課題番号　６Ａ－１６

研究題目　小胞体ストレスに応じた、新規翻訳後修飾ターゲットの探索と機能解析

研究組織

研究代表者：岡崎朋彦（北海道大学遺伝子病制御研究所）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

小胞体は細胞の恒常性維持に重要な細胞内オルガネラである。小胞体では、膜タンパク質や分泌タンパク質の合成も行うが、これらタンパク質の合成が滞ると、小胞体は小胞体ストレス応答を誘導し、不良タンパク質の解消を行う。

小胞体ストレス応答において、近年、小胞体膜局在 FICD (FIC domain-containing protein) が重要な役割を担うと考えられている。FICD はタンパク質の AMP 化および脱 AMP 化反応を触媒する翻訳後修飾酵素であり、小胞体シャペロン BiP の活性を AMP 化で制御することが知られている。しかしながら、BiP 以外の基質は不明であり、FICD の他の機能はよくわかっていない。そこで、本研究においては、小胞体ストレス時に、FICD がどのように機能するのかを明らかにすることを目的として、小胞体ストレス時の FICD の相互作用因子を網羅的に解析する。

[1-2]研究の方法・経過

本共同研究では、TurboID による近接依存性標識を用いて、FICD の相互作用因子探索を試みた。

FICD KO HEK293T 細胞に、TurboID を融合した FICD を発現させ、小胞体ストレス誘導試薬 Thapsigarigin により小胞体ストレスを誘導したのち、Biotin 化標識を行った。回収した細胞ライセートから、プロテオーム解析により、ビオチン化ペプチドを網羅的に同定した。プロテオーム解析は、小迫英尊教授との共同研究により行った。

今年度のプロテオームでは、検出感度の良い条件を決定するため、いくつかの標識条件において解析を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本共同研究によるプロテオーム解析により、標識の条件が決定した。最も良い条件では、1649 種類のペプチド、805 種類のタンパク質が同定できた。同定タンパク質の中から、小胞体ストレス誘導試薬依存的にビオチン化の検出量が増加するタンパク質を FICD の相互作用因子の候補とした。候補タンパク質は 95 種類あった。得られた候補タンパク質に対し、GO 解析を行ったところ、小胞体ストレス応答経路をはじめとする、小胞体における、細胞の恒常性維持のためのさまざまな経路に関与する可能性が示唆された。

今回の解析は、統計処理のできない解析であるため、今後は、決定した標識条件において、解析サンプル数を増やし、ラベルフリー定量解析を用いた統計解析を行う予定である。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これまで、FICD の機能については、小胞体ストレス時に小胞体局在シャペロン BiP の活性を制御することのみ知られていた。本研究では、近接依存性標識法を用いて FICD の相互作用因子を探索することにより、これまで明らかにされていなかった FICD の機能を示唆する結果を得ることができた。

小胞体ストレス応答は、神経疾患やがんと密接に関わることが知られている。小胞体ストレス応答における分子基盤の解明は、医学・薬学分野への波及効果も大きい。本研究の成果は、

これら疾患への新たな治療ストラテジーの提案に繋がる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

　今年度の研究により、FICD の機能ついての新たな示唆を得ることができた。今後は、解析サンプル数を増やして統計解析を行い、FICD の相互作用因子候補を絞った上で、候補因子群を個別に解析することで、FICD の機能を明らかにする。