

タンパク質機能発現制御における新規階層の発見と応用

北海道大学遺伝子病制御研究所分子細胞生物研究室

岡崎 朋彦

概要

タンパク質カルボキシル(G1a)化修飾は、主に血液凝固や骨形成に重要であることが知られているのに留まり未だ謎が多い。申請者はこれまで、G1a化に必要なビタミンK(VK)の欠乏やその競合阻害剤warfarin投与がマウスにおいてウイルス感染に対する抵抗性を減弱させることを発見した。これは、タンパク質G1a化がウイルス感染防御において重要な役割を果たすことを示す初めての発見である。また、非常に驚いたことに抗ウイルス応答に必須のミトコンドリア上因子MAVS/IPS1が唯一のカルボキシラーゼGGCXによってG1a化修飾を受けており、このMAVSの修飾がウイルス防御に重要な役割を果たすことが判明した。これまでG1a化基質は20余りの細胞外因子が知られているのみであり、MAVSという細胞質タンパク質のG1a化は例がない。そこで申請者は、本研究助成において1.「細胞内カルボキシル化タンパク質の網羅的同定及び機能解析」、2-1.「細胞内G1a化によるMAVSの機能切り替え機構」、2-2.「脱カルボキシル化機構」の探索、そして3.「GGCXによるMAVSのG1a化修飾機構」を調べた。

その結果、1及び2に関連して脱カルボキシル化酵素と新規細胞内カルボキシル化基質の候補因子を得た。また、2および3に関連してGGCXの膜挿入方向の反転によって細胞内たんぱく質がG1a化されること、また細胞内G1a化によりMAVS相互作用因子が変化することでMAVSの下流応答が切り替わる可能性が明らかとなった。

更に、2「脱カルボキシル化機構」を調べる過程で当初の計画には無かった「リン酸化修飾を介したストレスによるMAVS機能増強機構」を見出した。

以上より、本事業において当初予定していた実験計画の多くが達成出来ただけでなく、当初の計画以上の成果が得られた。

詳細

1. 細胞内カルボキシル化タンパク質の網羅的同定及び機能解析を行った

野生型マウスまたは中枢神経系特異的GGCX KOマウスの脳組織に対しコントロールIgGまたはpan-g1a抗体を用いて免疫沈降し、野生型マウス脳組織特異的に存在するカルボキシル化タンパク質を探索した。その結果、さまざまな細胞内タンパク質に由来するカルボキシル化ペプチドが得られた。その中のいくつ

かのタンパク質に注目し、発現プラスミドを作成して細胞に発現させてpan-gla抗体で検出を試みたところ、実際にいくつかのタンパク質についてはpan-gla体によって認識された。次に、その中でも転写因子Xに注目してカルボキシル化の特異的抗体を作製した。この抗体は実際にXを認識し、そのシグナルはGGCXのKO細胞においてほとんど検出されなかったことから、Xが実際にGGCXによってカルボキシル化されている可能性が示唆された。次に、Xのカルボキシル化の機能を調べるために細胞に野生型またはカルボキシル化サイト変異Xを発現してXの機能を調べたところ、野生型に比べてカルボキシル化サイト変異Xは機能を失っていることが分かった。以上の結果より、細胞内カルボキシル化タンパク質がMAVS以外にも多数存在すること、そのなかでもXが新たな細胞内カルボキシル化タンパクの1つであり、カルボキシル化がXの機能に重要な機能を持つ可能性が示唆された。

2-1. カルボキシル化によるMAVSの機能切り替え機構を調べた

申請者はカルボキシル化によってMAVSの結合因子が変化した結果、MAVSの下流応答が切り替わる可能性を考え、野生型MAVS (IFN誘導能高、caspase活性化能低)とMAVS 4A変異体 (IFN誘導能低、caspase活性化能高)の結合因子を質量分析により網羅的に探索・比較を行った。その結果より、MAVSの機能切り替えの責任候補分子としてNUDT21とTOMM40が得られた。得られた候補分子がMAVSの機能の切り替えに貢献するかをノックダウンにより検証した結果、NUDT21はMAVSによるI型IFNの誘導に重要であること、更にTOMM40はMAVSによる細胞死誘導を選択的に促進することが判明した。従って、カルボキシル化によるMAVSの機能切り替え機構として、MAVSの結合因子の切り替えが起こる可能性が示唆された。また、PLK1の機能を調べるためにHeLa S3細胞においてPLK1のノックダウンを行なったが、細胞が死滅してしまい解析を行うことが出来なかった。PLK1は細胞周期の進行に重要な遺伝子であるためと考えられる。先行研究と同じ細胞の293T細胞を用いて同様の実験を行ったが、やはり細胞を維持することが出来なかった。

2-2. MAVSリン酸化の機能解明と脱カルボキシル化酵素の探索を行った

質量分析 (MS) によりASK1/ASK2によるMAVSのリン酸化候補サイトの探索を行い、MAVSのある残基がASK1/ASK2-MKK6-p38経路によってリン酸化されることを見出した。そこで、MAVSリン酸化の特異的抗体を作成し、ウイルス感染を模倣する二本鎖RNA刺激によってリン酸化が上昇することが分かった。また、ウイルス感染だけでなく、小胞体ストレスを誘導するツニカマイシンやサブシガルジン、酸化ストレスを誘導するロテノン刺激などでもリン酸化が上昇することが明らかになった。更に、リン酸化の機能を調べるためにリン酸化サイト変異体発現細胞株を樹立し、野生型発現細胞株と比較を行った。すると、変異体発現細胞においては二本鎖RNA刺激やVSV感染に対するIFNの産生が抑制されている一方、アポトーシス実行に関わるカスパーゼの活性化は変化がなかった。即ち、ASK1/ASK2の下流で起こるMAVSのリン酸化はMAVSのIFN産生を促進する働きがあると考えられる。このことは、ASK1/ASK2によるMAVSリン酸化がMAVSのカルボキシル化を抑制してIFN産生を抑制するという当初の仮説とは異なる結果である。しかしながら、新たに「リン酸化修飾を介したストレスによるMAVS機能増強機構」を見出したのでこれらの結果をまとめて論文投稿準備中である (Zhao et al., in preparation)。

また、細胞内の脱カルボキシル化酵素を探索するために、まず細胞内カルボキシル化レベルをモニターする人工基質の作出を行った。そしてこの人工基質のカルボキシル化を指標に脱カルボキシル化酵素候補の働きを調べた。現在、18個の候補のうち計7つまでクローニングが完了しており、そのうち4つの候補については過剰発現によって人工基質のカルボキシル化が減少することが判明した。更に、そのう

ちの1つについてCRISPR/Cas9を用いてKO細胞を樹立して人工基質のカルボキシル化を調べたところ、KO細胞においてカルボキシル化レベルが有意に上昇していた。この結果より、タンパク質の脱カルボキシル化酵素が存在する可能性が示唆された。

3. MAVS発現によりGGCXの膜トポロジーが反転した

申請者は、改変split-GFP(Feng et al., 2017)を応用した膜タンパク質のトポロジーレポーターシステムを開発し、それを用いてGGCXの膜トポロジーを詳細に調べた。すると非常に驚いたことに、GGCXがMAVS発現によって膜トポロジーを反転させることが分かった。この結果は、ウイルス感染に応答してGGCXの酵素活性部位が細胞質側に現れるという非常に興味深い可能性を示している。この可能性を更に検討するために、ウイルス感染刺激によって生じる見かけの分子量が小さいGGCX(GGCX(B))が糖鎖修飾を受けていないかレクチンブロットで調べたところ、Bフォームはレクチンによって認識を受けないことが分かった。この結果は、ウイルス感染によってGGCXの膜トポロジーが反転する可能性を更に支持している。

今後の展望

申請者は初の細胞質カルボキシル化(G1a化)タンパク質としてMAVSを見出したが、G1a化を担うGGCXは小胞体(ER)に局在する5回膜貫通タンパク質であり、かつ酵素活性部位は小胞体(ER)内腔側に存在すると考えられている。従って「ER内腔側に酵素活性部位を持つはずのGGCXがいかなるメカニズムで細胞内基質をG1a化するのか」は不明であった。ところが申請者は、意外にもGGCXがウイルス感染に応答して膜トポロジーを反転させることで酵素活性部位を細胞外から細胞内に向け、新たに細胞内タンパク質をカルボキシル化する可能性を見出した。これまで膜タンパク質の機能発現には正しいトポロジーによる膜挿入が基盤となると考えられてきた(Hegde and Keenan, Nature Reviews MCB, 2022)。実際、様々な先行研究により、誤挿入された膜タンパク質は秩序だった校正システム(dislocaseやEMC複合体等)により再挿入や分解を受けることが報告されている。即ち、膜トポロジーが反転したタンパク質は機能が無い不要なものであり、品質管理システムによる排除の対象であるという考えが支配的であった。それに対して申請者の研究は、膜トポロジー反転が単なるエラーではなく、膜タンパク質の新規機能獲得様式である、という非常に興味深い可能性を示すものである。しかしながら、どのような仕組みにより膜タンパク質の膜トポロジーが反転するのかはほとんど明らかでない。

更に、ウイルス感染に対しGGCXの膜トポロジー反転が起こることから、細胞内G1a化タンパク質が他にも存在する可能性を検討した結果、MAVSとは異なる新規細胞内G1a化タンパク質を多数見出した。重要なことに、新規細胞内タンパク質にはウイルス感染とは異なる文脈で機能するタンパク質も含まれていることから、細胞内G1a化が他の生理的コンテキストにおいても機能する可能性は十分考えられる。

そこで今後は、まずGGCXを例に膜トポロジー反転の制御機構解明を試みる。更に膜トポロジーが反転した膜タンパク質の網羅的同定を行う。それらを通じて「膜トポロジー反転による新規機能獲得」というタンパク質機能発現制御における新たな概念確立を目指す。また、引き続き脱G1a化機構の解明と抗ウイルス応答における新規細胞内G1a化タンパク質の機能解析を行うとともに、細胞内G1a化に関わる他の生理的コンテキストを探る。以上、見出した「細胞内G1a化」と「膜トポロジー反転制御」というタンパク質機能発現制御における新たな階層の解析を通じて細胞内情報伝達の理解に繋げると共に、感染症や疾患に対する新たな分子ターゲットの基盤提供に貢献したい。