

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16132

研究課題名（和文）GPIアンカー型タンパク質合成酵素は、核の配置も制御する

研究課題名（英文）GPI transamidase complex regulates nuclear position

研究代表者

川口 紘平（Kawaguchi, Kohei）

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任助教

研究者番号：10835515

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）：ショウジョウバエのGPIトランスアミダーゼ複合体のサブユニットは相互に安定化し、とくにPIGKサブユニットのタンパク質安定性には他のすべてのサブユニットが必要であった。さらに、PIGKの分解は小胞体関連分解によって行われるとわかった。ショウジョウバエのGPIトランスアミダーゼ複合体のサブユニットのうちPIGT, PIGS, PIGU, GPAA1は小胞体と核膜に、PIGKは小胞体のみで局在した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPIトランスアミダーゼ複合体のサブユニットの過剰発現や局在の変化は癌との関係性が示唆されている。本研究はそれらのサブユニットのタンパク質安定性や局在について詳しく明らかにしたものである。今後、これらの知見がGPIトランスアミダーゼ複合体のサブユニットが過剰発現した癌の発症メカニズムの解明の一助になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The subunits of *Drosophila* GPI transamidase complex mutually stabilize each other. Especially PIGK subunit was required all other subunits for protein stability. Furthermore, PIGK degradation was mediated by endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). Among the subunits of the *Drosophila* GPI transamidase complex, PIGT, PIGS, PIGU, and GPAA1 localized to the endoplasmic reticulum and nuclear membrane, while PIGK localized only to the endoplasmic reticulum.

研究分野：細胞生物学

キーワード：GPI 核膜

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞において核の位置の制御は重要であり、その位置を制御する蛋白質 Lis1, Dcx の遺伝子変異は知的障害とてんかんを伴う神経疾患を引き起こす。しかし、神経細胞における核の位置を制御するメカニズムは未解明の部分が多く残されている。

### 2. 研究の目的

ショウジョウバエの視神経において GPI アンカー蛋白質の合成にかかわる GPI トランスアミダーゼ複合体のサブユニット PIGT をノックアウトしたところ、驚くことに視神経の核の配置が異常になることを発見した。そこで本研究では、GPI アンカー蛋白質の合成にかかわる酵素がどのように核の配置を制御しているのかを明らかにすることを目的とした。興味深いことに、GPI アンカー蛋白質の合成にかかわる酵素の変異は知的障害とてんかんを引き起こすことが報告されており、本研究によってこの疾患の理解が深まると考える。

### 3. 研究の方法

#### (1) PIGT と共に複合体をつくる PIGS, PIGU, PIGK, GAA1 も核膜に局在するのか？

申請時点では PIGT が神経で核膜に局在していることを発見していたが、PIGT と安定的に結合する PIGS, PIGU, PIGK, GAA1 も核膜に局在する可能性が高い。CRISPR/Cas9 法によって、これらの蛋白質にエピトープタグをノックインした系統を樹立し、細胞内局在を確認した。

#### (2) 複合体と相互作用する蛋白質の同定

PIGT の C 末端に FLAG タグを融合したコンストラクトを発現する系統を樹立し、この系統をもちいて PIGT に結合するタンパク質を解析した。

#### (3) 5 つのサブユニットのどれが核膜局在に必要なのか？

この複合体のどのサブユニットが核膜への局在に必要なのかを明らかにするため、視神経において 1 つのサブユニットの遺伝子をノックアウトし、その他 4 つのサブユニットの局在を確認する。

#### (4) GPI トランスアミダーゼ複合体サブユニットのタンパク質安定性についての解析

本課題の遂行にあたって、GPI トランスアミダーゼ複合体のサブユニットは相互に安定化していることを発見したため、これについて本研究の遂行にあたって作成した材料や、培養細胞の実験系を用いて解析した。

作成していたそれぞれのサブユニットのノックアウト系統と抗体をもちいて、免疫染色とウェスタンブロットによってそれぞれのサブユニットのタンパク質安定性に必要なサブユニットを確認した。

小胞体関連分解に必要なユビキチンリガーゼのノックアウト細胞株を樹立した。この細胞株のウェスタンブロット、定量 PCR、フローサイトメトリーによって GPI トランスアミダーゼ複合体サブユニットの分解メカニズムを解析した。

### 4. 研究成果

GPI トランスアミダーゼ複合体サブユニットのうち PIGT, PIGS, PIGU, PIGK, GAA は小胞体と核膜に局在し、PIGK は小胞体に局在することが明らかになった (Kawaguchi et al., FEBS Lett., 2021)。核の局在を制御する上では PIGK 以外のサブユニットが関与していることが示唆された。

解析過程に得られた予期しない実験結果によって、GPI トランスアミダーゼ複合体のサブユニットはお互いのタンパク質安定性に必要であることが明らかになった。興味深いことに PIGK サブユニットは他のどのサブユニットが失われてもタンパク質レベルで分解していた (Kawaguchi et al., BBRC, 2019)。PIGK は小胞体に存在しているので、PIGK は小胞体関連分解によって分解されるのではないかと考えた。そこで、小胞体関連分解に必要な E3 ユビキチンリガーゼのノックアウトスクリーニングを行ったところ、Hrd1 依存的な小胞体関連分解が PIGK の分解に関わることを明らかにした (Kawaguchi et al., Cell Struct. Funct., 2021)。

本研究では、残念ながら GPI トランスアミダーゼ複合体による核の位置の制御メカニズムの一端しか明らかに出来なかった。しかしながら、解析の過程で得られた予期しない実験結果によって、GPI トランスアミダーゼ複合体サブユニットのタンパク質安定性について様々な知見を得ることができた。それぞれのサブユニットの量は小胞体関連分解によって緻密に制御されていると考えられる。GPI トランスアミダーゼ複合体のサブユニットは様々な癌で過剰発現している。それらの癌では本研究が明らかにしたサブユニットの量的制御メカニズムが破綻していると予想され、国内外の関連研究分野に対して一定のインパクトを与える知見と考えている。

今後の展望として、GPI トランスアミダーゼ複合体による核の位置の制御メカニズムについてさらなる解析が期待されるだけでなく、サブユニットの量的制御の破綻がなぜ癌化を引き起こすのかについて解析することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawaguchi Kohei, Yamamoto Hino Miki, Matsuyama Nina, Suzuki Emiko, Goto Satoshi	4. 巻 595
2. 論文標題 Subunits of the GPI transamidase complex localize to the endoplasmic reticulum and nuclear envelope in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 960 ~ 968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14048	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 Yamamoto-Hino Miki, Kawaguchi Kohei, Ono Masaya, Furukawa Kazuhiro, Goto Satoshi	4. 巻 133
2. 論文標題 Lamin is essential for nuclear localization of the GPI synthesis enzyme PIG-B and GPI-anchored protein production in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 238527 ~ 238527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.238527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Kohei, Sato Tatsuro, Kondo Shu, Yamamoto-Hino Miki, Goto Satoshi	4. 巻 512
2. 論文標題 Stability of the transamidase complex catalyzing GPI anchoring of proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 584 ~ 590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------