様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ５ 月 １３ 日現在

機関番号： １７６０１
研究種目： 挑戦的研究（萌芽）
研究期間： 2020～2021
課題番号： ２０Ｋ２１４０１

研究課題名（和文）細菌のPUP化を応用した真核細胞のユビキチンリガーゼ基質同定法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a method for identification of ubiquitin ligase substrates in eukaryotic cells by application of bacterial ubiquitin-like modifier Pup

研究代表者
西頭　英起（Nishitoh, Hideki）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：００３３２６２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質分解システムの破綻は、不良タンパク質を蓄積させ神経変性疾患などのコンフォメーショナル病の発症に繋がることから、その理解は重要な研究課題です。研究代表者は小胞体の品質管理に必要なタンパク質分解に関する研究を推進してきた。タンパク質分解において「分解される不良タンパク質のユビキチン化に特異性はあるのか?」あるとすれば「その特異性の法則は?」といった疑問が未解明で、これらを解決するための新規ユビキチン化基質同定法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本手法の確立によって、小胞体におけるタンパク質分解に関与するユビキチンリガーゼの基質を同定することに成功した。本手法の獲得は、理論上全てのE3に応用可能である。今後は、真核細胞での網羅的解析により、タンパク質分解だけでなく新規シグナル伝達経路の発見にも繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Understanding the proteolytic system is an important research issue, as failure of the proteolytic system leads to the accumulation of defective proteins and the development of conformational diseases such as neurodegenerative disorders. The principal investigator has promoted research on proteolysis, which is necessary for quality control of the endoplasmic reticulum. In proteolysis, "Is there specificity in the ubiquitination of defective proteins to be degraded?" If so, what is the law of specificity? If so, what is the law of specificity?" We have developed a novel method to identify ubiquitination substrates to solve these questions.

研究分野： 細胞生物学

キーワード： タンパク質分解

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

ヒトが 1 日に合成するタンパク質は 160~200g といわれる。一方で、摂食するアミノ酸量はわずか 60~80g である。つまりタンパク質の大半は合成されては壊され、その原料となるアミノ酸はリサイクルされている。このタンパク質分解を担う細胞内の二大システムが ubiquitin proteasome system（UPS）と autophagy で、加齢とともにその活性は低下する。分解システムの破綻は、タンパク質の新規合成を破綻させるだけでなく、構造異常（不良）タンパク質を蓄積させ、神経変性疾患などのコンフォメーショナル病の発症に繋がることから、タンパク質分解の理解は重要な研究課題である。申請者はこれまで一貫して、小胞体の品質管理に必要な UPS に関する研究を推進してきた。その UPS の疑問として「分解される不良タンパク質のユビキチン（Ub）化に特異性はあるのか」あるとすれば「その特異性の法則は」といった点があげられる。これらを解決すべく本研究では新規 Ub 化基質同定法を開発することとした。

２．研究の目的

Ub 化は、E1、E2、E3 の三種類の触媒酵素群を介して標的タンパク質へ Ub が付加される反応である。その様式は直鎖型や分岐型など多様で、役割も分解に限らずシグナル伝達、DNA 修復、autophagy など多彩である。機能を終えた分子や不良タンパク質が UPS によって分解されるが、小胞体品質管理に重要な ER-associated degradation（ERAD）は、多くが後者を分解する。小胞体不良タンパク質は、小胞体内で直鎖化された後、細胞質に逆輸送され Ub 化される。つまり、ERAD における Ub 化基質は、全て直鎖ペプチド化され、細胞質に排出された瞬間から Ub 化されることが運命づけられている。哺乳類細胞には、少なくとも ERAD 関連ユビキチンリガーゼ（E3）として 8 種類の膜型と 5 種類の細胞質局在型がある。分解が運命づけられた直鎖ポリペプチド基質の Ub 化のためにこれほど多くの E3 が進化的に保存されている理由は、現時点で不明である。それぞれが代償的に機能している可能性が考えられるが、個体レベルでは、HRD1（小胞体膜型 E3）を含むいくつかのノックアウト（KO）マウスは致死性である。従って、ERAD-E3 間には何らかの基質特異性があると予想される。オルガネラ研究で最も受け入れられている説が、ERAD 基質の特異性を構造異常が存在する分子内領域に基づいて分類するという考え方である（小胞体内腔領域：ERAD-L、膜内領域：ERAD-M、細胞質領域：ERAD-C）。しかし、この結果は必ずしも再現性が高いとはいえない。その理由は、細胞レベルの実験では、細胞が生存しようとするために E3 代償性が働いてしまう（代償性が働いた細胞だけが生き残る）ためと考えられる。すなわち、これまでの遺伝子欠失によって同定・解析されてきた Ub 化基質は、必ずしも E3 と基質の生理的関係を反映しているとは言えない。そこで、必要性に基づく解析ではなく、細胞内で E3 によって実際に Ub 化されるタンパク質を直接検出する技法が必要であると考え、本研究の立案にいたった。これにより理論上、哺乳類の 700 種類にのぼる E3 の生理的基質を臓器、細胞種、細胞環境に応じて網羅的に同定できことになる。

３．研究の方法

ERAD-E3 の一つ HRD1 を新規 E3 基質同定法開発のプロトタイプとした。6 回膜貫通 Ring 型 E3 である HRD1 は小胞体ストレスによって発現誘導され、小胞体不良タンパク質の Ub 化に寄与する ERAD 必須因子であるとともに、転写因子などを含む細胞質基質の Ub 化にも関与する。つまり、HRD1 基質は極めて多種であり、ストレス依存的にどのようにして異なった標的分子を Ub 化しているのか、基質認識のメカニズムを含めその詳細については不明な点が多い。HRD1 によるストレス依存的な基質同定が可能になるとともに、他の ERAD-E3 を網羅的に解析し、小胞体膜近傍での UPS による分解システムの全容解明も可能とすることを目指した。具体的には、原核生物版 UPS として同定された Pup（prokaryotic ubiquitin-like protein）と Pup リガーゼ PafA（proteasomal accessory factor A）を利用した。ATP 存在下で PafA は、基質のリジン残基に Pup を共有結合させる。その反応は真核生物の Ub 化と共通だが、E1、E2、E3 を必要としない。従って、哺乳類細胞に、bait タンパク質-PafA の融合分子と Pup を発現させるだけで、prey 分子を Pup 化できる。BCCP（biotin carboxyl carrier protein）タグを付加することで、Pup を biotin 化（BioPup）し avidin プルダウンした。HRD1 は、ストレス誘導性のため、過剰発現ではなく PafA 配列を C 末端にノックイン（KI）した HRD1-PafAKI 細胞を樹立することで、生理的条件下で内在性 Ring 領域により Ub 化され、かつ PafA によって Pup 化された基質を人工的に作出することとした。

４．研究成果

（１）HEK293、HeLa 細胞を用いて、Corynebacterium glutamicum 由来 PafA 遺伝子を CRISPR/Cas により HRD1-C 末端に導入した KI ヘテロ細胞を樹立した。さらに、テトラサイクリンによる発現システムで BCCP-Pup を遺伝子導入し、細胞内在性 biotin により BioPup を発現させた。その結果、ドキソルビシン依存的に HRD1 基質が BioPup 化されることを既知の基質（α1-antitrypsin, transthyretin）を用いて検証できた。さらに avidin プルダウンし、質量分析により新規分子を複数同定することに成功した。

（2）同定した HRD1 による Ub 化分子群について、小胞体ストレス、様々な細胞質ストレスによる Ub 化変動を解析したところ、いくつかの分子が HRD1 欠損細胞でその分解が遅延することが確認された。現在は、臓器特異的、病態モデル特異的な HRD1 基質の同定を目指し、HRD1-PafA と BioPup 発現システムによるノックインマウスの樹立を目指している。

本手法の確立により、13 種類の ERAD-E3 基質を同一細胞、同一環境下で網羅的に同定することが可能になった。今後は、その情報を *in silico* 解析することで ERAD-E3 特異性の法則を見出すことを目指す。さらに、現在作製している *in vivo* での基質解析手法が確立されれば、神経変性疾患などでの病態特異的な基質特異性の変動モニタリングが可能になる。本研究成果は理論上、哺乳類の 700 種類にのぼる E3 全てに応用できる。将来の網羅的 E3 基質解析を可能にし、タンパク質分解だけでなく新規シグナル伝達経路の発見などにも繋がる可能性があるため、その応用性と波及効果は極めて大きいと期待している。

５．主な発表論文等

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

１．著者名 西頭英起	４．巻 75
２．論文標題 褐色脂肪細胞の熱産生とエネルギー代謝	５．発行年 2021年
３．雑誌名 臨床免疫・アレルギー科　科学評論社	６．最初と最後の頁 226-232
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1件（うち招待講演　1件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 門脇寿枝、西頭英起
２．発表標題 ER-resident sensor PERK-mediated regulation of mitochondrial function in brown adipose tissue
３．学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
４．発表年 2021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