

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18503

研究課題名(和文)品質管理にとどまらない小胞体関連分解(ERAD)の生理機能の探求

研究課題名(英文)Physiological roles of ER-associated degradation beyond the protein quality control

研究代表者

中務 邦雄(Nakatsukasa, Kunio)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：90547522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間中、細胞周期関連因子の解析が進んだ(ここではCdc99とする)。ERADの変異株において、内在性のCdc99の発現量が上昇していることが分かった。これが分解の抑制によるものか、転写の上昇によるものか、今後の検討する必要がある。  
本研究ではまた、ERADと金属イオン輸送体の新しい遺伝学的相互作用を発見した。この相互作用はCdc99を介したものと考えられるが、Cdc99のノックダウン株などを作製して、今後検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：In the course of this study, I focused on the analysis of Cdc99, which is a cell-cycle related protein. In the ERAD defective strain, the expression of endogenous Cdc99 increased. However, because Cdc99 degradation was not significantly affected by the depletion of ERAD-related components, the transcription of Cdc99 might have been upregulated in ERAD defective strains. I am currently testing this hypothesis.  
In this study, I also found a novel genetic interaction between ERAD and metal ion transport. I am currently testing if this interaction is mediated by Cdc99.

研究分野：機能生物化学

キーワード：小胞体 品質管理 ユビキチン 金属イオン輸送体 ERAD

## 1. 研究開始当初の背景

分泌タンパク質および細胞膜タンパク質は、小胞体で高次構造を形成する。しかし小胞体には、高次構造を形成して「成熟したタンパク質」だけでなく、高次構造を形成する途中の「未熟なタンパク質」、さらには、高次構造の形成に失敗した「異常タンパク質」が共存している。小胞体は恒常性を維持するために、「異常タンパク質」だけを特異的に認識して、サイトゾルへ送り返し、ユビキチン・プロテアソームシステムによって除去する仕組みを備えている。この分解系は ERAD (ER-associated degradation) と呼ばれており、酵母から高等動物までよく保存されている。品質管理機構および ERAD が破綻すると、異常タンパク質が小胞体に蓄積して、リウマチや神経変性疾患など、様々な病態の引き金になることが知られている。

過去約 20 年の研究から、ERAD の分子メカニズムの概略が明らかにされてきた。小胞体の構造異常タンパク質は、分子シャペロンおよび糖鎖結合タンパク質などによって特異的に選別され、小胞体膜近傍の E3 リガーゼ複合体に輸送される。次に基質は、レトロトランスロケーションと呼ばれる全く未知の仕組みによってサイトゾルへ送り返され、ユビキチン化を受ける。その後プロテアソームへ輸送されて分解される。ERAD の経路は特に出芽酵母でよく解析されている。構造異常部位が膜貫通領域にある膜タンパク質は ERAD-M、小胞体内腔の異常タンパク質は ERAD-L 経路を通り、どちらも Hrd1 E3 リガーゼによってユビキチン化を受ける (上図)。一方、基質の構造異常部位がサイトゾル側にある膜タンパク質は、ERAD-C 経路を通り、Doa10 E3 リガーゼによってユビキチン化を受ける。ごく最近、小胞体と連続した構造体で小胞体のサブドメインでもある核内膜に局在するタンパク質は、核内膜の Asi E3 リガーゼ複合体によって分解されることも示された。

このように ERAD では、モデル基質の「異常」を認識するメカニズム、「異常」タンパク質を分解する生理的意義の解明など、品質管理機構としての側面が重点的に研究されてきた。申請者は ERAD の分子メカニズムを *in vitro*、*in vivo* のアッセイ系によって解析してきた。

品質管理以外の ERAD の生理機能として知られていた数少ない例の一つが、HMG-CoA レダクターゼの分解調節である。この代謝酵素はステロール合成経路の律速

酵素であり、下流の代謝物が増加すると構造が変化して、Hrd1 によって分解される (フィードバック制御)。ごく最近、Erg1、Erg11 など、ステロール合成経路の他の代謝酵素も ERAD の基質となることが示された。このように、ERAD は構造の「異常」だけでなく、構造の「変化」を巧みに認識して、様々な細胞機能制御に寄与することが示唆されつつある。これまで品質管理という概念だけでは説明しにくかった、ERAD の欠損による低温感受性 (脂質組成の変化に起因するらしい)、ERAD の因子と脂質・代謝酵素の遺伝学的相互作用などの現象にも、説得力ある説明がなされつつある。

## 2. 研究の目的

本研究では、品質管理 (Quality Control) にとどまらない ERAD の生理機能の解明を目指した。具体的には、申請者が既に取得している ERAD の生理的な基質候補について、E3 リガーゼ複合体による認識機構と、分解の生理的意義の解明を行うことを目指した。基質候補の大部分は高等動物にも配列上のホモログが存在するので、高等動物における ERAD の生理機能の解明も目指した。

## 3. 研究の方法

出芽酵母データベースから、「ユビキチン修飾」、「短寿命」、「高等動物との保存性」、「細胞内局在 (小胞体・核・核膜孔・核内膜・脂質滴)」などを指標に、ERAD によって制御を受ける可能性があるタンパク質を約 50 個抽出した。これら基質候補に GFP を連結した融合タンパク質の安定性を、シクロヘキシミドチェイスによって調べた。さらに、プロテアソーム阻害剤 (MG132) によって分解が抑制されるタンパク質を選び出した。

酵母株の作製、シクロヘキシミドチェイスなどは定法に従った。

## 4. 研究成果

研究期間中、細胞周期関連因子の解析が進んだ (ここでは Cdc99 とする)。Cdc99 は必須遺伝子であり、欠損させると酵母は致死となる。内在性の Cdc99 に 3xHA タグを融合させた酵母株を作製したところ、野生株と同様の増殖を示したことから、Cdc99-3HA は機能的であることが分かった。Cdc99-3HA はプロテアソームに依存して分解される短寿命タンパク質であり、その分解は ERAD に関わる E3 酵素 Hrd1、Doa10、E2 酵素 Ubc6/Ubc7 などに依存することが分かった。しかし内在性

の Cdc99 を認識するポリクローナル抗体を作製して、タグなしの Cdc99 について同様の実験を行うと、分解されるものの、ERAD の変異株においても分解の強い抑制がみられなかった。Cdc99-3HA は小胞体に mis-localize して分解されているものと予想された。しかし、ERAD の変異株において内在性の Cdc99 の発現量は上昇していることが分かった。これが分解の抑制によるものか転写の上昇によるものかは今後の検討課題である。

本研究ではまた、ERAD と金属イオン輸送体の新しい遺伝学的相互作用を発見した。この相互作用は Cdc99 を介したものと考えられるが、Cdc99 のノックダウン株などを作製して、今後検討する予定である。

## 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 9 件 )

1. Guerriero C.J., Reutter K., Augustine A.A., Preston G.M., Weiberth K.F., Mackie T.D., Cleveland-Rubeor H.C., Bethel N.P., Callenberg K.M., Nakatsukasa K., Grabe M, and Brodsky J.L.  
Transmembrane helix hydrophobicity is an energetic barrier during the retrotranslocation of integral membrane ERAD substrates.  
*Molecular Biology of the Cell* (2017) in press
2. Okumura F., Joo-Okumura A., Nakatsukasa K., and Kamura T.  
Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  stabilizes the von Hippel-Lindau (VHL) disease suppressor, Myb-related protein 2.  
*PLOS ONE* (2017) Apr 10;12(4):e0175593. doi: 10.1371/journal.pone.0175593. eCollection 2017.
3. Uematsu K., Okumura F., Tonogai S., Joo-Okumura A., Hailu A.D., Nishikimi A., Fukui Y., Nakatsukasa K., and Kamura T.  
ASB7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation.  
*Journal of Cell Biology* (2016) Oct 10;215(1):95-106.
4. Okumura, F., Joo-Okumura, A., Nakatsukasa, K., and Kamura, T.  
The role of Cullin 5-containing ubiquitin ligases  
*Cell division* (2016) Mar 9;11:1. doi: 10.1186/s13008-016-0016-3. eCollection 2016
5. Okumura, F., Uematsu K., Byrne S.D., Hirano M., Joo-Okumura A., Nishikimi A., Shuin T., Fukui Y., Nakatsukasa K., and Kamura T.  
Parallel regulation of VHL disease by pVHL-mediated degradation of B-Myb and HIF- $\alpha$ .  
*Molecular and Cellular Biology* (2016) May 31;36(12):1803-17. doi: 10.1128/MCB.00067-16. Print 2016 Jun 15.
6. \*Nakatsukasa, K., and \*Kamura, T.  
Subcellular Fractionation Analysis of the Extraction of Ubiquitinated Polytropic Membrane Substrate during ER-Associated Degradation.  
*PLOS ONE* (2016) Feb 5;11(2):e0148327. doi: 10.1371/journal.pone.0148327. eCollection 2016.  
\*Co-corresponding author
7. \*Nakatsukasa, K., Okumura, F., \*Kamura, T.  
Proteolytic regulation of metabolic enzymes by E3 ubiquitin ligase complexes: lessons from yeast.  
*Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (2015) Nov-Dec;50(6):489-502. doi: 10.3109/10409238.2015.1081869. Epub 2015 Sep 11  
\*Co-corresponding author ( 中務への Invited review )
8. Nakatsukasa, K. and Kamura T.  
SCF<sup>Ucc1</sup> ユビキチンリガーゼはグリオキシル酸回路の代謝スイッチとして機能する  
*実験医学* (2015) vol. 33, 2613-2616.
9. \*Nakatsukasa, K., Nishimura, T., Byrne, S.D., Okamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Chibana, H., Okumura, F., and \*Kamura, T.

The Ubiquitin Ligase SCF<sup>Ucc1</sup> Acts as a Metabolic Switch for the Glyoxylate Cycle. *Molecular Cell* (2015) 59, 22-34.  
\*Co-corresponding author

〔学会発表〕(計8件)

1. 藤澤宗隆、中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧  
出芽酵母におけるトリアシルグリセロールリパーゼの活性制御機構の解析  
第39回日本分子生物学会年会  
2016年11月30日~12月2日  
パシフィコ横浜
2. 大谷悠貴、中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧  
出芽酵母タンパク質 Bdf2 の機能解析  
第39回日本分子生物学会年会  
2016年11月30日~12月2日  
パシフィコ横浜
3. Dawit Hailu Alemayehu、中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧  
出芽酵母 E3 リガーゼ SCFDia2 の新規基質 Prl1 の同定  
第39回日本分子生物学会年会  
2016年11月30日~12月2日  
パシフィコ横浜
4. 山口竜、中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧  
出芽酵母 E3 リガーゼ複合体 SCFMet30 による Ary34 の分解制御  
第39回日本分子生物学会年会  
2016年11月30日~12月2日  
パシフィコ横浜
5. 鈴木優太、栗田英奈、中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧  
リボソーム生合成を負に調節する転写制御因子 Dot6 および Tod6 は窒素源飢餓条件でプロテアソーム依存的に分解される  
第39回日本分子生物学会年会  
2016年11月30日~12月2日  
パシフィコ横浜
6. 森山周、西尾和也、中務邦雄、嘉村巧、水島恒裕  
クエン酸合成酵素 Cit2 およびリガンド複合体の結晶構造解析  
第39回日本分子生物学会年会  
2016年11月30日~12月2日  
パシフィコ横浜
7. 西尾和也、森山周、中務邦雄、嘉村巧、

水島恒裕  
F-box タンパク質 Ucc1 によるクエン酸合成酵素 Cit2 の認識機構  
第39回日本分子生物学会年会  
2016年11月30日~12月2日  
パシフィコ横浜

8. 中務邦雄、嘉村巧  
F ボックスタンパク質 Ucc1 による代謝制御機構の解析  
BMB2015  
2015年12月1日~12月4日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~nakatsukasa/lab.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

(Nakatsukasa, Kunio)

名古屋大学 理学研究科 講師

中務 邦雄

研究者番号：90547522

### (2) 研究分担者

( )

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

なし

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )

なし