

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840038

研究課題名(和文) BAG6の核内凝集体代謝における新規機能の解明

研究課題名(英文) Roles of BAG6 complex in nuclear protein quality control

研究代表者

横田 直人 (Yokota, Naoto)

首都大学東京・理工学研究科・助教

研究者番号：40610564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の品質管理は、細胞の恒常性維持において重要な役割を果たしている。BAG6は折りたたみに失敗した不良タンパク質の代謝、ならびにシグナル配列をもたない一回膜貫通型タンパク質(TAタンパク質)の埋め込みに関与することが報告されていたが、それらの詳細や核内における機能については明らかにされていなかった。

本研究では、TRC35のBAG6-TRC40相互作用における重要性や、TRC40の二量体化がBAG6との相互作用に重要であることなど複合体形成のメカニズムを明らかにした。さらに、モデル核内不良タンパク質を作製し、核内タンパク質の分解メカニズムを明らかにする系を立ちあげた。

研究成果の概要(英文)：The protein quality control system plays a pivotal role in proteostasis in cells. Although it was reported that BAG6 is involved in recognition and degradation of misfolded newly synthesized proteins, and biogenesis of a group of transmembrane protein that does not have a signal sequence at its N-terminus, the precise roles of BAG6 in these processes and in the nucleus have not been elucidated yet.

I attempted to clarify roles of BAG6 and its cofactors such as TRC35, TRC40 and Ubl4a in the nucleus and revealed that TRC35 and dimerization of TRC40 are responsible for interaction between BAG6 and TRC40. In order to analyze the mechanism of misfolded protein degradation in the nucleus, we produced a model substrate conjugated a nuclear localization signal. We observed that degradation of the substrates abolished in the presence of proteasomal inhibitor but not in the presence of leptomycin.

研究分野：細胞生化学

キーワード：BAG6 不良タンパク質 核内凝集体

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の品質管理, ならびに不良タンパク質代謝は細胞の恒常性維持の根幹を成す. 本研究において, おもな解析対象とする, BAG6 は長らくその機能が明らかにされていなかったが, 所属研究室の成果により, 新合成不良タンパク質の露出した疎水領域を認識し, ユビキチン-プロテアソーム系に運ぶことで, 不良タンパク質の凝集を防いでいることが明らかにされた. また, 近年, シグナルペプチドを持たない一回膜タンパク質 (TA タンパク質) の埋め込みへ関与することも海外の複数の研究室から見出されており, タンパク質と合成と分解における様々な局面において, 非常に重要な役割を果たしていることが考えられる. しかし, BAG6 の機能についてはまだ不明な点が多く残されており, 詳細な解析が望まれている.

興味深いことに BAG6 は核内にも多く存在していることが知られており, 細胞質とともに核内でも重要な役割を果たしていることが予測されてきたが, その機能についてはほとんど知られていなかった. そこで, BAG6 の新奇核内機能に注目し, 核内におけるタンパク質の品質管理, 分解機構, 並びに凝集体形成における機能を明らかにすることが, タンパク質の品質管理をとおした, BAG6 による細胞の恒常性維持機構の解明に重要であると考えに至った.

一方, ハンチントン病や球脊椎性筋萎縮症などの神経変性疾患では, 核においてポリグルタミン性の凝集体が観察されることが知られている. これまでの実験から BAG6 はこのポリグルタミン凝集体と共局在することが明らかにされている. BAG6 がこれらの疾患と関係を持つ可能性が十分に考えられたため, BAG6 機能解明が, ポリグルタミン病の病因解明に結びつくことも期待された.

2. 研究の目的

BAG6 とその複合体構成因子が凝集体形成や核内不良タンパク質の代謝においてどのような役割を果たしているかを明らかにする. また, BAG6 と相互作用する複合体構成因子がこれらの現象にどのように関与するか解析する. 得られた結果と, 核内凝集体に起因する疾患の関係性も明らかにする.

3. 研究の方法

変異体遺伝子, リコンビナントタンパク質等を利用した相互作用解析. ならびに各種遺伝子をノックダウンした際の細胞への影響等を評価することを通して, BAG6 と BAG6 複合体構成タンパク質の機能の解析を進めた.

4. 研究成果

(1) Ubl4a のポリグルタミン凝集体形成における影響を評価するために, GFP にアトロフィン 1 のポリグルタミン鎖を融合させた遺伝子を細胞に導入し, Ubl4a ノックダウンによりポリグルタミン凝集体形成への影響について, フィルタートラップアッセイを用いて測定したが, 著しい影響は観察されなかった.

(2) BAG6 と相互作用し, TA タンパク質の埋め込みへの関与が報告されている TRC40 は核内にも存在する. そこで, BAG6 と TRC40 との相互作用に着目して研究をすすめた. BAG6 と TRC40 の相互作用は, TRC40 の ATPase 活性に重要な残基や, TRC40 の二量体化に必要な領域に依存していることが明らかになった. また, TA タンパク質と結合できない変異体も BAG6 との結合が見られなかった. TRC35 ノックダウン条件化においても, BAG6-TRC40 の相互作用が見られなかったことから, これら二種類のタンパク質の相互作用において, TRC35 が重要な役割を果たしていることが明らかになった.

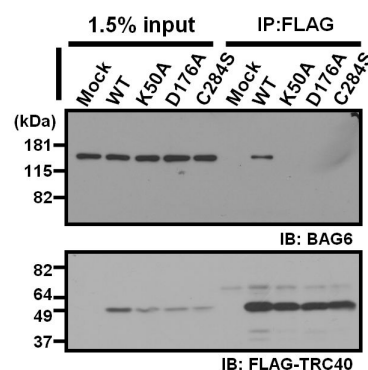


図 1. TRC40 変異体は内在性 BAG6 と相互作用しない

(3) TRC35 による BAG6 の制御機構を明らかにするために, これらの遺伝子をノックダウンし影響を調べた. その結果, これらの遺伝子の発現量は相互に影響しあうことが明らかになった. RT-PCR の結果, 両遺伝子の mRNA 量は変わらず, プロテアソーム阻害剤存在下でも分解は誘導されることから, 他の

タンパク質分解経路，ならびに翻訳レベルでこれらのタンパク質量が制御されている可能性が示唆された。

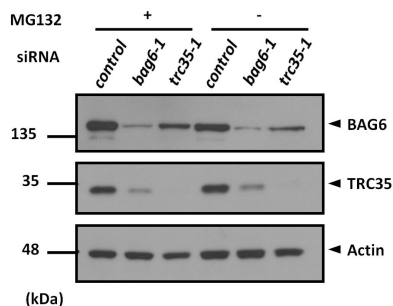


図2. BAG6 と TRC35 の発現量は相互に依存する

(4) BAG6 の核内不良タンパク質の分解経路を明らかにするために，シグナル配列を欠損させた T-cell receptor α に核局在シグナルを融合させた遺伝子を核内モデル不良タンパク質として用いて，研究を行った．この核内モデル不良タンパク質は，核外輸送の阻害剤であるレプトマイシン存在下においても分解が確認され，その分解は MG132 によって阻害された．この結果は，核内においてタンパク質分解がユビキチン-プロテアソーム系によって行われていることを示唆する．現在 BAG6 ノックダウン下における本モデルタンパク質の安定性について解析を進めている．

以上の研究成果は，BAG6 を介した不良タンパク質代謝ならびに，細胞内凝集体形成機構の解明の一歩となることが期待される．

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 1 件)

「Structure of a BAG6 (Bcl-2-associated Athanogene 6)-Ubl4a (Ubiquitin-like Protein 4a) Complex Reveals a Novel Binding Interface That Functions in Tail-anchored Protein Biogenesis.」(2015)

Kuwabara N, Minami R, Yokota N, Matsumoto H, Senda T, Kawahara H, Kato R. Journal Biological Chemistry. (査読有り)

90(15):9387-98.

doi: 10.1074/jbc.M114.631804.

〔学会発表〕(計 5 件)

「新規 BAG6 結合性 TA 型 E3 リガーゼの機能解析」

林下瑞希, 横田直人, 川原裕之.

科研費新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」領域班会議 2014 年 12 月 4 日, ホテルたつき (愛知県蒲郡市)

「核移行性不良タンパク質モデルを用いた核内タンパク質品質管理機構の解明」

保木優梨子, 横田直人, 川原裕之

科研費新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」領域班会議 2014 年 12 月 4 日, ホテルたつき (愛知県蒲郡市)

「新生タンパク質の品質管理に關与する BAG6-UBL4a 複合体の構造機能解析」

桑原直之, 横田直人, 川原裕之, 加藤龍一
科研費新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」領域班会議 2014 年 12 月 4 日, ホテルたつき (愛知県蒲郡市)

「タンパク質品質管理システムにおける TRC35/BAG6 相互作用の意義」

田中花実, 横田直人, 川原裕之

日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日, 横浜パシフィコ (神奈川県横浜市)

「Roles of mammalian GET components in BAG6 mediated protein quality control」

Yokota Naoto and Kawahara Hiroyuki

The 35th Naito Conference : The ubiquitin-proteasome system, 2013 年 7 月 11 日, ガトーキングダム (北海道札幌市)

〔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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

横田 直人 (YOKOTA Naoto)

首都大学東京・理工学研究科・助教

研究者番号：40610564