



## 小胞体関連分解 (ERAD) における異常タンパク質の認識と逆行輸送

### 1. はじめに

リボソームで合成されたタンパク質は、分子シャペロンやフォールディング酵素の助けによって高次構造を形成

し、機能状態へ成熟する。しかし、細胞は転写・翻訳のエラー、確率論的なミスフォールディング、熱ショック、浸透圧の変化、そして生理的条件の変化など、外的、内的なストレスにさらされており、天然構造の獲得に失敗した異常タンパク質がしばしば生じる。このような異常タンパク質の蓄積は“毒”になることがあるので、細胞には異常タンパク質を認識して修復または分解する「品質管理」と総称される仕組みが備わっている。品質管理システムはサイトゾル、小胞体、ミトコンドリア、核などに存在することが知られている。これらの中でも、小胞体は分泌タンパク質や細胞膜タンパク質が合成される場であり、細胞内の約3割に相当する大量のタンパク質が流れ込むため、特に堅牢な品質管理機構を備えている。

小胞体に構造異常のタンパク質が発生すると、UPR (unfolded protein response) というストレス応答反応が起こり<sup>1)</sup>、分子シャペロンや分解系酵素の発現が誘導される。小胞体で異常タンパク質を分解・除去する仕組みの一つがERAD

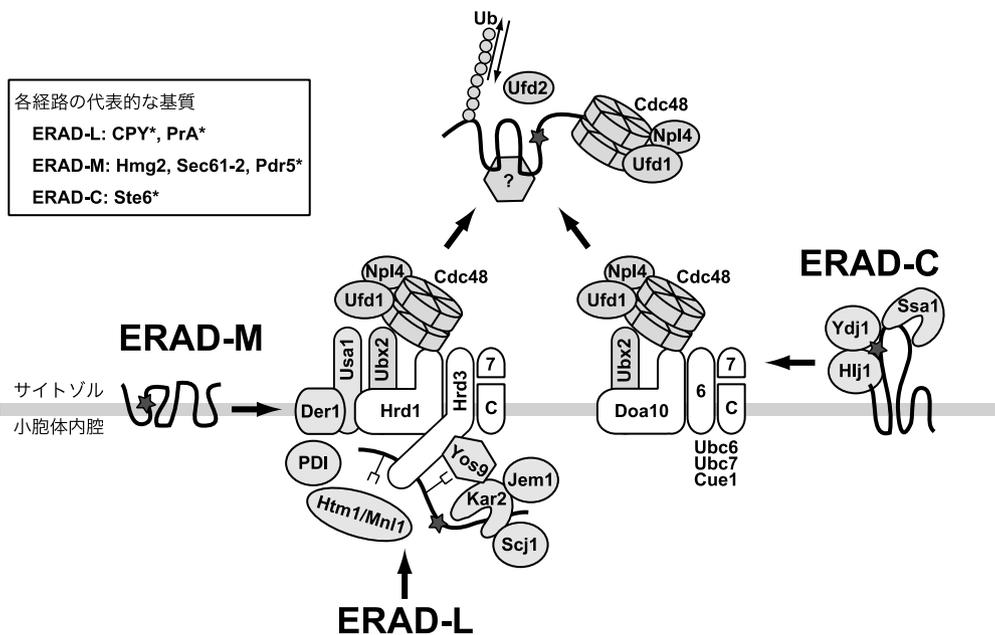


図1 出芽酵母におけるERADの経路(本文参照, 文献2を改変)

ERAD-Lの基質はHsp70 (Kar2), Hsp40 (Scj1, Jem1), Yos9, Hrd3, Htm1/Mnl1, PDI (protein disulfide isomerase) などによって認識・選別され、Hrd1によってユビキチン化される。これら内腔の因子はERAD-Mには関与しないと考えられている。Ubc7 (E2酵素, 図中“7”)はCue1 (図中“C”)によって膜にリクルートされ、Der1 (孔の候補であるが機能未知のタンパク質)はUxa1 (ユビキチン様ドメインを持つ2回膜貫通タンパク質)によってHrd1複合体にリクルートされている。ERAD-Cの基質はHsp70 (Ssa1), Hsp40 (Ydj1, Hlj1)などによって認識・選別され、主にDoa10によってユビキチン化される。Ubc6は膜貫通型のE2酵素である。Cdc48-Npl4-Ufd1複合体はUbx2によって小胞体膜にリクルートされる。ユビキチン化を受けた基質はサイトゾルへ逆行輸送される。左上には各経路の代表的な基質を記した。

(endoplasmic reticulum-associated degradation: 小胞体関連分解)である<sup>2)</sup>。ERADでは、小胞体の内腔と膜の異常タンパク質が特異的に認識され、サイトゾルへ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る(図1)。ERADの主要な因子は、酵母から高等動物まで比較的良好に保存されている。また、小胞体品質管理に関わる一連の因子に変異があってシステムが破綻したり、分泌タンパク質が機能を失うか毒性をもったりすると、アルツハイマー病、パーキンソン病、嚢胞性線維症、 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症などの、「フォールディング病」を含む様々な疾患の引き金となりうる。さらに、ERADの経路は免疫系やコレステロール合成系などに深く関わっていることなどからも、ERADは生理的に極めて重要なシステムとして注目されている<sup>3)</sup>。本稿では、ERADにおける基質の「認識」と「逆行輸送」について、遺伝学的解析と生化学的解析が進められている出芽酵母の知見を中心に紹介する。

## 2. 基質の認識メカニズム

### (1) 小胞体内腔の基質

小胞体内腔の異常タンパク質は、「ポリペプチド鎖の構造異常」と「*N*型糖鎖の特異的な構造」の二つが分解シグナルとして認識されると考えられている。認識された基質は、小胞体膜に局在するHrd1(E3リガーゼ)複合体へ輸送され、ユビキチン化を受ける。この経路はERAD-L(Lはlumenを意味する)と呼ばれており、Hrd1複合体には図1に示した因子が含まれる<sup>4)</sup>。ERADによって分解される「構造異常」のポリペプチド鎖は、本来分子内部に隠蔽されている疎水性領域を分子外に露出していて、凝集しやすい性質をもっていると考えられる。実際、小胞体内腔分子シャペロンHsp70(出芽酵母ではKar2)とHsp40(Jem1, Ydj1)は、基質を認識して溶解度を維持することによって、分解を促進する<sup>5)</sup>。しかしながら、分子シャペロンが凝集の阻止という役割によってのみERADに寄与しているのか、あるいは基質をE3リガーゼ複合体へ積極的にソーティングまたは輸送する機能をもつのかは、今後の検討課題である。

基質の構造異常は、分子シャペロンだけでなく、Hrd3の内腔ドメインによって認識されることが示されている。Hrd3は膜貫通領域を介してHrd1と相互作用しているので、基質をHrd1複合体へリクルートしている可能性も考えられる<sup>6)</sup>。

ERAD-L経路では、「*N*型糖鎖の特異的な構造」も分解シグナルとして認識される。最近の研究から、Hrd3の内

腔ドメインと相互作用しているYos9が、*N*型糖鎖の中でも、 $\alpha$ -1,6型マンノースを含むMan7GlcNAc2型を認識することが明らかになった。この型の糖鎖の生成には、Htm1/Mnl1(哺乳類EDEM1(ER degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein))が必要らしい。Htm1/Mnl1は $\alpha$ -マンノシダーゼ(Mns1)と同源性のあるタンパク質だが、活性に必要なシステインを欠いているので、マンノシダーゼ活性をもたないと考えられてきた。しかし、過剰発現によってMan7GlcNAc2型のタンパク質が増加すること<sup>7)</sup>、哺乳類の細胞でEDEM1やEDEM3を過剰発現させると糖鎖からマンノースが脱離すること<sup>8)</sup>などから、Htm1/Mnl1には糖鎖構造を調節する役割や、Yos9の上流で異常タンパク質の選別に関与している可能性が指摘されている<sup>6)</sup>。興味深いのは、Yos9による「*N*型糖鎖」の認識と、Hrd3による「構造異常」の認識が、それぞれ独立におこることである。これら二つのシグナルを独立に認識する仕組みは、ERADにおける基質の選択性を高める働きがあると予想されている<sup>6)</sup>。

### (2) 小胞体膜の基質

膜貫通型の異常タンパク質は、二つの経路で分解されると考えられている。膜貫通領域に異常ドメインがある基質は、Hrd1に依存してERAD-M(Mはmembraneを意味する)経路で分解される。一方、サイトゾル側に異常ドメインがある基質は、Doa10に依存してERAD-C(Cはcytosolを意味する)経路で分解される<sup>9)</sup>(図1)。しかしながら、Hrd1とDoa10の両方に依存して分解される基質も存在すること、哺乳類では検証が不十分であることなどから、モデルの一般性は今後検討される必要がある。ERAD-M経路の基質は、Hrd1の膜貫通領域に認識されると考えられている。

ERAD-C経路で最も解析されている基質はSte6の変異体である。Ste6は12回膜貫通型タンパク質で、野生型は小胞体からゴルジ体を経て細胞膜へ送られ、性フェロモン $\alpha$ -factorのトランスポーターとして機能する。一方、カルボキシ末端の42アミノ酸が欠失した変異体(Ste6\*)は、小胞体に留められてERADによって分解される。我々は、出芽酵母から調製したマイクロソーム画分とサイトゾル画分を利用して、Ste6\*のERADを試験管内で再構成したアッセイ系を確立した。その結果、サイトゾルの分子シャペロン(Hsp70(Ssa1), Hsp40(Ydj1, Hlj1))が基質を認識して、Doa10によるユビキチン化を促進することを見いだした。さらに、Hsp70の不活化によるユビキチン化の不全は

可逆的であったことから、これら分子シャペロンは基質の凝集を防ぐだけでなく、基質をE3リガーゼ Doa10 に提示するなど、より積極的な役割を果たしていることが示唆された。一方、サイトゾル Hsp90 (酵母では Hsp82) の不活化は、Ste6\* の分解を促進することが細胞レベルで示されている。おそらく基質の性質に依存して、分子シャペロンは pre-folding 複合体と pre-degradation 複合体を形成し、それぞれ基質のフォールディングと分解を促進していると予想される<sup>10)</sup>。

### (3) ERAD における基質認識の選択性

ERAD と UPR に関与する遺伝子を同時に破壊すると、細胞はタンパク質のミスフォールディングを引き起こす薬剤 (ツニカマイシン, DTT など) に感受性になる<sup>11)</sup>。薬剤で誘導されるタンパク質の構造異常に、共通した強い特徴があるとは考えにくい。つまり、品質管理機構やストレス応答という文脈で ERAD を考えると、「構造異常」という状態はさほど高くない選択性で、分子シャペロンや E3 リガーゼ複合体によって認識されるとも予想される。

しかしながら、小胞体で発生した異常タンパク質の全てが ERAD によって分解されるわけではなく、ERAD における基質認識には何らかの選択性があるらしい。たとえば、基質の熱力学的・速度論的な安定性と、ERAD による分解速度に必ずしも強い相関が見られない例が報告されている<sup>12)</sup>。また、Hrd1 や Doa10 が、ある特殊なアミノ酸配列 (両親媒性ヘリックスからなる分解シグナル) をもったタンパク質の分解に寄与することも示されている。これらことから、E3 リガーゼ複合体はアミノ酸の一次構造に帰結される分解シグナルを認識している可能性も否定できない。言い換えれば、このようなシグナルを分子外部に露出してしまうことが、ERAD によって分解される条件になるという考え方も提案されている<sup>13)</sup>。いずれにしても、

ERAD の基質は複数のステップによって認識・選別されていると予想される。基質認識のメカニズムの解明は、高等動物における ERAD の生理的意義を明らかにする上でも重要であろう。

### 3. 逆行輸送 (retrotranslocation)

E3 リガーゼ Hrd1, Doa10 の RING ドメイン、そして E2 酵素 Ubc6, Ubc7 などの活性部位はサイトゾル側にあるので、少なくとも内腔の基質 (ERAD-L) はユビキチン化を受けるために、サイトゾルへ送り返されなければならない。この反応は逆行輸送 (retrotranslocation または dislocation) と呼ばれており、基質は逆向き膜透過チャネル (retrotranslocon) を介してサイトゾルへ送られると予想されているが、その実体は全く明らかにされていない。

これまで retrotranslocon の候補としていくつかの膜タンパク質が提案されてきた。それぞれ「複数回膜貫通領域をもちチャネルを形成する可能性がある」、「基質と相互作用する」、「サイトゾル側と内腔側で他の因子と相互作用する (内腔とサイトゾルをリンクする)」、「変異によって分解が遅れる」などの条件をいくつか満たしている<sup>2)</sup>。別の仮説として、逆行輸送にタンパク質性の“孔”は必要でなく、膜から形成された脂質滴に基質が取り込まれてサイトゾルへ送られるというモデルも提示された<sup>14)</sup>。ごく最近、DNA-タンパク質複合体であるポリオーマウイルス SV40 (50nm の巨大複合体) が小胞体からサイトゾルへ輸送されるとき、ERAD の装置を必要とすることが示された<sup>15)</sup>。このように ERAD における逆行輸送のメカニズムは、未解決の大問題として精力的に研究が進められている。

ERAD における膜タンパク質の分解メカニズムには論争があり、主に二つのモデルがあった (図 2)。第一に、プロテアソームが endoproteolytic 活性によってサイトゾル側に露出したドメインやループを消化した後、基質を膜上で

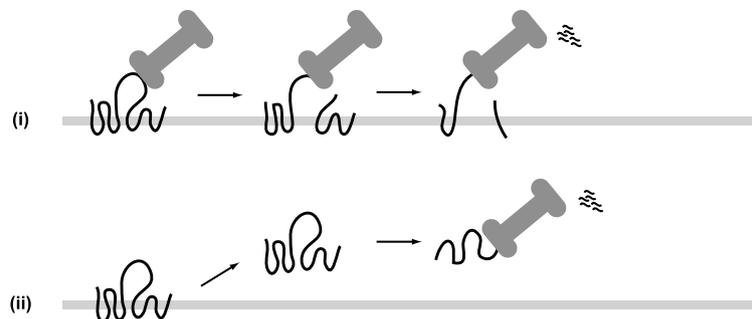


図 2 ERAD における膜タンパク質の分解モデル (本文参照)

分解するモデルである。この場合、分解と逆行輸送は強く共役していると考えられる(図2(i))。第二に、逆行輸送と分解は分離可能で、サイトゾルの中間体を経て分解されるモデルである(図2(ii))。我々は試験管内アッセイ系によって、Ste6\*がユビキチン化、Cdc48/p97(AAA ATPase)、そしてATPに依存して、分解される前にサイトゾルへ逆行輸送されることを証明した。この結果は、構造が複雑な複数回膜貫通型基質もサイトゾルへ逆行輸送されること、そして逆行輸送と分解が分割できる反応であること(第二のモデル)を示す。我々の報告の後で、Hmg2(酵母HMGC<sub>o</sub>A-reductase, 8回膜貫通タンパク質)も、その「全長」がユビキチン化とCdc48に依存してサイトゾルへ逆行輸送されることが示された<sup>16)</sup>。動物細胞において、細胞内のプロテアソームの活性を阻害すると、ユビキチン化された膜タンパク質がサイトゾルでアグリソームという構造を形成することが知られている。これらの結果は、アグリソームが逆行輸送を経て形成される構造であることを示唆する<sup>10)</sup>。逆行輸送された膜タンパク質がどのような因子と相互作用しているのか、retrotransloconは必要なのか、そしてプロテアソームへの輸送経路などが今後の検討課題である。

#### 4. 最 後 に

小胞体膜を反応場とした分解系にERADという名称がつけられてから、約13年になる。この間、主に酵母の遺伝学的解析などによって、関与する因子が次々に同定されてきた。ごく最近になって、試験管内再構成系による解析やプロテオーム解析が始まり、いよいよ反応の全体像が明らかにされつつある。しかしながら、基質の認識や逆行輸送に関わる因子とメカニズム、レトロトランスロコンの実体、基質がユビキチン化された後の経路、個体レベルにおけるERADの生理的意義など、多くの基本的な問題が未解決のまま残されている。これらの問題を解決することは、最終的にERADを制御する技術の開発にもつながっていくと考えられる。

#### 謝辞

本稿の執筆の機会を下さいました先生方、ならびに内容に関するアドバイスを下さいましたJeffrey L. Brodsky教授に御礼申し上げます。また、字数の制限から、多くの重要な論文を引用できなかったことをお詫びいたします。

1) Mori, K. (2000) *Cell*, 101, 451-454.

- 2) Nakatsukasa, K. & Brodsky, J.L. (2008) *Traffic*, 9, 861-870.
- 3) Vember, S.S. & Brodsky, J.L. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 944-957.
- 4) Carvalho, P., Goder, V., & Rapoport, T.A. (2006) *Cell*, 126, 361-373.
- 5) Nishikawa, S.I., Kato, Y., Fewell, S.W., Brodsky, J.L., & Endo, T. (2001) *J. Cell Biol.* 153, 1061-1070.
- 6) Quan, E.M., Kamiya, Y., Kamiya, D., Denic, V., Weibezahn, J., Kato, K., & Weissman, J.S. (2009) *Mol. Cell*, 32, 870-877.
- 7) Clerc, S., Hirsch, C., Oggier, D.M., Deprez, P., Jakob, C., Sommer, T., & Aeby, M. (2009) *J. Cell Biol.*, 184, 159-172.
- 8) Hirao, K., Natsuka, Y., Tamura, T., Wada, I., Morito, D., Natsuka, S., Romero, P., Sleno, B., Tremblay, L.O., Herscovics, A., Nagata, K., & Hosokawa, N. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 9650-9658.
- 9) Vashist, S. & Ng, D.T. (2004) *J. Cell Biol.*, 165, 41-52.
- 10) Nakatsukasa, K., Huyer, G., Michaelis, S., & Brodsky, J.L. (2008) *Cell*, 132, 101-112.
- 11) Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., & Sommer, T. (2000) *Nat. Cell Biol.*, 2, 379-384.
- 12) Sekijima, Y., Wiseman, R.L., Matteson, J., Hammarström, P., Miller, S.R., Sawkar, A.R., Balch, W.E., & Kelly, J.W. (2005) *Cell*, 121, 73-85.
- 13) Ravid, T. & Hochstrasser, M. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 679-690.
- 14) Ploegh, H.L. (2007) *Nature*, 448, 435-438.
- 15) Schelhaas, M., Malmström, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grünewald, K., & Helenius, A. (2007) *Cell*, 131, 516-529.
- 16) Garza, R.M., Sato, B.K., & Hampton, R. Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 14710-14722.

中務 邦雄

(名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻)

Mechanisms of recognition and retrotranslocation of misfolded proteins in the ER-associated degradation  
Kunio Nakatsukasa (Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan)

## 骨芽細胞分化と JNK シグナル

### 1. はじめに

全身の骨量は、骨芽細胞 (osteoblast) による骨マトリックス産生と、破骨細胞 (osteoclast) による骨吸収のバランスによって調節されることが知られる。骨芽細胞は骨細胞へと分化する過程で種々のマトリックスタンパク質を分泌し、骨組織の石灰化を誘導する。また分化した骨芽