

32. プレエンプティブ品質管理を介した疾患防御の新原理

川原 裕之

首都大学東京 大学院理工学研究科 生命科学専攻 細胞生化学教室

Key words : BAG6 複合体, タンパク質品質管理, ユビキチン, プロテアソーム, 神経変性疾患

緒言

膜タンパク質の新合成には厳密な品質管理が必要である。最近、このような膜タンパク質新合成の場に、新しい品質管理機構の存在が明確となってきた。膜タンパク質の殆どはシグナル配列依存的に小胞体へと輸送されるが、意外なことに、このプロセスの成功効率は必ずしも高くない。すなわち、最大で 40%にものぼる小胞体への移行エラーが生じうる。特に、ストレス条件下ではシグナル配列の認識不良、およびトランスロコンからの拒絶などが誘起され、シグナル配列を N 末端に持ったまま（正常な小胞体内プロセッシングを受けないまま）の不良膜タンパク質が細胞質に蓄積する。凝集性の高い不良膜タンパク質の蓄積を防ぐため、全く新しい「細胞質性」膜タンパク質品質管理機構の存在が予見され、「プレエンプティブ (pre-emptive : 予防的)」なタンパク質品質管理と名付けられた。しかし、古くから知られる「小胞体内」膜タンパク質品質管理 (ERAD など) とは対照的に、その分子の実体は最近まで明らかではなかった。

我々は最近、膜タンパク質の品質管理を担う新しい細胞質シャペロンとして BAG6 を見出し [1, 2]、その結合パートナー UBQLN4 と共に、これらがプレエンプティブ品質管理の中核として機能することを発見した [3]。すなわち BAG6-UBQLN4 複合体は、小胞体へのターゲティングに失敗した新合成膜タンパク質（あるいは分泌タンパク質）を細胞質にて峻別し、それらを速やかなプロテアソーム依存的分解系に導くのである [3, 4]。ヒトゲノムにコードされた全タンパク質の約 1/4 が膜タンパク質（あるいは分泌タンパク質）であることを考慮すると、膨大な数量の不良ポリペプチドが日常的に産生され、BAG6-UBQLN4 複合体のクライアントとして処理されていることが想定される (図 1)。プレエンプティブ品質管理は、プリオンをはじめとする凝集性ポリペプチドの選択的除去に関与することから、細胞内凝集体形成を病理とする各種疾患へ関与する可能性が高い。

2016 年 3 月、我々の EMBO Rep. 論文公表とほぼ同時期に、ハーバード医大のグループが若齢 rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) 患者の全エクソーム解析により、ヒト UBQLN4 点変異を初めて記載した。奇しくも、彼らが同定した変異部位は、我々が UBQLN4 の基質認識部位として見出した領域 [3] とほぼ一致し、UBQLN4 の基質認識異常が細胞のプロテオスタシスの異常、ひいては疾患発症の原因となる可能性が浮かび上がってきた。本研究では、プレエンプティブ品質管理に関する基礎研究を進め、新合成ポリペプチドの品質を監視・支配する BAG6-UBQLN4 複合体の作動機構を生化学的に解明することを目指した。

方法

若齢 RDP 患者に見出された UBQLN4 変異はデノボに生じたヘテロザイゴット点変異であることから、UBQLN4 疾患関連点変異体を発現する細胞ラインを構築した。この細胞を用いて、不良膜タンパク質モデルとしての IL-2R α SS (シグナル配列を欠損させたインターロイキン受容体 α 鎖) との親和性を免疫沈降法にて定量した。比較対象として野生型 UBQLN4 と IL-2R α SS との親和性を求めた。同時に、プロテアソーム阻害時に蓄積するポリユビキチン化タンパク質との親和性も定量比較した。さらに、新しい不良タンパク質モデルとして、MHC class I 依存的な抗原提示を受けることが報告されている GPI アンカー型膜タンパク質 PSCA (prostate stem cell antigen) と BAG6 複合体との関係についても検討した。

結果および考察

1. UBQLN4 疾患関連点変異体と膜タンパク質品質管理

UBQLN4 タンパク質に若齢 RDP 患者において見出された点変異を導入すると、変異 UBQLN4 と不良膜タンパク質モデル IL-2R α SS との親和性が增大することを新しく見出した (図 2)。さらに、UBQLN4 疾患関連点変異体は、野生型 UBQLN4 と比較して、MG-132 処理で誘導したポリユビキチン化基質との親和性も増大した。基質との親和性が増大した結果として、UBQLN4 疾患関連点変異体を発現させた細胞では不良膜タンパク質モデルのプロテアソーム依存的分解が阻害されることが判明した。一方、UBQLN4 疾患関連点変異体の発現細胞において、ユビキチン陽性の凝集体形成促進は認められなかった。これらの実験結果は、UBQLN4 変異が、これをヘテロザイゴートで有する神経変性疾患患者の神経細胞脱落、ひいては疾患発症の原因の一部となっている可能性を示しており、現在、UBQLN4 疾患関連点変異体を発現する神経細胞の細胞死に対する影響を検討しているところである。

2. GPI アンカー型膜タンパク質 PSCA とプレエンブティヴ品質管理

MHC class I 依存的な抗原提示を受けることが報告されている GPI アンカー型膜タンパク質 PSCA について解析を進め、小胞体へのアッセンブリに失敗した PSCA 分子種が BAG6 複合体の標的基質になっていることを本研究で見出した。このことは、BAG6 複合体が GPI アンカー型膜タンパク質を対象としたプレエンブティヴ品質管理に寄与していることを示唆している。現在、UBQLN4 変異、ならびに BAG6 機能不全が、ミスローカライズした PSCA の分解を介した抗原提示プロセスにどのような影響を与えるかについて解析を進めている。また我々は、BAG6 が多数の E3 ユビキチンリガーゼ群と複合体を形成しうることを質量分析により見出しており、このうちのどの E3 ユビキチンリガーゼが、不良膜タンパク質モデルとしての IL-2R α SS やミスローカライズした PSCA の分解と抗原提示に関わるかについて、網羅的ノックダウン解析により検討を進めている。

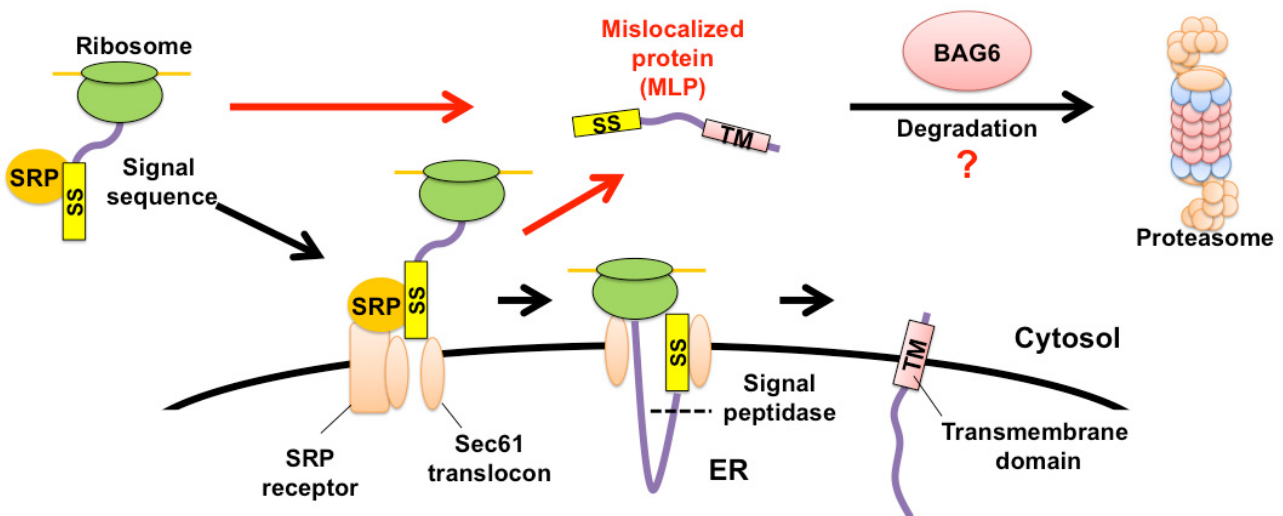


図 1. BAG6 複合体を介したプレエンブティヴ品質管理経路

細胞質リボソームで翻訳を開始した膜タンパク質の一部は、シグナル配列認識粒子 (SRP) やトランスロコンへの受け渡しに失敗し、N 末端にシグナル配列を有したままの Mislocalized protein (MLP) として細胞質中に産生される。ミスローカライズした不良ポリペプチドは、BAG6-UBQLN4 複合体により認識され、プロテアソーム依存的分解により選択的に除去される。

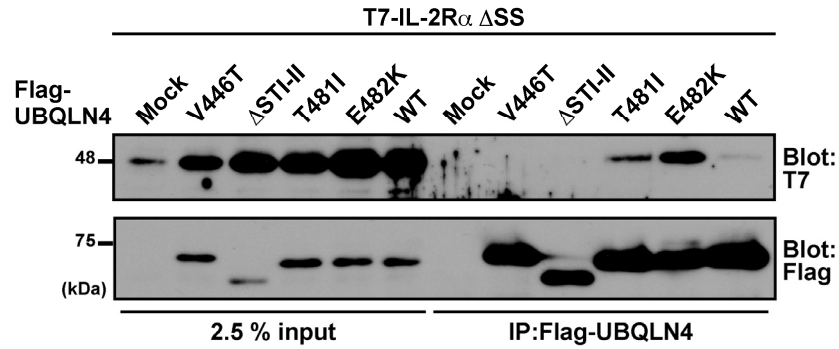


図2. UBQLN4 疾患関連点変異体と不良膜タンパク質モデル IL-2R aDSS との相互作用

UBQLN4 タンパク質の疾患関連点変異体(T481I)は、野生型(WT)と比べ、不良膜タンパク質モデル IL-2R $\alpha\Delta$ SS と強い親和性を獲得していた。

本助成により得られた研究成果の一部については、既に下に示した文献により発表し [2~6]、上原生命科学財団への感謝を各文献の謝辞に記載させて頂いたことを付記致します。

文 献

- 1) Minami R, Hayakawa A, Kagawa H, Yanagi Y, Yokosawa H, Kawahara H. BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. *J. Cell Biol.* 2010 ; 190: 637-650. PMID: 20713601 doi: 10.1083/jcb.200908092
- 2) Tanaka H, Takahashi T, Xie Y, Minami R, Yanagi Y, Hayashishita M, Suzuki R, Yokota N, Shimada M, Mizushima T, Kuwabara N, Kato R, Kawahara H. A conserved island of BAG6/Scythe is related to ubiquitin domains and participates in short hydrophobicity recognition. *FEBS J.* 2016; 283: 662-677. PMID: 26663859 doi: 10.1111/febs.13618.
- 3) Suzuki R, Kawahara H. UBQLN4 recognizes mislocalized transmembrane domain proteins and targets these to proteasomal degradation. *EMBO Rep.* 2016; 17: 842-857. PMID: 27113755 doi: 10.15252/embr.201541402.
- 4) Yamamoto K, Hayashishita M, Minami S, Suzuki K, Hagiwara T, Noguchi A, Kawahara H. Elimination of a signal-sequence uncleaved form of defective HLA protein through BAG6. *Sci. Rep.* 2017; 7: PMID: 29109525 DOI:10.1038/s41598-017-14975-9
- 5) Yamaki Y, Kagawa H, Hatta T, Natsume T, Kawahara H. The C-terminal cytoplasmic tail of hedgehog receptor Patched1 is a platform for E3 ubiquitin ligase complexes. *Mol. Cell. Biochem.* 2016; 414: 1-12. PMID: 26885983 doi:10.1007/s11010-015-2643-4
- 6) Noguchi A, Adachi S, Yokota N, Hatta T, Natsume T, Kawahara H. ZFP36L2 is a cell cycle-regulated CCH-protein necessary for DNA lesion-induced S-phase arrest. *Biol. Open.* 2018; 7: PMID: 29449217 doi: 10.1242/bio.031575