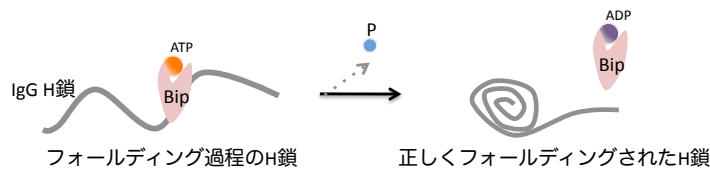
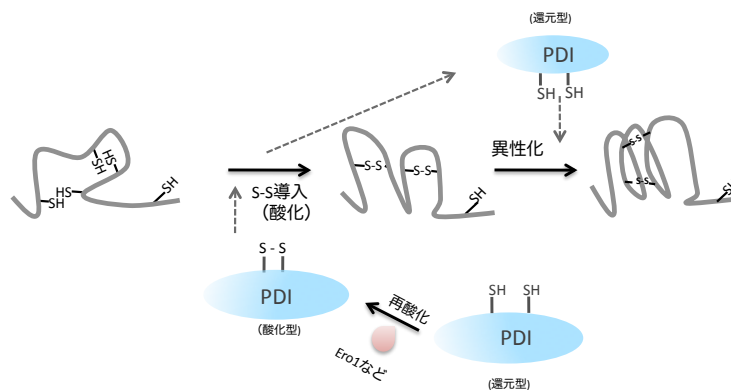


図1 タンパク質のフォールディング

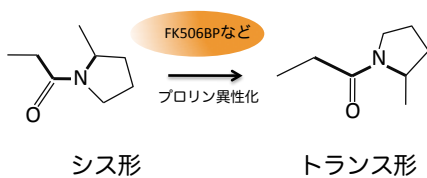
(A) 100 AAよりもサイズが小さく構造も単純なタンパク質は中間体を介さず、極めて迅速にフォールディングが行われる。(B) しかし、ほとんどのタンパク質は変成状態からネイティブな状態の遷移過程で、比較的安定的な構造のフォールディング中間体を経ることで正しく折り畳まれる。しかし、フォールディングの速度は中間体を経ることで減少する。(C) 巨大なタンパク質ほどフォールディングは複雑になり、誤ったフォールディングにより凝集する確率は上がる。分子シャペロンの補助がなければ正しい構造をとることは難しい。



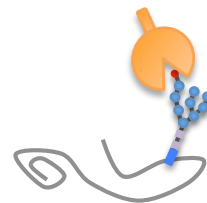
(A) Bip



(B) チオレドキシシンファミリー



(C) プロリルイソメラーゼ



(D) 細胞内レクチン

図2 小胞体における分子シャペロンのはたらき

(A) ATPが結合したBipは新生鎖の疎水性部分に結合し、誤ったフォールディングを防ぐ。Bipに結合したATPがADPへと変換されると新生鎖から解離する。(B) チオレドキシシンファミリーのPDIの例。酸化型PDIは新生鎖にジスフィド結合を導入する。導入により、還元型となったPDIはジスフィド結合の異性化に寄与するか、Ero1などにより再酸化を受ける。(C) プロリルイソメラーゼ。新生鎖のプロリンの構造をシス形からトランス形へ異性化する。(D) N型糖鎖と細胞内レクチン。詳細は図7へ。

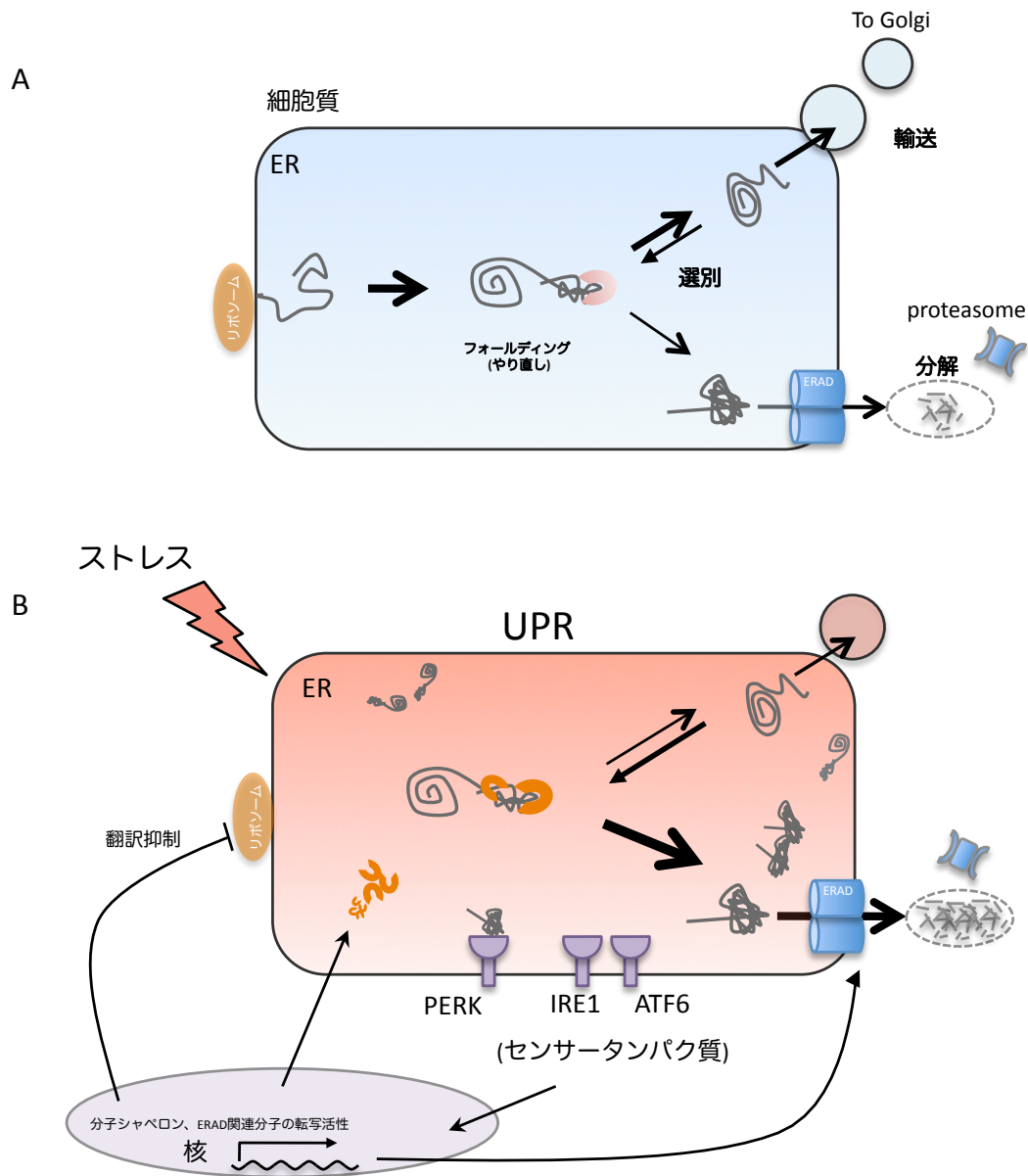


図3 小胞体におけるタンパク質品質管理機構 (EQRC) と小胞体ストレス応答 (UPR)

(A)小胞体では、新生鎖のフォールディング (一部の構造が折りたたみ不全なタンパク質の再生も行う)、正しくフォールディングされたタンパク質の選別・輸送、ミスフォールドタンパク質の分解を行っている。(B)小胞体に温度変化、ウイルス感染などのストレスがかかり、ミスフォールドタンパク質が蓄積されると、小胞体のホメオスタシスを保つため小胞体ストレス応答 (UPR) が起こる。PERK、IRE1、ATF6のミスフォールドセンサーが活性化されると、シグナル伝達経路下流の転写活性化により、リボソームの翻訳停止、分子シャペロン・ERAD関連分子の転写が促がされる。これらのはたらきでもホメオスタシスを保てない場合は、アポトーシスが誘導される。

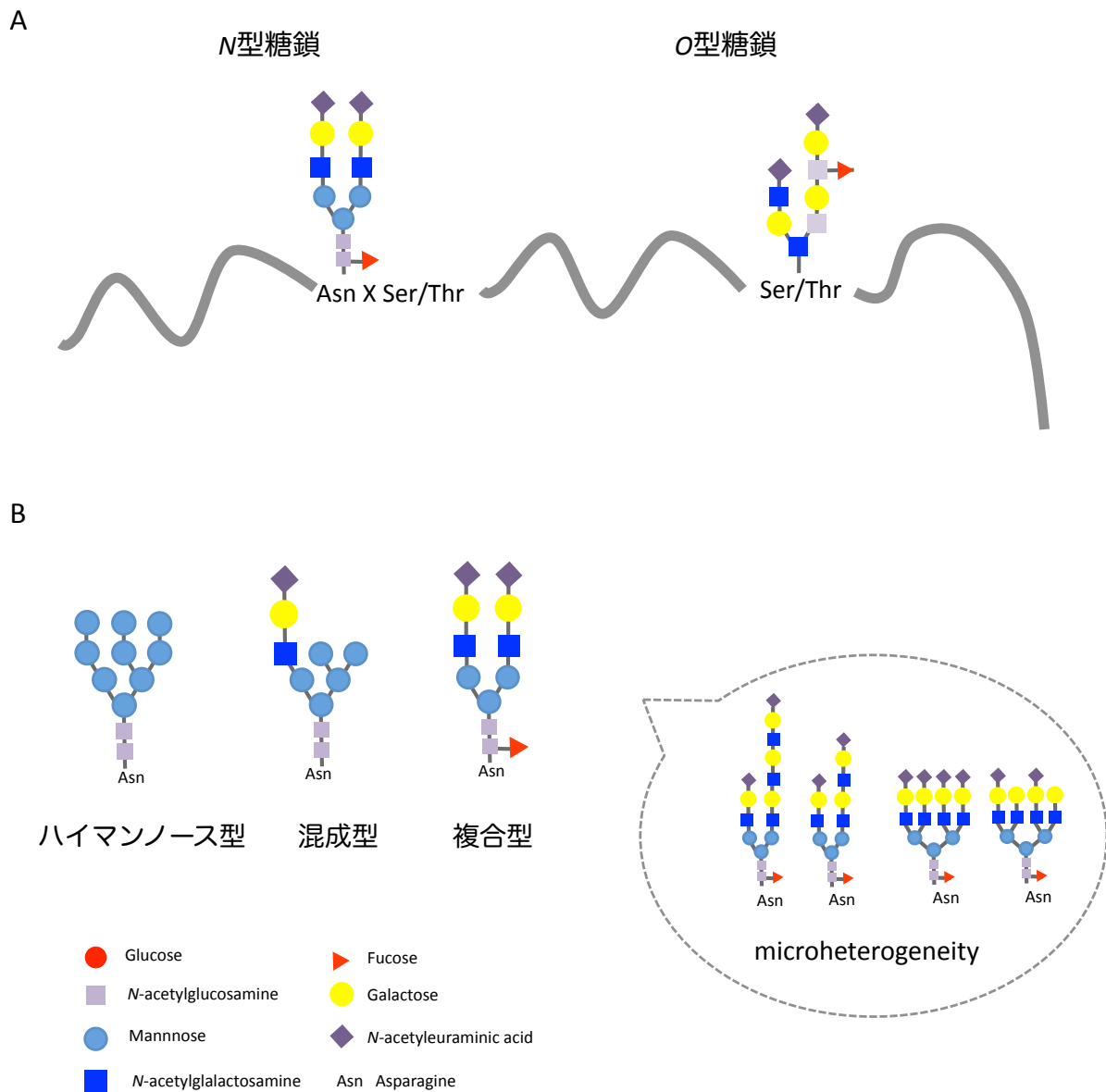


図4 N型糖鎖とO型糖鎖

(A) N型糖鎖はアミノ酸配列のNXS/TのN (Asn) に14糖が転移され、小胞体、ゴルジ体でプロセッシングされる。O型糖鎖はゴルジ体でSerまたはThrに次々と糖が付加され形成する。(B) 細胞膜表面タンパク質上のN型糖鎖のような、成熟したN型糖鎖はハイマンノース型 (未成熟型)、混成型、複合型からなる。実際には、微妙に構造が異なる不均一な状態 (microheterogeneity) で存在するため、多様性をもっている。

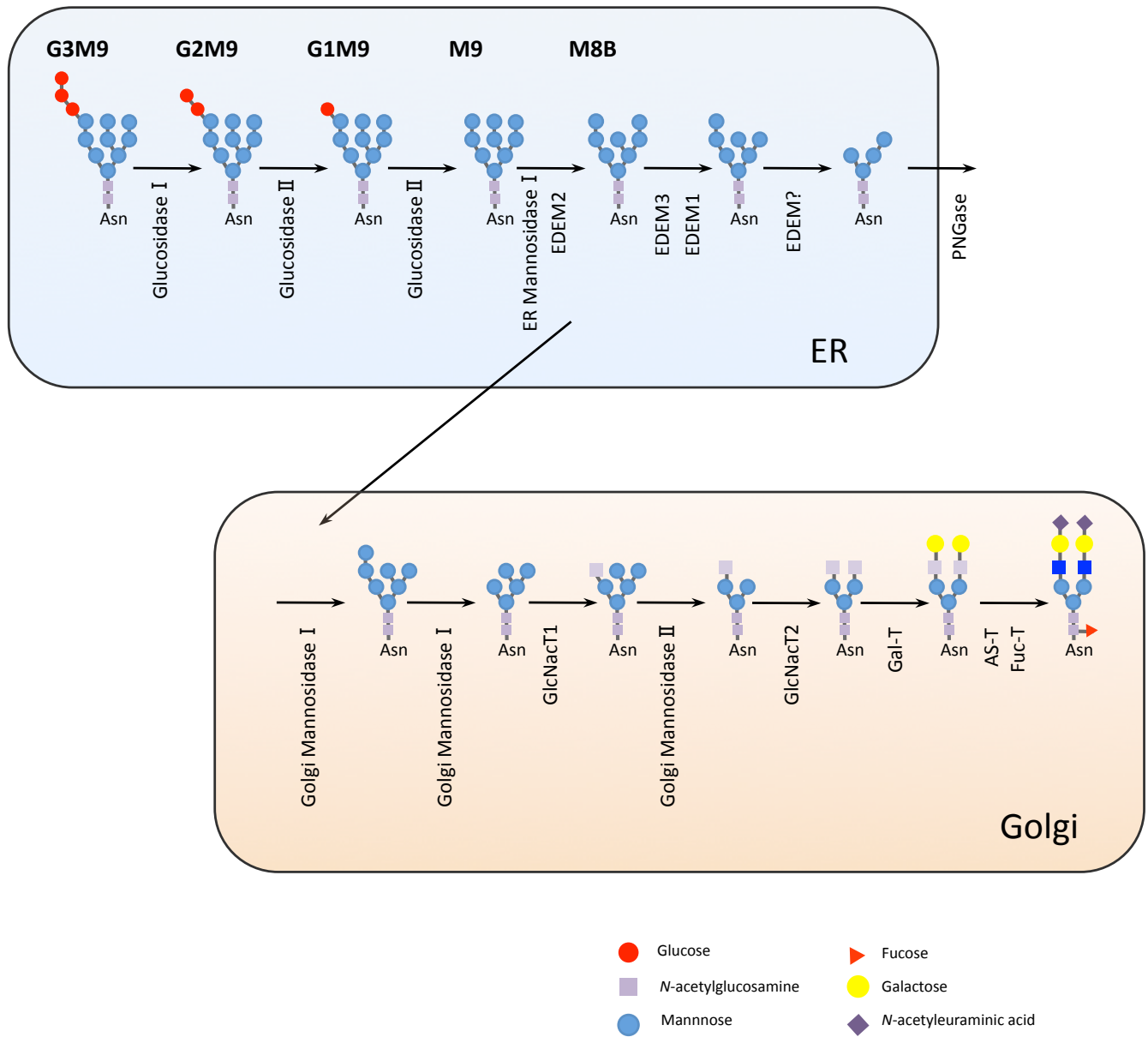


図5 小胞体とゴルジ体におけるN型糖鎖のプロセッシング

小胞体とゴルジ体では、N型糖鎖のプロセッシングの過程が異なる。小胞体におけるトリミング過程は動物間で保存されている。ゴルジ体での糖鎖修飾により、多様なN型糖鎖構造をとる。図は複合型の1つの糖鎖構造を示した。

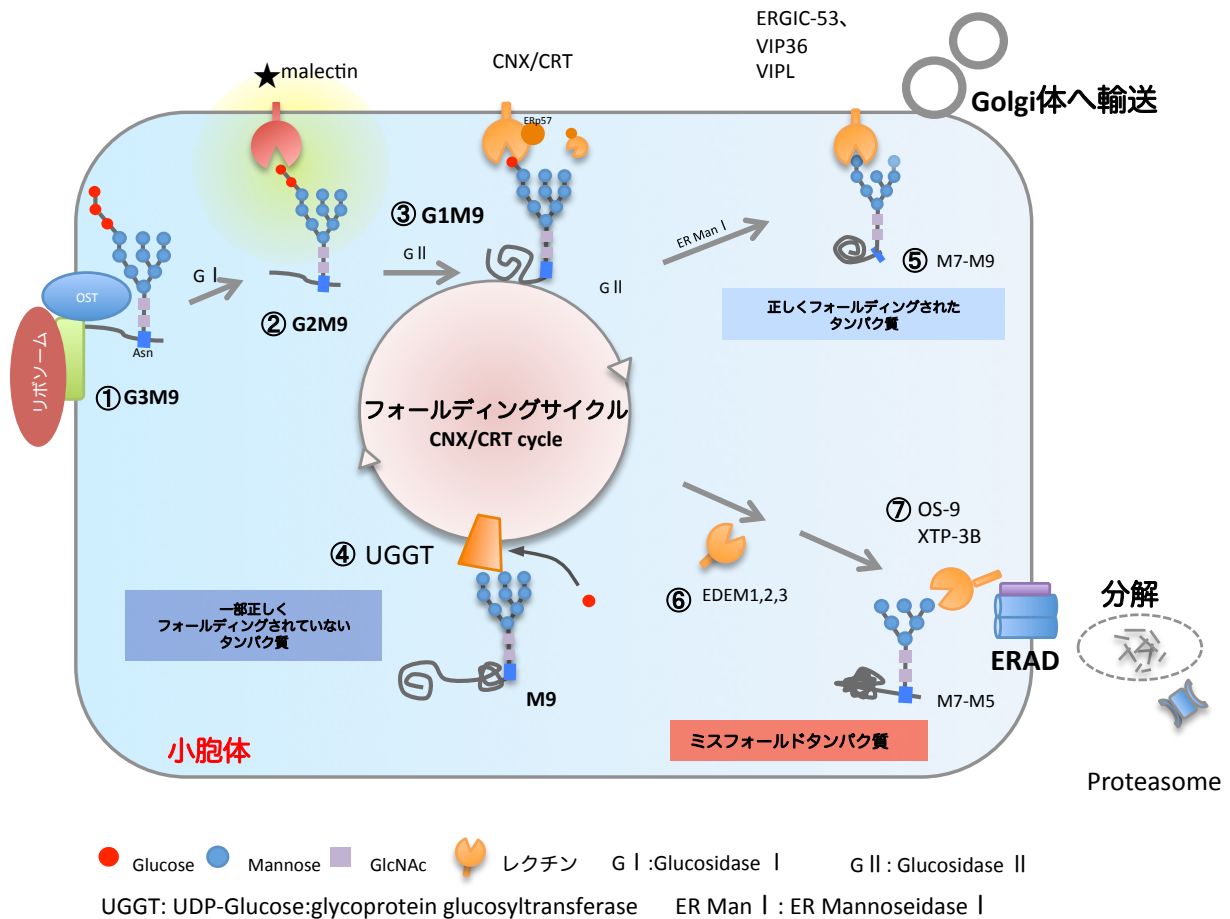
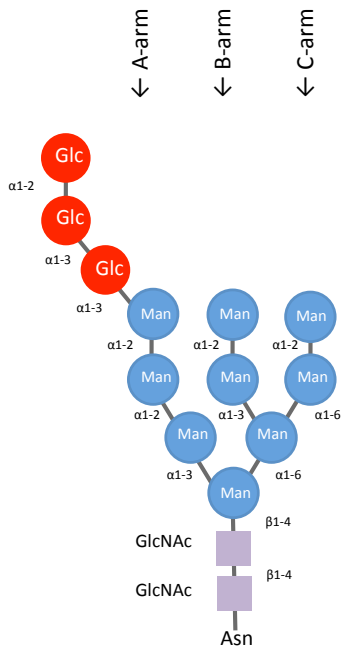


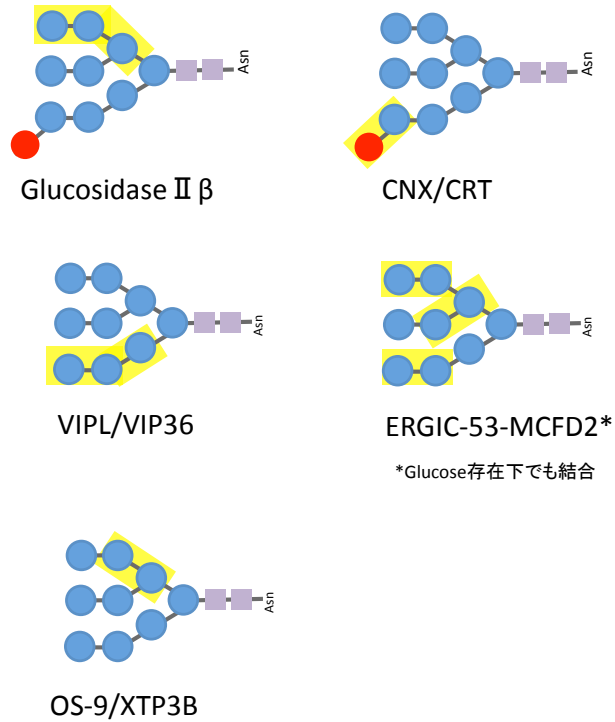
図6 N型糖鎖修飾されたタンパク質の小胞体タンパク質品質管理

N型糖鎖修飾されたタンパク質は小胞体で細胞内レクチンによるタンパク質品質管理を受ける。①リボソームで翻訳されたポリペプチド鎖は小胞体に貫入するとOSTによってG3M9糖鎖が付加される。②glucosidase Iによりグルコースがトリミングされるとマレクチンに認識され、③さらにglucosidase IIによりG1M9糖鎖にトリミングされるとcalnexin (CNX) または calreticulin (CRT) に認識されフォールディングのチェックを受ける。glucosidase IIによりM9糖鎖になると構造の一部が正しくないタンパク質はフォールディングセンサーであるUGGTに認識され、再びグルコースが付加される。この③→④をフォールディングサイクルと読んでいます。⑤正しく折り畳まれたものはERGIC-53などによりゴルジ体へと運ばれる。⑥ミスフォールドタンパク質はEDEM1,2,3により認識されマンノースが刈り取られた後、⑦OS-9、XTP3-Bといったレクチンに認識されERADを担う複合体を經由し、最終的に細胞質でプロテアソームに分解される。

A



B



Glc:Glucose, Man:Mannose, GlcNAc:N-acetylglucosamin

## 図7 N型糖鎖の結合様式と、タンパク質品質管理に関わるレクチンの糖鎖認識部位

(A) N型糖鎖の各糖結合とA-arm、B-arm、C-armの位置。(B) フロントアフィニティクロマトグラフィーによる結果をもとに各レクチンが強く結合する部分を推定し黄色で示した。ERGIC-53はM9 (G1M9) -M8 の $\alpha$ -1,2- $\text{Man}_2$ 構造に幅広く結合する。EDEM1-3は組換えタンパク質精製困難によりまだ解析されていない。K.Yamamoto, *Proc. Jap. Acad. Ser. B.*, 2014より引用、一部改変した。

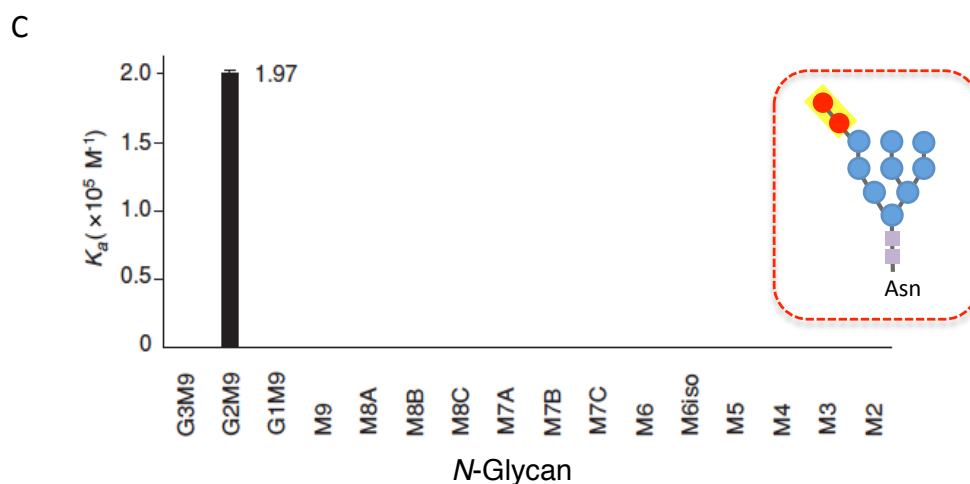
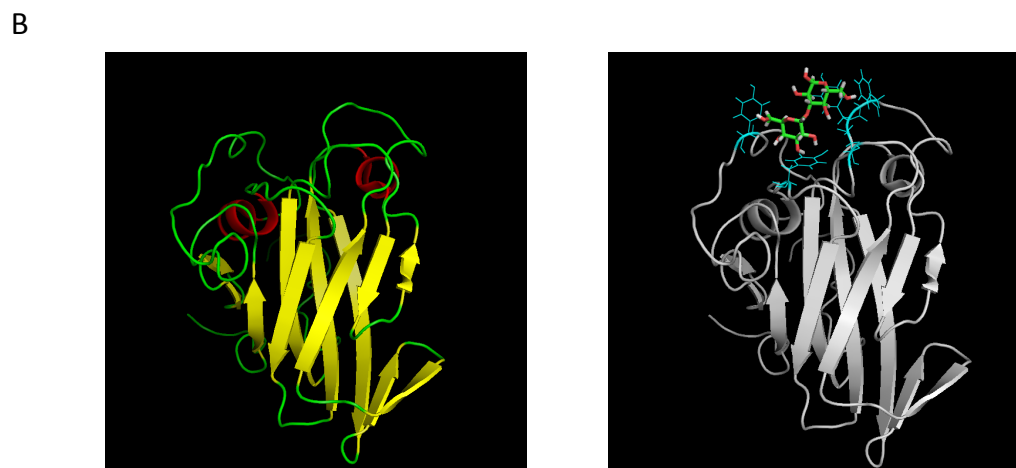
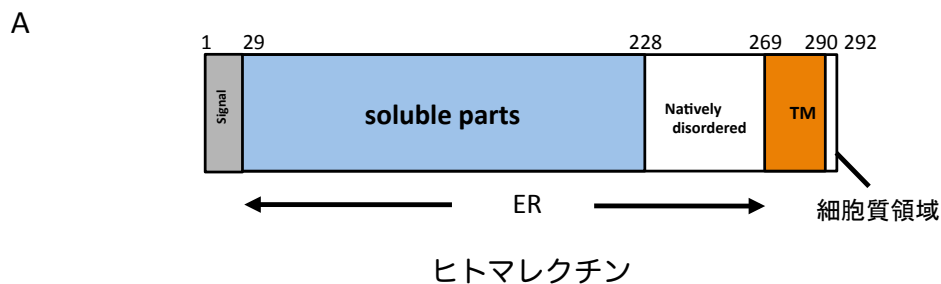


図8 NMRによるマレクチン立体構造解析とフロンタルアフィニティークロマトグラフィによる糖鎖結合解析

(A)ヒトマレクチンの構造。I型膜タンパク質で29-269 AAは小胞体内腔、270-290AAは膜貫通領域 (TM)、291-292AAの細胞質領域からなる。小胞体内腔領域はレクチン活性をもつ可溶性領域 (29-228 AA) と天然変成領域 (Natively disordered) (229-269 AA)からなる。(B) *Xenopus*のマレクチンの可溶性領域をNMRで立体構造解析した結果。マレクチンのみ (左: 2JWP) とマレクチンとニゲロースの共結晶 (右: 2K46) の構造解析の結果。Protein Data Bank (PDB) より引用。(C) ヒトのマレクチン42-228 AAの組換えタンパク質を用い、フロンタルアフィニティークロマトグラフィで解析した結果。G2M9糖鎖に特異的に結合した。Chen et al., *Mol. Biol. Cell.*, 2011より引用。



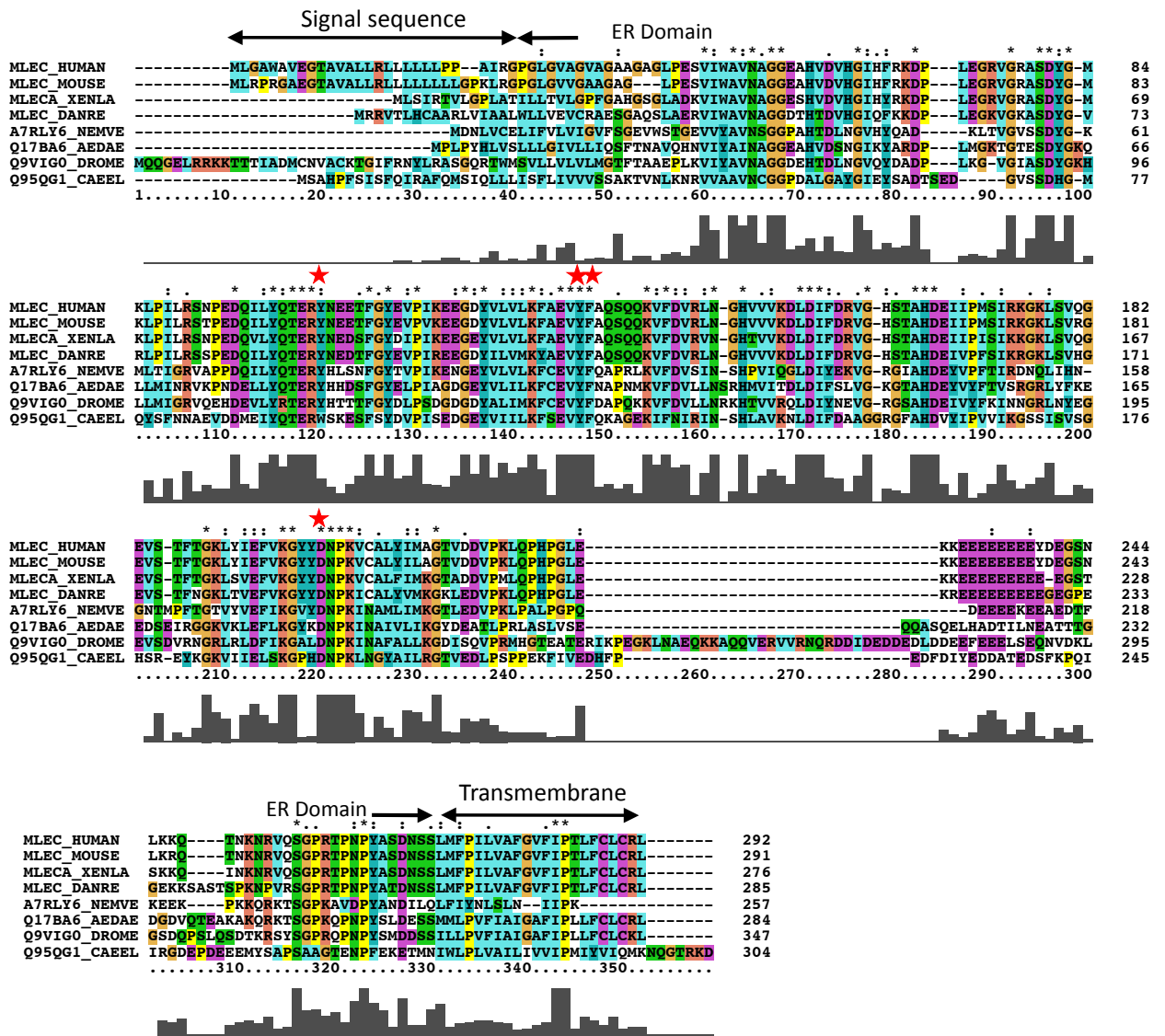
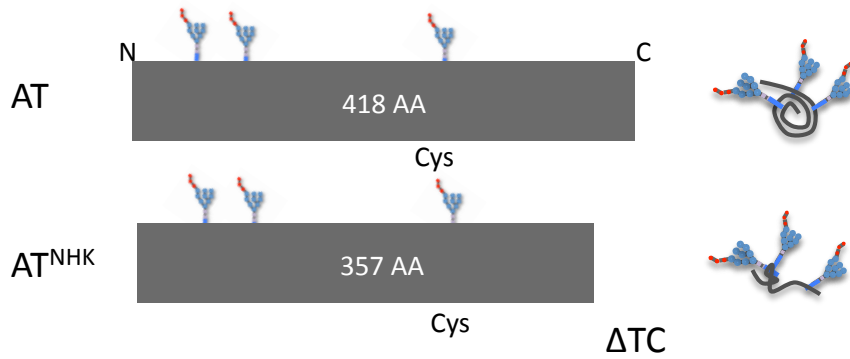


図9 マレクチンの動物間のアミノ酸配列相同性

HUMAN:ヒト、MOUSE:マウス、XENLA:アフリカツメガエル、DANRE:ゼブラフィッシュ、DROME:ショウジョウバ、AEDAE: ネットタイシアカ、CAEL: 線虫のマレクチンのアミノ酸配列を示す。図中の星マーク：糖結合に関わるアミノ酸、棒グラフ：縦に高いほど配列が保存されていることを示す。配列はUniProtより引用し(配列左側に Accession Numberを記載)、ClustalWにてアライメント表を作製した。

A



B

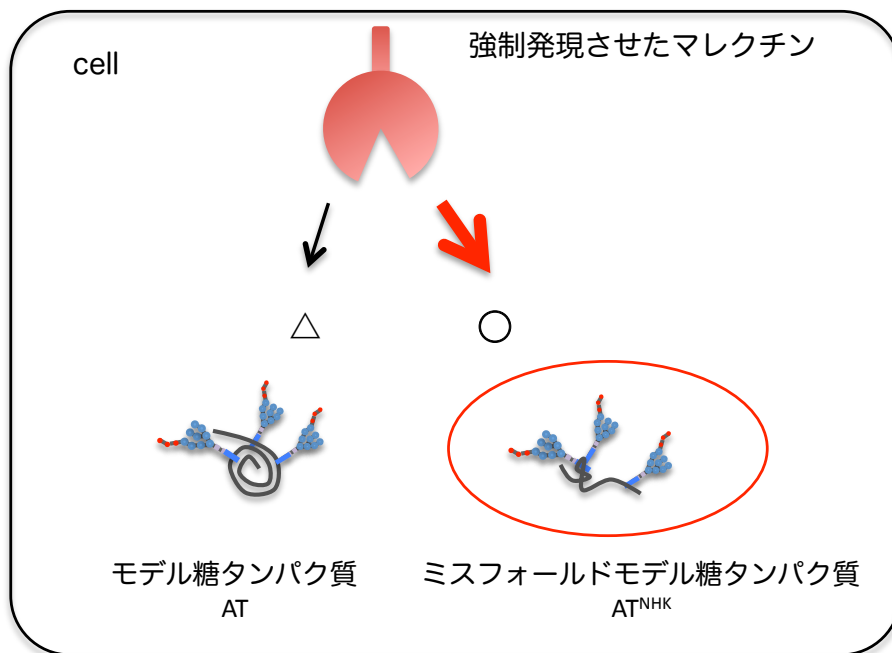


図10 マレクチンはミスフォールドな $\alpha$ 1-アンチトリプシン (AT<sup>NHK</sup>) と多く共沈する

(A) モデル糖タンパク質 $\alpha$ 1-アンチトリプシン(AT)とそのミスフォールドなモデルAT-Null<sub>HongKong</sub> (AT<sup>NHK</sup>) の模式図。AT<sup>NHK</sup>はフレームシフトによりC末端が短く、ミスフォールディングとなっている。(B) Chenらは、共免疫沈降による解析で、マレクチンがATよりもミスフォールドな構造のAT<sup>NHK</sup>と多く共沈することを示した (Chen *et.al.*, *Mol. Biol. Cell*, 2011)。

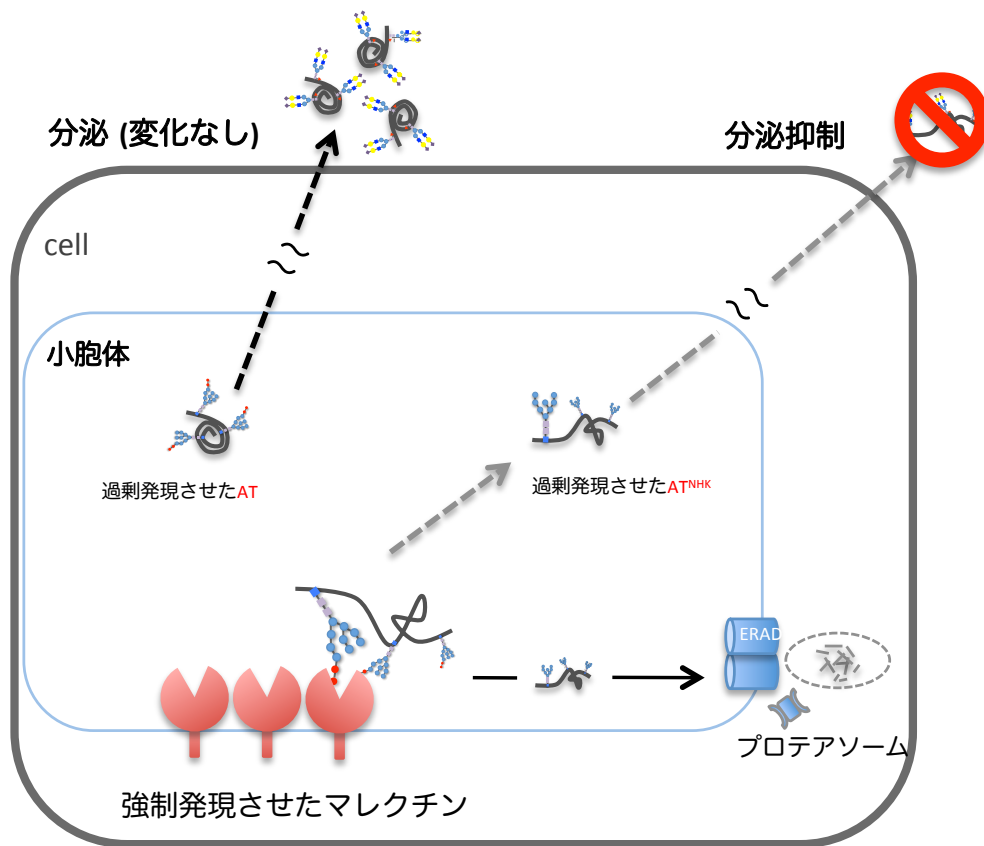


図11 マレクチンはミスフォールドタンパク質AT<sup>NHK</sup>の分泌抑制に関わる

マレクチンを過剰発現させた細胞では、過剰発現させてない細胞に比べ細胞外に分泌されるAT<sup>NHK</sup>の量が減少する。正しくフォールディングされるATの分泌量に変化はないことから、マレクチンがミスフォールドタンパク質の分泌抑制に関わることが示唆されている。また、OS-9レクチンおよびプロテアソーム阻害剤MG132を用いた実験から、マレクチンに分泌抑制されたAT<sup>NHK</sup>がERADを担う機構へと誘導され、最終的に細胞質で分解されることが考えられる (Chen *et.al.*, *Mol. Biol. Cell*, 2011)。

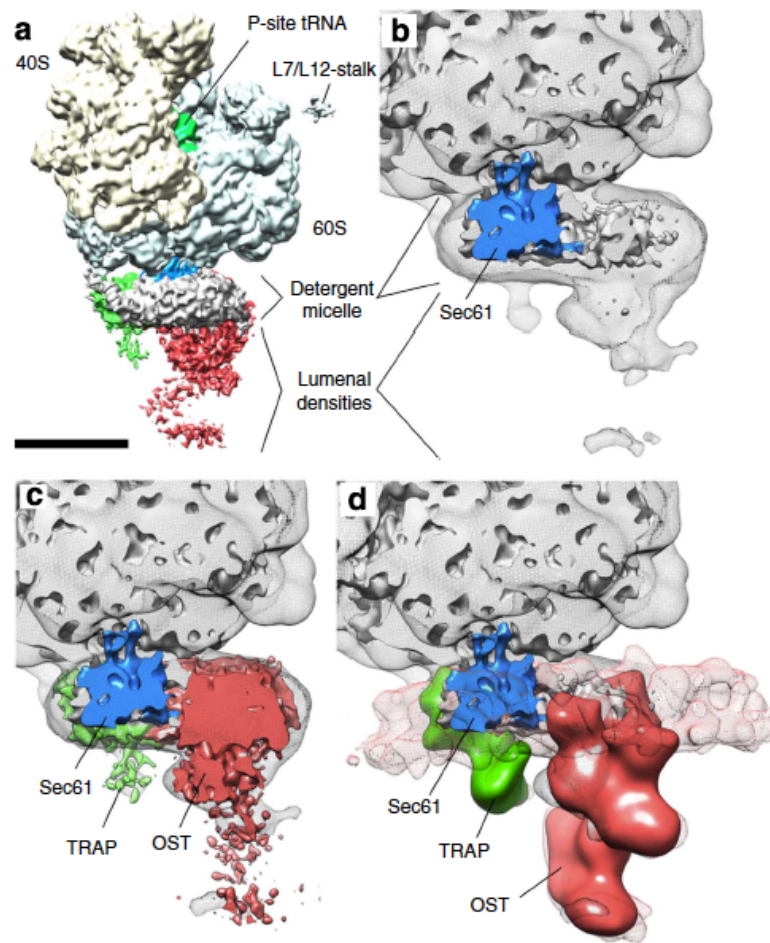


図12 oligosaccharyltransferase複合体はトランスロコン近傍に局在する

(a)-(d) イヌの臍臓から抽出・精製した粗面ミクロソーム画分のタンパク質について極低温電子顕微鏡で撮影し、撮影データを再構築した。(a)のスケールバーは10 nm。40s、60sはリボソームを構成するサブユニット。oligosaccharyltransferase複合体 (赤)とトランスロコンの構成ユニットであるTRAP (緑)、Sec61 (青)。Pfeffer *et.al*, *Nature communication*, 2014より抜粋。

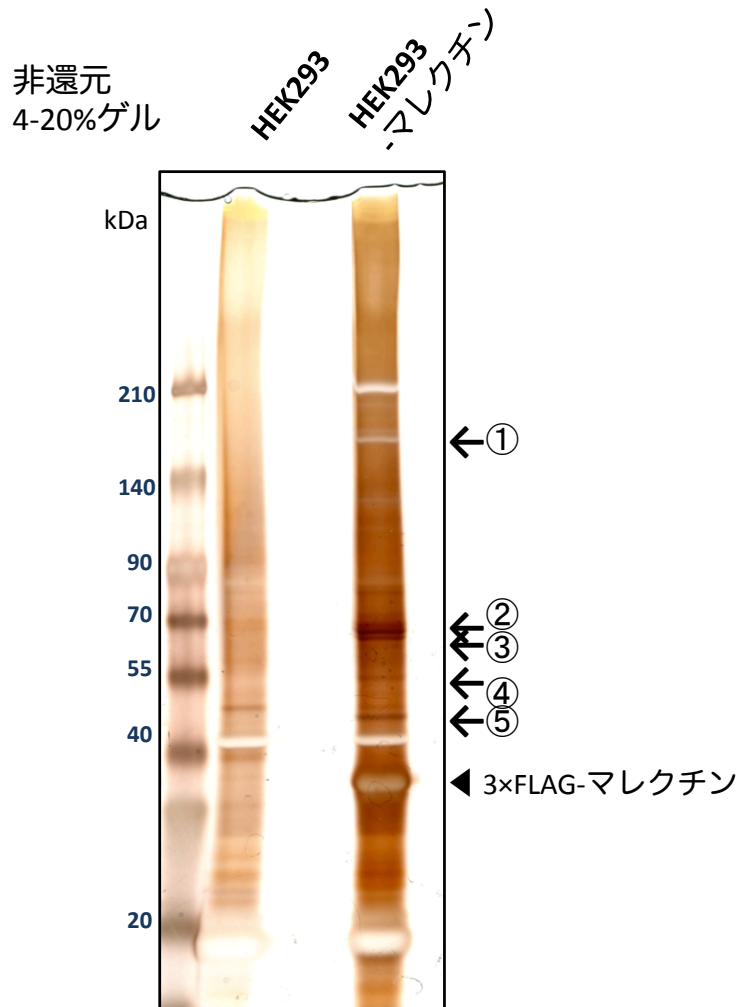
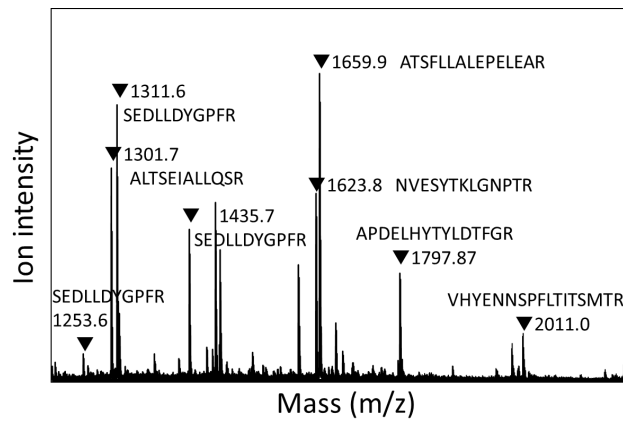
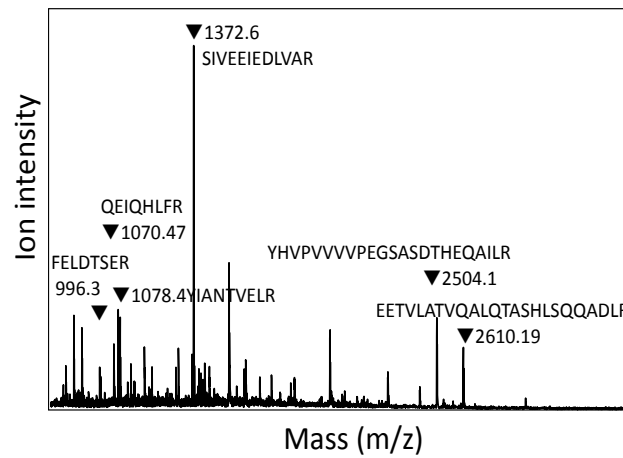


図13 マレクチンと共沈したタンパク質

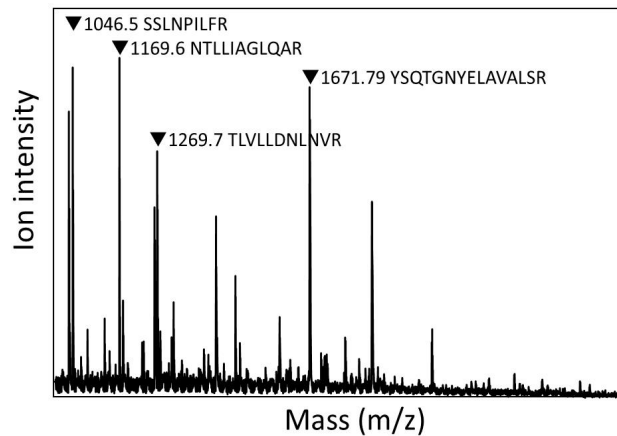
FLAGタグを融合したマレクチン発現細胞または発現させていない細胞を1% TritonX-100で可溶化した後、抗FLAG抗体-アガロースでそれぞれ共免疫沈降した。免疫沈降物をSDS-PAGEで分離した後、銀染色した。マレクチン発現細胞由来の免疫沈降物のレーンから特異的なバンドを複数検出した (矢印)。



A ribophorin1 (②より)



B ribophorin 2 (③より)



C OST48 (⑤より)

図14 マレクチンと共沈したタンパク質の質量分析～SDS-PAGEの分離を利用

図13で検出した②、③、⑤のMALDI-TOF-MSによる質量分析 (MS) の結果を示した。バンドを切り抜き、Trypsin消化等の前処理をした後、MALDI-TOF-MSで質量分析した。質量分析は reflector positive モードで行った。図中の▼で示したピークの  $m/z$  はMS/MS分析を行い、解析ソフトのProteinPilotでペプチドを同定した。

MEAPAAGFLLLLLGTWAPAPGSA**SEAPPLINEDVKRTVDLSSHLAKVTAEVVLAHLGG**  
**GSTRATSFLLALEPELEARLAHLGVQVKGEDEEENNLEVRETKIKGKSGRFFTVKLPVA**  
**LDPGAKISVIVETVYTHVLHPYPTQITQSEKQFVVFEGNHFYSPYPTKTQTMRVKLASR**  
**NVESYTKLGNPTRSEDLDDYGPFRDVPAYSQDTFKVHYENNSPFLTITSMTRVIEVSHWG**  
**NIAVEENVDLKHTGAVLKGPFSRYDYQRQPDSSGSISSFKTILPAAAQDVYYRDEIGNV**  
STSHLLILDSSVEMEIRPRFPLFGGWKTHYIVGY**NLPSYEYLYNLGDQYALKMRFVDHVF**  
**DEQVIDSLTVKIILPEGAKNIEIDSPYEISRAPDELHYTYLDTFGRPVIVAYKKNLVEQH**  
IQDIVVHYTFNKVLMQEP LLVAAFYILFFT VIIYVRLDFSITKDPAAEARMKVACITE  
QVLTLVNKRIGLYR**HFD**ETV**NRYKQSRDISTLNSGKKSLETEHKALTSEIALLSRLKTE**  
GSDLCDRVSEMQKLDQVKELVLKSAVEAERLVAGLKKDITYIENEKLISGKRQELVTKI  
DHILDAL

A ribophorin1

MTKFGFLRLSYEKQDT**LLKLLLSMAAVLSFSTR**LFAVLRFESVIHEFDPPYFNRYRTTR**FL**  
**AEEGFYKFHNWFDDR**AWYPLGRIIGGTIYPGLMITSAAIYHVLHFFHITIDIRNVCVFLA  
PLFSSFTTIVTYHLTKEKLDAGAGLLA**AAMIAVVPGYISR**SVAGSYDNEGIAIFCMLLTY  
YMWIKAVKTGSICWAAKCALAYFYMVSSWGGYVFLINLIPLHVLVLMMLTGRFSHRIYVAY  
CTVYCLGTILSMQISFVGFQPVLSSEHMAAFGVFGLCQIHAFVDYLRSKLNPQQFEVLF  
SVISLVGFVLLTVGALLMLTGKISPWTGRFYSLDPSYAKNNIPIIASVSEHQPTTWSSY  
YFDLQLLVFMFPVGLYYCFNSLSDARIFIIMYGVTSMYFSAVMVRMLLVLAPVMCILSGI  
GVSQVLSTYMK**NLDISR**PK**SKKQDSTYPIK**NEVASGMILVMAFFLITYTFHSTWVTS  
EAYSSPSIVLSAR**GGDGSRIIFDDFREAYYWL**RHNTPEDAKVMSWWDYGYQITAMANRTI  
LVDNNTWNNTHISR**VGQAMASTE**EKAYEIMRELDVSYVLVIFGGLTGYSSDDINK**FLWMV**  
**RIGGSTDTGKH**IKENDYYTPTGEFRVDREGSPVLLNCLMYKMCYRFGQVYTEAKRPPGF  
DRVRNAEIGNKDFELDVLEEAYTTEHWLVRIYKVKDLDNRGLSRT

B STT3A

図15 マレクチンと共沈したribophorin1、STT3Aの質量分析の結果~Nano-LCによる分離を利用  
赤字は同定されたペプチドを示す。

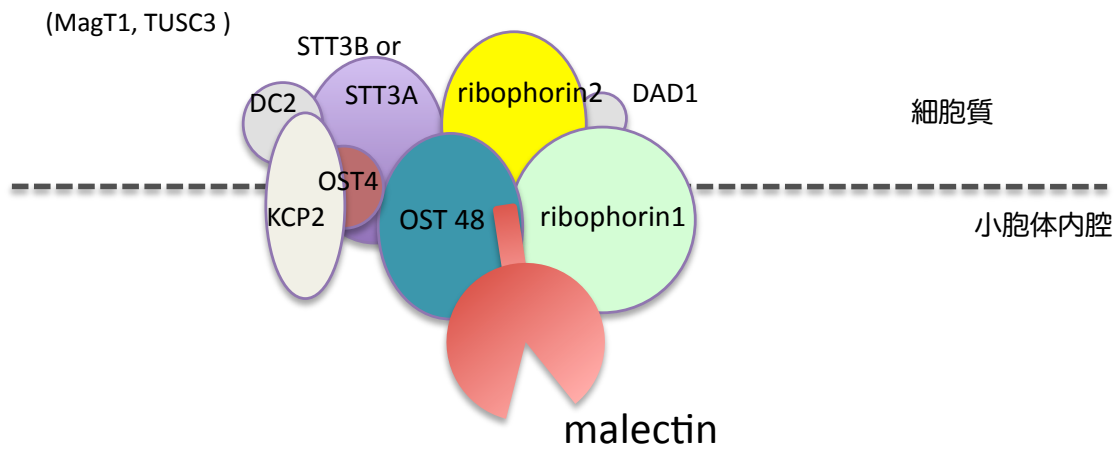


図16 マレクチンはoligosaccharyltransferase (OST) 複合体と結合する

oligosaccharyltransferase (OST) 複合体は10種類程度の膜タンパク質から構成され、新生鎖のN型糖鎖への転移に関わる。



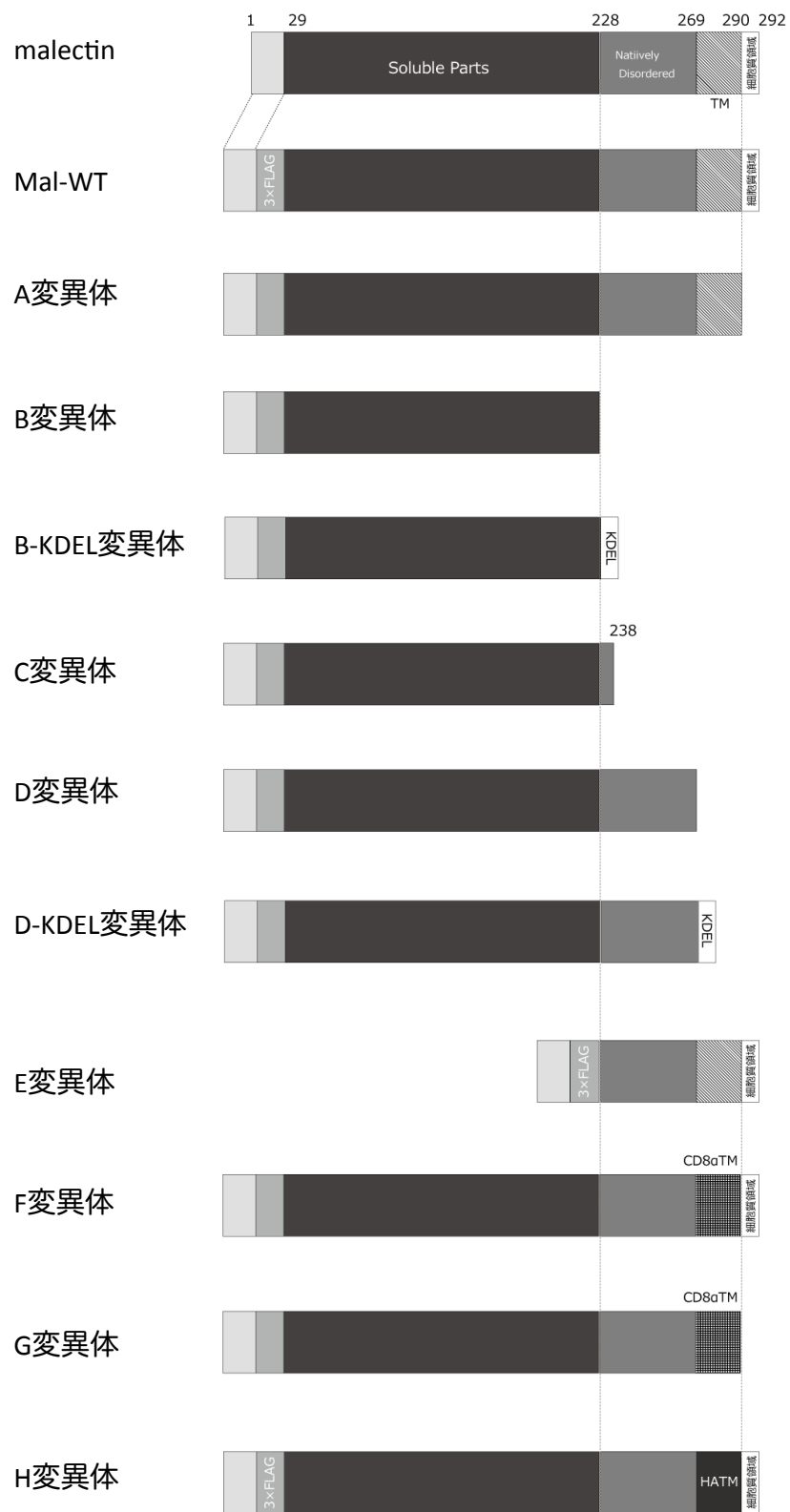


図17 作製したマレクチン変異体の模式図

TM: 膜貫通領域、HA:H1N1 (Puerto Rico)-Hemagglutinin、CD8α: ヒトCD8α、KDEL:Lys-Asp-Glu-Leu配列 (小胞体シグナル配列) を示す。

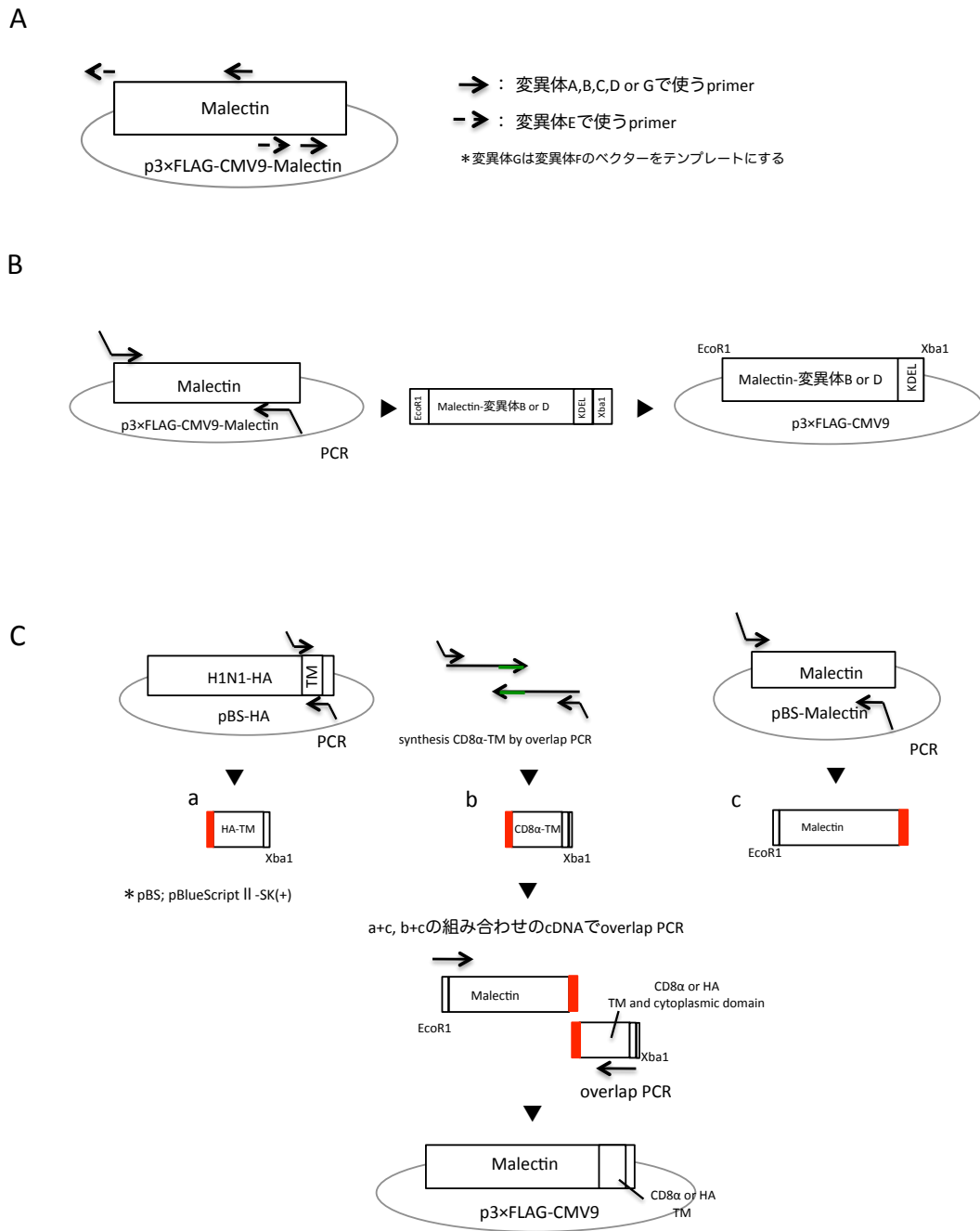


図18 マレクチン変異体プラスミドコンストラクトの作製  
 (A) A、B、C、D、E、G 変異体の作製方法 (B) B-KDEL変異体、D-KDEL変異体の作製方法 (C)  
 CD8 $\alpha$ TM置換変異体 (F)、HATM置換変異体 (H) の作製方法。

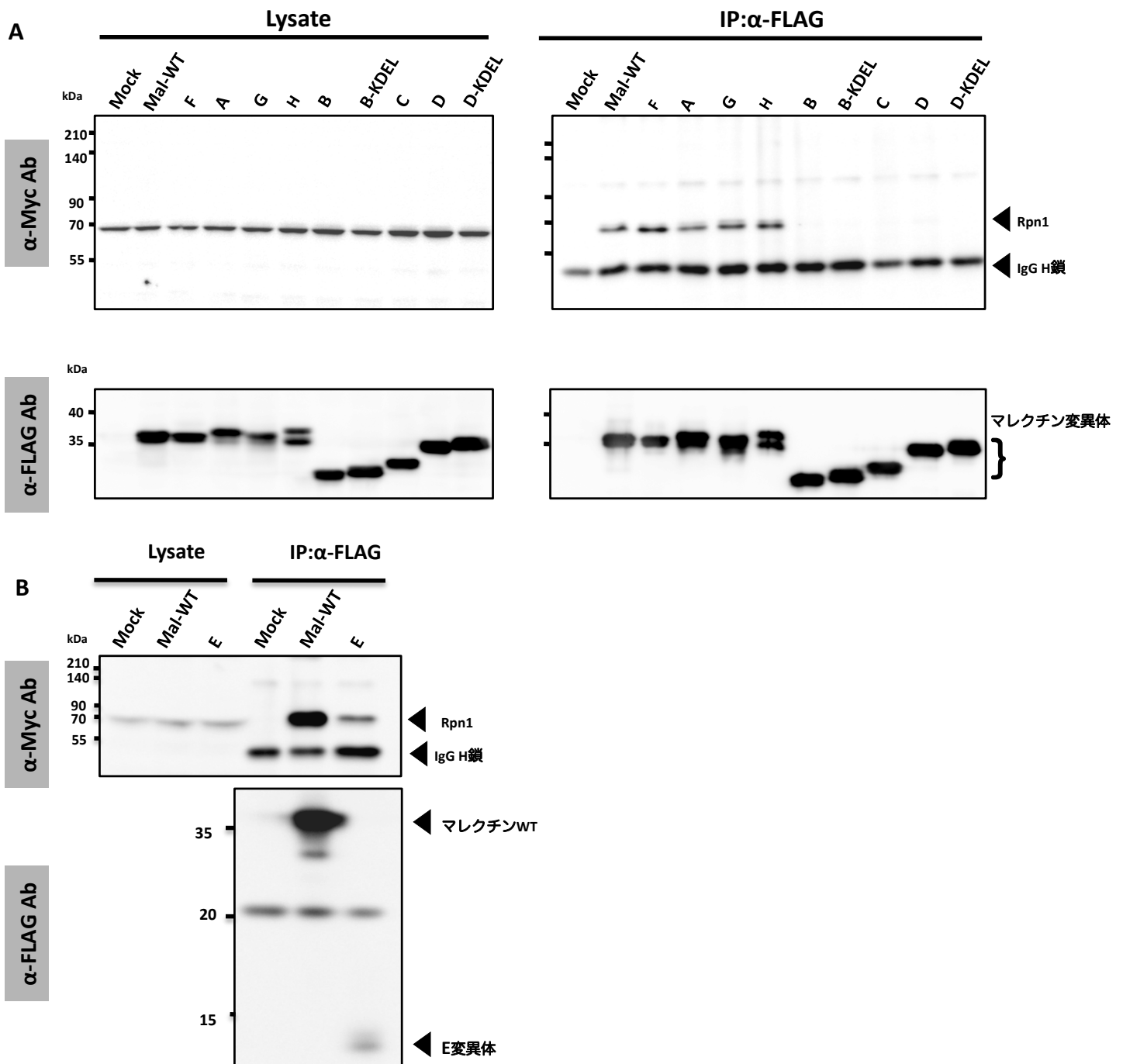


図19 マレクチンとribophorin1の相互作用には膜貫通領域が重要

HEK293細胞に3XFLAGタグを融合した各マレクチン変異体とMycタグを融合したribophorin1 (Rpn1)を共発現させ、48 h後に細胞を回収し抗FLAG抗体で免疫沈降した。免疫沈降した産物は還元条件下のSDS-PAGEで分離し、抗Myc抗体または抗FLAG抗体でウエスタンブロッティングした。(A) E変異体以外、(B) E変異体のウエスタンブロッティングの結果。MockはFLAGタグのみを発現するベクターを細胞に導入した。

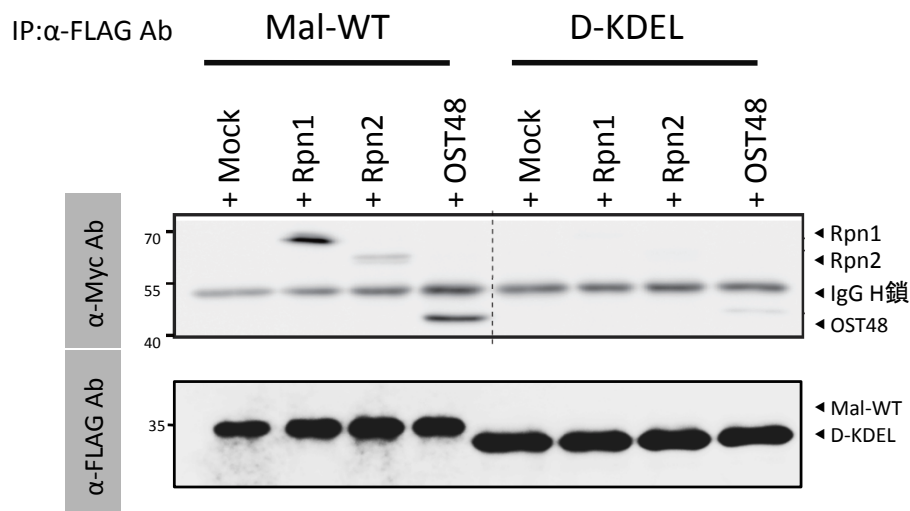
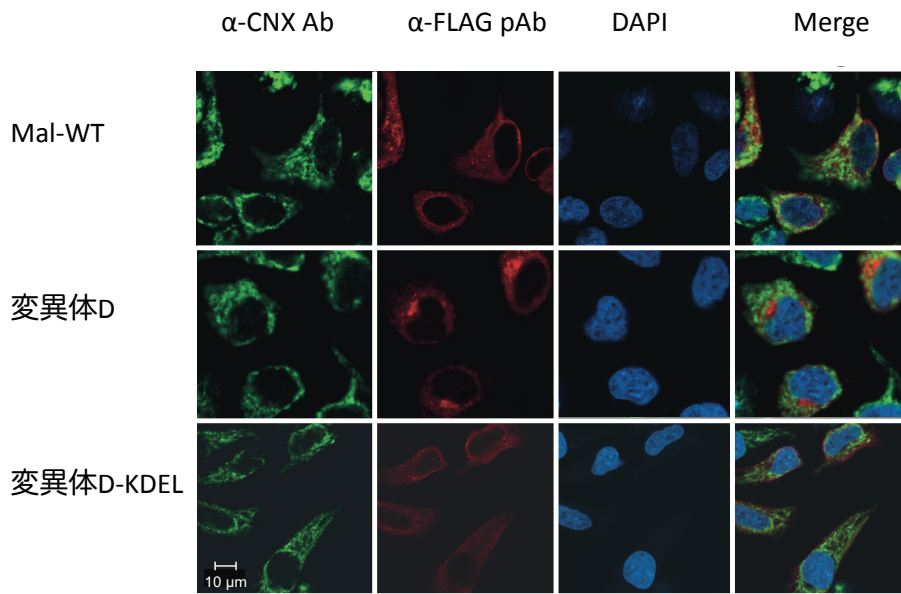


図20 D-KDEL変異体はOST複合体の構成分子と相互作用しない

3XFLAGタグを融合したwild-typeのマレクチン (Mal-WT) またはD-KDEL変異体と、Mycタグを融合したribophorin1 (Rpn1)、ribophorin2 (Rpn2)、OST48を共発現させ、48 h後に細胞を回収し抗FLAG抗体で免疫沈降した。免疫沈降物は還元条件下のSDS-PAGEで分離し、抗Myc抗体または抗FLAG抗体でウエスタンブロッティングした。MockはMycタグのみを発現するベクターを使用した。



緑:小胞体マーカー ( $\alpha$ -CNX Ab)、赤: FLAG-マレクチン ( $\alpha$ -FLAG pAb)

## 図21 マレクチン変異体の細胞内局在

Mal-WT、マレクチンの膜貫通領域と細胞質領域を削除したD変異体、およびD変異体に小胞体滞留シグナル配列Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)を付加したD-KDEL変異体の細胞内局在を比較した。Mal-WT、D変異体、D-KDEL変異体をリポフェクション法でHeLa細胞に発現させ、48 h 培養後に細胞を4% PFA/PBS(-)で固定し、蛍光免疫染色した。

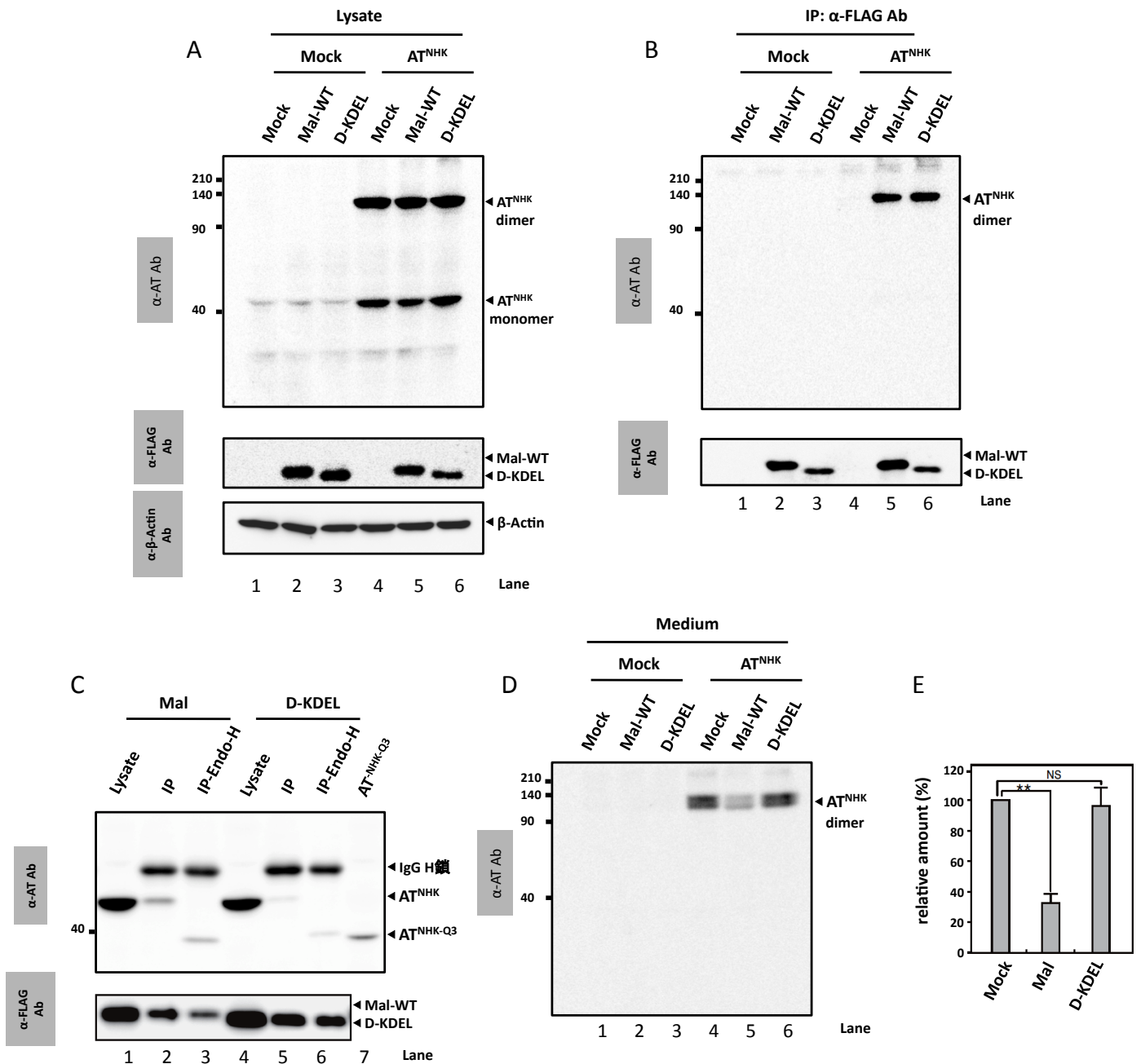
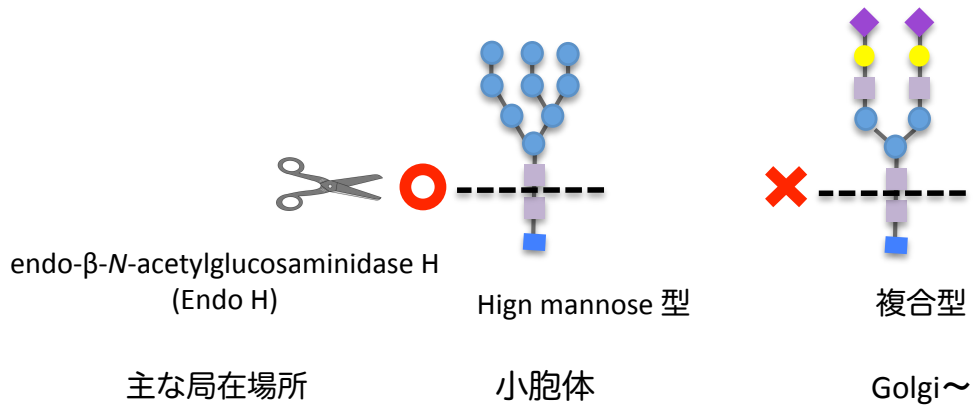


図22 D-KDEL変異体を用いた解析

Mal-WTまたはD-KDEL変異体とAT<sup>NHK</sup>をリポフェクション法でHela細胞に共発現させ、24 h後に培養液を交換し、48h後に培養上清および細胞を回収した。MockはFLAGタグのみを発現するベクターを使用した。細胞は1% TritonX-100で可溶化した後、rabbit 抗FLAG抗体で共免疫沈降し、各抗体でウエスタンブロッティングした。(A) Lysate、(B) 共免疫沈降の結果。(C) マレクチンと共沈したAT<sup>NHK</sup>の糖鎖をEndo-H処理した後の結果。Endo-Hの実験の詳細は図23を参照。AT<sup>NHK-Q3</sup>はAT<sup>NHK</sup>のN型糖鎖修飾部位3カ所をAsn→Gln置換した変異体。AT<sup>NHK-Q3</sup>を発現させた細胞のLysateをレーン7に泳動した。(D) 回収したメディウムを抗AT抗体でウエスタンブロッティングした結果。(A)、(B)、(D)の抗AT抗体でウエスタンブロッティングした結果は非還元条件、抗FLAG抗体および抗β-Actin抗体の結果は還元条件で行った。(E) (D)のAT<sup>NHK</sup>のバンドの濃度をdensitometry解析で比較した。グラフは独立した3回の実験の平均値を示し、error barは標準偏差を示すp < 0.01; NS, not significant (Student's t-test)

A



B

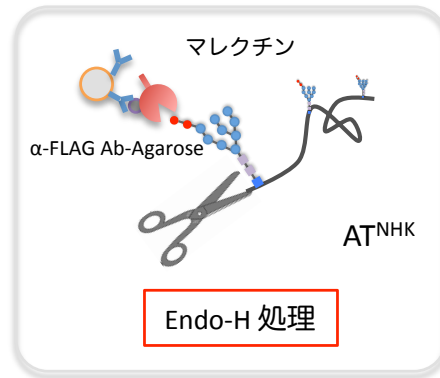


図23 Endo-H

(A) endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H (Endo-H) はハイマンノース型糖鎖の根元のGlcNAcの結合を切断するが、複合型糖鎖は切断しない。(B) 図22-Cの実験の模式図。抗FLAG抗体-アガロース免疫沈降したビーズをEndo-Hと還元条件下で一晩反応させた後、SDS-PAGEで分離し、抗AT抗体でウエスタンブロッティングした。N型糖鎖がハイマンノース型の場合、切断に伴いウエスタンブロッティングでバンドサイズの低い位置に検出される。

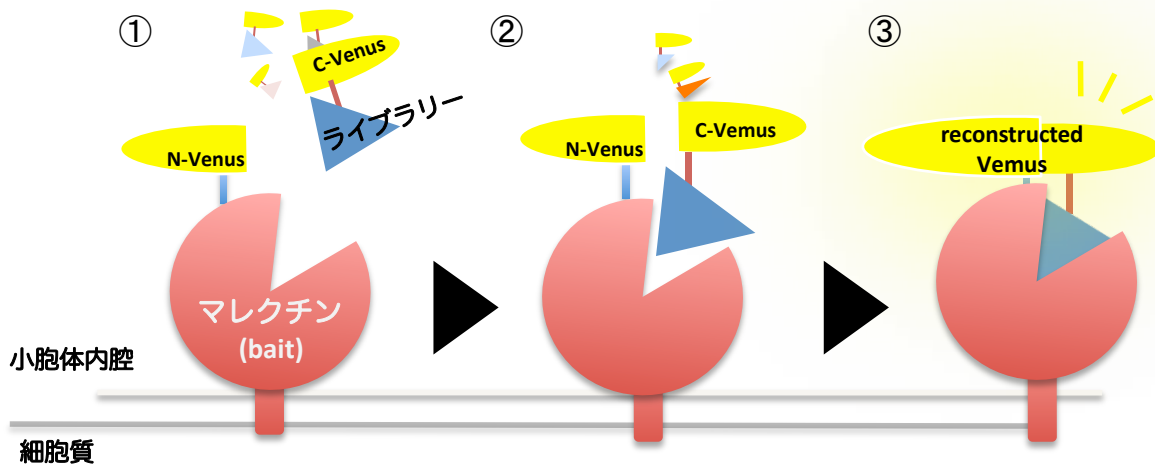
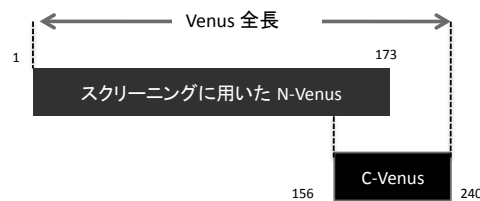


図24 protein-fragment complementation assayを応用したスクリーニング

分断したVenusのN末端側のフラグメント(N-Venus)を融合したマレクチンをbaitとして細胞内に発現させた後、C末端側のフラグメント(C-Venus)を融合したライブラリーを細胞に発現させる(①)。もし、ライブラリー中にマレクチンと相互作用する分子があった場合、両分子に融合されているVenus断片が近接し(②)、Venusの立体構造が再構築し、蛍光を回復する(③)。実際には、その蛍光が細胞が発する蛍光として測定される。1細胞ごとに異なるライブラリータンパク質が発現していれば、蛍光を発する細胞をもとにマレクチンと相互作用する分子を推定できる。

A



B

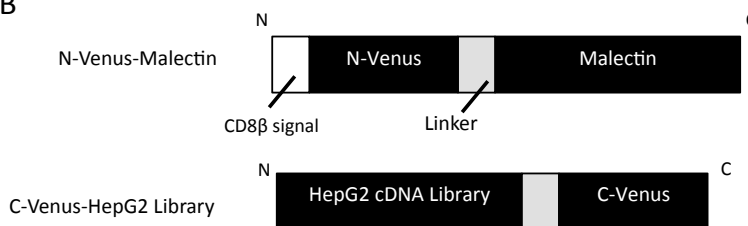
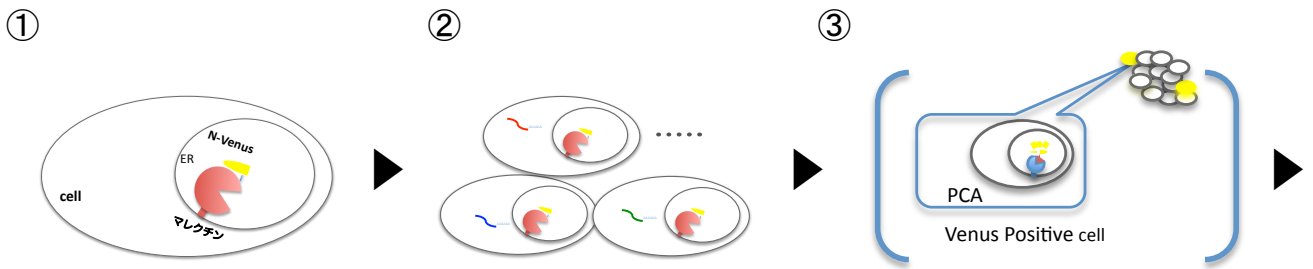


図25 PCAのスクリーニングで用いたコンストラクト

(A) レポータータンパク質Venusの配列をもとに、PCAで使用するN-Venus :1-173 AA、C-Venus :156-240 AAの2つのフラグメントを設計した。一部の領域(156-173 AA)はN-VenusとC-Venusの蛍光発光効率を上げるため重複させた。(B) N-Venus-malectinとC-Venus-HepG2 Libraryの設計図。N-VenusのN末端にヒトCD8βシグナルを、C末端にマレクチンを融合した。C-Venus-HepG2ライブラリーはChen et. al., *Glycobiology*, 2013と同じcDNAライブラリーを使用した。

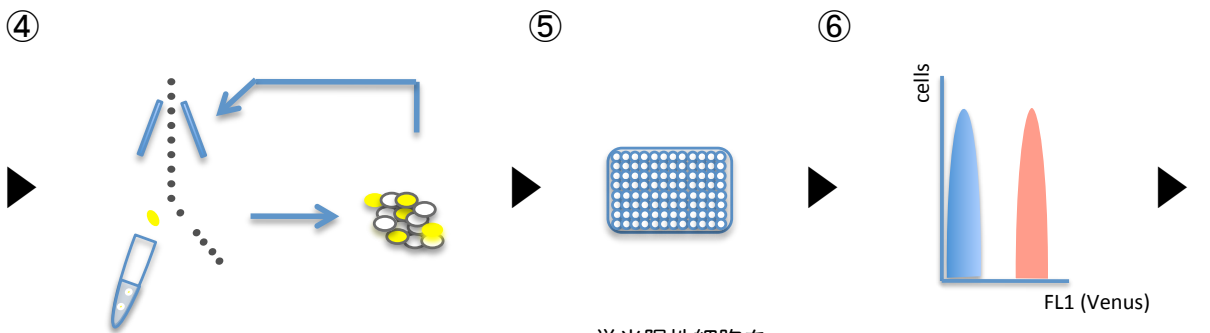




N-Venus-マレクチン  
安定発現細胞の作製  
偽陽性を発しないかを調べる

C-Venus-HepG2ライブラリーの導入

PCAの原理に従い、  
いくつかの細胞が蛍光を発する



セルソーターで蛍光陽性細胞を分取  
培養し再び分取する操作を数回行う

蛍光陽性細胞を  
限界希釈でクローン化

各クローンの蛍光を測定

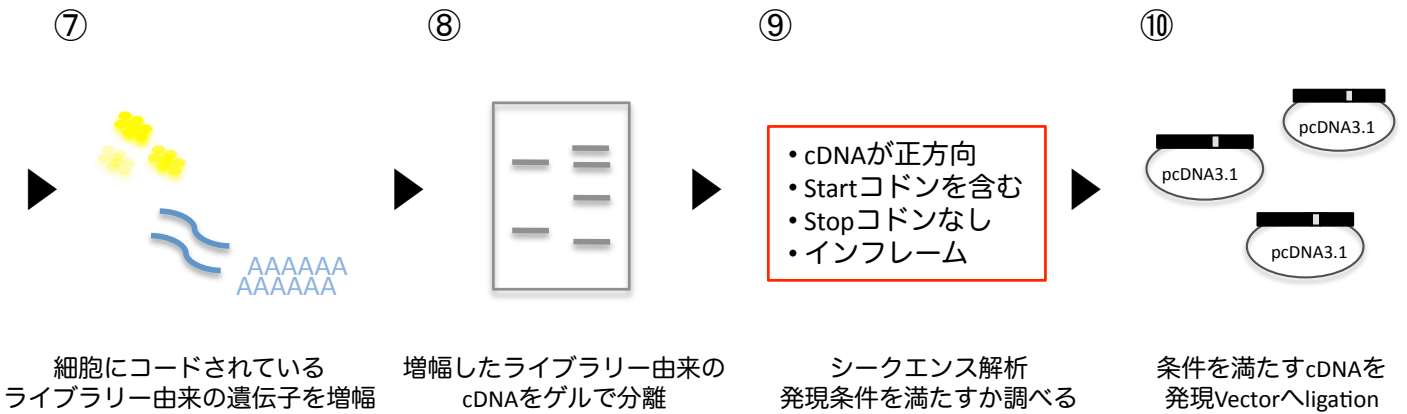


図26 PCAを応用したスクリーニングの手順

WB:  $\alpha$ -GFP Ab

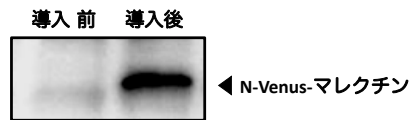


図27 N-Venus-マレクチン安定発現細胞の作製

BW5147細胞にpMXs-N-Venus-malectinをレトロウイルスの系で導入した後、細胞をクローン化した。抗GFP-N-terminal抗体によるウエスタンブロッティングで発現を調べた。

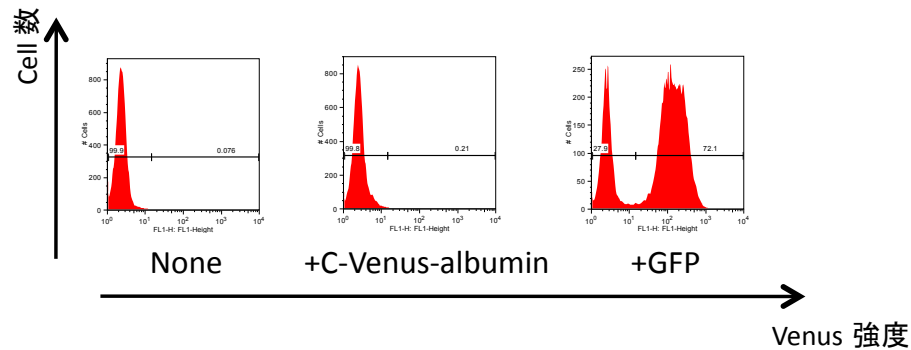


図28 偽陽性のチェックとC-Venus-HepG2ライブラリーの細胞への遺伝子導入効率

N-Venusマレクチン安定発現細胞にC-Venus-albuminをレトロウイルスの系で安定発現させ、偽陽性を発しないかフローサイトメトリーで調べた (+C-Venus-albumin)。C-Venus-HepG2ライブラリーをN-Venusマレクチン安定発現細胞に導入する際、GFPを発現するベクターを同様の方法で導入し、遺伝子導入効率を推定した (+GFP)。GFPとVenusは蛍光波長が近いため、ともにフローサイトメーター (FACS) のFL1で測定した。

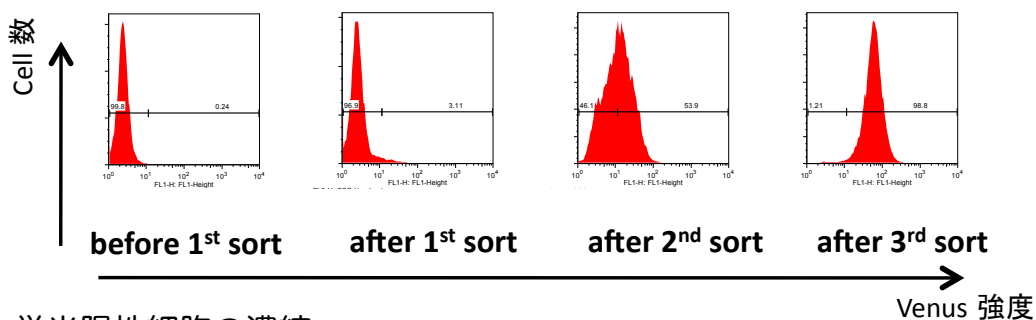
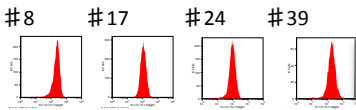


図29 蛍光陽性細胞の濃縮

N-VenusマレクチンとC-Venus-HepG2ライブラリーを遺伝子導入した細胞について、1回目のセルソーティング前と後、2回目、3回目のセルソーティング後の細胞集団の蛍光をフローサイトメトリー (FACS Calibur) で測定した。細胞はフリーズしていた各ストックを培養し、同時に測定した。

A

ex)



↓  
MFIを算出

B 3次 ソーティング後

2次 ソーティング後

Clone No	MFI
1	525
2	241
3	222
4	218
5	208
6	202
7	200
8	194
9	194
10	182
11	179
12	164
13	162
14	161
15	160
16	159
17	146
18	145
19	144
20	144
21	141
22	139
23	139
24	133
25	130
26	126
27	121
28	117
29	114
30	109
31	108
32	106
33	104
34	100
35	97.1
36	95.1
37	94.7
38	94.7
39	94.7
40	94.3
41	93.2
42	87.8
43	87.7
44	80.9
45	80.6
46	78.6
47	78.3
48	76.4
49	74
50	66.2
51	64.5
52	61.8
53	58.9
54	58.3
55	56.7
56	50.4
57	48.1
58	47.4
59	43.7
60	32.1
61	4.96
62	3.79

Clone No	MFI
63	148
64	112
65	107
66	97.3
67	92.1
68	81.1
69	80.7
70	77.5
71	68.5
72	60.8
73	58.4
74	51.1
75	51
76	50.3
77	47.9
78	45.7
79	45.6
80	45.2
81	43.9
82	41.2
83	40.1
84	36
85	34.9
86	34.3
87	34.1
88	33.6
89	33.2
90	32.9
91	25
92	23.3
93	21.2
94	20.6
95	20.2
96	20
97	19.5
98	19.1
99	17
100	15.9
101	15.5
102	15.4
103	14.8
104	12.2
105	10.8
106	10.2
107	9.95
108	9.76
109	7.96

Negative control: 2.03

図30 PCAスクリーニング-蛍光陽性クローンの蛍光強度一覧

A) 2次、3次ソーティング後の細胞集団を限界希釈でクローン化し、培養した後、フローサイトメトリーで蛍光強度を測定した。例として4クローン(#8、#17、#24、#39)のヒストグラムを表示。解析ソフトFlowJoで平均蛍光強度 (MFI)を算出した。(B) 各クローンの平均蛍光強度 (MFI) を示した。Negative controlはライブラリーを導入していないN-Venus-マレクチン発現細胞のMFI。ピンク色は配列を調べたクローン。

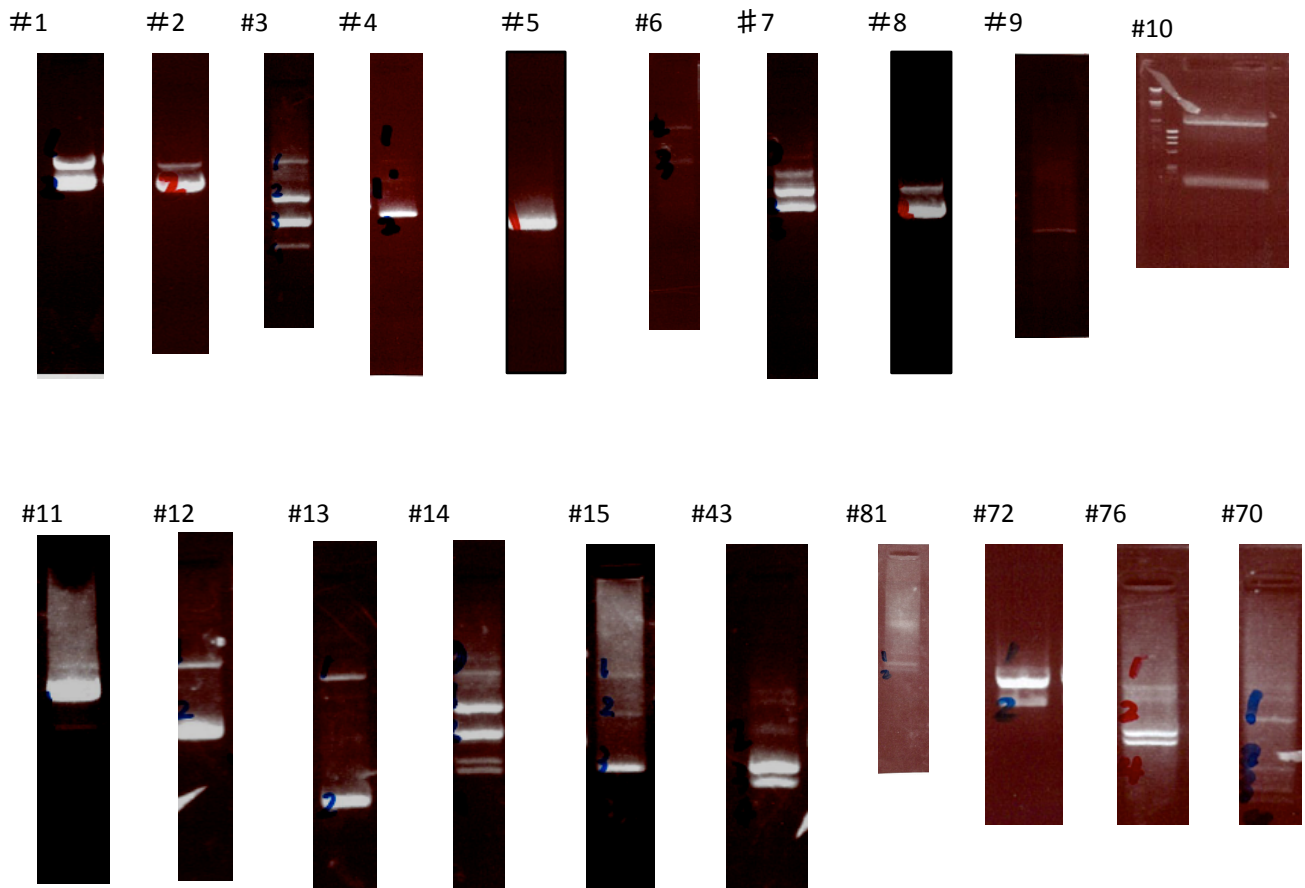


図31 蛍光陽性クローンにコードされているライブラリー由来の遺伝子の解析

選択した20クローンにコード各々されていたライブラリー由来の遺伝子をゲノムからゲノムダイレクトPCR、またはRNAからRT-PCRで増幅し、アガロースゲルで分離した。増幅されたライブラリー由来のcDNAは1種類/1クローンではなく、ほとんどが複数種類 (複数バンド)/1クローンで検出された。

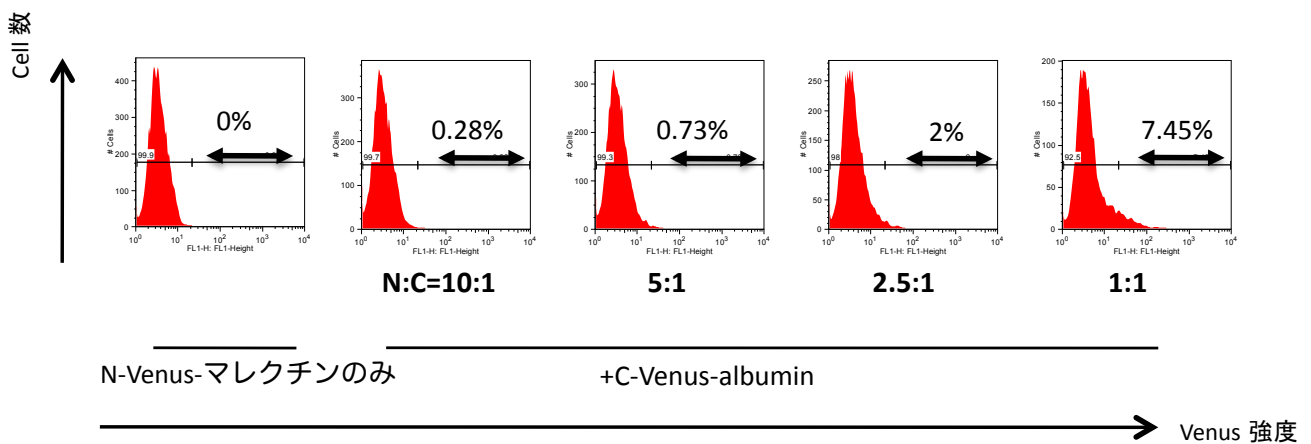
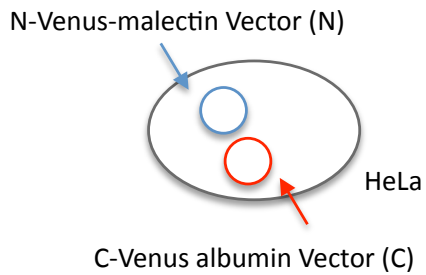


図32 一過性発現条件で行うPCAの条件検討

一過性発現条件でPCAを行うための適切なプラスミド導入比を検討した。24ウェルプレートにまいたHeLa細胞に、pcDNA3.1-N-Venus-malectin: pcDNA3.1-C-Venus-albumin=0.4 $\mu$ g: 0.04  $\mu$ g、0.4 $\mu$ g: 0.08  $\mu$ g、0.4  $\mu$ g: 0.16  $\mu$ g、0.4  $\mu$ g: 0.2 $\mu$ g、0.4  $\mu$ g: 0.4  $\mu$ gの条件でリポフェクションし、36 h後にフローサイトメトリーで解析した。ヒストグラム中の数字は、「N-Venus-マレクチンのみ」の蛍光強度の最高値をしきい値としたとき、その数字を上回る率。

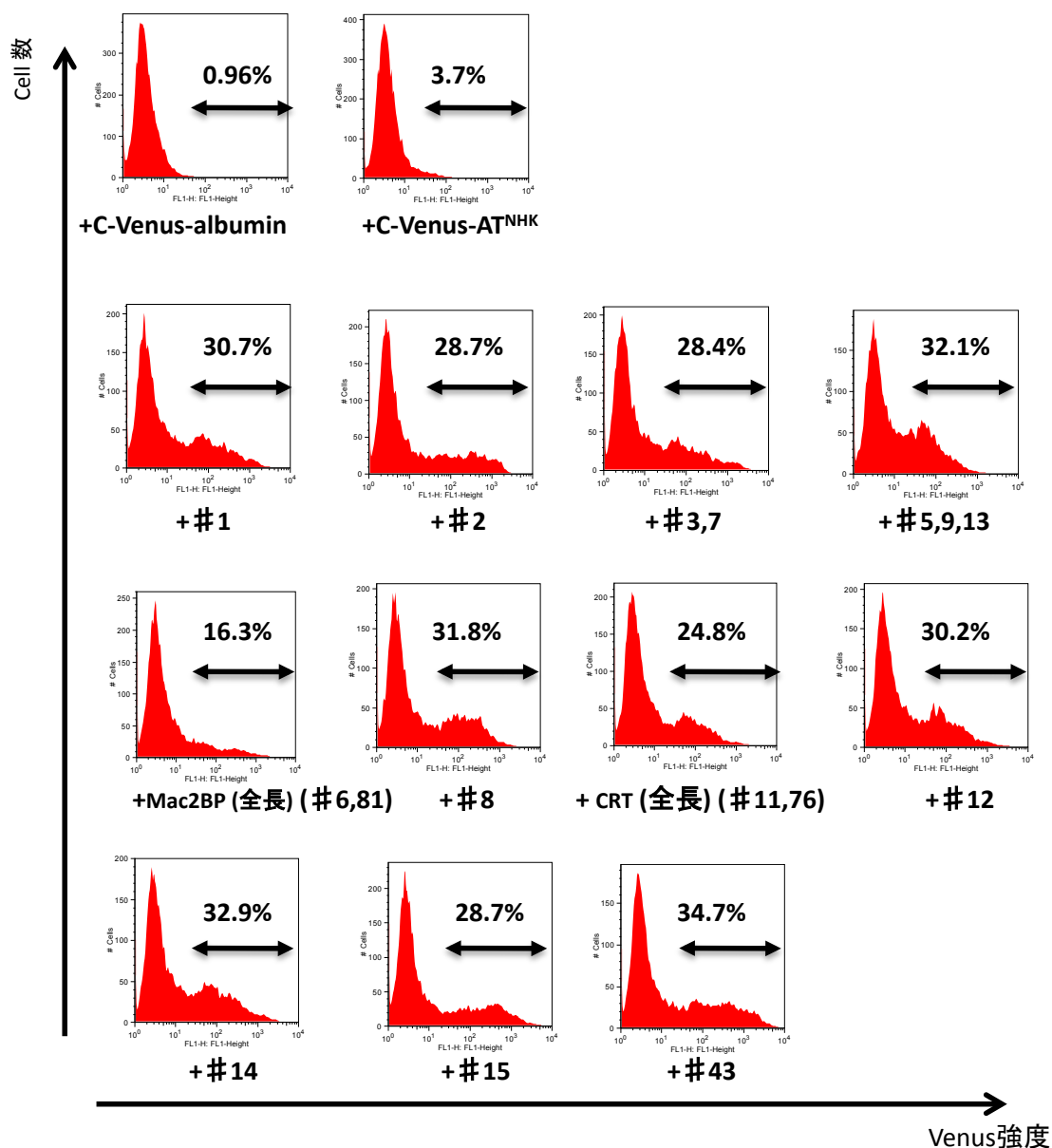
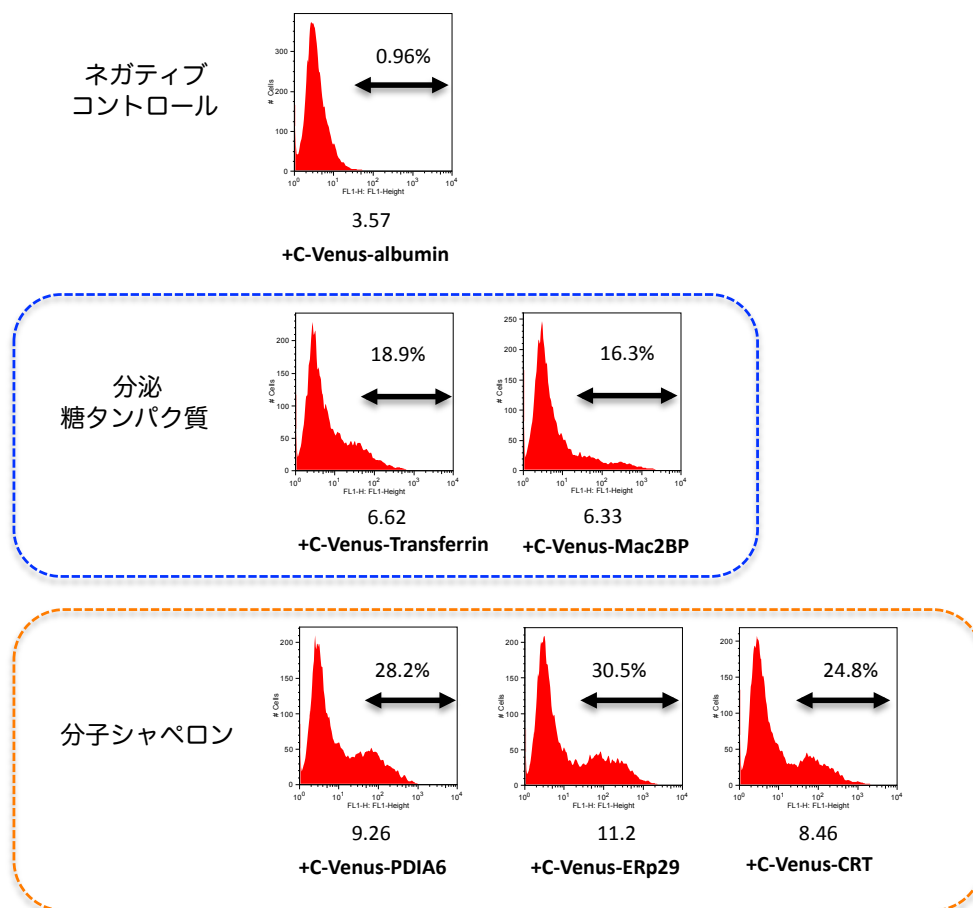


図33 一過性発現条件でのPCA (部分配列)

pcDNA3.1ベクターに挿入したN-Venus-マレクチンとpcDNA3.1ベクターにライゲーションした11種類のC-Venus側のライブラリー遺伝子(クローンにコードされていた配列のため遺伝子は部分配列)を用いて一過性発現条件でPCAをした。ただし、Mac2BPおよびCRTは全長配列を融合したC-Venusのベクターを使用した。pcDNA3.1-N-Venus-malectin: pcDNA3.1-C-Venus-ライブラリー遺伝子=5:1の比でHeLa細胞にリポフェクションし、36 h後にフローサイトメトリー解析した。

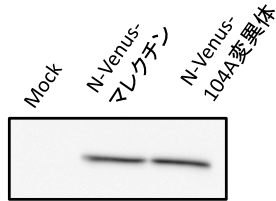


\* C-Venus-FK506BPは発現しなかった

図34 一過性発現条件でのPCA (全長配列)

マレクチンとの相互作用分子の候補に挙げた分泌糖タンパク質2種類と分子シャペロン3種類について、各遺伝子の発現領域の全長をC-Venusベクターにライゲーションし、pcDNA3.1-N-Venus-malectinと一過性発現条件でPCAを行った。ただし、FK506BPは発現しなかった。pcDNA3.1-N-Venus-malectin: pcDNA3.1-C-Venus-各遺伝子全長=5:1のプラスミド量比でHeLa細胞にリポフェクションし、36 h後にフローサイトメトリー解析した。ヒストグラム中数字の蛍光陽性率、サンプル上のMFIは解析ソフトFlowjoで算出した。

A



B

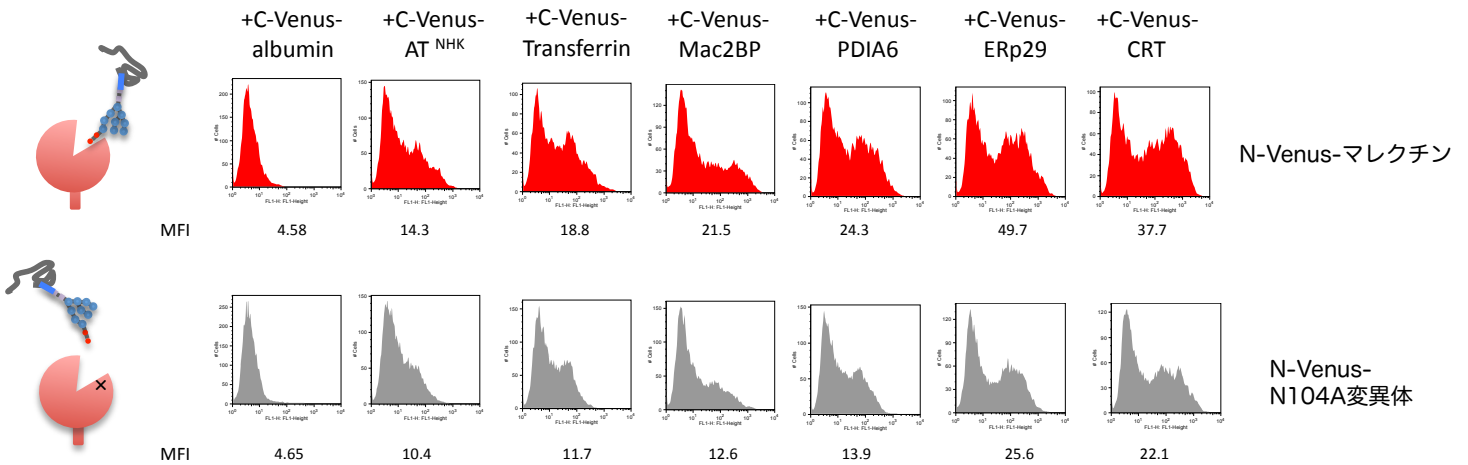


図35 マレクチン糖結合ドメイン変異体を用いた解析 (全長配列)

図34でマレクチンと相互作用することが示唆された分泌糖タンパク質2種類と分子シャペロン3種類についてN型糖鎖が結合に関与するか調べるため、マレクチンの糖結合ドメインN104A変異体を用いPCAで解析した。(A) pcDNA3.1-N-Venus-malectinとpcDNA3.1-N-Venus-malectinN104AをHeLa細胞にリポフェクションし、36 h後の両者の発現量を、抗GFP-N terminal抗体を用いたウエスタンブロッティングで比較した。(B) pcDNA3.1-N-Venus-malectinまたはN104A変異体とpcDNA3.1-C-Venusに挿入されたalbumin、AT<sup>NHK</sup>、Transferrin、Mac2BP、PDIA6、ERp29、CRTをHeLa細胞に5:1のプラスミド量比でHeLa細胞に共導入し、44 h後にフローサイトメトリーで解析した。MFI (平均蛍光強度) は解析ソフトFlowJoで算出した。



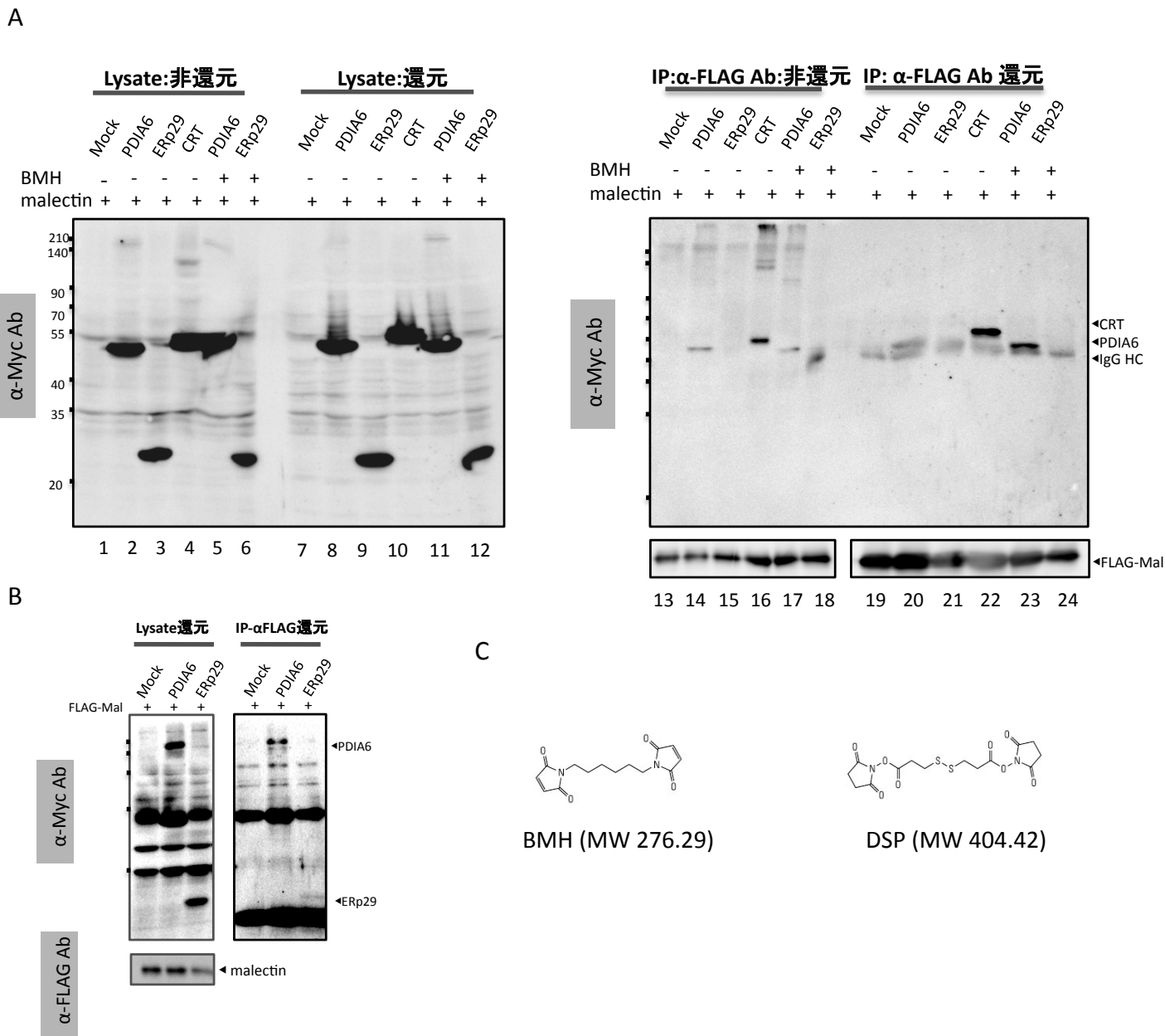
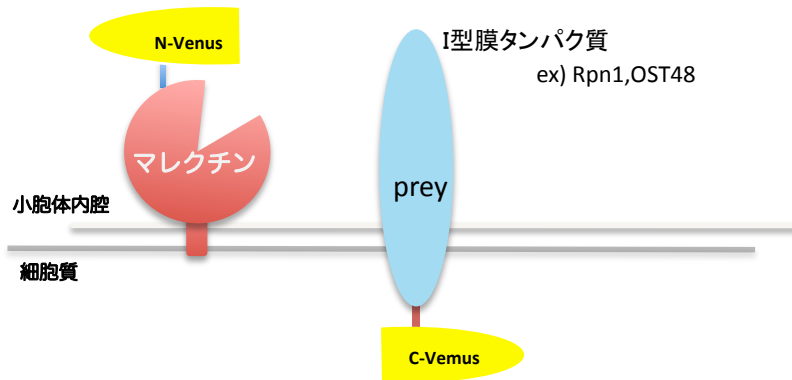


図36 共免疫沈降によるマレクチンとPDIA6、Erp29、CRTの相互作用の検出

(A) FLAGタグを融合したマレクチンとMycタグを融合したPDIA6、Erp29、CRTをHEK293T細胞に発現させ、架橋剤なしまたはBMHで架橋し、抗FLAG抗体で共免疫沈降した。MockはMycタグのみ発現するベクターを使用した。還元、非還元両方の条件でウエスタンブロッティングした。(B) DSPで架橋し、抗FLAG抗体で共免疫沈降した。還元条件でウエスタンブロッティングした。(C) 架橋剤BMH、DSPの構造。DSPは中心にS-S結合がある。構造式はPierce社の説明書より引用。

A



B

		C-Venus	
		N末側	C末側
N-Venus	N末側	ER可溶型/1型膜/一部の複数回膜型	ER可溶型/2型膜/一部の複数回膜型
	C末側	1型回膜/一部の複数回膜型	2型膜/一部の複数回膜型

※ ER可溶型：小胞体で可溶型で発現するタンパク質。膜タンパク質も、小胞体内腔に発現しかつ膜貫通領域がコードされていない部分配列の場合はこれに該当。

### 図37 I型膜タンパク質は本PCAでスクリーニングされない

(A) N-Venus-マレクチンと、C-VenusをC末に融合したI型膜タンパク質のPCAの模式図。N-VenusとC-Venusが近接できないことから、マレクチンとI型の膜タンパク質が相互作用しても蛍光を発しない。(B) N-Venus、C-Venusの融合位置の組み合わせと、スクリーニング可能なタンパク質の種類。黄色で示した組み合わせは、本スクリーニングの組み合わせ。

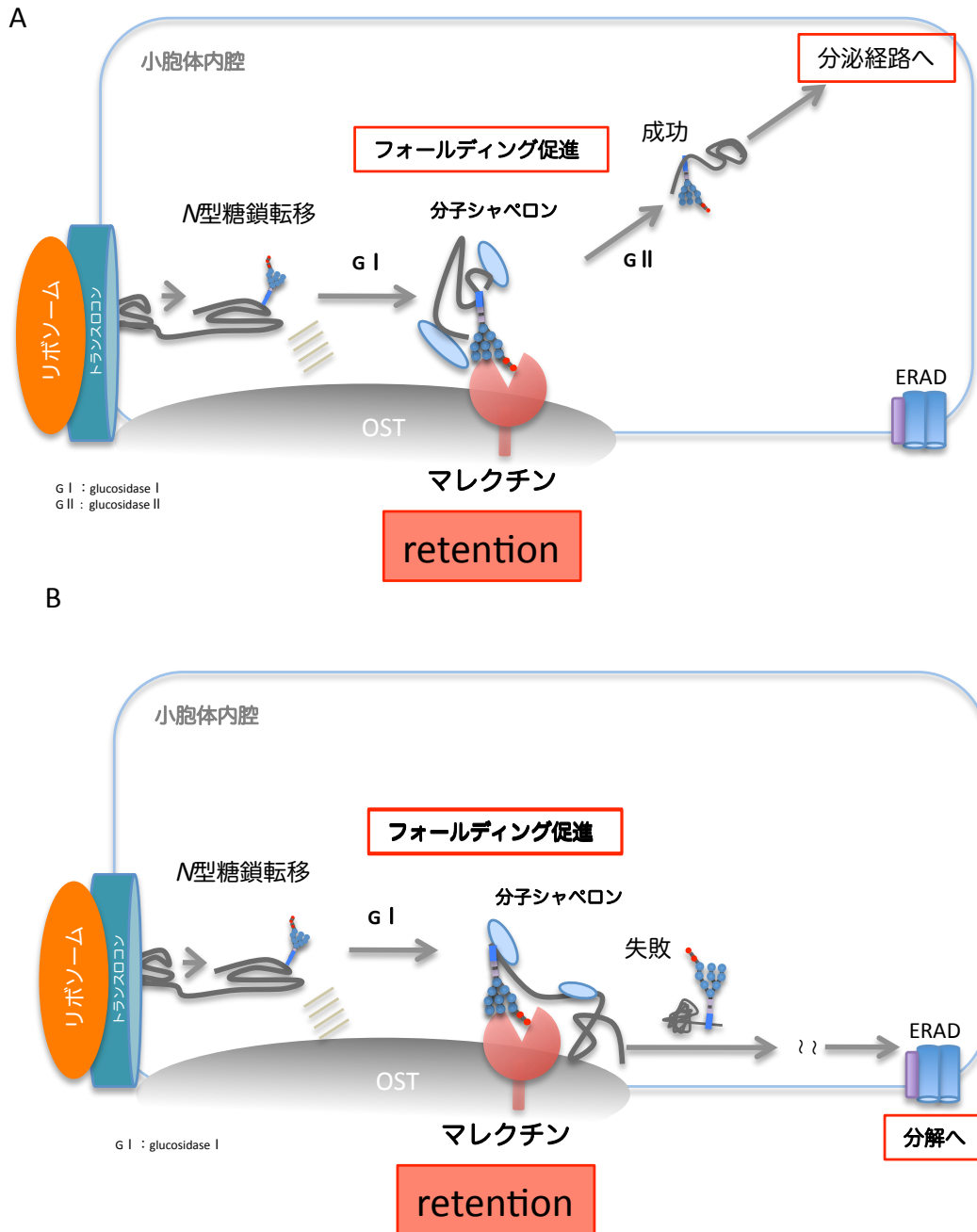


図38 糖タンパク質品質管理において予想されるマレクチンのはたらき

新生鎖がトランスロコンから小胞体に貫入するとOST複合体のSTT3によりG3M9糖鎖が転移され、同時にフォールディングも開始される。glucosidase IによるトリミングによりG2M9糖鎖となった新生鎖はマレクチンにトラップされ、マレクチンと間接的に相互作用するPDIA6、ERp29といった分子シャペロンのはたらきにより新生鎖のフォールディングが促進される。フォールディングに成功し疎水面を分子表面に露出しない新生鎖は分泌経路へと誘導されるが(A)、折りたたみに失敗し疎水面を多く露出したミスフォールドな新生鎖は、OST複合体上で捉えられERADを担う機構へと誘導される(B)。マレクチンは糖鎖を保持することで新生鎖の品質管理に関わっていると予想される。

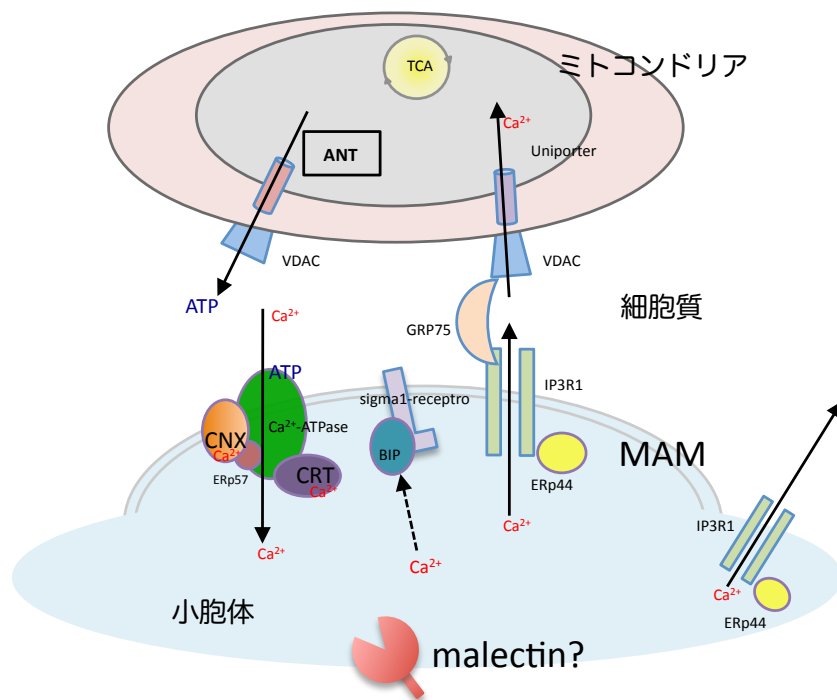
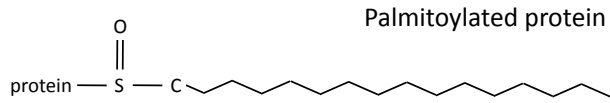


図39 小胞体のMAM領域における $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングと分子シャペロン

小胞体ではたらくシャペロン分子はMitochondria associated ER membrane (MAM) 領域で  $\text{Ca}^{2+}$ トランスポーターやチャンネルに結合し、ミトコンドリアの $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングとエネルギー代謝に関わる。Hayashi *et.al.*, *Trends in cell biology*, 2009を参照。

A



B

calnexin (CNX)

```

APPSSPKVTY KAPVPTGEVY FADSFDRGTL SGWILSKAKK DDTTDEIAKY 100
DGKWEVEEMK ESKLPGDKGL VLMSRAKHHA ISAKLNKPF FDTKPLIVQY 150
EVNFQNGIEC GGAVYKLLSK TPELNLDQFH DKTPYTIMFG PDKCGEDYKL 200
HFIFRHKNPK TGIYEKHKAK RPDADLKYF TDKKTHLYL ILNPDNSFEI 250
LVDSQVVNSG NLLNDMTPPV NPSREIEDPE DRKPEDWDER PKIPDPEAVK 300
PDDWDEDAPA KIPDEEATKP EGWLDDEPEY VPDPAEKPE DWDEDMGGEW 350
EAPQIANPRC ESAPGCGVWQ RPVIDNPNYK GKWKPPMIDN PSYQGIWKPR 400
KIPNPDFFED LEPFRMTPFS AIGLELWSMT SDIFFDNFII CADRRIVDDW 450
ANDGWGLKKA ADGAAEPGVV GQMIEAAEER PWLVVVVYILT VALPVFLVIL 500
ECCSGKKQTS GMEYKTDAP QPDVKEEEEE KEEKDKGDE EEEGEEKLEE 550
KQKSDAEEDG GTVSQEEEDR KPAAEEDIL NRSRNRKPR RE 592
  
```

マレクチン

```

MLGAWAVEGT AVALLRLLLL LLPPAIRGPG LGVAGVAGAA GAGLPESVIW 50
AVNAGGEAHV DVHGIHFRKD PLEGRVGRAS DYGMKLPILR SNPEDQILYQ 100
TERYNEETFG YEVPIKEEGD YVLVLKFAEV YFAQSQQKVF DVRLNGHVVV 150
KDLDIFDRVG HSTAHEIIP MSIRKGLSV QGEVSTFTGK LYIEFVKGYG 200
DNPKVCALYI MAGTVDDVPK LQPHPGLEKK EEEEEEEYD EGSNLKKQTN 250
KNRVQSGPRT PNPYASDNSS LMFPIIVAFG VFIPTLECLR 292
  
```

図40 パルミトイル化とマレクチン

(A) パリミチル酸の構造式 (B) calnexinとマレクチンのパルミトイル化される位置 (ただし、マレクチンは予想)。膜貫通領域:下線斜字、赤字: パルミトイル化に関わるシステイン残基、小胞体内腔: グレー色、細胞質領域: 黒色で正字。

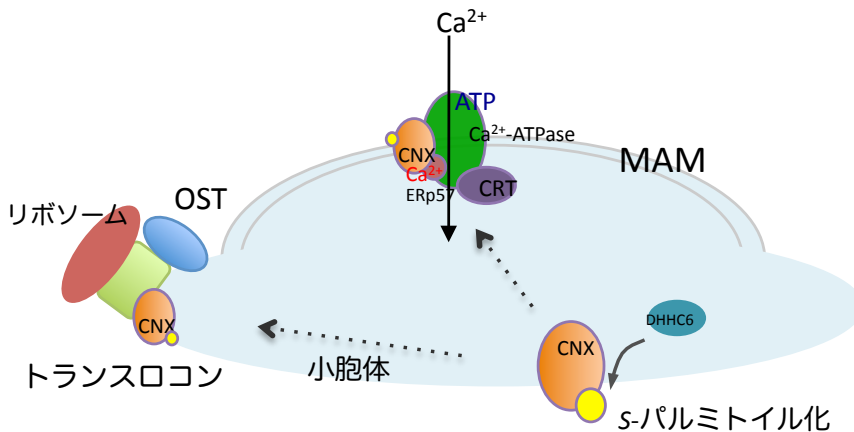


図41 s-パルミトイル化とCNX

DHHC6によってパルミトイル化されたCNXは、Sec61を中心とするトランスロコン複合体に移動し糖タンパク質の品質管理に関わるか (Lakkaraju *et.al.*, *EMBO. J.*, 2012)、Mitochondria associated ER membrane (MAM) 領域に移動しCa<sup>2+</sup>シグナル調節に関わる (Lynes *et.al.*, *EMBO. J.*, 2012, Lynes *et.al.*, *J.Cell. Sci.*, 2013)。

表1 小胞体ではたらく主要な分子シャペロン

Family	Main members	Function
HSP70	Bip/GRP78	Chaperon
HSP90	Endoplamin/GRP94	Chaperon
HSP40	ERdj1-ERdj7	Co-Chaperon
Lectins	calnexin, calreticulin EDEMs1, 2, 3 OS-9, XTP3-B malectin	Glycoprotein quality control Glycoprotein degradation Glycoprotein degradation ?
Glycan processing enzymes (lectins)	UGGT ER Glucosidase I, II ER mannosidases	Folding sensor Trims off glucose from N-Glycans Removes terminal mannoses
Peptidyl-prolys isomerase	Cyclophilin B, FK506BP, FKBP23, FKBP65	Isomerize peptide bonds
Thioredoxin PDI oxidative	PDI, ERp57, plus many others Ero1 $\alpha$ , Ero1 $\beta$ , PRDX4, VKOR, Gpx7/8	Oxidation for disulfide bonds Disulfide bond formation and isomerization

### ribophorin1

①	Sequence	$\Delta$ Mass	Prec MW	Conf
	ATSFLLALEPELEAR	-0.0952	1658.79	98

②	Sequence	$\Delta$ Mass	Prec MW	Confidence(%)
	ALTSEIALLQSR	0.0177	1300.75	99
	APDELHYTYLDTFGR	0.0258	1796.86	99
	ATSFLLALEPELEAR	0.0248	1658.91	99
	ISVIVETVYTHVLHPYPTQITQSEK	1.0502	2882.57	99
	LLALEPELEAR	-0.01	1252.69	99
	NIEIDSPYEISR	0.0136	1434.71	99
	NVESYTKLGNPTR	-0.0075	1622.80	99
	SEDLLDYGPFRR	0.0185	1310.63	99
	VHYENNSPFLTITSMTR	0.041	2009.99	96

### ribophorin2

③	Sequence	$\Delta$ Mass	Prec MW	Conf
	EETVLATVQALQTASHLSQQADLR	0.837	2609.18	99
	SIVEEIEDLVAR	-0.1118	1371.61	99
	YHVPVVVVPEGSASDTHEQAILR	0.8459	2503.13	99
	YIANTVELR	-0.0891	1077.49	93
	FELDTSER	-0.0833	995.37	63
	QEIQHLFR	-0.0942	1069.47	1

### OST48

④	Sequence	$\Delta$ Mass	Prec MW	Conf
	NLLIAGLQAR	-0.2301	1168.46	80
	YSQTGNYELAVLSR	-0.0477	1671.76	14
	SSLNPILFR	-0.0493	1045.54	1

⑤	Sequence	$\Delta$ Mass	Prec MW	Conf
	TLVLLDNLNVR	-0.0725	1268.67	99
	YSQTGNYELAVLSR	-0.0737	1670.75	99
	NLLIAGLQAR	-0.0701	1168.62	95
	SSLNPILFR	-0.0593	1045.53	2

表2 マレクチンと共沈したタンパク質の同定～SDS-PAGEの分離を利用

図13で得られた①-⑤のバンドに含まれるタンパク質に関して、MALDI-TOF-MSを用いた質量分析を行い、タンパク質を同定した。左側の数字は図13の銀染色の結果のバンドのナンバーを示す。質量分析で得られたMSおよびMS/MSのデータを解析ソフトのProteinPilotで解析することでタンパク質を同定した。Sequence: 同定されたペプチド、 $\Delta$ Mass: 測定された質量と実際の質量の誤差、Prec MW: MS/MS分析したペプチドの質量、Conf (%) : 結果の信頼性。ただし、①のバンドからはマレクチン由来のシグナルも検出された。

表3 マレクチンと共沈したタンパク質の同定～Nano-LCによる分離を利用

No	Total score	% Cov	Name
1	38.69	65.1	Malectin OS=Homo sapiens GN=MLEC PE=1 SV=1
2	23.70	54.0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens GN=RPNI PE=1 SV=1
3	12.81	47.4	Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=1 SV=1
4	12.20	41.2	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2
5	8.54	35.2	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
6	8.23	33.3	Protein arginine N-methyltransferase 5 OS=Homo sapiens GN=PRMT5 PE=1 SV=4
7	5.70	43.3	spt P00761  Trypsin precursor (EC 3.4.21.4) [Sus scrofa (contaminant)]
8	2.51	20.1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit STT3A OS=Homo sapiens GN=STT3A PE=1 SV=2
9	2.25	8.9	G-protein coupled receptor 98 OS=Homo sapiens GN=GPR98 PE=1 SV=1
10	2.03	15.1	Protocadherin-16 OS=Homo sapiens GN=DCHS1 PE=2 SV=1
11	2.02	41.3	ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=1 SV=4
12	2.01	36.4	Retinol dehydrogenase 12 OS=Homo sapiens GN=RDH12 PE=1 SV=3
13	6.54	31.0	Actin, alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA1 PE=1 SV=1
14	2.00	21.7	Nuclear receptor corepressor 2 OS=Homo sapiens GN=NCOR2 PE=1 SV=1
15	2.00	18.1	VPS10 domain-containing receptor SorCS3 OS=Homo sapiens GN=SORCS3 PE=2 SV=2

Total score: 同定したペプチドの信頼性から計算。99%: 2点, 95%: 1.3点, 66%: 0.47点として計算。% Cov: タンパク質の配列の中で同定されたペプチドが占める割合。  
 無色で示されたタンパク質は、操作過程で混入したと考えられるタンパク質、除きられなかった核タンパク質またはネガティブコントロールでも同定されたタンパク質。  
 黄色で示されたタンパク質は無印の条件に該当せず、マレクチンと相互作用する分子として同定されたタンパク質。Score上位15位を記載した。



表4 PCAで同定された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No
1	FK506BP	57	142	None	Chaperon	ER	#5/#9/#13
2	PDIA6	144	440	None	Chaperon	ER	#8
3	ERP29	180	266	None	Chaperon	ER	#15
4	calreticulin	375	417	1	Chaperon	ER	#11/#76
5	cathepsinZ	226	303	2	Glycoprotein	Lysosome	#3/#7
6	Transferrin	330	698	3	Glycoprotein	Secreted	#1
7	granulin	273	593	5	Glycoprotein	Secreted	#12
8	Mac2-BP	405	585	7	Glycoprotein	Secreted	#6/#81
9	apolipoprotein E (APOE)	309	317	7	Glycoprotein	Secreted	#14
10	TAPASIN	293	448	1		Golgi or ER	#2
11	integral membrane protein C2	160	267	1		Golgi	#43

