

論文内容の要旨

論文題目：小胞体関連分解における XTP3-B の機能と糖結合特異性の解明

氏名 山口 大介

【序論】

小胞体 (ER) では分泌タンパク質や膜タンパク質が盛んに合成されているが、同時に正しく折り畳まれなかったミスフォールドタンパク質も生成される。ミスフォールドタンパク質は遺伝子変異や代謝異常など様々な要因により生成されるが、正常の環境下でも、合成されるタンパク質のおよそ3割はミスフォールドタンパク質であるという報告もある。ミスフォールドタンパク質はERに蓄積し、ER内のタンパク質合成機構に負荷を与え、ERホメオスタシスの破綻、最終的にはアポトーシスを引き起こす。そのような事態を回避し、ミスフォールドタンパク質を特異的に分解するために、小胞体関連分解 (ERAD) という機構が備わっている (図1)。ERADにおいて最も重要なプロセスはミスフォールドタンパク質を正しい折りたたみのタンパク質と厳密に識別することである。ERAD促進因子として同定されたEDEMが、ミスフォールドタンパク質上の $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ isomer B糖鎖を認識し、識別していると考えられてきた。しかし、この糖鎖構造はカーゴレセプターERGIC-53の認

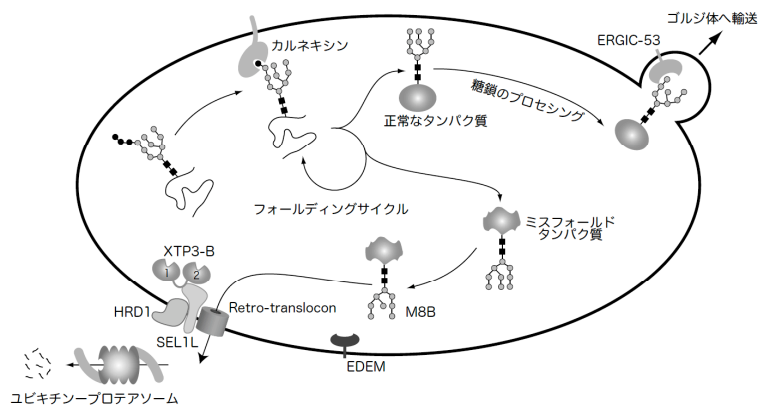


図1. 小胞体関連分解 (ERAD)

ERで合成されたタンパク質はカルネキシンによって折りたたまれ、ERGIC-53を介してゴルジ体へと輸送される。ミスフォールドタンパク質は細胞質に逆輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される。

ERに蓄積し、ER内のタンパク質合成機構に負荷を与え、ERホメオスタシスの破綻、最終的にはアポトーシスを引き起こす。そのような事態を回避し、ミスフォールドタンパク質を特異的に分解するために、小胞体関連分解 (ERAD) という機構が備わっている (図1)。ERADにおいて最も重要なプロセスはミスフォールドタンパク質を正しい折りたたみのタンパク質と厳密に識別することである。ERAD促進因子として同定されたEDEMが、ミスフォールドタンパク質上の $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ isomer B糖鎖を認識し、識別していると考えられてきた。しかし、この糖鎖構造はカーゴレセプターERGIC-53の認

識糖鎖であることや、EDEM はマンノシダーゼ活性をもつという報告から、どのようにミスフォールドタンパク質の識別が行われているか明確にされていない。最近、小胞体に局在する XTP3-B という可溶性タンパク質が、ミスフォールドタンパク質の細胞質への逆輸送に重要なユビキチンリガーゼ HRD1 複合体を構成するタンパク質の一つであることが報告された。しかし、その機能は明らかにされていない。また、XTP3-B はマンノース 6-リン酸レセプター (MPR) ホモロジドメイン (MRH ドメイン) を 2 つもつタンパク質であり、その MRH ドメインは MPR の糖結合活性に必須のアミノ酸を保存している。このことから、私は、XTP3-B がミスフォールドタンパク質の糖鎖を識別しているのではないかと考えた。そこで本研究では、XTP3-B の ERAD における機能と糖結合特異性を解析し、機能と糖結合特異性の関連性を解き明かすことを目指した。

【結果および考察】

XTP3-B の ERAD への関与

XTP3-B の ERAD への関連性を調べるために、ミスフォールドタンパク質のモデル分子である $\alpha 1$ -アンチトリプシン (AT^{WT}) の Null_{Hong Kong} 変異体 (AT^{NHK}) との相互作用を免疫沈降法により検証した。N 末端に 3xFLAG エピトープを付加した XTP3-B (3xFLAG-XTP3-B) と AT^{WT} もしくは AT^{NHK} を 293T 細胞に共発現させ、抗 FLAG 抗体と抗 AT 抗体で沈降させた。SDS-PAGE、ウェスタンブロットで解析した結果、XTP3-B は、 AT^{WT} と沈降せず、 AT^{NHK} と特異的に沈降した。これは、XTP3-B が ERAD 基質である

AT^{NHK} と選択的に相互作用することを示唆している。さらに MRH ドメインを欠失させた変異体を用いて同様の実験を行ったところ、XTP3-B $\Delta 1$ は AT^{NHK} と相互作用したが、XTP3-B $\Delta 2$ は相互作用しなかった(図 2)。つまり、XTP3-B は MRH ドメイン 2 を介して AT^{NHK} と相互作用していると考えられる。MRH ドメイン 2 との相互作用が糖鎖との結合を介しているか否かを検討するため、ER マンノシダーゼ I 阻害剤であるキフネシン (KIF) を用いて AT^{NHK} の糖鎖構造を改変し同様の実験を行った。KIF 存在下で AT^{NHK} を発現させて免疫沈降実験を行ったところ、XTP3-B と AT^{NHK} の相互作用は KIF 非存在下と大きな変化がみられなかった。これらのことから、ERAD の基質認識に XTP3-B の MRH ドメイン 2 が関与することが分かった。しかしながら、MRH ドメイン 2 が糖鎖を介しているか否かについては不明のままであった。そこで、糖鎖依存的な相互作用を詳細に解析するために、XTP3-B の糖結合特異性を解析した。

細胞表面糖鎖との結合解析

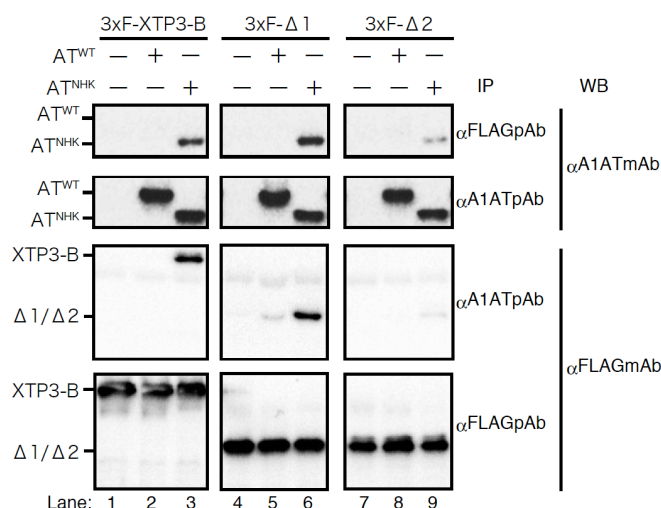


図 2. XTP3-B と NHK の免疫沈降実験

293T 細胞に 3xFLAG エピトープ融合 XTP3-B 発現ベクターと AT^{NHK} 発現ベクターを共導入し、抗 FLAG 抗体、抗 AT 抗体で免疫沈降実験を行い、SDS-PAGE およびウェスタンブロットで解析した。

XTP3-B の C 末端にヒト IgG1 (hIgG1) の Fc 領域を融合させた XTP3-B-Fc 融合タンパク質を作成するために、ヒト胚性腎臓由来 HEK293 細胞に遺伝子導入を行い、その培養上清を XTP3-B-Fc 融合タンパク質溶液として回収した。XTP3-B の MRH ドメイン 1、MRH ドメイン 2 をそれぞれ欠損した変異体 XTP3-B Δ1-Fc、XTP3-B Δ2-Fc も同様にして作成した。これらをプローブとして細胞表面糖鎖との結合を解析した。用いた CHO 細胞由来のレクチン耐性変異株 Lec1、Lec2、Lec8 細胞は、それぞれ *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I、CMP-シアル酸輸送体、

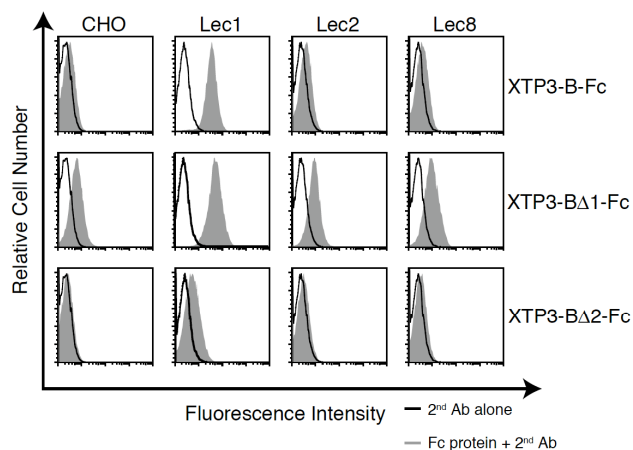


図3. XTP3-B-Fc タンパク質の結合解析

1 μg/ml の Fc タンパク質 (塗りつぶし) もしくは二次抗体のみ (実線) で CHO、Lec1、Lec2、Lec8 細胞を染色し、フローサイトメトリーで解析した。

UDP-ガラクトース輸送体に欠損をもつ細胞株であり、それぞれの細胞表面には異なる構造の糖鎖が発現している。それゆえ、これらの細胞株に対する XTP3-B-Fc の結合の違いを調べることで、糖結合活性のみでなく、その特異性も知ることができる。これらの細胞株に対する Fc タンパク質の結合をフローサイトメトリーで解析した。その結果、XTP3-B-Fc は Lec1 細胞に強く結合した (図3)。Lec1 細胞表面に発現する糖鎖構造は、主に $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ であることから XTP3-B は $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖に結合する可能性が示唆された。さらに、XTP3-B Δ1-Fc は Lec1 細胞に顕著に結合したが、XTP3-B Δ2-Fc は Lec1 細胞にわずかし結合しなかった (図3)。このことから、XTP3-B の 2 つの MRH ドメインのうち C 末端側のドメイン 2 が、Lec1 細胞との結合により重要であることが明らかになった。Lec1 細胞と XTP3-B-Fc の結合が糖鎖を介した結合であるか調べるために、エンドグリコシダーゼ H (EndoH) 処理により細胞表面の糖鎖を消化し、その結合を解析した。その結果、XTP3-B-Fc および XTP3-B Δ1-Fc の Lec1 細胞に対する結合が EndoH 処理により、有意に減少した。このことから、XTP3-B-Fc の Lec1 細胞への結合は、Lec1 細胞表面上の $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ を介していることが明らかになった。

XTP3-B の糖結合特異性の解析

N 型糖鎖は、様々な糖加水分解酵素および糖転移酵素の働きによって、ER やゴルジ体で多様な構造を獲得する。そのプロセスにおいてマンノシダーゼの働きは重要であり、マンノシダーゼの活性を阻害することで、生合成される *N* 型糖鎖の構造を改変できる。そこで、マンノシダーゼ II の阻害剤であるスワンソニン (SW) 存在下で培養した CHO、Lec2、Lec8 細胞に対する XTP3-B-Fc もしくは XTP3-B Δ1-Fc の結合を解析した。SW 未処理細胞では、結合は確認できなかったが、SW 処理細胞では有意な結合が確認された。SW 存在下では、複合型糖鎖へのプロセッシングが阻害されるため混成型糖鎖が細胞表面に発現する。混成型糖鎖の特徴は、そのコア構造として $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 構造を有している。このことから、XTP3-B は混成型糖鎖の $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 構造を認識していることが示唆された。ER マンノシダーゼ I (α 1-2 特異的) は高マンノース型糖鎖から $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ へのトリミングを行っている。そこで、その阻害剤である

KIF およびデオキシマンノジリマイシン (DMJ) 存在下で培養した Lec1 細胞に対する結合を解析した。その結果、KIF、DMJ のどちらでも結合が阻害されたが、KIF と比較し、DMJ の阻害効果が強く、KIF と DMJ を組み合わせるとさらに阻害された。このことから、XTP3-B は、高マンノース型糖鎖の中でも $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ の様なマンノース残基数の多い構造には結合できないと考えられる。次に、化学合成された $3\alpha,6\alpha$ -マンノペンタオース (branched Man_5 ; $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖の Man_5 に相当する五糖)、 α 1-2 マンノビオース ($\text{Man}\alpha$ 1-2 Man)、 α 1-3 マンノビオース ($\text{Man}\alpha$ 1-3 Man) および α 1-6 マンノビオース ($\text{Man}\alpha$ 1-6 Man) を用いて、結合阻害実験を行った。その結果、branched Man_5 および $\text{Man}\alpha$ 1-6 Man で濃度依存的に結合が阻害された (図 4 A)。この結果から、XTP3-B は、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖や混成型糖鎖に共通の branched Man_5 構造を認識しており、その構造の中でも $\text{Man}\alpha$ 1-6 Man 構造がその認識グライコトープであることが示唆された。さらに、 $\text{Man}\alpha$ 1-2 Man では結合が阻害されないことから、C アームの非還元末端が $\text{Man}\alpha$ 1-2 Man によってマスクされている高マンノース型糖鎖には、XTP3-B が結合できず、XTP3-B による認識には C アームのトリミングが重要であると考えられる (図 4 B)。

【結論】

本研究によって、XTP3-B の MRH ドメイン 2 が ERAD 基質である AT^{NHK} と特異的に相互作用し、かつ、糖鎖依存的に相互作用している可能性が示された。また糖結合特異性の解析から、XTP3-B が $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖などの C アームの α 1,2 Man 残基がトリミングされた高マンノース型糖鎖を認識することを明らかにした。ミスフォールドタンパク質は $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ isomer B という糖鎖構造をもち、その糖鎖がマンノシダーゼ様タンパク質である EDEM によって認識されることで ERAD へ誘導されると考えられてきた。

しかし、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ isomer B は正しくフォールディングされたタンパク質ももち、ERGIC-53 によって認識され、ゴルジ体へ輸送されるためのシグナルとしても機能する。つまり、ERAD と輸送が正確に機能するには、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ isomer B 以外に ERAD もしくは輸送のシグナルが重要な働きをすることになる。本研究から、XTP3-B が AT^{NHK} 上の糖鎖を認識し得ることが示されたが、ERAD で分解されるミスフォールドタンパク質には、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖が付加されているという報告を考え合わせると、XTP3-B は AT^{NHK} の $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖を認識している可能性が高い。また、ERAD 促進因子の EDEM それ自体がマンノシダーゼ活性を有することが報告されており、これらのことから、 AT^{NHK} などのミスフォールドタンパク質は、EDEM や ER マンノシダーゼ I によりその糖鎖の C アームがトリミングされ、 $\text{Man}\alpha$ 1-6 Man が露出する。このような糖鎖をもつミスフォールドタンパク質は、HRD1 複合体の XTP3-B によって認識され、細胞質に排出されるというメカニズムが存在すると考えられる。

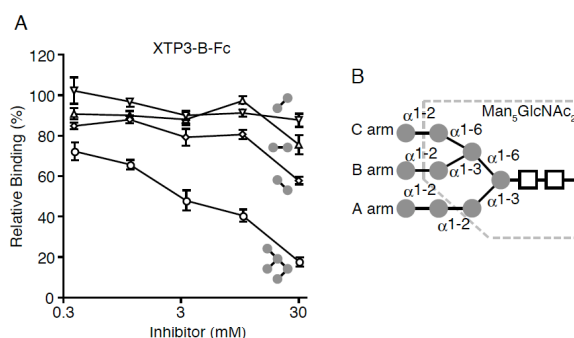


図 4. 二糖および五糖による結合阻害実験

(A) α 1-2(●)、 α 1-3(○)、 α 1-6(■)の各結合様式のマンノビオースおよびマンノペンタオースを各濃度で、Fc タンパク質と混合した。この混合液で Lec1 細胞を染色し阻害効果を解析した。(B) 高マンノース型糖鎖 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ の構造。 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ をコア構造として、各アームが $\text{Man}\alpha$ 1-2 Man でマスクされている。