

令和元年5月27日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07705

研究課題名(和文) タンパク質の糖鎖修飾がユビキチン化のシグナルとなる機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism how glycosylation of proteins functions as a signal for ubiquitination

研究代表者

吉田 雪子 (YOSHIDA, Yukiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：90271543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖タンパク質は細胞質とは膜で隔てられた細胞内小器官(オルガネラ)内や細胞の外に存在する。一方で、細胞質には糖タンパク質をユビキチン化する糖鎖認識ユビキチンリガーゼが存在する。これまで知られていた細胞質で糖タンパク質がユビキチン化を受けうる唯一の機構は、小胞体で正しい構造をとることができなかった異常タンパク質が細胞質へ逆行輸送後に分解される「小胞体関連機構」のみであった。本研究では、オルガネラが損傷を受けた場合に漏れ出した糖タンパク質を、糖鎖認識ユビキチンリガーゼSCFFBX027がユビキチン化し、損傷リソソームなどのオートファジーによる除去などの機構に寄与するという新たな現象を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体で合成されるタンパク質のおよそ半数は、糖鎖が付加された糖タンパク質である。糖鎖のタンパク質への付加は膜で囲まれた細胞内小器官(オルガネラ)で行われ、大部分の糖タンパク質は細胞の外に存在する。しかし、糖鎖が存在しないはずの細胞質には、糖鎖を除去する酵素や糖鎖認識ユビキチンリガーゼが存在する。これらの細胞質に存在する糖鎖関連酵素がどのような役割を果たすのかは不明であった。今回の成果は、細胞質に糖鎖が現れることを細胞が危険シグナルとして認知するという、これまで知られていなかった生体防御機構を明らかにしたものである。

研究成果の概要(英文)：Glycoproteins are found in the organelles, on the cell surface, and secreted to out of cells. On the other hand, glycoprotein-specific ubiquitin ligases are present in the cytosol where glycoproteins are not found usually. The endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation (ERAD) pathway has been known as an only pathway to appear unfolded glycoproteins in the cytosol. In this study, we found that SCFFBX027 ubiquitinates exposed glycoproteins normally sequestered on the luminal surface of organelles, such as lysosomes, following organelle damage, resulting in inducing autophagy for remove the injured organelles.

研究分野：細胞生物学、生化学、タンパク質分解

キーワード：ユビキチン ユビキチンリガーゼ F-boxタンパク質 オートファジー リソソーム 糖タンパク質 小胞体関連分解

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) SCF 複合体は、3つの不変サブユニットとヒトではおよそ70種類あるF-boxタンパク質を入れ替えることで様々な基質に対応するユビキチンリガーゼである。研究代表者は、3種類のN-結合型糖鎖を認識するF-boxタンパク質(FBX02, FBX06, FBX027)を見出し、それらの糖鎖認識機構や機能解析を行ってきた。これらの糖鎖認識F-boxタンパク質は、通常は糖タンパク質が存在しない細胞質に存在する。これまで、糖タンパク質が細胞質へ現れうる唯一の機構として、小胞体で正しい立体構造をとることができなかつた不良タンパク質が細胞質へ逆行輸送されてユビキチン・プロテアソーム系により分解される小胞体関連分解が知られていた。また、FBX02, FBX06, FBX027は小胞体で合成される高マンノース型糖鎖を認識することからこの小胞体関連分解に関わるユビキチンリガーゼと推定してきた。

(2) FBX027は高マンノース型糖鎖以外の糖鎖を認識しうることが他のグループから報告され、研究代表者も予備的実験からそれを確認していた。そのため、FBX027は小胞体より下流のゴルジ体で作られる糖鎖をもつタンパク質のユビキチン化を行う可能性が考えられた。すなわち、小胞体関連分解以外にも未知の糖タンパク質が細胞質へ現れる経路の存在が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究は、小胞体やゴルジ体などのオルガネラで付加された糖タンパク質がどのような経路で細胞質に出現し、糖鎖認識ユビキチンリガーゼに認識されるのか、その機構を明らかにすることで糖タンパク質糖鎖のもつ新たな機能を理解することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 3つのF-boxタンパク質FBX02, FBX06, FBX027の基質となりうる結合タンパク質及びユビキチン化タンパク質の同定: 個々のF-boxタンパク質にFLAGタグを付加したものをアダプター蛋白質Skp1と共に293T細胞とHeLa細胞に発現させ、免疫沈降を行った。コントロールとして糖鎖結合に重要なアミノ酸2残基に置換を導入した変異体を用いた。免疫沈降物をトリプシン消化後、LC-MS/MSにより解析した。また、FBX02, FBX06, FBX027を研究代表者が開発した細胞内のユビキチン化タンパク質を同定するためのプローブTR-TUBEと共に発現させ、ユビキチン化タンパク質を濃縮後、トリプシン消化物をdiGly抗体により精製したユビキチン化ペプチドをLC-MS/MSにより解析した。

(2) 3つのF-boxタンパク質FBX02, FBX06, FBX027の細胞内局在の解析: 各々のF-boxタンパク質にタグを付けたものを恒常的に細胞に発現させ、様々なオルガネラマーカータンパク質と共に免疫染色を行い局在の解析を行った。

(3) オルガネラの損傷による3つのF-boxタンパク質の局在の変化の解析: これまで、オルガネラ(ミトコンドリアやエンドソーム・リソソームなど)の損傷により、損傷オルガネラのユビキチン化が起こり、選択的オートファジーが引き起こされることが報告されていたため、3つのF-boxタンパク質の関与がないか調べるため、様々なオルガネラストレスを誘導し、経時的にこれらF-boxタンパク質の局在の変化を顕微鏡観察した。

(4) リソソーム損傷時に特異的にユビキチン化を受ける糖タンパク質の同定: 培養細胞にリソソーム損傷を与える試薬を添加しユビキチン化を受けるタンパク質を、TR-TUBE法により解析した。同時にFBX027を発現させることでユビキチン化が増強されるタンパク質も同様に解析した。LC-MS/MSにより同定されたタンパク質のユビキチン化をTR-TUBEを用いたウエスタンブロットング法により確認した。

(5) ノックアウト細胞の作製と選択的オートファジーの定量: CRISPR-Cas9系により、FBX027や基質として同定された糖タンパク質LAMP1, LAMP2などのノックアウト細胞の作製を行った。また、損傷したリソソームを検出するマーカータンパク質GFP-Gal3をこれらのノックアウト細胞とコントロール細胞に発現させ、損傷リソソームの消滅を経時的に定量解析した。

### 4. 研究成果

(1) 3種類の糖鎖認識F-boxタンパク質に結合したタンパク質から各々の糖鎖結合できない変異体に結合したタンパク質を差し引きそれぞれに特異的に結合するタンパク質を同定した。その大部分のタンパク質はN結合型糖鎖をもつ糖タンパク質であった。同定された糖タンパク質のうち、TR-TUBE法によりユビキチン化が見られるものを抽出した。同定されたユビキチン化糖タンパク質は3者もしくは2者で共通のものであったが、FBX027を発現させたときにのみ検出される糖タンパク質が複数個存在し、それらはリソソームやエンドソームに存在することが知られている複合型糖鎖を持つものであった。そのため、これまで知られている小胞体関連分解以外にもオルガネラから細胞質へ糖タンパク質が現れる機会があると考え、特にFBX027に注目して以下の実験を行った。

(2) FBX02 や FBX06 が細胞質に局在するのに対し、FBX027 は細胞内のオルガネラ膜や細胞膜に結合した局在パターンを示した。詳細に解析した結果、ミトコンドリア以外の小胞体、リソソーム、エンドソームなどのオルガネラマーカータンパク質と共局在することが判明した。FBX027 には N ミリスチル化を受けうる配列が存在し、実際ミリスチル化を受けることを確認した。この配列に置換を導入することで膜結合性の局在がなくなることから、この特徴的な局在は N ミリスチル化によるものであることを示した。

(3) リソソームの酵素によって重合し結晶化する試薬 (LLOMe) は、細胞培養液に添加後 10 分程度で細胞のリソソーム膜に損傷を起こすことが知られている。タグを付加した FBX027 を発現させた細胞に LLOMe を添加すると、FBX027 は経時的に損傷リソソームへ集積することが観察された。この集積は N ミリスチル化と糖鎖結合の 2 つの性質に依存するものであることも変異体を用いた解析から明らかとなった。生細胞を用いたイメージング解析により、リソソームが損傷を受けるとほぼ同時に FBX027 が集積することを示した。また、トランスフェクション試薬をコートした微細ビーズやシリカを細胞に導入することによりエンドソームに損傷を起こすと、FBX027 は損傷を受けたエンドソームにも集積することも観察された。

(4) オートファジーによる細胞内タンパク質のバルクの分解はリソソームにより行われるため、リソソームは細胞の品質管理に重要なオルガネラと考えられる。また非常に酸性度が高いため、その損傷は細胞に毒性を示すと考えられている。損傷を受けたリソソームは選択的オートファジーにより除去されることが先行研究から明らかとされており、リソファジーと呼ばれている。損傷を受けたリソソームはオートファジーに先立ちユビキチン化を受けることが報告されているが、何がどのユビキチンリガーゼによりユビキチン化されるのかその機構に関しては不明であった。そこで、リソソームに損傷を与えた場合にユビキチン化されるタンパク質を網羅的に同定すると共に、FBX027 を発現させることでユビキチン化が亢進するタンパク質の同定も行った (図 1)。その結果、複合型糖鎖をもつ LAMP1 と LAMP2 が FBX027 の基質候補と考えられた。実際、ウエスタンブロッティングにより、LAMP1, LAMP2 は FBX027 に結合すること、また、FBX027 の発現により強くユビキチン化を受けることが確認された。特に LLOMe 処理時に LAMP2 が極めて強くユビキチン化を受けることも明らかとした。これらのタンパク質のユビキチン化は他の糖鎖認識 F-box タンパク質では起こらず、FBX027 による特異的なものであった。

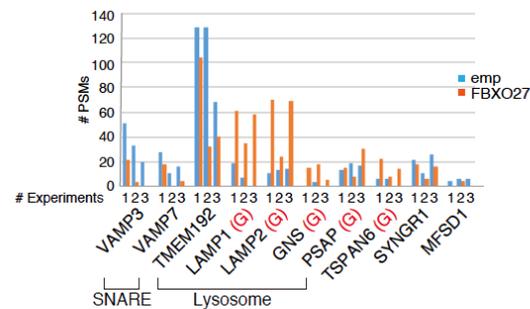


図 1. リソソーム損傷時にユビキチン化されるタンパク質  
青いバーは FBX027 の発現がない細胞、赤いバーは FBX027 発現細胞において同定されたユビキチン化タンパク質の割合を示す

特に LLOMe 処理時に LAMP2 が極めて強くユビキチン化を受けることも明らかとした。これらのタンパク質のユビキチン化は他の糖鎖認識 F-box タンパク質では起こらず、FBX027 による特異的なものであった。

(5) 実際に、FBX027 による LAMP2 のユビキチン化が損傷リソソームの除去に関わることを確かめるために、FBX027 を発現している PANC1 細胞において、FBX027, LAMP1, LAMP2 それぞれのノックアウト細胞を作製し、リソファジー効率に及ぼす影響を調べた。その結果、LAMP2 並びに FBX02 の遺伝子を破壊した細胞では、リソファジーが有意に遅延することが確認された。

(6) これらの結果は、リソソームが損傷を受けた際に、細胞質へ漏れ出した糖タンパク質、特に LAMP2 が FBX027 により認識され、ユビキチン化を受け、オートファジーを誘導することを示したものである (主な発表論文-雑誌論文)。これまで、リソファジーと呼ばれる生体防御機構に関して、どのようにリソソームの損傷が認識されるのかは不明であった。本研究により、通常は細胞質に存在しない糖鎖が細胞質のユビキチンリガーゼにより認識されることが引き金となることが判明した (図 2)。FBX027 は神経細胞に発現するタンパク質であり、一般的なリソファジーよりはむしろ神経変性疾患に見られるアミロイドなどによるオルガネラ損傷に関わる可能性も考えられるため、現在ノックアウトマウスを作製し、生体における機能の解析を進める準備を行っている。

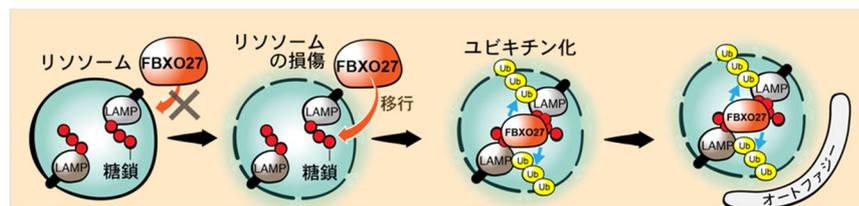


図 2. FBX027 による損傷リソソーム除去機構 (リソファジー)

尚、細胞質に存在する糖鎖認識ユビキチンリガーゼと糖鎖除去酵素などが、細胞質に現れた糖鎖を異常なものとして認識することが、細胞における品質管理に重要な役割を果たしている例を纏め、2 つの総説 (主な発表論文-雑誌論文) を執筆した。

(7) FBX02 は脳特異的に発現する。また、FBX06 は様々な臓器に発現している。FBX02 と FBX06 の生体における違い、また、両者が何か特異的な小胞体関連分解に関与する可能性を見出すために、小胞体ストレスやゴルジ体ストレスなど様々なストレスを細胞に与え、ユビキチン化を受ける糖タンパク質の変化を見るために TR-TUBE 法で解析を行った。しかし、予想に反して大きな違いは見られなかった。一方で細胞質に存在する糖鎖除去酵素遺伝子をロックアウトした細胞を作製し、野生型の細胞と FBX06 や FBX02 によるユビキチン化を受ける糖タンパク質の違いを比較検討したところ、特に FBX06 によるユビキチン化タンパク質に大きな変化が見られた(未発表データ。投稿準備中)。さらに解析を進め、糖鎖ユビキチンリガーゼによる特異的小胞体関連分解機構について解析を続ける予定である。

これら 3 つの糖鎖認識 F-box タンパク質の解析を通じ、さらに新たな生体防御機構の解明に取り組んでいきたい。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計5件)

Yoshida Y, Saeki Y, Tsuchiya H, Tanaka K. Detection of ubiquitination activity and identification of ubiquitinated substrates using TR-TUBE. *Methods Enzymol.* 618. (2019) p135-p147 DOI: 10.1016/bs.mie.2018.12.032 (査読無)

Yoshida Y, Mizushima T, Tanaka K. Sugar-recognizing ubiquitin ligases: Action mechanisms and physiology. *Front. Physiol.* 10. (2019) 109(1-8) DOI: 10.3389/fphys.2019.00104 (査読有)

Yoshida Y, Tanaka K. Cytosolic N-glycans: Triggers for ubiquitination directing proteasomal and autophagic degradation; Molecular systems for monitoring cytosolic N-glycans as signals for unwanted proteins and organelles. *Bioessays* 40. (2018) 1700215 (1-9) DOI: 10.1002/bies.201700215(査読有)

Yoshida Y, Yasuda S, Fujita T, Hamasaki M, Murakami A, Kawawaki J, Iwai K, Saeki Y, Yoshimori T, Matsuda N, Tanaka K. Ubiquitination of exposed glycoproteins by SCFFBX027 directs damaged lysosomes for autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114. (2017) 8574-8579, DOI: 10.1073/pnas.1702615114 (査読有)

Nishio K, Yoshida Y, Tanaka K, Mizushima T. Structural analysis of a function-associated loop mutant of the substrate-recognition domain of Fbs1 ubiquitin ligase. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 72. (2016) 619-629 DOI: 10.1107/S2053230X16011018(査読有)

### [学会発表](計4件)

吉田雪子、安田さや香、藤田敏治、濱崎万穂、村上有沙、川脇純子、岩井一宏、佐伯泰、吉森保、松田憲之、田中啓二：SCFFBX027 による損傷リソソームから細胞質へ露出した糖蛋白質のユビキチン化はリソファジーの引き金となる ConBio2017 (2017)

Yoshida Y, Matsuda N, Tanaka K.: Appearance of N-glycans in the cytosol serves as the 'eat me' signal for damaged lysosomes. 理研国際シンポジウム：Systems Glycobiology and Beyond (2017)

吉田雪子、村上有沙、川脇純子、佐伯泰、松田憲之、田中啓二：すべてのヒト F-box 蛋白質は SCF ユビキチンリガーゼ複合体を形成できるか？ 第 39 回日本分子生物学会年会(2016)

Yoshida Y, Murakami A, Kawawaki J, Saeki Y, Matsuda N, Tanaka K.: A comprehensive analysis of SCF complex formation of human F-box proteins. Cold Spring Harbor Asia conference 'Ubiquitin family, Autophagy & Diseases' (2016)

### [その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/protein/>

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。