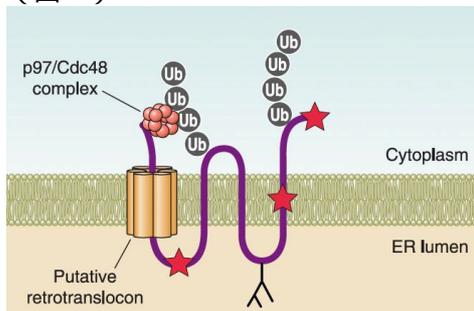
研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that membrane proteins containing ENaC might be degraded in proteasome through a similar mechanism to “retrotranslocation” in ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation). As results, we indicate that 1) a p97 (a AAA+ ATPase) inhibitor accumulated ENaC in the plasma membrane when ENaC degradation was induced by a p38 inhibitor, 2) p97 colocalized with ENaC by inducing ENaC degradation with a p38 inhibitor, 3) a composition of proteasome also colocalized with ENaC by a p38 inhibitor. Based on these results, ENaC might be degraded in proteasome through a p97-dependent mechanism.

研究分野：細胞生理学

キーワード：proteasome ENaC p97 MG132 Ubiquitin

1. 研究開始当初の背景

細胞内のタンパク質やオルガネラは合成と分解の動的平衡により恒常性を維持する一方で、細胞内外の環境変化に应答してこの動的平衡は変化する。その際に、細胞内分解系が極めて大きな役割を果たしていることが知られるようになり、大別するとユビキチン・プロテアソーム系とリソソーム・オートファジー系がある。一般に、形質膜に存在する受容体やイオンチャネルなどの膜貫通型タンパク質は、モノ・K63 ポリユビキチン化修飾を受け、エンドサイトーシスを介して細胞内へ取り込まれ、初期・後期末期エンドソームを経て、リソソームで分解されると考えられている。一方で、主に細胞質のタンパク質が受ける K48 ポリユビキチン化修飾は 26S プロテアソームでの分解シグナルであり、プロテアソームへターゲティングされると、19S プロテアソームでユビキチン受容体による認識、脱ユビキチン化・unfolding を経て 20S プロテアソーム内のプロテアーゼにより分解される。しかし、膜貫通型タンパク質であっても、ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) では、misfolding 等の異常が認識されてユビキチン化された後、AAA⁺ ATPase である p97/Cdc48 complex が標的タンパク質のユビキチン鎖を認識して結合し、ATP の加水分解により膜から引き抜くための機械的力を付与し、“retrotranslocon” という仮想チャネル様構造を介して細胞質側に引き抜かれる “retrotranslocation (逆行輸送)” というメカニズムが提唱されている (図 1; *Physiol Rev* 92: 537-576, 2012)。AAA⁺ ATPase は、これまでにプロテアーゼ様機能、unfolding するシャペロン様機能、膜透過装置様機能を有することが示唆されている。これらの研究成果は、形質膜の膜貫通型タンパク質でもプロテアソームで分解されるメカニズムが存在する可能性を示している。(図 1)



上皮型 Na⁺チャネル (ENaC) は、膜 2 回貫通型の α 、 β 、and γ -ENaC の 3 つの subunit から構成され、C 末端には Nedd4-2 (E3 ubiquitin ligase) に結合する PY motif が存在し、N 末端がポリユビキチン化される。近年、遺伝性高血圧症 (リドル症候群) の原因遺伝子である ENaC は血圧調節因子として注目され、リドル変異が導入されるとユビキチ

ン化されずに ENaC 膜発現量が増大して皮質集合管での Na⁺再吸収が亢進し、容量性に高血圧を発症する。このように ENaC 膜発現制御を解明することは、血圧調節に重要であり、高血圧治療に新しい標的や視点をもたらす。しかし、これまでの研究で、ユビキチン化 ENaC はエンドサイトーシスされ、エンドソームを経てリソソームで分解されると認識されている一方で、プロテアソーム阻害剤が ENaC の分解を抑制するという報告もあるが (*Am J Respir* 50: 526 (2014), *FASEB J* 23: 3829 (2009), *EMBO J* 16: 6325 (1997))、そのメカニズムや詳細な実態については全く明らかにされていないのが現状である。最近の我々の研究成果は、形質膜タンパク質である ENaC がプロテアソームにより分解を受けていることを強く示唆しており、そのメカニズム解明は形質膜タンパク質の新しい分解メカニズムの発見につながると共に、ENaC の膜発現制御は、本研究課題を解明するためのモデル研究として優れた実験系になると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、形質膜の膜貫通型タンパク質である上皮型 Na⁺チャネル (ENaC) がプロテアソームで分解されることを強く示唆する研究結果を得ているが、これまでに形質膜の膜貫通型タンパク質がプロテアソームで分解されることを証明した報告はない。そこで、ENaC の分解メカニズムをモデル研究として、本研究では以下の研究仮説を立て、その新規メカニズムの解明を研究目的とする。本研究では、「形質膜の膜貫通型タンパク質も retrotranslocation machinery (逆行輸送装置) により細胞質に引き抜かれてユビキチン・プロテアソーム系で分解される」という研究仮説を立て、研究を推進する。

3. 研究の方法

本申請課題では、皮質集合管由来上皮細胞である A6 細胞は形質膜タンパク質である内在性 ENaC がプロテアソームで分解されることが示唆されており、p38 阻害剤で ENaC のユビキチン化を介した管腔側膜上 ENaC の分解を誘導できるため、本研究のモデル細胞として用いる。一方、ENaC は ERAD を受けるとの報告もあり、本実験では、4 でビオチン化表面ラベリングした ENaC を形質膜に存在する ENaC とし、内膜系の ENaC と区別するため、全ての実験でビオチン化 ENaC を検出する。

(1) p97 機能阻害の ENaC 膜発現への作用を解明

ENaC 分解誘導時に、p97 阻害剤 (MDBN や DBeQ) や knock-down による p97 機能阻害でビオチン化 ENaC の膜発現量が変化すれば、p97 と

ENaC の形質膜からの引き抜きとの関連性について明らかにできる。また、同条件で短絡電流法を用いて ENaC を介する Na⁺再吸収量を測定することで、機能を有する ENaC の相対的な量と生化学的手法により検出された ENaC 量との関連性について検証する。また、対照実験として、Dynamin 阻害剤の影響についても検討することで、クラスリン依存性エンドサイトーシスとの関連性についても検討する。

(2) ENaC と p97 の直接的な関連性の検討
形質膜から引き抜く装置としての p97 complex が ENaC と共局在することの解明
p97 機能阻害が ENaC への直接的な関与であることを示すために、ENaC との共局在を p97 と ENaC 抗体を用いて免疫共沈により検証する。

(3) ENaC をプロテアソームヘターゲティングするシャトル分子の同定
シャトル分子の特性は、ユビキチン化基質 (ENaC) への親和性、プロテアソーム上の docking sites (Rpn13, Rpn10, Rpn2, Rpn1) への親和性、特有の共通配列であり、これらの性質を基盤に探索する。
シャトル分子と ENaC の共局在、シャトル分子候補の knock-down によりプロテアソームへの集積への影響について検証する。

4. 研究成果

皮質集合管上皮細胞由来 A6 細胞を単層に培養してアルドステロンを添加すると ENaC の発現量・膜発現量がともに増大して Na⁺再吸収量が著しく増大する。この際に、p38 阻害剤である SB202190 を添加すると ENaC をユビキチン化する Nedd4-2 のリン酸化が抑制されて ENaC との親和性が増大し、ENaC のユビキチン化が増えて ENaC の分解が誘導される。このように、ENaC の分解を誘導する際に、プロテアソーム阻害剤である MG132 等を同時に添加すると分解の誘導が阻止され、膜発現量が回復することを見出した。この現象は、ENaC がプロテアソームで分解される可能性と分解されなかった ENaC がリサイクルされた可能性を示している。

ここで、もし ENaC がプロテアソームで分解されるのなら、ENaC は形質膜から引き抜かれなければならない。そこで、ENaC を形質膜から引き抜くメカニズムとして、ERAD 類似のシステムを想定し、ENaC を引き抜く駆動力を与える因子として p97 を候補とした。P97 の阻害剤は、分解誘導時に ENaC および p97 をともに形質膜に集積させること、共局在することを明らかにした。また、p97 阻害剤は、MG132 などのプロテアソーム阻害剤の効果を減弱させることも明らかにした。さらに、分解誘導時には ENaC はプロテアソームの構成因子と共局在することを強く示唆する結果も得

ている。

以上のことから、内在性に ENaC を発現している皮質集合管モデル細胞において、ENaC は p38 抑制による分解誘導時に、p97 により形質膜から引き抜かれ、プロテアソームヘターゲティングされた後、プロテアソームで分解されていることが強く示唆された。この結果より、ENaC の分解を担っているのはプロテアソームであり、p97 を介する膜タンパク質の分解メカニズムは新しい発見と考えている。

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)

Ma Z, Taruno A, Ohmoto M, Jyotaki M, Lim JC, Miyazaki H, NIISATO N, Marunaka Y, Lee RJ, Hoff H, Payne R, Demuro A, Parker I, Mitchell CH, Henao-Mejia J, Tanis JE, Matsumoto I, Tordoff MG, Foskett JK. CALHM3 Is Essential for Rapid Ion Channel-Mediated Purinergic Neurotransmission of GPCR-Mediated Tastes. *98(3): 547-561*, 2018. 査読あり
DOI: 10.1016/j.neuron.2018.03.043

Sasamoto K, Marunaka R, NIISATO N, Sun H, Taruno A, Pezzottia G, Yamamoto T, Kanamura N, Zhu W, Nishio K, Inui T, Eaton DC, Marunaka Y. Analysis of Aprotinin, a Protease Inhibitor, Action on the Trafficking of Epithelial Na⁺ Channels (ENaC) in Renal Epithelial Cells Using a Mathematical Model. *Cell Physiol Biochem. 41:1865~1880*, 2017. 査読あり
doi: 10.1159/000471934

Marunaka Y, NIISATO N, Miyazaki H, Nakajima KI, Taruno A, Sun H, Marunaka R, Okui M, Yamamoto T, Kanamura N, Kogiso H, Ikeuchi Y, Kashio M, Hosogi S, Nakahari T. Quercetin is a useful medicinal compound showing various actions including control of blood pressure, neurite elongation and epithelial ion transport. *Curr Med Chem. 23: 1-12*, 2016. 査読あり
DOI : 10.2174/0929867323666160919095043

Sasamoto K, NIISATO N, Taruno A, Marunaka Y. Simulation of Cl⁻ Secretion in Epithelial Tissues: New Methodology Estimating Activity of Electro-Neutral Cl⁻ Transporter. *Front Physiol.6: 370*, 2015. 査読あり
doi: 10.3389/fphys.2015.00370

〔学会発表〕(計 9件)

新里直美、丸中良典. 上皮型 Na⁺チャネル(ENaC)の膜発現制御の分子メカニズム. 膜学会第40回年会. 2018. 5.8-9; 東京.

Sasamoto K, Niisato N, Marunaka Y. Aprotinin reduces the recycling rate of epithelial Na⁺ channels (ENaC) to the apical membrane of an epithelial cell: a four-state model of intracellular ENaC trafficking. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017.3.28-30; Hamamatsu.

Taruno A, Miyazaki H, Niisato N, Marunaka Y. Homologous CALHM subunits assemble to form a novel voltage-gated ATP channel. International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal Transduction. 2016.5.21; Kyoto

Sun H, Niisato N, Marunaka Y. Insulin is involved in transcriptional regulation of NKCC and the CFTR Cl⁻ channel through PI3K activation and ERK inactivation in renal epithelial cells. International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal Transduction. 2016.5.21; Kyoto

Sasamoto K, Niisato N, Marunaka Y. Simulation of Cl⁻ secretion in epithelial tissues: New methodology estimating activity of electroneutral Cl⁻ transporter. International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal Transduction. 2016.5.21; Kyoto

Taruno A, Miyazaki H, Niisato N, Sun H, Kashio M, Marunaka Y. CALHM1 and CALHM3 are assembled to form a novel voltage-gated ATP channel. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2016.3.22-24; Sapporo.

Taruno A, Miyazaki H, Niisato N, Hongxin K, Kashio M, Marunaka Y. Homologous CALHM subunits assemble to form a novel voltage-gated ATP channel. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2016.7.20-22; 横浜.

Sasamoto K, Niisato N, Marunaka Y. Simulation of Cl⁻ secretion in epithelial tissues: New methodology estimating activity of electroneutral Cl⁻ transporter. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2016.3.22-24; Sapporo.

Niisato N, Marunaka Y. A regulatory mechanism for apical surface expression of ENaC through the ubiquitin-proteasome pathway in renal epithelial A6 cells. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2016.3.22-24; Sapporo.

〔図書〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kyotogakuen.ac.jp/profile/n-aomi-niisato>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新里 直美 (NIISATO Naomi)
京都学園大学・健康医療学部・教授
研究者番号: 00237645

(2) 研究分担者

丸中 良典 (MARUNAKA Yoshinori)
立命館大学・総合科学技術研究機構・教授
研究者番号: 00127036

宮崎 裕明 (MIYAZAKI Hiroaki)
摂南大学・理工学部・教授
研究者番号: 30360027

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()