

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770162

研究課題名（和文） 小胞体関連分解における糖タンパク質の新しい分解経路の解明

研究課題名（英文） Analysis of endopeptidase reactions involved in ERAD

研究代表者

細見 昭 (HOSOMI AKIRA)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・特別研究員

研究者番号：60525864

研究成果の概要（和文）：

真核細胞において、小胞体で発生した異常タンパク質は細胞質に出されユビキチン-プロテアソーム系で分解される。この分解機構を小胞体関連分解（ER-associated degradation; ERAD）という。ERADをより理解するために、酵母において、ERADで機能すると考えられる未知のエンドペプチダーゼを同定し、その機能を調べることを目的にしている。可溶性の異常タンパク質を切断する候補として Ste24 を同定した。

研究成果の概要（英文）：

ER quality control (ERQC) is a protein surveillance system, which scrutinizes the folding status of newly synthesized proteins in the ER. In this system, aberrant proteins, which fail to form a functional folding/complex, will be degraded by a degradation pathway called ER-associated degradation (ERAD). In this study, novel endopeptidase reaction involved in ERAD process was analyzed. Ste24 is identified as a candidate of "ERAD endopeptidase".

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 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・機能生物化学

キーワード：ERAD、糖タンパク質、PNGase、エンドペプチダーゼ

1. 研究開始当初の背景

「小胞体関連分解（ERAD）とは」

真核細胞内でつくられた分泌および膜タンパク質はリボソームから小胞体（ER）へ運ばれる。ERへ運ばれたタンパク質はER局在シャペロンによって立体構造が整えられる。正しい構造を獲得したタンパク質はそれぞれの目的地に輸送される。一方、正しい構造を獲得できなかったタンパク質はERに停留され、再度、立体構造が整えられる。このよ

うに、タンパク質はER内で厳しい選別を受ける。最終的に正しい立体構造を獲得できなかったタンパク質は細胞質に出され、ユビキチン修飾を受ける。そして、ユビキチンが分解シグナルとなり、プロテアソームというタンパク質複合体へ運ばれて分解される。この分解機構は小胞体関連分解（ER-associated degradation, ERAD）と呼ばれる。ERADは酵母からヒトまでよく保存されており、リソソーム分解系と並ぶ基本的な細胞内タンパ

ク質分解機構である。近年、ERAD とアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、嚢胞性線維症等との関連を示す報告が相次いでおり、ERAD の全容解明が必要となっている。

「糖鎖脱離過程の謎」

これまでにたくさんの ERAD モデルタンパク質が確立され、それらを利用してタンパク質とプロテアソームの関係が明らかにされてきた。プロテアソームは筒状の狭い構造であるため、分解されるタンパク質は立体構造を解かれてからプロテアソームに入ると考えられている。同様に糖鎖も分解の邪魔になるので、プロテアソームに入る前に、細胞質糖鎖脱離酵素ペプチド:N-グリカナーゼ (PNGase) がタンパク質から糖鎖を切り離すと考えられている。そう考えると、ERAD で分解される糖タンパク質をチェイスして分子量を調べた場合、バンドが糖鎖分下にシフトした後にタンパク質が分解されて減っていくはずである。ところが、酵母の代表的な ERAD モデル糖タンパク質 CPY* (液胞内局在カルボキシペプチダーゼ Y の 1 アミノ酸変異体) では糖鎖分の分子量が減少することなくタンパク質が分解されていくことが報告されており、糖鎖が切り離されていないように見えてきた。ゆえに PNGase が本当に ERAD で機能しているか分からなかった。しかし、興味深いことに、申請者が所属する研究室で、植物由来 ERAD モデル糖タンパク質リシン A 鎖 (RTA) において、糖鎖分の分子量が減少してからタンパク質が分解されて減っていくという現在考えられている理論通りの分解が世界で初めて検出された。この結果から、やはり PNGase によって ERAD で分解される糖タンパク質から糖鎖が切り離されていると考えられる。では、なぜ CPY* では糖鎖分の分子量の減少が見られないままタンパク質が分解されるように見えるのか？この謎を解くことができれば、ERAD において糖鎖がいつどこで切り離され、タンパク質がどのように分解されているのかが分かるはずである。

2. 研究の目的

CPY*を詳しく解析するために、N 末端と C 末端両方にタグを連結した FLAG-CPY*-HA を作製した。FLAG-CPY*-HA を、プロテアソームによるタンパク質分解が極度に抑えられた変異株 *cim5-1* と、さらに *cim5-1* から糖鎖脱離酵素である PNGase 遺伝子を無くした *cim5-1 png1Δ* 二重変異株に発現させて、それぞれのタグの抗体でウェスタンブロッティングを行った。その結果、興味深いことに、両株において、今まで全く予想されてい

なかった CPY*全長より小さい CPY*中間体を FLAG 抗体で検出することができた。しかも、検出された CPY*中間体は *cim5-1* よりも *cim5-1 png1Δ*の方が大きかった。そこで、両株の中間体を糖鎖切断酵素 Endo-H で処理したところ、中間体の分子量が一致した。この結果は、ERAD で機能していることが確定できなかった PNGase が RTA 以外の糖タンパク質からも糖鎖を脱離していることを示した画期的な発見である。これまでの ERAD 研究では、モデルタンパク質の全長のバンドが薄くなっていくことを分解と見ていたので、糖鎖脱離が検出できなかったと考えられる。さらに、初めて CPY*中間体の存在を確認したので、中間体の産生が ERAD 機構にとって何か意味があるのではないかと考えた。そこで、中間体の産生が可溶性タンパク質の CPY*だけでなく膜タンパク質でも起こる普遍的な現象なのかを確かめるために、RTA の膜貫通型モデル糖タンパク質 RTL の N 末端と C 末端両方にタグを連結した FLAG-RTL-V5 を作製して CPY*と同様の実験を行った。その結果、RTL も CPY*と同様に中間体が産生されることを発見した。プロテアソームはタンパク質を末端から分解すると考えられているので、この切断はプロテアソーム以外のプロテアーゼ活性で起こったと推測される。これらの事実は、可溶性でも膜貫通型でも ERAD で分解される糖タンパク質は未知のエンドペプチダーゼで切断されることを示している。ゆえに、エンドペプチダーゼの同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) RTL 切断酵素の同定

酵母の非必須のエンドペプチダーゼ遺伝子が 43 個の遺伝子破壊株及び過剰発現株を用いて RTL 切断酵素の同定を試みた。さらに、RTL の変異体を作製して RTL 切断部位の同定を試みた。

(2) CPY*切断酵素の同定

CPY*の中間体は酵母野生株では検出できない。ゆえに、単純に酵母の非必須のエンドペプチダーゼ遺伝子 43 個の遺伝子破壊株に CPY*を発現させても中間体の生成を確認することはできない。そこで、もう一つの可溶性 ERAD モデルタンパク質 RTA を用いて、CPY*分解に関与するエンドペプチダーゼ遺伝子の推定を行った。見つかった候補遺伝子と ERAD 関連遺伝子の二重破壊株を作製してその性質を確認した。

4. 研究成果

(1) RTL 切断酵素の同定

酵母のゲノムデータベースを調べたところ、生育に非必須のエンドペプチダーゼ遺伝子が43個あったので、43個のエンドペプチダーゼ遺伝子破壊株にFLAG-RTL-V5を発現させて、ウエスタンブロッティングを行い、酵母野生株よりRTL中間体が少なくなる遺伝子破壊株を探した。しかし、野生株よりRTL中間体が少なくなる遺伝子破壊株は無かった。RTL中間体の分子量からRTLの切断はER膜付近で起こっていると推測された。そこで、膜貫通ドメイン前後の領域を数塩基毎にアラニンに置換した変異RTLを作製し、ウエスタンブロッティングを行った。しかし、全てのRTLアラニン変異体においてRTL中間体が検出され、切断部位の同定には至らなかった。次に、膜貫通領域近傍にmycタグを挿入したRTL-myc変異体を複数作製し、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、膜貫通領域内の切断を示唆するデータを得た。さらに、43個のエンドペプチダーゼを過剰発現させたところロンボイドプロテアーゼファミリーに属するPcp1遺伝子の過剰発現株でRTL中間体の増加が確認された。タンパク質の膜貫通領域を切断する酵素としてロンボイドファミリープロテアーゼが知られている。そこで、出芽酵母でロンボイドホモログを検索すると、Pcp1を含めて計5個のホモログ遺伝子が見つかった。ゆえに、RTL中間体を蓄積するhul5遺伝子破壊株をベースにし、ロンボイドホモログ5遺伝子と遺伝子破壊を重ねた六重破壊株を作製し、FLAG-RTL-V5のウエスタンブロッティングを行ったが、六重破壊株においても依然としてRTLのC末端側中間体の蓄積が検出された。この結果は、少なくともロンボイドプロテアーゼのみがRTLを切断しているわけではないことを示している。しかし、Pcp1遺伝子過剰発現株でRTLの中間体の増加が検出されたので、Pcp1の活性中心に変異を導入したPcp1(S256G)を作製して解析を行った結果、Pcp1とPcp1(S256G)で中間体増加に有意差が見られなかった。したがって、Pcp1が酵素としてRTLの切断を行っていることが確認できなかった。ゆえに、RTLを切断する酵素の同定には至らなかった。

(2)CPY*切断酵素の同定

CPY*の中間体は酵母野生株では検出できない。ゆえに、43個のエンドペプチダーゼ遺伝子破壊株にCPY*を発現させても中間体の生成を確認することはできない。ゆえに、もう一つの可溶性ERADモデルタンパク質RTAを用いた。43個のエンドペプチダーゼ遺伝子破壊株にFLAG-RTAを発現させて、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、Ste24遺伝子破壊株でFLAG-RTAの分解異常が観察され、Ste24がERADに関与することが示唆された。そこで、cim5-1 ste24Δ二重変異株を

作製し、FLAG-CPY*-HAを発現させた。ウエスタンブロッティングを行った結果、cim5-1株でと比べてCPY*中間体の減少が見られた。この結果はSte24がCPY*の切断に関与することを示している。しかし、cim5-1 ste24Δ二重変異株においても僅かながらCPY*中間体が検出されたので、他のエンドペプチダーゼの存在が示唆された。このSte24の機能を調べるためにSte24遺伝子破壊株とERAD因子の遺伝子破壊株の二重破壊株を作製した。二重遺伝子破壊株の生育を調べたところ、酵母には高温である37°Cや小胞体ストレスを起すDTT(ジチオトレイトール)に対して感受性を示した。この結果はSte24がERADで機能していることを示唆している。

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0件)

[学会発表] (計5件)

- ① Akira Hosomi and Tadashi Suzuki、Analysis of endopeptidase reactions involved in ERAD、第35回日本分子生物学会年、2012年12月、福岡市
- ② Akira Hosomi and Tadashi Suzuki、Analysis of endopeptidase reactions involved in ERAD、Joint Meeting of the Society for Glycobiology and American Society for Matrix Biology、2012年11月、サンディエゴ(アメリカ)
- ③ 細見 昭、鈴木 匡、ERADにおけるエンドペプチダーゼ活性の解析、酵母遺伝学フォーラム第45回研究報告会、2012年9月、宇治市
- ④ 細見 昭、鈴木 匡、ERADにおけるエンドペプチダーゼ活性の解析、第84回日本生化学会大会、2011年9月、京都市
- ⑤ 細見 昭、鈴木 匡、ERADで機能するエンドペプチダーゼの解析、酵母遺伝学フォーラム第44回研究報告会、2011年9月、福岡市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細見 昭 (HOSOMI A)
独立行政法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究
チーム・特別研究員
研究者番号：60525864

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし