

研究題目 小胞体ストレス誘導性の翻訳と共役したタンパク質分解の分子

機構の解明

研究組織

研究代表者：門脇 寿枝（宮崎大学医学部）

共同研究者：吉川 治孝（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

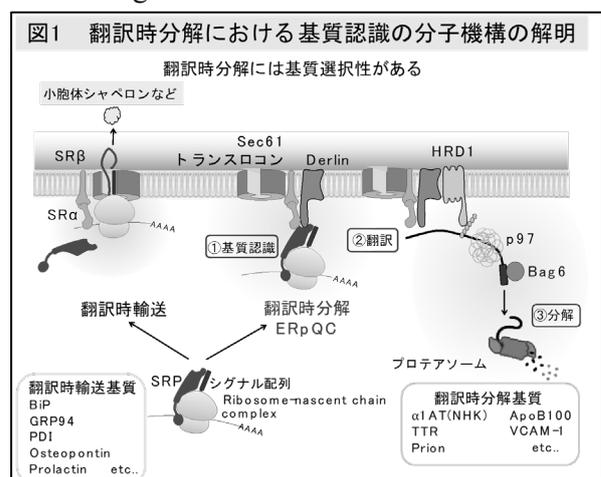
真核細胞の全タンパク質のうち、シグナル配列を持つ分泌・膜タンパク質は小胞体内へ挿入され、正しく折畳まれることで適切な場所へと輸送され機能する。しかし、様々なストレス環境下では折畳み異常タンパク質が小胞体内に蓄積するため、細胞はこれらを修復あるいは消去する品質管理機構をもつ。一方、小胞体内でのタンパク質折畳み許容量の回復のため、小胞体膜近傍での翻訳抑制や mRNA の分解により小胞体へのタンパク質輸送が制限される。しかし、これらの翻訳時輸送制限は絶対的でなく、回避して合成されたタンパク質は小胞体への過負荷となるため、バックアップシステムとして**翻訳と共役した分解（翻訳時分解）**が作動する。翻訳時分解は、小胞体に挿入されるべきシグナル配列を持つタンパク質を細胞質で翻訳し、即座にプロテアソームにて分解する機構であり、その異常は小胞体に限らず、細胞質のタンパク質品質管理をも破綻させ、凝集タンパク質に起因する神経変性疾患などの様々な病態に関与する危険性をはらんでいる。

現在までに申請者は、翻訳時分解の分子機構について以下のことを見出している。(1) 小胞体ストレス環境では、Sec61 トランスロコンに小胞体膜タンパク質 Derlin がリクルートされ、Derlin へのシグナル認識粒子(SRP)の結合を介し、シグナル配列を持つ新生鎖を小胞体から細胞質へと輸送先を変更させる (図 1①)。(2) 翻訳を完了した新生鎖は、E3 リガーゼ HRD1 によりユビキチン化され、AAA-ATPase p97 とシャペロン Bag6 によりプロテアソームに輸送され分解される (図 1②③, [Kadowaki Cell Rep 2015](#),

[Sci. Rep. 2018](#))。さらに、翻訳時分解には基質選択性があり、小胞体シャペロンの多くは翻訳時分解基質とはならず、小胞体へと翻訳時輸送される (図 1 左)。つまり、細胞は、分泌タンパク質などの小胞体への輸送を選択的に阻害して細胞質で翻訳時分解し、一方で小胞体品質管理に必要な分子を翻訳時輸送することで、小胞体の品質を保つ。本共同利用では、この基質選択性決定の分子メカニズムの解明を目的とする。

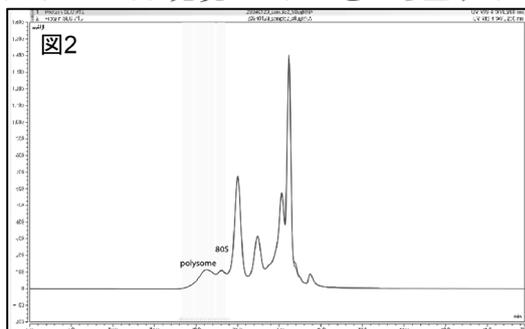
[1-2] 研究の方法・経過

翻訳時分解基質を含む Ribosome-nascent chain complex (RNC) は SRP に認識された後、Derlin に捕捉される (図 1①)。そこで、翻訳時分解基質の RNC に結合する分子を探索することで基質認識分子を特定する。具体的には、シグナル配列前に Flag タグを融合した翻訳時分解基質、コントロールとして翻訳時輸送基質 (小胞体シャペロン)を細胞に発現し、小胞体ストレス状況下でシクロヘキシミド処理後、可溶化する。その後、吉川先生らが開発されたサイズ排除クロマトグラフィーを利用したリボソームの分画 (Ribo Mega-SEC) により、80S リボソームの分



離・回収を行い、抗 Flag 抗体にて免疫沈降して、翻訳時分解基質特異的結合分子を質量分析にて同定する。得られた候補分子の検証のため siRNA ノックダウンによる発現抑制細胞を用いた Immunoblotting (IB)にて翻訳時分解の誘導を指標に基質認識分子を特定する。

現在までに、翻訳時分解基質として Flag-NHK を HEK293 細胞内に発現させ Ribo Mega-SEC により、80S リボソームの分離と回収に成功しているが (図 2)、目的の Flag-NHK を合成するリボソーム自体がごく微量であり、収量を上げる必要がある。そこで、高収量タンパク質実験系の構築のため Exi293 発現システムを立ち上げている。



【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

小胞体ストレス状況下では、細胞はシグナル配列含有タンパク質の運命を「小胞体での翻訳時輸送」または「細胞質での翻訳時分解」に小胞体膜上で巧みに振り分けている。その基質選択性決定の分子機構を知るために、80S モノソームに着目し、翻訳時分解基質を翻訳する RNC に特異的に結合する分子を明らかにしたいと考えている。ただし、翻訳時分解基質自体が RNC を形成する時間はかなり限定され、実際に Ribo Mega-SEC により、80S リボソームの分離と回収を行い、抗 Flag 抗体で免疫沈降して IB を行ったところ、合成途上の翻訳時分解基質である Flag-NHK の発現はごく微量で、特定の分子量 (約 30kDa) であることが明らかとなった (図 3: 白矢頭)。今後は、この Flag-NHK を翻訳する 80S の RNC を大量に回収するために、Exi293 発現システムにて系の構築を目指す。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

申請者は最近、翻訳時分解の破綻が細胞質にて凝集タンパク質を蓄積させること、個体レベルで運動機能に異常があることを捉えている (投稿中)。そのため、シグナル配列含有タンパク質が翻訳時輸送、あるいは翻訳時分解に選別される機構が明らかになれば、凝集タンパク質に起因する多くの神経変性疾患などの病態に

対する治療薬開発に繋がる可能性が期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

- [雑誌] Naoya Murao, Taito Matsuda, **Hisae Kadowaki**, Yosuke Matsushita, Kousuke Tanimoto, Toyomasa Katagiri, Kinichi Nakashima, Hideki Nishitoh.

The Derlin-1-Stat5b axis maintains homeostasis of adult hippocampal neurogenesis.

EMBO Rep. 25:3678-3706 (2024)

- [雑誌] Hiroki Shimura, Sota Yamamoto, Isshin Shiiba, Mami Oikawa, Shohei Uchinomiya, Akio Ojida, Shigeru Yanagi, **Hisae Kadowaki**, Hideki Nishitoh, Toshifumi Fukuda, Shun Nagashima, Tomoyuki Yamaguch.

Etomoxir suppresses the expression of PPARgamma2 and inhibits the thermogenic gene induction of brown adipocytes through pathways other than β -oxidation inhibition.

J Biochem. 2024 Dec27:mvae092 (2024)

- [書籍] **門脇寿枝**, 小胞体関連分解 ERAD の解析方法: 田村康, 山野晃史 編
実験医学別冊「疾患研究につながるオルガネラ実験必携プロトコール」. 羊土社, 東京, 93-104, 2024 年

[3-2] 学会発表

- Hisae Kadowaki**. Molecular mechanism of stress-dependent co-translational degradation on the ER membrane.
Ribosome Meeting 2024 Tokyo, 東京, 12 月 4 日, 2024 年
- 門脇寿枝** Molecular mechanism of stress-dependent co-translational degradation on the ER membrane.
第 47 回日本分子生物学会年会, 福岡, 11 月 28 日, 2024 年
- 門脇寿枝**, 西頭英起 小胞体ストレス依存的な翻訳時分解を介したタンパク質品質維持機構
第 76 回日本細胞生物学会大会, つくば, 7 月 17 日, 2024 年

【4】今後の課題等

今後は、小胞体での翻訳時輸送から細胞質での翻訳時分解に運命決定する分子の特定に至るために、高収量タンパク質精製システムを立ち上げる。

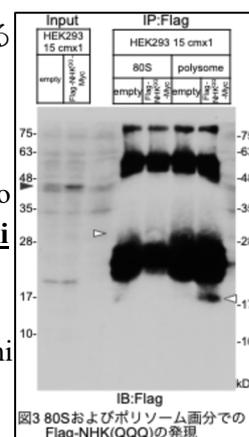


図3 80Sおよびポリソーム画分でのFlag-NHK(QQQ)の発現