

シビアな構造異常糖タンパク質が出現すると手順を踏まずに強制分解

～酵母にはない高等動物特有の小胞体糖タンパク質分解システムの解明～

ポイント

- ・ ネイティブだが不安定な糖タンパク質は糖鎖依存分解経路のみで分解される
- ・ シビアな構造異常糖タンパク質は糖鎖依存分解経路、非依存分解経路の両方で分解される

(研究者からのコメント)

構造異常タンパク質は細胞にとって有害ですので、修復されないと細胞はこれを分解します。これまで、糖鎖が共有結合したタンパク質が分解される際には糖鎖が刈り込まれ、分解シグナルがむき出しになって分解処分されると考えられてきました。昨年、この刈り込み酵素の実体を解明しました。今回、この刈り込み酵素を全て欠損する細胞を作製して解析した結果、シビアに構造異常となった糖タンパク質の場合、糖鎖の刈り込みという手順を踏まなくても強制的に分解されることを見いだしました。タンパク質品質管理機構の奥深さが改めて浮き彫りになりました。

1. 要旨

蜷川 暁 研究員(現京都大学大学院理学研究科生物科学専攻/元岡崎統合バイオサイエンスセンター)、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、細胞にとって有害であるシビアな構造異常糖タンパク質は糖鎖依存分解経路だけでなく糖鎖非依存分解経路でも分解されるという、酵母にはない高等動物特異的な分解システムを発見しました。

全タンパク質の約 1 / 3 が生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、不要なタンパク質や構造をとっていない異常タンパク質は分解処分されます。小胞体におけるタンパク質の分解は、糖鎖を持つタンパク質(糖タンパク質)を処分する糖鎖依存分解経路と、糖鎖を持たないタンパク質を処分する糖鎖非依存分解経路の 2 つに大別されると考えられてきました。糖鎖依存分解経路では、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 個以下へと段階的に刈り込みされます。本研究グループは昨年、このマンノース刈り込みがマンノシダーゼ EDEM2 によって開始され、EDEM3/1 によって完了されることを明らかにしました (Ninagawa et al., JCB, 2014)。

そこで本研究は、糖鎖依存分解経路の糖タンパク質分解への影響を精査することを目的としました。最新ゲノム編集技術である TALEN(Transcriptional activator-like effector nuclease)法を駆使して EDEM1/2/3 の遺伝子破壊を行い、糖鎖依存分解経路が全く機能しない EDEM トリプルノックアウト細胞(EDEM TKO 細胞)を作製しました。EDEM TKO 細胞では、ネイティブな一次構造を持つが不安定な糖タンパク質 ATF6a、ATF6a(C)、CD3- δ -ATM あるいは EMC1 の分解が、予想通り顕著に抑制されました。一方、驚いたことに、 α 1-アンチトリプシンの変異体であるモデル構造異常糖タンパク質 NHK については、初期の分解遅延が観察されましたが、最終的には野生型細胞の場合と同様に分解されました。この予想外の結果を受けて、本研究グループは、NHK と NHK 以外の分解基質の挙動の違いは何に由来するのかという謎に迫ることにしました。NHK は C 末端に大きな欠損領域が存在し、大きく構造が崩れ

ていると考えられることから、「シビアな構造異常部位を有する糖タンパク質は糖鎖依存分解経路に加えて糖鎖非依存分解経路でも分解される」という仮説を立てました。

この仮説を検証するために、ATF6 α (C)、CD3- δ - Δ TM あるいは EMC1 に対してアミノ酸の挿入、欠失による構造異常部位を導入し、EDEM TKO 細胞においてそれらの分解速度を調べました。すると NHK と同様に、初期には分解遅延が見られましたが、最終的には分解されるようになりました。これらのことからシビアな構造異常部位を有する糖タンパク質は、糖鎖依存分解経路だけでなく糖鎖非依存分解経路でも分解されることが明らかになりました。

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ず異常構造を持つタンパク質や、機能的ではあるが不安定なタンパク質は、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。

糖鎖の有無により小胞体での構造形成経路と分解経路が大きく違ってくるということが知られています。糖鎖を持つタンパク質は糖鎖依存構造形成経路や糖鎖依存分解経路の基質になり、糖鎖を持たないタンパク質は糖鎖に依存しない構造形成経路や分解経路の基質になることが分かっています。糖鎖依存分解経路では、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)、糖タンパク質が分解へと導かれます。昨年、本研究グループは、高等動物における糖鎖刈り込み酵素 EDEM1、EDEM2、EDEM3 を同定し、その活性を明らかにしました。今回、同グループは糖鎖刈り込みを必要とした糖鎖依存分解経路の分解への寄与を詳細に解析しました。

3. 研究結果

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なニワトリ DT40 細胞、および近年開発された TALEN 法^{注2)}を活用してヒト細胞において、EDEM1、EDEM2、EDEM3 を破壊した EDEM トリプルノックアウト細胞(EDEM TKO 細胞)を作製しました。この糖鎖依存分解経路を遮断した EDEM TKO 細胞では、糖タンパク質 ATF6 α の分解が予想通り顕著に抑制されました(図 1 右)。一方で、 α 1-アンチトリプシンの変異体であるモデル構造異常糖タンパク質 NHK については、初期の分解遅延が観察されましたが、最終的には野生型同様に分解されました(図 1 左)。同グループは、この予想外の結果が、何に由来するのか調べることにしました。

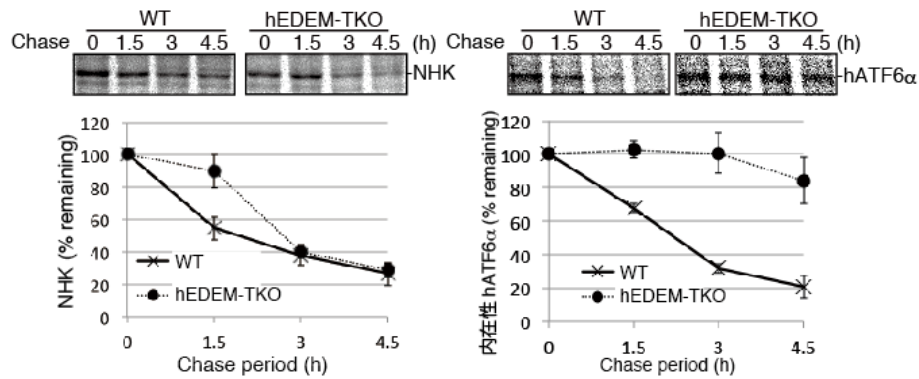


図1 2つの分解モデル糖基質の挙動の違い

EDEM TKO 細胞において NHK の初期分解遅延が確認されましたが、最終的には分解されました。hATF6α では顕著な分解遅延が見られました。この挙動の違いは何に由来するのでしょうか？

ATF6α は不安定であるがネイティブな糖タンパク質であるのに対して、NHK は C 末端に大きな欠損領域と 15 アミノ酸の変異配列を持ち、大きく構造が壊れていると推測されます。そこで、このような挙動の違いは、シビアな構造異常部位の有無に由来すると考え、仮説「構造異常の度合いによって分解のされ方が違い、シビアな構造異常部位を有する糖タンパク質は糖鎖依存分解経路に加えて糖鎖非依存分解経路でも処分される」の立証を試みました。

ATF6α 以外にも、不安定であるがネイティブな高次構造を有すると推測される糖タンパク質 ATF6α(C)、CD3-δ-ΔTM および EMC1 の分解は EDEM TKO 細胞において顕著に遅れました。一方、ATF6α(C)、CD3-δ-ΔTM、EMC1 にアミノ酸の欠失または挿入による変異を導入すると、NHK と同様に、初期の分解遅延と、最終的な分解が観察されました。またトリプシン消化法や今回初めて本研究グループによって開発された PNGase アッセイにより、これらの変異によって ATF6α(C)、CD3-δ-ΔTM、EMC1 の構造が大きく壊れていることも示されました。よって上記の仮説が強く支持されました。

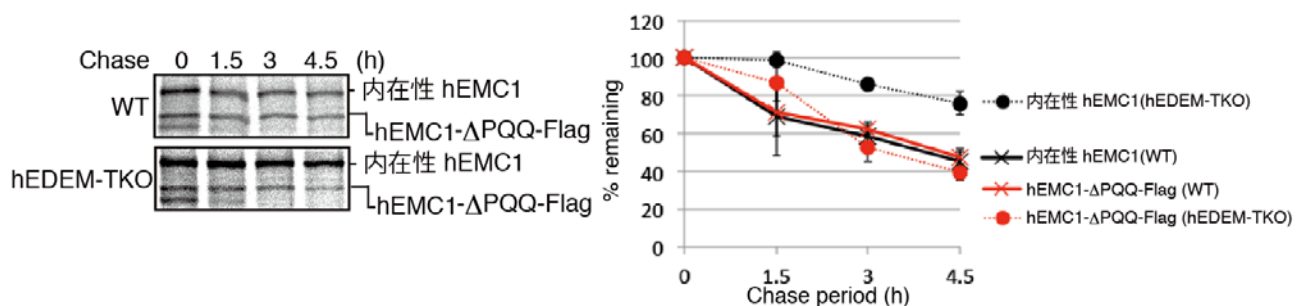


図2 不安定な糖タンパク質とシビアな構造異常タンパク質の分解曲線

ネイティブだが不安定な内在性糖タンパク質 EMC1 の分解は、EDEM TKO 細胞において顕著に遅延していました。一方で PQQ ドメインの大部分を欠失した EMC1-ΔPQQ-Flag については、EDEM TKO 細胞において初期の分解遅延が見られるものの、最終的には野生型細胞同様に分解されていました。他のデータから EMC1-ΔPQQ-Flag は構造が壊れていることが支持されています。

4. まとめ

本研究により、小胞体の不安定な糖タンパク質は糖鎖依存分解経路のみで処分され、シビアな構造異常を有する糖タンパク質は糖鎖依存分解経路と糖鎖非依存分解経路で確実に処理されることが示されました。小胞体におけるタンパク質分解の基本機構は酵母からヒトまで保存されていますが、酵母では糖鎖非依存分解経路が機能しておらず、この分解システムは高等動物のみに存在していると考えられます。新たに発見されたこの精巧な対応策は、進化に伴って多様化した小胞体の負荷に対処するために獲得されたと考えられます。

小胞体において構造異常タンパク質を分解処理する機構は、ヒトにとって極めて重要な役割を果たしていることが分かっています。実際に、この分解機構がアルツハイマー病を初めとした60以上の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その予防にもつながると期待されます。

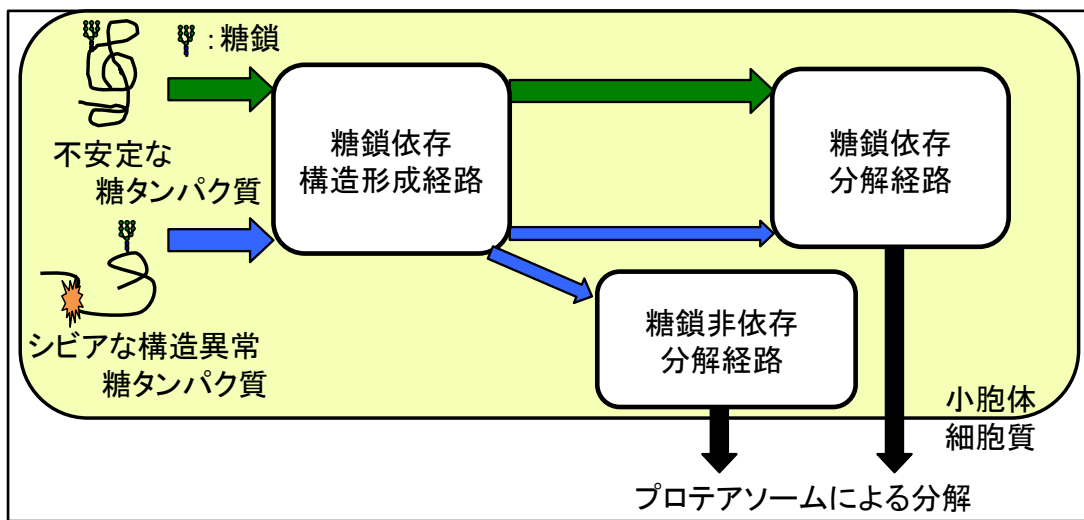


図3 糖タンパク質の構造形成経路と分解経路の模式図

不安定な糖タンパク質は糖鎖依存構造形成経路に入った後、糖鎖依存分解経路で分解される。一方で、シビアな構造異常糖タンパク質は、糖鎖依存構造形成経路に入った後、糖鎖依存分解経路もしくは非依存分解経路で分解される。

5. 論文名と著者

論文名 : Forcible destruction of severely misfolded mammalian glycoproteins by the non-glycoprotein ERAD pathway

ジャーナル名 : The Journal of Cell Biology

著者

Satoshi Ninagawa^{1,2}, Tetsuya Okada¹, Yoshiki Sumitomo¹, Satoshi Horimoto¹, Takehiro Sugimoto¹, Tokiro Ishikawa¹, Shunichi Takeda³, Takashi Yamamoto⁴, Tadashi Suzuki⁵, Yukiko Kamiya², Koichi Kato^{2,6} and Kazutoshi Mori¹

著者の所属機関 (5つの研究グループの緊密な連携により、本研究が達成されました)

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
6. 名古屋市立大学大学院薬学研究科 (糖鎖解析、糖タンパク質分解解析、取り纏め)
3. 京都大学大学院医学研究科 (DT40 細胞における遺伝子破壊)
4. 広島大学大学院理学研究科 (TALEN 法)
5. 理化学研究所 グローバル研究クラスタ 糖鎖代謝学研究チーム (PNGase, ENGase KO 細胞)

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

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。