

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658262

研究課題名(和文) CLPTM1が関わる新しい小胞体品質管理分子機構と疾患

研究課題名(英文) A novel role of CLPTM1 in the ER-associated degradation of membrane proteins

研究代表者

稲葉 睦 (INABA, MUTSUMI)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授

研究者番号：00183179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ユビキチン化や糖鎖認識に非依存性という特徴をもつ、アニオン交換輸送体AE1変異体の小胞体関連分解(ERAD)におけるCLPTM1の役割を解明することである。AE1変異体を発現させたHEK細胞における解析から、CLPTM1がERに分布し、KIAA0090、p97/VCP、Derlins、calnexin等と相互作用することを明らかにした。CLPTM1は、R664X AE1と特異的に結合するものの、その存否はR664X AE1のプロテアソーム分解に影響しなかった。一方で、KIAA0090とp97/VCPは、やはりR664X AE1と結合し、そのプロテアソーム分解を促進した。

研究成果の概要(英文)：The ER-associated degradation (ERAD) of various polytopic membrane proteins involves recognition of the polypeptide in the ER and its retrotranslocation into the cytosol, leading to its degradation by the proteasome system. The purpose of the present study was to unravel the role of CLPTM1 in the ERAD of an AE1 anion exchanger mutant, R664X AE1, with characteristic features of ubiquitin- and glycosylation-independence. In HEK293 cells expressing the AE1 mutant, CLPTM1 was localized in the ER and associated with several ER chaperone proteins including KIAA0090, p97/VCP, Derlins, and calnexin. However, overexpression or suppression of CLPTM1 had no apparent effect on proteasomal degradation of R664X AE1. In contrast, overexpression of KIAA0090 and/or p97/VCP accelerated the proteasomal degradation of the mutant.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命科学・獣医学

キーワード：小胞体関連分解 プロテアソーム系 膜蛋白質 小胞体品質管理 シャペロン

1. 研究開始当初の背景

バンド3欠損症(球状赤血球症)で生じるアニオン交換輸送体 AE1 変異体 R664X AE1 の ERQC/ERAD は、従来知られる膜タンパク質のそれがない特徴を備えている。その機序を探る過程で、申請者らは、ER に滞留する R664X AE1 と結合するタンパク質として、calnexin、p97 (AAA ATPase)、HSP70、BiP 等とともに CLPTM1 を見出した。これは、CLPTM1 が、タンパク質の加工工場 ER の分子シャペロンとして膜内在性タンパク質の品質管理に働くことを示唆している。

CLPTM1 (cleft lip and palate transmembrane protein 1)は、CD44 などとともに、多因子疾患である口唇・口蓋裂(cleft lip and palate)の原因遺伝子解析の結果、原因のひとつとして見出されたもので、マウス胸腺における T 細胞分化・成熟に不可欠とされるタンパク質 HS9 と同一である。CLPTM1 は、膜を 5~7 回貫通する膜内在性タンパク質であると推定され、トランスジェニックマウスでは大脳・小脳、腎臓、肝臓、脾臓を主に全身臓器に発現がみられる。ところが、既知タンパク質とのアミノ酸配列や既知機能ドメインに関する類似性を一切もたないために知見は極めて少なく、上記の疾患/現象との関連の機序はもとより、CLPTM1 の性状と本質的な生理機能は、最初の報告から 15 年を経過した今も依然謎である。

一方、近年、CLPTM1 と類似の CLPTM1-like タンパク質(CLPTM1L)の遺伝子が、ER シャペロンである複数の熱ショックタンパク質遺伝子群とともに、抗癌剤によるアポトーシス誘導、ストレス応答、さらに肺癌や膀胱癌等多くの腫瘍の発症と関連する因子の一つであることが示されたが機序はやはり不明である。CLPTM1 の役割解明は、これら疾患の発症や病態理解の基盤情報になると期待できる。

2. 研究の目的

小胞体(ER)におけるタンパク質の品質管理(ERQC)とプロテアソームによる分解(ERAD)は、タンパク質の品質管理はもちろん、分裂・増殖や情報伝達等、広範な細胞活動を制御しており、その異常は様々な疾患の発症や病態に密接に関与する。分泌タンパク質 ERQC/ERAD の構成分子と機序とが次第に明らかになる一方で、膜内在性タンパク質のそれらに関する知見は依然乏しい。本研究では、CLPTM1 とアニオン交換輸送体 AE1 の ER における相互作用に関する知見を基に、膜内在性タンパク質の ERQC/ERAD において CLPTM1 が ER シャペロンとして働くことを実証し、多様な疾患の発症・病態と ER 機能との関連について新たな研究領域展開の端緒を拓くことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CLPTM1 の臓器・組織分布と細胞内局在: CLPTM1 の全身臓器・組織における分布と細胞内局在を牛の試料を用い、蛍光抗体法・免疫電顕法で明らかにする。同時に、培養細胞に発現させた CLPTM1 についても、ER を焦点に局在を解明する。

(2) CLPTM1 の ER シャペロンとしての実態解明: R664X AE1 と F508-CFTR を基質タンパク質として利用し、これら膜内在性タンパク質の ERQC/ERAD に対する CLPTM1 過剰発現、あるいは抑制の影響を培養細胞を用いて明らかにし、CLPTM1 の ER シャペロンとしての機能を実証する。さらに、ER で CLPTM1 と相互作用する新たな基質膜タンパク質とシャペロン分子を探索し、その機能の普遍性の検証を図る。

4. 研究成果

(1) AE1 変異体を発現させた HEK 細胞から、プルダウン法/LC-MS/MS 法により、これと相互作用する ER 関連分子として CLPTM1、KIAA0090、p97/VCP、Derlin-1、Derlin-2、calnexin、FIT、CLPTM1 等を同定した。

(2) 蛍光抗体法による検出や、CLPTM1-EGFP、あるいはmyc-CLPTM1を培養細胞に発現させることにより、CLPTM1がERに局在することを明らかにした。

(3) R664X AE1、あるいは F508-CFTR と CLPTM1 を培養細胞に一過性共発現させ、プロテアソーム阻害剤の存在・非存在下、あるいは siRNA 法で内因性 CLPTM1 の発現を抑制した条件下で、これらタンパク質の含量、相互作用、細胞内局在を検討した。その結果、ER において、CLPTM1 が R664X AE1 と特異的に結合する一方、CFTR とは結合しないことを明らかにした。しかし、R664X AE1 のプロテアソームによる分解には、CLPTM1 の存否による明瞭な影響が認められず、ER における R664X AE1 の CLPTM1 との結合とプロテアソーム分解とは直接にはリンクしないことが示された。したがって、CLPTM1 の R664X AE1 の ERAD における役割は、ER シャペロンとして、これを ER に止めることにあることが推定された。一方で、興味深いことに、CLPTM1 と同時に見出した KIAA0090 が、やはり R664X AE1 と結合し、さらにそのプロテアソーム分解を促進することが明らかになった。

(4) そこで、これらを検証し、また同時に他の ER 分子の作用を検討すべく、CLPTM1、KIAA0090 等の組換え蛋白質を HEK 細胞に発現させ、同時に導入した R664X AE1 の分解に及ぼす影響を解析し、以下の結果を得た。

・ CLPTM1-myc の過剰発現は R664X AE1 の発現量に明らかな影響はみられなかった(対照の

約 90%) が、KIAA0090-myc を同時に発現させると R664X AE1 含量の著しい低下 (同 45%) がみられ、これはプロテアソームの抑制により阻害された。

・これらの細胞では、CLPTM1-myc、KIAA0090-myc の免疫沈降反応で R664X AE1 の共沈が認められ、かつその共沈産物量は KIAA0090 のほうが相対的に多かった。

・p97/VCP の過剰発現は R664X AE1 含量の顕著な減少は生じなかったが、その機能不全変異体 K524M の存在下で、R664X AE1 含量は約 2 倍に増加した。即ち、そのプロテアソーム系分解には p97/VCP が必須であることが示された。

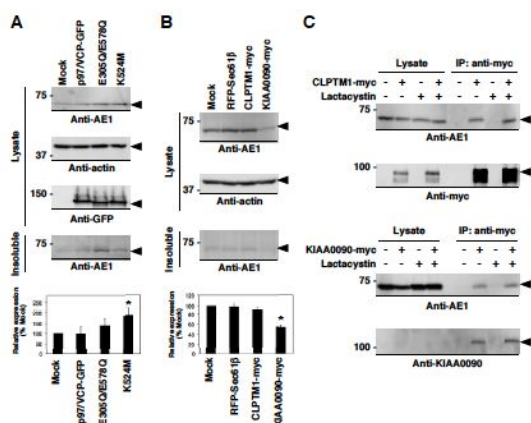


Fig.1. Overexpression of KIAA0090 and p97/VCP but not CLPTM1 increased degradation of R664X AE1. The effect of exogenous CLPTM1, KIAA0090, or p97 on the expression of R664X AE1 was examined by immunoblotting (A and B). HEK293 cells were co-transfected with R664X AE1 and CLPTM1-myc or KIAA0090-myc and incubated in the presence (+) or absence (-) of lactacystin. After incubation, the contents of the proteins were analyzed by immunoblotting (C).

(5) これらの知見から、CLPTM1 は R664X AE1 の ER 品質管理に関わるものの、その ER から細胞質への輸送とプロテアソーム分解には、むしろ p97/VCP と KIAA0090 が関与することが示唆された。CLPTM1 の役割は、ER からの逆輸送に先んじて、R664X AE1 を ER に停めることが考えられる。

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 3件)

Otsu, W., Kurooka, T., Otsuka, Y., Sato, K., and Inaba, M. (2013) A new class of endoplasmic reticulum export signal X X for transmembrane proteins and its selective interaction with Sec24C. J. Biol. Chem. 288, 18521-18532. (査読

有り)

DOI: 10.1074/jbc.M112.443325

Sato, K., Otsu, W., Otsuka, Y., and Inaba, M. (2013) Modulatory roles of NHERF1 and NHERF2 in cell surface expression of the glutamate transporter GLAST. Biochem. Biophys. Res. Commun. 833, 839-845. (査読有り)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.059

Wang, C.-C., Sato, K., Otsuka, Y., Otsu, W., and Inaba, M. (2012) Clathrin-mediated endocytosis of mammalian erythroid AE1 anion exchanger facilitated by a YXX or a canonical YXXX motif in the N-terminal stretch. J. Vet. Med. Sci. 74, 17-25. (査読有り)

DOI: 10.1292.jvms.11-0345

[学会発表](計 3件)

Otsu, W., Otsuka, Y., Miyazono, K., Sato, K., and Inaba, M. (2013) Endoplasmic reticulum-associated degradation of a bovine AE1 mutant: Interaction of R664X AE1 with ER chaperones and dislocation channel proteins. 第 86 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜、横浜、2013 年 9 月 11 日

大津 航、宮園耕介、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉 睦 (2013) アニオン交換輸送体 AE1 の小胞体関連分解メカニズム：小胞体関連蛋白質との相互作用。日本膜学会第 35 年会、早稲田大学理工学部、東京、2013 年 5 月 20 日

大津 航、宮園耕介、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉 睦 (2012) R664X 変異 Anion Exchanger 1 (AE1) の小胞体関連分解：AE1 と小胞体蛋白質との相互作用。第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場、福岡、2012 年 12 月 16 日

[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

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/lmm/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

稲葉 睦 (INABA, Mutsumi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：00183179

(2)研究分担者

佐藤 耕太 (SATO, Kota)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：50283974

(3)連携研究者

なし