

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440058

研究課題名(和文) プロテアソームに入る前の異常タンパク質の切断機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of unidentified truncation mechanism of misfolded proteins

研究代表者

細見 昭 (Hosomi, Akira)

国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・協力研究員

研究者番号：60525864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体関連分解(ER-associated degradation: ERAD)での異常タンパク質の分解はプロテアソームがその役割を担っている。しかしながら、これまでの解析で、出芽酵母において異常糖タンパク質のモデルであるCPY* (カルボキシペプチダーゼY変異体)がプロテアソーム以外のプロテアーゼによって切断されている可能性が示唆されていた。その機構を解明するべく解析を行った結果、CPY*が切断されて中間体(50kと30k付近の2つのサイズ)が生じること及び、50kの中間体が400から404番目の5アミノ酸で切断されていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Misfolded proteins are degraded by proteasome in ER-associated degradation (ERAD). However, our previous study suggested that unidentified protease cleaves CPY* (carboxypeptidase Y mutant), which is a major ERAD model substrate, in budding yeast. To clarify the mechanism of the cleavage, we analyzed CPY* intermediates. Our study demonstrated that 50k and 30k intermediates were generated and cleavage site for 50k intermediate is located in 400-404 amino acid residues.

研究分野：生化学

キーワード：酵母 小胞体関連分解 エンドペプチダーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核細胞内で作られた分泌経路によって輸送される可溶性タンパク質は、リボソームから小胞体(ER)へ挿入される。ER内でタンパク質は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小胞輸送で運ばれる。一方、正しい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、修飾されたユビキチンが分解シグナルとなり、プロテアソーム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。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なされている。

(2) これまでに多くの 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。そうであるならば、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、生物種を問わず、ERAD研究で用いられるモデルタンパク質の殆どがそのようにはならず、糖鎖が付いたまま分解されているように見られてきた。出芽酵母の代表的な可溶性 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)でも同様に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脱離がないように見えてきた。

(3) これまでの異常タンパク質の解析で、全長より小さい分子量で検出される異常タンパク質の切れ端はプロテアソームによって切られている最中のものだろうと思われてきた。しかし、私はこれまでの ERAD の分子機構の研究の過程でプロテアソームによるタンパク質分解が抑えられた状態でも多くの異常タンパク質の切れ端が存在することを観察してきた。その結果から、異常タンパク質の糖鎖脱離を見ることができないのは、異常タンパク質がプロテアソームに入る前に何かしらの酵素(エンドペプチダーゼ)によって切断されているからではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) これまでの研究において、ERAD で働くエンドペプチダーゼ候補として Ste24 が見つかったので、Ste24 の解析を行い CPY* 分解における Ste24 の重要性を明らかにすることを試みた。具体的には以下のテーマを設定して解析を行った。

- ・ Ste24 は CPY* の分解に影響を与えるのか?
- ・ PNGase による糖鎖脱離とエンドペプチダーゼによる CPY* 切断は協調するのか?
- ・ CPY* のどの配列が切断されるのか? 細胞内のどこで切断されるのか?

3. 研究の方法

(1) Ste24 の重要性と CPY* 中間体生成機構の解明

Ste24 遺伝子破壊株での CPY* 分解

Ste24 が CPY* の分解に直接影響を与えるか調べるために、タンパク質合成をシクロヘキシミド(CHX)で止めて、CPY* の分解をウエストタンブロットで検出する実験法(CHX decay assay)を行った。野生株と比較して Ste24 遺伝子破壊株で CPY* の安定化が確認できれば、Ste24 が CPY* の分解に関与していることの証明になる。

Ste24 による CPY* 切断と PNGase による糖鎖脱離は互いに影響を与えるのか?

Ste24 と Png1 が協調して CPY* の分解に影響を与えるかを調べる。野生株では両酵素が働くので CPY* は効率よく分解されると考えられる。Png1 遺伝子破壊株では Ste24 が働くので何とか CPY* は分解できると考えられる。同様に Ste24 遺伝子破壊株でも Png1 が働くので何とか CPY* は分解できると考えられる。そして、Ste24 Png1 二重破壊株では両方の働きが失われているので著しい CPY* 分解阻害が起こるかもしれない。これを確認するために Ste24 Png1 二重破壊株を作製して、CHX decay assay を行う。Ste24 破壊株と Png1 破壊株に比べて Ste24 Png1 二重破壊株で CPY* の安定化が確認できれば、両タンパク質は協調的に機能すると言える。

CPY* のどの配列が切断されるのか。

CPY のどの配列もしくはアミノ酸が切断のターゲットになっているか知ることができれば、酵母以外の生物も含む ERAD モデルタンパク質が切断されているか調べる足がかりになると考えられる。CPY* 中間体は N 末端に付加した FLAG タグで検出することができた。よって、CPY* を C 末端側でアラニン(Ala)スキャンを行い、CPY* が切断されない変異体を探す。切断できない変異体が見つければそのアミノ酸が切断に重要であることになる。

4. 研究成果

Ste24 遺伝子破壊株での CPY* 分解

Ste24 が CPY* の分解に直接影響を与えるかを確認するために CHX decay assay を行った。WT は野生株、hrd1Δ はポジティブコントロー

ルである。ste24Δには hrd1Δのような強いCPY*分解遅延は見られなかったが、WTよりも若干の遅延が見られた(図1)。この結果は、Ste24が単独ではCPY*の分解に大きな影響を及ぼさないことを示している。

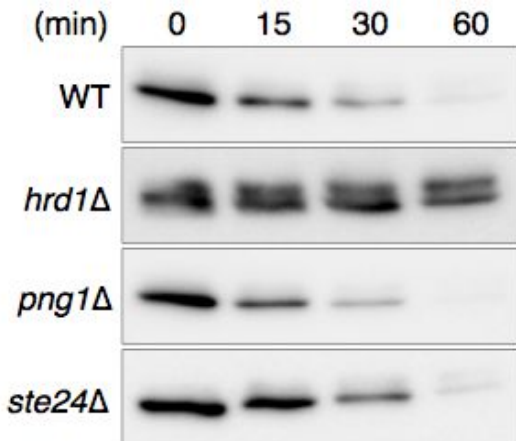


図1.CHX decay 実験

Ste24によるCPY*切断とPNGaseによる糖鎖脱離は互いに影響を与えるのか?

Ste24とPng1が協調してCPY*の分解に影響を与えるかを調べるために、ste24Δ png1Δ二重破壊株を用いてCHX decay assayを行った。今回の実験はCPY*の分解遅延をより詳しく解析するためにEndoH(N型糖鎖脱離酵素)でCPY*のN型糖鎖を除いた後にウエスタンブロットングを行った。その結果、前回と同様にste24Δにおいて若干のCPY*分解遅延が見られたが、意外にもste24Δ png1ΔではCPY*の分解遅延が見られなかった。なぜ二重破壊株の分解が問題なく行われるのか現時点では分からないが、少なくともSte24とPng1が協調してCPY*の分解が行われているとは考えられない。

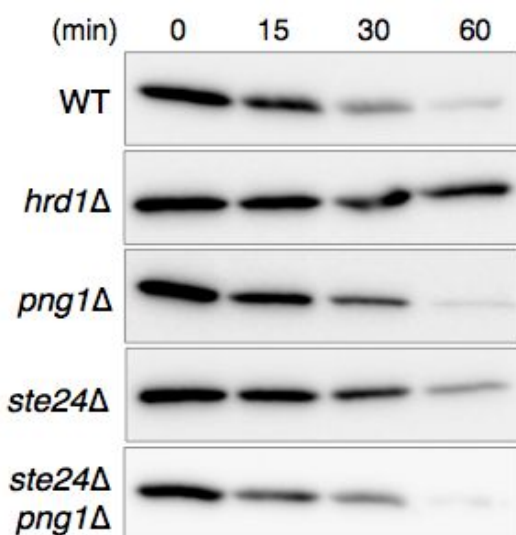


図2.CHX decay 実験 (EndoH 有り)

CPY*のどの配列が切断されるのか。
CPYのどの配列もしくはアミノ酸が切断の

ターゲットになっているかを調べるために、CPY*の truncation 変異体を作製して解析を行った。その結果、CPY*の420番目付近に切断部位があると示唆された(図3)。切断部位をさらに詳しく調べるために、推定切断部位付近を5アミノ酸毎にアラニンに置換した変異体Alaを作製して解析を行った。その結果、400Ala404変異体で著しく中間体の生成が抑えられる事が分かった。この結果から、400から404番目の5アミノ酸の一部もしくは全部が切断に重要であることが分かった(図4)。400から404番目のアミノ酸の一つずつのアミノ酸を置換した変異体を作製したが、1アミノ酸レベルでの切断部位の同定は出来なかった。したがって、現時点では切断されるためのコンセンサス配列はその存在も含めて明らかでない。また、他のERADモデル糖タンパク質であるPrA*の中間体の検出を試みたが、検出できなかった。

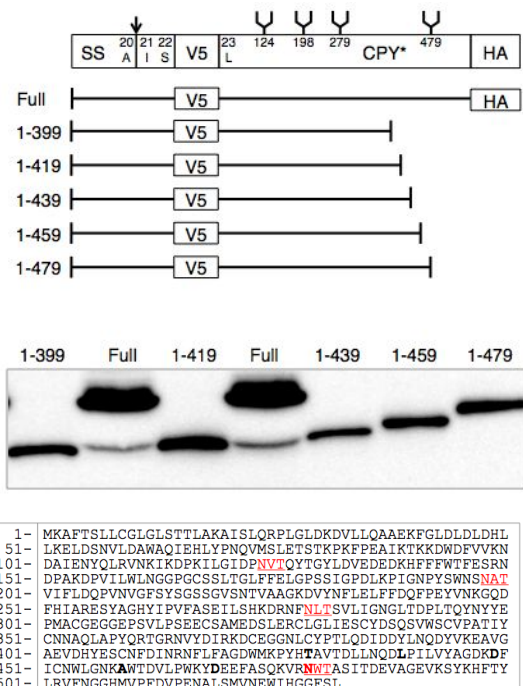


図3.CPY*の切断部位 (truncation 変異体)
(SS: シグナル配列、V5: V5 タグ、HA: HA タグ、矢印: シグナルペプチド切断部位、アンテナ: N型糖鎖付加部位)

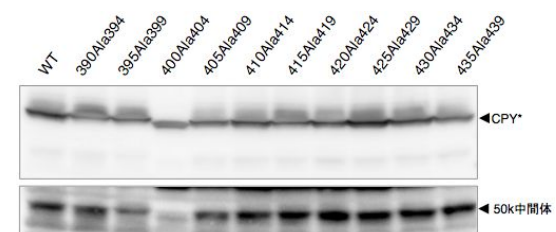


図4. CPY*の切断部位 (Ala 変異体)

これらの結果から、CPY*の切断部位をおおよそ特定する事ができた。しかしながら、CPY*の切断が行われる際に重要なアミノ酸

配列の同定にまでは至らなかった。ゆえに、切断配列による他の ERAD 基質タンパク質の切断部位予測は現時点では不可能である。また、意外にも *ste24Δ* や *ste24Δ png1Δ* で CPY* の分解が強く抑制されなかった。したがって、現時点では ERAD 基質を切断するエンドペプチダーゼの生物学的重要性は全く分からない。しかしながら、Ste24 が CPY* の切断に参与していることは ERAD 基質タンパク質の分解の多様性を示しており、ERAD 基質タンパク質がプロテアソームに辿り着く前にどのようなプロセッシングを受けるのかは今後解明されるべき事象であると言える。

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1件)

1. Hosomi A, Suzuki T.

Cytoplasmic peptide: *N*-glycanase cleaves *N*-glycans on a carboxypeptidase Y mutant during ERAD in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 査読有り、2015 Apr; 1850(4):612-9.

doi: 10.1016/j.bbagen.2014.12.008.

[学会発表](計1件)

細見昭、鈴木匡、ERAD で機能するエンドペプチダーゼの解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細見 昭 (HOSOMI AKIRA)

国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・協力研究員

研究者番号：60525864