

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06222

研究課題名(和文)小胞体ストレスによる新規合成タンパク質の分解機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of ER stress-induced newly synthesized protein degradation

研究代表者

門脇 寿枝 (Hisae, Kadowaki)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40568200

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)：細胞内の全タンパク質の約1/3は小胞体で合成される。しかし、様々な環境要因により小胞体内では折畳み異常タンパク質が蓄積する。細胞は、このような小胞体ストレス状況に対抗するため、リフォールディングやERADを介し不良タンパク質蓄積を軽減する。また一方で翻訳抑制やmRNA分解を介して小胞体へのタンパク質輸送負荷を防ぐ。近年、新たな小胞体負荷回避機構として、予防的品質管理(ERpQC)が報告された。ERpQCは、小胞体局在タンパク質を細胞質で翻訳し分解する機構であるが、その詳細は不明な点が多い。本研究では、ERpQCの分子機構ならびに生理的意義と、その破綻によるプロテオスタシスの異常を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの報告より、リボソームの多くは小胞体膜上や近傍で翻訳を行っており、そこで産生されるタンパク質のうち相当の割合が、不良タンパク質として即座に分解されることが推察される。従って、小胞体膜上での新規合成タンパク質の分解機構を解明することは、真核細胞の機能維持システムさらには、その破綻による病態分子機構の解明に繋がると期待される。本研究で、ERpQCの分子機構ならびにその破綻によるプロテオスタシスの異常を解明したことで、翻訳と共役した新たな分解機構の提唱に繋がりと、既知の小胞体品質管理にも新規概念を提示できたという観点から、その生物学的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：About one-third of all cellular proteins are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER). However, unfolded proteins accumulate in the ER due to various environmental factors. To overcome ER stress conditions, cells reduce the accumulation of defective proteins through refolding and ERAD. On the other hand, they prevent protein overload into the ER through translational attenuation and RIDD. Recently, ER stress-induced preemptive quality control (ERpQC) has been reported as a new mechanism to avoid ER overloading. ERpQC is a mechanism to translate and degrade ER-targeted proteins in the cytoplasm. However, the details remain unclear. In this study, we elucidated the molecular mechanism and physiological significance of ERpQC, and defective proteostasis due to its disruption.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス タンパク質分解 新規合成タンパク質

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、小胞体ストレス時に新規合成された分泌タンパク質が、小胞体に挿入されずに、シグナル配列を保持したまま細胞質で UPS により速やかに分解される現象を見出し、その生理的重要性と分子機構の一部を報告した (Kadowaki *Cell Rep.* 2015)。小胞体ストレスに晒された細胞は、主に2つの戦略により小胞体ホメオスタシスを回復する。一方は、既に小胞体に挿入された不良タンパク質を軽減するため、小胞体シャペロンによるリフォールディングと小胞体関連分解 (ER-associated degradation: ERAD) が活性化される。他方は、小胞体が機能発揮できる許容範囲を維持するための、翻訳抑制と局所的な mRNA 分解である。しかし、この翻訳抑制は必ずしも全タンパク質翻訳を止めず、実験的には細胞全体の約半分の新規合成が維持されたままである (Kang *Cell* 2006, Kadowaki 未発表)。このことは、小胞体ストレス条件下での小胞体シャペロンや ERAD 分子を動員する必要性から合理的である。ただし、翻訳抑制を逃れた新規合成タンパク質のうち、小胞体品質管理に関与しない分泌タンパク質などの小胞体への移行は、小胞体に更なる負荷をかけることになる。これを軽減するシステムとして、小胞体の予防的品質管理“ER stress-induced pre-emptive quality control (ERpQC)”が働く (図1)。我々は、これまで未解明であった ERpQC の分子機構と生理的重要性を世界に先駆けて明らかにしてきた。ヒト肝癌由来 HepG2 細胞において、小胞体ストレス下では、分泌タンパク質 Transthyretin (TTR) の多くが小胞体内腔に挿入されず、シグナル配列非切断型のまま細胞質へ産生され、UPS で分解される (Kadowaki *Cell Rep.* 2015, 図1)。その際に、BiP、PDI などの小胞体シャペロンの多くは、小胞体ストレス下でも翻訳され小胞体へと移行する。つまり、分泌タンパク質の小胞体挿入が選択的に阻害されることで、ストレス時の小胞体フォールディング許容量を維持すると考えられる。このように ERpQC のメカニズムは、小胞体ストレス時に小胞体タンパク質の運命が翻訳時輸送 (cotranslational translocation) から分解経路へと変更されると考えられ、「認識ステップ」と「分解ステップ」に大別される (図1)。ここでは小胞体膜タンパク質 Derlin ファミリーが、ここでは細胞質に局在するシャペロン補助因子 Bag6 と AAA-ATPase p97 が必要であることを報告した (Kadowaki *Cell Rep.* 2015)。さらに、ERpQC 基質特異的ユビキチン化酵素のスクリーニングから小胞体膜型 E3 HRD1 を同定している (Kadowaki *Sci Rep.* 2018, 図1)。

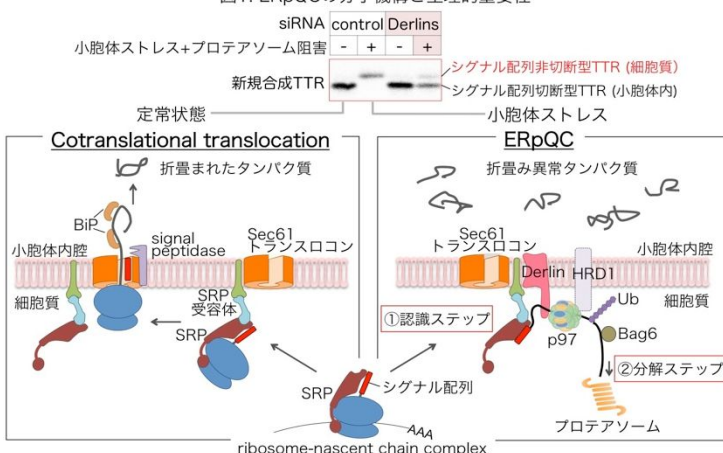
これらの知見より、本研究では小胞体膜上での新規合成タンパク質分解機構を更に明らかにすることで、真核細胞が正しく機能するためのタンパク質品質管理機構の解明と、タンパク質分泌の盛んな組織での ERpQC の重要性とその破綻による疾患の病態機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

我々は前述の通り、ERpQC の 認識および 分解のステップに必要な分子を同定している。しかし未だ不明な点として、 () に関しては () Derlin がリボソームから出現したシグナル配列を含む小胞体タンパク質を定常時の翻訳時輸送からストレス時の細胞質での分解に、どのタイミングでどのようにルート変更させるのか、 () 小胞体シャペロンの多くが ERpQC による分解を免れて小胞体へと輸送されるために、どのような選別が行われているのか、を中心に明らかにする。また、 () に関して、これまでに同定した分解関連因子 HRD1、Bag6、p97 は全て ERAD 構成因子と重複する。しかし、免疫沈降法およびシヨ糖密度勾配遠心法による解析から、ERpQC では HRD1 と Sec61 トランスロコンが結合し、ERAD とは異なる分子量の複合体を形成することを見出している (Kadowaki *Sci Rep.* 2018)。そこで、 () 上記分子群以外の ERpQC 構成因子を同定するとともに、 () ERpQC が小胞体ストレス時に誘導される生細胞での細胞内局所を、ERAD と比較して時空間的に明らかにする。また、ERpQC の生理的重要性については分泌細胞を用いて示してきたが、生体組織における役割については不明である。そこで () ERpQC に対する特異的な阻害化合物を探索し、小胞体品質管理の破綻と疾患の関与が示されている中枢神経系での役割を明らかにする。

教科書的記述によると、翻訳時輸送では、リボソーム上に現れたシグナル配列がシグナル認識粒子 SRP により認識され、SRP 受容体を介し小胞体膜上の Sec61 トランスロコンにリクルートされ、小胞体内腔へと翻訳産物が運ばれる (図1左)。我々はさらに、小胞体ストレス時の翻訳

図1: ERpQCの分子機構と生理的重要性



では SRP が Sec61 トランスロコン近傍に局在化した Derlin にリクルートされることで、小胞体タンパク質の運命を小胞体内への輸送から細胞質での分解へと変えることを世界に先駆けて明らかとした (Kadowaki *Cell Rep.* 2015, 図 1 右)。この運命決定の分子機構を明らかにできれば、新たな生物学的事象の発見に繋がり、既知の翻訳時輸送に新しい概念を提唱できると期待される。一方で、小胞体品質管理の観点からも、ERpQC の重要性は実験的困難さから不明であった。我々が着目する ERpQC は、新規合成の小胞体タンパク質の分解により予防的に小胞体品質を維持するユニークなシステムである。この分子機構と生理的意義を明らかにする本研究は、全真核生物に共通する翻訳と共役した新たな分解機構を提唱するとともに、既知の小胞体品質管理にも新規概念を提示する点で、その生物学的意義は大きい。

一方我々は、これまでに小胞体ホメオスタシスの破綻と神経変性疾患について研究してきた (Nishitoh *Genes Dev.* 2002, Kadowaki *Cell Death Differ.* 2005)。中でも家族性 ALS において、原因因子である変異型 SOD1 の結合による Derlin-1 機能異常は小胞体ストレス誘導性神経毒性に繋がる (Nishitoh *Genes Dev.* 2008)。最近の知見では、変異型 SOD1 は Derlin-1 機能障害を介して ERpQC 基質分解を阻害する (Kadowaki 未発表)。また、ERpQC とプリオン病との関与も報告されている (Rane *Dev. Cell* 2008)。従って、ERpQC は複数の神経変性疾患に関与し、そのメカニズム解明は新しい疾患分子標的の開発に繋がる研究課題であると期待される。

3. 研究の方法

現在までの研究から、ERpQC は肝細胞のタンパク質分泌機能に必須の小胞体品質管理システムであること、分子メカニズムとして Derlin ファミリーによる基質認識、Bag6・p97 を介した分解を報告した。さらに、最近 E3 リガーゼ HRD1 を同定している (図 1)。しかし、「Derlin とともにリボソームから基質を認識する直接の因子は何か?」「ERpQC 基質となる分泌タンパク質と、ならない小胞体シャペロンでは何が異なるのか?」「小胞体品質管理機構かつ分解システムである ERAD と ERpQC では構成因子や細胞内局在に差があるのか?」「生体内のどこで ERpQC は働き、その破綻はどんな疾患に繋がるのか?」など未解明な点が残されている。本研究では ERpQC の基質側と装置側からのアプローチにより、詳細なメカニズム解明を目指した。具体的には、基質 (基質の探索と基質の翻訳速度解析)、装置 (基質結合分子の同定と機能解析)、細胞内局在 (PLA による ERpQC 局在解析)、生理的意義 (ERpQC 阻害による生理的役割の解明) に焦点を当て、研究を行った。

4. 研究成果

細胞は、小胞体ストレス状況に対抗するため、リフォールディングや ERAD を介し不良タンパク質蓄積を軽減する。また一方で翻訳抑制や mRNA 分解を介して小胞体へのタンパク質輸送負荷を防ぐ。近年、新たな小胞体負荷回避機構として、ERpQC が報告された。ERpQC は、小胞体局在タンパク質を細胞質で翻訳し分解する機構であるが、その詳細は不明な点が多い。本研究では、ERpQC の分子機構ならびに生理的意義を明らかにするために、以下の解析を行った。

基質 基質の探索: ERpQC 基質として TTR, α 1-antitrypsin (α 1AT), Insulin, Prion など約 10 種類が知られているが、基質選択性の普遍性を見出すために網羅的基質探索を行った。我々は小胞体ストレス時に Derlin がリボソームタンパク質と結合することを示している (夏目徹博士・産総研との共同研究)。そこで proximity-specific ribosome profiling の手法 (Calvin *Science* 2014) を用い、小胞体ストレス時に Derlin に近接したリボソームを回収し、ERpQC 誘導で翻訳された mRNA の解析より基質を探索した (岩崎信太郎博士・理研との共同研究)。その結果、多くの小胞体局在分子の mRNA 配列が同定された。小胞体局在分子のうち、シグナル配列を持つ群 (分泌タンパク質など) と小胞体保留シグナル KDEL 配列を持つ群 (小胞体シャペロンなど) に分けて解析した結果、シグナル配列を持つ分子の mRNA を翻訳するリボソームが有意に Derlin-1 近傍に濃縮され、小胞体シャペロンなどの KDEL 配列保有分子では、Derlin-1 近接が観察されないことが分かった。

基質の翻訳速度解析: 最近の解析から、基質が約 200 アミノ酸翻訳された後に分解経路へとリクルートされることを発見した。これは、シグナル配列が SRP によって認識され Sec61 トランスロコンにリクルートされた後、約 200 アミノ酸合成されて初めて、Derlin による認識を受けることを示唆する。これらの結果より、ERpQC 基質とその他の分子では、一次構造の部位特異的に翻訳速度に差があり、そのことが Derlin によって認識される時間を与えると予想している。そこで、リボソームプロファイリングによる mRNA 翻訳速度比較の手法 (Ingolia *Science* 2009) を用いた ERpQC モデル基質の翻訳速度解析により、基質認識機構について基質の一次構造の特徴を捉えた (岩崎信太郎博士・理研との共同研究)。現在、そのアミノ酸配列を元に基質の変異体を準備中である。

装置 基質結合分子の同定と機能解析: 基質と Derlin に結合する分子がシグナル配列を持ったタンパク質の認識に関わるとの仮説のもと、結合分子を同定・解析した。既に、小胞体ストレス時に基質に結合する分子を質量分析により網羅的に探索し、複数の基質に共通して結合する 8 分子を同定した。これらの分子の基質認識への関与を知るため、各因子をノックダウンし ERpQC

における必要性を検証した。

細胞内局在 PLA (proximity ligation assay) による ERpQC 局在解析：ERpQC 基質分解は、小胞体への翻訳時挿入阻害が起点となることから、粗面小胞体上の現象と予想される。そこで基質(シグナル配列前に Flag タグを付加した Flag-TTR)の蓄積、および Derlin、Sec61 との共局在を PLA にて解析した。過剰発現で Derlin-1 と Sec61 α 、Flag-TTR と Derlin-1 の近接可視化に成功した。

現在、各遺伝子へのタグノックイン細胞を樹立し、細胞内在性レベルでの検証を試みている。

生理的意義 ERpQC 阻害による生理的役割の解明：生理的意義解明のため、小胞体ストレス状況下で ERpQC が正常に機能しないことが細胞に与える影響を解析した。Derlin 結合分子を解析する過程で、ERpQC 基質の合成量を低下させる分子が同定された。そこで、その分子を欠失させた際の細胞内変化を免疫蛍光染色や FACS など観察した結果、ERpQC の破綻により、細胞質のタンパク質品質管理が低下することで、aggresome が増大することが明らかとなった。

本研究成果において、ERpQC の分子機構ならびにその破綻によるプロテオスタシスの異常を解明したことで、翻訳と共役した新たな分解機構の提唱に繋がったと同時に、既知の小胞体品質管理にも新規概念を提示できたという観点から、その生物学的意義は大きいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kato H, Okabe K, Miyake M, Hattori K, Fukaya T, Tanimoto K, Beini S, Mizuguchi M, Torii S, Arakawa S, Ono M, Saito Y, Sugiyama T, Funatsu T, Sato K, Shimizu S, Oyadomari S, Ichijo H, Kadowaki H, Nishitoh H	4. 巻 3
2. 論文標題 ER-resident sensor PERK is essential for mitochondrial thermogenesis in brown adipose tissue.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sci. Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900576	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 -
1. 著者名 Kadowaki H, Satrimafitrah P, Takami Y, Nishitoh H	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25724-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 -
1. 著者名 Kadowaki H, Nishitoh H	4. 巻 286
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum quality control by garbage disposal.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 232-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14589.	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 -
1. 著者名 Sugiyama T, Murao N, Kadowaki H, Takao K, Miyakawa T, Matsushita Y, Katagiri T, Futatsugi A, Shinmyo Y, Kawasaki H, Sakai J, Shiomi K, Nakazato M, Takeda K, Mikoshiba K, Ploegh HL, Ichijo H, Nishitoh H	4. 巻 -
2. 論文標題 ERAD components Derlin-1 and Derlin-2 are essential for postnatal brain development and motor function.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体の予防的品質管理における新生タンパク質の翻訳制御
3. 学会等名 第14回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体の予防的品質管理における新生タンパク質の翻訳制御
3. 学会等名 第14回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体の予防的品質管理における新生タンパク質の翻訳制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の分解機構
3. 学会等名 新学術領域 新生鎖の生物学 第5回若手ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kadowak H, Nishitoh H.
2. 発表標題 Translational regulation of newly synthesized protein in ER stress-induced pre-emptive quality control
3. 学会等名 新学術領域 新生鎖の生物学 国際会議 Proteins: From the Cradle to the Grave (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kadowak H, Nishitoh H.
2. 発表標題 Regulation of newly synthesized protein degradation in ER stress-induced pre-emptive quality control
3. 学会等名 EMBO Workshop: Endoplasmic reticulum function in health and disease (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の分解機構
3. 学会等名 第12回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体の予防的品質管理における新生鎖の翻訳制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 門脇寿枝, 西頭英起
2. 発表標題 小胞体センサーPERKを介した褐色脂肪細胞の機能制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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