

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15026

研究課題名(和文)小胞体における不良膜タンパク質のリソソーム分解制御因子の網羅的同定

研究課題名(英文) Identification of genes involved in the lysosomal degradation of aberrant membrane proteins at the endoplasmic reticulum

研究代表者

林 裕輝 (Hayashi, Yuki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任研究員

研究者番号：50879971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体におけるフォールディングに失敗した不良膜タンパク質は有害で様々な疾患の原因になりうるため、選択的分解により除去される。小胞体において不良膜タンパク質を選択的に分解する機構にはプロテアソーム依存的なERAD経路に加え、リソソーム依存的な経路も存在するが、リソソーム経路の詳細な分子機構は不明であった。本研究では、不良膜タンパク質がアダプタータンパクTOLLIPに選択的に認識され、リソソーム分解へ導かれるという新たなタンパク質分解機構の存在を明らかにした。さらにこの経路における基質の認識機構やリソソームへの運搬機構など、詳細な分子メカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質のミスフォールディングは、筋萎縮性側索硬化症や遺伝性痙性対麻痺などの運動神経変性疾患をはじめ様々な疾患の原因となることが提唱されている。膜タンパク質の新規分解経路およびその重要因子を発見した本研究は、ミスフォールド膜タンパク質の選択的除去という、疾患の新たな治療戦略の創出に資するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Misfolded membrane proteins in the endoplasmic reticulum (ER) can cause a variety of diseases. Since they are toxic, they are removed by selective degradation systems in the ER. In addition to the proteasome-dependent ERAD pathway, there is also a lysosome-dependent pathway for selective degradation of misfolded membrane proteins in the ER, but the detailed molecular mechanism of the lysosome pathway has not been clarified. In the present study, we have revealed the existence of a novel proteolytic pathway in which misfolded membrane proteins are selectively recognized by the adaptor protein TOLLIP, leading to lysosomal degradation. I have also elucidated the detailed molecular mechanism of this pathway, including the substrate recognition mechanism and the transport mechanism to lysosomes.

研究分野：タンパク質品質管理、小胞体ストレス

キーワード：リソソーム TOLLIP 膜タンパク質 ユビキチン 小胞体ストレス タンパク質品質管理

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。

1. 研究開始当初の背景

フォールディングに失敗して小胞体に蓄積した膜タンパク質は、小胞体の本来の機能を障害するなどしてストレスを引き起こし、様々な変性疾患の原因にもなりうる。そのため、これら不良膜タンパク質は選択的に分解されることで細胞内から速やかに除去される。小胞体における不良膜タンパク質の選択的な分解経路として最も有名なものは、1990年代初頭に発見された ER-associated degradation (ERAD) 経路である (Ward et al., *Cell*, 1995; Jensen et al., *Cell*, 1995) (図左)。この経路において基質は、小胞体膜上の E3 ユビキチンリガーゼ複合体へと選択的にターゲティングされてユビキチン化され、VCP により細胞質へと引き抜かれたのちにプロテアソーム分解される。

一方で近年、リソソーム分解される不良膜タンパク質の例が多数報告され (Houck et al., *Mol. Cell*, 2014; Schultz et al., *Nat. Commun.*, 2018)、小胞体における膜タンパク質分解にはプロテアソームだけでなく、リソソームも重要であることが示唆された。しかし、ERAD のメカニズム理解は進展している一方、不良膜タンパク質がリソソーム分解されるメカニズムは不明な点が多く、そもそもリソソームが不良膜タンパク質を選択的に分解する「品質管理」の役割を果たすか否かも不明瞭であった。

2. 研究の目的

本研究では、不良膜タンパク質のリソソーム分解に関与する因子を同定し、その因子の詳細な作動機序を生化学的・分子生物学的な解析を通して明らかにすることを目的とした。さらに同定した因子により分解される生理的基質の探索を行うことで、リソソーム分解経路の生理的意義の理解を深めることも目指した。

3. 研究の方法

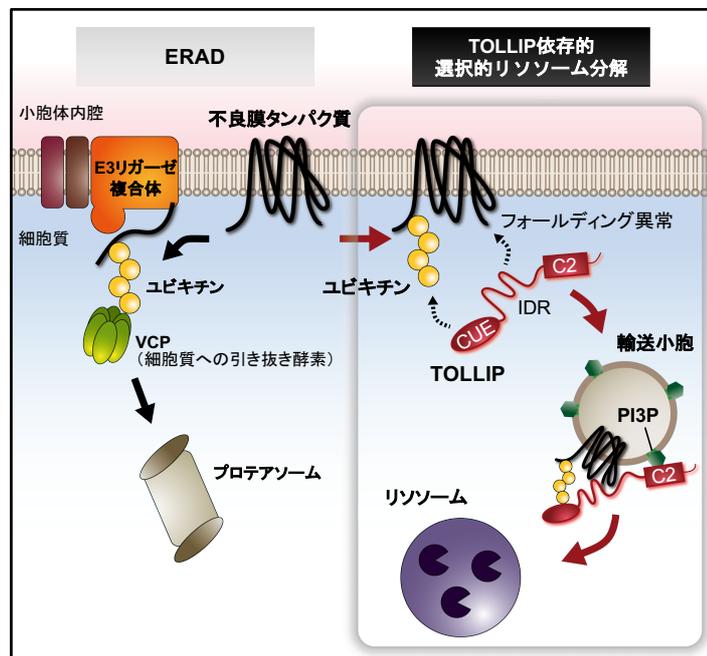
本研究では、artificial な不良膜タンパク質モデルを開発し、そのリソソーム分解機構を解析した。細胞質におけるリソソーム分解基質として知られる α -synuclein A53T 変異体 (Webb et al., *J. Biol. Chem.*, 2003; Cuervo et al., *Science*, 2004) を小胞体膜タンパク質 E-Syt1 のヘアピン領域を用いて小胞体膜にぶら下げたモデル基質を作製したところ効率よくリソソーム分解されたため、このモデル基質を用いて分解機構の解析を行った。以下に示す2つのアプローチを並行して実施し、モデル基質のリソソーム分解に関与する因子を同定したのち、その因子がモデル基質を認識するメカニズムや小胞体からリソソームへと輸送するメカニズムを詳細に解析することとした。

(1) 候補分子アプローチ

既知のタンパク質品質管理因子がモデル基質のリソソーム分解に関与するか否かを検討した。具体的な候補分子としては、細胞質凝集体のリソソーム分解に関与する aggrephagy receptor (p62, NBR1, TOLLIP など)、 α -synuclein のユビキチン化を担う E3 ユビキチンリガーゼ (CHIP, NEDD4 など)、小胞体膜に局在するタンパク質品質管理因子 (HRD1, gp78, Derlin-1 など) について検討した。

(2) ゲノムワイドアプローチ

ゲノムワイド CRISPR/Cas9 スクリーニングでモデル基質のリソソーム分解に必要な因子を網羅的に同定することを試みた。具体的には、リソソーム分解に伴って蛍光特性が変化する mCherry-EGFP もしくは mKeima タグをモデル基質に付加したコンストラクトを用い、sgRNA ライブラリーを導入した際にリソソーム分解が抑制された細胞群を FACS でソートし、次世代シーケンサーでノックアウトされている遺伝子を判別することで、モデル基質のリソソーム分解に必要な遺伝子を同定する。



4. 研究成果

本研究課題の遂行の結果、不良膜タンパク質を選択的に認識してリソソーム分解に導く因子 TOLLIP を同定することに成功した (図右)。TOLLIP を基軸に据えた分子メカニズム解析を通し、小胞体には不良膜タンパク質を選択的にリソソーム分解へ導く新たなタンパク質品質管理機構が存在することを証明した。現在、この研究成果 (下記 1-3) を報告する論文を国際学術誌に投稿済みで、under revision の状態である。

(1) 候補分子アプローチによる、不良膜タンパク質のリソソーム分解促進因子 TOLLIP の同定

まず、上述した既知のタンパク質品質管理因子について、モデル基質のリソソーム分解に関与するか否かを過剰発現や siRNA を用いたノックダウン実験で検討した。その結果、 α -synuclein をユビキチン化してリソソーム分解を促進する因子として報告されていた細胞質ユビキチンリガーゼ NEDD4 (Tofaris et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011) および細胞質 aggrephagy receptor として報告されていた TOLLIP (Lu et al., *Cell*, 2014) について、モデル基質のリソソーム分解に必要な十分であることがわかった。さらに、内在性の NEDD4、TOLLIP いずれもモデル基質を認識することが免疫沈降実験により示されたため、これらは基質認識を介して直接的にモデル基質の分解に寄与することが示唆された。このうち、後述するようにモデル基質以外の不良膜タンパク質も認識および分解促進することが判明した TOLLIP に着目して解析を行うこととした。

一方、ゲノムワイド CRISPR スクリーニングを実施するために FACS でモデル基質のリソソーム分解の検出を試みたが、リソソーム阻害剤 Bafilomycin A1 を処置した際の蛍光特性の変化は小さく、ゲノムワイドスクリーニングで分解関連因子を同定するためのプローブとしては頑健性のない不適切なものであることが判明した。従って、モデル基質の分解関与因子を同定するためのゲノムワイドスクリーニングは実施しないこととした。

(2) TOLLIP 依存的なリソソーム分解経路の分子メカニズム解析

まず、TOLLIP のドメイン変異体を用いて、モデル基質のリソソーム分解に必要なドメインを探索した。その結果、リン脂質結合ドメイン C2、機能未知の intrinsically disordered region (IDR)、ユビキチン結合ドメインの CUE が必要であることを見出した。このうち、IDR と CUE ドメインは基質認識に関与し、免疫沈降法やリコンビナントタンパク質を用いた in vitro binding assay を用いた解析の結果、IDR はタンパク質のミスフォールディングを認識し、CUE は基質のユビキチン鎖を認識することが明らかとなった。また、共焦点顕微鏡を用いた解析により、C2 ドメインとリン脂質の一種 phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) との結合を介して TOLLIP は不良膜タンパク質を PI3P が豊富な輸送小胞へとターゲティングし、最終的に基質はリソソームへ移行して分解されることが明らかとなった。この TOLLIP 依存的な不良膜タンパク質のリソソームへの輸送にはオートファゴソーム形成因子 (FIP200、ATG7) および ER-Golgi 間輸送 (COPII) が関与しないことを見出した。したがって、TOLLIP は基質を小胞体からリソソームへと向かう直接的な小胞輸送を介して運搬していることが示唆された。

(3) TOLLIP 依存的なリソソーム分解経路の生理的意義

続いて、TOLLIP が artificial なモデル基質以外の生理的な不良膜タンパク質のリソソーム分解も担うか否かを検討した。疾患関連変異を持ち、小胞体に不良膜タンパク質として蓄積することが報告されている様々な膜タンパク質の中から、VAPB の筋萎縮性側索硬化症変異体 (P56S) および Seipin の遺伝性痙性対麻痺変異体 (N88S および S90L) が TOLLIP 依存経路の分解基質となることを見出した。TOLLIP を発現抑制した細胞では、これらの基質、とりわけミスフォールドしたユビキチン化体が顕著に蓄積する様子が見られた。また、神経系の細胞である SH-SY5Y や NSC34 において、TOLLIP は Seipin 変異体の選択的な分解を促進し、かつ Seipin 変異依存的な疾患発症に密接に関連があると提唱されている小胞体ストレス (Yagi et al., *Hum. Mol. Genet.*, 2011) も寛解した。

つい最近、海外の乳がんを専門に扱うグループから、TOLLIP が小胞体膜タンパク質 Derlin-1 や TMEM63A のリソソーム分解を促進することを示唆するデータが報告された (Zhang et al., *Autophagy*, 2022)。そのため、TOLLIP は疾患変異体だけでなく、様々な内在性膜タンパク質を分解することで小胞体全体の恒常性維持に寄与している可能性が示唆された。そこで、TOLLIP を欠損させた HEK293A 細胞において小胞体ストレス状態を検討したところ、VCP 阻害剤もしくは 20S プロテアソーム阻害剤を用いて ERAD を阻害した条件において、TOLLIP 欠損による顕著な小胞体ストレス誘導が確認された。この結果から、TOLLIP 依存経路が ERAD のバックアップ機構として ERAD 阻害時の小胞体ストレス誘導を防ぎ、小胞体の恒常性を維持する機能があることが示唆された。

(4) TOLLIP 非依存的なリソソーム分解経路の探索に向けた実験系の構築

上述の通り、TOLLIP は様々な不良膜タンパク質のリソソーム分解を担うことが示唆された。

しかし、検討の過程で、いくつかの不良膜タンパク質は TOLLIP に認識されず、TOLLIP 非依存的にリソソーム分解されることが明らかとなった。この TOLLIP 非依存的基質のうち、白内障変異を持つある膜タンパク質について mKeima タグを付加して FACS でリソソーム分解を評価したところ、上述のモデル基質より遥かに顕著に Bafilomycin A1 依存的な蛍光特性の変化が見られ、この基質は非常に盛んにリソソーム分解されることが示唆された。そこで、当初予定していた artificial モデル基質を用いたスクリーニングの代わりに、この白内障変異体を新たなモデル基質として用い、ゲノムワイド CRISPR スクリーニングで TOLLIP 非依存的経路に関与する因子を網羅的に同定しようと考えた。スクリーニングに用いるための基質および Cas9 を恒常的に発現する細胞株は樹立済みであり、現在、スクリーニングの実施に向けた詳細なスキームを構築中である。この TOLLIP 非依存的経路の解析は、令和 5 年度より開始する若手研究において実施予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 林裕輝
2. 発表標題 選択的リソソーム分解を介した小胞体における膜タンパク質の新たな品質管理機構
3. 学会等名 第15回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hayashi, Y., Ichijo, H.
2. 発表標題 Selective lysosomal degradation of aberrant ER membrane proteins by the cargo adaptor TOLLIP
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩谷健人、林裕輝、一條秀憲
2. 発表標題 ゲノムワイドCRISPR/Cas9スクリーニングによる不良膜タンパク質のリソソーム分解機構の探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林裕輝、一條秀憲
2. 発表標題 選択的リソソーム分解を介した小胞体における膜タンパク質品質管理機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林裕輝
2. 発表標題 選択的リソソーム分解を介した小胞体膜タンパク質品質管理機構
3. 学会等名 新学術領域「マルチモードオートファジー」第4回班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林裕輝、一條秀憲
2. 発表標題 選択的リソソーム分解を介した小胞体における膜タンパク質の新たな品質管理機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林裕輝、一條秀憲
2. 発表標題 選択的リソソーム分解を介した小胞体における膜タンパク質の新たな品質管理機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早川怜志、林裕輝、一條秀憲
2. 発表標題 ゲノムワイドCRISPR/Cas9スクリーニングによる小胞体における不良膜タンパク質のリソソーム分解機構の探索
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林裕輝
2. 発表標題 Selective lysosomal degradation of aberrant ER membrane proteins by the cargo adaptor TOLLIP
3. 学会等名 EMBO Workshop Protein quality control: From molecular mechanisms to therapeutic intervention (国際学会)
4. 発表年 2023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