

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18538

研究課題名(和文) 小胞体における不安定糖タンパク質と構造異常糖タンパク質の分解メカニズムの解析

研究課題名(英文) Insight into how severely misfolded proteins are degraded in the ER

研究代表者

蜷川 暁(Ninagawa, Satoshi)

京都大学・理学研究科・特定助教

研究者番号：80647991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体関連分解機構において、糖タンパク質の構造異常の度合いが低いと糖鎖依存分解経路のみで分解され、構造異常の度合いが高いと糖鎖依存、非依存分解経路の両方で分解される現象を発表した。今回その分子メカニズムの解析を行った。

過去の報告より糖鎖依存分解経路から糖鎖非依存分解経路へtargetingする候補分子に着目し、遺伝子破壊株の作製を試みた。すると、細胞にとって非常に重要であるこの分子は、欠失すると細胞は死に至るため、この分子の変異体細胞を作出した。その変異体細胞では、少なくとも糖鎖非依存分解経路の分解が抑制されていた。現在も論文文化に向けさらなる解析を続けている。

研究成果の概要(英文)：ER-associated degradation (ERAD) is composed of glycoprotein and non-glycoprotein degradation pathways. By inhibition of glycoprotein degradation pathway, native but unstable or somewhat unfolded glycoproteins were stabilized, but degradation of severely misfolded glycoproteins was delayed only at early chase periods, but they were eventually degraded as in wild-type cells. We analyzed these molecular mechanisms.

We tried to knock out the candidate gene, which target substrates from glycoprotein degradation pathway to non-glycoprotein degradation pathway, and found that the gene is essential for cells, indicating its importance. Using PITCh method, its low expression strains were established. The mutant strain includes some mutations in genomic level. We found that the strain is defective to degrade severely misfolded non-glycoproteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タンパク質分解 糖鎖 小胞体 構造異常タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体内のタンパク質を分解する小胞体関連分解機構において、糖タンパク質は糖鎖依存分解経路で、非糖タンパク質は糖鎖非依存分解経路によって分解されると考えられてきた。しかし申請者は、糖タンパク質の構造異常の度合いが低いと糖鎖依存分解経路のみで分解され、構造異常の度合いが高いシビアな構造異常糖タンパク質は糖鎖依存、非依存分解経路の両方で分解される現象を公表した(Ninagawa et al., 2015 JCB)。そこで本研究では、特に構造異常の度合いの高い糖タンパク相互作用分子に着目し、どのように分解へと導かれるか分子メカニズムの解析を行う。

### 2. 研究の目的

シビアな構造異常糖タンパク質は、通常時は、N型糖鎖依存構造形成経路によって構造形成が試みられるが構造形成できないため、N型糖鎖依存分解経路によって処理されている。しかし、なんらかの理由でN型糖鎖依存分解経路が抑制された場合は、糖鎖非依存経路で分解される。このとき、N型糖鎖非依存分解経路へ導く Targeting protein と特異的に結合すると予想している。本研究では、その Targeting protein の同定および解析を行う。このことで、より毒性の高いと考えられるシビアな構造異常糖タンパク質を確実に分解に導く高等動物細胞の精巧な恒常性維持機構の分子メカニズムの一端を解明する。

### 3. 研究の方法

不安定な糖タンパク質とシビアな構造異常糖タンパク質の相互作用分子が違うことが示唆されている。そこで、それぞれの構造形成から分解過程における一連の結合因子を明らかにすることで、特にシビアな構造異常糖タンパク質の分解経路が明らかにする。一時的な結合も合わせて検出するために、APEX2 による近傍タンパク質のビオチン化標識、その精製と同定を行う。APEX2 はフェノール派生物を酸化し、フェノキシラジカルにビオチンフェノールのビオチンを結合させられる酵素である(Rhee et al., 2013 Science)。また SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture)法も同時に用いる。SILAC 法とは、細胞中のタンパク質を質量の異なる安定同位体のアミノ酸で標識し、Mass によって解析することで、数千個ものタンパク質の大規模な同定・定量を可能にする良く確立された方法である。この方法によって検出された分子のうち、非特異的に同定された分子を排除できる。さらにこの際に、糖鎖依存分解経路に必須なマンノシダーゼ阻害剤であるキフネンシンを用いることで、結合タンパク質に変化が出るかどうか検証する。

また上記網羅的同定方法に並行して、過去の報告より Targeting protein の候補分子に

着目し、遺伝子破壊株の作製を試みる。その遺伝子破壊株に、キフネンシンを加えて、シビアな構造異常糖タンパク質の分解が大きく抑制されるか検証する。

### 4. 研究成果

不安定な糖タンパク質とシビアな構造異常糖タンパク質の相互作用分子を明らかにしたい。そのため不安定な糖タンパク質とシビアな構造異常糖タンパク質に APEX2 を付与した発現ベクターコンストラクトを作製した。不安定な糖タンパク質として CD3 - TM-APEX2-Flag3 を、シビアな構造異常糖タンパク質として CD3 - TM-Insert4-APEX2-Flag3 を用いる。Insert4 は、構造が解明されている CD3 の -Helix の中央に Proline、Alanine の繰り返し構造を挿入しており、CD3 の構造形成が大きく崩れていると期待している。実際に、我々が開発した PNGase アッセイにより構造が full length のものよりも、壊れていることをすでに示している(Ninagawa and Mori 2016 Bio-Protocol)。当初、CD3 - TM-APEX2-Flag3 と CD3 - TM-Insert4-APEX2-Flag3 を細胞に発現させると小胞体に targeting される効率が 60%程度と非常に悪かった。この理由として、過剰発現系によるタンパク質発現により小胞体膜への targeting 効率が下がることが考えられた。これは、発現ベクターのプロモーター750 bp のうち 600 bp を削り、150 bp とすることで、発現量を減らし、小胞体膜への targeting が 85%程度に改善することに成功した(図 1)。

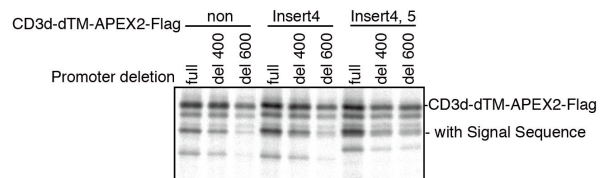


図 1 CD3 - TM-APEX2-Flag3 の小胞体 targeting 効率は発現量を減らすと向上する。小胞体に targeting されると N 型糖鎖が 3 つ付加されるので、Signal Sequence の切断を受けても上方にバンドが検出される。

次に Promoter 領域を削ったこれらのコンストラクトを用いて、近傍タンパク質の Biotin 化を試みた。マグネティックストレプトアビジンビーズによる精製を行い、銀染色によって、結合タンパク質が検出されるか調べた。しかし、non-specific に検出されるバンドも多く、銀染色では、同定に十分なタンパク量が検出されていない可能性もあるため、網羅的な結合タンパク質の同定は、系の改善が必要という状況である。この解決には、Stable 発現細胞株を選別し、すべての細胞が CD3 - TM-APEX2-Flag3 を発現する状態

で、実験を行うなどということが考えられる。今後、さらなる系の改善に取り組み、結合タンパク質を同定したい。

上記と並行して、糖鎖依存経路が抑制された際にも、シビアな構造異常糖タンパク質が分解される要となる因子である Targeting protein の候補分子 X に着目して研究を進めている。その X の機能を解析するために、遺伝子破壊細胞を作製しようと試みたが、どうしてもその遺伝子破壊細胞は得られなかった。その過程において、X の発現量が著しく低い変異株を得ることが出来た。X が細胞にとって重要な働きをしているため、致死なのではないかと考え、野生株と変異株に対して X の RNAi を行った。野生型では、細胞の生存率は高かったが、変異株では、致死に至った。X は essential gene と考えられる(図 2)。

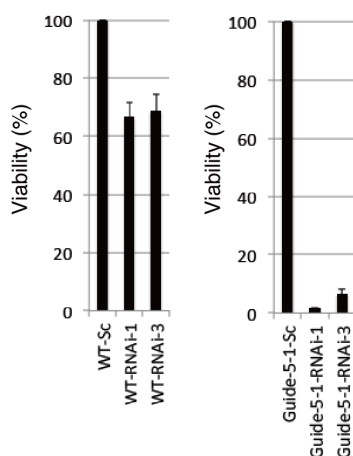


図 2 RNAi を行った際の、野生型(WT)細胞と変異型(Guide-5-1)細胞の Viability を計測した。特定の Target を持たない Scramble (Sc)をコントロールとし、X を Target とする RNAi-1、RNAi-3 を用いた。X の発現が元々少ない変異型細胞において、RNAi すると著しく Viability が悪化していることがわかり、X が essential gene であることが強く支持される。

この X の変異型細胞において、不安定な糖タンパク質の分解速度を調べると、変化はなかった。一方で、糖鎖非依存分解経路の基質の分解速度を調べると、野生型細胞に比べて大きく遅延していた。少なくとも X は糖鎖非依存分解経路においては、非常に重要な役割を果たしていることがわかってきた。今後は、この X の変異型細胞を用いて、シビアな構造異常糖タンパク質の分解速度などを調べ、細胞に toxicity が高いと考えられるシビアな構造異常糖タンパク質を確実に分解する分子メカニズムに迫って行きたい。

## 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 6 件)

(1). 岡田 徹也、蜷川 暁、森 和俊  
みにれびゅう 糖タンパク質の小胞体関連  
分解におけるマンノーストリミング機構  
生化学 (2016) Vol. 88, No.2, 257-260  
査読あり  
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880257

(2). Ninagawa, S. and Mori, K. (2016).  
Trypsin Sensitivity Assay to Study the  
Folding Status of Proteins. Bio-protocol  
6(19): e1953.  
査読あり  
DOI: 10.21769/BioProtoc.1953.

(3). Ninagawa, S. and Mori, K. (2016).  
PNGase Sensitivity Assay to Study the  
Folding Status of Proteins. Bio-protocol  
6(19): e1952  
査読あり  
DOI: 10.21769/BioProtoc.1952

(4). Yagi H, Kuo CW, Obayashi T,  
Ninagawa S, Khoo KH, Kato K.  
Direct mapping of additional modifications  
on phosphorylated O-glycans of  
 $\alpha$ -dystroglycan by mass spectrometry  
analysis in conjunction with knocking out  
of causative genes for dystroglycanopathy.  
Molecular and Cellular Proteomics. (2016)  
15:3424-3434  
査読あり  
DOI: 10.1074/mcp.M116.062729

(5). Ishikawa T, Toyama T, Nakamura Y,  
Tamada K, Shimizu H, Ninagawa S, Okada  
T, Kamei Y, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T,  
Aoyama E, Takigawa M, Harada A, Mori  
K.

UPR transducer BBF2H7 allows export of type II collagen in a cargo- and developmental stage-specific manner.

The Journal of Cell Biology. (2017) 216:1761-1774.

査読あり

DOI: 10.1083/jcb.201609100

(6). Sugimoto T\*, Ninagawa S\*, Yamano S, Ishikawa T, Okada T, Takeda S, Mori K.

SEL1L-dependent Substrates Require Derlin2/3 and Herp1/2 for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation.

Cell Structure and Function. (2017) 42:81-94.

\* equal contribution

査読あり

DOI: 10.1247/csf.17007

〔学会発表〕(計 2 件)

(1)第 68 回 日本細胞生物学会 2016 年 6 月 15 日～17 日 口頭発表 分解執行局域における新展開  
若手最優秀発表賞、優秀発表賞選考会  
優秀発表賞

(2)第 68 回 日本細胞生物学会 2016 年 6 月 15 日～17 日 シンポジウム 口頭発表 分解執行局域における新展開(オルガネラ局域の間取り図)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

蜷川 暁 (SATOSHI NINAGAWA)

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  
特定助教

研究者番号：80647991

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )