

令和 6 年 9 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06171

研究課題名(和文) ユビキチン化反応によりERファジーが終結する分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of ER-phagy termination by ubiquitination

研究代表者

梶保 博昭 (Kajiho, Hiroaki)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：70401221

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)：飢餓状態の細胞は自らの脂質やタンパク質を分解して栄養供給を行っている。特に小胞体の一部を選択的に分解する現象はERファジーと呼ばれている。栄養状態が回復しERファジーが終結するためにはERファジーに関わるタンパク質を速やかに分解する必要があるがその分子機構はわかっていない。本研究課題により小胞体に局在するユビキチンリガーゼLunaparkがERファジー受容体p63をユビキチン化してプロテアソームによるp63の分解を促進することを示した。この結果から、ERファジーの終結にLunaparkによるp63のユビキチン化が重要である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体でのユビキチン化反応は一般的にタンパク質の品質管理機構として用いられる。本研究課題により、小胞体でのユビキチン化反応が飢餓状態から栄養状態の回復に伴うERファジーの終結で重要である可能性が示され、小胞体でのユビキチン化反応の新たな役割を提唱できた。

細胞に感染したウイルスは小胞体で膜を利用して増殖する。ERファジーはこのようなウイルスの排除機構としても用いられている。本研究課題によりLunaparkによるERファジー受容体p63へのユビキチン化の異常がウイルス感染症を引き起こす可能性が考えられる。今後、Lunaparkをターゲットとしたこれらの感染症に対する創薬への応用が十分考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cells degrade intracellular components to regenerate proteins and lipids and to produce energy for survival under starved conditions. This self-digestion process is called autophagy. ER-phagy is a selective form of autophagy for the ER-resident proteins, and is mediated by ER-phagy receptors. When the extracellular circumstance changes from starved conditions to nutrient rich conditions, ER-phagy receptors have to be promptly degraded to terminate ER-phagy. However, the molecular mechanism of the degradation of the ER-phagy receptors remains unknown. We found that Lunapark, a ubiquitin ligase localizing at the three-way junctions of the ER tubular network, binds to p63, one of the ER-phagy receptors. Lunapark ubiquitinated p63 for proteasomal degradation. These results suggest that ubiquitination of p63 by Lunapark is important for ER-phagy termination.

研究分野：生化学

キーワード：小胞体 ユビキチン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞はタンパク質の合成と分解を繰り返して新陳代謝することにより、タンパク質の品質を一定に保っている。細胞内小器官の一つである小胞体は、膜タンパク質の合成や品質管理を行っており、細胞内へのタンパク質供給の開始点として重要な役割を担っている。

栄養が不足して飢餓状態になると細胞は自身のタンパク質を分解して、タンパク質を再合成するための材料を供給している。小胞体では、飢餓時に一部が出芽してオートファゴソームと呼ばれる小胞を形成し、加水分解酵素を多く含むリソソームへと運ばれる。この現象はER ファジーと呼ばれている。飢餓状態から栄養状態が回復すると細胞はER ファジーを終結させて、通常の新陳代謝を行うようになる。この際、ER ファジーに関わるタンパク質の分解がチェックポイントとなりER ファジーが終結することが考えられるがその分子メカニズムは未だ十分解明されていない。

2. 研究の目的

小胞体でのタンパク質の分解経路の一つにユビキチン - プロテアソーム系が知られている。近年小胞体に局在するユビキチンリガーゼの一つがER ファジーに必要であることが報告され、ER ファジーがユビキチン化反応によって調節される可能性が示唆されている。しかし、ER ファジーに関わるタンパク質が栄養状態に応じてユビキチン化されているのか、800種類以上あるユビキチンリガーゼの中で何がER ファジーに関わるタンパク質をユビキチン化しているのかなど、その分子機構は全くわかっていない。そこで本研究課題では、飢餓状態から栄養状態の回復に伴い、ER ファジーに関わるタンパク質がユビキチン化され分解されることで、ER ファジーを速やかに終結させることを想定し、ユビキチン化反応によるER ファジーの終結機構を明らかにすることを本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

(1)小胞体に局在するユビキチンリガーゼ Lunapark のER ファジーへの関与

小胞体の網目構造の連結部位である three-way junction には Lunapark が局在して、three-way junction を安定化している。Lunapark の N 末端の細胞質領域はユビキチンリガーゼを有していることから、Lunapark がER ファジーに関わるかを調べた。Lunapark に対する siRNA (2種類の異なるターゲット配列) およびコントロール siRNA を HeLa 細胞にトランスフェクトした。これらの細胞をリソソームの V-ATPase 阻害剤である Bafilomycin A1 を含む DMEM またはアミノ酸飢餓培地である EBSS で6時間培養後、whole cell lysate を抗 LC3 抗体によりイムノプロットした。また、ER ファジーを特異的に検出する mCherry Cleavage from ER (CCER) アッセイを行った。Lunapark に対する siRNA または control siRNA を mCherry-RAMP4 安定発現 HeLa 細胞にトランスフェクションし、48時間培養した。EBSS に培地交換し、さらに16時間培養した。whole cell lysate を抗 mCherry 抗体によりイムノプロットし、ER ファジーにより mCherry-RAMP4 から mCherry が切断されるかを調べた。

(2)Lunapark がユビキチン化するER ファジー受容体の探索

ER ファジーは小胞体に局在するER ファジー受容体と隔離膜に局在する LC3 との結合を介して行われる。ユビキチンリガーゼである Lunapark がER ファジー受容体のユビキチン化に関わるかを調べた。Lunapark の C 末端に FLAG タグを付与した Lunapark-FLAG とER ファジー受容体の N 末端に myc タグを付与した myc-ER ファジー受容体、HA タグを付与したユビキチン (HA-Ub) をヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞に発現させた。可溶性画分を 90°C で5分処理し、ER ファジー受容体に結合するタンパク質を解離させた後に、抗 myc 抗体で免疫沈降した。免疫沈降画分を抗 HA 抗体によりイムノプロットした。

(3) Lunapark ノックダウン時のER ファジー受容体 p63 のプロテアソームによる分解

Lunapark をノックダウンすると p63 のユビキチン化が減少し、p63 のプロテアソームによる

分解が減少すると考えられる。Lunapark に対する siRNA およびコントロール siRNA を HeLa 細胞にトランスフェクトした。これらの細胞をタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドを含む培地で 0~12 時間培養した。さらに、リソソームのプロテアソーム阻害剤である MG132 の培地への添加の有無による差も調べた。whole cell lysate を p63 に対する抗体によりイムノブロットした。

(4) Lunapark と p63 の結合実験

Lunapark-myc と FLAG-p63 を HEK293 細胞に発現させた。可溶性画分を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、免疫沈降画分を抗 myc 抗体によりイムノブロットした。Lunapark と p63 は中央に膜貫通ドメインを持ち、N 末端と C 末端が細胞質を向いており、ヘアピン型の構造を取っている。そこで、様々な Lunapark と p63 の欠失変異体をそれぞれ作成し、同様に免疫沈降実験を行った。

(5) Lunapark と p63 の細胞内の共局在

Lunapark-FLAG と myc-p63 を HeLa 細胞に発現させた。小胞体のマーカーとして、EGFP-Sec61 β も同時に発現させた。PFA により細胞を固定し、抗 FLAG 抗体と抗 myc 抗体による免疫染色を行った。蛍光顕微鏡により染色した細胞を観察し、Lunapark-FLAG と myc-p63 が小胞体上で共局在するかを調べた。

4. 研究成果

(1) 小胞体に局在するユビキチンリガーゼ Lunapark の ER ファジーへの関与

小胞体の網目構造の three-way junction に局在する Lunapark は、N 末端に細胞質領域はユビキチンリガーゼを有している。Three-way junction で ER ファジーが起きることが報告されていることから、Lunapark が ER ファジーに関わるかを調べた。コントロール siRNA をトランスフェクトした細胞では EBSS 培地での飢餓により脂質修飾を受けた LC3 の量が顕著に増加した。一方、Lunapark に対する siRNA をトランスフェクトした細胞では飢餓状態でも脂質修飾を受けた LC3 の量は増加しなかった。

LC3 の脂質修飾は ER ファジーを含むオートファジー全般が起きた時に起こる現象である。そこで ER ファジーを特異的に検出するため、ER ファジーによる mCherry-RAMP4 からの mCherry の切断を調べる CCER アッセイを行った。コントロール siRNA をトランスフェクトした細胞では EBSS 培地での飢餓によって切断された mCherry が顕著に増加した。一方、Lunapark に対する siRNA をトランスフェクトした細胞では飢餓状態でも mCherry の量は増加しなかった。したがって、Lunapark が ER ファジーに関与することが示唆された。

(2) Lunapark がユビキチン化する ER ファジー受容体の探索

ER ファジーは小胞体に局在する ER ファジー受容体を介して進行する。そこで、Lunapark が ER ファジー受容体のユビキチン化に関わるかを調べた。myc タグをつけた数種類の ER ファジー受容体の HEK293 細胞でのユビキチン化が Lunapark-FLAG の発現により増加するかを調べたところ、ER ファジー受容体のうち p63 のユビキチン化は Lunapark-FLAG の発現によって顕著に増加した。以上の結果より、Lunapark が p63 のユビキチン化に関わる可能性が示唆された。

(3) Lunapark ノックダウン時の ER ファジー受容体 p63 のプロテアソームによる分解

ポリユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームに運ばれて分解される。そこで、p63 の分解に Lunapark が関与するかを調べた。シクロヘキシミドによりタンパク質合成が阻害されているため、コントロール siRNA をトランスフェクトした HeLa 細胞では 4、8、12 時間と時間が経過するに従って内在性の p63 のタンパク量が減少していった。この p63 の減少はプロテアソーム阻害剤 MG132 の添加により抑えられたことから、p63 の分解は主にプロテアソームによって行われていることが示唆された。一方、Lunapark に対する siRNA をトランスフェクトした細胞では、MG132 の有無に関わらず p63 のタンパク質量は時間が経過しても減少しなかった。以上の結果より、Lunapark は p63 のプロテアソームによる分解に関わっていることが明らかとなった。

(4) Lunapark と p63 の結合実験

次に Lunapark が p63 と結合するかを調べた。Lunapark-myc と FLAG-p63 を HEK293 細胞に発現させ、可溶性画分を抗 FLAG 抗体で免疫沈降したところ、Lunapark-myc が FLAG-p63 の免疫沈降画分中に検出された。次に、Lunapark の p63 結合部位を調べるため、Lunapark の様々な欠失変異体-FLAG と myc-p63 を用いて免疫沈降実験を行った。その結果、Lunapark の膜貫通領域が p63 との結合に必要であることがわかった。また、p63 の欠失変異体を用いて Lunapark との免疫沈降実験を行ったところ、p63 は複数の Lunapark 結合部位を持つことが示唆された。

(5) Lunapark と p63 の細胞内の共局在

Lunapark と p63 が細胞内で共局在するかを調べた。Lunapark-FLAG と myc-p63 を HeLa 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体と抗 myc 抗体による免疫染色を行った。Lunapark-FLAG と myc-p63 が小胞体の網目構造の上で共局在する様子が観察された。

以上の結果より、小胞体の網目構造の three-way junction に局在する Lunapark は ER ファジージに重要であること、Lunapark が ER ファジージ受容体の一つである p63 をユビキチン化してプロテアソームにより分解すること、Lunapark が p63 と結合することがわかった。以上のことより、Lunapark と p63 により栄養状態に応じた ER ファジージを制御するメカニズムとして以下のモデルが考えられる。細胞が飢餓状態になると小胞体の p63 が隔離膜の LC3 と結合し、オートファゴソームを形成する。オートファゴソームはリソソームまで運ばれて分解されて ER ファジージが完了する。栄養が回復し ER ファジージの必要が無くなると、Lunapark が p63 をユビキチン化する。ユビキチン化された p63 がプロテアソームまで運ばれて分解され ER ファジージが終結する、というモデルを想定している(図 1)。

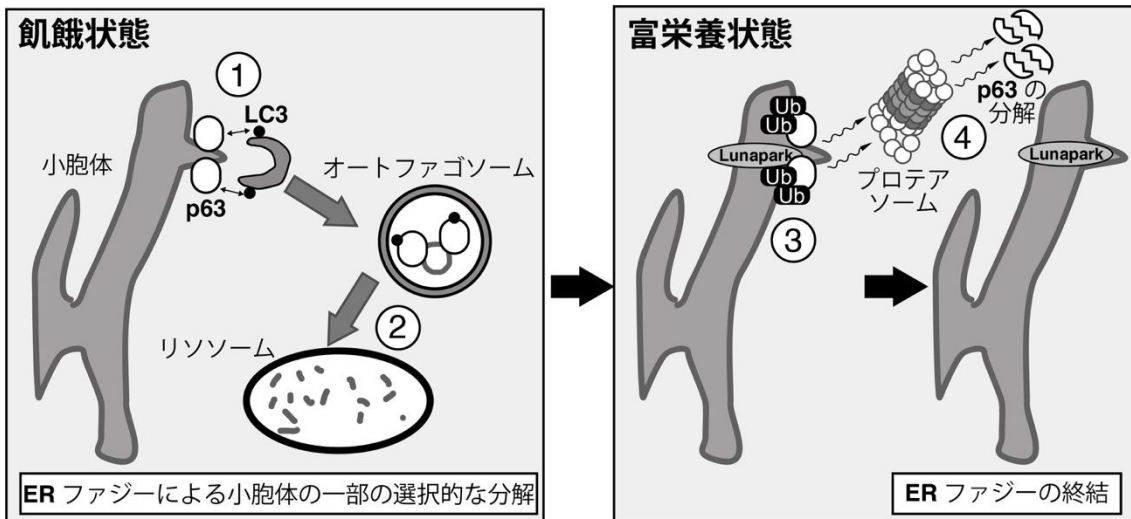


図 1 Lunapark と p63 による栄養状態に応じて ER ファジージを制御するメカニズム

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 Anggrandariyanny, P.C., Kajiho, H., Yamamoto, Y., Sakisaka, T.	4. 巻 172(4)
2. 論文標題 Lunapark ubiquitinates atlastin-2 for the tubular network formation of the endoplasmic reticulum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 245-257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac060	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〕

神戸大学医学研究科膜動態学ホームページ https://www.med.kobe-u.ac.jp/membrd/
--

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
研究協力者	匂坂 敏朗 (SAKISAKA TOSHIAKI) (80359843)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	

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