

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570183

研究課題名（和文） 小胞体関連分解を担う小胞体膜上のユビキチンリガーゼ複合体の研究

研究課題名（英文） Analysis of the ubiquitin-ligase complex in the endoplasmic reticulum membrane that regulates endoplasmic reticulum-associated degradation in mammals

研究代表者

細川 暢子（HOSOKAWA NOBUKO）

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：00263153

研究成果の概要（和文）：細胞内小器官の 1 つ小胞体では、多くのタンパク質の生合成が行われる。ところが生合成の過程で、タンパク質はしばしば高次構造形成に失敗してしまう。細胞にはこのような異常タンパク質をサイトゾルに引き出し、ユビキチン化して分解するシステムがあり、小胞体膜にユビキチンリガーゼ複合体が存在している。本研究では、このユビキチンリガーゼ複合体の安定性を調べるとともに、細胞は複合体形成状態を変化させることでタンパク質の分解機能を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Endoplasmic reticulum (ER) is an organelle in which various kinds of proteins are synthesized. Newly synthesized proteins that failed to obtain their native conformations are retrotranslocated out of the ER, and degraded by the cytoplasmic proteasome after the addition of ubiquitins by the ubiquitin ligase complex that resides in the ER membrane. In the present study, we have analyzed the stability of each component of the complex and found that the dynamic change of the component of the complex regulates the degradation of misfolded substrates.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：小胞体、小胞体関連分解、ユビキチンリガーゼ、タンパク質品質管理、HRD1-SEL1L 複合体、レクチン

1. 研究開始当初の背景

小胞体では、多くの分泌タンパク質や膜タンパク質の生合成が行われている。多細胞生物では、細胞接着や細胞間コミュニケーションのために多くの膜タンパク質や分

泌タンパク質が産生されるようになり、細胞は発達した小胞体をもつようになる。一方で、細胞や個体に種々のストレスがかかった場合や、遺伝子に変異がある場合に加えて、通常の生合成過程においてもタンパ

ク質はしばしば高次構造形成に失敗することから、小胞体には多くのミスフォールドしたタンパク質が蓄積してくる。このような構造異常タンパク質は、サイトゾルへ引き出されてユビキチン化された後、プロテアソームで分解される事が明らかにされ、小胞体関連分解(ER-associated protein degradation; ERAD)と呼ばれている。

小胞体関連分解において、分解基質のユビキチン化を担うリガーゼ(E3)は、小胞体膜上に存在することが知られている。出芽酵母では、複数回膜貫通領域をもつ Hrd1/Der3 が ERAD に必須のユビキチンリガーゼであることが解明されている。Hrd1 は サイトゾルにリガーゼドメインをもっており、小胞体内腔に比較的大きなドメインをもった膜タンパク質 Hrd3 と複合体を形成すること、また Hrd1-Hrd3 複合体を形成して初めて安定に存在することが知られている。ここ数年の間に、酵母小胞体膜上には、Hrd1-Hrd3 を中心とし、小胞体内腔側にはレクチンである Yos9 やシャペロンタンパク質 Kar2 が、サイトゾル側には ATPase 活性をもつ Cdc48 が結合し、「品質管理複合体」を形成することが次々と明らかにされてきた(Gause *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2006; Denic *et al.*, *Cell*, 2006; Calvalho *et al.*, *Cell*, 2006)。一方、哺乳類に関しては、2008 年になって、申請者らを含めて 3 つのグループから、酵母と同様の複合体が存在して、小胞体品質管理を制御していることが示され(Christianson *et al.*, *Nat. Cell Biol.*; Hosokawa *et al.* *JBC*; Mueller *et al.*, PNAS)、引き続き活発な研究が展開されている。

申請者らは、哺乳類の小胞体膜上に HRD1-SEL1L を中心とした品質管理複合体が存在すること、この複合体は、糖タンパク質のみならず、糖鎖をもたないタンパク質の分解も制御していること、SEL1L をノックダウンするとミスフォールドしたタンパク質の分解が抑制されることを明らかにした(Hosokawa *et al.* *JBC*, 2008)。さらに、ERAD の分解シグナルとなる糖鎖構造を明らかにしてきた(Hosokawa *et al.* *JBC*, 2009)。

哺乳類においても、ERAD 基質分解過程において、HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体は中心的な役割を担っていることから、本研究において、HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体の機能解明に取り組む。

2. 研究の目的

(1) HRD1-SEL1L 複合体の安定性およびその制御機構の解析

酵母の Hrd1p は不安定なタンパク質で、Hrd3p と結合して初めて細胞内で安定して発現することが知られている。最近申請者らは、ヒト培養細胞を用いて、逆に HRD1 が SEL1L の安定的発現に重要であることを見いだした。HRD1 の発現量の変動は、小胞体関連分解の調節を介して、酵母の生育に影響を及ぼし、またマウス関節炎の発症にも関わることが知られている。哺乳類培養細胞において、これらの現象の基盤となる細胞内メカニズムを解明する。

(2) HRD1-SEL1L を含む品質管理複合体の形成状態と、基質分解機能との相関関係の解明

SEL1L は小胞体内腔に比較的大きなドメインをもち、新規小胞体レクチン OS-9、XTP3-B や、小胞体シャペロンタンパク質 BiP などと結合している。SEL1L や HRD1 を RNAi 法でノックダウンした場合に、ERAD 基質の分解が抑制されるが、この時 HRD1-SEL1L と相互作用する因子との複合体形成状態はどのように変化するのかを調べ、機能との相関を明らかにする。

(3) HRD1-SEL1L 複合体によるミスフォールドした基質の認識機序の解析

ERAD で分解される糖タンパク質は、ミスフォールドしたペプチド鎖と、分解シグナルとなる糖鎖構造の両方が認識されて初めて分解系へと仕分けられる。HRD1-SEL1L 複合体が ERAD 基質をどのようにして認識しているのかについて解析する。

3. 研究の方法

(1) 主としてヒト培養細胞(HEK 293 細胞)を用いて実験を行った。

(2) タンパク質を発現ベクターにクローニングして細胞に発現させた。トランスフェクション法によってタンパク質を一過性に発現させたり、あるいは内在性のタンパク質を siRNA を用いた RNAi 法によってノックダウンして機能解析を行った。

(3) 一過性に発現させたタンパク質や内在性タンパク質の検出には、それぞれ、特異的抗体や付加したタグに対する抗体を用いた。ウェスタンブロット法を用いてタンパク質の発現量を検出し、またラジオアイソトープを用いて代謝ラベルした後、免疫沈降法を用いてタンパク質の発現量および細胞内での安定性を検討した。抗体は市販のものを購入、あるいは特異的抗体を作製して実験に用いた。

(4) タンパク質の複合体形成状態は、代謝ラベルした細胞を用いた免疫共沈降法や、免疫共沈降物に対してウェスタンブロットを行って検出した。また、シヨ糖密度勾配超遠心法を用いて細胞を分画し、複合体形成状態を検討した。

(5) ERAD で分解されるモデル基質として、 α 1-antitrypsin の変異体である NHK および NHK-QQQ を用いた。細胞を代謝ラベルし、パルス-チェイス法によって ERAD で分解される基質タンパク質の発現量を定量し、基質の分解速度を検出した。

(6) 大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を発現させ、FPLC を用いてタンパク質の精製を行った。

4. 研究成果

(1) まず、HRD1-SEL1L 複合体の安定性およびその制御機構を調べた。その結果、SEL1L は半減期の短い不安定なタンパク質であるが、HRD1 と複合体を形成することによって細胞内で安定に存在することが明らかになった (図 1)。酵母ではユビキチンリガーゼである Hrd1p が不安定なタンパク質で、SEL1L ホモログである Hrd3p と結合することによってはじめて安定に存在できることが知られている。一般に小胞体タンパク質の品質管理メカニズムは酵母からヒトまで良く保存されているが、その中心的役割を担うユビキチンリガーゼ複合体の安定性については、ヒトと出芽酵母において逆の制御機構をもつことが明らかになった。その生物学的意義の解明は今後の課題である。

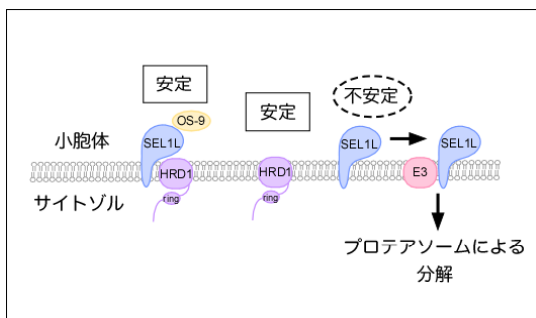


図 1 小胞体膜に存在する HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体の安定性制御 (模式図)

(2) HRD1-SEL1L 複合体の細胞内存在状態を調べたところいくつかの複合体を形成することが明らかになった (図 2、Complex I と Complex II)。ダイナミックに複合体形成状

態を変化させることで分解機能を制御している可能性が考えられる。

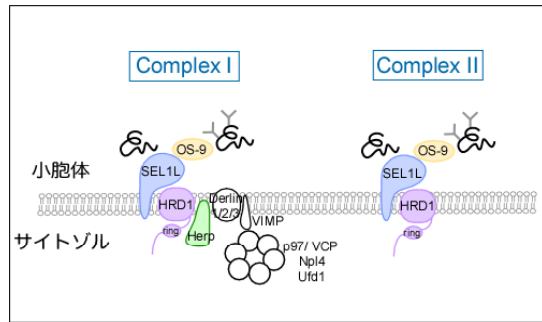


図 2 HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体における複合体形成状態の変化 (模式図)

(3) SEL1L は単独で発現させると、細胞内では速やかに分解される。SEL1L の分解は ERAD 経路によるものであること、および SEL1L の分解にかかわるユビキチンリガーゼは、HRD1 とは異なる別のユビキチンリガーゼであることが示された (図 1)。

(4) HRD1、SEL1L および HRD1-SEL1L を一過性に細胞に発現させることによって、HRD1-SEL1L 複合体は ERAD 基質の分解速度を調節していることを明らかにした。

(5) 小胞体レクチン XTP3-B と HRD1-SEL1L 複合体の機能について解析した。その結果、XTP3-B タンパク質は SEL1L と結合してはじめて安定に存在できること、内在性の XTP3-B タンパク質はすべて SEL1L と結合して小胞体膜上の品質管理複合体に存在することが明らかになった。

(6) XTP3-B は成熟途上にある糖タンパク質の分解を抑制する機能があることを明らかにした。我々はすでに、XTP3-B のホモログであるレクチン OS-9 が、HRD1-SEL1L 複合体と結合すること、特定の糖鎖構造を認識してミスfoldした糖タンパク質に結合し ERAD を促進することを報告している。これらの結果を総合すると、HRD1-SEL1L を含む品質管理複合体は、パートナーとなるレクチンを使い分けることによって、基質の分解を促進するのみならず、フォールディング途上にある未成熟なタンパク質の分解を防ぐ働きもしていることが示唆された (図 3)。

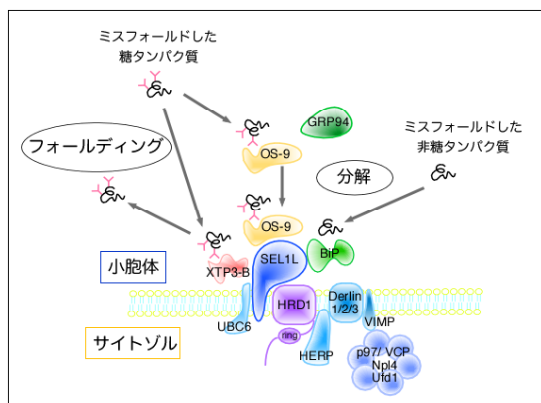


図3 HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体とレクチンの結合によるミスフォールドした ERAD 基質分解の制御機構 (模式図)

(7) さらに HRD1 および SEL1L それぞれのタンパク質が、どのようにして基質を認識し、小胞体からの基質の運び出し、ユビキチン化に関与しているかについて検討を進めた。その結果、大変興味深い結果が得られてきた。現在、そのメカニズムを解明する実験を進めており、論文として発表する準備を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Fujimori T, Kamiya Y, Nagata K, Kato K, Hosokawa N*: Endoplasmic reticulum lectin XTP3-B inhibits endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded α 1-antitrypsin variant. *FEBS J.*, 査読有、Vol. **280**, 2013, 1563-1575 DOI:10.1111/febs.12157
- ② Iida Y, Fujimori T, Okawa K, Nagata K, Wada I, and Hosokawa N*: SEL1L protein critically determines the stability of the HRD1-SEL1L endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) complex to optimize the degradation kinetics of ERAD substrates. *J. Biol. Chem.*, 査読有、Vol. **286**, 2011, 16929-16939 DOI:10.1074/jbc.M110.215871
- ③ 細川暢子: ERAD (小胞体関連分解) を制御するレクチン OS-9 と XTP3-B. *生化学*、査読有、Vol. 83, No.1, 2011, 44-49
- ④ Hosokawa N*, Tremblay LO, Sleno B, Kamiya Y, Wada I, Kato K, Nagata K, and Herscovics A.: EDEM1 accelerates the

trimming of α 1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans. *Glycobiology*, 査読有、Vol. **20**, 2010, 567-575

DOI:10.1093/glycob/cwq001

- ⑤ Hosokawa N*, Kato K, Kamiya Y. Mannose 6-phosphate receptor homology domain-containing lectins in mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation. *Methods in Enzymology*, 査読無、Vol. **480** (Ed. M. Fukuda) Elsevier, 2010, 181-197 DOI:10.1016/S0076-6879(10)80010-2
- ⑥ Hosokawa N*, Kamiya Y, Kato K. The role of MRH domain-containing lectins in ERAD. *Glycobiology*, 査読有、Vol. **20**, 2010, 651-660 DOI:10.1093/glycob/cwq013

[学会発表] (計 8 件)

- ① Hosokawa N: Homeostasis and quality control of proteins in cells. The Joint Symposium of the 7th International Symposium of the Institute Network and the 45th IDAC Symposium, the 2nd Symposium for Joint Usage/Research Center of Aging. "Research Frontiers for Smart Aging" (口頭発表) (2012. 6. 15、仙台市)
- ② Hosokawa N: Roles of N-glycans in the regulation of mammalian glycoprotein quality control. 第34回日本分子生物学会年会シンポジウム "Glycoprotein quality control: Biosynthesis, molecular recognition and physiological roles of N-glycans" (口頭発表) (2011. 12. 16、横浜市)
- ③ Fujimori T, Kamiya Y, Kato K, Nagata K, Hosokawa N: The novel role of MRH domain-containing lectin XTP3-B in endoplasmic reticulum quality control. 第34回日本分子生物学会年会 (2011. 12. 13-16、横浜市) (口頭及びポスター発表)
- ④ 細川暢子: 小胞体における糖鎖修飾とタンパク質品質管理機構. 第84回日本生化学会大会シンポジウム「糖鎖修飾: システムズバイオロジーへの展望」 (口頭発表) (2011. 9. 22、京都市)
- ⑤ Hosokawa N: Lectins and enzymes that regulate the mammalian glycoprotein quality control.: The 31st Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [II] Metabolites, Stress response, Microdomains, and Beyond. Sapporo (Japan) (2011. 9. 14)
- ⑥ Fujimori T, Kamiya Y, Kato K, Nagata K, Hosokawa N: Functional analysis of MRH

domain-containing lectin XTP3-B in the endoplasmic reticulum quality control. The 31st Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [II] Metabolites, Stress response, Microdomains, and Beyond. Sapporo (Japan) (2011.9.13-16)

⑦ Hosokawa N, Iida K, Okawa K, Nagata K. : Formation of HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex that regulates the mammalian ERAD. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara (Japan) (2010.9.13-16)

⑧ Fujimori T, Kamiya Y, Kato K, Nagata K, Hosokawa N. : Functional analysis of a mammalian lectin XTP3-B in the endoplasmic reticulum quality control. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara (Japan) (2010.9.13-16)

[その他]

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/bf01>

(研究室ホームページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 暢子 (HOSOKAWA NOBUKO)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：00263153

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：