

博士論文

論文題目

新生糖タンパク質の品質管理を担うマレクチンの生化学的解析
(Functional analysis of malectin in the quality control of nascent glycoprotein)

氏 名

武田 晃

論文の内容の要旨

論文題目

新生糖タンパク質の品質管理を担うマレクチンの生化学的解析 (Functional analysis of malectin in the quality control of nascent glycoprotein)

氏名 武田 晃

【序論】

膜タンパク質・分泌タンパク質の合成の場である小胞体では、膨大な数の新生タンパク質のフォールディング、正しくフォールドされたタンパク質を選別・輸送、ミスフォールドとなったタンパク質を分解することで品質管理している。この機構は各々の新生タンパク質に付加される *N* 型糖鎖と、その糖鎖構造を認識する 10 種類程度

の細胞内レクチンによつて的確に行われている(図 1)。Oligosaccharyltransferase (OST) によつて新生ポリペプチド鎖の Asn に付加された 14 糖からなる $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G3M9) 糖鎖は、糖タンパク質のフォールディング状態に応じて糖が刈り取られ、各々の糖鎖構造が品質管理における「タグ」の役割を果たす(図1)。近年、G2M9 糖鎖を認識する「マレクチン」が発見された。マレクチンのアミノ酸配列は生物種間で高度に保存されていることから、細胞内で重要な役割を果たしていると考えられた。

これまで、マレクチンの機能に関して以下のことが明らかになっている。モデル糖タンパク質である α 1-アンチトリプシン (AT) およびそのミスフォールド体 AT NullHong Kong (ATNHK) を用いた共免疫沈降の解析から、ヒトのマレクチンは正常な構造の AT よりもミスフォールドな構造をもつ ATNHK と多く共沈し、細胞外への分泌を抑制することが分かった。また、マレクチンに認識された ATNHK は分解機構へと誘導されることが示唆されている (Chen.*et.al.*,2011)。本研究では、細胞内におけるマレクチンの機能をより深く理解するため、異なる 2 つの方法でマレクチン相互作用分子の網羅的

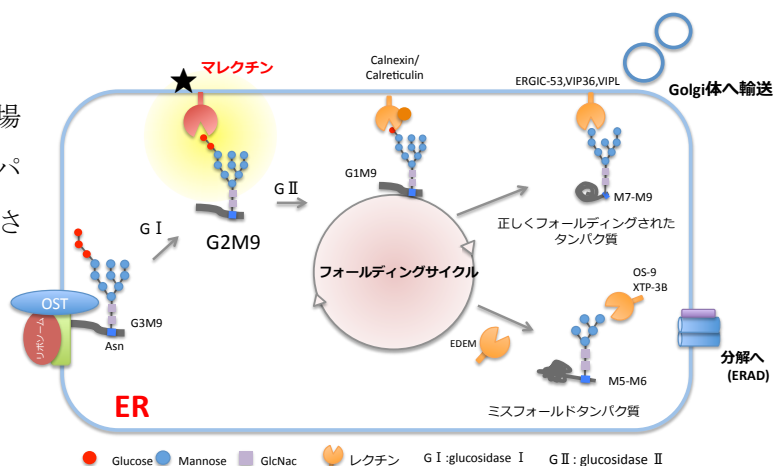


図1 タンパク質の小胞体品質管理機構とレクチン

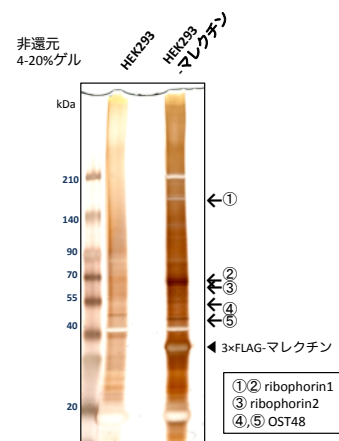


図2 マレクチン-免疫沈降後の SDS-PAGE

な探索を行った。

【結果と考察】

1. マレクチンは oligosaccharyltransferase (OST) 複合体の構成分子である

これまで、Qin らによる質量分析を用いた解析から、OST 複合体の構成分子の 1 つである ribophorin1 (Rpn1) がマレクチンと恒常的に相互作用する分子として同定されている (Qin *et.al.*, 2012)。マレクチンの新たな相互作用分子を明らかにするため、いくつかの改良を施した上で、改めて質量分析による解析を行った。作製した HEK293-マレクチン発現細胞由来の免疫沈降物を SDS-PAGE し、前処理をした上で質量分析したところ、Rpn1 の他に OST 複合体の構成分子である ribophorin2 (Rpn2)、OST48 がマレクチンの相互作用分子として同定された。また、免疫沈降物を Nano-LC で分離した後、質量分析したところ、Rpn1 に加え、OST 複合体の活性中心である STT3A が同定された。以上の結果から、マレクチンは OST 複合体と相互作用することが示唆された。

2. OST 複合体と結合不能なマレクチン変異体を使った解析

マレクチンが OST 複合体と相互作用しミスフォールド糖タンパク質の分泌抑制の機能に関わるか否かを調べるため、OST 複合体に結合不能でかつ小胞体に局在するようなマレクチン変異体を作製した。

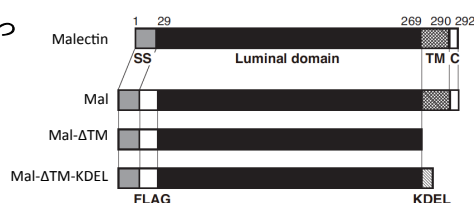


図3 OST複合体と結合不能なマレクチン変異体

2-1) OST 複合体と結合不能なマレクチン変異体の作製

Rpn1 とマレクチンの相互作用する部位を調べるため、マレクチンの様々な部位欠損変異体を作製し、結合部位を調べた。その結果、マレクチンと Rpn1 の結合に膜貫通領域が必要であることが示唆された。そこで図 3 のような変異体を作製した。C 末端に小胞体滞留シグナルペプチドを融合した Mal-ΔTM-KDEL は OST 複合体の構成

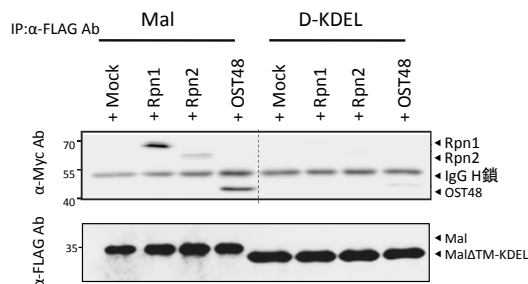


図4 Mal-ΔTM-KDEL変異体は OST複合体と相互作用しない

分子である Rpn1、Rpn2 および OST48 と相互作用せず(図 4)、また蛍光免疫染色による顕微鏡観察の結果からマレクチン(Mal)と同様に小胞体に局在することが分かった。Mal-ΔTM-KDEL は小胞体に局在し、かつ OST 複合体に結合不能な変異体であることが示唆されたことから、次の解析に用いた。

2-2) Mal-ΔTM-KDEL は小胞体で ATNHK と結合する

共免疫沈降法による解析から Mal-ΔTM-KDEL もミスフォールド糖タンパク質 ATNHK と相互作用することが分かった(図 5-B)。さらにその免疫沈降産物を endo-β-N-glycosidase H (Endo-H) 処理したところ、ATNHK の糖鎖は全て切断された。Endo-H はハイマンノース型糖鎖を切断することから、Mal-ΔTM-KDEL は Mal と同様に、小胞体内腔で ATNHK と結合することが示唆された。

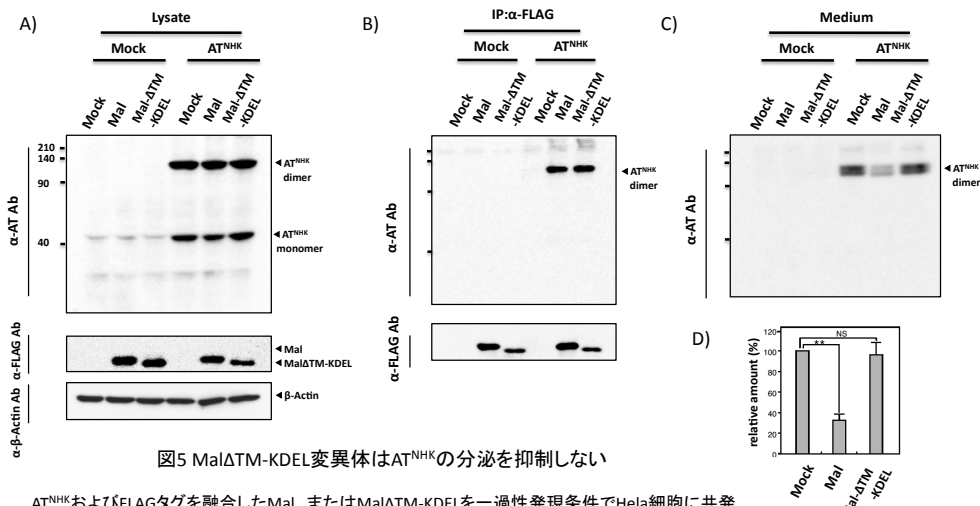


図5 Mal Δ TM-KDEL変異体はAT^{NHK}の分泌を抑制しない

AT^{NHK}およびFLAGタグを融合したMal,またはMal Δ TM-KDELを一過性発現条件でHela細胞に共発現させ、24hr後に培養液を交換した後再び培養し、48hr後に培養液および細胞を回収した。細胞はLysisした後、 α -FLAG抗体で免疫沈降し、 α -AT抗体でウエスタンブロットングした(B)。細胞外へ分泌されたAT^{NHK}は培養上清を α -AT抗体でウエスタンブロットし解析した(C)。C)のAT^{NHK}のバンドの濃度をdensitometry解析で比較した(n=3)(D)。 α -AT抗体で解析した結果は非還元、 α -FLAG抗体および α - β Actin抗体の結果は還元条件で行った。

2-3) Mal- Δ TM-KDEL 変異体は AT^{NHK} の分泌を抑制しない

Mal- Δ TM-KDEL が AT^{NHK} の分泌抑制に関わるかを解析するため、AT^{NHK} と Mal または Mal- Δ TM-KDEL を共発現させた後、細胞外に分泌された AT^{NHK} 量をウエスタンブロットングで調べた。その結果、Mal は AT^{NHK} の分泌を抑制するが、Mal- Δ TM-KDEL は分泌を抑制しないことが示され(図 5-C,D)、マレクチンと OST 複合体の結合は、マレクチンによるミスフォールドタンパク質の分泌抑制に重要であることが示唆された。

3. Protein-fragment complementation assay を利用したマレクチン相互作用分子の解析

免疫沈降法による相互作用分子の探索は、細胞の可溶化が必要、wash 等の操作により弱い相互作用が検出されにくい、という欠点を有している。そこで、「細胞内でのスクリーニング系」を用いてマレクチンと相互作用する分子を明らかにすることで、マレクチンに関する新たな知見が得られるのではないかと考えた。本研究では蛍光タンパク質を利用した、protein-fragment complementation assay (PCA) を用いてマレクチンの相互作用分子の探索を行った。

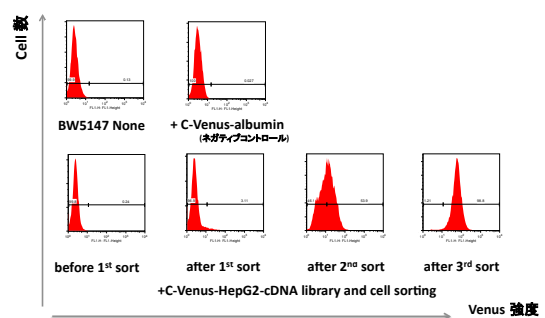


図6 PCAを利用したマレクチン相互作用分子の探索

N-Venus-マレクチン発現細胞に、C-Venus-HepG2-cDNAライブラリーを安定発現させ、セルソーティングを用いて蛍光陽性細胞集団を濃縮した。ソーティング前後の細胞群をフローサイトメトリーで解析した。

3-1) PCA によるマレクチン相互作用分子のスクリーニング

PCAは細胞内で2つのタンパク質の相互作用を解析する方法である。蛍光タンパク質のN末端断片をタンパク質Aに、C末端断片をタンパク質Bに融合した形で細胞内に発現させ、AとBの相互作用を蛍光タンパク質断片の近接による蛍光発光として検出する系である。改変GFPであるVenusのN末端側のフラグメントを融合したN-Venus-マレクチンを細胞に発現させた後、同細胞にC-Venus-HepG2 cDNA library をウイルスベクターを用いて導入し、スクリーニングを行った。蛍光強度が上位の細胞集団をセル

ソーターで3回濃縮し(図6)、得られた蛍光陽性細胞集団を限界希釈でクローン化した。フローサイトメトリ解析で蛍光が陽性であったクローンの中から20クローンを選択し、コードされているライブラリー由来の遺伝子を調べた。

3-2) PCAスクリーニングの結果と検討

調べた20クローンから11種類の遺伝子がマレクチンの相互作用分子の候補に挙げられた(表1)。

実際に、蛍光を発することを確認するため、クローニングしたライブラリーの遺伝子を発現ベクターに挿入し、N-Venus・マ

レクチンとHeLa細胞で共発現させPCAを行った。その結果、どの候補も蛍光が陽性となり、マレクチンと相互作用することが示唆された。同定された候補分子は分子シャペロンまたは分泌糖タンパク質が割合として多く含まれていた。なお、スクリーニングされた候補分子はタンパク質部分配列である。そこで、小胞体で機能する分子シャペロン PDIA6、ERp29、calreticulin、およびリガンドとして結合すると考えられた糖タンパク質 Mac2BP、Transferrin について、全長配列をコードした C-Venus で PCA 解析した。その結果、いずれの候補も有意に蛍光を示しマレクチンと相互作用することが示唆された。またこれらの分子は、糖認識ドメインを欠損したマレクチン変異体を用いた解析から、N型糖鎖依存的に相互作用することが示唆された。さらに、糖鎖を有さない分子シャペロン PDIA6、ERp29、および calreticulin は共免疫沈降法からもマレクチンと相互作用することが示された。以上の結果から、分泌糖タンパク質がリガンドとしてマレクチンと相互作用すること、また分子シャペロンがマレクチンと相互作用し新生タンパク質のフォールディング促進に関与する可能性が示唆された。

【結論・考察】

マレクチン安定発現細胞を使った免疫沈降および質量分析の解析から、マレクチンが OST 複合体と相互作用することが見出された。また、マレクチン変異体を用いた解析から、マレクチンは OST 複合体と相互作用することでミスフォールド糖タンパク質の分泌抑制し、分解経路へと誘導することが考えられた。一方、PCA を利用した細胞内におけるスクリーニングから、免疫沈降法による探索からは検出されなかったマレクチンのリガンドとなる分泌糖タンパク質、および新生タンパク質のフォールディングに関わる分子シャペロンが同定された。新生タンパク質に付加された G3M9 糖鎖は、glucosidase I、glucosidase II により G1M9 糖鎖へとトリミングされる過程で G2M9 糖鎖を経る。マレクチンが分泌糖タンパク質等の新生タンパク質の G2M9 糖鎖をトラップすることで、PDIA6、ERp29 等の分子シャペロンによるフォールディングが促されると考えられる。しかし、その中でフォールディングに失敗し疎水面を露出してミスフォールドとなった新生タンパク質は、OST 複合体を入り口として分解経路へと誘導されることが予想される。

表1 PCAスクリーニングによるマレクチン相互作用候補分子

No	Name	部分配列の長さ AA	全長 AA	glycosilation site	Memo	localization	コードされていたクローン数
1	FK506BP	57	142	None	Chaperon	ER	3
2	PDIA6	144	440	None	Chaperon	ER	1
3	ERP29	180	266	None	Chaperon	ER	1
4	calreticulin	375	417	1	Chaperon	ER	2
5	cathepsinZ	226	303	2	Glycoprotein	Lysosome	1
6	Transferrin	330	698	3	Glycoprotein	Secreted	2
7	granulin	273	593	5	Glycoprotein	Secreted	1
8	Mac2-BP	405	585	7	Glycoprotein	Secreted	2
9	apolipoprotein E (APOE)	309	317	7	Glycoprotein	Secreted	1
10	TAP BP variant2 (TAPASIN)	293	448	1		Golgi or ER	1
11	integral membrane protein C2	160	267	1		Golgi	1

目次

要旨

略語表	3
はじめに	6
序論	8
タンパク質のフォールディング	8
小胞体品質管理機構	12
N型糖鎖を利用した小胞体タンパク質品質管理機構	13
マレクチンとは	17
第一章	19
背景	19
α 1-アンチトリプシン	19
マレクチンの機能に関する先行研究	19
Oligosaccharyltransferase	20
研究の目的	21
材料と方法	22
基本的な実験操作	22
質量分析を用いたマレクチン相互作用分子の同定～SDS-PAGEによる分離を利用する方法	28
質量分析を用いたマレクチン相互作用分子の同定～Nano-LCによる分離を利用する方法	30
マレクチンの共免疫沈降実験	31
蛍光免疫染色	36
結果	38
共免疫沈降法および質量分析によるマレクチン相互作用分子の探索	38
OST複合体と結合不能なマレクチン変異体による解析	40
考察	45
マレクチンはOST複合体と結合する	45
マレクチンのミスフォールドモデル糖タンパク質 AT ^{NHK} の分泌抑制には、OST複合体との結合が重要である	47
マレクチンによるミスフォールド糖タンパク質分泌抑制と ribophorin1	48
今後の研究について	49
第二章	51
背景	51
免疫沈降法の問題点	51
Protein-fragment complementation assay	51

研究目的	52
材料と方法	53
基本的な実験操作	53
Protein-fragment complementation assay によるマレクチン相互作用分子のスクリーニング	53
一過性発現条件での PCA	57
架橋剤を用いた共免疫沈降法によるマレクチン相互作用の検出	60
結果	62
PCA 法を用いたマレクチン相互作用分子のスクリーニング	62
PCA 法によるマレクチン相互作用候補分子の決定～部分配列を用いた PCA の解析	65
PCA 法によるマレクチン相互作用分子の同定～全長配列を用いた PCA の解析	67
マレクチンの糖結合ドメイン変異体を用いた PCA による解析	67
共免疫沈降法によるマレクチンと同定された分子シャペロンの相互作用解析	68
考察	70
PCA 法を用いたマレクチン相互作用分子のスクリーニング	70
PCA 法による相互作用の検討	72
分子シャペロン PDIA6、ERp29、CRT はマレクチンと相互作用する	73
PCA によるスクリーニングから示唆されたこと	74
本スクリーニングの問題点と改良点	75
第 1 章・第 2 章の考察	78
第 1 章・第 2 章から予想されること	78
マレクチンが OST 複合体に存在する意義について	80
G2M9 糖鎖の役割	81
2 種類の方法でマレクチン相互作用分子探索を行ったことについて	83
マレクチンに関する新たな知見について	84
Nano-LC による分離を利用した質量分析の結果から見出された新たな知見	84
マレクチンの S-パルミトイル化	85
S-パルミトイル化されたマレクチンの機能について	86
総括	87
謝辞	88
参考文献	89
図表	98

略語表

α -AT: anti- α 1-antitrypsine

α -FLAG: anti-FLAG

AA: amino acid

ANS: 1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid

ANT3: ADP/ATP translocase 3

APOE: apolipoprotein E

AT: α 1-antitrypsin

AT^{NHK}: α 1-antitrypsin Null_{Hong Kong} mutant

AT^{NHK-Q3}: three *N*-Glycosilationsites mutant of α 1-antitrypsin Null_{Hong Kong}

ATF6: activating transcription factor 6

BiP: immunoglobulin heavy-chain binding protein

BPB: bromophenol blue

BSA: bovine serum albumin

CHCA: α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid

CNX: calnexin

CRT: calreticulin

C-Venus: C-terminal fragment of Venus

DMJ: deoxymannojirimycin

DNJ: deoxynojirimycin

DTT: dithiothreitol

EDEM: ER degradation enhancing α -mannosidase like protein

Endo-H: endo- β -*N*-acetylglucosaminidase H

ER: endoplasmic reticulum

ERAD: ER associated degradation

ERGIC-53: ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein

ERManI: ER mannosidase I

ERp29: endoplasmic reticulum resident protein 29

ERp57: endoplasmic reticulum resident protein 57

Ero1: ER oxidoreductin 1

ERQC: ER quality control

FAC: frontal affinity chromatography

FACS: fluorescent activated cell sorter

FCS: fetal calf serum

FK506BP: fk506-binding protein 2

Fuc: fucose
G1M9: Glc₁Man₉GlcNAc₂
G2M9: Glc₂Man₉GlcNAc₂
G3M9: Glc₃Man₉GlcNAc₂
Gal: galactose
GAM-HRP: goat F(ab')₂ anti-mouse IgG(H+L) HRP conjugate
GI: glucosidase I
GII: glucosidase II
GIIβ: glucosidase II β-subunit
Glc: glucose
GlcNAc: N-acetylglucosamine
GPI-anchor: glycosphosphatidylinositol-anchor
HRD1: HMG-CoA reductase degradation protein 1
HRP: horse radish peroxidase
HSP: heat shock protein
IAA: iodoacetamide
IRE1: inositol-requiring protein 1
LC: liquid chromatography
M5: Man₅GlcNAc₂
M6: Man₆GlcNAc₂
M7: Man₇GlcNAc₂
M8B: Man₈GlcNAc₂ isomer B
M8C: Man₈GlcNAc₂ isomer C
M9: Man₉GlcNAc₂
mAb: monoclonal antibody
Mac2BP: Mac-2-binding protein/ galectin-3-binding protein
Mal: malectin
MAM: mitochondria associated ER membran
MALDI-TOF-MS: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
Man: mannose
MFI: geometric mean fluorescence intensity
MS: mass spectrometry
N-Venus: N-terminal fragment of Venus
OS-9: osteosacroma-9
OST: oligosaccharyltransferase

OST48: oligosaccharyltransferase 48 kDa subunit
pAb: polyclonal antibody
PBS: phosphate buffered saline
PCA: protein-fragment complementation assay
PCR: polymerase chain reaction
PDIA6: protein disulfide-isomerase A6
PE: R-phycoerythrin
PERK: PKR-like ER kinase
PI: propidium iodide
PMSF: phenylmethylsulfonylfluoride
Rpn1: ribophorin1
Rpn2: ribophorin2
STT3A: oligosaccharyltransferase subunit STT3A
STT3B: oligosaccharyltransferase subunit STT3B
TAPASIN: TAP-associated protein
TBS: tris buffered saline
TBS-T: TBS containing 0.1% Tween20
Transferrin: serotransferrin
TM: transmembrane
UDP-Gal: uridine5-diphosphogalactose
UGGT: UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase
UPR: unfolded protein response
VIP36: vesicular integral membrane protein of 36 kDa
VIPL: VIP36-like protein
VDAC: voltage-dependent anion channels
VSV-G: vesicular stomatitis virus G glycoprotein
XTP3-B: XTP3-transactivated gene B protein precursor
2-ME: 2-mercaptoethanol

はじめに

我々のからだは約 60 兆個の細胞からできている。その 1 つ 1 つの細胞では、1 秒間に数万個という膨大な数のタンパク質が合成されており、その種類は約 5,000 以上におよぶ。我々が正常な身体の状態を維持していくためには、正しい立体構造のタンパク質のみが生産され、正しい場所に運ばれ機能する必要がある。もし、正しい立体構造のタンパク質が生産されずに異常な構造のタンパク質 (ミスフォールドタンパク質) が体に蓄積すると、生体に異常を来す。その重症化した例がフォールディング病と呼ばれるアルツハイマー病やハンチントン病、あるいはパーキンソン病といった神経変成疾患である。しかし、複雑な立体構造のタンパク質を正しく作り出すことは簡単なことではない。

タンパク質はフランシス・クリックが提唱したセントラルドグマに従い、DNA→mRNA→タンパク質の順序に合成される[1,2]。2つの矢印はしばしば「転写」、「翻訳」という日本語に置き換えられるが、実際には翻訳の後にもう 1 つフォールディングという矢印が存在する。リボソームによって mRNA から翻訳された直後のポリペプチド鎖は立体構造をとらないため、ほとんどが機能をもたない。1次構造と呼ばれるこのポリペプチド鎖が、周囲の水分子などとの関係からヘリックス構造や β シート構造といった「局所的」に安定な2次構造をとる。さらに疎水性残基の水との反発やアミノ酸側鎖間の疎水的結合、ジスルフィド結合などにより「分子全体」として安定な3次構造をとることで、はじめてタンパク質として機能できるようになる。多くの膜タンパク質や分泌タンパク質は、粗面小胞体でこのような立体構造の構築がなされる。リボソームによる翻訳と同時にポリペプチド鎖 (新生鎖) が小胞体へと押し込まれ、すぐにタンパク質のフォールディングがなされる。フォールディングは分子シャペロンと呼ばれるタンパク質群に助けられながら巧みに行われ、正しくフォールドしたタンパク質はゴルジ体へと輸送される。しかし、生成過程で折りたたみに失敗したミスフォー

ルドタンパク質もいづらかできてしまう。遺伝子異常などの原因も合わせ、驚くべきことに全合成タンパク質のうちミスフォールドな状態のものは30%に上ると言われている[3]。このような異常なタンパク質は放っておくと凝集体を形成し、先に挙げた疾患の原因になることから、正しくフォールドしたタンパク質と選別され、小胞体から細胞質へと排出された後、プロテアソーム系で積極的に分解される[4]。このように小胞体では、新生鎖のフォールディング、選別・輸送、分解をシステマティックに行い、品質管理することで正しい立体構造のタンパク質のみを作り出しているのである[5,6]。多くの分泌タンパク質や膜タンパク質は、生合成の過程で転移されるN型糖鎖のトリミングを利用したエレガントな方法で品質管理されることが知られている[7]。本研究が着目した「マレクチン」はN型糖鎖のある構造に結合する細胞内レクチンで、糖タンパク質の品質管理に関わると考えられている[8,9,10]。マレクチンについて詳しく触れていく前に、背景となる「タンパク質のフォールディング」、「N型糖鎖とタンパク質品質管理機構」について次の項目で簡単に解説する。

序論

タンパク質のフォールディング

<フォールディング理論>

1972年にノーベル化学賞を受賞した Anfinsen は、124 アミノ酸残基からなる ribonuclease A を用いた実験から、「タンパク質の立体構造は、アミノ酸一次配列によって自由エネルギーが最小となるように自発的に折り畳まれる」という Anfinsen のドグマと呼ばれる熱力学的仮説を提唱した[11]。遺伝子配列が決まれば一義的にタンパク質の立体構造が決まる、という考えである。しかし、複雑な高分子であるタンパク質のフォールディングを、この考えのみでは理解することはできないと気づいた Levinthal は、タンパク質のフォールディングにはアミノ酸配列によって規定された特定の経路が存在すると考え、速度論的仮説を導入した[12]。経路上に特異的なフォールディング中間体が存在するという考えであり、球状タンパク質のモルテン・グロビュール状態は発見された中間体の代表的な例である。現在一般的となっている理論では、サイズの小さなタンパク質は特定の経路や中間体を介さずに素早く折り畳まれ、分子量 10,000 を超えるようなタンパク質は中間体を蓄積し、相対的にゆっくりフォールディングされると考えられている (図 1)。1 ドメインからなるタンパク質のフォールディング時間は $\tau \propto \exp(cN^a)$ (N ; アミノ酸数、 c, a ; 定数) と相関することが報告されている[13,14]。この式によると 100 残基程度の小型のタンパク質ではミリ秒程度であるが、1,000 残基では非常に長い時間となり現実的にフォールディング不能となる。多くの場合、このような大きなタンパク質は分子シャペロンによる補助が必要とされる。また、細胞の中のタンパク質は、その濃度が 20%に達するほどの濃厚な溶液であり、フォールディングと凝集が常に隣り合う。さらに温度変化、pH 変化などのストレスが、タンパク質の凝集確率を引き上げる。このように、大きなタンパク質にとってフォールデ

ィングが困難な実際の細胞の環境下では、分子シャペロンによる援助が重要な役割を果たす。

<分子シャペロン>

分子シャペロンとは、「タンパク質のフォールディングを援助するが、自身は最終的な構造に取り込まれない一連のタンパク質」と定義される[15]。一般的に分子シャペロンは、露出する疎水性残基に疎水性相互作用で結合し、変性タンパク質同士の凝集を防ぐこと、および ATP 加水分解のエネルギーを使ってフォールディングの援助を行っている。ここでは哺乳類細胞の「小胞体」ではたらくメインの分子シャペロン (表 1) について説明する。

○ 熱ショックタンパク質ファミリー ~ Bip

温度上昇によって誘導されるタンパク質として発見された熱ショックタンパク質 (heat shock protein (HSP) ファミリー) は、細胞質、ミトコンドリア等に広く分布しタンパク質のフォールディングで重要な役割を担っている。小胞体の HSP ファミリーは、HSP40 系の ERdj1-7、HSP70 系の Bip、HSP90 系の GRP94 などが存在する。中でも Bip は、免疫グロブリンの生合成に関わる分子シャペロンとして発見され、小胞体内腔総タンパク質の 5-10%と豊富に存在する分子シャペロンとして有名である[16,17]。免疫グロブリンの H 鎖の疎水性アミノ酸残基に結合した Bip は、L 鎖と会合するまでの凝集を防ぐ役割を果たす (図 2-A)[18]。これと同じようにミスフォールドタンパク質の疎水的な領域に Bip が結合し、疎水面を覆い隠すことにより凝集を防いでいることが知られている。また、Bip は小胞体ストレス応答 (UPR: unfolded protein response) と密接な関わりをもつことが知られている。通常状態において、Bip は小胞体膜タンパク質である inositol-requiring protein 1 (IRE1)、PKR-like ER kinase (PERK)、activating transcription

factor 6 (ATF6) などの小胞体膜タンパク質に結合しているが、小胞体にミスフォールドタンパク質が蓄積すると、これらのタンパク質から解離しミスフォールドタンパク質と結合して凝集を防ぐ。Bip が遊離した IRE1、PERK は多量体化による自己リン酸化が起こり、また ATF6 は自身が切断されることにより活性化し、小胞体ストレス応答が誘導される[19,20,21]。

○ チオレドキシシンファミリー

タンパク質のフリーな 2 つのシステイン残基は、酸化的環境下の小胞体内腔で 2 電子酸化が促進され共有結合 (ジスフィルド結合) を形成する。共有結合であるジスフィルド結合はタンパク質の 3 次構造形成・安定化に極めて重要な役割を果たすため、適切に架橋されることは極めて重要である。例えば、ヒトの免疫グロブリン M (IgM) 1 分子は小胞体で約 100 本ものジスルフィド結合が導入され 5 量体の成熟型になることが知られており、IgM 産生細胞では 1 秒間に 1,000 分子もの IgM を合成している[18]。このような哺乳類細胞におけるジスフィルド結合形成や架け替えに関与するタンパク質は、Cys-X-X-Cys のチオレドキシシン様モチーフをもつファミリーで、小胞体内に PDI (protein disulfide-isomerase) や ERp57 (endoplasmic reticulum resident protein 57)、PDIA6 (protein disulfide-isomerase A6) など 20 種類近く存在する[22]。PDI は Bip と、ERp57 は calnexin/ calreticulin、というように他の分子シャペロンと複合体を形成し協同的に働くことが知られている。しかし、各々のチオレドキシシンファミリータンパク質がどのような基質特異性をもつかは、詳しく分かっていない[23,24]。ジスルフィド結合導入の作用機序については PDI の解析が進んでおり、2 つのチオレドキシシンモチーフが酸化された酸化型の PDI が、フォールディング途上の新生鎖のシステイン 2 残基を酸化し、ジスルフィド結合を導入することが分かっている (図 2-B) [25]。還元型になった PDI は活性中心に FAD が結合した Ero1 (ER oxidoreductin 1) と呼ばれるフラビン

酵素に再酸化され、再び酸化型の PDI となる。出芽酵母の細胞内では PDI が主に酸化型として存在していることが報告されている[26]。再酸化を担う酵素は酵母では Ero1p の 1 つとされており、哺乳類細胞においても Ero1 のみが主として働くと考えられている。しかし近年、PRDX4、VKOR、GPX7/8 の 4 種類が Ero1 以外にチオレドキシソファミリーに対して酸化能をもつ酵素として同定され[27,28,29,30]、複数の酸化経路が存在した複雑なネットワークを形成していると考えられている。また哺乳類細胞における誤ったジスルフィド結合の架け替えは、還元型状態のチオレドキシソタンパク質が担っていると考えられているが、その詳細なメカニズムはまだよく分かっていない。哺乳類細胞におけるジスルフィド異性化システムはまだはっきりと解明されていないのが実状である。

○ プロリルイソメラーゼ

アミノ酸残基のペプチド結合のほとんどは、C=O と N-H が逆方向のトランス型をとり、同方向のシス型よりもはるかに安定である。一方、タンパク質のプロリン残基は他のアミノ酸と比較し直前の残基とシス型で結合しやすい性質をもつ。小胞体では正確なフォールディングを行うため、ペプチド結合をトランス型へと異性化しタンパク質のフォールディングを進めている (図 2-C)。この異性化を担う酵素はプロリルイソメラーゼと呼ばれ、cyclophilin B や FK506 binding protein (FK506BP) などが挙げられる[31]。これらは、免疫抑制剤の標的分子としても有名である。

○ 細胞内レクチン

「糖タンパク質の品質管理」の項目に記載した。

小胞体品質管理機構

<小胞体とタンパク質のフォールディング>

小胞体内腔の環境は細胞質の環境と比べ、 Ca^{2+} などのイオン状態、酸化還元状態、局在する分子シャペロンなど異なる点がある。また、翻訳後修飾についても、シグナルペプチドの切断、*N*型糖鎖の修飾、GPI アンカーの付加、ジスフィルド結合の導入など細胞質では起こらないような修飾が小胞体では起こる。これらの違いは多くのタンパク質にとって必要不可欠なことであり、小胞体で正しくフォールディングされるタンパク質が細胞質では正しくフォールディングされないケースが多い。またその逆も然りである。

哺乳類細胞の小胞体におけるフォールディングは3つのフェーズからなる。1段階目は、翻訳と同時にシグナルペプチドを頼りに小胞体へと押し込まれてきた新生鎖に対し、入り口であるトランスロコン複合体で起こる。2段階目は、翻訳が終了し、リボソームおよびトランスロコンから離れた新生鎖に対して起こり、3段階目はサブユニット等の複合体の形成のために起こる。小胞体では表1で挙げたような分子シャペロンが、膨大な分泌タンパク質や膜タンパク質のフォールディングを担っている[6]。

<小胞体品質管理機構とは>

先に挙げたように、小胞体は常に大量のタンパク質を生成し続けている。しかし、小胞体はただタンパク質の合成のみを行う場ではない。部分的に誤ったタンパク質のフォールディングをやり直し、正しくフォールディングされたタンパク質のみをゴルジ体へと送り出す。一方、生成の過程で発生した3割にも上る新生鎖のフォールディング不良品を選別し、ERAD (ER associated degradation) を担う排出機構に誘導し、細胞質のプロテアソーム分解系へと送り出す (図 3-A)。また、時に異常事態も発生する。小胞体は急激な温度変化、遺伝子の変異、化学物質の影響、ウイルス感染、代謝異常

などの ER ストレス因子により、ミスフォールドタンパク質が蓄積するリスクに常にさらされている。このようなストレスに対し、小胞体ストレス応答という機構がはたらくことでミスフォールドタンパク質の蓄積が抑制され、危機的状況は対処される (図 3-B)。これら一連のタンパク質の生産・品質管理システムは「小胞体品質管理機構 (ERQC)」と呼ばれており、ミスフォールドタンパク質が小胞体に蓄積し細胞毒となることや、ゴルジ体以降の下流のコンパートメントに運ばれ生体異常の原因となることを防いでいる[6]。このように小胞体のみならず細胞全体や生体のホメオスタシスの維持も担っている。以下、小胞体で生産される分泌タンパク質や膜タンパク質の多くに付加される N 型糖鎖と小胞体品質管理機構の関係について説明する。

N 型糖鎖を利用した小胞体タンパク質品質管理機構

<糖鎖とは>

単糖が鎖状に連なった高分子である「糖鎖」は、同じように鎖状からなる核酸、タンパク質に並ぶ第三の生命鎖と呼ばれている。生体内では複合糖質とよばれる糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンの構成成分として存在し、細胞識別・接着、免疫反応、発生・分化、がん、病原体感染など身体の中の様々な機能・現象に深く関わっている。細胞内のタンパク質に関しては、7-8 割近くが糖鎖修飾を受けるとされている [32]。C-マンノシル化や GPI アンカー型を除き、メインの糖鎖修飾は小胞体で起こる N 型糖鎖修飾とゴルジ体で起こる O 型糖鎖修飾に大別される。

N 型糖鎖修飾は、糖鎖転移酵素 (OST: oligosaccharyltransferase) が小胞体内腔でドリコールリン酸に結合した 14 糖からなる前駆体をポリペプチド鎖の Asn-X-Ser/Thr モチーフの Asn に転移することで起こる (図 4-A)。この 14 糖はマンノースを 9 糖含むハイマンノース構造であるが、数種類のグリコシダーゼにより小胞体、シス-ゴルジ体で糖がトリミングされた後、異なる糖転移酵素のはたらきによりゴルジ体で糖が次々と付

加される (図 5)。最終的には混成型、複合型に大別される不均一 (heterogeneity) な成熟型の糖鎖構造に変化する (図 4-B) [32]。しかし実際には、未成熟に近いままのハイマンノース型が最終構造となっているものも多く存在する。一方、ゴルジ体で起こる O 型糖鎖修飾は、14 糖がはじめに転移される N 型糖鎖と異なり、1 つ 1 つ単糖が付加されていく。タンパク質の Ser または Thr を豊富に含む領域に UDP-GalNAc が付加されると、様々な転移酵素により糖鎖が伸長される。O 型糖鎖はいくつかの基本構造が存在するが、一般的に糖鎖は長く複雑である。

<レクチンとは>

糖を認識するタンパク質は総称で「レクチン」と呼ばれている (ただし抗体は除く)。一般的に糖鎖と動物レクチンの結合強度は $Ka \sim 10^4 \text{ M}^{-1}$ 程度であり、安定的な複合体となる免疫グロブリンと抗原の結合 ($Ka = 10^7 \sim 10^{11} \text{ M}^{-1}$) と比較すると弱い[33]。細胞認識や分子認識、あるいはタンパク質の輸送など、幅広い細胞内現象に関わっていることから[34]、「糖鎖とレクチン」に着目した研究は重要なテーマとして位置付けられているが、結合強度の低さとレクチンが認識する糖鎖構造の特異性の低さが大きなボトルネックとなり、なかなか研究が進んで来なかった[35]。しかし近年、糖鎖アレイやレクチンアレイ、フロンタルアフィニティクロマトグラフィといった解析手法が開発され、研究の前進速度が上がりつつある。N 型糖鎖を利用したタンパク質品質管理機構の研究もその 1 分野である。

<N 型糖鎖と細胞内レクチンによる小胞体タンパク質品質管理機構>

O 型糖鎖がタンパク質の Ser/Thr に次々と糖が付加されて成熟するのに対し、N 型糖鎖は、合成された 14 糖からなる糖鎖が新生鎖に転移されると、小胞体で一旦糖の刈込みが行われ、その後ゴルジ体で糖が次々と転移され成熟する (図 5)。多くのエネルギー

一を使い合成した *N* 型糖鎖をわざわざ刈り込むことは、エネルギー的に明らかに無駄なステップである。しかし興味深いことに、この「エネルギー的に無駄なステップ」は種を超えて保存された普遍的なプロセスである。このプロセスを利用しているシステムこそが、*N* 型糖鎖を利用した小胞体品質管理機構である。多くの分泌タンパク質や膜タンパク質の新生鎖に付加される *N* 型糖鎖の構造をタンパク質の品質状態 (フォールディング状態) を示す「タグ」として利用している。タグの違い、つまり糖鎖構造の違いを見分け、新生鎖を管理するメンバーが小胞体で働く細胞内レクチンである。この小胞体ではたらく 10 種類程度の細胞内レクチンは、膨大な数の新生鎖の処理に大きく寄与している。

OST 複合体により新生鎖の Asn に転移された $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Glc: Glucose、Man: Mannose、GlcNAc: *N*-acetylglucosamine) の G3M9 糖鎖 (図 6-①) は、glucosidase I に認識され α -1,2 で結合していた末端グルコースが 1 個トリミングされる。この $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G2M9) はマレクチンと呼ばれるレクチンに認識された後 (図 6-②) (詳しくは後述する)、続いて glucosidase II に認識されて α -1,3 で結合したグルコースが 1 個トリミングされる。 $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G1M9) になると、膜型のレクチンである Calnexin (CNX) または可溶型のレクチンである Calreticulin (CRT) に Ca^{2+} 依存的に認識される (図 6-③) [36]。CNX および CRT は糖鎖結合に関わるレクチン活性のみでなく、non-Native な構造の新生鎖にタンパク質間相互作用で結合し、分子シャペロンとして働く。さらに、CNX または CRT の C 末端に直接結合した ERp57 が協同的に働きジスフィルト結合の導入や異性化が行われることでフォールディングが促進される。フォールディングを終えた新生鎖の *N* 型糖鎖は、glucosidase II によって 3 つ目のグルコースがトリミングされ、CNX/CRT から解離する。ここで、部分的に誤ったフォールディングがされた新生鎖はフォールディングセンサーである UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) によって認識され、再びグルコースが 1 個付加される (図

6-④)。UGGT はタンパク質表面の疎水性パッチを見分け、フォールディング中間体や誤ってダイマーとなった新生鎖を認識していると考えられるが、折りたたみ不全なミスフォールド糖タンパク質はグルコース付加を受けない[37,38,39,40]。このように再生可能な新生鎖は、付加されたグルコースをタグとして、再び CNX/CRT によるフォールディングのやり直しを受ける。この一連のフォールディングサイクルは CNX/CRT サイクルと呼ばれている。正しく折り畳まれた新生鎖の M9 糖鎖、または ER-mannosidase I (ERMan I) により B アームのマノースがトリミングされた $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (M8B) 糖鎖は、カーゴレセプターである ERGIC-53、またはこれと相同性の高い VIP36、VIPL に認識される (図 6-⑤) [41,42,43]。植物レクチンと相同性の高い L 型レクチンに属する ERGIC-53 は、補助タンパク質 MCFD2 とともに Ca^{2+} 依存的に新生鎖の N 型糖鎖に結合すると、C 末端の KKFF モチーフの 2 つの F 残基で COP II と結合し、ERGIC 領域を経てゴルジ体へと運ばれる。ゴルジ体へと運ばれた ERGIC-53 は、結合していたタンパク質の糖鎖から解離すると、上記のモチーフの 2 つの K 残基が COP I と結合し小胞体へと逆輸送される[44,45]。一方、CNX/CRT サイクルを経ても折りたたみ不全であるミスフォールド糖タンパク質は、ERMan I と相同性がある ER degradation enhancing α -mannosidase like protein (EDEM) と呼ばれるタンパク質群によって認識されマノースが刈り込まれる (図 6-⑥) [46]。EDEM2 が M9 糖鎖の B アームの $\text{Man-}\alpha$ -1,2 結合を切断すると分解経路への誘導が始まり、さらに $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ B (M8B) 構造を認識した EDEM1、EDEM3 により $\text{Man-}\alpha$ 1,2 結合がトリミングされることが近年明らかになっている[47]。EDEMs によって $\text{Man-}\alpha$ 1,6 結合が露出した M5-M7A 構造は、可溶性レクチンである OS-9、XTP3-B に認識される (図 6-⑦)。これらのレクチンは E3 ユビキチンライゲースの HRD1 を中心とする ER associated degradation (ERAD) を担う複合体と小胞体内腔で相互作用する。両レクチンはモデル糖タンパク質 α 1-アンチトリプシン (AT) とミスフォールドモデル糖タンパク質 α 1-アンチトリプシン-Null^{Hong Kong} (AT^{NHK})

を用いた実験から、ミスフォールド糖タンパク質のみに結合すると考えられている [48,49,50]。複合体中のユビキチン化酵素によりユビキチン化されたミスフォールド糖タンパク質は、レトロトランスロコンと呼ばれるチャネルを通り細胞質へと引きずり出され、プロテアソーム複合体により分解される[51]。

小胞体における新生鎖の品質管理で機能するレクチンと、各々のレクチンが強く認識する *N* 型糖鎖構造の部位を図 7 に示した[52]。*N* 型糖鎖構造がフォールディング状態を示すタグとして働き、その構造を認識するレクチンによって処理されている。しかし、ERGIC-53 vs EDEMs のように「どのようにして正しい構造とミスフォールドな構造のタンパク質を見分けているのか」という疑問に関しては明確な回答が得られておらず、EDEMs の構造的な理解や相互作用する分子の同定を含めたメカニズムの解明がこれからの課題である。

近年見つかった細胞内レクチンの 1 つであるマレクチンもまだ機能が明確ではない。これまでの先行研究を、次の「マレクチンとは」および「第 1 章 背景」にまとめた。

マレクチンとは

OST 複合体により *N* 型糖鎖の G3M9 糖鎖が付加された新生鎖は、glucosidase I、glucosidase II によりグルコースが 2 個トリミングされると G1M9 糖鎖となり、CNX/CRT に認識される。G1M9 糖鎖になる過程の G2M9 糖鎖の状態の生物学的意義は、この分野の研究者にとって長年謎であった。2008 年になり、アフリカツメガエルからマルトースおよびニゲロースに結合する I 型膜タンパク質のレクチンが発見され、マレクチンと名付けられた[53]。アフリカツメガエルのマレクチンの可溶性部位を NMR で構造解析した結果をみると、 β サンドイッチ構造の脇に α ヘリックス構造が配置されたマレクチン特有の球状構造をとっており、新たなタイプの糖認識構造のレクチンであることが分かった (図 8-A、B)。また、様々な糖鎖が固相化された基板上で相互作用解析

を行う糖鎖アレイ、およびレクチンカラム中に流した糖鎖の溶出速度から親和性を測定するフロントアルフィニティークロマトグラフィによる詳しい解析の結果、マレクチンは G2M9 糖鎖を特異的に認識することが明らかになった (図 8-C) [53,8]。マレクチンは線虫からヒトに至るまで、動物種間でアミノ酸配列が高く保存されたタンパク質であり (図 9)、生体内のほぼすべての組織・器官で発現している[53]。細胞内局在は免疫染色による顕微鏡観察から、小胞体に局在していることが報告されている[9,53]。マレクチンは小胞体において糖タンパク質の品質管理における 1 プレイヤーとして働くことが示唆されているが、CNX や CRT、ERGIC-53 などの小胞体ではたらく他の細胞内レクチンと比べ機能に関する報告は乏しく、実像が捉え切れていない。本研究では免疫沈降法による相互作用分子の探索 (第 1 章) および PCA によるマレクチン相互作用分子のスクリーニング (第 2 章) の 2 種類のマレクチン相互作用分子の網羅的解析を行い、細胞内におけるマレクチンの機能解明を目指した。

第 1 章 免疫沈降法による相互作用分子の探索

背景

α 1-アンチトリプシン

血清タンパク質の α 1-アンチトリプシン (AT) は 3 カ所に *N* 型糖鎖修飾を受ける可溶性の分泌糖タンパク質で、血中へ分泌されると主にプロテアーゼインヒビターとして機能する[54]。現在 100 種類以上の変異体が見つかっており、 α 1-アンチトリプシン-Z (ATZ) のように α 1-アンチトリプシン欠損症などの重篤な病気を引き起こす変異体も存在する[55]。この欠損症はオートファジーと密接に関係しており、ATZ はオートファジー研究のモデルタンパク質として使用されている[56,57]。また、AT は小胞体で *N* 型糖鎖を介してレクチンと結合することから、モデル糖タンパク質としてタンパク質の品質管理機構の研究に用いられてきた[58,59]。変異体の 1 つである AT Null^{Hong Kong} 型(AT^{NHK}) は ERAD における分解機構の基質として研究に用いられてきた[60,61]。AT^{NHK} は変異によるフレームシフトで C 末端配列を欠損し (図 10-A) [62]、分子表面に疎水性パッチを露出した折りたたみ不全な構造をとることが知られている。また、256 番目にシステイン残基を有しており、一部 2 量体を形成することが報告されている [8,63]。本研究においても AT^{NHK} をミスフォールディングのモデル糖タンパク質として用い、機能に関する研究を行った。

マレクチンの機能に関する先行研究

Chen らは糖タンパク質 AT と AT のミスフォールド体である AT^{NHK} (図 10-A、前の項目「 α 1-アンチトリプシン」に記述した) をリガンドとして用い、マレクチンの機能について解析した。共免疫沈降法の解析におけるマレクチン糖結合ドメインの Ala 置換体を用いた解析結果、および glucosidase II 阻害剤の deoxynojirimycin (DNJ) を用いた

解析結果から、マレクチンは *N* 型糖鎖依存的に AT または AT^{NHK} に結合することを示した[8]。一方、マレクチンと共沈する量を調べると、AT よりも AT^{NHK} と多く共沈したことから、マレクチンがミスフォールドしたタンパク質を細胞内に留めていることが示唆された (図 10-B)。この結果はマレクチンおよび糖タンパク質のヘマグルチニンを用いて解析した Galli らによる報告からも示唆されている[9]。また、Chen らはマレクチンを強制発現した細胞としていない細胞で AT または AT^{NHK} の細胞外への分泌量を比較し、マレクチン強制発現下で AT の分泌量に変化が起こらないのに対し、AT^{NHK} の分泌は顕著に抑制されることを示した (図 11)。マレクチンが AT^{NHK} の分泌抑制に関わることは、マレクチンノックダウンによる解析からも示されている。さらにマレクチン発現下で OS-9 に結合する AT^{NHK} の量が増えること、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理を行うと AT^{NHK} の分泌量に変化がなくなることから、マレクチンが結合し細胞内に留めたミスフォールド糖タンパク質は、最終的に ERAD を担う機構で分解されることが示唆された (図 11) [8]。Qin らはマレクチンと恒常的に相互作用する分子を調べるため、プロテオーム解析を行い、OST 複合体の構成分子として知られる ribophrin1 を同定した。この ribophrin1 はマレクチンと恒常的に結合し、マレクチンの AT^{NHK} の分泌抑制能を高める可能性が HEK293T 細胞における実験から示唆された。また、疎水性蛍光プローブ 1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid (ANS) を用いた解析から、ribophrin1 が分子表面に疎水性パッチをもっていることが示唆され、さらに変性 ribonuclease A に選択的に結合したことからタンパク質のミスフォールド構造の識別に寄与している可能性が示唆された[10]。

Oligosaccharyltransferase

OST 複合体はドリコールリン酸に G3M9 糖鎖が付加した前駆体を新生鎖に転移する酵素複合体である。図 12 のようにトランスロコンの近傍に存在し、NXS/T のアミノ酸

配列構造をサーチし転移する[64]。酵素活性の中心は STT3A、STT3B のアイソフォームで各々の複合体を形成する[65]。STT3A はリボソームによる翻訳伸長中の新生鎖に転移を行い、STT3B は翻訳後の新生鎖の STT3A にスキップされた部位に転移を行う。OST 複合体は ribophrin1、ribophrin2、OST48 などを含む 10 種類程度の膜タンパク質から構成され、各構成分子は STT3 が正確に糖鎖を転移するための補助因子として働くとされている[66]。

研究の目的

現在、マレクチンのリガンドとしてではなく、恒常的にマレクチンと相互作用する分子として同定されているタンパク質は ribophrin1 のみである。そこで、質量分析を用いた相互作用分子の探索を改めて行うことで、①マレクチンは OST 複合体と結合しているのかどうか ②マレクチンは糖タンパク質の品質管理以外の機能を有するかどうかを明らかにしたいと考えた。G1M9 糖鎖を認識する CNX や CRT といったレクチンは Ca^{2+} 貯蔵、 Ca^{2+} シグナリング、抗原提示に関わるなどフォールディング以外の機能にも関わることが知られている[67,68]。網羅的解析による相互作用分子の同定からマレクチンの機能に関する新たな知見を得ることを目指した。

材料と方法

基本的な実験操作 (第2章と共通)

<緩衝液、調製した試薬>

・ PBS(-)

: 8.1 mM Na₂HPO₄、 1.47 mM KH₂PO₄、 137 mM NaCl、 2.68 mM KCl

・ FACS Buffer (フローサイトメトリーの解析で使用する)

: NaHCO₃ (0.35 g/l)、0.1% (w/v) NaN₃、0.1% (w/v) BSA を含む 9.8 mg/ml Hanks' balanced salt solution (Gibco)

<細胞培養>

ヒト胎児性腎臓由来の HEK293 細胞およびヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞、マウス胸腺腫細胞由来の BW5147 細胞は東北大学加齢医学研究所の医用細胞資源センターより、レトロウイルスパッケージング細胞である Platinum-E 細胞 (Plat-E 細胞) は東京大学医科学研究所の北村俊雄博士より供与して頂いた[69]。

HEK293 および HeLa 細胞は、D10 [10%非働化ウシ胎児血清 (FCS: fetal calf serum) (Invitrogen)、100 µg/ml ペニシリン、100 U/ml ストレプトマイシン、50 µM 2-mercaptoethanol (2-ME)、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) を加えた D-MEM 培地 (invitrogen)] で培養した。BW5147 細胞は R10 [10% FCS、100 µg/ml ペニシリン、100 U/ml ストレプトマイシン、50 µM 2-mercaptoethanol (2-ME) を加えた RPMI 培地 (Gibco)] で培養した。Plat-E 細胞 (レトロウイルスパッケージング細胞株) は、10 µg/ml blasticidin S HCl (Invitrogen)、1 µg/ml puromycin (Sigma) を含む D10 培地で培養した。いずれの細胞株も、5% CO₂ 存在下、37°C の条件で培養した。

<抗体>

mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody (F1804)、rabbit polyclonal anti-FLAG antibody (α -FLAG pAb) (F7425)、monoclonal anti-FLAG M2 antibody-conjugated agarose beads (A2220)、mouse monoclonal anti-FLAG M2-peroxidase antibody (M2-HRP) (A8592)、anti-GFP N-terminal antibody、goat anti-mouse IgG (Fab specific)-peroxidase antibody (GAM-HRP) (A2304)、mouse monoclonal anti- β -actin antibody (A5441) は Sigma-Aldrich から購入した。mouse monoclonal (B9) anti-alpha1 antitrypsin (α -AT Ab) (ab9399)、mouse anti-calnexin antibody (α -CNX Ab) は Abcam から購入した。donkey anti-rabbit IgG -peroxidase linked (Fab')₂ fragment (DAR-HRP) (NA93400V) は Amersham Bioscience から購入した。Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse IgG (A-11001) および Alexa Fluor 568-labeled goat anti-rabbit IgG (A-11036) は Life Technology から購入した。mouse monoclonal anti-Myc (9E10、mouse IgG 1) は、抗 Myc 抗体産生ハイブリドーマを American Type Culture Collection より購入し、培養上清から Protein A カラムによって精製したものを使用した。

<ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) およびシーケンスの確認>

PCR はメーカーの指示書に基づき基本的に以下の条件で行った。KOD-plus DNA polymerase (Toyobo) を用いる場合、94°C 2 min (94°C 30 sec、Tm-5°C 30 sec、68°C x min (min/kb)) \times 25-30 サイクル 68°C 10 min の条件で、KOD-FX DNA polymerase (Toyobo) を用いる場合、94°C 2 min (98°C 10 sec、68°C x min (min/kb)) \times 25-30 サイクルの条件で、KOD-plus Neo DNA polymerase (Toyobo) を用いる場合、94°C 2 min (98°C 10 sec、68°C x min (30 sec/kb)) \times 25-30 サイクルの条件で、PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara) を用いる場合、(98°C 10 sec、55°C 5 sec、72°C x min (min/kb)) \times 25-35 サイクルの条件で行った。(論文中に記述してある場合は、記述の条件で行った) 反応溶液はメーカーの

指示書に従い調製した。プライマーは Greiner bio-one に合成を依頼した。PCR で増幅した DNA 断片の配列は、dye-terminater 法を利用し、3500 Genetic analyzer (Applied Biosystems)、または 3130xl Genetic analyzer (Applied Biosystems) により解析した。

<大腸菌培養>

液体培養は LB 培地 [10% (w/v) Bacto trypton (Becton Dickinson)、5% (w/v) Bacto yeast extract (Becton Dickinson: BD)、5% (w/v) NaCl] ampicillin sodium salt を終濃度 100 µg/ml を加え、形質転換した大腸菌 DH5 α を 37°C、16 h 振盪培養した。

<DNA の分離・ゲル抽出・精製>

Agarose standard 01 (Solana) を用いて作製した 1%または 2%のアガロースゲルで電気泳動を行い、DNA サイズで分離した。切り出した DNA を含むゲル片は QIAquick gel extraction kit (Qiagen) および Econo spin II a (GeneDesign)を用いて精製した。

<プライマーのリン酸化>

T4 polynucleotide kinase (Takara) の指示書に従い primer をリン酸化した。37°Cで 1 h 反応させ、70°Cで 20 min インキュベートし酵素を失活させた。

<ライゲーション反応～形質転換>

ライゲーション反応は Takara Ligation Mighty Mix (Takara) を用いた。ベクターとインサートをモル比 1: 5~10 で混合した DNA 溶液 5 µl に Ligation Mix を 5 µl 加え、16°C で 30 min ライゲーション反応を行った。その後、大腸菌コンピテントセル DH5α 100 µl にライゲーション溶液を 10 µl 加え、42°C、40 sec のヒートショックを与えて、形質転換を行った。氷上で 5 min 静置した後、LB/Amp プレートにまき、37°C、一晚培養した。

<プラスミド精製>

サブクローニング用のプラスミドを大腸菌から精製する際は、FastGene plasmid mini kit (日本ジェネティクス)を使用した。細胞に遺伝子導入するプラスミドを大腸菌から精製する際には、Nucleobond PC20 または PC100 (Macherey-Nagel) を使用した。手順はキットの指示書に従った。

<Lipofectamine 2000 を用いた細胞への遺伝子導入 (リポフェクション) >

メーカーの指示書を参考にした基本的な方法を以下に記載した (実験ごとにプラスミド量、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) の量は異なる)。プラスミドベクター2 µg と無血清培地 OPTI-MEM (Invitrogen) 125 µl、および Lipofectamine 2000 5 µl と OPTI-MEM 125 µl をそれぞれ混和し室温で 5 min 静置した後、その両混合液を混和した。20 min 静置した後、6-well プレートでメディウム 2 ml にて一晩培養した細胞に滴下し、さらに培養を続けた。

<SDS-PAGE>

SDS-PAGE は Laemmli 法を参考に行った[70]。SDS-PAGE を行うにあたり、下記のバッファーを調製した。

- Lower gel buffer (pH 8.8): 1.5 M Tris、0.4% (w/v) SDS
- Upper gel buffer (pH 6.8): 0.5 M Tris、0.4% (w/v) SDS
- 10×SDS-PAGE-Running buffer: 0.25 M Tris、1.92 M glycine (Wako)、1% (w/v) SDS
- 6×SDS Sample buffer (非還元): 125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、12% (w/v) SDS、30% (w/v) sucrose、0.03% (w/v) bromophenol blue (BPB)

SDS-PAGE ゲルの作製から泳動までの方法を以下に示した。10% Lower gel 溶液 [30% (w/v) アクリルアミド溶液 4.2 ml、lower gel buffer 3.15 ml、MilliQ 5.25 ml] に 120 μ l の 10% (w/v) 過硫酸アンモニウム (Wako)、7.5 μ l の TEMED (Wako) を加え、適量をゲル板に流し込み、イソプロパノールで空気を遮断し重合させた。Lower gel の重合が完了したのを確認した後、上層のイソプロパノールを除去した。Upper gel 溶液 [30% (w/v) アクリルアミド溶液 0.84 ml、upper gel buffer 1.57 ml、MilliQ 3.75ml] に 60 μ l の 10% (w/v) 過硫酸アンモニウム、7.5 μ l の TEMED を加え、Lower gel に重層させ、コームを挿入して重合させた。サンプルに適量の 6×SDS Sample buffer を加え懸濁したのち、95°C で 5 min 煮沸したものを SDS-PAGE に供した。泳動は 1×running buffer をバッファーに用い、サンプルが Upper gel 中は 60 V、Lower gel 中は 200 V の定電圧下で泳動した。

<ウエスタンブロッティング>

SDS-PAGE で分離したタンパク質をゲルから PVDF 膜 Immobilon-P (Millipore) に、wet 法で転写した。転写装置には、Mini trans-blot cell (Bio-Rad) を用い、Transfer buffer [25 mM Tris、192 mM glycine、20%メタノール] 中、100 V 定電圧下で、90 min 転写した。転写後の PVDF 膜を、4% (w/v) スキムミルク (BD) を含む TBS-T [20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.1% Tween-20] に浸し、4°C で一晩または室温で 1 h 振盪した。その後、TBS-T で希釈した 1 次抗体を 1 h、室温で反応させた。TBS-T で洗浄後、2 次抗体である GAM-HRP または DAR-HRP を 1 h、室温で反応させた。PVDF 膜を TBS-T で洗浄後、Immobilon western chemiluminescent HRP substrate (Millipore) を用い、LAS-4000 (GE-Healthcare) で検出した。

<免疫沈降>

免疫沈降で使用するバッファーを調製した。

・ Lysis バッファー: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% TritonX-100、1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF; Sigma-Aldrich)、1 µg/ml leupeptin hemisulfate monohydrate (leupeptin; Wako) または 200 倍希釈 protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)

・ Wash バッファー: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.1% TritonX-100 または 0.1% Tween-20

基本的な免疫沈降の操作は以下の通りに行った。

細胞は PBS (-) で洗浄し、6-well プレートの 1 ウェル分の細胞につき Lysis バッファー 300 µl を添加し、4°C で 1 h 回転攪拌して細胞を可溶化した。13000×g で 4°C、20 min 遠心して不溶物を除去し、得られた上清を細胞溶解液とした。細胞溶解液の一部に 6×SDS-PAGE サンプルバッファーおよび 2-ME を 1/10 量を加え、95°C で 5 min 煮沸したものを Input サンプルとした。残りの細胞溶解液は、抗体が結合したビーズと 4°C で穏やかに一晩回転攪拌し、反応させた。回収した沈降ビーズは Wash バッファーで 3 回洗浄した。その後、2×SDS Sample buffer (非還元) を加え、95°C で 5 min 煮沸し溶出した。還元条件のサンプルは、さらに 2-ME を加えて 95°C で 3 min 煮沸し変性させた。得られた各試料は SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロッティングで検出した。

<フローサイトメトリー>

回収した培養細胞は FACS Buffer に懸濁し、死細胞を染め分けるために propidium iodide (Sigma) を終濃度 0.5 µg/ml で加え、FACS Calibur (Becton Dickson) で蛍光を測定した。解析ソフトウェアには、FlowJo (Tree Star) を用いた。

質量分析を用いたマレクチン相互作用分子の同定～SDS-PAGEによる分離を利用する方法

まず、HEK293-3×FLAG-malectin 発現安定細胞を作製した (結果・考察では HEK293-マレクチン安定発現細胞として記載)。Lipofectamine 2000 を用いたリポフェクション法により、p3×FLAG-CMV9-malectin ベクター (ネオマイシン耐性遺伝子を含む) を HEK293 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入の3日後から D10 培地に 1 mg/ml G418 (Wako) を含んだ培地で2週間の薬剤セレクションを行い、セレクション後の細胞を HEK293-マレクチン発現安定細胞とした。15 cm dish 2 枚で HEK293 細胞および HEK293-マレクチン発現安定細胞をそれぞれ培養し、得られた約 3.0×10^7 cells に対し Lysis バッファー 1.6 ml で可溶化した後、monoclonal anti-FLAG M2 antibody-conjugated agarose beads 150 μ l で免疫沈降した。免疫沈降したビーズは 2×SDS Sample buffer (非還元) を 40 μ l 加え、95°C で 5 min 煮沸し溶出した。溶出したサンプルは、5-20%グラジエントゲル (ATTO) で分離した後、2D-silver stain reagent II (コスモバイオ) を使用し銀染色した。HEK293 細胞由来のサンプルのレーンと比較し、マレクチン発現細胞由来のレーンから特異的に検出されたバンドをカッターで切り抜き、ゲル内消化を行った。

まず、切り抜いた各々のゲル片を Wako の銀染色 MS キット付属の脱染色試薬 A と脱染色試薬 B を 100 μ l ずつ混合した溶液を加え、15 min、室温で脱染色した。MilliQ で2回、50 mM 重炭酸アンモニウムで2回洗浄した後、10 mM DTT (in 50 mM 重炭酸アンモニウム) を加え、56°C で 1 h 遮光条件で振とうし、タンパク質のジスルフィド結合を SH 基に還元した。上清を除いた後、55 mM ヨードアセトアミド (in 50 mM 重炭酸アンモニウム) を加え、室温、1 h 遮光条件で振とうし、SH 基をアルキル化した。続いてゲル片を、50%メタノールと 10% 酢酸の混合溶液で 10 min 振とうする操作を 4 回、50 mM 重炭酸アンモニウムで 5 min の振とうを 1 回、続いてアセトニトリルで 5 min の振とうを 1 回し洗浄した。洗浄したゲル片は遠心エバポレーターで脱水し、完全に

白くなったことを確認した上でトリプシン処理した。トリプシン処理は 20 ng/ μ l trypsin 溶液 (Promega) および非イオン性の界面活性剤である *n*-octyl- β -D-thioglucoside を 0.1% (w/v) を含む 50 mM 重炭酸アンモニウムをゲル片 1 mm²あたり 1 μ l の目安で加え、20 min 氷上で染み込ませた。余分な trypsin 溶液を除いた後、加えた trypsin 溶液と等量の 50 mM 重炭酸アンモニウムを添加し、37°Cで一晩、酵素消化した。ゲル片が入ったマイクロチューブに 50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) を加え、超音波洗浄機に浮かべて 15 min 抽出し、上清を回収した。さらに 75%アセトニトリル、0.1% TFA を加え同様の操作を行い、上清を回収した。混合した両上清を、完全に乾燥させないように注意しながら遠心エバポレーターでアセトニトリルを気化させた。得られたペプチド溶液を脱塩チップ SEP C-TIP (日京テクノス) を使用し脱塩濃縮を行った。操作手順は脱塩チップのマニュアルに従って行い、5 μ l の 80%アセトニトリル、0.1% TFA 溶液でペプチドを溶出した。

ペプチド溶液は約 0.75 μ l ずつ OPTI-TOF 384 well insert (ABSciex) プレートに添加した。 α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (CHCA; Wako) の 50%アセトニトリル、0.1% TFA 飽和溶液を 1/4 希釈したマトリクス溶液を同量添加し風乾させた。また、同じプレート上に東京大学大学院の鈴木實博士から譲与して頂いたキャリブレーション試薬を添加し、同様に処理した。ペプチドサンプルは matrix assisted laser desorption/ ionization -time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) で質量分析した。MALDI TOF/TOF 5800 (ABSciex) にサンプルが添加された 384 well プレートをセットし、reflector positive モードで分析した。まず、キャリブレーション試薬を用いて質量校正を行い、各々のサンプルから MS スペクトルを得た。続いて、調べたいサンプルの MS スペクトルとネガティブコントロールの MS スペクトルを比較し、調べたいサンプルの MS スペクトルから特異的なスペクトルの質量電荷 (m/z) を選択し、MS/MS 解析した。MS/MS 解析から得られたスペクトルデータは、解析ソフトである ProteinPilot (ABSciex) で処理し、

各々のサンプルに含まれるタンパク質を同定した。

質量分析を用いたマレクチン相互作用分子の同定～Nano-LC による分離を利用する方法

1.0×10^7 cells の HEK293 および HEK293-3×FLAG-malectin 安定発現細胞の Lysate に対して 80 μ l の monoclonal anti-FLAG M2 antibody conjugated agarose beads を反応させ免疫沈降した。洗浄した免疫沈降ビーズから抗体に結合した分子を 100 mM Glycin-HCl (pH 2.8) 300 μ l、室温、5 min で溶出し、すぐに 1M Tris-HCl (pH 9.0) 10 μ l を添加し中和した。溶出液は Microcon YM-10 (millipore) に全量添加し、約 10 μ l に濃縮した。濃縮したサンプルに終濃度 10 ng/ μ l の trypsin 溶液および終濃度 50 mM 重炭酸アンモニウムを加え、37°Cにて一晩反応させた。反応溶液は、2% TFA を 1/20 量加えた後、DiNa nano LC/MALDI フラクションシステム (KYA TECH)で分離した。

DiNa nano LC で使用する溶液は以下に示した。

バッファーA: 2%アセトニトリル、0.1% TFA

バッファーB: 70%アセトニトリル、0.1% TFA

バッファーC: 4 mg/ml CHCA (in バッファーB)

装置の流路、スポッターおよびカラムの洗浄、平衡化をマニュアルに従い行った後、免疫沈降物の分離をした。カラムは専用の逆相カラムである HiQ sil C18W-3 (KYA TECH) を用い、以下の条件で溶媒を流した。0-2 min linear (100%A、0%B)、2-43 min linear (97.8%A、2.2%B)、43-48 min linear (50%A、50%B)、48-58 min linear (0%A、100%B)、58-64 min step (0%A、100%B)、64-73 min linear (0%A、100%B) の条件で流速 300 nl/min に設定した。スポッターにて 1400 nl/min バッファーC のマトリクス溶液と混和し OPTI-TOF 384 Well Insert 上の計 119 ウェルにスポットした。スポットされたプレートは MALDI TOF/TOF 5800 の LC-MALDI モードによるバッチ操作により、全てのスポッ

トについて MS および MS/MS スペクトルを得た。MS/MS 解析は S/N (シグナルノイズ比) >10 の条件を満たす m/z を網羅的に分析した。得られたデータは ProteinPilot で解析しタンパク質を同定した。

マレクチンの共免疫沈降実験

共免疫沈降法の解析で使用するプラスミド

①既存のベクター

pcDNA3.1-AT、pcDNA3.1-AT^{NHK}、pcDNA3.1-AT^{NHK-Q3}、p3×FLAG-CMV9-malectin は Chen *et. al.*, *Mol. Biol. Cell*, 2011、pRc/CMV-hCD8 β signal-myc-ribophorin1、pRc/CMV-hCD8 β signal-myc-ribophorin2、pRc/CMV-hCD8 β signal-myc-OST48 は Qin *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, 2012 で使用されているベクターと同じコンストラクトのものを使用した[8,10]。

②マレクチン変異体ベクターの作製

・ A、B、C、D、E および G 変異体の作製

A、B、C、D、E、G 変異体を発現するベクターは KOD-plus Mutagenesis kit (Toyobo) を用いて作製した (図 18-A)。A、B、C および D 変異体は、p3×FLAG-CMV9-malectin をテンプレートに以下の組み合わせのプライマーを用い、94°C 2 min (94°C 10 sec、68°C 8 min)×7 サイクルの条件で PCR した。G 変異体は F 変異体のベクターをテンプレートに同様の条件で PCR した。

A 変異体は、Malectin-TGA-F: 5'- TGATCTAGAGGATCCCGGGTGG -3' および
Malectin-29-290-R: 5'- GCAGAGGCAGAAGAGGGTTGG -3'

B 変異体は、Malectin-TGA-F および

Malectin-29-228-R: 5'- CTCCAATCCCGGATGAGGCTG -3'

C 変異体は、Malectin-TGA-F および

Malectin-29-238-R: 5'- TTCTTCTTCTTCTTCTTCTCCTTCTTCTTTCTTCTC -3'

D 変異体は、Malectin-TGA-F および

Malectin-29-269-R: 5'- GCTGTTGTCCGAGGCATAGG -3'

E 変異体は、Malectin- 238-292-F: 5'-GAATATGATGAAGGGTCTAATCTC -3' および

Malectin-238-292-R: 5'- GAATTCGCGGCCGCAAGCTTG-3'

G 変異体は、Malectin-TGA-F および Malectin-29-290-R (* テンプレートは変異体 F)。

以降の操作は付属の指示書に従い行った。得られた各々のベクターはシーケンス解析で正しい配列であることを確認した。

• B-KDEL および D-KDEL 変異体の作製

B-KDEL および D-KDEL 変異体を発現するベクターは、PCR でマレクチン変異体の遺伝子配列を増幅した後、p3×FLAG-CMV9 ベクターに導入し作製した (図 18-B)。

B-KDEL および D-KDEL 変異体は、p3×FLAG-CMV9-malectin をテンプレートに PrimeSTAR HS DNA polymerase と以下のプライマーを用いて PCR した。

B-KDEL 変異体は、

Malectin-F-EcoR I: 5'- CGCGAATTCACCCGGGCTC-3'

PCR-Malectin-29-228-KDEL-R:

5'- CGCTCTAGATCACAGCTCGTCCTTCTCCAATCCCGGATGAGGCTG-3'

D-KDEL 変異体は、

Malectin-F-EcoR I: 上記記載

PCR-Malectin-29-269-KDEL-R:

5'- CGCTCTAGATCACAGCTCGTCCTTCTGCTGTTGTCCGAGGCATAGGG -3'

(斜体は制限酵素 Xba I の配列、下線部は小胞体滞留シグナル KDEL の配列を示す)

増幅した cDNA 断片はアガロース電気泳動、ゲル抽出で精製した後、制限酵素 EcoR I および Xba I で切断し、同じ制限酵素の組み合わせで切断した p3×FLAG-CMV9 ベクターにライゲーションした。得られたベクターは、シーケンス解析で正しい配列であることを確認した。

- p3×FLAG-CMV9-malectin-CD8 α TM 置換体 (F 変異体)、および-HATM 置換体 (H 変異体) の作製

マレクチンの膜貫通領域 (Transmembrane: TM) をヒト CD8 α の膜貫通領域に置換した変異体および、インフルエンザ H1N1 Puerto Rico のヘマグルチニン (HA) の膜貫通領域に置換した変異体を発現するプラスミドのコンストラクトは以下の通りに作製した (図 18-C)。

p3×FLAG-CMV9-malectin-CD8 α TM 置換体 (F 変異体) の作製

ヒト CD8 α の膜貫通領域は PrimeSTAR HS DNA polymerase と以下のプライマー

CD8 α -tempF: 5'- TCTACATCTGGGCGCCCTTGGcgggacttgtggggctctt -3'

CD8 α -tempR: 5'- GGTGATAACCAGTGACAGGAGaaggaccccacaagtcccgg -3'

(小文字は両プライマーのアニーリング部位を示す)

を用い、(変性 98°C 10 sec、アニーリング 68-1×x°C (x=cycle) 5 sec、伸長 68°C 20 sec)×7 サイクルの反応条件で合成した。次に、得られた反応溶液に以下のプライマー

CD8 α -F-overlap: 5'- caacagcATCTACATCTGGGCGCCCTTGG -3'

CD8 α -R-RL*Xba I:

5'- CTCTAGATCACAACCGGGTGATAACCAGTGACAGGAGAA -3'

(小文字はマレクチンの小胞体内腔領域の配列とアニールする部位、下線はマレクチンの細胞質領域および終止コドン、斜体は制限酵素 Xba I 配列)

を終濃度 0.2 μ M となるように添加し、PrimeSTAR HS DNA polymerase で PCR した。この PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動し、ゲル抽出したものを CD8 α TM for overlap template とした。一方、マレクチンの小胞体内腔領域の cDNA は、マレクチンの全長配列がコードされた pBlueScript II -SK (+)-malectin をテンプレートに、PrimeSTAR HS DNA polymerase と以下のプライマー

Malectin-F-EcoR I: 5'- CGCGAATTCACCCGGGCTC -3'

Malectin-R2-overlap: 5'- gatgtagatGCTGTTGTCCGAGGCATAGG -3'

(小文字は hCD8 α TM の配列とアニールする部位、斜体は制限酵素 EcoR I 配列)

を用い、PCR で増幅した。この PCR 産物をアガロースゲル電気泳動およびゲル抽出し精製したものを malectin for overlap template とした。次に、CD8 α TM for overlap template と malectin for overlap template-1 を overlap PCR で連結、増幅した。まず、両 template と KOD-plus DNA polymerase を用い、94°C 2 min (変性 94°C 30 sec、アニーリング 48°C 30 sec、伸長 68°C 1 min) \times 8 サイクルの反応条件で 2 つの cDNA を連結させた。続いて、得られた反応溶液に、リン酸化した以下のプライマー

Malectin-F-EcoR I: 上記記載

CD8 α -R-for overlap: 5'- GCTCTAGATTCACAACCGGGTG -3'

を終濃度 0.2 μ M となるように添加し、94°C 2 min (変性 94°C 30 sec、アニーリング 57°C 30 sec、伸長 68°C 1 min) \times 27 サイクルの条件で PCR した。得られた PCR 産物は精製後、Sma I cut した pBlueScript II -SK (+) にライゲーションし、大腸菌 DH5 α の形質転換および培養を経てプラスミドを得た。正しい配列であることをシーケンス解析で確かめた後、制限酵素 EcoR I と Xba I でインサートとなる cDNA を切断した。そのインサート断片を同じ制限酵素の組み合わせで切断した p3 \times FLAG-CMV9 ベクターにライゲーションし、目的のプラスミドを得た。

p3 \times FLAG-CMV9-malectin -HATM 置換体 (H 変異体)

HA の膜貫通領域は pBlueScript II -SK (+)-H1N1 (Pueruto Rico)-HA から、以下のプライマーと PrimeSTAR HS DNA polymerase を用い、PCR した。

HATm-F-for overlap: 5'- cggacaacagcATTCTGGCGATCTACTCAACTGTTCG -3'

HATm-R-RL-Xba I: 5'- GCTCTAGATTCACAACCGGGATTGCCCCCAGGGAGACC -3'

(小文字はマレクチンの小胞体内腔領域の配列とアニールする部位、下線はマレクチンの細胞質領域および終止コドン、斜体は制限酵素 Xba I 配列)

精製した PCR 産物を HATM for overlap template とした。一方、マレクチンの小胞体内腔領域の cDNA は pBlueScript II -SK (+)-malectin をテンプレートに PrimeSTAR HS DNA polymerase と以下のプライマーを用い PCR した。

Malectin-F-EcoR I: 上記記載

Malectin-R3-overlap: 5'- cgccagaatGCTGTTGTCCGAGGCATAGG -3'

(小文字は HATM の配列とアニールする部位)

PCR 産物を精製したものを malectin for overlap template-2 とした。次に、HATM for overlap template と malectin for overlap template-2 を overlap PCR で連結・増幅した。以下のリン酸化したプライマーを使い、アニーリング温度 56°C の条件で「p3× FLAG-CMV9-malectin -CD8 α TM 置換体の作製」における overlap PCR の反応条件と同様に行った。

Malectin-F-EcoR I: 上記記載

HATM-R-for overlap: 5'- CGCTCTAGATTCACAACCGGGATTGC -3'

精製した cDNA は、制限酵素 EcoR I と Xba I で切断後、同じ組み合わせで切断した p3×FLAG-CMV9 にライゲーションし、目的のプラスミドを得た。

<マレクチン変異体と ribophrin1 の共免疫沈降実験>

遺伝子導入時に約 6 割程度の密度となるよう前日 6-well プレートに播種した HeLa 細胞または HEK293 細胞に、Lipofectamine 2000 を用いたリポフェクション法で遺伝子導入した。各 p3×FLAG-CMV9-malectin 変異体ベクター 1 µg と、pRc/CMV-hCD8 β signal-myc-ribophorin1 を 1 µg を混合し共導入した。48 h 後に細胞を回収し、monoclonal anti-FLAG M2 antibody conjugated agarose beads で免疫沈降を行った (詳しい方法は「免疫沈降」の項目に記載した)。

<マレクチン変異体と AT^{NHK} の共免疫沈降実験>

p3×FLAG-CMV9 (Mock)、p3×FLAG-CMV9-Mal-WT または p3×FLAG-CMV9-Mal-D-KDEL 1 µg と、pcDNA3.1-AT^{NHK} または pcDNA3.1 (Mock) 1 µg を混合し、リポフェクション法で HeLa 細胞に遺伝子導入を行った。24 h 後に培地を交換した後、さらに 48 h 培養した。細胞培養した培地を一部回収し、1000×g で遠心した後、上清に 6×SDS Sample buffer (非還元) を加え、95°C で 5 min 煮沸し培養上清サンプルとした。共免疫沈降は α-FLAG pAb を Protein A ビーズ (GeneScript) に 4°C で 2 h 反応させたもの、もしくは monoclonal anti-FLAG M2 antibody conjugated agarose beads を用いて行った。

(詳しい方法は「免疫沈降」の項目に記載した)

<Endo-β-N-acetylglucosaminidase H (Endo-H) による反応>

Promega 社の Endo-H 酵素付属のバッファーを用いて反応させた。α-FLAG Ab で免疫沈降したビーズに、×1 に希釈した Endo-H Denature Buffer を 30 µl 加え、95°C で 5 min boil した。室温に戻した後、3.3 µl の 10×Endo-H Reaction Buffer、Endo-H 125 U を加え、37°C で 16 h 反応させた。

蛍光免疫染色

カバーガラス (Matsunami) への細胞接着を良くするため、まずカバーガラスをゼラチンコート処理した。6-well プレート上に置いたカバーガラスに 150 μ l の滅菌 1% (w/v) ゼラチン/PBS (-) を滴下し、室温で 10 min 静置した後、溶媒をアスピレーターで吸引し 20 min 程度室温で乾燥させた。次に、プレート上に HeLa 細胞を 0.3×10^6 cells/well でまき、一晩培養後、Lipofectamine 2000 を用いて各マレクチン変異体ベクターを 1 μ g 遺伝子導入した。約 48 h 後、細胞を剥がさないように注意しながら冷たい PBS (-) で 2 回洗浄し、続いて 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS(-) を添加し 20 min、室温に静置し細胞を固定した。PBS(-) で 3 回洗浄した後、0.1% TritonX-100/PBS(-) を添加し、1 h、室温に静置し細胞の膜浸透化を行った。0.02% TritonX-100/PBS(-) で 3 回洗浄した後、5% (w/v) BSA および 5% goat serum を含む PBS(-) を細胞が接着したカバーガラス上に滴下し、1h、室温で静置し blocking した。Blocking した後、2 μ g/ml の rabbit α -FLAG pAb および 5 μ g/ml の mouse α -CNX Ab (Abcam) の混合液を 1 次抗体として 4°C で一晩反応させた。反応後、カバーガラスを 0.02% TritonX-100/PBS (-) で 3 回洗浄し、続いて 5 μ g/ml Alexa Fluor 568-labeled goat anti-rabbit IgG と 5 μ g/ml Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse IgG を混合した 2 次抗体溶液を 1 h、室温で反応させた。カバーガラスは 0.02% TritonX-100/PBS (-) で 3 回洗浄した後、スライドガラス (Matsunami) 上に滴下した 50 μ M 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む Vectashield mounting media (Vector laboratories) の上にマウントした。水分を綿棒で拭き取った後、マニキュアでカバーガラスを固定した。細胞の蛍光顕微鏡観察は共焦点顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss) で行い、LSM イメージブラウザーソフト (Carl Zeiss) で画像処理した。

結果

共免疫沈降法および質量分析によるマレクチン相互作用分子の探索

マレクチンと恒常的に相互作用することが明らかになっている分子は ribophorin1 のみである[10]。今回、改めてマレクチンと相互作用する分子の探索を行い、ribophorin1 以外の分子を同定することで、より深くマレクチンに関する知見が得られることを期待した。

<SDS-PAGE による分離を用いた解析>

まず、マレクチンと共沈した免疫沈降物を SDS-PAGE で分離し質量分析する方法を試みた。マレクチンを一過性の条件で発現させた Qin らの報告よりも細胞数のスケールを大きくするため[10]、3×FLAG タグを融合したマレクチン安定発現細胞を作製した。細胞全体の数割がマレクチンを発現する一過性条件に比較し、全ての細胞で3×FLAG タグを融合したマレクチンを発現することから、より収率よくマレクチンと共沈する分子が得られることを期待した。また、抗 FLAG 抗体がビーズに共有結合で結合した抗 FLAG 抗体アガロースビーズを免疫沈降に使用し、免疫沈降物への抗体の混入を防いだ。約 3.0×10^7 cells の HEK293-マレクチン安定発現細胞およびネガティブコントロールとしてマレクチンを発現しない HEK293 細胞をそれぞれ 1% TritonX-100 で可溶化し、免疫沈降した。還元条件における SDS-PAGE は抗体由来のバンドが検出に影響する可能性があるため、非還元条件下で免疫沈降物を SDS-PAGE で分離し、銀染色した。マレクチンを発現しない細胞由来の試料のレーンと比較し、マレクチン発現細胞由来の試料のレーンから特異的なバンドが複数検出された (図 13)。各々のバンドを切り抜き、trypsin 等によるゲル内消化をした後、MALDI-TOF-MS で分析したところ、図 13 の①、②のバンドから ribophorin1 (68.5kDa)、③のバンドから ribophorin2 (67.7 kDa)、

④、⑤のバンドから OST48 (50.8 kDa)を同定した (括弧内の数字は予想分子量) (図 14、表 2)。②に加え、①の高分子量から ribophrin1 が検出された理由として、非還元条件で電気泳動したため一部が多量体のまま泳動されたこと、また同じバンドからマレクチンも同定されていることからマレクチンと結合した形で検出された可能性が考えられる。OST48 も④、⑤の 2 カ所から検出されているが、還元条件では⑤のバンドが検出されなかったことから (data not shown)、変性状態の違いによる移動度の差と考えられる。ribophrin1 に加え、新たに検出された ribophrin2、OST48 はいずれも OST 複合体の構成分子であった[71]。

<Nano-LC による分離を用いた解析>

HEK293-マレクチン発現細胞または HEK293 細胞を抗 FLAG 抗体アガロースビーズで免疫沈降し、マレクチンと共沈した産物を限界濾過膜で脱塩・濃縮した後、trypsin 処理し、逆相カラムを使い Nano-LC で分離した。なお、タンパク質の還元、アルキル化の操作は行わなかった。Nano-LC で分離したサンプルは装置内で CHCA 溶液と混和し、直接質量分析用のプレートにインジェクトした。インジェクトした 119 spots 全てについて MALDI-TOF-MS で分析したところ、表 3 に示したタンパク質が同定された (スコアの高い上位 15 の候補を表示)。同定されたタンパク質には、OST 複合体の構成分子として ribophrin1 に加え、N 型糖鎖を付加する活性中心の STT3A が含まれていた (表 3)。また、同様の質量分析の際に混入物として度々検出される、細胞骨格を形成するタンパク質、操作過程で混入したと考えられる核タンパク質、およびネガティブコントロールからも検出された分子を候補から除外したところ、G タンパク質共役型受容体-98、プロトカドヘリン-16、ADP/ATP translocase-3、レチナール脱水素酵素-12 などが同定されたタンパク質に挙げられた。なお、マレクチンを発現しない細胞由来の試料 (ネガティブコントロール) から検出されたタンパク質は、trypsin、不溶性の核タ

ンパク質、または操作過程で混入したと考えられるケラチン等のハウスキーピングタンパク質であった。

以上の免疫沈降法ならびに SDS-PAGE または Nano-LC の分離による質量分析の結果、マレクチンの相互作用分子として OST 複合体の構成分子 ribophrin1、ribophrin2、OST48、STT3A が検出された。この結果から、マレクチンは OST 複合体 (図 16) と結合すると考えた。

OST 複合体と結合不能なマレクチン変異体による解析

<マレクチンと ribophrin1 の結合部位の解析>

マレクチンは ribophrin1 と恒常的に相互作用する (図 13、図 14) [10]。マレクチンが ribophrin1 と結合する部位を調べるため、以下のマレクチンのドメイン欠損変異体および、膜貫通領域変異体のプラスミドのコンストラクトを作製した (図 17、18)。マレクチン-wild type (Mal-WT) の細胞質領域の 2 アミノ酸を除いた A 変異体、可溶性部位であるレクチンドメインのみの領域からなる B 変異体、小胞体滞留シグナルである Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) を付加した B-KDEL 変異体、B 変異体の領域に加えグルタミン酸リッチな配列を含んだ C 変異体、C 変異体の領域に加え天然変性領域 (Natively disordered domain) を含んだ D 変異体、D に KDEL 配列を付加した D-KDEL 変異体、天然変性領域と膜貫通領域および細胞質領域からなる E 変異体、マレクチンの膜貫通領域をヒト CD8 α の膜貫通領域に組換えた F 変異体、F 変異体の細胞質領域を除いた G 変異体、およびトリインフルエンザ H1N1 のヘマグルチニンの膜貫通領域に組換えた H 変異体である。どのコンストラクトも N 末端に 3×FLAG タグ配列をコードしている。HEK293 細胞で、FLAG タグを融合した各マレクチン変異体および、Myc タグを融合した Myc-ribophrin1 を共発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、ウエスタンブロッティングで解析した。いずれのマレクチン変異体も発現することを確認した上で (図 19)、

マレクチンと共沈したタンパク質について抗 Myc 抗体によるウエスタンブロッティングをした。その結果、ribophrin1 と共沈したマレクチンは、変異のない Mal-WT および A、E、F、G、H 変異体で、共沈しなかったのは B、B-KDEL、C、D、D-KDEL 変異体であった (図 19)。膜貫通領域を有するマレクチン変異体は ribophrin1 と共沈し、有していない変異体は共沈しないことが分かった。また、マレクチンの膜貫通領域を HA あるいはヒト CD8 α の膜貫通領域に置換した変異体も共沈することが分かった。これらの結果から、マレクチンと ribophrin1 の結合には膜貫通領域が必要であることが示唆された。

<マレクチン D-KDEL 変異体は OST 複合体と結合不能である>

マレクチンの膜貫通領域および細胞質領域を削除し KDEL 配列を付加した D-KDEL 変異体が、ribophrin1 以外の OST 複合体の構成分子である、ribophrin2、または OST48 と結合するか否か調べた。HeLa 細胞に FLAG タグを融合した Mal-WT または D-KDEL 変異体と、Myc タグを融合した ribophrin2 または OST48 を共発現させ、抗 FLAG 抗体による共免疫沈降法で調べたところ、Mal-WT は ribophrin2 および OST48 と共沈したが、D-KDEL 変異体は両者とも共沈しないことが分かった (図 20)。OST 複合体を構成する分子は 1 回または複数回膜貫通型のタンパク質であり、各々の結合には膜貫通領域が重要であることが知られている[66,71]。以上から、マレクチンの D-KDEL 変異体は OST 複合体と結合不能な変異体であると考えた。

<マレクチン D-KDEL 変異体は小胞体に局在する>

Mal-WT、D 変異体および D-KDEL 変異体の細胞内局在を調べるため、HeLa 細胞にそれぞれ発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。その結果、Mal-WT は先行研究と同様に小胞体に局在したが[9,53]、膜貫通領域を削除した D 変異体は小胞

体に局在しないことが分かった (図 21) (局在の仕方からゴルジ体周辺に局在することが予想された)。一方、D 変異体に小胞体滞留シグナルを付加した D-KDEL 変異体は Mal-WT と同様に小胞体に局在することが分かった。

<マレクチンのミスフォールドモデル糖タンパク質 AT^{NHK} の分泌抑制には、OST 複合体との結合が重要である>

Chen らは、マレクチンがミスフォールドな構造をとる AT^{NHK} を細胞内に留め、AT^{NHK} の分泌抑制に関わることを示した (図 10、図 11) [8]。そこで、マレクチンと OST 複合体との結合が AT^{NHK} の分泌抑制に関係するか否かを調べるため、OST 複合体と結合不能でかつ小胞体に局在するマレクチン D-KDEL 変異体を用いて解析した。細胞内における D-KDEL 変異体と AT^{NHK} の結合を調べるため、Mal-WT または D-KDEL 変異体と AT^{NHK} を HeLa 細胞に共発現させて培養し、培養後に回収した細胞を抗 FLAG 抗体で共免疫沈降した。

まず、Lysate に関するウエスタンブロッティングから発現量を比較したところ、Mock 細胞、Mal-WT 発現細胞、D-KDEL 変異体発現細胞における AT^{NHK} の発現量に差が認められないことが分かった (図 22-A)。先行研究と同様に、AT^{NHK} はジスフィルド結合により 2 量体としても検出され、また N 型糖鎖を 3 本有することからウエスタンブロッティングで 2 量体の予想分子量である 84 kDa よりも高分子量側に検出された [8,63]。次に、マレクチンと共沈したタンパク質を抗 AT 抗体でウエスタンブロッティングした。その結果、Mal-WT と同様に D-KDEL 変異体も AT^{NHK} と共沈したことから (図 22-B)、可溶型である D-KDEL 変異体も AT^{NHK} と相互作用することが分かった。

マレクチンは小胞体内腔で AT^{NHK} の N 型糖鎖の G2M9 糖鎖に結合する [8,9,63]。同様に D-KDEL 変異体も小胞体で AT^{NHK} と結合するか調べるため、endo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo-H) による AT^{NHK} の分子量の変化から明らかにすること

を試みた。Endo-H はハイマンノース型の *N* 型糖鎖の根元部分に存在する GlcNAc-GlcNAc の結合を切断しタンパク質から *N* 型糖鎖を遊離する酵素で、複合型糖鎖は切断しない (図 23-A) [72]。Endo-H 反応性のハイマンノース型糖鎖は主に小胞体に局在することから、Endo-H の切断による分子量の変化で、D-KDEL 変異体と結合した AT^{NHK} が小胞体内腔由来かどうか予想できる。免疫沈降で D-KDEL 変異体と共沈した AT^{NHK} について、Endo-H (図 23-B) で処理し、分子量の変化をウエスタンブロッティングで調べた。その際、反応効率を上げるため Endo-H は免疫沈降物を還元して行った。抗 AT 抗体で検出した結果、D-KDEL 変異体と共沈した AT^{NHK} のバンドは、Mal-WT の結果と同様に、*N* 型糖鎖をもたない AT^{NHK} 変異体 (AT^{NHK-Q3}) と同じ位置にシフトした (図 22-C-レーン 3/6/7)。したがって Mal-WT および D-KDEL 変異体は、小胞体内腔で AT^{NHK} と結合することが示唆された。マレクチンは、268 番目のアスパラギン残基が *N* 型糖鎖修飾のコンセンサス配列 NXS/T の条件を満たすことから (データベース UniProt KB では *N* 型糖鎖修飾ありと記載されている)、Endo-H で切断されることが予想された。しかし、Endo-H で処理し抗 FLAG 抗体で検出した結果、分子量サイズの変化は見られなかった (図 22-C-レーン 1/2/3)。ゆえにマレクチンは *N* 型糖鎖を有していないことが示唆された。OST 複合体が *N* 型糖鎖付加を行うためには、アスパラギン残基の位置が 10-12 残基膜貫通領域から離れている必要がある[73]。マレクチンの 268 番目のアスパラギン残基は膜貫通領域から 2 残基と近傍であることから、*N* 型糖鎖修飾されないものと考えられる。

次に、細胞外に分泌された AT^{NHK} の量を比較するため、細胞の培養上清をウエスタンブロッティングした。先行研究から細胞外へ分泌される AT^{NHK} はほとんどが 2 量体であることが明らかになっている[8,10]。本研究の結果においても (図 22-D)、2 量体の AT^{NHK} がメインで検出された。2 量体のバンドは AT^{NHK} の 3 本の糖鎖が heterogeneity であることからブロードとなっているが、上方が複合体型で下方がハイマンノース型

と考えられる。2量体より高分子量側に検出されたバンド (210 kDa~) は、複数の凝集した AT^{NHK} が検出されたものと考えられる。次に細胞外に分泌された AT^{NHK} の量を比較するため、ウエスタンブロッティングした結果を densitometry 解析した。還元条件と非還元条件を解析した結果、定量性に相違がなかったことから、非還元条件下におけるウエスタンブロッティングの結果 (図 22-D) を解析に用いた。マレクチンを発現しない Mock 細胞における分泌量を 100%として比較したところ、Mal-WT を発現した細胞で分泌量が 33%に減少し先行研究と同様であったが、D-KDEL 変異体を発現した細胞では 96%と変化しないことが分かった (図 22-E)。このことから、Mal-WT は AT^{NHK} の分泌抑制に関わるが、D-KDEL 変異体は関わらないことが示唆された。D-KDEL 変異体は OST 複合体と結合不能なマレクチン変異体であることから、マレクチンによる AT^{NHK} の分泌抑制には、OST 複合体との結合が重要であることが示唆された。

考察

マレクチンは OST 複合体と結合する

これまでマレクチンと恒常的に相互作用する分子として ribophrin1 のみが明らかになっていた[10]。本研究ではマレクチンを安定的に発現する細胞を使用し、かつ免疫沈降法を改善したことにより、ribophrin1 に加え ribophrin2、OST48、STT3A を MALDI-TOF-MS による質量分析から同定した (図 14、図 15、表 2、表 3)。これらはいずれも OST 複合体の構成分子であったことから、マレクチンは OST 複合体と結合していることが示唆された (他の同定された候補についての考察は「マレクチンに関する新たな知見」に記した)。本研究では、マレクチンと共沈したタンパク質を SDS-PAGE または Nano-LC の 2 つの手法で分離しそれぞれ解析した。前者はマレクチンと特異的に共沈したタンパク質を視覚的に捉え選択したため信頼性の高い結果であるが、人為的な選択操作が入っているためマレクチンと相互作用している他の分子を取りこぼしている可能性がある。一方、後者は Nano-LC で分離しプレートにインジェクトした試料について機械的に解析することで、表 3 の黄色で示したように新たなタンパク質も同定された。しかし、遠心操作で除き切れなかった不溶性の核タンパク質や操作過程で混入したと考えられるハウスキーピングタンパク質が多く検出され、また SDS-PAGE を用いた手法で検出された ribophrin2、OST48 は同定されなかった。このように、両手法は一長一短である。なお、ribophrin2、OST48 が同定されなかった理由として考えられることは、使用した限界濾過膜や逆相カラムからタンパク質やペプチドが効率よく溶出されなかったこと、またはシスチンの還元・SH 基のアルキル化の操作をしなかったことにより、両タンパク質の trypsin 消化効率が下がり、質量分析で検出されやすいペプチドの数が減少したことが挙げられる。改善方法としては、限界濾過膜ではなくアセトン沈殿を行うこと、還元・アルキル化操作を行うことが改善方法と考えられる。

また、TritonX-100ではなく、比較的マイルドなDigitoninを可溶化剤に用いること、FLAGタグを融合したマレクチンを発現させると同時にribophorin1やSTT3A等を過剰発現させることで、より多くのOST複合体構成分子を同定できると考える。

OST複合体に関する研究は酵母で広く行われてきた経緯があるが[74]、現在のところ酵母でマレクチン相同性の分子は発見されておらず、NCBIのBLASTによるホモロジー検索においても見つかってない。これが近年までマレクチンが発見されなかった原因の1つであると考えられる。実際には、「マレクチン」というレクチンの存在が報告されるより前の2006年に、Shibataniらがイヌの膵臓から精製・分離したOST複合体のプロテオーム解析から未知のタンパク質KIAA0152として、マレクチンと同一のタンパク質を同定している[75]。本研究およびShibataniらのプロテオーム解析の結果を見ると、両解析ともにSTT3Bは同定されていない。OST複合体は、翻訳と同時にN型糖鎖を転移するSTT3Aを含むOST複合体と、翻訳後に転移するSTT3Bを含むOST複合体の2つに分類されることが知られている[66] (第1章 背景「Oligosaccharyltransferase」に記した)。これらの結果から推定すると、マレクチンはSTT3Aを含むOST複合体と結合しフォールディング途上の新生鎖に対して機能していると考えられた。より明確に調べるため、Blue-Native-PAGEで2種類のOST複合体を分離して検出し、マレクチンが両OST複合体と相互作用するか否か解析を試みたが、OST複合体をうまく検出することができず明らかにすることはできなかった。マレクチンがSTT3Aを含むOST複合体のみと結合するか否か結論を出すには、さらなる解析が必要である。

マレクチンとOST複合体の相互作用は、10種類のマレクチン変異体とribophorin1の結合解析、およびribophorin2、OST48との結合解析から膜貫通領域が必要であることが示唆された (図19、図20)。この解析では、マレクチンの膜貫通領域をヒトCD8 α (変異体F) またはインフルエンザウイルスHAに変換した変異体も作製し調べた (変異体H)。図19が示すように、予想に反していずれの変異体もribophorin1と相互作用した。

さらに、膜貫通領域がヒト CD8 α でかつ細胞質領域を削除した変異体も ribophrin1 と相互作用した。他の膜貫通領域に変換しても相互作用する理由は特定できていないが、詳細に解析を行っていない小胞体内腔領域の天然変性領域 (Natiely disorder) も結合に関与しているのではないかと考えられる。

マレクチンは小胞体に局在するが (図 21)、膜貫通領域を削除すると OST 複合体とも結合不能となり (図 20 (D-KDEL 変異体と同様に D 変異体でも結合不能であることを確認した))、D 変異体のように小胞体に局在できなくなる。タンパク質の小胞体への局在化は、C 末端に KDEL や KKXX などの小胞体局在シグナルをもつこと [76]、膜貫通領域に疎水性残基のクラスターと両端に極性残基をもった配列を有すること [77]、または小胞体に局在化するタンパク質と複合体を形成することより起こると言われている。マレクチンは小胞体局在シグナルをもたず、上記のような膜貫通領域の配列を有さない。したがってマレクチンは、小胞体局在性の 10 種類程の膜タンパク質から構成される OST 複合体 (図 16) と相互作用することで、小胞体に局在化可能となっていることが考えられる。

マレクチンのミスフォールドモデル糖タンパク質 AT^{NHK} の分泌抑制には、OST 複合体との結合が重要である

マレクチンが結合する OST 複合体は、これからフォールディングを受けようとする新生鎖に N 型糖鎖を転移するサブユニットである。一方、マレクチンはミスフォールド糖タンパク質の分解経路への誘導に関与していることが示唆されている [8]。この OST 複合体の機能とは矛盾するような機能に関わるマレクチンが、OST 複合体と一体となって機能しているか調べるため、OST 複合体と結合不能な変異体を用いて解析を試みた。解析には膜貫通領域を他のタンパク質のものに置換した変異体 (変異体 F、G、H) を用いようとしたが、ribophrin1 と免疫沈降で共沈したため (図 19)、機能解析には

マレクチンの膜貫通領域および細胞質領域を削除し C 末端に小胞体シグナルを付加した D-KDEL 変異体を用いた。

図 22-B・C から、可溶型のマレクチンは D-KDEL 変異体も AT^{NHK} と小胞体内腔で結合することが示唆された。D-KDEL 変異体は OST 複合体と結合不能な変異体であることから、マレクチンと OST 複合体の結合がマレクチンとミスフォールド糖タンパク質の結合に必要でないことが示唆された。一方、細胞外に分泌された AT^{NHK} の量を比較すると、WT のマレクチンを発現している細胞では分泌が抑制されたのに対して (図 22-D レーン 5)、OST 複合体と結合不能な D-KDEL 変異体を発現している細胞では分泌が抑制されないことが分かった (図 22-D レーン 6)。このように、マレクチンと OST 複合体との結合は AT^{NHK} との結合には必要でないが、マレクチンのミスフォールド糖タンパク質の分泌抑制の機能には重要であることが示唆された。ミスフォールド糖タンパク質である AT^{NHK} は ERAD を担う機構で分解されるが、過剰に発現させた一部の AT^{NHK} は、分泌経路を通り細胞外へと分泌されることがこれまでに報告されている [8,10,63]。これは、 AT^{NHK} を過剰発現させたことにより、ERAD を担う機構へと誘導するセンサータンパク質の許容量、または ERAD の許容量の限界を超えたことが原因と予想される。Chen らはプロテアソーム阻害剤 MG132 を用いた解析、および ERAD を担う複合体と相互作用する OS-9 と AT^{NHK} についての解析から、マレクチンが分泌抑制した AT^{NHK} が ERAD を担う機構へと誘導されることを示唆した。したがって、OST 複合体と結合するマレクチンに認識された AT^{NHK} は、ERAD を担う機構へと誘導された後、最終的に細胞質でプロテアソームに分解されると考えられる。

マレクチンによるミスフォールド糖タンパク質分泌抑制と ribophorin1

Qin らは ribophorin1 がマレクチンのミスフォールドセンサーとして働き、 AT^{NHK} の分泌抑制に関与していることを HEK293T における共免疫沈降法の解析から示唆した [10]。

ribophrin1 がマレクチンのミスフォールドセンサーとなっていることをより詳しく調べ
るため、本研究では ribophrin1 と結合不能な D-KDEL 変異体を用い共免疫沈降法で解
析した。HeLa 細胞において ribophrin1 を強制発現した細胞としていない細胞、または
内在性 ribophrin1 をノックダウンした細胞としていない細胞で、Mal-WT または
D-KDEL 変異体と共沈する AT^{NHK} の量、および細胞外に分泌される AT^{NHK} の量を比較
した。しかし、この解析から ribophrin1 がマレクチンの分泌抑制に関わることを示すこ
とはできなかった (data not shown)。使用した細胞の違いによる影響や、ribophrin1 をノ
ックダウンすると OST 複合体の構成分子の発現も同時に下がるという報告があること
から[64]、別のアプローチで解析・検討する必要があると考える。また HEK293T で
OST48 を強制発現させると ribophrin1 を強制発現させたときと同様に AT^{NHK} の分泌が
抑制されたことから (data not shown)、「OST 複合体とマレクチンの機能の関係」という
ように、よりマクロな視点からマレクチンによるミスフォールド糖タンパク質の分泌
抑制について研究することが必要であると考え。

今後の研究について

本研究の結果から、OST 複合体上でマレクチンに糖鎖を認識されたミスフォールド
糖タンパク質が分解機構へと誘導されることが示唆された。しかし現在のところ、ミ
スフォールドタンパク質認識の詳しいメカニズムを含め、マレクチンに認識された
AT^{NHK} がどのように ERAD を担う分解機構へと至るかはブラックボックスである。ミ
スフォールド糖タンパク質の分解の誘導に関わる分子の同定を期待し、本研究におい
て 1 mM DTT で ER ストレスを誘導したマレクチン発現細胞について免疫沈降および質
量分析を行ったが、ER ストレス特異的にマレクチンと相互作用するタンパク質は同定
できなかった (data not shown)。もしマレクチンに認識された AT^{NHK} が CNX/CRT サイ
クルに入る場合は、もう一度 EDEMs などにミスフォールド糖タンパク質として選別さ

れる必要があり非効率的である (図 6-⑥)。近年、小胞体 endo-mannosidase が見つかったという報告がなされている[78]。この酵素は、glucosidase および mannosidase 阻害下で G1M9 糖鎖からマンノースをトリミングし M8A 糖鎖を産生する能力が示されており、CNX/CRT から分解機構への誘導に関与すると考えられる。したがって、マレクチンに認識されたミスフォールド糖タンパク質が、CNX/CRT サイクルに入らずに分解機構へと誘導される新たな経路の存在も考えられる。また ER ストレス下において、OST 複合体近傍に局在するトランスロコンを介し AT^{NHK} が細胞質へと排出され、プロテアソームに分解されることが報告されている[79]。ブラックボックスを明らかにする上で、新たな報告や可能性も含めて検討する必要があるかもしれない。

なお、本研究では内在性のマレクチンをノックダウンまたはノックアウトせずに、FLAG タグを融合したマレクチンまたはその変異体を強制発現し解析を行っている。内在性のマレクチンも OST 複合体と相互作用することから、強制発現させたマレクチンのうち OST 複合体と相互作用するマレクチンも限られていることが予想される。内在性のマレクチンをノックダウンし、強制発現させたマレクチンが全て OST 複合体と相互作用可能な条件を検討することで、より顕著な解析結果が得られるかもしれない。

第 2 章 PCA によるマレクチン相互作用分子のスクリーニング

背景

免疫沈降法の問題点

免疫沈降法は生化学的な解析で広く利用されており、比較的信頼性の高い相互作用解析法である。しかし、細胞を界面活性剤で可溶化して行う *in vitro* の手法であり、本来の細胞の環境を壊した上で解析することから、細胞内のオルガネラ内の環境では結合していた 2 つのタンパク質が、可溶化剤の強さや溶液の pH、二価イオン濃度などの条件から解離してしまうケースが考えられる。また、分子間の相互作用が弱い場合、操作過程の洗浄等で結合が解離してしまうことも考えられる。実際、抗体と抗原の結合が安定なのに対し、哺乳類のレクチンと糖鎖を介したリガンド糖タンパク質の結合の K_a は $\sim 10^4 \text{ M}^{-1}$ と弱く、しばしば *in vitro* の実験で解離することが報告されている[52]。

Protein-fragment complementation assay

Protein-fragment complementation assay (PCA) は蛍光タンパク質の蛍光を利用した assay 系である。この assay 系は、2 つに分断したレポータータンパク質の断片を相互作用する 2 つのタンパク質に各々融合すると、タンパク質の相互作用にともない分断されていたレポーターの断片が近接、相補的に結合し蛍光を回復する現象を利用する (図 24) [80]。PCA の最大のメリットは蛍光を用いた検出法のため、生きた細胞内で相互作用を解析できる点である。細胞を可溶化する必要がなく、細胞内のオルガネラの環境を保ったまま相互作用解析が可能である。設計したプラスミドコンストラクトを発現することさえできれば、基本的に細胞の種類は選ばず、酵母 two-hybrid 法のように核内で行う必要もない。また、調べたい分子間の相互作用により、レポーター断片が非可逆的に結合するため一過的な結合も解析可能である。

PCA を利用したスクリーニングの解析はこれまで多く報告されている[81,82,83]。細胞内レクチンに関する PCA は Nyfeler らが最初に報告している。小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送に関わるカーゴレセプターERGIC-53 について PCA を応用した相互作用分子のスクリーニングを行い、糖鎖で結合するリガンド分子として α 1-アンチトリプシンを同定した[59]。また、我々の研究グループも ERGIC-53 に関する相互作用分子の PCA スクリーニングを行い、ERGIC-53 の複数のリガンド候補分子を同定することに成功した[84]。Nyfeler らのグループが一過性の発現系で PCA スクリーニングを行ったのに対し、我々はウイルスベクターを用いた安定発現系を利用した。スクリーニングで蛍光陽性となった細胞をセルソーターで濃縮する操作を加え、またレポータータンパク質に蛍光強度の高い Venus を用いたことで、複数のリガンド分子の同定が可能となった[84]。本研究ではこのスクリーニング系を利用し、マレクチンの相互作用分子の同定を試みた。

研究目的

生きた細胞内での相互作用の解析が可能な PCA を利用し、マレクチンと相互作用する分子をスクリーニングすることで、*in vitro* の解析である免疫沈降を用いた手法では明らかにならなかった新たな知見が得られることを期待した。

材料と方法

基本的な実験操作

操作手順は「第1章 基本的な実験操作」に記載した。

Protein-fragment complementation assay によるマレクチン相互作用分子のスクリーニング

<N-Venus-マレクチン安定発現細胞の作製>

N-Venus 融合マレクチンを発現するレトロウイルスベクターpMXs-hCD8 β signal-N-Venus-malectin-IRES hygro を用い、N-Venus-マレクチン安定発現細胞を作製した。パッケージング細胞である Plat-E を、 7.0×10^5 /well で 6-well プレートにまき、D10 培地 2 ml で一晩培養後、Lipofectamine 2000 を用いて遺伝子導入した。72 h 後に培養上清を回収し、 $1,000 \times g$ で 10 min 遠心した上清をレトロウイルス溶液とした。 1.0×10^5 cells/well の BW5147 細胞を 6-well プレートにまき、R10 培地 2 ml/well で一晩培養後、レトロウイルス溶液 1 ml を加え 48 h 培養した。続いて hygromycin B 500 μ g/ml を含む R10 培地で薬剤耐性細胞のセレクションを開始し、1 週間培養後、1 cell/well で 96-well プレートにて限界希釈した。培養後に得られた各クローンについて、ウエスタンブロッティング法で N-Venus-マレクチンの発現量を調べ、発現量の高いクローンを選択した。

<HepG2-C-Venus ライブラリーの遺伝子導入>

N-Venus-マレクチン安定発現細胞に、Chen らによる報告で使用したのと同じ C-Venus ライブラリーを発現するレトロウイルスベクター、pMXs-C-Venus HepG2-library を遺伝子導入した[84]。

6.0×10^5 cells/well の Plat-E を 6-well プレート 21 well にまき、一晚培養後、Lipofectamine 2000 で計 105 μg のライブラリー用ベクターを遺伝子導入した。72 h 後に培養上清を回収し、 $1,000 \times g$ で 10 min 遠心した上清をレトロウイルスライブラリー溶液とした。 0.96×10^7 cells の N-Venus-マレクチン安定発現細胞を 3.0×10^5 cells/well の密度で 32 wells にまき、R10 培地 2 ml/well で 12 h 培養後、1 well につきレトロウイルスライブラリー溶液 1 ml および 4 mg/ml polybrene を 10 μl 加え、72 h 培養した。その後、ウイルスライブラリーを感染させた細胞は 15 cm dish で R10 培地にて培養し、一部はフリーズソリューション (90% FCS、10% DMSO) に溶解しストックした。また、C-Venus-HepG2-ライブラリーと同様に、GFP を発現する pMXs-IRES-GFP、および C-Venus 融合アルブミンを発現する pMXs-C-Venus-albumin ベクターを用い、N-Venus-マレクチン安定発現細胞 1 well 分にウイルス感染させた。感染効率を調べるため、R10 メディウムに継代して 24 h 後、作製した GFP 発現細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定し、レトロウイルスの感染効率を調べた。フローサイトメトリーのための試料調製は、第 1 章の基本的な実験操作「フローサイトメトリー」に記述した。

<セルソーターによる蛍光陽性細胞の濃縮>

PCA の原理に従い、Venus 陽性となった細胞集団をセルソーターで分取した。 4.8×10^6 cells の HepG2-C-Venus ライブラリーを感染させたマレクチン安定発現細胞を PBS (-) で洗浄後、5% FCS を含む PBS(-) 10 ml に懸濁した。大きな細胞塊を除くため、セルストレーナー付きの 5 ml ラウンドチューブに通した後、セルソーター FACS-Vantage SE (BD) で GFP 陽性細胞を分取した。GFP 発現細胞を使い分取可能なことを確かめた上で、ライブラリー感染細胞のセルソーティングをした。10 ml の細胞溶解液を 3 本のラウンドチューブに分け 3 回に分けて行った。改変 GFP である Venus は GFP とほぼ同じ励起・蛍光波長であることから、フローサイトメトリーの FL1 で蛍光を検出した。オ

ペレーションソフトである Cell Quest (BD) 上で上位~1%にゲートをかけ、20% FCS を含む R10 メディウム 3 ml に各々回収した。回収した細胞は $440 \times g$ で 5 min 遠心して上清を除いた後、100 $\mu\text{g/ml}$ の gentamicin を含む R10、2 ml に懸濁し、6-well プレートで培養した。数日後、細胞を 15 cm dish に拡大継代し、 1.2×10^7 cells の蛍光強度上位 5%を同様の操作で2次ソーティングをした。2次ソーティングで分取した細胞を再び拡大培養し、 3.5×10^6 の細胞の蛍光強度上位 6%を同様の操作で3次ソーティングをした。分取した細胞は培養した後、フローサイトメーターFACS Caliber (BD) で Venus の蛍光強度を測定した。

<蛍光陽性発現細胞集団の限界希釈法によるクローン化>

2次ソーティングおよび3次ソーティング後から、それぞれ4日間程度培養して得られた細胞集団を、各々96-well プレートに限界希釈した。 0.8×10^6 cells/well で各々プレート4枚にまき、R10 メディウムで10日間程度培養した。1コロニー/well として増えてきているウェルのみを選択し、24-well プレート、6-well プレートへと順に拡大培養した。各々のクローン化した細胞は、フローサイトメーターFACS Caliber で Venus の蛍光強度を測定した。

<ゲノムダイレクト PCR>

蛍光陽性細胞のクローンから HepG2-C-Venus ライブラリー由来の遺伝子配列を同定するため、各々の細胞のゲノムを抽出し、ダイレクト PCR をした。まず、クローン化した細胞を各々 $0.6-1.5 \times 10^6$ cells 用意し、FlexiGene DNA kit (Qiagen) を用いてゲノム抽出を行った。方法は添付されている指示書に従った。次に、抽出したゲノム 25 ng または 100 ng をテンプレートに KOD-FX を使い、25 μl スケールで PCR した。PCR は 94°C

2 min、(変性 94°C 30 sec、アニーリング 53°C 30 sec、伸長 68°C 3 min)×35 サイクルの反応条件で行った。プライマーにはリン酸化処理をした以下のプライマーを用いた。

pMXs-F: 5'-GGTGGACCATCCTCTAGACT-3'

VenusC-r3: 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

増幅した PCR 産物はアガロース電気泳動で分離し、各々の DNA 断片をゲル抽出した。

精製した DNA 断片は以下のプライマーを用いてダイレクトシーケンスした。

Forward: pMXs-FX: 5'-CATCCTCTAGACTGCCGG-3'

Reverse: VenusC-rX: 5'-TCCTCGATGTTGTGGCGG-3'

シーケンスで得られた配列は DDBJ または NCBI の BLAST サーチで遺伝子を検索した。各々のクローンの DNA 断片のうち、ライブラリー由来の遺伝子配列が以下の条件①順方向に挿入されている②スタートコドンを含む③ストップコドンを含まない④インフレーム *C-Venus* に連結する、を満たす cDNA 断片を、制限酵素 *Sma* I で切断された pBlueScript II -SK (+) (*Bap* 処理済み) にライゲーションした。

<RNA 抽出および RT-PCR>

ゲノムダイレクト PCR による遺伝子増幅が難しいクローンは、RNA を抽出し RT-PCR から遺伝子配列の同定を試みた。クローン化した細胞、約 3.0×10^5 cells を用意し、FlexiGene RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。方法は添付されている指示書に従った。RT-PCR は、total RNA を逆転写した後、PCR する方法と、One step RT-PCR kit (QIAGEN)を用いる 2 種類の方法で行った。まず前者について説明する。逆転写反応は PrimeScript RT-PCR kit (Takara) および VenusC-rX プライマーを用い、42°C で 15 min、20 μ l スケールで行った。詳しい組成、手順は付属の指示書に従った。続いて、逆転写産物を PrimeSTAR HS DNA polymerase で増幅した。プライマーはリン酸化した pMXs-FX と VenusC-rX を用いた。後者の Onestep RT-PCR は、反応組成

はマニュアルに従い、50°C 30 min (逆転写)、95°C 15 min、(変性 94°C 1 min、アニーリング 53°C 45 sec、伸長 72°C 1 min)×30 サイクル、72°C 10 min の条件で行った。プライマーはリン酸化した pMXs-FX と VenusC-rX を用いた。増幅した PCR 産物は、「ゲノムダイレクト PCR」の項目と同様に、ダイレクトシーケンスをしてライブラリー遺伝子をデータベースで検索した後、発現条件を満たす cDNA を pBlueScript II -SK (+) にライゲーションした。ただし、Onestep RT-PCR に含まれる DNA polymerase は Taq DNA polymerase であるため cDNA フラグメントの両端に T または A 塩基が付加される。本研究では、PCR 産物を PrimeSTAR HS DNA polymerase で増幅した後、pBlueScript II -SK (+) に導入した。

一過性発現条件での PCA

<ライブラリー由来遺伝子の発現ベクターへのサブクローニング>

pBlueScript II -SK (+) に導入された HepG2-C-Venus ライブラリー由来の遺伝子を、発現ベクター pcDNA3.1/hygro(-) にサブクローニングした。Apa I/Not I、Xho I/EcoRV、Kpn I/Xba I または Xho I/Bam HI で制限酵素処理し、同じ組み合わせで制限酵素処理した pcDNA3.1/hygro (-) にライゲーションした。

<マレクチン相互作用分子の全長配列のクローニングと C-Venus-遺伝子全長コンストラクトの作製>

以下の遺伝子のコーディング領域は、ヒトの各組織由来の cDNA library からそれぞれクローニングした。PCR の反応組成、反応条件はメーカーの指示書に従った (アニーリング温度はそれぞれ異なる)

・ *PDI46* (NM_005742.2): Human uterus cDNA library から以下のリン酸化されたプライマーを用い、KOD-plus DNA polymerase、61°C のアニーリング条件で PCR した。

PDIA6-F-cloning: 5'- CTCGGCATGGCTCTCCTGGTGC -3'

PDIA6-R-cloning: 5'- GGCTCTCACAACTCATCTTTCCC -3'

・ *ERp29* (NM_006817.3): Human pancreas cDNA library から以下のリン酸化されたプライマーを用い、KOD-plus DNA polymerase、45°Cのアニーリング条件で PCR した。

ERp29-F-cloning: 5'- CACTATCGCTTACCTACCTC -3'

ERp29-R-cloning: 5'- GACAGCCTTTTTACAGCTCC -3'

・ *Calreticulin* (NM_004303.3)

Human lung cDNA library から以下のリン酸化されたプライマーを用い、KOD-plus neo DNA polymerase、2 step で PCR した。

Calreticulin-F-cloning: 5'- TCCGTACTGCAGAGCCGCTG -3'

Calreticulin-R-cloning: 5'- AGCGCTCAGGCCTCAGTCCAG -3'

・ *Transferrin* (DQ923758.1(一部 Natural variant あり)): Human liver cDNA library から以下のリン酸化されたプライマーを用い、KOD-plus DNA polymerase、46°Cのアニーリング条件で PCR した。

Transferrin-F-cloning: 5'- GCACCCGGAAGATGAGG -3'

Transferrin-R-cloning: 5'- GTGGCAGCCCTACCTCTG -3'

<C-Venus-遺伝子全長のベクターコンストラクトの作製>

クローニングした遺伝子配列を pcDNA3.1-C-Venus ベクターに効率よくライゲーションさせるため、Hpa I/Not I の制限酵素サイトを KOD-plus Mutagenesis kit を用いて改変し、Xho I/Not I または EcoR I (MunI)/Xho I の組み合わせでライゲーションができるようにした。クローニングした遺伝子配列全長は以下のリン酸化されたプライマーを用い、PCR で各制限酵素サイトを付加した。その際、ストップコドンを含まないように留意した。

• FK506BP

FK506BP-F-Xho I: 5'- CCGCTCGAGAGAGACATGAGGCTGAGCTGGTTC -3'

FK506BP (Nostop) -R-Not I: 5'- ATAGTTTAGCGGCCCGCCAGCTCAGTTCGTCGCTC -3'

• PDIA6

PDIA6-F-Xho I: 5'- CCGCTCGAGATGGCTCTCCTGGTGCTCG -3'

PDIA6 (Nostop) -R-Not I: 5'- ATAGTTTAGCGGCCCGCCAACTCATCTTTCCCTAAGTC -3'

• ERp29

F-EcoR I-ERp29 for PCA: 5'- CCGGAATTCGATATGGCTGCCGCTGTGCCCC -3'

R-Xho I-ERp29 for PCA: 5'- CCGCTCGAGCAGCTCCTCTTTCTCGGCCCCC -3'

• calreticulin

F-CRT-EcoR I-for PCA: 5'- CCGGAATTCGCCATGCTGCTATCCGTGCCGC -3'

R-CRT-Xho I-for PCA: 5'- CCGCTCGAGCAGCTCGTCCTTGGCCTGGCC -3'

• Transferrin

F-MunI-Transferrin for PCA: 5'- CCGCAATTGAAGATGAGGCTCGCCGTGG -3'

R-Xho I-Transferrin for PCA: 5'- CCGCTCGAGAGGTCTACGGAAAGTGCAGG -3'

(斜体は制限酵素の配列)

PCR で生成された cDNA は直接、または pBlueScript II -SK (+) に一度導入した後、各制限酵素で切り出し pcDNA3.1-C-Venus にライゲーションした。なお、pcDNA3.1-C-Venus-Mac2BP は Chen らが作製したベクターを使用した[84]。

<一過性発現条件での PCA >

24-well プレートに HeLa 細胞を 0.7×10^5 cells/well、D10 メディウム 0.5 ml/well を加え、pcDNA3.1-N-Venus-malectin 0.4 μ g と pcDNA3.1-C-Venus-各遺伝子ベクター 0.08 μ g

を混合し、1.25 μ l の Lipofctamine 2000 を用いて遺伝子導入した。36 h 培養後細胞を回収し、フローサイトメトリーで蛍光 Venus を測定した。

架橋剤を用いた共免疫沈降法によるマレクチン相互作用の検出

<免疫沈降のためのプラスミドコンストラクト作製>

リン酸化された以下のプライマーを使い PCR した cDNA を制限酵素処理し、Myc 配列がコードされている pcDNA3.1 ベクターにライゲーションした。その際、各遺伝子の N 末端のシグナル配列および開始コドンを含めないように留意した。ただし、CRT は Myc 配列を N 末端に付加した融合タンパク質の発現が確認できなかったため、Myc 配列を C 末に付加するプライマーを用いて PCR し、増幅した cDNA を pcDNA3.1 ベクターの EcoR V サイトに平滑末端でライゲーションした。

• PDIA6

PDIA6-F-Nosignalstart-F+Hpa I: 5'- CGGGTTAACCTGTATTCCTCTAGTGATGATG -3'

PDIA6-R+Not I: 5'- ATAGTTTACGCGCCGCTCACAACTCATCTTTCCTAAG -3'

• ERp29

F-EcoR I-ERp29 for Myc: 5'- GAATTCCTGCACACCAAGGGCGCCCTTC -3'

R-Xho I-ERp29 for Myc: 5'- CTCGAGTTACAGCTCCTCTTTCTCGGCC -3'

• Calreticulin

F-CRT: 5'- GGCCTGGCCGGGGACATCTTCC -3'

R-CRT-Myc-KDEL-TGA: 5'-

TACAGCTCGTCCTTAAGATCTTCTTCACTAATAAGTTTTGTTTCGGCCTGGCCGGGG

ACATCTTCC -3'

<架橋剤を用いた共免疫沈降法>

D10 培地に懸濁した HEK293T 細胞を 7.0×10^5 cells/well で 6-well プレートにまき、p3 ×FLAG-CMV9-malectin および pCAGGS-Myc-各遺伝子を混合した総量 5 μ g のプラスミドベクターを、8 μ l/well の Lipofectamine 2000 を用いて遺伝子導入した。約 36 h 後、6-well プレート上で細胞を剥がさぬように注意しながら PBS (-)+0.5 mM EDTA でリンスした後、架橋剤を含んだ 500 μ l の PBS (-)-0.5 mM EDTA で細胞を回収した。架橋剤 dithiobis succinimidylpropionate (DSP) は 20 mM DSP in DMSO を作製した後、1 mM となるように PBS (-)-0.5 mM EDTA に懸濁した。細胞を含む溶液に添加後、室温で 10 min 反応させた後、終濃度 20 mM となるように Tris-HCl pH 7.5 を加え、氷上で 10 min 静置し反応を停止した。架橋剤 1, 6-bismaleimido-hexane (BMH) は 20 mM BMH in DMSO を作製した後、0.5 mM となるように PBS (-)+0.5 mM EDTA に溶かした。細胞を含む溶液に添加後、室温で 10 min 反応させ、終濃度 10 mM となるように 2-ME を加え、氷上で 20 min 静置し反応を停止した。架橋した細胞は PBS (-) で洗浄した後、Lysis buffer 300 μ l に懸濁し、monoclonal anti-FLAG M2 antibody-conjugated agarose beads で免疫沈降した。以降の免疫沈降の操作方法は、第 1 章 基本的な実験操作「免疫沈降」の項目に記述した。免疫沈降物は、SDS-PAGE で分離した後、 α -Myc Ab または α -FLAG Ab を用いウエスタンブロットティングで解析した。

結果

PCA 法を用いたマレクチン相互作用分子のスクリーニング

図 26 に示した PCA スクリーニングの一連の流れに沿って行った。

<N-Venus-マレクチン安定発現細胞の作製>

血球系の細胞株である BW5147 細胞はリポフェクション法による遺伝子導入効率が悪い。また、エレクトロポレーション法についても試したところ遺伝子導入効率が低かったことから、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した (図 26-①)。

N-Venus-マレクチンを発現するベクターを遺伝子導入した細胞は、hygromycin B で薬剤セクションし、クローン化した。N-Venus-マレクチンの発現量の高いクローンを拡大培養し、次のステップに用いた。図 27 に発現確認をした結果を示す。

<C-Venus ライブラリーの遺伝子導入>

C-Venus-HepG2 ライブラリーを、 0.96×10^7 cells の N-Venus-マレクチン安定発現細胞にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した (図 26-②)。使用した C-Venus-HepG2 ライブラリーを発現するベクターは Chen らによる PCA の報告で使用したのと同じベクターで、 6.3×10^7 cells のヒト肝臓癌細胞株 HepG2 から mRNA を抽出しランダムヘキサマーprimer を用いて逆転写した後、C-Venus がコードされている pMXs ベクターに導入され作製された。約 3.1×10^6 の独立クローンを含み、サイズ分画カラムを利用し 500 bp 以下の cDNA は除去してあり、平均インサート長は約 1050 bp からなる[84]。ライブラリーの遺伝子導入の際、遺伝子の発現率確認のため同じ条件で GFP 発現ベクターを導入した。フローサイトメトリー解析の結果、72% GFP 陽性であったことから、ライブラリー遺伝子も 7 割程度の効率で細胞に遺伝子導入されたもの

と考えられる (図 28) [84]。また、同じ条件で N-Venus-マレクチン安定発現細胞に C-Venus-albumin (ネガティブコントロール) を発現させた。PCA は N-Venus と C-Venus に連結した両タンパク質が相互作用すると蛍光を発する。N型糖鎖を有していない分泌タンパク質のアルブミンはマレクチンと相互作用しない。したがって、スクリーニングの系において蛍光の偽陽性を生じる可能性があるか否かの指標になる。フローサイトメトリー解析の結果、C-Venus-albumin を遺伝子導入した細胞から蛍光が検出されなかったことから (図 28)、PCA のスクリーニング系として問題ないものと判断した。

<セルソーターによる Venus 陽性細胞の濃縮とクローン化>

C-Venus-HepG2 ライブラリーが遺伝子導入された N-Venus-マレクチン安定発現細胞の中で、PCA の原理 (図 24) に従い蛍光 Venus 陽性となった細胞をセルソーターで分取した (図 26-③、④)。1 次ソーティングでは 4.8×10^6 cells の細胞の蛍光強度上位~1% の細胞集団を、2 次ソーティングでは、1 次ソーティング後の細胞を拡大培養した 1.2×10^7 cells について蛍光強度上位 5% を、3 次ソーティングでは 2 次ソーティング後の細胞を拡大培養した 3.5×10^6 cells について蛍光強度上位 6% を分取した (図 29)。2 次ソーティングおよび 3 次ソーティングから得られた細胞集団を各々 96-well プレートに限界希釈し (図 26-⑤)、顕微鏡観察で 1 クローン/well で増えてきたクローンのみを拡大培養した。2 次ソーティング後の 47 クローンと 3 次ソーティング後の 62 クローンについて、フローサイトメトリーで Venus の蛍光強度を調べた (図 26-⑥)。蛍光強度は幾何学的平均蛍光強度 (MFI: mean fluorescence intensity) を求め比較した (図 30)。2 次ソーティング後の細胞集団由来のクローンの平均の MFI が 42.4、3 次ソーティング後の細胞集団由来のクローンの MFI が 121.6 であったことからソーティング操作で蛍光の高いクローンを分取できたことが確認できた。ただし、測定は細胞の成長に合わせ複数回に分けて行っているため、厳密な比較ではなく目安である。

< Venus 陽性細胞にコードされたライブラリー由来の遺伝子の解析 >

蛍光陽性となった細胞に発現するライブラリー由来の遺伝子が、マレクチンと相互作用する候補分子の遺伝子となる。得られたクローンのうち、2次ソーティング後の4クローンおよび、3次ソーティング後の蛍光強度上位の15クローンを含む16クローンについて、各クローンにコードされたライブラリー由来の遺伝子を調べた(図26-⑦)。

C-Venus-HepG2 ライブラリーはレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入をしたため、細胞のゲノムにコードされている。細胞からゲノムを抽出し、ライブラリー由来の遺伝子をPCRで増幅した。この方法で増幅が難しいクローンのライブラリー由来の遺伝子は、細胞からRNAを抽出しRT-PCRで増幅した。得られたcDNAをアガロースゲル電気泳動したところ、サイズの異なる1~7本のバンドとしてそれぞれ検出された(図26-⑧)(図31)。

96-wellプレート中で1クローン/wellのみで増殖してきたもののみを選択したことから、複数種類のクローンが混ざっている可能性は低い。したがって、レトロウイルスを利用する系でC-Venus-HepG2-ライブラリーを細胞に導入した際、1細胞に異なるタンパク質をコードする複数種のC-Venus-ライブラリーのベクターが導入され、ゲノムに組み込まれたことが原因と考える。各々のcDNA断片をゲル抽出し、精製されたcDNAをダイレクトシーケンスしライブラリー遺伝子の配列を調べた。

調べた配列の中から発現条件である以下の項目、①順方向に挿入されている②スタートコドンの配列を含む③ストップコドン以降の配列を含まない④インフレームでC-Venus配列に連結する、を満たすcDNAを選択した(図26-⑨)。

2次ソーティング後から得た4クローンのうち2クローン、3次ソーティング後から得た16クローンのうち14クローンから、上記の条件を満たすcDNAを各1種類ずつ取得した。その結果、#5と#9と#13、#11と#76、#3と#7、#6と#81、は同一タンパク質で同一領域のライブラリー遺伝子配列をコードしていたことから増殖した同じ株を選択したと考えられる。

したがって計 16 クローンから 11 種類の遺伝子がマレクチンと相互作用する可能性のある候補として挙げられた。得られた 11 種類の cDNA は発現ベクターに導入した (図 26-⑩)。

<一過性発現条件の PCA の検討>

PCA 法によるマレクチン相互作用分子のスクリーニングで得られた分子について、一過性発現条件下で PCA をする前に、適した条件で PCA を行うための条件検討をした。我々のグループによる ERGIC-53 の PCA に関する研究から、PCA で C-Venus 側のベクターを N-Venus 側のベクターと同量、または多く細胞に導入すると、実際には相互作用することのない 2 分子でも偽陽性を発することが指摘されていた。そこで、N-Venus-マレクチンと C-Venus-albumin を細胞内に共発現させ、蛍光の偽陽性を生じることなく解析可能な条件を検討した。N-Venus-マレクチンを発現するベクターと C-Venus-albumin を発現するベクターの比を 1:1、2.5:1、5:1、10:1 の条件で HeLa 細胞にリポフェクション法で導入し検討した。遺伝子導入から 36 h 後に細胞から生じる蛍光をフローサイトメトリーで解析した結果、1:1 の条件では蛍光 (偽陽性) を生じることが分かった (図 32)。この結果から、5:1~10:1 の条件で PCA することが適切であると考えられる。

PCA 法によるマレクチン相互作用候補分子の決定～部分配列を用いた PCA の解析

N-Venus-マレクチンを発現するベクターと、発現ベクターに導入した 11 種類の各 C-Venus-ライブラリー遺伝子を使用し、一過性発現条件における PCA で各候補分子が細胞内でマレクチンと相互作用するか調べた。ライブラリーの導入で使用したレトロウイルスの系は、ライブラリー遺伝子がゲノム上にランダムに組み込まれるため、組み込まれた位置により発現量が異なる可能性が高い。また、クローン化した細胞は各々

の細胞の状態により遺伝子の発現量や蛍光量に影響が出ると考えられる。そのため、一過性発現条件で PCA をすることで、発現量を一定にした解析が可能になると考えた。ライブラリー由来の遺伝子は、それぞれ ATG から遺伝子の途中までが翻訳され (表 4-部分配列の長さ)、それより下流は C-Venus 配列が翻訳される。ゆえに、この PCA の解析結果はマレクチンと 11 種類の各候補分子の「部分配列」の相互作用を示すことになる。N-Venus-マレクチンを発現するベクターと C-Venus-ライブラリー遺伝子を発現するベクターを、5:1 のプラスミド量比で HeLa 細胞に遺伝子導入し、36 h 後フローサイトメトリーで解析した。その結果、ネガティブコントロールである C-Venus-albumin の結果と比較し、11 種類の候補分子は全て蛍光陽性となった (図 33)。

FK506BP、PDIA6、ER protein 29 (ERp29)、CRT、cathepsinZ、serotransferrin (Transferrin)、granulin、Mac2-BP、ApolipoproteinE (APOE)、TAP-associated protein (TAPASIN)、integral membrane protein 2C (ITM2C) の 11 種類はマレクチンと相互作用する可能性のある、マレクチン相互作用候補分子として同定された。各候補分子について、コードされていたタンパク質の発現領域や報告されている細胞内局在等の情報を表 4 にまとめた。

FK506BP、PDIA6、ERp29、CRT は小胞体内腔に局在し分子シャペロンとしてはたらく可溶性のタンパク質である。FK506BP はプロリルイソメラーゼ、PDIA6 および ERp29 はジスフィルドイソメラーゼ、CRT はフォールディングを行うレクチンである。

FK506BP、PDIA6、ERp29 は N 型糖鎖を有していないことから、マレクチンのリガンド以外の理由で相互作用する可能性が考えられた[85,86,87]。cathepsinZ、Transferrin、granulin、Mac2-BP、APOE は N 型糖鎖を複数有する糖タンパク質で後ろの 4 つの候補はいずれも分泌糖タンパク質である[88,89,90,91,92]。TAPASIN は小胞体または Golgi 体に局在し、内因性抗原の MHC class I へのペプチドローディングに関わるとされ、細胞内レクチンの CNX と結合することが知られている[68]。ITM2C はゴルジ体または Lysosome に局在するが機能は不明である。

PCA 法によるマレクチン相互作用分子の同定～全長配列を用いた PCA の解析

表 4 の候補分子の中で、小胞体に局在し分子シャペロンとして機能する FK506BP、PDIA6、ERp29、CRT および分泌糖タンパク質である、Transferrin、Mac2-BP について、翻訳領域の全長配列を C-Venus に融合したベクターを作製し、PCA 法でマレクチンとの相互作用を調べた。作製した C-Venus ベクターと N-Venus-マレクチンを発現するベクターを用いて一過性発現条件で、部分配列の PCA の解析と同様の条件で行った。その結果、解析した PDIA6、ERp29、CRT、Transferrin および Mac2BP は、ネガティブコントロールの albumin と比較し蛍光陽性であったことから (図 34)、PCA 法によりこの 5 つのタンパク質はマレクチンと相互作用することが示唆された。ただし、FK506BP については全長の C-Venus コンストラクトを細胞に導入しても発現が見られなかったため、これ以降解析を進めていない。N 型糖鎖を有さない PDIA6、ERp29 を含む分子シャペロン 3 種類と、N 型糖鎖を 3 本もつ Transferrin、および 7 本もつ Mac2BP の分泌糖タンパク質 2 種類の PCA の結果を見ると (図 34)、分子シャペロン 3 種は、分泌糖タンパク質と比較し蛍光陽性率が高く、また平均蛍光強度の比較においても分子シャペロン 3 種は糖タンパク質に比べ高い値を示した。このことから分子シャペロン 3 種は、Transferrin、Mac2BP と異なる様式でマレクチンと相互作用していることが推察された。

マレクチンの糖結合ドメイン変異体を用いた PCA による解析

N 型糖鎖を 3 本有する Transferrin、7 本有する Mac2BP と、分子シャペロン PDIA6、ERp29、CRT について、N-Venus-マレクチンのマレクチン領域の糖認識ドメイン N104 をアラニン置換した変異体を作製し、N 型糖鎖結合能を欠いたマレクチンが各分子との相互作用に与える影響について調べた。まず、細胞における N-Venus-マレクチンと N-Venus-N104A 変異体の発現量に差がないことをウエスタンブロッティング法で確かめ

た (図 35-A)。PCA の解析は遺伝子導入から 44 h 後にフローサイトメトリーで測定し MFI を算出した。解析では差を見やすくするため通常の 36 h よりも 8 h 培養時間を伸ばして行った。N-Venus-N104A 変異体と N-Venus-マレクチンで比較したとき、ネガティブコントロールは +C-Venus-albumin (4.65←4.58) であったのに対し、+C-Venus-Transferrin (12.6←21.5)、+C-Venus-Mac2BP (11.7←18.8) と蛍光が減弱した (図 35-B)。また、N型糖鎖を有さない+C-Venus-PDIA6 (13.9←24.3)、+C-Venus-ERp29 (25.6←49.7) も減弱し、+C-Venus-CRT (22.1←37.7) も減弱した。N-Venus-マレクチンと N-Venus-N104A 変異体はアミノ酸 1 残基の違いであることから、立体構造的な問題から蛍光が減弱したとは考えにくい。どの候補分子も平均蛍光強度が 4 割程減弱したことから、マレクチンと 2 種類の分泌糖タンパク質および 3 種類の分子シャペロンの相互作用に N型糖鎖が関与することが示唆された。

共免疫沈降法によるマレクチンと同定された分子シャペロンの相互作用解析

PCA 法によるスクリーニング、および一過性の PCA における解析から相互作用することが示唆された分子シャペロン PDIA6、ERp29、CRT について、マレクチンと相互作用することを PCA 以外の実験系で調べるため共免疫沈降法による解析を行った。

PCA 法は細胞に発現するタンパク質に約 100 残基または 170 残基のレポーター断片を融合して行う assay 系である。レポーター断片を融合することにより構造が変化し、本来とは異なる相互作用が検出されてしまう可能性も考えられる。共免疫沈降法により、実際にマレクチンがこれらの分子と相互作用していることを確かめられると考えた。

まず、Myc タグ配列を PDIA6、ERp29 の N 末端に、CRT は C 末端に融合し、細胞内で発現することを確認した (図 36-A)。3×FLAG タグを融合した Mal-WT と、Myc タグを融合した PDIA6、ERp29 または CRT を共発現させ、抗 FLAG 抗体で共免疫沈降し相互作用を調べた。また、分子間の結合が弱い場合や一過的な結合の場合、免疫沈降

の操作過程で分子間の結合が外れ検出されない可能性があるため、PDIA6、ERp29 については、分子間の結合を化学的に架橋する架橋剤を用いた条件も合わせて検討した。マレクチンと共沈したタンパク質を抗 Myc 抗体によるウエスタンブロッティングで検出したところ、CRT および PDIA6 は架橋剤なしの条件で検出されることが分かった (図 36-A-レーン 16/22、レーン 14/20)。共沈した PDIA6 はウエスタンブロッティングの非還元条件で、PDIA6 の分子量付近 (48 kDa) 以外に 90-140 kDa 付近にバンドが 3 本現れた (図 36-A-レーン 14)。架橋剤 BMH (図 36-C) で架橋するとバンドは濃くなったが (レーン 17)、還元するとバンドが消失した (レーン 23)。よって、これが PDIA6 同士によるジスルフィド結合により現れたバンドか、PDIA6 以外のタンパク質との相互作用により現れたバンドかどうかは不明である。ERp29 は架橋剤なしの条件で共沈が認められなかったが (レーン 18/24)、リジン残基反応性の架橋剤 DSP (図 36-C) を用い共免沈降法を試みたところ、図 36-B のように ERp29 は還元条件下で予想されるサイズの分子量に検出された (DSP は構造内のジスルフィド結合が還元条件下で消失し (図 36-C)、単量体として検出される)。架橋剤 BMH を用いた解析でマレクチンとの共沈を確認できなかった理由は (図 36-A レーン 18/24)、ERp29 がシステイン残基を 1 残基のみしかもたず、架橋の効率が低かったためだろう。

このように、マレクチンは PDIA6、ERp29、CRT と相互作用することが、共免疫沈降法においても示唆された。

考察

PCA 法を用いたマレクチン相互作用分子のスクリーニング

私は本研究のマレクチン以外に、ERGIC-53 と相同性の高い 2 つの L タイプレクチン VIPL、VIP36 の相互作用分子の PCA 法によるスクリーニングを試みた。作製した N-Venus-VIPL または N-Venus-VIP36 安定発現細胞に、両レクチンが相互作用しない albumin を C-Venus に融合して発現させ、培養後に蛍光を発するか調べた。先行研究の ERGIC-53 と同様に[84]、N-Venus-VIPL に C-Venus-albumin を発現させた細胞は蛍光を発しなかったが、N-Venus-VIP36 においては蛍光を発してしまうことが分かった。Venus を用いた PCA の偽陽性については先行研究で指摘されていたが[93]、このように細胞内レクチンの中にも偽陽性を発する例が確認された。N-Venus-マレクチン安定発現細胞に C-Venus-albumin を発現させ解析したところ、偽陽性を発しなかったことから (図 28)、PCA によるスクリーニングを行うに至った。

本研究で用いた C-Venus ライブラリーは、ヒト肝臓がん由来の HepG2 細胞株である。肝臓では多くの分泌タンパク質が作られ、またマレクチンの発現量も高いことから (EST profile: Hs.744910 - *MLEC*)、スクリーニングに用いるライブラリーとして適切であると考えた。C-Venus-HepG2 ライブラリーは 3.1×10^6 の種類を含むスケールである[84]。スタートコドンの有無やインフレームで C-Venus に接続するなどの条件を満たし、実際に細胞中で発現する遺伝子 (部分配列) の種類はそのスケールよりも落ちる。しかし、細胞で発現するタンパク質の種類は 1.0×10^4 程度であることから、HepG2 細胞に発現しているタンパク質群の様々なドメインをライブラリーはコードしているものと考えた。この C-Venus-HepG2 ライブラリーは 3.1×10^6 の約 2 倍以上の細胞数に導入されたことから、適切な規模で本スクリーニングは行われたものと考えられる。

ライブラリーを安定発現系で細胞に導入することのメリットは、蛍光陽性となった細胞の濃縮が可能となることである。一過性発現系のように培養時間に影響されて蛍光が減弱することはないため、安定した相互作用候補分子の検出が可能になる。しかし、本スクリーニングのようにウイルスベクターを用いてライブラリーを導入した場合、ゲノムに組み込まれた位置により発現量に差がでる。したがって、各々のライブラリー由来のタンパク質の発現量が一定ではないため、スクリーニングで濃縮された各クローンの蛍光強度は、相互作用の強弱をそのまま反映しているわけではない。図 30-B で示した各クローンの蛍光強度は、マレクチンとの相互作用の可能性を大まかに示す指標と捉えるのが適切である。実際に、配列を調べた遺伝子 (図 30-B ピンク色) について発現量が一定となるように一過性発現条件下で行った PCA の解析の結果では (図 33)、図 30 の MFI の強さをそのまま反映していなかった。しかし、スクリーニングで得られた蛍光強度上位 15 株を含む 20 株の陽性クローン (実際に解読できたのは 16 クローン) から同定されたマレクチン相互作用候補分子 11 種類の多くは、小胞体に局在するタンパク質、または複数の N 型糖鎖を有する分泌糖タンパク質であった (表 3)。マレクチンは小胞体に局在し糖タンパク質の品質管理に関わることから、スクリーニングの結果は細胞内におけるマレクチンとの相互作用を反映しているものと考えられ、実際に後の解析で相互作用が確認されている。セルソーティングで蛍光強度の高い細胞集団を濃縮することにより、インフレイムで高発現し、かつマレクチンと相互作用する分子を発現するクローンが取得されたと考える。また、PCA 法は調べたい 2 つの分子の相互作用により、近接した N-Venus と C-Venus が不可逆的に結合して蛍光を発するため、一過的な相互作用も安定して検出可能な手法である。PCA 法をスクリーニングに利用することで、後述する Mac2BP、Transferrin のようにマレクチンとレクチン-リガンドの関係で一過的に相互作用すると考えられる分子も同定された。ただし、本スクリーニング法の場合、I 型膜タンパク質のマレクチン相互作用候補分子は原理的

に同定されないことに注意が必要である (第 2 章-考察「I 型膜タンパク質との相互作用の検出」に詳しく記した)。

PCA 法による相互作用の検討

スクリーニングで使用した C-Venus-HepG2-ライブラリーは各遺伝子の部分配列がコードされており、C-Venus が連結したライブラリー由来のタンパク質部分配列が発現する。マレクチンはミスフォールド糖タンパク質を細胞内に留めることから (図 10) [8,9,10]、図 33 の PCA の結果はマレクチンとミスフォールドとなったタンパク質部分配列の相互作用を示している可能性があった。しかし、PDIA6、ERp29、CRT、Transferrin、Mac2BP は各々アミノ酸全長配列を用いた PCA の解析においても相互作用が認められたことから (図 34)、マレクチンは正しくフォールディングされたこれらの分子と相互作用すると考えられた。

Chen らは、糖結合ドメインをアラニン置換した細胞内レクチンの ERGIC-53 と糖タンパク質 Mac2BP の相互作用を PCA 法で解析し、アラニン置換した ERGIC-53 が置換していない ERGIC-53 と比較し有意に蛍光が減弱することを示し、Mac2BP が糖鎖を介して ERGIC-53 と相互作用することを示した[84]。そこで、本研究でもマレクチンの糖結合ドメイン N104 をアラニン置換した N-Venus-マレクチンを作製し、PCA 法による解析を試みた。共免疫沈降法による解析から FLAG タグを融合した N104A 変異体と共沈する AT^{NHK} の量は、Mal-WT よりも 4 割ほど減少することが分かっている[8]。PCA の解析の結果においても各候補分子に対して N104A 変異体は 4 割ほど平均蛍光強度が減弱し、N 型糖鎖が相互作用に関係することが示唆された (図 35)。Transferrin は 3 本、Mac2BP は 7 本と複数の N 型糖鎖を有することから、マレクチンとリガンドの関係で結合していると考えられた。一方、分子シャペロンの PDIA6、ERp29 は N 型糖鎖を有していない。マレクチンは AT や AT^{NHK}[8,9,10]、また Transferrin、Mac2BP のように新

生鎖の糖鎖を認識してトラップする。マレクチン N104A 変異体ではトラップされる新生鎖が減少することから、マレクチンがトラップした新生鎖に相互作用する PDIA6、ERp29 も減少し、蛍光が減弱したのではないかと考える。この解析から、分泌糖タンパク質がマレクチンにリガンドとして結合すること、マレクチンが分子シャペロン PDIA6 および ERp29 と間接的に相互作用する可能性が示唆された。

分子シャペロン PDIA6、ERp29、CRT はマレクチンと相互作用する

分子シャペロン PDIA6、ERp29、CRT は、アミノ酸全長配列を用いた一過性発現の PCA 法 (図 34)、および共免疫沈降法 (図 36) の、異なる 2 つの手法から相互作用することが示唆された。

CRT は共免疫沈降においてマレクチンと架橋剤を用いずに共沈した。CRT は G1M9 糖鎖を認識し新生鎖のフォールディングを行うレクチンである。同じ G1M9 糖鎖を認識する CNX が細胞内レクチンの EDEM と相互作用し、ミスフォールド糖タンパク質の受け渡しをしているように[46]、G2M9 糖鎖を認識するマレクチンと CRT が相互作用し、新生鎖の受け渡しをスムーズにしていることが考えられる。共免疫沈降法による解析で、マレクチンは内在性の CNX と共沈したことから (data not shown)、CNX についても同様のことが考えられる。

PDIA6 に関する共免疫沈降の解析において、第 1 章 材料と方法「免疫沈降」に記載したような通常の手順で解析したところ、マレクチンとの共沈は認められなかった。そこで、リン酸化タンパク質の解析で行われるように、細胞が付着している培養プレート上に直接可溶化バッファーを添加し、細胞を可溶化するように操作方法を変えたところ共沈が認められた (図 36-A レーン 14)。したがって、PDIA6 とマレクチンとの相互作用は細胞外の環境の変化の影響を受けることが予想された。ERp29 とマレクチンの共免疫沈降は架橋剤 DSP を用いることで相互作用が検出された。このように免疫沈

降法の解析ではPDIA6が架橋剤なしの条件でマレクチンと共沈したのに対して、ERp29は架橋剤を必要とした。PCAの解析におけるマレクチンとPDIA6またはERp29の相互作用の結果を見ると(図34)、平均蛍光強度はPDIA6よりもERp29の方が高く免疫沈降の結果と一致していない。PCA法は2分子間の相互作用の強度が上がれば、基本的に平均蛍光強度および蛍光陽性率も上昇する。しかし、細胞内で一過的に相互作用する2分子もレポーター断片同士の不可逆的結合で蛍光を発すること、また間接的に相互作用する場合は相互作用の様式が複雑になることから、単純に蛍光強度の比較から2分子間の相互作用の強度を測ることは難しいのではないかと考える。

PDIA6、ERp29はともにチオレドキシシン様ドメインを有しており、チオレドキシシンファミリーに属する。PDIA6は活性部位であるCXXCドメインを有し、ジスフィルド結合の導入および異性化を行うことが報告されている(図2-B)(詳細を背景と概要-「分子シャペロン-チオレドキシシンファミリー」に記した)[94,95]。一方、ERp29はCXXCドメインがなく活性をもたない[94]。チログロブリンの分泌過程に関与するという報告や腫瘍形成に関わるという報告がされているがはっきりとした機能は分かっていない[96,97]。共免疫沈降による解析はマレクチンがPDIA6およびERp29と相互作用することを示したPCA法による解析の結果(図34)を支持している。マレクチンとPDIA6およびERp29の相互作用は、マレクチン糖結合ドメイン変異体を用いたPCAの解析よりN型糖鎖依存的であったことから(図35)、これらの分子はマレクチンが糖鎖を保持した新生鎖と相互作用し、新生鎖のフォールディングに関与していることが考えられる。

PCAによるスクリーニングから示唆されたこと

マレクチンは、glucosidase II阻害剤を用いた先行研究で分泌糖タンパク質の α 1-アンチトリプシンとG2M9糖鎖依存的に結合することが示されている[8,10]。今回、細胞内で一過的に相互作用するタンパク質の同定が可能なPCA法によるスクリーニングに

より、新たにマレクチンと相互作用する分泌糖タンパク質 Transferrin、Mac2BP が同定された (図 34) これらはマレクチンの糖認識ドメイン変異体で結合が低下したことからマレクチンとリガンドとして結合していることが示唆された (図 35)。また、N型糖鎖を有さない ERp29、PDIA6 といったチオレドキシシンファミリーの分子シャペロンがマレクチンと相互作用することが PCA および共免疫沈降法による解析から示唆されている。(図 34、図 36)。これらの分子もマレクチン糖認識ドメイン変異体を用いた解析で蛍光が減弱したことから、マレクチンが G2M9 糖鎖をトラップした新生鎖に相互作用し、新生鎖のフォールディングに関わっているものと考えられる (図 35)。また、表 4 のようにマレクチン相互作用分子として分子シャペロンが高い割合で同定されていることから、他にもマレクチンにトラップされた新生鎖と相互作用する分子シャペロンが存在し、フォールディングを促していることが予想される。Galli らの報告によれば、マレクチンが酸化的フォールディングの促進に関わることは今のところ見出せていない[9]。マレクチンがチオレドキシシンファミリー等の分子シャペロンと相互作用し、新生鎖のフォールディング促進に重要な役割を果たすか否か、今後詳しく調べる必要がある。例えば、glucosidase II 阻害剤を用いて G2M9 糖鎖を蓄積させること、分子内ジスフィルド結合の多い Transferrin などの別の基質で解析すること、あるいはパルスーチェイスの解析をより短いタイムスケールで解析することで明らかになるのではないかと考える。

本スクリーニングの問題点と改良点

<クローンにコードされたライブラリー由来の遺伝子の解析効率を上げる>

これまでに PCA の確認も含め蛍光陽性のクローンの解析が完了した数は 16 株である。マレクチンと相互作用する分子の傾向を知るためには、より網羅的に調べる必要がある。シーケンス解析を容易でなくしている原因は、レトロウイルスにより複数

の C-Venus-ライブラリーのベクターが一つの細胞に導入され、1 クローンに複数のライブラリー由来の遺伝子がコードされていることである。図 31 で示されたような複数の cDNA を各々シーケンス解析し、タンパク質を発現するか調べる必要がある。また、mRNA の発現量等の問題やクローニング時の PCR の時間設定から、増幅された cDNA に発現条件を満たす配列を見出せない場合もある。効率よく解析を行うためには、1 クローンに 1 遺伝子で導入されていることが望ましい。C-Venus-ライブラリーの細胞への導入時のレトロウイルスの力価を検討し、1 遺伝子/1 クローンで遺伝子導入される条件を検討することで、スクリーニングの解析効率が上がると考える。またコスト的な問題を有しているが、次世代シーケンスを利用することも 1 つの手である。濃縮した蛍光陽性細胞集団をクローン化せず、まとめてライブラリー由来の遺伝子を RT-PCR で増幅・精製し、次世代シーケンサーでターゲットリシーケンスすることで、より多くのクローンを簡便に調べることが可能になると考える。

< I 型膜タンパク質との相互作用の検出 >

マレクチンは I 型膜タンパク質であり、配列の大部分は小胞体内腔側に発現する。本スクリーニングのように、マレクチンの N 末端に N-Venu 断片を融合し、ライブラリーの C 末端に C-Venus 断片を結合した場合、図 37-A に記載したように I 型膜タンパク質とは原理的に結合しない。免疫沈降法で検出された ribophrin I や OST48 のような I 型膜タンパク質で膜貫通領域を介して結合する場合は、ライブラリーにコードされていた領域がどの部分であろうと検出されない。複数回膜貫通型タンパク質においても、コードされている配列の翻訳終了位置によって原理的に検出されることはない。したがって、OST 複合体のような I 型または複数回膜貫通型のタンパク質で主に構成され、膜貫通領域を介して結合している複合体の場合、今回と同じスクリーニング方法で構成分子が同定される可能性は低い。I 型膜タンパク質の候補をスクリーニング

するためには、マレクチンの C 末端側に N-Venus を融合し PCA を行う方法が容易である (図 37-B)。ただしこの方法の場合、ライブラリーにコードされた I 型膜タンパク質の配列に膜貫通領域が含まれる必要があること、小胞体内腔に可溶型で発現する分子は検出されないことから、スクリーニングの規模は格段に下がることになる。本研究では、スクリーニングの規模を保つため、N-Venu 断片を N 末端に融合したマレクチンを用いてスクリーニングした。より幅広い知見を得るため、N-Venus 断片を C 末端に融合したマレクチンに対する相互作用分子のスクリーニングも、今後行う必要がある。

第 1 章・第 2 章の考察

第 1 章・第 2 章から予想されること

小胞体において OST 複合体により新生鎖に付加された G3M9 糖鎖は、glucosidase I により G2M9 糖鎖へとトリミングされ、その後 glucosidase II により G1M9 糖鎖、さらには M9 糖鎖となる (図 5)。可溶型の glucosidase II は α サブユニットと β サブユニットからなり、 β サブユニットが N 型糖鎖のマンノース構造を認識することで (図 7)、 α サブユニットによる α -1,3 で結合した末端のグルコースの切断を可能にしている [98,99,100]。glucosidase II は末端のグルコースが α -1,2 の様式で結合した G3M9 糖鎖から直接 G1M9 糖鎖または M9 糖鎖にトリミングすることはできない。ゆえに N 型糖鎖が転移された新生鎖は原則 G2M9 糖鎖の状態を経る。解析されていないマレクチンの天然変性領域については不明だが、立体構造からマレクチン自身がミスフォールド糖タンパク質を選別し結合する可能性は低い (図 9)。本研究の PCA 法によるスクリーニングおよびその後の解析により、Mac2BP および Transferrin がマレクチンのリガンドとして結合することが示唆された (図 34、図 35)。また、スクリーニングで多くの分泌糖タンパク質がマレクチン候補分子として同定されたことから (表 3)、マレクチン自身は新生鎖の G2M9 糖鎖にタンパク質の折り畳みの状態に関係なく結合すると考えられる。Galli らの報告のように [9]、マレクチンにトラップされた新生鎖はフォールディングが一部未完成な状態、あるいはフォールディング中間体の状態のものが多く存在すると考えられる。これらに対して、スクリーニングから同定されたような PDIA6、ERp29 といった分子シャペロンが働きかけ (図 34、図 35、図 36)、フォールディングを促していることが考えられる。これには大きく分けて 2 つの理由が予想される。1 つ目はフォールディングを促進させ、ミスフォールドとなったタンパク質を G2M9 糖鎖の段階で排除するため、2 つ目は G2M9 糖鎖の 2 つのグルコースがマレクチンに認識されマス

クされることで可溶型の glucosidase II による早期のトリミングを防ぎ、フォールディングが比較的成熟した状態で新生鎖を CNX/CRT に受け渡すためである。フォールディング状態に問題のない新生鎖はマレクチンから解離した後、glucosidase II によるトリミングを受け、CNX/CRT に認識されフォールディングサイクルに入ると考えられる (図 38-A) [101]。一方、マレクチンに G2M9 糖鎖がトラップされ、分子シャペロンによるフォールディングを受けた新生鎖の中で、分子表面に疎水面を露出するようなミスフォールドな構造をもつものは別の経路を歩む。マレクチン変異体による解析から明らかになったように (図 22-D)、マレクチンと結合する OST 複合体が重要な役割を果たす。ミスフォールド糖タンパク質は、OST 複合体を入り口として ERAD を担う機構へと誘導され、最終的に細胞質のプロテアソームに分解されると考えられる (図 38-B) [8]。このように、マレクチン自身は G2M9 糖鎖を保持することで、新生鎖のフォールディングおよび分解経路への誘導に関わり、糖タンパク質の品質管理に寄与していると考えられる。また、マレクチンおよび AT^{NHK} を強制発現させたときの状況は (図 22)、細胞が ER ストレスを受けた状態と似ている (図 3)。ER ストレスを受けると、小胞体にミスフォールドタンパク質が蓄積し、ER ストレス応答でマレクチンの発現量が上昇する [8]。ER ストレス下におけるマレクチンと OST 複合体による ERAD を担う機構へのミスフォールドタンパク質の誘導は、CNX/CRT によるフォールディングサイクルを経て分解に至る経路 (図 7-⑥) のバックアップ機構として働くことも考えられる。

本研究で明らかにならなかったことを挙げる。Chen らが報告したように、共免疫沈降法においてマレクチンは AT よりもミスフォールドな構造をもつ AT^{NHK} と多く共沈する (図 10)。本研究の免疫沈降法による解析では、マレクチンとミスフォールド糖タンパク質との結合に OST 複合体との結合が必要でないことが示唆され (図 22-B)、その理由を明確にすることはできなかった。また、PCA 法による解析においても明らかに

できていない。可能性の1つではあるが、OST複合体以外のタンパク質や機構が関与していることも考えられる。

マレクチンが OST 複合体に存在する意義について

第1章において、マレクチンはOST複合体と相互作用することが示唆された (図14、表2、表3)。マレクチンがOST複合体と相互作用することの意義は大きく2つ考えられる。1つ目は第1章から示唆されたように (図22)、マレクチンが保持したミスフォールド糖タンパク質の分解経路への誘導に、OST複合体が関わるためである。マレクチンがOST複合体と結合不能な場合、ミスフォールド糖タンパク質はマレクチンに分泌抑制されない (図22-D) [8]。したがって、OST複合体はマレクチンと協同し、ミスフォールド糖タンパク質を分解経路へと誘導していることが考えられる。2つ目は、OST複合体と相互作用することで効率のよい新生鎖の受け渡しを可能にしていることである。「第1章 背景 Oligosaccharyltransferase」に記したように、OST複合体は複合体に含まれる活性中心 STT3 のアイソフォームによって役割が若干異なる。また局在も、STT3A を含む OST 複合体は新生鎖が貫入するトランスロコンと結合するのに対して [102]、STT3B を含む OST 複合体はトランスロコンと結合していない [66]。本研究の解析で、マレクチン相互作用分子として STT3A が同定されていることから (表3)、マレクチンはSTT3Aを含むOST複合体とトランスロコン付近で相互作用している可能性が高い。STT3A を含む OST 複合体はトランスロコン近傍にいて、ジスルフィド結合等によるフォールディングを受ける前の新生鎖から効率よく N-X-T/S 配列をサーチし、G3M9 糖鎖を転移している [103,104]。新生鎖に転移された糖鎖は、膜貫通型の glucosidase I によりグルコースが速やかに切断され G2M9 糖鎖となり [105]、OST 複合体上に局在するマレクチンに認識される (第1・2章)。可溶型の glucosidase II により G1M9 糖鎖となると、トランスロコンと結合した膜貫通型の CNX [106]、または可溶型

の CRT に認識される。このように、*N* 型糖鎖の G3M9 糖鎖から G1M9 糖鎖に至るまでのステップは、新生鎖が貫入するトランスロコン付近でプロセスが進行すると考えられる。これは、PCA 法および共免疫沈降法による解析でマレクチンと CRT の相互作用が示唆されたこと (図 34)、共免疫沈降法においてマレクチンと内在性の CNX が共沈したこと (data not shown) から示唆される。マレクチンはトランスロコン近傍に局在する OST 複合体と結合し、関連するレクチンや加水分解酵素との物理的距離を縮めることで、リボソームで翻訳され伸長してくる新生鎖を効率よく受け渡していると考えられる。

G2M9 糖鎖の役割

合成された *N* 型糖鎖の構造は図 6-A に示したようにグルコース 3 個、マンノース 9 個、GlcNAc2 個から形成される。この 14 糖からなる G3M9 糖鎖が転移され、3 つのグルコースが順々にトリミングされるステップは酵母を含め真核生物で保存されており、重要な意味を持つことが考えられる。G3M9 糖鎖からグルコースが全てトリミングされた M9 糖鎖は、輸送・分解・フォールディングやり直しの運命決定の選別を受けること、また UGGT により M9 糖鎖にグルコースが付加されるとフォールディングのやり直しが実行されることから (図 7)、*N* 型糖鎖中にグルコースを有している状態は新生鎖のフォールディングの指標になることが考えられる。G3M9 糖鎖のグルコースの結合に着目すると、末端のグルコースが α -1,2 の様式で結合し、2 番目・3 番目は α -1,3 の様式で結合している (図 6)。OST 複合体により G3M9 糖鎖が転移されると α -1,2 で結合した末端のグルコースは glucosidase I により迅速にトリミングされる[107]。これは、G3M9 糖鎖が OST 複合体の活性部位に再認識されることを防ぐためと考えられている[105]。G2M9 糖鎖、G1M9 糖鎖は、末端のグルコースの結合様式が同じ α -1,3 結合であり、両者とも glucosidase II にトリミングされる。glucosidase II がタンパク質の状態を見分けて

トリミングしているという報告がないことから[94]、末端が α -1,3で結合したグルコースをN型糖鎖から無作為に1つトリミングしていると予想される。G1M9糖鎖からM9糖鎖になると、先述したように輸送・分解・フォールディングのやり直しの決定を受ける、新生鎖にとって重要な運命決定ステップに至る。もし、仮にOST複合体により中間のグルコースを欠いた「G2M9糖鎖」が新生鎖に転移されることが共通のルールであるとする、すぐにG1M9糖鎖、そしてM9糖鎖となり運命決定ステップに至ることになる。そうするとG3M9糖鎖が転移される場合に比べ、M9糖鎖をもつフォールディング未完成の新生鎖が増大し、やり直しを受けるためにその多くがUGGTによる認識とグルコース付加が必要になるだろう。しかし、こうした未完成の新生鎖も、UGGTにより認識される数は限られる。その結果としてフォールディング未完成のタンパク質が、正しいフォールディングを受けたタンパク質として誤ってゴルジ体へと輸送される確率が上がることが予想される。これはミスフォールドタンパク質が細胞内・外に蓄積されることに繋がり危険である。糖タンパク質合成において、G3M9糖鎖を転移し、G2M9糖鎖の状態を経ることでこのようなリスクを回避していると考えられる。

glucosidase I にトリミングされた直後のG2M9糖鎖はマレクチンと glucosidase II の両方に認識される可能性があるが、マレクチンが糖鎖の転移を行う OST 複合体と結合しているのに対し、glucosidase II が可溶型であること、マレクチンが2つのグルコースに特異的に結合するのに対し、glucosidase II β はマンノース構造に結合することから(図7)、両者の発現量を考慮に入れなければ、マレクチンが glucosidase II よりも先に認識する確率の方が高いだろう。G2M9糖鎖は、マレクチンにトラップされ、フォールディングの促進(第2章)、およびミスフォールドな構造をもつ新生鎖を早期に分解機構へと誘導することで(第1章)、CNX/CRTにおけるフォールディング、そしてその後のM9糖鎖で受ける運命決定ステップの効率化に寄与していると考えられる。

2 種類の方法でマレクチン相互作用分子探索を行ったことについて

免疫沈降法を用いる手法は、界面活性剤による細胞の可溶化および抗体ビーズの洗浄操作を経るため、比較的強いタンパク質間の相互作用が検出され信頼性が高い。しかし、細胞を壊して解析しなければならず、一過的に結合する分子や *in situ* な条件でのみ結合する分子は検出されない可能性がある。PCA を用いる手法は、調べたいタンパク質に蛍光タンパク質断片を融合する必要があること、ライブラリーも部分配列であること (本スクリーニングの場合) などスクリーニングにいくつかのバイアスがかかる短所をもつが、生きた細胞のオルガネラ内で一過的な相互作用を含めて解析が可能、という長所を有している。前者の免疫沈降法を用いる手法からマレクチンが OST 複合体と結合していることが示唆され、OST 複合体との結合がマレクチンのミスフォールド糖タンパク質の分泌抑制に重要であることが分かった。後者の PCA 法からは、リガンドとして一過的にマレクチンと結合すると考えられる分泌糖タンパク質や、前者の免疫沈降法では検出されなかった ERp29、PDIA6、CRT などの分子シャペロンと相互作用することが示唆された。このように、2 種類の網羅的解析を組み合わせることで、両解析法の長所を活かし、新規の相互作用候補分子の同定に至ることができたと考ええる。

マレクチンに関する新たな知見について

Nano-LCによる分離を利用した質量分析の結果から見出された新たな知見

免疫沈降および Nano-LC による分離を用いた質量分析の結果、OST 複合体の構成分子以外のタンパク質もマレクチン相互作用分子として同定された (表 3)。マレクチンが ER 膜内腔側に局在するのに対し (図 21)、表 3 中の G タンパク質共役型受容体-98 (No.9)、プロトカドヘリン-16 (No.10) は細胞膜表面、レチナール脱水素酵素-12 (No.12) は細胞質に発現し、マレクチンと相互作用する意義を見出すのは現在のところ難しい。また、VPS10 domain-containing receptor SorCS3 (No.15) は N 型糖鎖を 8 本もつ膜型の糖タンパク質でマレクチンのリガンドの可能性が高い。ADP/ATP translocase 3 (ANT3) (No.11) はミトコンドリアの内膜に局在する膜タンパク質である。マレクチン相互作用分子の探索で ANT3 が同定された理由について、以下考察した。ANT3 は Voltage-dependent anion channels (VDAC) と相互作用し、ミトコンドリアの TCA サイクルで作られた ATP を細胞質へと放出している[108]。VDAC はミトコンドリア外膜に局在するチャンネルを担うタンパク質で、一部の VDAC は GRP75 というタンパク質を介し、小胞体のミトコンドリアとの接続領域 (MAM) と相互作用している (図 39) [109]。MAM 領域側のチャンネルからミトコンドリアの VDAC へと Ca^{2+} が送り込まれることが報告されているように[109]、MAM 領域では小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} シグナリングや脂質代謝が行われており、複数の小胞体の分子シャペロンが MAM 領域でこれらの重要な役割を担っている (図 39) [110]。MAM 領域は小胞体の滑面小胞体のミトコンドリアと接続する領域で[111]、リボソームが結合する粗面小胞体とは異なる領域である。近年、粗面小胞体ではたらく膜タンパク質の分子シャペロンが S-パルミトイル化と呼ばれる翻訳後修飾を受け、MAM 領域に局在が変化することが報告されてい

る[112]。マレクチンが MAM 領域に移動し ANT3 と間接的に相互作用したという仮説を立て、マレクチンの *S*-パルミトイル化について調べた。

マレクチンの *S*-パルミトイル化

タンパク質に起こる脂質化は、脂肪酸アシル化、プレニル化、GPI 化およびコレステロール化が知られている。脂肪酸アシル化の 1 つ、*S*-パルミトイル化は可逆的な翻訳後修飾であり、細胞内における重要な機能にも関わることから近年注目されている[113]。*S*-パルミトイル化は、16 炭素鎖飽和脂肪酸のパルミチル酸 (図 40-A) がタンパク質のシステイン残基のチオール基にチオエステル結合を介して付加することで起こる。哺乳類で *S*-パルミトイル化を担う酵素は現在のところ Asp-His-His-Cys (DHHC) モチーフをもつ 24 種類の *S*-パルミトイル化酵素 (DHHC ファミリー) が同定されており、脱パルミトイル化酵素は APT1 と PPT1 が報告されている[114]。膜タンパク質の *S*-パルミトイル化は、膜貫通領域近傍の細胞質領域 (またはその膜貫通領域側) のシステインに起こる[115]。細胞内レクチンでは CNX が膜貫通領域と細胞質領域の境界の細胞質側 2 残基のシステインに、*S*-パルミトイル化修飾を受けることが報告されている[112] (図 40-B)。マレクチンが CNX のように *S*-パルミトイル化修飾を受けるかどうか調べるため、アミノ酸配列を確認したところ、膜貫通領域と細胞質領域の境界の膜貫通領域側に 2 つシステイン残基が存在することを見出した (図 40-B)。*S*-パルミトイル化されたタンパク質を網羅的に解析した文献を調べたところ、いずれの解析においてもマレクチン (または未知タンパク質 KIAA0152 として) が高い確率で *S*-パルミトイル化の修飾を受けることが示唆されていた[116,117,118,119]。

S-パルミトイル化されたマレクチンの機能について

膜タンパク質の S-パルミトイル化修飾がその膜タンパク質にもたらす変化として、一般的に構造の安定化、チャンネル等の複合体形成、脂質ラフトなどへの局在制御、ユビキチン等の翻訳後修飾の制御が知られている[115]。S-パルミトイル化された CNX は、ミトコンドリアの MAM 領域に移動し Ca^{2+} シグナリングに関わること[112,120]、あるいはトランスロコン複合体と結合し糖タンパク質の品質管理に関わる事が報告されている[106]。いずれの報告も、CNX が S-パルミトイル化により局在または機能がダイナミックに変化することを示している (図 41)。CNX の報告をもとに S-パルミトイル化がマレクチンにもたらす変化を考えると、OST 複合体と結合可能になること、または MAM 領域に移動し糖タンパク質の品質管理以外の機能をする事が考えられる。前者の OST 複合体との関係について、S-パルミトイル化修飾を受けない (と予想される) マレクチン変異体を用いて解析した。膜貫通領域のシステインに変異を入れた C288A/C290A 変異体を用いた免疫沈降で内在性の ribophorin1 との相互作用を解析したが、Mal-WT と C288A/C290A 変異体の中で ribophorin1 の共沈した量に差が認められず (data not shown)、前者に関与する可能性は見出せていない。後者の MAM 領域への局在化に関しては、先述したようにマレクチン相互作用分子として ANT3 が同定されていること (表 3)、またラットの精巢の MAM 画分から分離・精製した 500 kDa と 290 kDa の複合体よりマレクチンが同定されることが報告されている[121]。S-パルミトイル化されたマレクチンは MAM 領域へ局在し、 Ca^{2+} シグナリング、脂質代謝等に関わっている可能性は高いと考えられる。

可逆的な翻訳後修飾である S-パルミトイル化のスイッチングを受けたマレクチンの機能が、どのように変化するかを詳細に調べることで、細胞内におけるマレクチンのはたらきがより明確になってくるものと考えられる。

総括

本研究の第1章において、免疫沈降および質量分析からマレクチンが OST 複合体と相互作用することが示唆された。また、OST 複合体と結合不能なマレクチン変異体を用いた解析から、マレクチンによるミスフォールド糖タンパク質の分泌抑制に OST 複合体との相互作用が重要であることが示され、OST 複合体を入り口としてミスフォールド糖タンパク質が分解経路へと誘導される可能性が示唆された。また、第2章においてマレクチンと特異的に相互作用する分子を「細胞内」で探索するため、PCA 法を用いたスクリーニング・解析を行い、マレクチンが細胞内で様々な分泌糖タンパク質と糖鎖依存的に結合すること、また分子シャペロンと相互作用することを示唆した。この結果から、マレクチンに糖鎖を保持された新生鎖が分子シャペロンによるフォールディング促進を受けることが予想された。以上の研究から、マレクチンは OST 複合体と相互作用し、新生鎖のフォールディングおよびミスフォールドとなった新生鎖の分解誘導に関与することが考えられた。

今後のマレクチンに関する研究の課題に、本研究で得られた知見が「細胞内在性」のマレクチンでも起こることを調べる必要性を挙げる。内在性のマレクチンに対する生化学的な解析を行う上で、マレクチンを特異的に認識する抗体は必須である。本研究においてマレクチンに対するモノクローナル抗体の作製を試みたが取得には未だ至っていない。抗マレクチンモノクローナル抗体が作製されれば、細胞の通常の状態における、あるいは ER ストレス下におけるマレクチンの役割もよりはっきりとしてくるだろう。また、「マレクチンに関する新たな知見」で述べたように、マレクチンの S-パルミトイル化がどのように機能や局在に影響を及ぼすか解析することで、新たなマレクチンの姿も見えてくるものと考えている。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々から御指導、御鞭撻、または精神面を支える激励を賜りました。全ての方々にここに記載することはできませんが、特に研究面において御世話になった方々を代表して謝辞を述べさせていただきます。

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野 山本一夫 教授に深く感謝致します。

本研究を遂行する上で、適切なお指導、ご助言を頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野 松本直樹 准教授に深く感謝致します。

研究を進める上での心構えや研究に取り組む姿勢を教えてくださいました東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野 小浪悠紀子 非常勤講師に深く感謝致します。

本研究の先行研究をされ、適切な研究のアドバイスを下さりました、医薬デザイン工学分野 OB の秦盛エイ 博士、胡丹 博士、陳陽 博士に深く感謝致します。

研究を進める上で、進め方、実験に関する細やかなアドバイスを下さり、また精神的にも支えて頂きました、東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野 OB の赤塚明宣 博士、亀田洋輔 氏、曾我慶介 博士、そして鈴木詔子 先生に深く感謝致します。

研究を進める上で適切なアドバイスを下さり、また研究以外にも研究室の仕事、行事の開催等いろいろな面でサポートして下さいました、東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野の安保博仁氏、岸本純氏、本田智子氏に深く感謝致します。

本研究において LAS4000 の装置を使わせて頂いた、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻 上田卓也 教授、ならびに研究室の方々に深く感謝致します。

また、研究室の生活を共に過ごした医薬デザイン工学分野に所属する同期の方々、先輩の方々、そして後輩の方々、また他研究室でありながら、研究のご相談、アドバイスを下さった先生、先輩、後輩の方々には、この場を借りて感謝の気持ちを述べさせていただきます。

最後に、これまで生活面で支えて頂いた家族に御礼を申し上げます。

参考文献

- [1] F.E. Cohen, J.W. Kelly, Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases, *Nature* 426 (2003) 905-909.
- [2] D.J. Selkoe, Folding proteins in fatal ways, *Nature* 426 (2003) 900-904.
- [3] U. Schubert, L.C. Anton, J. Gibbs, C.C. Norbury, J.W. Yewdell, J.R. Bennink, Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* 404 (2000) 770-774.
- [4] P.J. Thomas, B.H. Qu, P.L. Pedersen, Defective protein folding as a basis of human disease, *Trends Biochem Sci* 20 (1995) 456-459.
- [5] L. Ellgaard, M. Molinari, A. Helenius, Setting the standards: quality control in the secretory pathway, *Science* 286 (1999) 1882-1888.
- [6] L. Ellgaard, A. Helenius, Quality control in the endoplasmic reticulum, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003) 181-191.
- [7] A. Helenius, M. Aebi, Intracellular functions of N-linked glycans, *Science* 291 (2001) 2364-2369.
- [8] Y. Chen, D. Hu, R. Yabe, H. Tateno, S.Y. Qin, N. Matsumoto, J. Hirabayashi, K. Yamamoto, Role of malectin in Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-dependent quality control of alpha 1-antitrypsin, *Molecular Biology of the Cell* 22 (2011) 3559-3570.
- [9] C. Galli, R. Bernasconi, T. Solda, V. Calanca, M. Molinari, Malectin Participates in a Backup Glycoprotein Quality Control Pathway in the Mammalian ER, *PloS One* 6 (2011) e16304.
- [10] S.Y. Qin, D. Hu, K. Matsumoto, K. Takeda, N. Matsumoto, Y. Yamaguchi, K. Yamamoto, Malectin Forms a Complex with Ribophorin I for Enhanced Association with Misfolded Glycoproteins, *Journal of Biological Chemistry* 287 (2012) 38080-38089.
- [11] C.B. Anfinsen, Principles that govern the folding of protein chains, *Science* 181 (1973) 223-230.
- [12] Levintha.C, Are There Pathways for Protein Folding, *Journal De Chimie Physique Et De Physico-Chimie Biologique* 65 (1968) 44.
- [13] O.V. Galzitskaya, S.O. Garbuzynskiy, D.N. Ivankov, A.V. Finkelstein, Chain length is the main determinant of the folding rate for proteins with three-state folding kinetics, *Proteins* 51 (2003) 162-166.
- [14] N. Koga, S. Takada, Roles of native topology and chain-length scaling in protein folding: a simulation study with a Go-like model, *Journal of Molecular Biology* 313 (2001) 171-180.
- [15] J. Ellis, Proteins as molecular chaperones, *Nature* 328 (1987) 378-379.
- [16] I.G. Haas, M. Wabl, Immunoglobulin heavy chain binding protein, *Nature* 306 (1983) 387-389.
- [17] K. Mori, A. Sant, K. Kohno, K. Normington, M.J. Gething, J.F. Sambrook, A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (Bip) gene by unfolded proteins, *The EMBO Journal* 11 (1992) 2583-2593.

- [18] L.M. Hendershot, The ER function BiP is a master regulator of ER function, *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York* 71 (2004) 289-297.
- [19] A. Bertolotti, Y. Zhang, L.M. Hendershot, H.P. Harding, D. Ron, Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response, *Nature Cell Biology* 2 (2000) 326-332.
- [20] K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, K. Mori, Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress, *Molecular Biology of the Cell* 10 (1999) 3787-3799.
- [21] H. Yoshida, T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, K. Mori, ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response, *Molecular and Cellular Biology* 20 (2000) 6755-6767.
- [22] L. Ellgaard, L.W. Ruddock, The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties, *EMBO Reports* 6 (2005) 28-32.
- [23] L. Meunier, Y.K. Usherwood, K.T. Chung, L.M. Hendershot, A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins, *Molecular Biology of the Cell* 13 (2002) 4456-4469.
- [24] J.D. Oliver, H.L. Roderick, D.H. Llewellyn, S. High, ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin, *Molecular Biology of the Cell* 10 (1999) 2573-2582.
- [25] B. Tsai, C. Rodighiero, W.I. Lencer, T.A. Rapoport, Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin, *Cell* 104 (2001) 937-948.
- [26] A.R. Frand, C.A. Kaiser, Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum, *Molecular Cell* 4 (1999) 469-477.
- [27] E. Zito, E.P. Melo, Y. Yang, A. Wahlander, T.A. Neubert, D. Ron, Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin, *Molecular Cell* 40 (2010) 787-797.
- [28] T.J. Tavender, J.J. Springate, N.J. Bulleid, Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum, *The EMBO Journal* 29 (2010) 4185-4197.
- [29] T. Schallus, K. Feher, U. Sternberg, V. Rybin, C. Muhle-Goll, Analysis of the specific interactions between the lectin domain of malectin and diglucosides, *Glycobiology* 20 (2010) 1010-1020.
- [30] V.D. Nguyen, M.J. Saaranen, A.R. Karala, A.K. Lappi, L. Wang, I.B. Raykhel, H.I. Alanen, K.E. Salo, C.C. Wang, L.W. Ruddock, Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation, *Journal of Molecular Biology* 406 (2011) 503-515.
- [31] C. Schiene-Fischer, Multidomain peptidyl prolyl cis/trans Isomerases, *Biochimica et Biophysica Acta* (2014) not in published.

- [32] A. Varki, Essentials of glycobiology, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2009.
- [33] J. Napetschnig, H. Wu, Molecular basis of NF-kappaB signaling, Annual Review of Biophysics 42 (2013) 443-468.
- [34] N.a.L. Sharon, H. , Lectins. 2nd edn., Kluwer Academic Publishers (2003).
- [35] National Research Council (US) Committee on Assessing the Importance and Impact of Glycomics and Glycosciences. Council Transforming Glycoscience:A Roadmap for the Future (2012).
- [36] F.E. Ware, A. Vassilakos, P.A. Peterson, M.R. Jackson, M.A. Lehrman, D.B. Williams, The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins, The Journal of Biological Chemistry 270 (1995) 4697-4704.
- [37] M. Izumi, Y. Makimura, S. Dedola, A. Seko, A. Kanamori, M. Sakono, Y. Ito, Y. Kajihara, Chemical synthesis of intentionally misfolded homogeneous glycoprotein: a unique approach for the study of glycoprotein quality control, Journal of the American Chemical Society 134 (2012) 7238-7241.
- [38] S. Dedola, M. Izumi, Y. Makimura, A. Seko, A. Kanamori, M. Sakono, Y. Ito, Y. Kajihara, Folding of synthetic homogeneous glycoproteins in the presence of a glycoprotein folding sensor enzyme, Angewandte Chemie 53 (2014) 2883-2887.
- [39] J.J. Caramelo, O.A. Castro, L.G. Alonso, G. De Prat-Gay, A.J. Parodi, UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (2003) 86-91.
- [40] A.J. Parodi, Protein glucosylation and its role in protein folding, Annual Review of Biochemistry 69 (2000) 69-93.
- [41] Y. Kamiya, D. Kamiya, K. Yamamoto, B. Nyfeler, H.P. Hauri, K. Kato, Molecular basis of sugar recognition by the human L-type lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36, The Journal of Biological Chemistry 283 (2008) 1857-1861.
- [42] N. Kawasaki, Y. Ichikawa, I. Matsuo, K. Totani, N. Matsumoto, Y. Ito, K. Yamamoto, The sugar-binding ability of ERGIC-53 is enhanced by its interaction with MCFD2, Blood 111 (2008) 1972-1979.
- [43] T. Satoh, K. Suzuki, T. Yamaguchi, K. Kato, Structural basis for disparate sugar-binding specificities in the homologous cargo receptors ERGIC-53 and VIP36, PloS One 9 (2014) e87963.
- [44] C. Appenzeller-Herzog, B. Nyfeler, P. Burkhard, I. Santamaria, C. Lopez-Otin, H.P. Hauri, Carbohydrate- and conformation-dependent cargo capture for ER-exit, Molecular Biology of the Cell 16 (2005) 1258-1267.

- [45] F. Kappeler, D.R. Klopfenstein, M. Foguet, J.P. Paccaud, H.P. Hauri, The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII, *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 31801-31808.
- [46] Y. Oda, N. Hosokawa, I. Wada, K. Nagata, EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin, *Science* 299 (2003) 1394-1397.
- [47] S. Ninagawa, T. Okada, Y. Sumitomo, Y. Kamiya, K. Kato, S. Horimoto, T. Ishikawa, S. Takeda, T. Sakuma, T. Yamamoto, K. Mori, EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step, *The Journal of Cell Biology* 206 (2014) 347-356.
- [48] J.C. Christianson, T.A. Shaler, R.E. Tyler, R.R. Kopito, OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD, *Nature Cell Biology* 10 (2008) 272-282.
- [49] T. Satoh, Y. Chen, D. Hu, S. Hanashima, K. Yamamoto, Y. Yamaguchi, Structural basis for oligosaccharide recognition of misfolded glycoproteins by OS-9 in ER-associated degradation, *Molecular Cell* 40 (2010) 905-916.
- [50] D. Yamaguchi, D. Hu, N. Matsumoto, K. Yamamoto, Human XTP3-B binds to alpha1-antitrypsin variant null(Hong Kong) via the C-terminal MRH domain in a glycan-dependent manner, *Glycobiology* 20 (2010) 348-355.
- [51] Y. Ye, Y. Shibata, C. Yun, D. Ron, T.A. Rapoport, A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol, *Nature* 429 (2004) 841-847.
- [52] K. Yamamoto, Intracellular lectins are involved in quality control of glycoproteins, *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 90 (2014) 67-82.
- [53] T. Schallus, C. Jaech, K. Feher, A.S. Palma, Y. Liu, J.C. Simpson, M. Mackeen, G. Stier, T.J. Gibson, T. Feizi, T. Pieler, C. Muhle-Goll, Malectin: A novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation, *Molecular Biology of the Cell* 19 (2008) 3404-3414.
- [54] P.G. Gettins, Serpin structure, mechanism, and function, *Chemical Reviews* 102 (2002) 4751-4804.
- [55] J.K. Stoller, L.S. Aboussouan, Alpha1-antitrypsin deficiency, *Lancet* 365 (2005) 2225-2236.
- [56] D.H. Perlmutter, Alpha-1-antitrypsin deficiency: importance of proteasomal and autophagic degradative pathways in disposal of liver disease-associated protein aggregates, *Annual Review of Medicine* 62 (2011) 333-345.
- [57] J.H. Teckman, D.H. Perlmutter, Retention of mutant alpha(1)-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response, *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (2000) G961-974.
- [58] W.J. Ou, P.H. Cameron, D.Y. Thomas, J.J. Bergeron, Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation, *Nature* 364 (1993) 771-776.

- [59] B. Nyfeler, V. Reiterer, M.W. Wendeler, E. Stefan, B. Zhang, S.W. Michnick, H.P. Hauri, Identification of ERGIC-53 as an intracellular transport receptor of alpha1-antitrypsin, *The Journal of Cell Biology* 180 (2008) 705-712.
- [60] N. Hosokawa, I. Wada, K. Hasegawa, T. Yorihuzi, L.O. Tremblay, A. Herscovics, K. Nagata, A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation, *EMBO Reports* 2 (2001) 415-422.
- [61] Y. Liu, P. Choudhury, C.M. Cabral, R.N. Sifers, Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome, *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) 5861-5867.
- [62] R.N. Sifers, S. Brashearsmacatee, V.J. Kidd, H. Muensch, S.L.C. Woo, A Frameshift Mutation Results in a Truncated Alpha-1-Antitrypsin That Is Retained within the Rough Endoplasmic-Reticulum, *Journal of Biological Chemistry* 263 (1988) 7330-7335.
- [63] N. Hosokawa, I. Wada, Y. Natsuka, K. Nagata, EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded alpha1-antitrypsin, *Genes to cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 11 (2006) 465-476.
- [64] S. Pfeffer, J. Dudek, M. Gogala, S. Schorr, J. Linxweiler, S. Lang, T. Becker, R. Beckmann, R. Zimmermann, F. Forster, Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon, *Nature Communications* 5 (2014) 3072.
- [65] D.J. Kelleher, D. Karaoglu, E.C. Mandon, R. Gilmore, Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties, *Molecular cell* 12 (2003) 101-111.
- [66] S. Shrimal, N.A. Cherepanova, R. Gilmore, Cotranslational and posttranslocational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum, *Seminars in Cell & Developmental Biology* (2014).
- [67] H.L. Roderick, J.D. Lechleiter, P. Camacho, Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b, *The Journal of Cell Biology* 149 (2000) 1235-1248.
- [68] P.A. Wearsch, P. Cresswell, The quality control of MHC class I peptide loading, *Current Opinion in Cell Biology* 20 (2008) 624-631.
- [69] S. Morita, T. Kojima, T. Kitamura, Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses, *Gene Therapy* 7 (2000) 1063-1066.
- [70] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [71] E. Mohorko, R. Glockshuber, M. Aebi, Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation, *Journal of Inherited Metabolic Disease* 34 (2011) 869-878.
- [72] F. Maley, R.B. Trimble, A.L. Tarentino, T.H. Plummer, Jr., Characterization of glycoproteins and

- their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases, *Analytical Biochemistry* 180 (1989) 195-204.
- [73] D.J. Kelleher, R. Gilmore, An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase, *Glycobiology* 16 (2006) 47R-62R.
- [74] R. Knauer, L. Lehle, The oligosaccharyltransferase complex from yeast, *Biochimica et Biophysica Acta* 1426 (1999) 259-273.
- [75] T. Shibatani, L.L. David, A.L. McCormack, K. Frueh, W.R. Skach, Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits, *Biochemistry* 44 (2005) 5982-5992.
- [76] M. Stornaiuolo, L.V. Lotti, N. Borgese, M.R. Torrisi, G. Mottola, G. Martire, S. Bonatti, KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex, *Molecular Biology of the Cell* 14 (2003) 889-902.
- [77] M. Sato, K. Sato, A. Nakano, Endoplasmic reticulum localization of Sec12p is achieved by two mechanisms: Rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and Rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain, *The Journal of Cell Biology* 134 (1996) 279-293.
- [78] 平野 真, 久保佳蓮, 伊藤幸成, Spencer J. Williams, 戸谷希一郎 小胞体画分に見出されたエンドマ
ンノシダーゼ活性の解析, *日本糖質学会* B2-06(a) (2014).
- [79] K. Nagasawa, T. Higashi, N. Hosokawa, R.J. Kaufman, K. Nagata, Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation, *EMBO Reports* 8 (2007) 483-489.
- [80] A. Galarneau, M. Primeau, L.E. Trudeau, S.W. Michnick, Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions, *Nature Biotechnology* 20 (2002) 619-622.
- [81] I. Remy, S.W. Michnick, A cDNA library functional screening strategy based on fluorescent protein complementation assays to identify novel components of signaling pathways, *Methods* 32 (2004) 381-388.
- [82] Z. Ding, J. Liang, Y. Lu, Q. Yu, Z. Songyang, S.Y. Lin, G.B. Mills, A retrovirus-based protein complementation assay screen reveals functional AKT1-binding partners, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006) 15014-15019.
- [83] O.H. Lee, H. Kim, Q. He, H.J. Baek, D. Yang, L.Y. Chen, J. Liang, H.K. Chae, A. Safari, D. Liu, Z. Songyang, Genome-wide YFP fluorescence complementation screen identifies new regulators for telomere signaling in human cells, *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 10 (2011) M110 001628.
- [84] Y. Chen, S. Hojo, N. Matsumoto, K. Yamamoto, Regulation of Mac-2BP secretion is mediated by

- its N-glycan binding to ERGIC-53, *Glycobiology* 23 (2013) 904-916.
- [85] Y.J. Jin, M.W. Albers, W.S. Lane, B.E. Bierer, S.L. Schreiber, S.J. Burakoff, Molecular cloning of a membrane-associated human FK506- and rapamycin-binding protein, FKBP-13, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (1991) 6677-6681.
- [86] M. Kikuchi, E. Doi, I. Tsujimoto, T. Horibe, Y. Tsujimoto, Functional analysis of human P5, a protein disulfide isomerase homologue, *Journal of biochemistry* 132 (2002) 451-455.
- [87] D.M. Ferrari, P. Nguyen Van, H.D. Kratzin, H.D. Soling, ERp28, a human endoplasmic-reticulum-luminal protein, is a member of the protein disulfide isomerase family but lacks a CXXC thioredoxin-box motif, *European Journal of Biochemistry / FEBS* 255 (1998) 570-579.
- [88] I. Santamaria, G. Velasco, A.M. Pendas, A. Fueyo, C. Lopez-Otin, Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location, *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 16816-16823.
- [89] R.R. Crichton, M. Charletoaux-Wauters, Iron transport and storage, *European Journal of Biochemistry / FEBS* 164 (1987) 485-506.
- [90] A. Bateman, H.P. Bennett, Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors, *The Journal of Endocrinology* 158 (1998) 145-151.
- [91] S.A. Muller, T. Sasaki, P. Bork, B. Wolpensinger, T. Schulthess, R. Timpl, A. Engel, J. Engel, Domain organization of Mac-2 binding protein and its oligomerization to linear and ring-like structures, *Journal of Molecular Biology* 291 (1999) 801-813.
- [92] A.H. Smelt, F. de Beer, Apolipoprotein E and familial dysbetalipoproteinemia: clinical, biochemical, and genetic aspects, *Seminars in Vascular Medicine* 4 (2004) 249-257.
- [93] Y. Kodama, C.D. Hu, An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio, *BioTechniques* 49 (2010) 793-805.
- [94] P. Maattanen, K. Gehring, J.J. Bergeron, D.Y. Thomas, Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (2010) 500-511.
- [95] O.B. Oka, N.J. Bulleid, Forming disulfides in the endoplasmic reticulum, *Biochimica et biophysica acta* 1833 (2013) 2425-2429.
- [96] D. Gao, I.F. Bambang, T.C. Putti, Y.K. Lee, D.R. Richardson, D. Zhang, ERp29 induces breast cancer cell growth arrest and survival through modulation of activation of p38 and upregulation of ER stress protein p58IPK, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92 (2012) 200-213.
- [97] M. Baryshev, E. Sargsyan, S. Mkrтчian, ERp29 is an essential endoplasmic reticulum factor regulating secretion of thyroglobulin, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340 (2006) 617-624.

- [98] K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, Y. Ito, Substrate specificity analysis of endoplasmic reticulum glucosidase II using synthetic high mannose-type glycans, *The Journal of Biological Chemistry* 281 (2006) 31502-31508.
- [99] D. Hu, Y. Kamiya, K. Totani, D. Kamiya, N. Kawasaki, D. Yamaguchi, I. Matsuo, N. Matsumoto, Y. Ito, K. Kato, K. Yamamoto, Sugar-binding activity of the MRH domain in the ER alpha-glucosidase II beta subunit is important for efficient glucose trimming, *Glycobiology* 19 (2009) 1127-1135.
- [100] E.S. Trombetta, K.G. Fleming, A. Helenius, Quaternary and domain structure of glycoprotein processing glucosidase II, *Biochemistry* 40 (2001) 10717-10722.
- [101] M. Molinari, A. Helenius, Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells, *Nature* 402 (1999) 90-93.
- [102] C. Ruiz-Canada, D.J. Kelleher, R. Gilmore, Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms, *Cell* 136 (2009) 272-283.
- [103] N.A. Cherepanova, S. Shrimal, R. Gilmore, Oxidoreductase activity is necessary for N-glycosylation of cysteine-proximal acceptor sites in glycoproteins, *The Journal of Cell Biology* 206 (2014) 525-539.
- [104] H.H. Freeze, M. Aebi, Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation, *Current Opinion in Structural Biology* 15 (2005) 490-498.
- [105] A. Helenius, M. Aebi, Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum, *Annual Review of Biochemistry* 73 (2004) 1019-1049.
- [106] A.K. Lakkaraju, L. Abrami, T. Lemmin, S. Blaskovic, B. Kunz, A. Kihara, M. Dal Peraro, F.G. van der Goot, Palmitoylated calnexin is a key component of the ribosome-translocon complex, *The EMBO Journal* 31 (2012) 1823-1835.
- [107] A. Tannous, G.B. Pisoni, D.N. Hebert, M. Molinari, N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER, *Seminars in Cell & Developmental Biology* (2014) S1084-9521
- [108] M.Y. Vyssokikh, D. Brdiczka, The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis, *Acta Biochimica Polonica* 50 (2003) 389-404.
- [109] G. Szabadkai, K. Bianchi, P. Varnai, D. De Stefani, M.R. Wieckowski, D. Cavagna, A.I. Nagy, T. Balla, R. Rizzuto, Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca^{2+} channels, *The Journal of Cell Biology* 175 (2006) 901-911.
- [110] T. Hayashi, R. Rizzuto, G. Hajnoczky, T.P. Su, MAM: more than just a housekeeper, *Trends in Cell Biology* 19 (2009) 81-88.
- [111] D.J. Morre, W.D. Merritt, C.A. Lembi, Connections between mitochondria and endoplasmic reticulum in rat liver and onion stem, *Protoplasma* 73 (1971) 43-49.
- [112] E.M. Lynes, M. Bui, M.C. Yap, M.D. Benson, B. Schneider, L. Ellgaard, L.G. Berthiaume, T.

- Simmen, Palmitoylated TMX and calnexin target to the mitochondria-associated membrane, *The EMBO Journal* 31 (2012) 457-470.
- [113] M.J. Nadolski, M.E. Linder, Protein lipidation, *The FEBS Journal* 274 (2007) 5202-5210.
- [114] J. Korycka, A. Lach, E. Heger, D.M. Boguslawska, M. Wolny, M. Toporkiewicz, K. Augoff, J. Korzeniewski, A.F. Sikorski, Human DHHC proteins: a spotlight on the hidden player of palmitoylation, *European Journal of Cell Biology* 91 (2012) 107-117.
- [115] S. Blaskovic, M. Blanc, F.G. van der Goot, What does S-palmitoylation do to membrane proteins?, *The FEBS Journal* 280 (2013) 2766-2774.
- [116] J.S. Yount, B. Moltedo, Y.Y. Yang, G. Charron, T.M. Moran, C.B. Lopez, H.C. Hang, Palmitoylome profiling reveals S-palmitoylation-dependent antiviral activity of IFITM3, *Nature Chemical Biology* 6 (2010) 610-614.
- [117] B.A. Merrick, S. Dhungana, J.G. Williams, J.J. Aloor, S. Peddada, K.B. Tomer, M.B. Fessler, Proteomic profiling of S-acylated macrophage proteins identifies a role for palmitoylation in mitochondrial targeting of phospholipid scramblase 3, *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 10 (2011) M110 006007.
- [118] W. Yang, D. Di Vizio, M. Kirchner, H. Steen, M.R. Freeman, Proteome scale characterization of human S-acylated proteins in lipid raft-enriched and non-raft membranes, *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 9 (2010) 54-70.
- [119] B.R. Martin, B.F. Cravatt, Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells, *Nature Methods* 6 (2009) 135-138.
- [120] E.M. Lynes, A. Raturi, M. Shenkman, C. Ortiz Sandoval, M.C. Yap, J. Wu, A. Janowicz, N. Myhill, M.D. Benson, R.E. Campbell, L.G. Berthiaume, G.Z. Lederkremer, T. Simmen, Palmitoylation is the switch that assigns calnexin to quality control or ER Ca²⁺ signaling, *Journal of Cell Science* 126 (2013) 3893-3903.
- [121] M. Prasad, J. Kaur, K.J. Pawlak, M. Bose, R.M. Whittal, H.S. Bose, Mitochondria associated ER-Membrane (MAM) regulates steroidogenic activity via StAR-VDAC2 interaction, *Journal of Biological Chemistry* (2014) not in published.

【発表論文】

- K. Takeda, S. Qin, N. Matsumoto, K. Yamamoto.: Association of malectin with ribophorin I is crucial for attenuation of misfolded glycoprotein secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 454, (2014) 436-440.
- S.Y. Qin, D. Hu, K. Matsumoto, K. Takeda, N. Matsumoto, Y. Yamaguchi, K. Yamamoto, Malectin forms a complex with ribophorin I for enhanced association with misfolded glycoproteins, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 38080-38089.