



構造異常糖タンパク質の分解に必須な

糖鎖刈り込み機構を解明

～最新ゲノム編集解析により醜いアヒルの子が美しい白鳥に変身～

ポイント

- ・ EDEM1、EDEM2、EDEM3 はいずれも糖鎖刈り込み酵素活性を持つ
- ・ EDEM2 によって構造異常糖タンパク質からの糖鎖刈り込みが開始される
- ・ EDEM1 および EDEM3 は、EDEM2 に続いて第2段階目の糖鎖刈り込みを行う

研究者からのコメント

革新的なゲノム編集法の登場により、ヒト培養細胞でも比較的容易に遺伝子破壊を行うことができる時代が到来しました。この新技術を構造異常糖タンパク質の分解機構の解明に用いたところ、過剰発現や遺伝子発現抑制法によって導かれていたモデルとは全く異なる結果が得られました。細胞や生体の中で本当に何が行われているのか明らかにして行くことができる今後の研究を楽しみにしています。

1. 要旨

蜷川 暁 研究員(現岡崎統合バイオサイエンスセンター/元京都大学大学院理学研究科生物科学専攻)、岡田 徹也 助教(京都大学大学院理学研究科生物科学専攻)、森 和俊 教授(京都大学大学院理学研究科生物科学専攻)らの研究グループは、細胞にとって有害な構造異常糖タンパク質を小胞体から抹消する仕組みについて、従来のモデルを一新する提唱をしました。

分泌タンパク質や膜タンパク質が合成される小胞体では、タンパク質の厳密な品質管理が行われており、正しい構造を獲得しないタンパク質は不良品として分解処理されます。小胞体で合成されるタンパク質の多くには糖鎖が付加されます。これら糖タンパク質が正常な構造を獲得できない場合、分解の目印として、糖鎖に含まれる9個のマンノースが7個以下へと刈り込みされます。高等動物では糖鎖刈り込み酵素の候補分子として、EDEM1、EDEM2、EDEM3 が注目されてきましたが、実際に糖鎖刈り込み酵素活性を有するのか、それとも単純に糖鎖を認識する分子として機能するのか、10年来議論されてきました。特に、EDEM2 には糖鎖刈り込み酵素活性がないことが通説となっていました。

本研究において森教授らのグループは、最近開発された革新的なゲノム編集法である Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 法を活用し、これまで困難であったヒト培養細胞を用いた遺伝子破壊解析を行いました。その結果、EDEM1、EDEM2、EDEM3 全てが糖鎖刈り込み活性を有することを初めて実証しました。また、各 EDEM タンパク質の酵素活性には基質特異性があることを発見し、糖鎖刈り込みの第1段階(9個のマンノースを持つ糖鎖からマンノース1個を刈り込む反応)は EDEM2 により行われること、第2段階(8個のマンノースを持つ糖鎖からマンノースを1個以上刈り込む反応)は EDEM1 あるいは EDEM3 により行われること、従来は EDEM1 が最も重要な分子として捉えられていましたが、EDEM1 より EDEM3 の寄与が大きいことを明らかにしました。さらに、EDEM2 による糖鎖刈り込みの開始が、構造異常糖タンパク質分解経路に必須であることも明らかにしました。

EDEM タンパク質の酵素活性の有無に関する長年の議論に決着をつけたこれらの成果は、これまでの糖鎖刈り込みモデルを一新しました。今回の発見は小胞体における構造異常糖タンパク質分解機構を理解する上で極めて重要なものです。構造異常タンパク質の産生や分解処理機構の破綻はフォールディング病と総称される様々な疾患に関与することが知られており、本研究の成果は、これら疾患の発症機構の解明や新しい治療戦略の立案にもつながると期待されます。

2. 研究の背景

小胞体は、全タンパク質の約 1 / 3 を占める分泌タンパク質および膜タンパク質が合成され成熟する場です。生合成されたタンパク質は N 型糖鎖^{注1)}付加やジスルフィド結合などの翻訳後修飾を受け、小胞体シャペロンなどの助けを借りて正しい立体構造を獲得します。一方、どうしても正しい立体構造を獲得できないタンパク質は、小胞体関連分解と呼ばれる機構により小胞体から細胞質に逆行輸送され、ユビキチン・プロテアソーム系によって分解されます。

小胞体関連分解には様々な分解経路が存在しますが、小胞体で合成されるタンパク質の大部分には N 型糖鎖が付加されることから、糖鎖依存的な小胞体関連分解経路が最も良く研究されています。糖鎖依存的な分解経路では、マンノース 9 個を含む M9 型糖鎖からマンノースが順次刈り込みされることで (M9→M8B→M7・M6・M5)、構造異常糖タンパク質が分解へと導かれます。高等動物では糖鎖刈り込み酵素の候補分子として、EDEM1、EDEM2、EDEM3 が注目されてきましたが、実際に酵素活性を有するのかどうか 10 年来議論されてきました。中でも、EDEM2 には酵素活性がないことが通説となっていました。そこで森和俊教授らの研究グループは、ニワトリ DT40 細胞およびヒト HCT116 細胞を用いた遺伝子破壊解析を行い、これら候補分子の機能を詳細に解析しました。

3. 研究結果

ニワトリ DT40 細胞では相同組換えが起こりやすく、比較的容易に遺伝子破壊株の作製が可能です。DT40 細胞に加え、最新技術である TALEN 法^{注2)}を活用して、これまで困難であったヒト細胞においても EDEM1、EDEM2、EDEM3 の遺伝子破壊を行いました。細胞内の糖鎖組成にどのような影響があるか調べたところ、ニワトリ、ヒトいずれにおいても EDEM2 が欠損した細胞では M9 型糖鎖が増加し、EDEM1 あるいは EDEM3 が欠損した細胞では M8B 型糖鎖が増加しました(Fig-1)。この結果は、ヒトとニワトリにおいて、3 種の EDEM タンパク質全てが糖鎖刈り込み活性を有することを示しています。

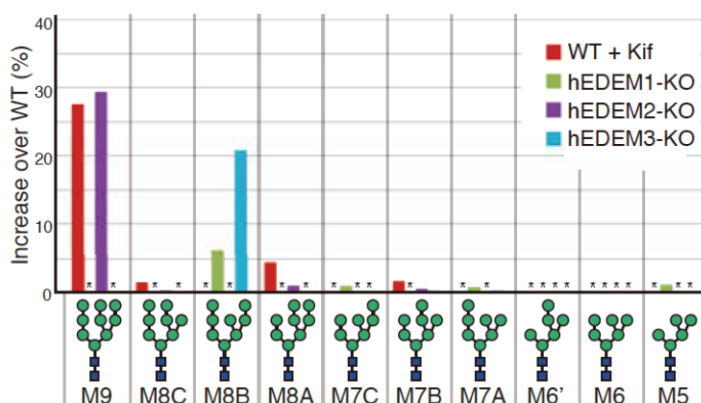


Fig-1. 各ヒト HCT116 細胞株での糖鎖組成

それぞれの遺伝子破壊株の各々の糖鎖が野生型細胞と比較してどの程度増加したかを示している。

Fig-1 を詳しく見ていきますと、EDEM2 の欠損による M9 型糖鎖の増加割合が糖鎖刈り込みの強力な阻害剤であるキフネンシン(Kif)の効果と同程度であることから、EDEM2 が M9 型糖鎖から M8B への刈り込み、すなわち糖鎖刈り込みの第 1 段階を実行する主要な酵素であると考えられます。また EDEM2 の欠損による M9 型糖鎖の増加割合と、EDEM1 および EDEM3 の欠損による M8B 型糖鎖の増加割合の合計が同程度であることから、EDEM2 は第 1 段階のみに、EDEM1/EDEM3 は第 2 段階 (M8B 型糖鎖から糖鎖をさらに刈り込む) のみにそれぞれ特異的に寄与すると考えられます。

次に、EDEM タンパク質の糖鎖依存的な小胞体関連分解経路への寄与を検証するために、糖鎖に依存して分解される小胞体膜タンパク質 ATF6 の分解速度を調べました(Fig-2)。その結果、野生型細胞と比較して EDEM2 欠損細胞では ATF6 の分解が顕著に遅延していました。また、EDEM3 欠損細胞、EDEM1 欠損細胞においても ATF6 の有意な分解遅延が観察されました。これらの結果から EDEM1、EDEM2、EDEM3 が糖鎖依存的な小胞体関連分解経路に確かに寄与しており、中でも EDEM2 が極めて重要な働きをしていることがわかります。

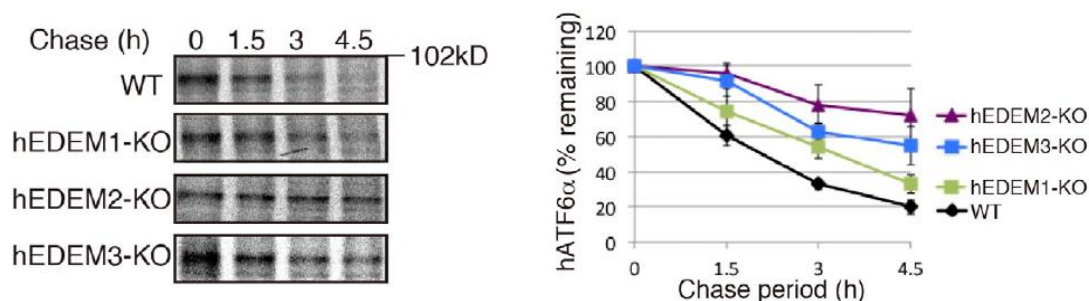


Fig-2. それぞれのヒト遺伝子破壊株における ATF6 の分解曲線
それぞれの遺伝子破壊株において ATF6 の分解速度を調べた。

EDEM2 欠損細胞、EDEM3 欠損細胞、EDEM1 欠損細胞、野生型細胞(WT)の順に ATF6 の半減期が長かった。

4. まとめ

本研究により EDEM1、EDEM2、EDEM3 がそれぞれ特異的な糖鎖刈り込み活性を持つ酵素であることが実証されました。また、酵素活性を持たないと考えられていた EDEM2 (醜いアヒルの子) が糖鎖刈り込みの第 1 段階を実行する非常に重要な酵素 (美しい白鳥) であり、EDEM1 および EDEM3 は第 2 段階を実行する酵素であることが明らかとなりました(Fig-3)。これらの成果は、従来の小胞体内で行われる糖鎖刈り込みモデルを一新するものであり、今後の小胞体における構造異常タンパク質分解研究の大きな指針となる重要な発見です。本研究は、同時に遺伝子破壊解析の重要性と新ゲノム編集法の有用性も示しています。

小胞体内に生じた構造異常タンパク質を分解処理する機構は、細胞が生命活動を行う上で極めて重要です。実際に、構造異常タンパク質の蓄積や分解機構の破綻がフォールディング病^{注3)}と総称される様々な疾患に関与することが報告されています。本研究の成果は、これら疾患の発症機構の解明や新しい治療戦略の立案にもつながると期待されます。

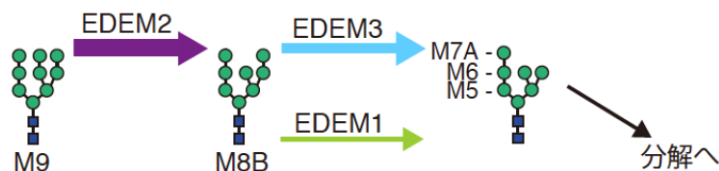


Fig-3. 新糖鎖刈り込みモデル
EDEM2 が刈り込みを開始した後に、EDEM3/EDEM1 がさらに刈り込みを行い、異常糖タンパク質を分解へと導く

5. 論文名と著者

論文名 : EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step

ジャーナル名 : The Journal of Cell Biology

著者

Satoshi Ninagawa^{1,2}, Tetsuya Okada¹, Yoshiki Sumitomo¹, Yukiko Kamiya², Koichi Kato^{2,3}, Satoshi Horimoto¹, Tokiro Ishikawa¹, Shunichi Takeda⁴, Tetsushi Sakuma⁵, Takashi Yamamoto⁵, and Kazutoshi Mori¹

著者の所属機関

1. 京都大学大学院理学研究科（糖タンパク質分解解析等、取り纏め）
2. 岡崎統合バイオサイエンスセンター, 3. 名古屋市立大学大学院薬学研究科（糖鎖解析）
4. 京都大学大学院医学研究科（DT40細胞における遺伝子破壊）
5. 広島大学大学院理学研究科（TALEN法）

6. 本研究への支援

本研究は下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- ・文部科学省 科学研究費補助金

また本研究は、岡崎統合バイオサイエンスセンター加藤晃一研究室、京都大学大学院医学研究科武田俊一研究室、広島大学大学院理学研究科山本卓研究室との緊密な共同研究により達成され、Faculty of 1000により F1000Prime に選ばれました。

7. 用語説明

注1) N型糖鎖

小胞体で生合成されるタンパク質には特定のアスパラギン(N)残基に対して糖鎖が付加される。N型糖鎖は3つのグルコース、9つのマンノース、2つのN-アセチルグルコサミンから成る。

注2) TALEN法

DNA結合ドメイン(TALEs)とDNA切断ドメイン(Nuclease)を融合させた人工DNAヌクレアーゼにより、任意のDNA配列を切断する新技術。

注3) フォールディング病

タンパク質の異常構造が原因で引き起こされる病気の総称。アルツハイマー病や嚢胞性繊維症、プリオン病(狂牛病)など。