

小胞体品質管理機構の解明による疾患治療標的の探索

宮崎大学医学部機能生化学分野

門脇 寿枝

【研究の目的および背景】

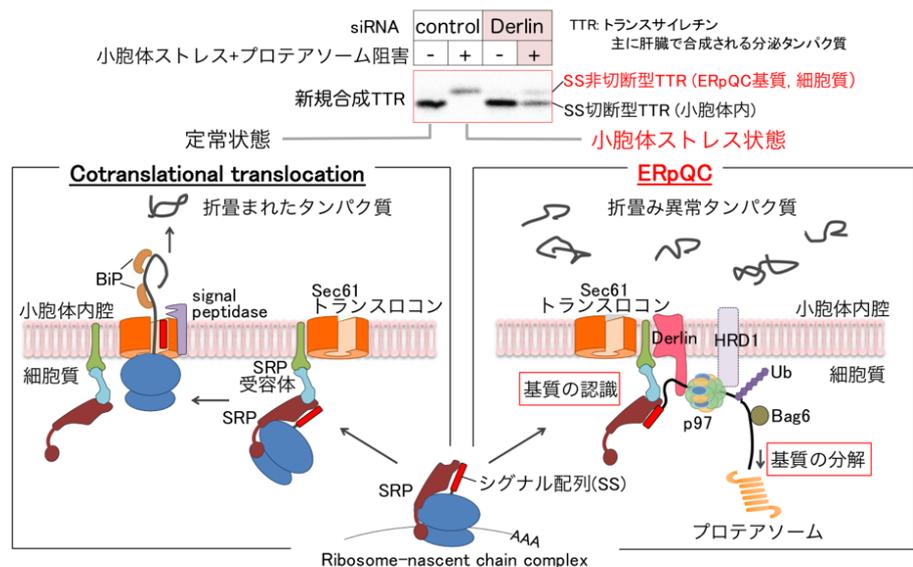
細胞内で合成される全タンパク質の約1/3は小胞体を通過するため、小胞体の品質は巧みに管理されている。しかし、環境要因や遺伝子変異などによって小胞体内には折畳み異常タンパク質が蓄積し、様々な疾患の原因となる。このような小胞体ストレス状況に晒された細胞は、小胞体ホメオスタシスを回復するために、①翻訳抑制、②mRNA分解、③小胞体シャペロン発現誘導によるリフォールディング、④小胞体関連分解(ER-associated degradation: ERAD)といった小胞体品質管理機構を作動させ、小胞体内でのタンパク質合成を一時抑制した状況下で折畳み異常タンパク質を適切に処理する(図1)。ストレスに対する初期応答として重要な翻訳抑制は、必ずしも全てのタンパク質合成を抑制可能ではなく、実験的には35~64%の新規翻訳が維持されたままである(Kang et al. *Cell* 2006, Kadowaki et al. 未発表, 以下点線は我々の研究)。これは、小胞体シャペロンやERADに必要な分子を小胞体内腔へ動員するためには合理的である。しかし、翻訳抑制を逃れた新規合成タンパク質のうち、小胞体品質管理に無関係な分泌タンパク質などは、小胞体に更なる負荷をかけることになるため、これを

軽減するシステムとして新規合成小胞体タンパク質の分解システム ER stress-induced preemptive quality control (ERpQC: 予防的小胞体品質管理)が働く(Kang et al. *Cell* 2006)。

我々はこれまでに、神経変性疾患の一つ、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS)において、家族性ALSの原因である変異型SOD1タンパク質が直接結合する標的分子と

して、ERADに関わる小胞体膜タンパク質Derlin-1を同定し、その結合が小胞体品質管理機構を破綻させ小胞体ストレス誘導性神経細胞毒性を惹起することを見いだした(Nishitoh et al. *Genes Dev.* 2008, Fujisawa et al. *Ann. Neurol.* 2012, Homma et al. *Mol. Cell* 2013)。Derlin-1は哺乳類では Derlin-2, -3と共にDerlinファミリー(以下Derlinと略)に属し、Derlinは小胞体ストレス依存的に発現誘導されるERAD関連分子として同定されたが、その機能的役割には多くの不明な点が残されている。我々は、Derlin解析の過程でERAD機能に加えてERpQCへの関与を明らかとした。通常、シグナル配列(SS)を持つタンパク質は、Sec61トランスロコンを介して小胞体内腔へ挿入されるが(図1左下)、小胞体ストレス時にはその挿入が阻害され、SSが切断されることなく直接細胞質中でプロテアソームにより分解される(図1右下)。このERpQC基質は、プロテアソーム阻害によりSS非切断型タンパク質として生化学的に検出される(図1上、左より2レーン目)。しかし、Derlin欠失細胞では、ストレス時にみられる分泌タンパク質の小胞体内腔への挿入阻害がキャンセルされ、過度な小胞体負荷を引き起こす(図1上、右より1レーン

図1: ERpQCの分子機構と生理的重要性



目)。すなわち、Derlin欠失によるERpQC機能異常は、小胞体ストレス時に翻訳抑制を免れた小胞体タンパク質の小胞体への絶え間ない輸送を引き起こし、これは小胞体品質管理の悪化に繋がる。このような小胞体品質管理機構の破綻は、神経変性疾患や代謝性疾患、炎症性疾患など多くの病態に関連することから(Kadowaki et al., *Genes* 2013, *FEBS J.* 2019)、その分子メカニズムの解明は新たな疾患分子標的の開発に繋がる研究課題であると大いに期待される。

我々は世界に先駆けて、ERpQCのメカニズムとして、DerlinとSec61やSRP54との小胞体ストレス依存的結合を見出し、さらに基質分解において、小胞体膜型ユビキチンリガーゼHRD1や、AAA-ATPase p97、シャペロン様活性をもつBag6が関与することを明らかとした(Kadowaki et al., *Cell Rep.* 2015, *Sci. Rep.* 2018)。これらの結果から、新規合成小胞体タンパク質が、Derlin複合体とRibosome-nascent chain complex (RNC complex)の会合により小胞体挿入を阻害されSS非切断型として細胞質に蓄積し、その後小胞体膜上でユビキチン化され、効率よくプロテアソームに運ばれて分解されていると予想される。さらに興味深い結果として、小胞体シャペロンはERpQCによって分解されず小胞体ストレス時にも内腔へと挿入される。その基質特異性は、SSだけでなくその後の配列も関与することを示唆する結果を得ている。

以上の知見を踏まえ本研究では、小胞体ストレス時に起こる新規合成タンパク質の分解を介した小胞体品質管理機構の分子メカニズムと生理的意義の解明と同時に、その破綻による疾患の病態メカニズムを明らかとし、疾患治療の分子標的を探索することを目的とした。

【研究方法】

これまで我々は、ERpQCの分子メカニズムとしてDerlinファミリーによる基質認識、HRD1によるユビキチン化、Bag6・p97を介したプロテアソームへの輸送を報告した。しかし、「ERpQC基質となる分泌タンパク質と、ならない小胞体シャペロンでは何が異なるのか?」「Derlinとともにリボソームから基質を認識する直接の因子は何か?」「ERpQCはどのように制御されているのか?」「生体内のどこでERpQCは働き、その破綻はどんな疾患に繋がるのか?」など未解明な点が残されている。そこで本研究では、「①ERpQC基質の特異性(ERpQC基質)」、「②小胞体タンパク質を細胞質内で合成させる機構(ERpQC装置)」、さらに「③ERpQCと病態」に焦点を絞り、ERpQCを介した新規小胞体品質管理機構とその破綻による病態機構の解明を目指した。

【研究成果】

細胞は、小胞体ストレス状況に対抗するため、リフォールディングやERADを介し不良タンパク質蓄積を軽減する。また一方で翻訳抑制やmRNA分解を介して小胞体へのタンパク質輸送負荷を防ぐ。近年、新たな小胞体負荷回避機構として、ERpQCが報告された。ERpQCは、小胞体局在タンパク質を細胞質で翻訳し分解する機構であるが、その詳細は不明な点が多い。本研究では、ERpQCの分子機構ならびに生理的意義を明らかにするために、以下の解析を行った。

① ERpQC基質に関する研究

小胞体ストレス時には、シャペロンは速やかに小胞体内腔に翻訳され不良タンパク質をリフォールディングする。従って、小胞体内腔へ翻訳されるタンパク質の全てがERpQC基質となるわけではない。事実、BiP、PDI、GRP94などの小胞体シャペロンは、ストレス時にもERpQCによる分解を逃れて小胞体内腔で合成される。このような基質振り分けが起こっているかを解明するために、小胞体ストレス依存的に翻訳時にERpQC基質を小胞体への輸送から細胞質での分解へと運命変更させる小胞体膜タンパク質 Derlinを活用した。実際、Derlin結合分子の網羅的解析により、ストレス依存的に多くのリボソームタンパク質や翻訳関連分子が同定されたことから(産総研、夏目徹博士との共同研究)、ストレス依存的にDerlinに近接するリボソームに着目し、リボソームプロファイリングによりERpQC基質の同定を試みた(理研の岩崎信太郎博士との共同研究)。コントロールである細胞質局在GFPに近接するリボソームが翻訳するmRNAと比較した結果、Derlin近接リボソームはエクソソーム構成因子を積極的に翻訳していることが明らかとなった(論文投稿準備中)。これは、Derlinによって小胞体ストレス時にエクソソーム構成

因子が小胞体への輸送を回避し、細胞質で分解されることで、結果的にエクソソームの品質を保つ可能性を示しており、今後、ERpQCによるエクソソームの品質管理について解析していきたい。さらに我々は、Derlin近接リボソームが、小胞体内に局在してタンパク質折畳みに機能するシャペロンなどの品質管理分子よりも、小胞体を通して他オルガネラや細胞外に輸送される分子を積極的に翻訳していることを確認した(論文投稿準備中)。以上の結果より、Derlinによって小胞体への輸送から細胞質での分解に運命を変更させられる分子の多くは、小胞体品質管理に関与しない分子であり、今後はその基質振り分けの分子メカニズムの解明を目指したい。

② ERpQC装置に関する研究

小胞体ストレス誘導性ERpQCに関わる分子群を詳細に同定するため、リルーティングに関わるDerlin結合分子の網羅的解析を行った(産総研、夏目徹博士との共同研究)。その結果、小胞体ストレス状況下でDerlin-1, -2, および -3に共通して結合する分子として、トランスコンや翻訳関連因子が数多く同定された。中でも我々は、Sec61トランスロコンに着目し、ERpQCとの関連について検討した。Sec61トランスロコンはSec61 α , β , γ の3つから構成され、 α と γ はタンパク質の小胞体膜透過に必須であるが、 β の機能についてはよく分かっていない。そこで、Sec61 β がERpQCに関与するか調べた。その結果、Sec61 β はERpQC基質の翻訳を抑制することで、細胞質で分解される運命にある基質が無駄に合成されないよう制御していることが明らかとなった。さらに、Sec61 β による翻訳抑制の分子メカニズムを検討したところ、Sec61 β は、DerlinによってリルートされたERpQC基質mRNAを含むRNC complexと翻訳開始複合体eIF4Fの結合を阻害することで、結果的に基質mRNAへリボソームを呼び込めずに翻訳抑制することが分かった(論文投稿準備中、図2)。

③ ERpQCと病態に関する研究

②で得られた結果より、Sec61 β によるERpQC基質の翻訳抑制は、その後分解されるタンパク質の無駄な合成を防ぐ理に適った制御といえる。そこで、Sec61 β による翻訳抑制機構の破綻が、細胞内に及ぼす影響について調べることで、その生理的意義についてアプローチした。特に、分泌タンパク質を盛んに合成することで小胞体ストレスが誘導されやすいとされる、肝臓由来のヒト培養細胞株HepG2を用いSec61 β のノックダウンを行った。その結果、Sec61 β の欠失は細胞質のプロテオスタシスを悪化させ、異常なタンパク質凝集体を生み出すことが分かった。これまでSec61 β の詳細な機能は不明であったが、本研究により、小胞体ストレス依存的にSec61トランスロコンにリクルートされたDerlinが小胞体へ輸送されるはずであったタンパク質の行き先を細胞質に変更し、Sec61 β がその翻訳を抑制することで無駄な合成を防ぎ、細胞質のプロテオスタシスを維持しながら、プロテアソームへの分解に導くことが分かった(論文投稿準備中)。今後は、Sec61 β 機能不全によるERpQC基質の細胞質での蓄積が生体へ及ぼす影響を知るために、小胞体ストレスとの関連が多く報告されている、糖尿病や神経変性疾患に着目し、Sec61 β 欠失による細胞質の病態関連タンパク質の品質管理および細胞毒性について解析を進める予定である。

図2: ERpQCの制御機構

