

HLTFは γ 線によって活性化されず、また相同組換えにも関与しない⁸⁾ことから、SHPRH/HLTFはRNF8とは独立した役割を持つと考えられる。今後も新たなE3や基質の同定によって、ユビキチン化によるDSB修復の制御機構がますます明らかになっていくものと期待される。

おわりに

発がん物質や放射線によって引き起こされるDNA損傷は、細胞の持つ多様な修復機構によって適切に修復される。これら修復機構に異常があるとDNA損傷が蓄積する。がんの根源的原因となる点変異や染色体転座の多くは、偶発的に生じるよりむしろ、これら蓄積したDNA損傷が“適切でない”修復機構によって不正確に修復された結果であり、その分子メカニズムが少しずつ明らかにされてきている¹⁷⁾。臨床で使われるがん治療のほとんどはDNAに損傷を与え、がん細胞をアポトーシスによって殺すことで治療効果を発揮するが、同時に二次発がんのリスクを増やす理由はここにある。従って、様々な修復機構がどのように制御され、どのように多様なDNA損傷に対処しているのかを明らかにすることは、発がんのメカニズムのみならず、がんの効率的治療を考える上で重要であろう。ユビキチンをキーワードにした研究がこれらの理解に貢献することを期待したい。

- 1) San Filippo, J., Sung, P., & Klein, H. (2008) *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 229–257.
- 2) Andersen, P.L., Xu, F., & Xiao, W. (2008) *Cell Res.*, 18, 162–173.
- 3) Mukhopadhyay, D. & Riezman, H. (2007) *Science*, 315, 201–205.
- 4) Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2002) *Nature*, 419, 135–141.
- 5) Motegi, A., Kuntz, K., Majeed, A., Smith, S., & Myung, K. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, 26, 1424–1433.
- 6) Kannouche, P.L., Wing, J., & Lehmann, A.R. (2004) *Mol. Cell*, 14, 491–500.
- 7) Motegi, A., Sood, R., Moinova, H., Markowitz, S.D., Liu, P.P., & Myung, K. (2006) *J. Cell Biol.*, 175, 703–708.
- 8) Motegi, A., Liaw, H.J., Lee, K.Y., Roest, H.P., Maas, A., Wu, X., Moinova, H., Markowitz, S.D., Ding, H., Hoeijmakers, J. H., & Myung, K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 12411–12416.
- 9) Zhao, G.Y., Sonoda, E., Barber, L.J., Oka, H., Murakawa, Y., Yamada, K., Ikura, T., Wang, X., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Boulton, S., & Takeda, S. (2007) *Mol. Cell*, 25, 663–675.
- 10) Sonoda, E., Zhao, G.Y., Kohzaki, M., Dhar, P.K., Kikuchi, K., Redon, C., Pilch, D.R., Bonner, W.M., Nakano, A., Watanabe, M., Nakayama, T., Takeda, S., & Takami, Y. (2007) *DNA Repair (Amst.)*, 6, 280–292.

- 11) Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T.M., Pelletier, L., Jackson, S.P., & Durocher, D. (2007) *Science*, 318, 1637–1640.
- 12) Huen, M.S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M. B., & Chen, J. (2007) *Cell*, 131, 901–914.
- 13) Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2007) *Cell*, 131, 887–900.
- 14) Plans, V., Scheper, J., Soler, M., Loukili, N., Okano, Y., & Thomson, T.M. (2006) *J. Cell. Biochem.*, 97, 572–582.
- 15) Stewart, G.S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A.K., Kolas, N.K., Miller, E.S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., Oldreive, C., Wildenhain, J., Tagliaferro, A., Pelletier, L., Taubenheim, N., Durandy, A., Byrd, P.J., Stankovic, T., Taylor, M.R., & Durocher, D. (2009) *Cell*, 136, 420–434.
- 16) Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., Lukas, J., & Lukas, C. (2009) *Cell*, 136, 435–446.
- 17) Motegi, A. & Myung, K. (2007) *Methods*, 41, 168–176.

茂木 章

(京都大学大学院医学研究科
遺伝医学講座放射線遺伝学分野)

Maintenance of genome stability though Ubc13-dependent ubiquitination

Akira Motegi (Department of Radiation Genetics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe, Sakyo-ku, Kyoto 606–8501, Japan)

小胞体内腔における分泌タンパク質動態の制御機構

1. はじめに

小胞体は膜タンパク質および分泌系タンパク質が固有の高次構造を獲得するオルガネラであり、それらのタンパク質はシグナル配列を介して、トランスロコンを通過して小胞体内腔に運ばれる。翻訳直後の未成熟なタンパク質はN-結合型糖鎖の付加、BiPやカルネキシンなどの小胞体シャペロンによる保護、ジスルフィド結合の形成、サブユニットのアセンブリーなどを経て、機能的な高次構造を形成し、ER exit sites (ERES) を通じて小胞体から搬出されることが知られている。また、タンパク質が正しくフォールディングできなかった場合、つまりミスフォールディングした場合には、疎水性部分が分子の表面に露出するため

に、非特異的な結合による凝集体を形成しやすく、他のタンパク質の成熟や細胞の機能に影響を与える。そのため、ミスフォールディングしたタンパク質は、小胞体関連分解機構 (ERAD) によって選択的に小胞体から排出され、細胞質のプロテアソームにより分解される。このようなタンパク質のフォールディングと分解の一連の過程は、小胞体の品質管理機構と呼ばれている¹⁾。

小胞体は細胞質の全域に網目状の三叉構造を形成する管状体として存在する。小胞体の内径は10–100nm程度であるため、タンパク質が数分子程度しか並ぶことができないと推測される。また、ゴルジ体などの他のオルガネラとは異なり、小胞体では成熟したタンパク質、未成熟なタンパク質、ミスフォールドしたタンパク質が共存しているため、個々のタンパク質の動態が無秩序な状態であれば、それらの衝突により凝集体が形成されることが容易に想像できる。

そこで本稿では、小胞体のタンパク質動態の制御とその一分子レベルでの解析について紹介する。

2. 緑色蛍光タンパク質を用いた生細胞におけるタンパク質動態の解析

生細胞におけるタンパク質の動態を研究する上で、蛍光タンパク質は強力なツールとなる。緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) はオワンクラゲから単離された約28 kDaのタンパク質であり、特定の波長の光を当てるだけで緑色の蛍光を発する。蛍光化合物ではなくGFPを使う最大の利点は、細胞や生体中の特定のタンパク質を生きたままの状態を観察できることにある。また、強力な光を当てることにより不可逆的に消光する (ブリーチング) 性質と蛍光分子の拡散による消光からの回復を利用した fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) は生細胞におけるタンパク質の動態を定量的に解析することを可能にした²⁾。現在では、用途や目的に応じた様々な蛍光タンパク質が開発されている³⁾。また、*in vitro*での蛍光物質の解析法であった蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy; FCS) を利用して、*in vivo*における一分子レベルでの解析も可能となり、その方法を使った報告も増えつつある⁴⁾。

3. 小胞体におけるタンパク質の動態

小胞体のタンパク質は、品質管理機構を経て他のオルガネラに輸送されるタンパク質と、小胞体に局在するタンパク質 (ゴルジ体との間を循環するタンパク質を含む) に分

けることができる。初期分泌系オルガネラ研究の分野において、前者はカーゴと呼ばれ、後者にはシャペロン、カーゴ受容体やトランスロコンなどが含まれる。

水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質 (vesicular stomatitis virus G protein; VSV-G) は小胞体から細胞膜への小胞輸送の研究分野において、カーゴのモデル分子として広く用いられている。VSV-Gの温度感受性変異体 (VSV-G tsO45) は、培養温度を40°Cにするとミスフォールディングにより小胞体に滞留したままになるが、培養温度を32°Cに下げるとすぐにフォールディングが再開され、小胞体から輸出される。Nehlsらは、VSV-G tsO45を用いたFRAPによる解析によって、蛍光回復率 (mobile fraction; 可動性成分を表す) は培養温度に依存しないこと、すなわち分子の拡散は成熟の度合いに左右されないことを明らかにした。その可動性成分は、小胞体に局在する膜タンパク質である lamin B 受容体に匹敵する⁵⁾。我々もチロシナーゼを用いた実験により同様の結果を得た⁷⁾。また、インスリン受容体を用いた実験でも野生型とミスフォールド変異体の可動性成分の割合に変化はないことが報告されている⁶⁾。

ただし、糖タンパク質への糖鎖付加を阻害するツニカマイシンの添加や、広範なミスフォールディングを誘発するATP枯渇条件下では、VSV-G tsO45の可動性成分は顕著に減少している (参考文献5)。しかし、このような条件では、シグナル配列をGFPのN末端に融合させたss-GFPの動態も影響をうけることから⁵⁾、ツニカマイシンなどによるカーゴの動態の抑制は、VSV-G tsO45だけでなく、小胞体内腔の環境そのものに影響を与えていることが推測される。また、我々は α -グルコシダーゼ阻害剤である castanospermin 処理によってレクチン型シャペロンであるカルネキシンおよびカルレティキュリンと基質タンパク質の相互作用を阻害した場合に、チロシナーゼの可動性成分が減少することを発見した (図1A)。糖鎖のグルコーストリミングに依存するフォールディングとタンパク質動態制御の間に何らかの関連があることを示唆する⁷⁾。

では、小胞体に局在する比較的大きなタンパク質複合体であるトランスロコンの動態はどうだろうか。トランスロコンと強固に結合する oligosaccharyltransferase (OST) 複合体のサブユニットである Dad1 は、非カーゴ分子であるにもかかわらず、前述の lamin B 受容体に比べて1/7程度までその拡散速度が低下していた。しかし、ピューロマイシン処理などによってリボソームとの結合を解除すると拡散速度が上昇したことから、巨大分子であるリボソームに

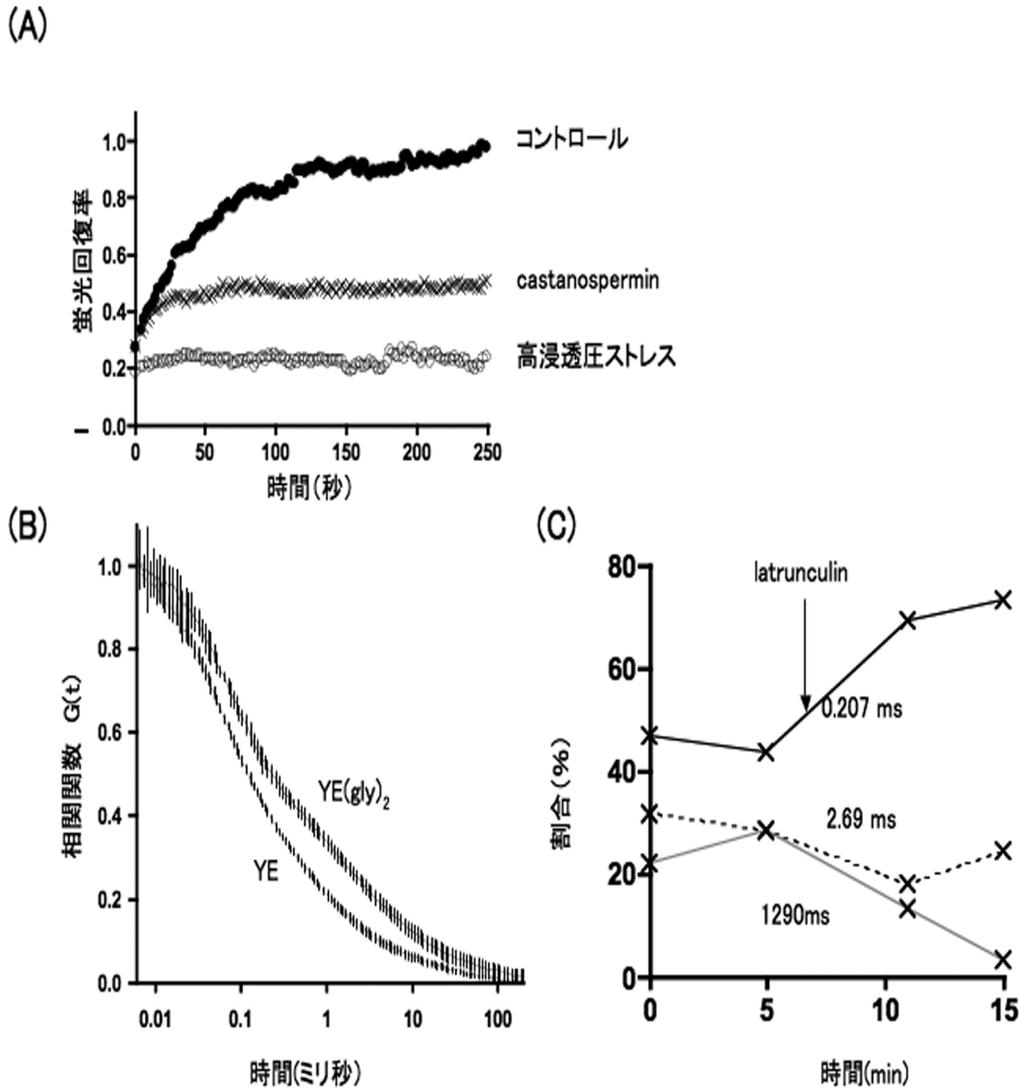


図1 小胞体に局在するタンパク質の動態の変化
 (A) 高浸透圧ストレス及び α -グルコシダーゼ阻害剤 castanospermin 添加におけるチロシナーゼの動態のFRAP解析. (B) *N*-結合型糖鎖付加による小胞体内腔タンパク質の動態の変化のFCS解析. 曲線が右にシフトするほど拡散速度が低下していることを示している. (C) YE(gly)₂のアクチン重合阻害剤 latrunculin 添加における速度成分の割合の変化. YE(gly)₂を三つの速度成分 (0.207 ms, 2.69 ms, 1290 ms) に分け, それぞれの分子の割合をY軸に示している. 矢印で示す latrunculin 添加の前後で速い成分 (0.207 ms) の割合が増加していることがわかる.

結合することでこれらの動態が制御されていることが推測される⁸⁾.

この報告を含む多くの文献の中にGFP融合タンパク質を使うことによる問題点を見つけることができる. 第一に, Dad1は分子量10kDaの比較的小さなタンパク質であり, その挙動はGFPをN末端またはC末端のどちらに融合させるかによって大きく異なる⁸⁾. 第二に, 野生型の

GFPを含むいくつかのGFP改良体は二量体を形成する傾向があり, 特に膜タンパク質とGFPの融合タンパク質を過剰発現させると, 膜がスタック状になり, 異常な構造体が容易に観察される. このような現象は単量体への変異により回避される⁹⁾. 三つ目の問題点は, GFPの融合タンパク質を細胞に過剰発現させると, 本来あるべき位置とは異なる場所に局在するケースが頻繁に見られることから, 発

現量を常に考慮する必要があることである。我々は、チロシナーゼの発現量が過多の場合には、フォールディングの状態に関係なく、小胞体において動態が抑制されることを見出した⁷⁾。小胞体のようにタンパク質の濃度が高く、その構造が外部からの影響を受けやすい空間において、蛍光タンパク質を使った動態の実験は少なくともこれらの三つの問題点に留意する必要がある。

4. 高浸透圧ストレス下での小胞体局在タンパク質動態

我々は、より詳細に小胞体でのタンパク質動態を解析するために、一般的な物理的ストレスであり、生体内でもしばしば観察される高浸透圧ストレス（約 900 mOsm）を用いている。この高浸透圧ストレスの環境では、小胞体からのタンパク質の輸出やエンドサイトーシスが阻害されることが知られている^{10,11)}。高濃度ソルビトールを含む培地で細胞を培養し、高浸透圧ストレス下における VSV-G tsO45 の挙動を観察した。その結果、VSV-G tsO45 の可動性成分がソルビトールによって極端に減少することがわかり、高浸透圧ストレスがカーゴの動きを即座に阻害することが明らかになった（図 1A）。また、培養温度による VSV-G tsO45 のフォールディング状態の変化は、タンパク質の動態に影響しなかった。さらに、同条件下では、非成熟型チロシナーゼや可溶性タンパク質である α 1-antitrypsin のミスフォールド変異体の動きも同様に制御された¹²⁾。

では、何が動態の制御に関与するのであろうか。その疑問に答えるために、ゴルジ体と小胞体との間を循環する KDEL 受容体、ジスルフィド結合形成に関与する Ero1L、小胞体シャペロンである BiP やカルネキシン、カーゴ受容体である ERGIC53 などの非カーゴ分子について、その挙動の変化を追跡した。これらの非カーゴ分子の場合には、蛍光回復率は高浸透圧ストレス後でもカーゴほどは阻害されず、ストレス添加 1 時間後ではストレス前とほぼ同じレベルにまで蛍光が回復していた。これらの結果から、高浸透圧ストレスによるタンパク質動態の制御は、カーゴに特有の作用であることがわかった。また、カーゴの動態の制御は、既知のシャペロンによらないことが示唆された¹²⁾。

この動態制御機構はカーゴをどのように認識しているのだろうか。我々は解析した分子のほとんどが複数の N-結合型糖鎖による修飾を受けているという点に着目した。そこで、小胞体局在シグナルを持つ黄色蛍光タンパク質 (YE) と YE に二カ所の糖鎖付加配列を導入した YE(gly)₂ の動態を調べることによって、糖鎖付加部位の増加と拡散速度の低下が相関することを見出した（図 1B）。また、糖

鎖が付加されない VSV-G tsO45 変異体では動態の阻害が解除されている（すなわち可動性成分が増加している）ことがわかった。これらの結果は、小胞体カーゴの動態制御が、糖鎖の認識を介して行われていることを強く示唆する¹²⁾。

5. 小胞体内でのタンパク質の動態と細胞骨格

実際に、この糖鎖依存的な小胞体タンパク質の動態制御はどのように行われているのであろうか。細胞骨格は、細胞の外形の維持だけでなく、ゴルジ体の構造の維持や小胞輸送への関与が知られている。また、酵母において小胞体の網目構造と細胞骨格が結合することが報告されている¹³⁾。我々はこれらの報告から細胞骨格に着目し、小胞体タンパク質の動態との関連について調べた。そして、アクチンフィラメントの重合に作用する latrunculin の処理により、YE(gly)₂ の速い成分 (0.207ms) が顕著に増加することを蛍光相関分光法により明らかにした（図 1C）。これらの結果から、糖鎖を介するカーゴ動態制御がアクチンフィラメントに依存すると考えられる¹²⁾。

6. おわりに

小胞体内腔において、糖鎖に依存するカーゴの動態制御の意義とは何であろうか。先述したように、カーゴのフォールディングと分解は小胞体の品質管理機構によって厳密に制御されている。それらに加えて、我々の報告は未成熟なタンパク質やミスフォールディングしたタンパク質同士の衝突を未然に防ぎ、疎水性部分の非特異的な結合を抑制することで、品質管理の精度を高める機構が存在していることを示唆する（図 2）。また、最近我々は、小胞体のプロテオーム解析によって、シャペロンや ERAD 関連タンパク質の初期分泌系オルガネラにおける分布が均一ではなく、局在によりカーゴが享受する品質管理プロセスが異なることを示唆するデータを得ている（文献 14, Nagaya 未発表）。我々は新しい生物物理学の技法と基本的な生化学の技法を組み合わせることで、小胞体という極めて複雑な構造に対しても、正確な理解を得ることを目的に研究を進めている。

謝辞

小胞体タンパク質の動態の研究は、福島県立医科大学和田郁夫教授のもとで行われたものであり、和田郁夫教授をはじめ共同研究者の皆様へ深く感謝いたします。また、小胞体プロテオミクスに関しては、カナダ McGill 大学の

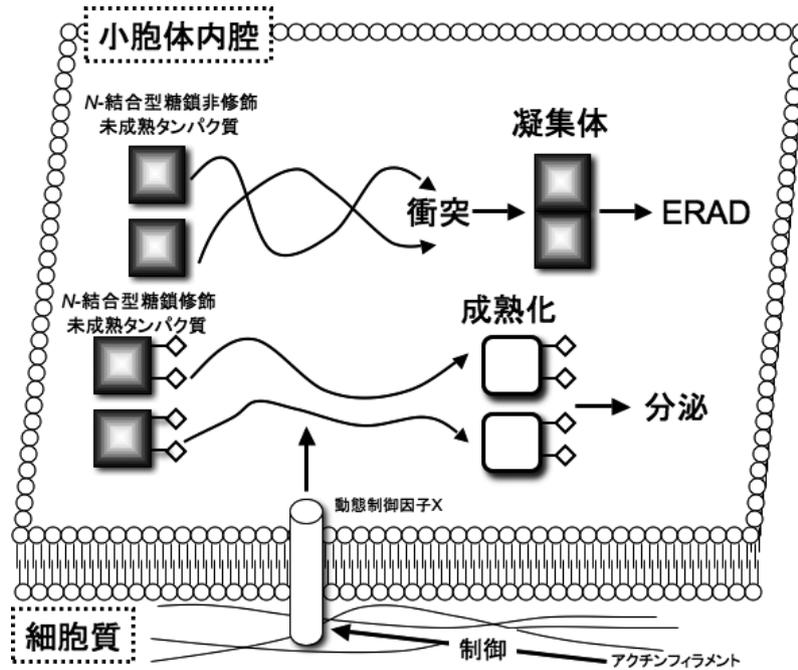


図2 糖鎖依存的な動態制御による凝集体形成の予防機構の仮説

John Bergeron 教授のもとで行われたものであり、同研究室のメンバーに感謝致します。

- 1) Anelli, T. & Sitia, R. (2008) *EMBO J.*, **27**, 315-327.
- 2) 和田郁夫 (2007) 生細胞蛍光イメージング (原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰編) pp. 85-92, 共立出版株式会社, 東京.
- 3) Shaner, N.C., Steinbach, P.A., & Tsien, R.Y. (2005) *Nat. Methods*, **2**, 905-909.
- 4) 金城政孝 (2007) 生細胞蛍光イメージング (原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰編) pp. 101-109, 共立出版株式会社, 東京.
- 5) Nehls, S., Snapp, E.L., Cole, N.B., Zaal, K.J., Kenworthy, A.K., Roberts, T.H., Ellenberg, J., Presley, J.F., Siggia, E., & Lippincott-Schwartz, J. (2000) *Nat. Cell Biol.*, **2**, 288-295.
- 6) Ramos, R.R., Swanson, A.J., & Bass, J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 10470-10475.
- 7) Kamada, A., Nagaya, H., Tamura, T., Kinjo, M., Jin, H.Y., Yamashita, T., Jimbow, K., Kanoh, H., & Wada I. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 21533-21542.
- 8) Nikonov, A.V., Snapp, E., Lippincott-Schwartz, J., & Kreibich, G. (2002) *J. Cell Biol.*, **158**, 497-506.
- 9) Snapp, E.L., Hegde, R.S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N., & Lippincott-Schwartz, J. (2003) *J. Cell Biol.*, **163**, 257-269.
- 10) Lee, T.H. & Linstedt, A. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1445-1462.
- 11) Heuser, J.E. & Anderson, R.G. (1989) *J. Cell Biol.*, **108**, 389-400.

- 12) Nagaya, H., Tamura, T., Higa-Nishiyama, A., Ohashi, K., Takeuchi, M., Hashimoto, H., Hatsuzawa, K., Kinjo, M., Okada, T., & Wada, I. (2008) *J. Cell Biol.*, **180**, 129-143.
- 13) Kachar, B. & Reese, T.S. (1988) *J. Cell Biol.*, **106**, 1545-1552.
- 14) Gilchrist, A., Au, C.E., Hiding, J., Bell, A.W., Fernandez-Rodriguez, J., Lesimple, S., Nagaya, H., Roy, L., Gosline, S.J., Hallett, M., Paiement, J., Kearney, R.E., Nilsson, T., & Bergeron, J.J. (2006) *Cell*, **127**, 1265-1281.

長屋 寿雄¹, 田村 拓²

(¹ 徳島大学疾患酵素学センターシグナル伝達と糖尿病研究部門, ²University of Massachusetts, Amherst)

Regulated motion of proteins in the endoplasmic reticulum
Hisao Nagaya¹ and Taku Tamura² (¹Division of Molecular Genetics, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, ²University of Massachusetts, Amherst)