

博士論文番号：0981027

新規小胞体膜タンパク質 DNAJB12 の機能解析

山本 洋平

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座

(河野 憲二 教授)

平成 24 年 1 月 24 日提出

所属 (主指導教員)	動物細胞工学 (河野 憲二 教授)		
氏名	山本 洋平	提出	平成23年12月20日
題目	新規小胞体膜タンパク質 DNAJB12 の機能解析		

要旨

細胞内ではフォールディングに失敗した異常タンパク質が恒常的に生じている。細胞はこれらを認識して修復または分解、無毒化することにより、恒常性を維持している。小胞体で構造異常タンパク質が生じると、当該タンパク質は小胞体からサイトゾルへと逆行輸送された後、プロテアソーム系で分解される。この過程は小胞体関連分解(ER-associated protein degradation; ERAD)と呼ばれている。構造異常膜タンパク質の分解に関しては、出芽酵母において ER 膜に局在する DnaJ タンパク質である Hlj1 と Hsp70 である Ssa1 が共同して、分解基質とユビキチンリガーゼ (E3)との結合、及びユビキチン化を促進することが報告されていた。しかし、高等真核生物で膜タンパク質の分解に関与する DnaJ family タンパク質は同定されていなかった。私は、その候補として DNAJB12 に着目した。このタンパク質は、酵母からヒトまで保存されているが、その機能は不明であった。但し、一次配列から、このタンパク質は膜に局在化し、分子内に J-domain を持つことが予想された。事実、proteinase K を用いたトポロジー解析、免疫染色実験、及び免疫沈降実験から、DNAJB12 は小胞体に局在する II 型の一回膜貫通タンパク質であり、自身の J-domain を介して、Hsc70 (サイトゾルの Hsp70 ファミリータンパク質) と結合することが判明した。

次に、DNAJB12 の過剰発現が小胞体の構造異常膜タンパク質の分解に及ぼす影響をパルスチェイス実験で調べた。その結果、DNAJB12 はこのようなタンパク質に対して、著しい分解促進能を持つことが明らかになった。一方、同条件下、プロテアソーム阻害剤である Lactacystin を添加した場合、その分解は抑制された。また、Hsc70 との結合能を欠失した DNAJB12 の H139Q 変異体では、分解促進能は確認できなかった。更に、siRNA を用いた、ノックダウン法により内在性の DNAJB12 の発現量を低下させたところ、分解基質の安定化が確認された。

以上の結果から、DNAJB12 は、自身の持つ J-domain を介して Hsc70 と結合することにより、小胞体の構造異常膜タンパク質の分解をプロテアソーム依存的に促進することが分かった。即ち、DNAJB12 は小胞体の膜タンパク質の品質管理に重要な役割をはたすことが明らかになった。

それでは、DNAJB12は小胞体内腔の構造異常分泌タンパク質の分解に働くであろうか。この点を調べる為に、私は、モデル基質として α 1-アンチトリプシンの変異体である null Hong Kong (NHK) を利用した。その結果、DNAJB12はこの基質の分解を促進しないことが判明した。よって、DNAJB12は小胞体内腔のタンパク質の品質管理には関与しないことが示唆された。

さらに、DNAJB12の細胞内における更なる機能解析をするために、質量分析法を用いてDNAJB12の相互作用因子の探索を行った。その解析の結果、DNAJB12の相互作用因子としてp62が(Sqstm1/A170)が同定された。p62は高等動物のサイトゾルに局在するタンパク質であり、様々なシグナル伝達や選択的オートファジーに関与していることが報告されている。

p62はN末端側のPB1-domainを介して自身がオリゴマー化する。さらにC末端側のUBA-domainでユビキチン化タンパク質と結合し、サイトゾルで凝集体を形成する。このp62凝集体を起点として、アポトーシスなどのシグナル伝達が活性化される。さらにp62のノックダウンによってアポトーシスが抑制されることも知られている。即ち、細胞内においてp62の存在量が制御されることが、細胞の恒常性維持に重要である。またp62の一部が小胞体膜近傍に局在していることも報告されている。以上のことから私はDNAJB12が小胞体膜上でp62を分解し、アポトーシスをはじめとするシグナル伝達を制御しているのではないかと予想した。

このモデルを検証するために、まず、DNAJB12の過剰発現が内在性のp62の分解におよぼす影響をパルスチェイス実験により解析した。その結果、DNAJB12によるp62の分解促進が確認された。一方、同条件下、プロテアソーム阻害剤であるMG132を添加した場合には、p62の分解が抑制された。更に、DNAJB12の発現量をノックダウンにより低下させたところp62の分解は顕著に抑制された。また、同条件下、細胞内に著しいp62の凝集体の蓄積も観察された。以上の結果より、細胞内でp62の一部はDNAJB12依存的にプロテアソーム系で分解促進されることが明らかになった。

それでは、ここで観察された現象—DNAJB12依存的なp62の分解—は、どのような生理的な意義をもつのであろうか。このことを調べる目的で、DNAJB12の発現抑制が細胞のアポトーシスにおよぼす影響を調べた。アポトーシス誘導条件下、DNAJB12のノックダウンをおこなうと、アポトーシスを起こしている細胞の割合が著しく上昇した。この結果から、DNAJB12はアポトーシスの制御にも重要であることが示唆された。

細胞内では、p62の存在量の変化によってアポトーシスや酸化ストレス応答を始めとする様々な反応が制御されている。よって、p62の細胞内存在量の調節は重要である。本研究から、p62の量を適切なレベルに保つために、小胞体の膜タンパク質DNAJB12が重要な役割を果たしているという新知見を得た。今後は、この制御に小胞体が果たす役割やこの制御のもつ生理的な役割の全貌を明らかにしていきたい。

目次

略語	6-7
序章	8-12
タンパク質分解の概要	8
小胞体関連分解 (<u>ER-Associated Degradation</u> : ERAD)	9-12
図表	13-17

第一章

序論	19
材料と方法	20-24
結果	25-29
DNAJB12 は小胞体に局在し、J ドメインをサイトゾル側に持つ II 型の一回膜貫通タンパク質である	25-26
DNAJB12 は J ドメインを介してサイトゾルの Hsc70 と結合する	26-27
DNAJB12 は CFTR の分解を促進する	27-28
DNAJB12 は構造異常膜タンパク質の ERAD に寄与する	28-29
考察	30-31
図表	32-45

第二章

序論	47
材料と方法	48-51
結果	52-57
DNAJB12 と相互作用するタンパク質の同定	52-53
DNAJB12 と p62 は実際に結合する	53-54
DNAJB12 と p62 の細胞内局在	54
DNAJB12 はユビキチン-プロテアソーム系で p62 の分解を促進する	54-56

DNAJB12 のノックダウンにより、p62 の細胞内凝集体が著しく増加する	56
DNAJB12 のノックダウンにより、アポトーシスが促進される	56-57
考察	58-61
図表	62-83
謝辞	84
参考文献	85-89

略語

A1AT: α 1-antitrypsin

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CNX: Calnexin

CRT: Calreticulin

ERAD: Endoplasmic reticulum-associated degradation

ERAD-C: ERAD-Cytosol

ERAD-L: ERAD-luminal

ER Man: ER mannosidase I

Hsc70: Heat Shock Protein of 70kDa cognate

Hsp40: Heat Shock Protein of 40kDa

Hsp70: Heat Shock Protein of 70kDa

KIR: Keap1-interacting region

LIR: LC3-interacting region

Luc: Luciferase

NHK : α 1-antitrypsin genetic variant-null Hong Kong

PB1: Phox1 and Bem1p

TCRa: T cell-receptor α subunit

UBA: ubiquitin-associated domain

VSVG: Vesicular stomatitis virus G protein

序章

タンパク質分解の概要

タンパク質分解は生物が生きて行くために必要不可欠な現象であり、発生、分化、転写制御、抗原提示、シグナル伝達、タンパク質の品質管理などの種々の生命現象に深く関わっている。タンパク質の品質管理は細胞の恒常性を保つ上でとても重要な役割を果たしている。タンパク質は短いもので数分、長いもので数ヶ月の寿命があり、半減期が5時間以内のものは短寿命タンパク質、50時間以上のもは長寿命タンパク質と呼ばれている(Schimke, R.T., and Doyle, D. 1970; Goldberg, A.L., and St John, A.C. 1976)。細胞内のタンパク質分解機構は大きくユビキチン-プロテアソームによる分解とリソソーム（オートファジー）による分解の二つに分けられ、前者は主に短寿命タンパク質の分解に、後者は長寿命タンパク質の分解に関与していると考えられている(Levine, B., and Klionsky, D.J. 2004; Cuervo, A.M. 2004; Shintani, T., and Klionsky, D.J. 2004; Klionsky, D.J. 2005)(図 1)。これらの分解系の破綻は様々な疾患へと繋がり、悪性腫瘍、神経変性疾患、慢性炎症などが引き起こされることが報告されている。

ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解は、E1（活性化酵素）／E2（結合酵素）／E3（ユビキチンリガーゼ）の3種類の酵素群によって基質タンパク質にポリユビキチン鎖を付加することから始まる。続いて、付加されたポリユビキチン鎖が分解シグナルとしてプロテアソームによって捕捉され、基質タンパク質は分解される。興味深いことに、サイトゾルに存在するタンパク質のみではなく、小胞体内でフォールディングに失敗したタンパク質も小胞体からサイトゾルへと逆行輸送された後に、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される。この過程を小胞体関連分解(ER-Associated Degradation : ERAD)と呼ぶ(Meusser et al., 2005)(図 2)。

小胞体関連分解 (ER-Associated Degradation : ERAD)

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の輸送の起点となっている。ここでタンパク質は N 結合型糖鎖やジスルフィド結合などの翻訳後修飾を受けながら正しい構造へと折り畳まれ、ゴルジ体へと送られる。ERAD は小胞体内における嚴重なタンパク質の品質管理機構の一翼を担う重要な機構であり 3つのプロセスからなっている。①小胞体内で構造異常タンパク質を特異的に認識する機構、②構造異常タンパク質を小胞体内から細胞質側へと逆行輸送する機構、③細胞質に出た構造異常タンパク質を分解する機構の 3つである(Meusser et al., 2005) (図 2, 表 1)。

[構造異常タンパク質認識機構]

リボソームによって新規に合成されたタンパク質は疎水性領域をむき出しにした非常に無防備な状態である。分子シャペロンと総称されるタンパク質はフォールディング途中のタンパク質表面に露出している疎水性領域を認識して結合、その成熟を補助している。分泌経路のタンパク質合成の場である小胞体にも分子シャペロンは存在しており、主に BiP(Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein; Grp78 (Glucose Regulated Protein 78)とも呼ばれる小胞体内在性 Hsp70; Heat Shock Protein of 70kDa), Hsp40, Grp94(小胞体内在性 Hsp90), PDI(Protein Disulfide Isomerase), calnexin / calreticulin (CNX/CRT)などが知られている(表 1)。分子シャペロンはタンパク質のフォールディングを補助する一方で、分解にも寄与する。BiP は小胞体膜上の E3 複合体に結合し、構造異常タンパク質を受け渡すと考えられている。しかし、BiP が基質タンパク質のフォールディングと分解をどのように選択しているのかは明らかになっていない。N-結合型の糖タンパク質については、糖鎖のトリミングによって分解のタイミングが決定されている。マンノシダーゼ I (ER Man I) は Man₉型の N-結合型糖鎖(Man₉GlcNAc₂)からマンノース 1 分子を切断して Man₈型に変換する。この反応は ER Man I の濃度が低いために起こりにくい、小胞体で長時間フォールディングできなかつたタンパク質の糖鎖はいずれトリミングを受けることになる(Ellgaard and Helenius 2003)。レクチン様タンパク質である EDEM および OS9/Yos9 は Man₈型糖鎖をもつ構造異常タンパク質を認識して、分解機構に受け渡すと考えられている(Hosokawa et al., 2001)。すなわち、ER Man I によるトリミングを受けるまでの時間がフォールディングの制限

時間となるのである。

【逆行輸送】

新生ポリペプチド鎖は、10回膜貫通タンパク質である Sec61 α 及び1回膜貫通タンパク質である Sec61 β, γ のヘテロ三量体からなる膜透過装置を通過して小胞体内へと入って行く。このタンパク質の順行輸送の過程はよく理解されているが、構造異常タンパク質が小胞体からサイトゾルへと向かう逆行輸送を行う膜透過チャンネルの実体は未だ明らかになっておらず、いくつかの仮説が提唱されている。一つは、逆行輸送に関しても Sec61 複合体が膜透過装置として機能している可能性である。そのほか、小胞体膜タンパク質である Derlin1/Der1 や Hrd1, TEB4/Doa10 もチャンネル候補に挙げられている(表 1)。このうち、Hrd1 と Doa10 は ERAD に関与する E3 である (後述)。

【ユビキチン-プロテアソーム分解】

ERAD に関与する E3 のほとんどは小胞体膜上に存在し、複数のタンパク質と共に複合体を形成している。出芽酵母では、Hrd1 と Doa10 が ERAD に必要な E3 であり、どちらも小胞体に局在する膜タンパク質である。Hrd1 複合体には、Hrd3, Usa1, Der1, Ubx2 などのタンパク質が含まれる。Hrd3 は Hrd1 を安定化すると共に、小胞体内腔ドメインで Yos9 と結合する。BiP も Yos9 を介して間接的に Hrd3 に結合する。Hrd3 は、基質タンパク質が BiP や Yos9 から Hrd1 複合体に受け渡されるための窓口として機能すると考えられている。膜透過チャンネル候補である Der1 は Usa1 を介して Hrd1 に結合しているが、Der1 と Usa1 の詳細な機能は不明である。Hrd1 によってポリユビキチン化を受けた基質タンパク質は、Cdc48 によってサイトゾルに引き出される。Cdc48/p97 は AAA+ATPase ファミリータンパク質であり、Ubx2 は Cdc48 複合体を Hrd1 複合体に誘導する役割を担う(図 3-A)。小胞体内腔の構造異常可溶性タンパク質や、内腔側に構造異常部位を持つ膜タンパク質のポリユビキチン化は主に Hrd1 複合体によって行われると考えられており、この過程は ERAD-L (L:Luminal) と呼ばれている(図 3-A)。

一方、Doa10 複合体は Doa10 と Ubx2 のみから構成されている。サイトゾル側に構造異常部位のある膜タンパク質は主に Doa10 複合体により処理されると考えられており、こちらは ERAD-C(C:Cytosolic) と呼ばれている(Carvalho, P et

al., 2006)(図 3-B)。

哺乳類細胞において ERAD に関与する E3 としては、HRD1 と TEB4 (Doa10 のオーソログ) に加え、RMA1 と CHIP が知られている(表 1)。RMA1 は小胞体膜タンパク質であるが、CHIP はサイトゾルの可溶性タンパク質である (Meacham et al., 2001; Morito et al., 2008)。HRD1 は出芽酵母 Hrd1 複合体に類似した複合体を形成する。出芽酵母の Hrd3, Usa1, Der1 については、SEL1, HERP, Derlin-1,-2,-3 がそれぞれ哺乳類のオーソログとして知られ、HRD1 複合体に含まれる(表 1)。また、酵母 Ubx2 のオーソログは見つかっていないが、VIMP が functional analogue として同様の役割を果たしている。出芽酵母で見られる ERAD-L,-C のような E3 の使い分けが、哺乳類細胞においてなされているかどうかは、明らかになっていない(図 3-C)。

構造異常膜タンパク質の ERAD においてはサイトゾルの Hsp70 ファミリー及び、そのコファクターである DnaJ タンパク質が重要な役割をしていることが知られつつある。出芽酵母の研究からサイトゾルの Hsp70 である Ssa1 と小胞体膜上にアンカーされている DnaJ タンパク質である Hlj1 が小胞体膜に生じた構造異常タンパク質の ERAD において重要であることが示されている (Youker et al., 2004)。

哺乳動物細胞においてもサイトゾルの Hsp70 ファミリータンパク質である Hsc70 が小胞体の構造異常膜タンパク質の ERAD に重要であることが示されていた。しかし、この過程で Hsc70 と共に働く哺乳動物細胞の DnaJ タンパク質は同定できていなかった。第一章で私はこのような働きをもつ新規の DnaJ タンパク質の同定に成功している。以下、DnaJ タンパク質の基本的な特徴について説明する。

[DnaJ タンパク質]

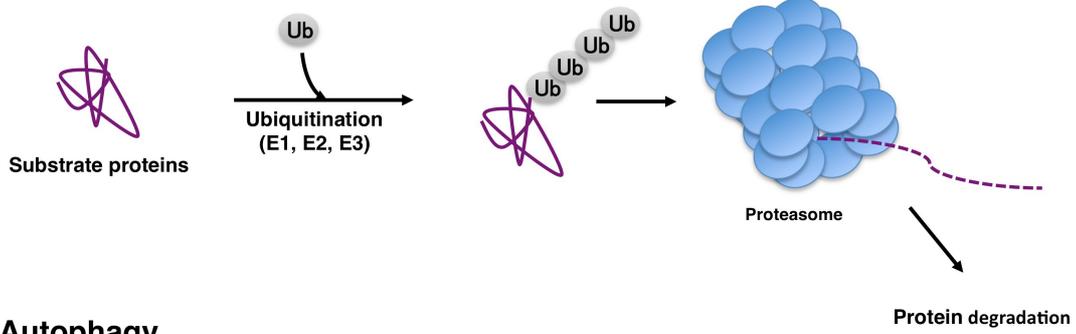
DnaJ (Hsp40)タンパク質は Hsp70 ファミリータンパク質の補助因子として機能する。J ドメインは約 70 アミノ酸残基からなり、DnaJ タンパク質の間で特に相同性の高い領域である。DnaJ タンパク質は J ドメインを介して Hsp70 と結合、その ATPase 活性を上昇させることにより、様々な基質タンパク質への Hsp70 の結合を促進する。現在、ヒトでは 40 種類以上の DnaJ タンパク質が同定されている。

[小胞体の J タンパク質]

小胞体に局在する DnaJ タンパク質は、7 種類が報告されていた。このうち、ERdj1/ MTJ1、ERdj2/Sec63、ERdj4/MDG1 及び ERdj7/Gng10 は小胞体内腔側に J ドメインを持つ膜タンパク質であり、BiP と共に新生タンパク質の順行輸送を促進している(p35, 図 5-D 参照)。他の 3 種類(ERdj3,5 及び p58^{IPK})は小胞体内腔の可溶性タンパク質であり、BiP と共に基質タンパク質のフォールディングや ERAD に寄与している(Chevalier et al., 2000; Kurisu et al., 2003; Hosoda et al., 2003; Dong et al., 2008; Ushioda et al., 2008; Jin et al., 2009; Zahedi et al., 2009)。しかし、哺乳動物において、小胞体の構造異常膜タンパク質の ERAD に働く DnaJ タンパク質は同定されていなかった。

図表

1. Ubiquitin proteasome system



2. Autophagy

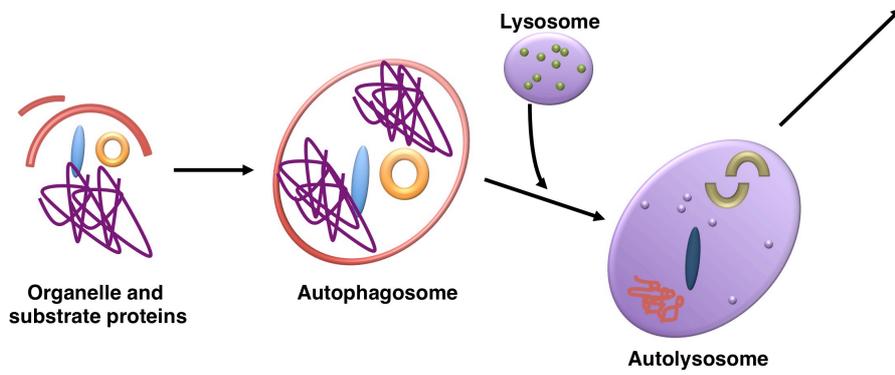


図 1 細胞内におけるタンパク質分解系の概要
本文参照

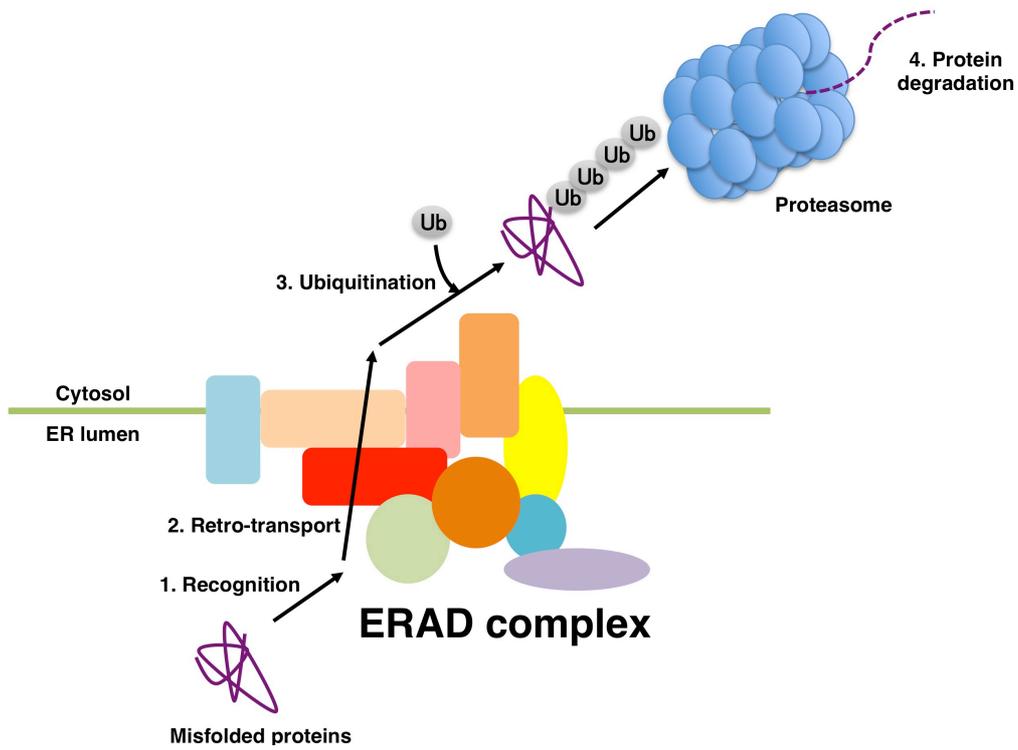
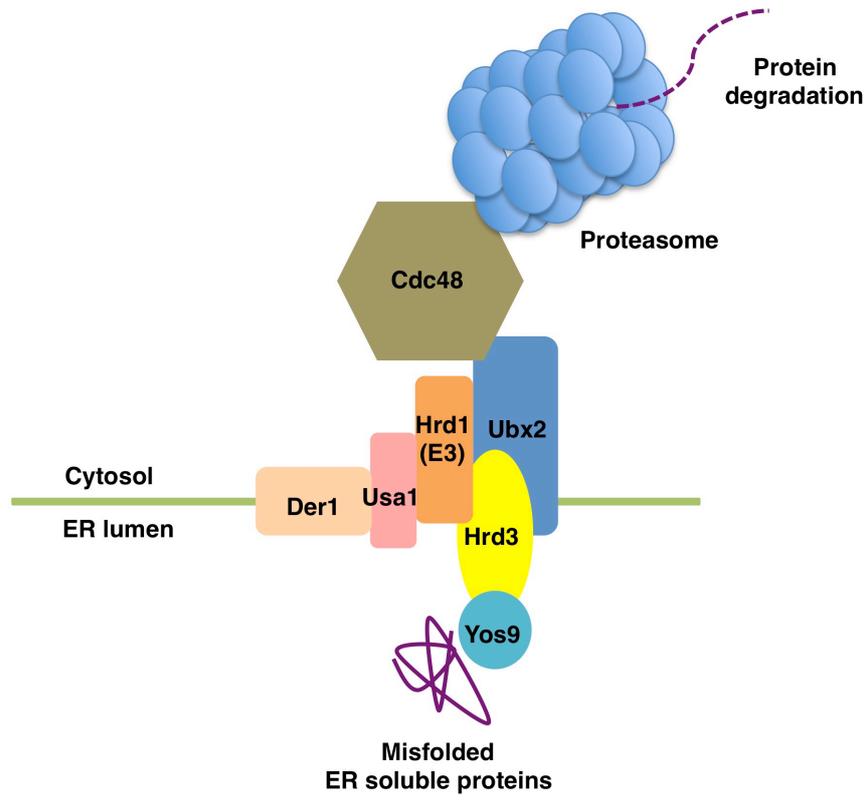
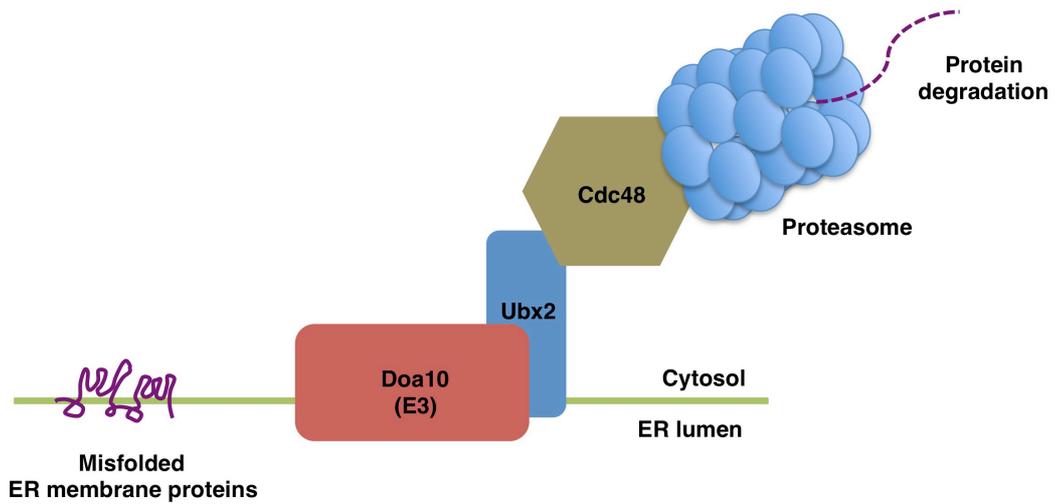


図 2 小胞体関連分解(ER-Associated degradation; ERAD)の概要
本文参照

A



B



C

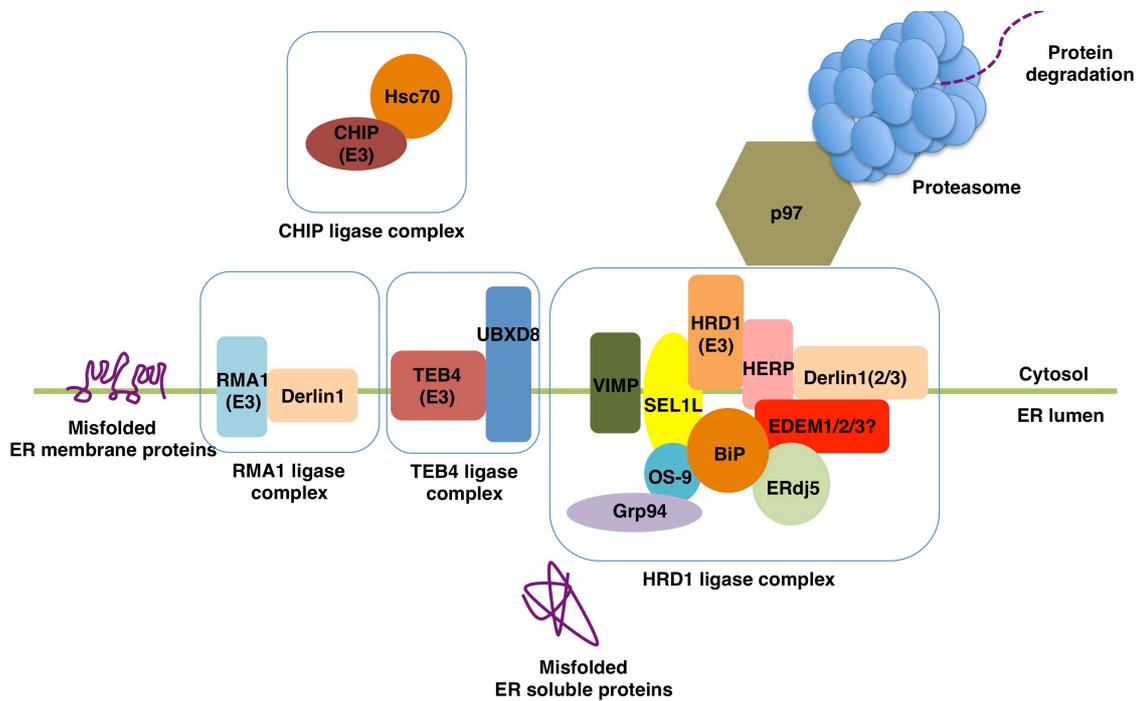


図 3 出芽酵母および哺乳動物における ERAD の概要

(A) 出芽酵母における ERAD-L(ERAD-Luminal)についての概略図

本文参照

(B) 出芽酵母における ERAD-C(ERAD-Cytosol)についての概略図

本文参照

(C) 哺乳動物における ERAD についての概略図

本文参照

ERAD における 基本過程	Human	Other name	Localization	Yeast homolog
小胞体内における構 造異常タンパク質の 認識とプロセッシング	ER ManI EDEM1-3 PDI BiP GRP94 ERdj5 OS-9 SEL1L	GRP78 JPDI	Membrane ER ER ER ER ER ER Membrane	Mns1 Htm1(Mnl1) Pdi Kar2 - - Yos9 Hrd3
基質の逆行輸送のチ ャネル候補	Sec61 complex Derlin1-3		Membrane Membrane	Sec61 complex Der1
E3 ライゲース	HRD1 TEB4 RMA1 CHIP	Synoviolin MARCHVI RNF5 STUB1	Membrane Membrane Membrane Cytosol	Hrd1/Der3 Doa10 - -
分解基質のプロテア ソームへの移行	p97 UBXD8	VCP ETEA	Cytosol Membrane- associated	Cdc48 Ubx2
その他	HERP VIMP	Mif1 ERASIN	Membrane Membrane	Usa1 -

表 1 小胞体関連分解(ERAD)に関わる主要因子

第一章

序論

動物細胞の小胞体膜に構造異常タンパク質が生じると、これは小胞体からサイトゾルへと逆行輸送され、サイトゾル中のプロテアソーム系で分解をうける (Yang et al., 1993; Ward et al., 1995; Younger et al., 2006; Morito et al., 2008)。この過程にはサイトゾルのHsp70ファミリータンパク質であるHsc70が必要である (Meacham et al., 2001; Okuda-Shimizu and Hendershot, 2007; Nakatsukasa et al., 2008)。一般にHsp70ファミリータンパク質が特定の機能を果たす際にはコファクターとして、特定のDnaJファミリータンパク質を必要とする。事実、出芽酵母においてはHsp70であるSsa1と小胞体膜に存在するDnaJタンパク質であるHlj1 とが協働して働き、構造異常膜タンパク質の分解を促進することが知られていた (Youker et al., 2004)。しかし、哺乳動物においては、このような過程に働くDnaJタンパク質は同定されていなかった。

私は、その候補としてDNAJB12に着目した。このタンパク質は、分裂酵母からヒトまで保存されているが、その機能は不明であった (図4)。但し、一次配列から、このタンパク質は膜に局在化し、分子内にJドメインを持つことが予想された (図5-A)。本章での解析から、DNAJB12は、サイトゾルのHsp70であるHsc70と結合し、構造異常膜タンパク質の分解を促進していることが判明した。

材料と方法

細胞培養

本研究では、ヒト子宮頸癌株化細胞由来である HeLa 細胞及び、ヒト胎児腎細胞(HEK293)に SV40 large T 抗原を組込んだ HEK293T 細胞を用いて実験を行った。培養するための培地としては、10% fetal bovine serum (JRH Bioscience) と 4mM L-グルタミンを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) を用い、培養は 37°C、5% CO₂ 存在下で行った。

プラスミド

pCAGGS-DNAJB12-Flag を作製するために、NIH3T3 細胞から totalRNA を抽出した。totalRNA からプライマー P1 (5'-CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTCCATGCAGGGAGGCCTGCACC-3')を用いて Flag タグの配列を付加した DNAJB12 の cDNA を RT-PCR によって構築した。さらに pCAGGS ベクターに上記の配列を組み込むために *EcoR1* の切断配列 (灰色で表示) をもったプライマー P2 (5'-TGCTCGGGTGAATTCATGGAATCCAACAAGGATGAAGCCGA-3'; forward)、P3 (5'-TTTTTTGAATTCCTCACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAG-3'; reverse)を用いて RT-PCR により pCAGGS-DNAJB12-Flag を構築した。

上記と同様の方法を用いて、pCAGGS-HA-DNAJB12-Flag を作製した。プライマーは P1, P2 及び *EcoR1* の切断配列と HA タグの配列を含んだ P4(5'-AAAAGAATTCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGAATC-3' (an *EcoRI* site plus HA-tagging and DNAJB12-hybridizing sequences)を用いた。

pCAGGS-DNAJB12H139Q-Flag の作製には pCAGGS-DNAJB12-Flag のプラスミドを用いて、site directed mutagenesis 法により DNAJB12 の 139 番目のヒスチジン (CAT)をグルタミン (CAA)に置換し構築した。

ERAD の基質である pEGFP-ΔF508-CFTR, pEGFP-WT-CFTR (Johnston *et al.*, 1998), そして pcDNA3.1-TCRa (Yu *et al.*, 1997)に関しては R. R. Kopito 博士(Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford, CA,

USA)から提供して頂いた。また、pcDNA3-VSVG-ts045-GFP (Gallione and Rose, 1985)は J. Lippincott-Schwartz 博士(Cell Biology and Metabolism Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health)から提供して頂いた。そして、pcDNA3.1-NHK に関しては京都産業大学の永田和宏博士から提供して頂いた pREP9-NHK を *Hind*III と *Xho*I のサイトからサブクローニングして pcDNA3.1 に組み込み、作製した。

上記のプラスミドを哺乳動物細胞へトランスフェクションするには Effecten (QIAGEN)を用いた。

抗体

本研究では以下の抗体を用いた：guinea pig 抗 DNAJB12 抗体（木村太地博士作製）、rabbit 抗 calnexin 抗体（Stressgen）、rat モノクローナル抗 Hsc70 抗体（Stressgen）、rabbit 抗 p62 抗体（MBL）、rabbit 抗 GFP 抗体（MBL）、mouse モノクローナル抗 GFP 抗体（Roche）、rabbit 抗 DDDDK 抗体（MBL）、mouse モノクローナル抗 Flag 抗体 M2（Sigma-Aldrich）、goat 抗 GAPDH 抗体（ABR）、rabbit 抗 A1AT 抗体（DakoCytomation）。また、イムノブロット実験のために、以下の二次抗体を用いた抗 Rabbit IgG（GE Healthcare）、抗 Mouse-IgG+IgM-HRP（Jackson ImmunoResearch）、抗 Rat Immunoglobulins-HRP（DAKO）さらに、抗体免疫染色実験のために以下の二次抗体を使用した。Alexa Fluor® 647 Goat Anti-guinea pig IgG (highly cross-adsorbed)、Alexa Fluor® 488 Goat Anti-mouse IgG (highly cross-adsorbed) (Invitrogen)。

免疫抗体染色

免疫抗体染色法で観察する細胞を調製するために、まず HeLa 細胞を 1.5×10^7 cell/10cm dish（80%コンフルエント）の密度まで培養した。この HeLa 細胞を No.1S coverglass(松浪硝子)を敷いた 6 well プレート(costar カタログ No 3516 Corning Incorporated) に 0.6×10^6 cell/dish の密度で播き培養した。その後、1%酢酸/99%エタノールで 15 分間処理し、細胞の固定を行なった。次に 15 分間ジギトニン(50ug/mL)/PBS(+)で細胞膜透過処理を行なった後、3%BSA/PBS でブロッキングした。この細胞に対して抗 DNAJB12 抗体及び抗 calnexin 抗体

(3%BSA/PBS でそれぞれ 100 倍、500 倍に希釈)を一時間反応させた。その後 PBS で 3 分間、5 回洗浄後、細胞に二次抗体 (guinea pig Alexa Fluor 647 及び rabbit Alexa Fluor 488 それぞれ 3%BSA/PBS で 200 倍希釈)を一時間室温で反応させた。さらに先ほどと同様に細胞の洗浄を行った。次に細胞を ProLong Gold(invitrogen)で封入後、OLYMPUS 社製、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV1000 で観察した。

DNAJB12 と Hsc70 及び CFTR の結合実験

サンプル調製： HeLa 細胞を 6 穴プレートに播種し、5% CO₂ 存在下、37℃ で培養した。翌日、培養ディッシュの 50~80%が細胞で被われていることを確認した後、Effecten (QIAGEN)を用いて、DNAJB12-Flag または DNAJB12-H139Q-Flag 及び CFTR を発現するプラスミドを HeLa 細胞に導入した。24 時間培養後、細胞を 1ml の PBS で懸濁した後、遠心分離(5,000 rpm、5 分、4℃)によって細胞を回収した。タンパク質を抽出するため、回収した細胞は 200 μ l の Lysis buffer[50mM Tris-HCl(pH 8.0)、150mM NaCl、1% Nonident P-40]に懸濁した。この際、タンパク質分解を抑えるため、Lysis buffer には Protease inhibitor (2 μ g/ml Pepstatin A、2 μ g/ml Leupeptin、1mM Bsnzamidine、1mM PMSF)を加えた。30 分後、15,000 rpm、20 分、4℃で遠心分離し、上清(可溶性画分)を回収した。

免疫沈降： 上記のように調製した細胞ライセートに 20 μ l の抗 Flag 抗体-Agarose ビーズ (50% slurry, SIGMA)を加え、4℃で 1 時間インキュベートした。その間、抗体ビーズと抗原等の結合を促進するため、サンプルを含むチューブは上下にゆっくりと回転させた。抗原と抗体を結合させた後、非特異的に抗体ビーズに結合しているタンパク質を除く目的で、ビーズは Protease inhibitor を含んでいない 1ml Lysis buffer で 3 回洗浄した。次に、ビーズから DNAJB12 およびこれと結合しているタンパク質を遊離させるために、ビーズに 2 \times SDS sample buffer を 60 μ l 加え、室温で 30 分間静置後、更に、65℃、10 分で変性処理した。このようにして得られた最終サンプルを免疫沈降サンプルとして用いた。

DNAJB12 に結合している Hsc70 及び CFTR の検出： 上記免疫沈降サンプル (10 μ g) を 7.5%の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、イムノブロットを行った。DNAJB12 およびこれに結合している Hsc70

と CFTR を検出した。

DNAJB12 のノックダウン実験

HEK293T細胞を6穴プレートに 1.5×10^5 個ずつ播種し、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いてDNAJB12特異的なsiRNA (sijb12#1; 5'-UAUCUGUGUCGCCAAAGUAGCGUGC-3' と 5'-GCACGCUACUUUGGCGACACAGAUUA-3') , sijb12#3; 5'-AUAGGCAUCAGCUGCACAAACACCC-3' と 5'-GGGUCAAGCAAUGUAAAGAUUACUA -3')またはコントロール siRNA(siLuc)を細胞にリバーストランスフェクションし、5% CO₂存在下、37°Cで24時間培養した。

パルス-チェイス実験

HEK293T 細胞を 6 well のコラーゲンコートプレート (IWAKI) に播種し、5% CO₂、37°Cの条件で 24 時間培養後、メチオニン、システインフリーの DMEM (GIBCO)(10% FBS) を用いて 30 分間インキュベートした。その後、[³⁵S]-EXPRESS protein labeling mixture (PerkinElmer)を用いて標識を行った。30 分間の標識の後、培地を通常の DMEM に交換し、培養を継続した。経過時間ごとに細胞を 1ml の PBS で洗浄後、回収した。タンパク質を抽出するため、回収した細胞に 1% NP40 lysis buffer. または 0.3% SDS RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.3% SDS, 0.5% deoxycholic acid and protease inhibitors]を加えライセートを作製した。

非特異的にビーズに結合するタンパク質を除く目的で、上記サンプルに 5 μ l の protein A-coupled Sepharose beads (GEHealthcare)を加え、4°Cで 15 分間、プレクリアを行った。その後、遠心して上清を回収し、そこに 2 μ l の各種抗体を加え、4°Cで 45 分間、抗原抗体反応を行った。次に、20 μ l の protein A-coupled Sepharose beads (GEHealthcare)を加え、4°Cで 1 時間、回転させながらインキュベートした。その後非特異的にビーズに結合しているタンパク質を除く目的で、1ml の 0.2% SDS RIPA lysis buffer [50mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 0.2% SDS, 0.5% deoxycholic acid]で 3 回洗浄した。次に、ビーズに 60 μ l の Laemmli sample buffer を加えて室温で 30 分静置した後、65°C、10 分の熱変性処理を行った。以上の行程から得られたサンプルを最終サンプルとし

て用いた。最終サンプルのうち 20 μ l を、11.25%の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。SDS ポリアクリルアミドゲルを乾燥させた後、IP プレートに密着させ、2 日後に BAS2500 (Fujifilm)により放射性シグナルを検出した。

結果

DNAJB12 は小胞体に局在し、J ドメインをサイトゾル側に持つ II 型の一回膜貫通タンパク質である

先述したように、動物細胞小胞体膜に生じた構造異常タンパク質はサイトゾルに運ばれた後、プロテアソームによって分解を受ける。この過程にはサイトゾルの Hsp70 ファミリータンパク質である Hsc70 が必要であることがわかってきた。しかし、この過程において Hsc70 と協調して働く DnaJ ファミリータンパク質は同定されていなかった。このようなタンパク質を同定するにあたり、私は、同タンパク質は次のような性質を持つと予想した。すなわち、同タンパク質は小胞体膜に局在し、かつ Hsc70 との相互作用に必要な J ドメインをサイトゾル側に持つと考えた。私はこのようなタンパク質の候補として DNAJB12 に着目した。DNAJB12 の構造を図 5-A に示す。DNAJB12 は分子内に J ドメインをもつタンパク質である。また、分子内に高度に疎水的な領域を一カ所持つことから、一回膜貫通タンパク質であると予想された。さらに分裂酵母からヒトまで高度に保存されていることから、細胞の機能維持において重要な役割を果たしていると考えられた (図 4)。

しかし、その細胞内における局在は不明であった。そこで、私は HeLa 細胞内における DNAJB12 の局在を調べることにした。そのために、抗 DNAJB12 抗体を用いた免疫抗体染色を行った。その結果、DNAJB12 の大部分と小胞体の膜タンパク質である Calnexin との共局在が観察された (図 5-B)。以上の結果と一次配列の情報から、DNAJB12 は小胞体に局在する一回膜貫通タンパク質であることが示唆された。

DNAJB12 がサイトゾルの Hsc70 と協調して働くためには、J ドメインをサイトゾルに持つ必要がある。DNAJB12 は、そのようなトポロジーをとるのであるか？このことを調べるために、N 末端側に HA タグ、C 末端側に Flag タグを付加した DNAJB12 を HeLa 細胞に一過的に発現させた。次に、この細胞からマイクロソームを調製し Proteinase K を用いた Protease protection 実験を行った。その後、抗 HA 抗体及び抗 Flag 抗体を用いて DNAJB12 の断片をイムノブロット法により検出した (図 5-C)。その結果、Proteinase K 未処理時に

は全長の DNAJB12 が抗 HA 抗体及び、抗 Flag 抗体の両方で検出された (図 5-C レーン 1 及びレーン 4)。それに対して、Proteinase K を処理した際には抗 Flag 抗体でのみ DNAJB12 の断片が検出された (図 5-C レーン 2 及びレーン 5)。このことから DNAJB12 の N 末端側はサイトゾル、C 末端側は小胞体内腔を向いていることが明らかになった。以上の結果から、DNAJB12 が小胞体に局在しサイトゾル側に J ドメインを持つ II 型の膜貫通タンパク質であることが明らかになった (図 5-D)。

DNAJB12 は J ドメインを介してサイトゾルの Hsc70 と結合する

先の結果から、DNAJB12 はサイトゾル側に Hsp70 との結合に必要な J ドメインを有することがわかった。そこで私は次に DNAJB12 がサイトゾルの Hsp70 ファミリータンパク質である Hsc70 と実際に結合するかどうかについて検証した (図 6-A)。そのために、まず、HeLa 細胞に、C 末端側に Flag タグを付加した DNAJB12 (DNAJB12-Flag) を一過的に発現させ、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行った。その後、DNAJB12-Flag と共沈降してくる Hsc70 をイムノブロット法で検出した (図 6-A 中央のパネル)。その結果、DNAJB12-Flag を発現している細胞では DNAJB12-Flag と Hsc70 の共沈降が観察された。一方、DNAJB12-Flag を発現していない細胞では Hsc70 の共沈降は確認できなかった (図 6-A 中央のパネル レーン 1)。このことから、DNAJB12 と Hsc70 が細胞内で特異的に結合していることがわかった。

一般的に DnaJ タンパク質は J ドメイン内で高度に保存されている HPD 配列を介して Hsp70 ファミリータンパク質と結合する (Kampinga and Craig, 2010)。それでは、ここでみられた DNAJB12 と Hsc70 の相互作用には、DNAJB12 の J ドメインの HPD 配列は必要であろうか? このことを調べるために、私は DNAJB12 の J-domain 内にある HPD 配列に変異を導入し QPD (H139Q) に変えた DNAJB12 H139Q-Flag 変異体を作製した。次に HeLa 細胞で DNAJB12 H139Q-Flag を発現させた。このとき変異体は野生型の DNAJB12-Flag とほぼ同様の発現量を示した (図 6-A 下段パネル)。にもかかわらず、免疫沈降の結果、変異型では Hsc70 の共沈降は確認できなかった (図 6-A 中央のパネル レーン 2,3)。これらの結果から、DNAJB12 と Hsc70 との結合には DNAJB12 の J ドメインが必要であることがわかった。

DNAJB12 は CFTR の分解を促進する

先述したように、構造異常膜タンパク質の ERAD 分解には Hsc70 が必要であることがわかっている。前節で説明したように DNAJB12 は実際に Hsc70 と結合していることがわかった。よって、DNAJB12 が Hsc70 と協調して働き、構造異常膜タンパク質の分解に働く可能性がある。そこで、この点について調べることにした。このためのモデル基質として嚢胞性線維症の原因タンパク質である CFTR を用いた。CFTR は 1 2 回膜貫通タンパク質でフォールディング効率が非常に悪いため、野生型においても大部分が ERAD によって分解されることが知られている。

CFTR の品質管理に DNAJB12 が関与しているかどうかを調べるために、まず、N 末端側に GFP タグを付加した野生型の CFTR (GFP-WT-CFTR) を HeLa 細胞に一過的に発現させた(この融合タンパク質は、野生型 CFTR と同様の機能・安定性をもつことが既に報告されている)。次に抗 GFP 抗体を用いてイムノブロットを行い、細胞のライセート中の CFTR を検出した(図 6-B) (Johnston et al., 1998)。GFP-WT-CFTR は B フォーム (ER フォーム) から C フォーム (Golgi-plasma membrane フォーム) へと成熟して行く。これらのタンパク質がイムノブロットでは 2 本のバンドとして検出できる(図 6-B 上段パネル レーン 1)。GFP-WT-CFTR と共に野生型の DNAJB12-Flag を一過的に過剰発現させた場合、B フォーム及び C フォームのバンドは共にほとんど検出できなかった(レーン 2)。この結果は、DNAJB12 が構造異常膜タンパク質の分解を促進することを示唆する。一方、変異型の DNAJB12 H139Q-Flag を共発現させた場合には、C フォーム(レーン 3)の存在量が著しく減少した(この結果の解釈に関しては考察を参照)。これらの結果から、DNAJB12 が構造異常膜タンパク質の一つである CFTR の細胞内における存在状態に影響しうることがわかった。

それでは、DNAJB12 は細胞内で構造異常膜タンパク質と相互作用できるのだろうか？このことを調べる目的で免疫沈降実験をおこなった。抗 Flag 抗体で DNAJB12-Flag を免疫沈降した場合、CFTR の共沈降が検出された(図 6-B 下段パネル レーン 2)。それに対して、変異型の DNAJB12 では CFTR の共沈降は確認できなかった(図 6-B 下段パネル レーン 3)。このことから野生型の DNAJB12 は構造異常膜タンパク質である CFTR と Hsc70 を介して結合できることがわかった。

次に CFTR の品質管理における DNAJB12 の役割について詳細に解析を行う

ためにパルス・チェイス実験を行った。そのためにまず HEK293T 細胞で GFP-WT-CFTR を発現させた。次にこの細胞を ^{35}S -メチオニン/システインを含んだ培地中で 30 分間インキュベートし、新規に合成されたタンパク質の標識を行った。その後、通常の培地に戻し、放射性同位体で標識されたタンパク質の運命を時間経過で追跡した。このようにして得たサンプル中の GFP-WT-CFTR を、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降によって回収した後、SDS-PAGE によって分離することによって、GFP-WT-CFTR の B フォームから C フォームへの成熟過程を観察した (図 6-C 上段パネル)。DNAJB12-Flag を共発現させた場合、C フォームはほとんど検出されなかった (中段パネル)。また、合成された B フォームも速やかに消失した (図 6-D)。一方、同条件下、ユビキチンプロテアソーム系の阻害剤であるラクタスタチンを添加したところ、GFP-WT-CFTR の総量の減少が明瞭に抑制された。以上の結果から、DNAJB12 は構造異常膜タンパク質のモデル基質である WT-CFTR の分解を促進できることがわかった。また、ここでみられる DNAJB12 依存的な CFTR の分解はプロテアソーム系を利用していること、すなわち、ERAD によるものであることも明らかになった。

DNAJB12 は構造異常膜タンパク質の ERAD に寄与する

DNAJB12 が WT-CFTR 以外の構造異常膜タンパク質の分解にも関与するかどうか検証する目的で、WT-CFTR 以外の ERAD 基質を用いて、先ほどと同様にパルス・チェイス実験を行った。それらの基質の一つである Δ F508-CFTR 変異体は CFTR の 508 番目のフェニルアラニン残基が欠損した変異体である。この膜タンパク質は正しくフォールディングが行われなため、C フォームに成熟することはなく小胞体膜上で急速に分解されることが知られている (Ward et al., 1995)。また T cell-receptor の α subunit (TCR α) (T cell-receptor は α と β という二つのサブユニットからなる) を単独で発現させた場合にもこのタンパク質は正しくフォールディングできないことが知られている (Yu et al., 1997)。DNAJB12 を過剰発現させると、これら二つの基質は共にその分解が促進された (図 7-A,B)。私はさらに、vesicular stomatitis virus G protein (VSV-G) の温度感受性変異体 (tsO45-VSV-G ; この膜タンパク質は 39°C で正しくフォールディングできないために ERAD で分解される) (Gallione and Rose, 1985) の分解への影響も調べた。DNAJB12 を過剰発現すると、このタンパク質は急速に

分解された (図 7-C)。これらの結果から、DNAJB12 は小胞体の WT-CFTR 以外の構造異常膜タンパク質の分解も促進できることが明らかになった。

それでは DNAJB12 は小胞体内腔側の構造異常分泌タンパク質の分解には関与するのだろうか? $\alpha 1$ アンチトリプシンはヒト血清中に存在するセリンプロテアーゼインヒビターで、その null Hong Kong 変異体 (NHK) は小胞体内腔で正しくファールディングすることができず、ERAD で迅速に分解されることが、明らかになっている (Sifers et al., 1988)。そのため、このタンパク質は構造異常分泌タンパク質のモデル基質として広く用いられている。DNAJB12 を過剰発現させ、NHK に対する分解促進効果を検証したところ、NHK への分解促進効果は確認されなかった (図 7-D)。これらの結果から、DNAJB12 は小胞体の構造異常膜タンパク質の分解は促進することができるが、小胞体内腔の分泌タンパク質の分解は促進しないことが示唆された。

さらに、細胞内における DNAJB12 の機能を解析する目的で DNAJB12 特異的 siRNA を用いてノックダウンすることで内在性の DNAJB12 の発現量を抑制し、その影響を調べた。そのために、まず DNAJB12 のノックダウンの条件検討をおこなった。HEK293T 細胞に二種類の DNAJB12 siRNA (sijb12 #1, sijb12 #3) を一過的に導入したところ、sijb12 #1 及び sijb12 #3 の両方で効率よく DNAJB12 の発現量を低下することができた (図 8-A)。以後の実験では sijb12 #1 を用いて DNAJB12 のノックダウンをおこなっている。

DNAJB12 の発現量抑制が、細胞内のタンパク質分解に及ぼす影響を調べる目的で、細胞に DNAJB12 siRNA 及び基質として GFP-CFTR Δ F508 を一過的に導入し、パルス-チェイス実験を行った。その結果、ネガティブコントロールの siRNA と比べ、DNAJB12 をノックダウンした細胞では GFP-CFTR Δ F508 の分解が遅延した (図 8-B)。一方、基質として NHK を用いて、同様にノックダウンした場合には NHK の分解には変化が見られなかった (図 8-C)。これらのことから、DNAJB12 は小胞体内腔の構造異常タンパク質ではなく、小胞体の構造異常膜タンパク質の ERAD に関与していることが明らかになった。

考察

タンパク質の品質管理機構は、細胞内に生じた構造異常タンパク質の分解もしくは修復を行うことで、細胞の恒常性維持にとって重要な役割を担っている(Ding and Yin., 2008)。これまでの研究により、小胞体膜上に生じた構造異常膜タンパク質は ERAD によってサイトゾルへと逆行輸送され、プロテアソームで分解されることがわかっていた(Gallione and Rose., 1985; Ward et al., 1995; Yu et al., 1997)。さらに、哺乳動物において生じた小胞体の構造異常膜タンパク質の分解にはサイトゾルの Hsp70/Hsc70 シャペロンが必要とされることも示されていた(Younger et al., 2006)。一般に Hsp70/Hsc70 がシャペロンとして、細胞内の特定のプロセスに関わるためには、特定の DnaJ タンパク質をコファクターとして必要とする。しかしながら、この過程で働く DnaJ タンパク質はまだ明らかになっていなかった。今回、私は小胞体の構造異常膜タンパク質の分解に DnaJ タンパク質である DNAJB12 が働くことを見出した(図 9)。さらに DNAJB12 はプロテアソーム系を介して、構造異常膜タンパク質の分解を促進していることも明らかにした。これらの結論は次のような結果に基づく。

1) DNAJB12 を細胞内で過剰発現させたところ、WT-CFTR を含むいくつかの構造異常膜タンパク質の分解が顕著に促進された。2) DNAJB12 依存的な WT-CFTR の分解はプロテアソーム阻害剤で抑制された。よって DNAJB12 はプロテアソーム系を介して、構造異常膜タンパク質の分解を促進していることがわかった。3) DNAJB12 は細胞内で WT-CFTR 及び Hsc70 と結合した。さらに、DNAJB12 の J ドメインに変異を導入すると、このような結合は失われた。よって、DNAJB12 の基質認識や Hsc70 との結合には DNAJB12 の J ドメインが重要であると予想された。4) ノックダウンにより内在性の DNAJB12 の発現量を低下させた場合に CFTR Δ F508 の分解が抑制された。このことから、内在性の DNAJB12 が構造異常膜タンパク質の効率のよい分解に必要であることがわかった。5) DNAJB12 の過剰発現及びノックダウンによっても構造異常分泌タンパク質のモデル基質である NHK の分解に変化がなかった。よって DNAJB12 は小胞体の構造異常膜タンパク質の分解を特異的に促進することがわかった。

今回、私は DNAJB12 が小胞体に局在する一回膜貫通タンパク質であり、J

ドメインをサイトゾル側にもつことを明らかにした (図 5-D)。この DNAJB12 の小胞体膜におけるトポロジーは非常にユニークである：他の哺乳動物細胞における J タンパク質はすべて J ドメインを小胞体内腔側に有しているのに対して、DNAJB12 はサイトゾル側に J ドメインを持っている (Chevalier et al., 2000; Kurisu et al., 2003; Hosoda et al., 2003; Dong et al., 2008; Jin et al., 2009; Zahei et al., 2009)。このことから、トポロジー的にも DNAJB12 は構造異常タンパク質を分解するために、都合のよい形を取っていると考えられる。すなわち、DNAJB12 自身が膜タンパク質であるので、基質である構造異常膜タンパク質と効率よく相互作用できると期待できる。また、J ドメインをサイトゾル側にもつため、サイトゾルの Hsc70 と無理なく結合できると予想できる。

今回、私は DNAJB12 が Hsc70 と基質である WT-CFTR の両方と結合し得ることを示した (図 6-A,B)。この結合は DNAJB12 の J ドメイン中の H139Q 変異体によって解消されることも明らかになった。したがって、J ドメインが基質や Hsc70 との相互作用に重要であることがわかった。しかし、この変異体は WT-CFTR に対する分解促進能を弱いながらも保持していた (図 6-B レーン 3)。この結果から、次の二つの可能性を予想している。1) DNAJB12 は Hsc70 と結合しなくても、効率は悪いながら、構造異常膜タンパク質の分解を促進することができるかもしれない。例えば、サイトゾルの Hsp90 ファミリータンパク質と相互作用し、構造異常膜タンパク質の分解を促進する可能性もある。あるいは、2) DNAJB12 の変異体は弱いながらも実際には Hsc70 との結合能力を保持しているかもしれない。この場合には、変異体においても、現在、私が考えているモデル通り、DNAJB12 と Hsc70 とが協調的に働きながら、構造異常膜タンパク質の分解を促進していることになる。

図表

Mouse	1	-----	MESNKDEAERCISIALKAIQSNQPERALRFLEKAQRL	37
Human	1	-----	MESNKDEAERCISIALKAIQSNQPDALRFLEKAQRL	37
Drosophila	1	-----	MDGNKDEAQRCLDFAVQALAAGKIEKAEKFLKAEFL	37
C. elegans	1	MTADANRSESLLCMDKAREAIKSGD	TDKARRMLLKAKKLDPGQNI	EFLTKKIDEMTTSSS 60
S. pombe	1	-----	MESSREALRCIGLARKYLNAGEYDKALKFANKSLRI	37
	38	YPTPRVSALIESLNQKPQSTGDHPQPTD	TTHTTTKAGGTETPSANGEAGGGESAKGYTS	97
	38	YPTPRVRALIESLNQKPQTAGDQPPPTD	TTATHRKAGGTDAPSANGEAGG-ESTKGYTA	96
	38	FPTDNAKLLAQLKSTPSNESNGKSRTAG	--SDEKDSG---PRKRVNSDRSSAPDYTK	92
	61	QSSSSRASEERSYAHDDHYDEPNLNRK	ARSPVKKNGKTEPEPKPRASRTPKLGVDYTS	120
	38	HATTEGEDFVKQIEKQKLTGSPNPQAT	PKQENKSNFFSEKQSVRENGSSAGEKKQKWT	97

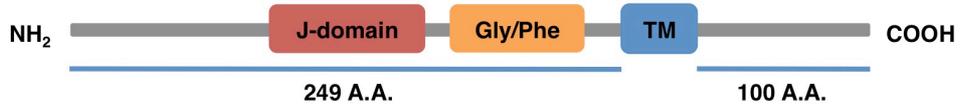
	98	EQVAAVKRVKQCKD--YYEILGVSRSAS	DEDLKKAYRKLALKFHPDKNHAPGATEAFKAI	155
	97	EQVAAVKRVKQCKD--YYEILGVS	RGASDEDLKKAYRRLALKFHPDKNHAPGATEAFKAI	154
	93	DQLEAVRKVKTCCKD--YYEVLGVS	KTATDSEIKKAYKKLALQLHPDKNKAPGAVEAFKAL	150
	121	EQKELVERIRHCKD--YYEILKVDK	QASDDDIRKEYRKMALKLHPDKCRAPHATEAFKAL	178
	98	EQHLLVQKIIKYKNHQYYEILD	LKKTCDTTEIKKSYKKLALQLHPDKNHAPSADAEAFKMV	157
	156	GTAYAVLSNPEKRKQYDQFGDDKSQAAR	-----HGSH-----GDFHRGFEADISPED	203
	155	GTAYAVLSNPEKRKQYDQFGDDKSQAAR	-----HGSH-----GDFHRGFEADISPED	202
	151	GNAAGVLTDAEKRNQYDLYG	INESHNGHGNNGGGHHGQYNNYGYSRGFQADISAE	210
	179	GNAYAVLSADAKRRQYDQFGAEAANGHT	--PTRRRRGGGGVFFEHYAHGFEADFTPEE	236
	158	SKAFOVLSDPNLRHAYDRTGMDPESRAS	----AASSSFSSNAGGHPGSAYPQANMSPED	213
	204	LFNMFVGGGF-PSSNVHVYSNGR	----MRYTYQQRQ--DRRDNQDGGGLGVFVQLMPILI	256
	203	LFNMFVGGGF-PSSNVHVYSNGR	----MRYTYQQRQ--DRRDNQDGGGLGVFVQLMPILI	255
	211	LFNMFVGGGF-PQQNVHM-RQQR	----RR-----QQ--AREDREGNNS-SALVNLLPIVL	256
	237	IFNMFVGGGF-PTEQVR	----RR-----ARHA-QQQQ--YHRYEQQTPYGPLLQLPLIA	284
	214	LFNSFFGQDFFSFGPGTFFFGGPG	GIRVHQFGGRPRNFARRQQAQDMPPKSIQYQLPLIV	273
	257	LILVSALSQI-----MVSSPPYSL	SPRPSVGHIRVTDHLNVAYYVADTFSEEYTGSSL	311
	256	LILVSALSQI-----MVSSPPYSL	SPRPSVGHIRVTDHLNVAYYVADTFSEEYTGSSL	310
	257	LIGLSMMSF-----FISDPMYSL	TPSHKYS--VKRETNSLKVPYVKNDFYSEYQGSVA	309
	285	IMVIGL LAQI-----MVGEPAFSL	HQTSKYT--VKRMTAELRVYFVRSDFESSYRGR-I	336
	274	VILFAFLSNFWS DSTSVNTRY	SFQQNYKYT--VPRITTAKHNIPIYMSQKDLKLSRDI	331
	312	KTVERNVEDDYIANLRNNCWKE	KQQKEGLLYRA--RYFGD	TDYHRAQKMGTPSCNRLSE 369
	311	KTVERNVEDDYIANLRNNCWKE	KQQSEGLLYRA--RYFGD	TDYHRAQKMGTPSCSRLSE 368
	310	R-LEESVEDDFVNLKHS	CSREERNYRDSMLAKA--RTFGDRDLYRKAQNI	TPSCENLQK 366
	337	RQVEQQVEDDYIQNLRMNCYKE	QNLKETKLYRA--RWMRDEAMMRDAERTPL	PSICIRLNE 394
	332	RRLNEKVEHTYTQNVHNA	CLREQQIKEDEIRRAQGWFFPDKEALKKAKELRL	PNCEELNR 391
	370	VQASLHG-----		376
	369	VQASLHG-----		375
	367	YLIT-----		370
	395	IYSH-----		398
	392	LGYRTYSNSYFF		403

図 4 DNAJB12 のアミノ酸配列と生物種間でのホモロジー解析

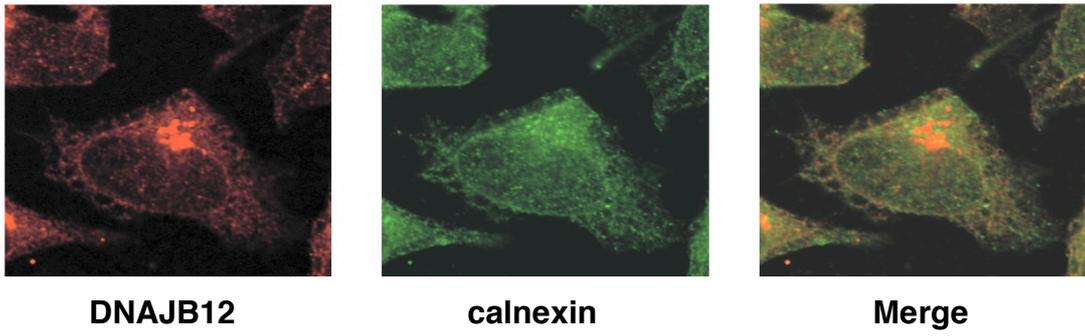
Mouse, (*Mus musculus*); Human, (*Homo sapiens*); Drosophila, (*Drosophila melanogaster*); *C. elegans*, (*Caenorhabditis elegans*); そして、*S. pombe*, (*Schizosaccharomyces pombe*)の 5 種の生物間について DNAJB12 のアミノ酸配列の相同性を比較した。DNAJB12 のアミノ酸配列上で、赤枠は J ドメインを示し、*で記した箇所は HPD 配列を示した。Gly/Phe-domain は橙色で、膜貫通領域は青色で示した。また、黒色で塗りつぶされた DNAJB12 のアミノ酸配列は 5 種類の生物間で完全に一致している。また灰色に塗りつぶされた配列は 60~80%生物間で一致している。

A

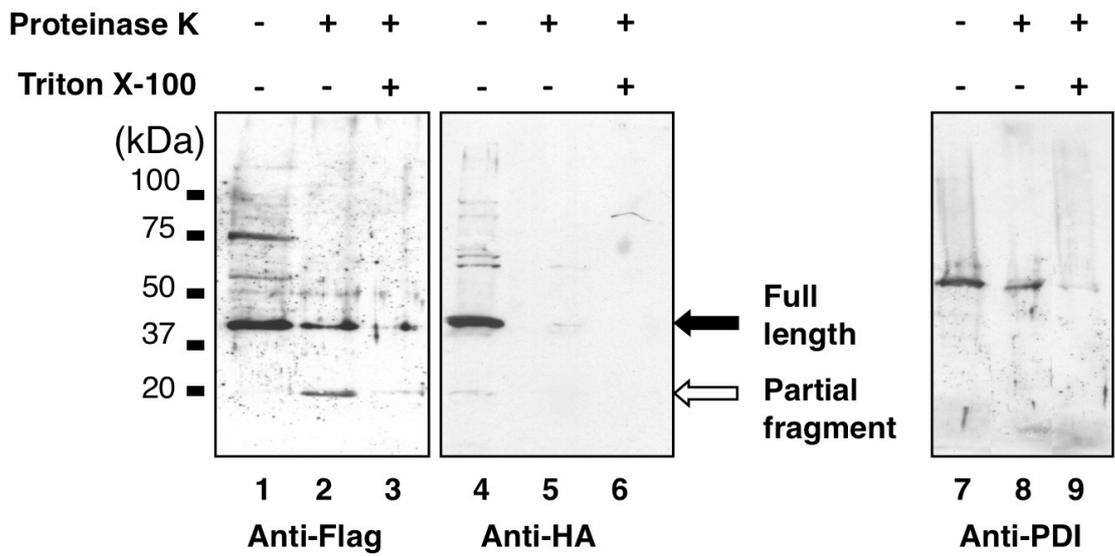
DNAJB12 376 A.A. 42kDa



B



C



D

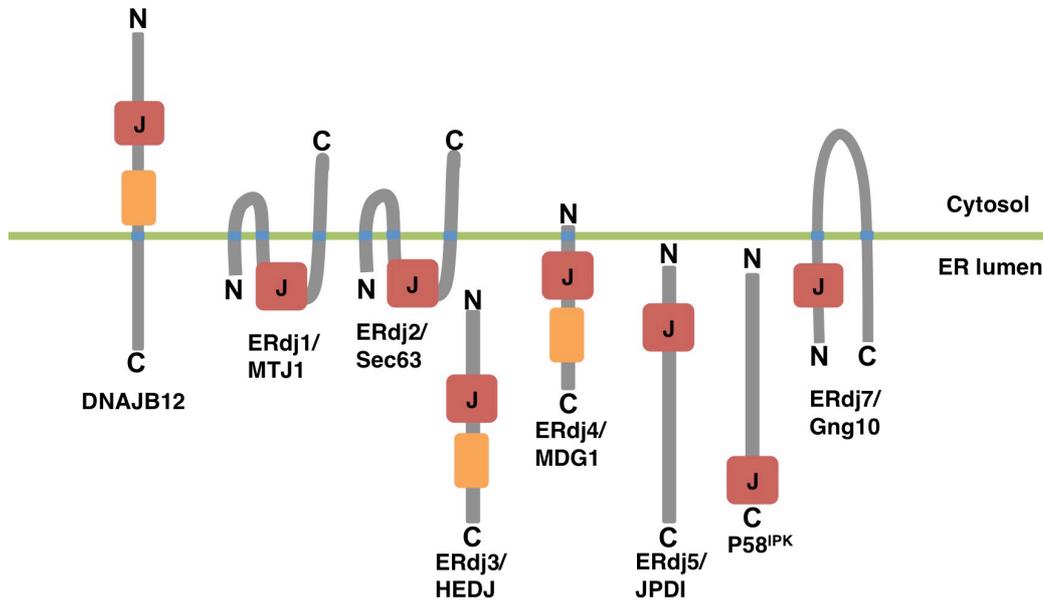
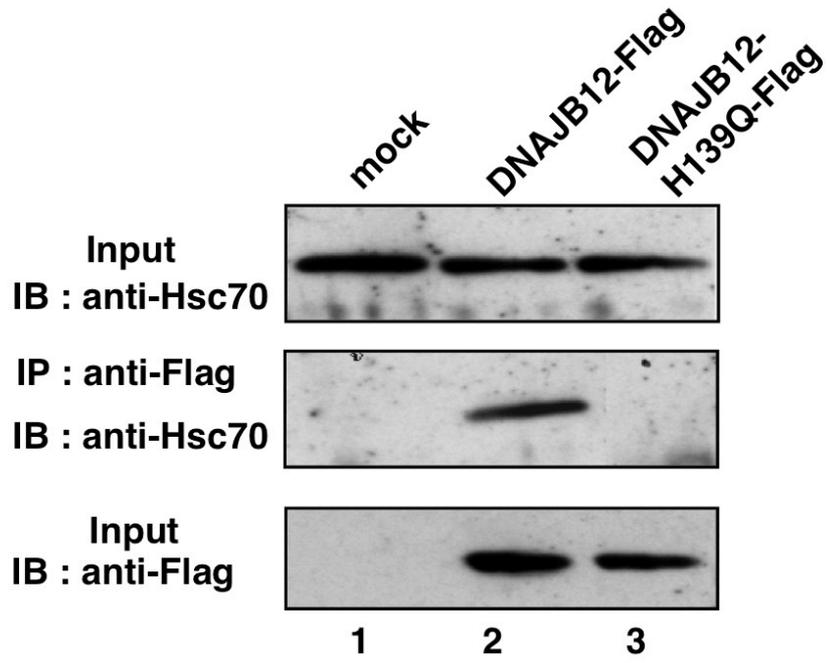


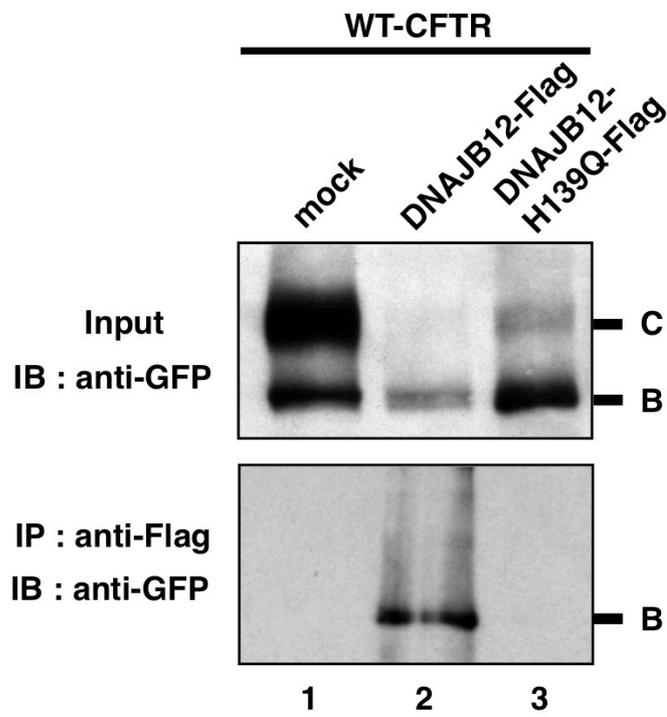
図 5 新規 DnaJ ファミリータンパク質 DNAJB12

- (A) DNAJB12 は全長 376 アミノ酸残基からなるタンパク質である。分子内に J ドメインと高度に疎水的なドメイン (TM ドメイン) を持つ。また、両ドメインの間に存在する Gly/Phe ドメインの機能については不明である。
- (B) HeLa 細胞において、DNAJB12 と小胞体の膜タンパク質である calnexin の細胞内局在を免疫抗体染色法により観察した。DNAJB12 の検出には抗 DNAJB12 抗体と Alexa647 が結合している二次抗体を用いた。一方、calnexin の検出には抗 calnexin 抗体と Alexa488 が結合している二次抗体を使用した。
- (C) HA-DNAJB12-Flag を過剰発現した HeLa 細胞から、マイクロソームを調製した。そのマイクロソームを proteinase-K あるいは 1%TritonX-100 で処理した。その後、得られたサンプルに対して、抗 Flag 抗体、抗 HA 抗体、そして抗 PDI 抗体を用いてイムノブロットを行った。HA-DNAJB12-Flag の全長については黒色の矢印、断片については白色の矢印で示した。木村太地博士との共同研究結果。
- (D) DNAJB12 の小胞体におけるトポロジーを小胞体に局在することが知られている他の DnaJ タンパク質のトポロジーと共に示した。

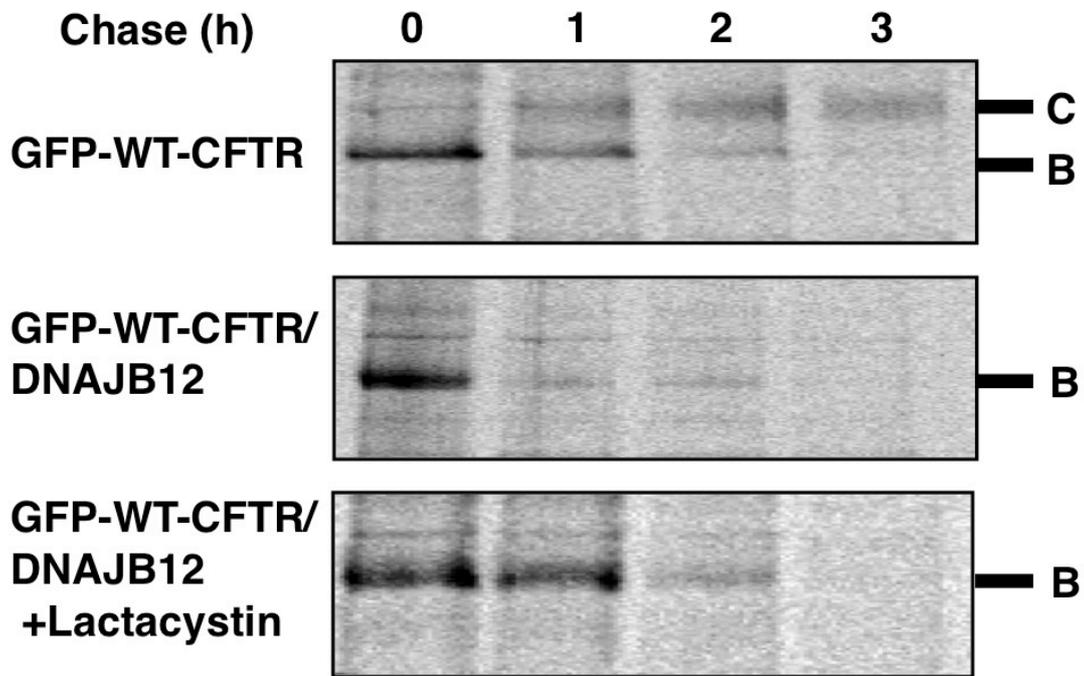
A



B



C



D

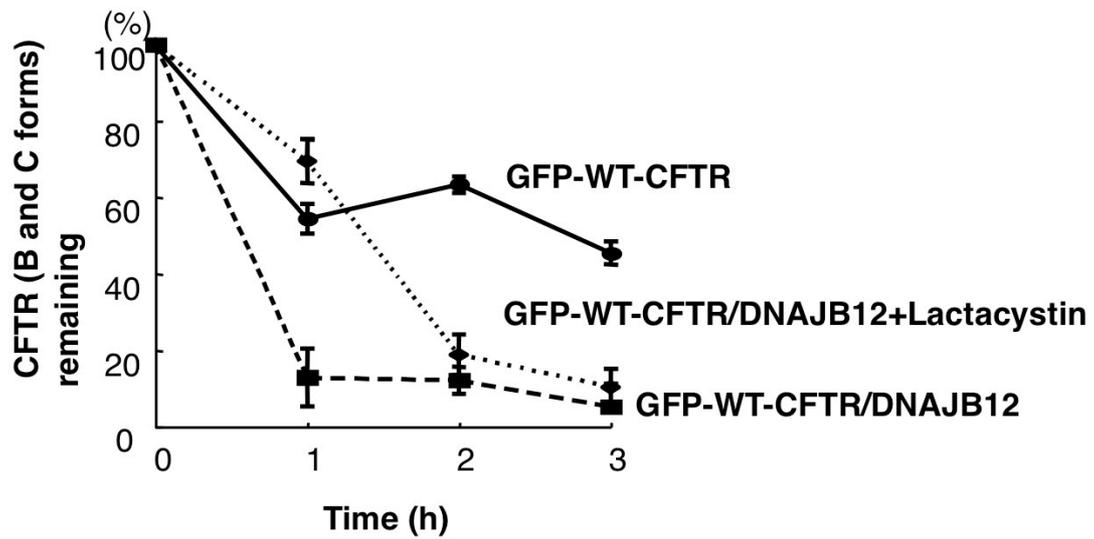
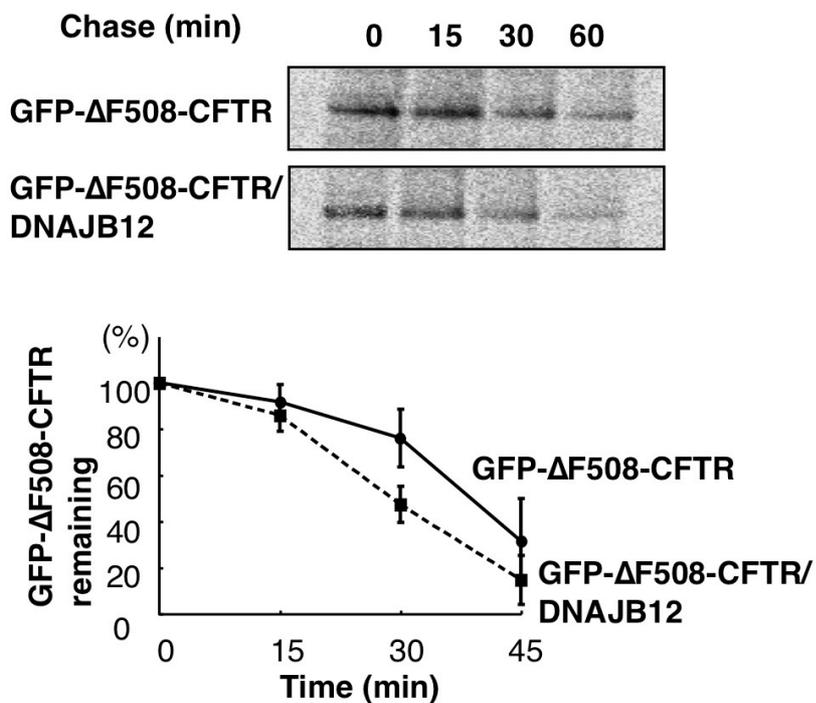


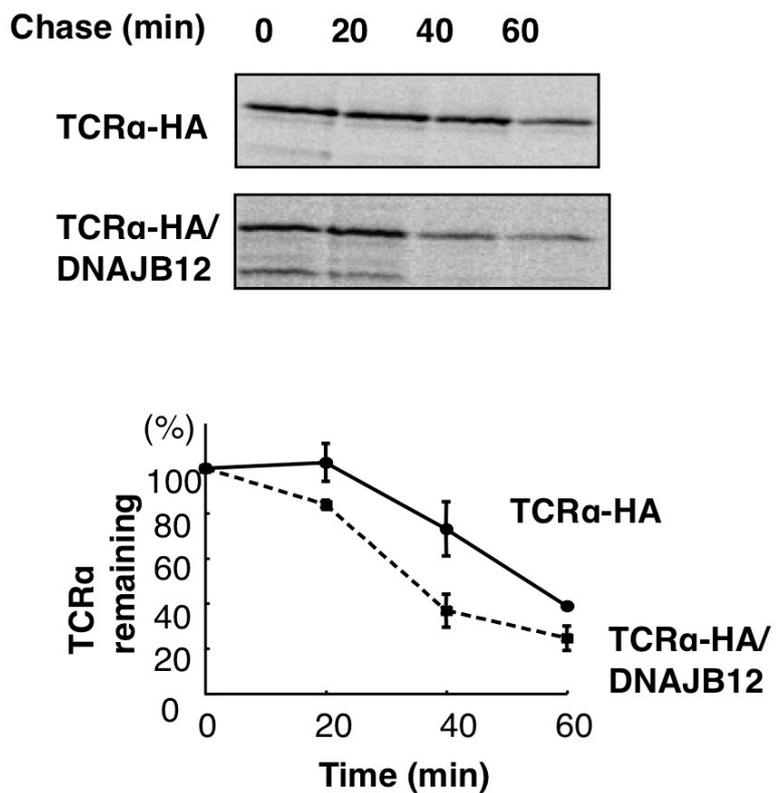
図 6 DNAJB12 は Hsc70 と結合し、CFTR の分解を促進する

- A. HeLa 細胞に pCAGGS ベクター、pCAGGS-DNAJB12-Flag、pCAGGS-DNAJB12 H139Q-Flag をトランスフェクション法によって導入した。36 時間後、細胞を回収し、ライセートを調製した後、抗 Flag アガロースビーズで免疫沈降をおこなった。その後、ライセート(Input)と免疫沈降産物を SDS-PAGE で展開し、抗 Hsc70 抗体及び抗 Flag 抗体でイムノブロットを行った。木村太地博士との共同研究結果。
- B. HeLa 細胞に pEGFP-WT-CFTR 及び pCAGGS ベクター、pCAGGS-DNAJB12-Flag、pCAGGS-DNAJB12 H139Q-Flag を導入後、24 時間後に細胞を回収した。それぞれ細胞のライセートを調製した後、抗 Flag アガロースビーズで免疫沈降をおこなった。その後、ライセート(Input)と免疫沈降産物を SDS-PAGE で展開し、抗 GFP 抗体及び抗 Flag 抗体でイムノブロットを行った。木村太地博士との共同研究結果。
- C. HEK293T 細胞に pEGFP-WT-CFTR 及び pCAGGS-DNAJB12-Flag を導入した後、細胞を 24 時間培養した。次にこの細胞を ^{35}S -メチオニン/システインを含んだ培地中で 30 分間インキュベート(パルス)し、新規に合成されたタンパク質の標識を行った。その後、通常の培地に戻し培養を一定時間続けた(チェイス)。また、一部の細胞に対してはパルス及びチェイスの間、ユビキチン-プロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンを作用させた(10 μM)。このようにして得たサンプル中の GFP-WT-CFTR を、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降によって回収した後、SDS-PAGE によって分離した。次に免疫沈降物の放射活性を BAS2000 で検出することによって、GFP-WT-CFTR の B フォームから C フォームへの成熟過程を観察した。木村太地博士との共同研究結果。
- D. パネル C のバンドの放射活性を BAS 2000 によって定量し、バンドの相対強度を時間経過とともにプロットした。3 回の独立した実験から標準偏差を求め Error bar として表示した。木村太地博士との共同研究結果。

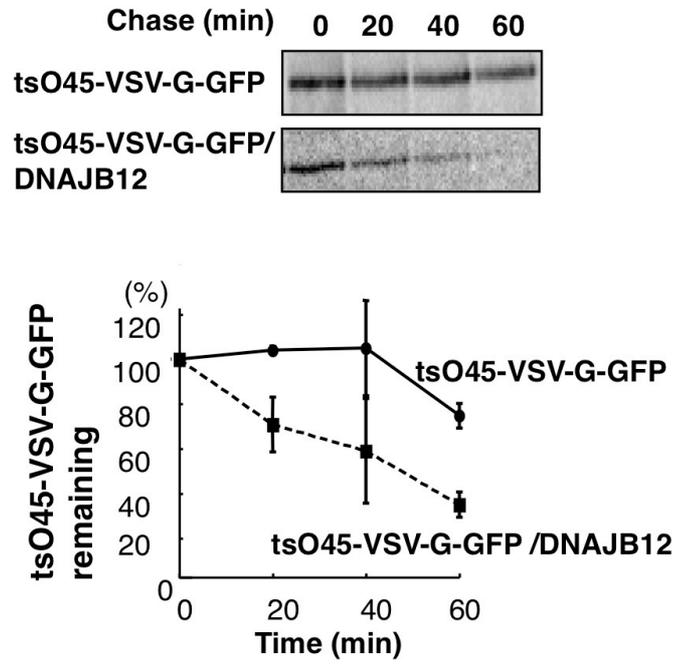
A



B



C



D

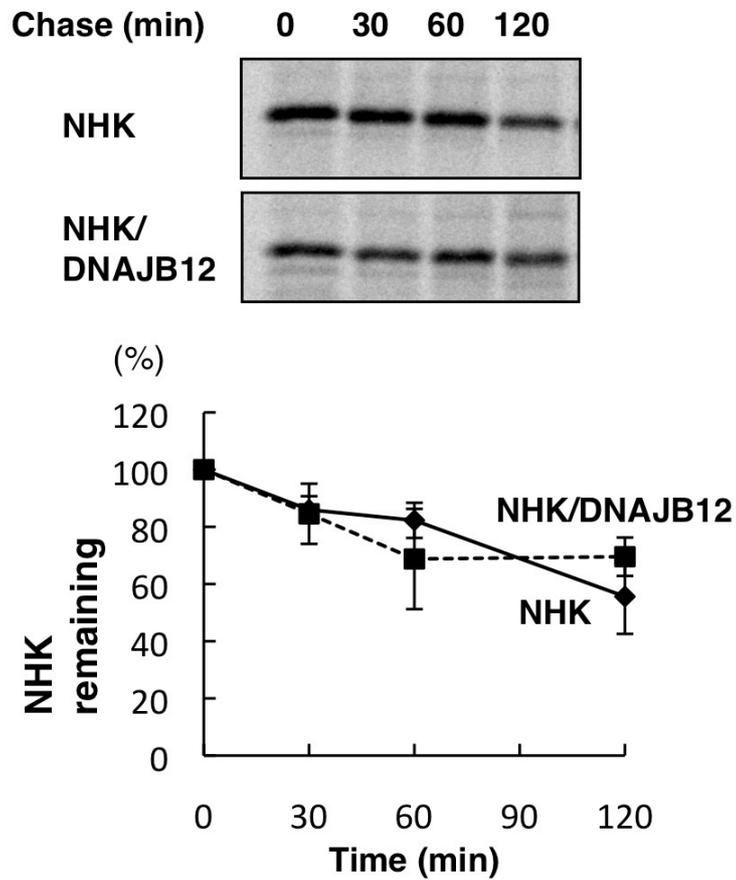
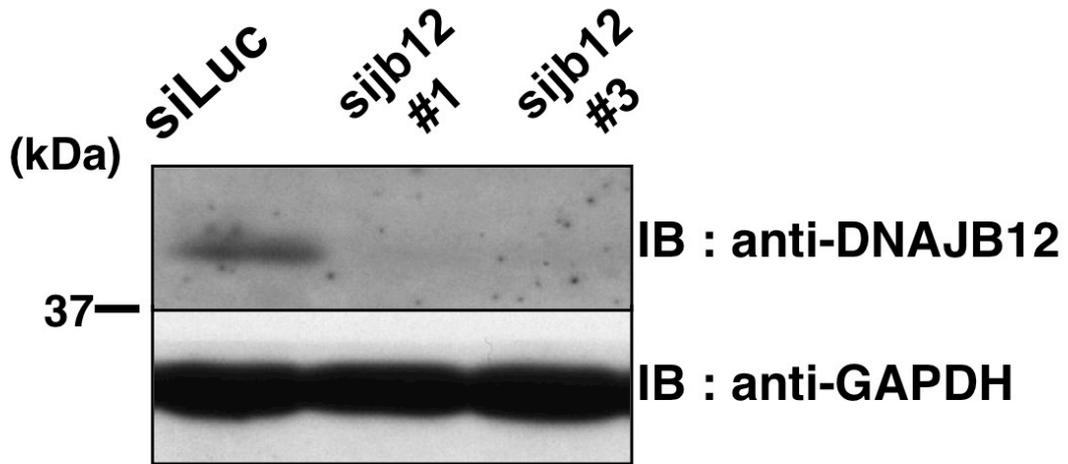


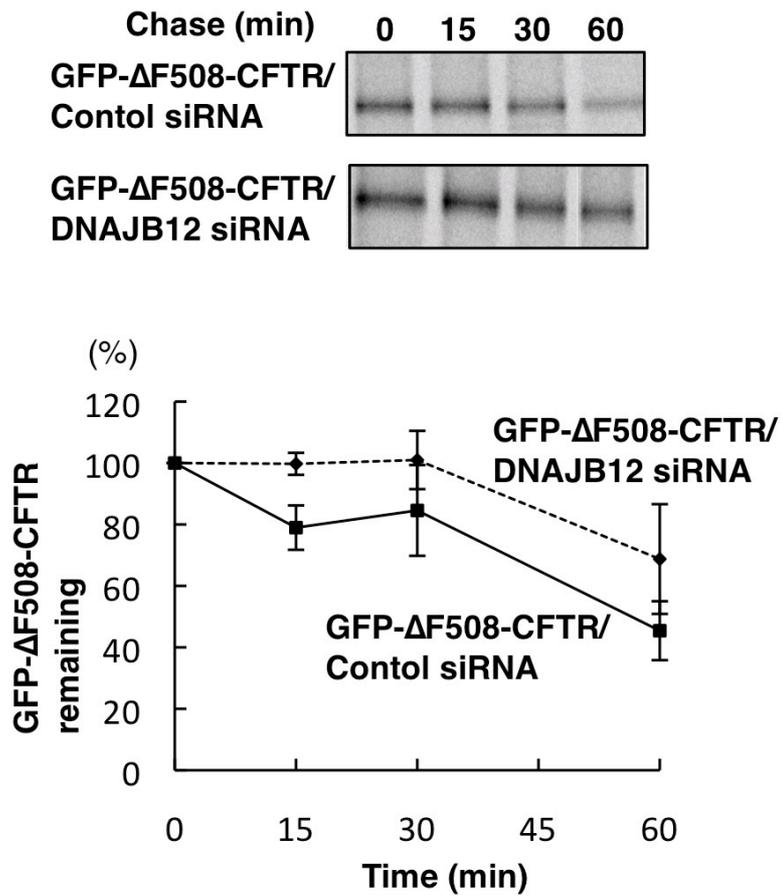
図 7 DNAJB12 は様々な構造異常膜タンパク質の分解を促進する

- A. HEK293T 細胞に DNAJB12-Flag 及び、構造異常膜タンパク質のモデル基質である EGFP- Δ F508-CFTR を過剰発現した後、図 6 と同様な手順でパルス-チェイス実験をおこない、得られたサンプルに対して、抗 GFP 抗体で免疫沈降をおこなった。免疫沈降物を SDS-PAGE で展開した後、その放射活性を BAS 2000 によって検出した。下図ではバンドの相対強度を時間経過とともにプロットした。
- B. HEK293T 細胞に DNAJB12-Flag 及び、構造異常膜タンパク質のモデル基質である TCR α -HA を過剰発現した後、図 6 と同様な手順でパルス-チェイス実験をおこない、得られたサンプルに対して、抗 HA 抗体で免疫沈降をおこなった。免疫沈降物を SDS-PAGE で展開した後、その放射活性を BAS 2000 によって検出した。下図ではバンドの相対強度を時間経過とともにプロットした。木村太地博士との共同研究結果。
- C. HEK293T 細胞に DNAJB12-Flag 及び、構造異常膜タンパク質のモデル基質である VSV-G-tsO45-GFP を過剰発現し、細胞を 39°C で培養した。その後、図 6 と同様な手順でパルス-チェイス実験をおこない、得られたサンプルに対して、抗 GFP 抗体で免疫沈降をおこなった。免疫沈降物を SDS-PAGE で展開した後、その放射活性を BAS 2000 によって検出した。下図ではバンドの相対強度を時間経過とともにプロットした。木村太地博士との共同研究結果。
- D. HEK293T 細胞に DNAJB12-Flag 及び、構造異常膜タンパク質のモデル基質である NHK を過剰発現した後、図 6 と同様な手順でパルス-チェイス実験をおこない、得られたサンプルに対して、抗 A1-AT 抗体で免疫沈降をおこなった。免疫沈降物を SDS-PAGE で展開した後、その放射活性を BAS 2000 によって検出した。下図ではバンドの相対強度を時間経過とともにプロットした。

A



B



C

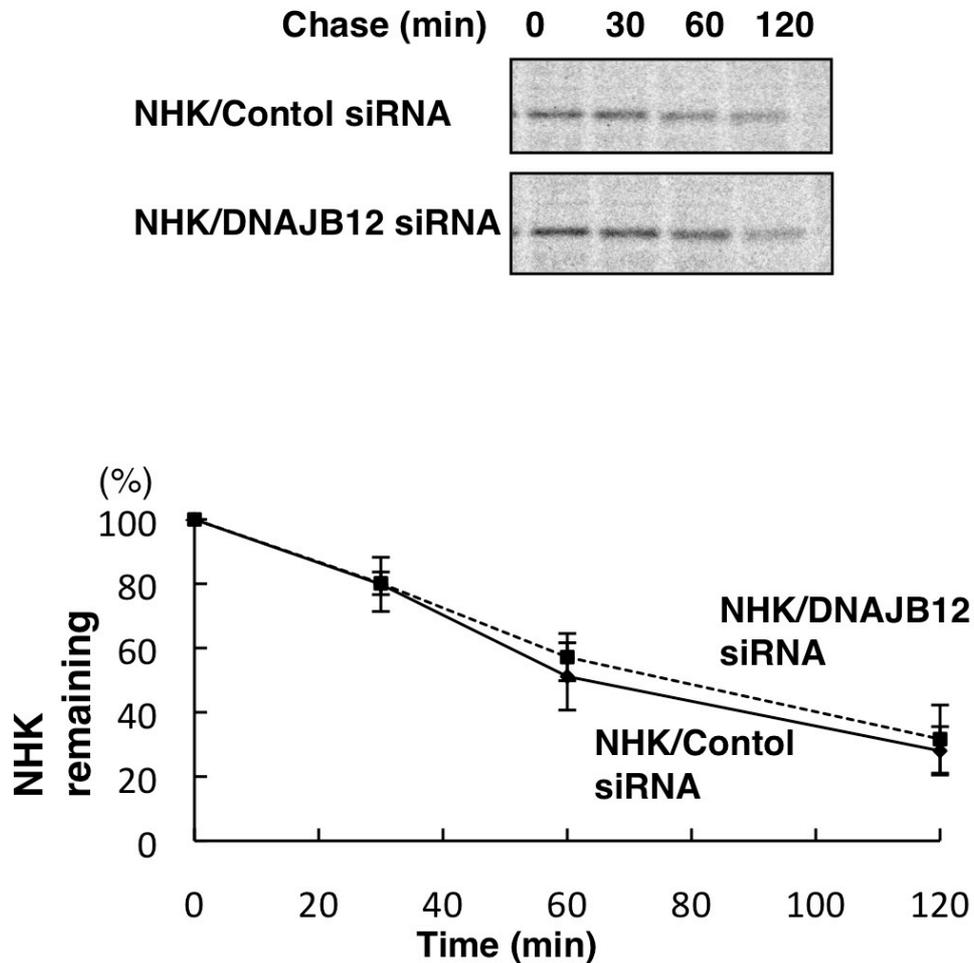


図 8 DNAJB12 は構造異常膜タンパク質の分解に寄与している

- A. Lipofectamine RNAiMAX を使用して HEK293T 細胞に siRNA(sijb12#1, sijb12#2, siLuc)をリバーストランスフェクション(細胞をデッシュに播くと同時にトランスフェクションをおこなう方法)し、36 時間後に細胞を回収した。これらの細胞からライセートを調製し、SDS-PAGE で展開した後、抗 DNAJB12 抗体及び抗 GAPDH 抗体でイムノブロットをおこなった。
- B. Lipofectamine RNAiMAX を使用して HEK293T 細胞に sijb12#1 または siLuc をリバーストランスフェクションし、その 24 時間後に構造異常膜タンパク質のモデル基質を発現するプラスミドである pEGFP- Δ F508-CFTR をトランスフェクションした。24 時間後、図 6 と

同様な手順でパルス-チェイス実験をおこなった。得られたサンプルに対して、抗 GFP 抗体で免疫沈降をおこなった後、SDS-PAGE で展開した免疫沈降物中の放射活性を BAS 2000 によって検出した。下図では、バンドの相対強度を時間経過とともにプロットした。

- C. Lipofectamine RNAiMAX を使用して HEK293T 細胞に sijb12#1 または siLuc をリバーストランスフェクションし、その 24 時間後に構造異常膜タンパク質のモデル基質を発現するプラスミドである pcDNA3.1-NHK をトランスフェクションした。24 時間後、図 6 と同様な手順でパルス-チェイス実験をおこなった。得られたサンプルに対して、抗 A1AT 抗体で免疫沈降をおこなった後、SDS-PAGE で展開した免疫沈降物中の放射活性を BAS 2000 によって検出した。下図では、バンドの相対強度を時間経過とともにプロットした。

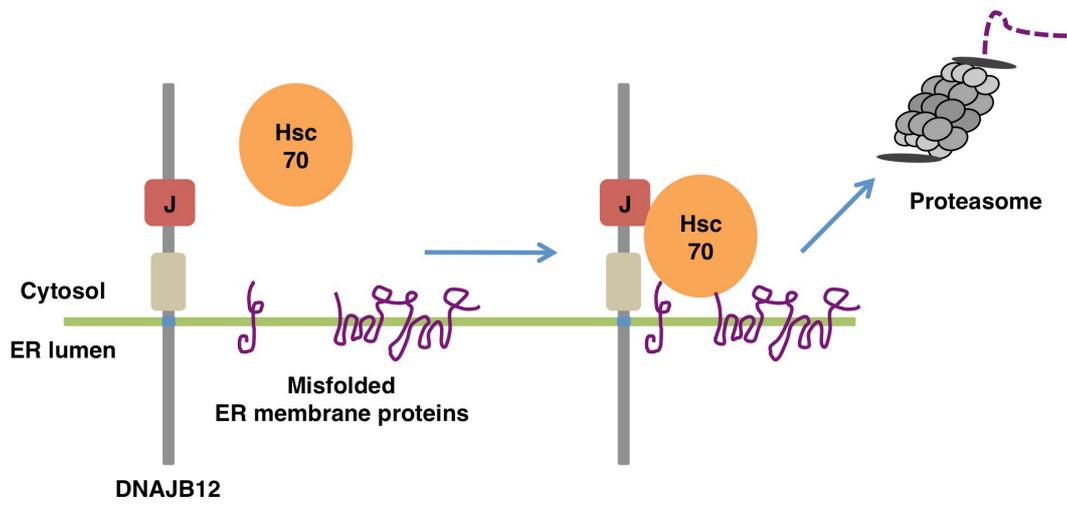


図 9 DNAJB12 による小胞体構造異常膜タンパク質分解モデル
本文参照

第二章

序論

第一章ではDNAJB12が小胞体膜に生じた構造異常タンパク質を基質とし、その分解を促進する役割を持つことを明らかにした。本章では、DNAJB12の新たな基質としてp62を同定した。p62はサイトゾルに局在するタンパク質で、アポトーシスや酸化ストレス応答など様々な細胞内プロセスの制御因子として働くことが知られている (Sanz et al., 2000; Jin et al., 2009; Komatsu et al., 2010)。本章での解析から、DNAJB12はサイトゾルのp62と結合し、その分解をユビキチン-プロテアソーム系で促進することが判明した。また、DNAJB12がアポトーシスの異常亢進を抑制する働きを持つことも明らかになった。即ち、DNAJB12は細胞機能を制御する上で重要な役割を担っていることが分かった。

材料と方法

細胞培養

本研究では、ヒト子宮頸癌株化細胞由来である HeLa 細胞及び、ヒト胎児腎細胞(HEK293)に SV40 large T 抗原を組込んだ HEK293T 細胞を用いて実験を行った。培養するための培地としては、10% fetal bovine serum (JRH Bioscience) と 4mM L-グルタミンを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) を用いた。実際の培養は 37°C、5% CO₂ 存在下で行った。

プラスミド

第一章でも用いた pCAGGS-DNAJB12-Flag を使用した。このプラスミドを哺乳動物細胞へトランスフェクションするには Effecten (QIAGEN)を用いた。

抗体

第一章で記述したものと同様の抗体を使用した。

DNAJB12 結合因子の同定を目的としたマスマスペクトル解析

HeLa 細胞へのリン酸カルシウム法による pCAGGS-DNAJB12-Flag または pCAGGS のトランスフェクションは、以下のように行った。10cm dish に 1.5×10^6 個の細胞をまき、21 時間培養後、新しい DMEM 培地に交換し、さらに 3 時間培養した。20 μ g/10cm dish の pCAGGS-DNAJB12-Flag、pCAGGS ベクターをそれぞれリン酸カルシウム法により細胞へトランスフェクトし、6 時間培養した。次いで Hank's 溶液で 2 回洗浄後、DMEM を入れて培養した。

トランスフェクションから 24 時間後に培地を除き、1ml の PBS を入れ、セルスクレイパーで細胞を回収した。lysis buffer (10mM Tris-HCl(pH7.4), 140mM NaCl, 10mM EDTA, 1% NP40) 1ml に BSA(終濃度 1%)と Protease inhibitors mix(2 μ g/ml PepstatinA, 2 μ g/ml Leupeptin、1mM Benzamidine、1mM PMSF、それぞれ終濃度)を加え、10cm dish2 枚分の細胞を懸濁し、氷上で 30 分間静置した。その後、4°C、15000rpm で 30 分間遠心し、上清を回収した。

得られた上清に対して 20 μ l の抗 Flag 抗体-Agarose ビーズ (50%slurry SIGMA) を加え 4 $^{\circ}$ C で 12 時間、rotation した。1ml の lysis buffer で 3 回ビーズを洗浄し、2 \times SDS sample buffer(DDT+) 50 μ l を加えて 50 $^{\circ}$ C、10 分間変性処理を行った。このサンプル 20 μ l を 10%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で展開した。その後、ゲルを CBB 染色し、DNAJB12 過剰発現時に特異的に現れるタンパク質バンドを確認した。これ以降のマスペクトル解析に必要な作業 (バンドの切り出し、タンパク質のゲル内消化、ペプチド抽出と脱塩、質量分析、データベース検索) は本学ベンチャービジネスラボラトリに委託し、質量分析計 MADLI-TOF MS (voyager) により解析された。マスペクトル解析のデータベース検索には、Mascot を用いた。

DNAJB12 と p62 の結合実験

サンプル調製: HeLa 細胞を 6 穴プレートに播種し、5% CO₂ 存在下、37 $^{\circ}$ C で培養した。翌日、培養ディッシュの 50~80%が細胞で被われていることを確認した後、Effecten (QIAGEN)を用いて、DNAJB12-Flag を発現するプラスミドを HeLa 細胞に導入した。また、内在性の DNAJB12 と p62 の結合も検証するために、トランスフェクション未処理の細胞も用意した。24 時間の培養後、それぞれの細胞を 1ml の PBS で懸濁した後、遠心分離 (5,000 rpm、5 分、4 $^{\circ}$ C) によって細胞を回収した。タンパク質を抽出するため、回収した細胞は 200 μ l の Lysis buffer [50mM Tris-HCl(pH 8.0)、150mM NaCl、1% Nonident P-40] に懸濁した。この際、タンパク質分解を抑えるため、Lysis buffer には Protease inhibitor (2 μ g/ml Pepstatin A、2 μ g/ml Leupeptin、1mM Bsnzamidine、1mM PMSF) を加えた。30 分後、15,000 rpm、20 分、4 $^{\circ}$ C で遠心分離し、上清 (可溶性画分) を回収した。

免疫沈降: 上記のように調製した細胞ライセートに 20 μ l の抗 Flag 抗体及び、抗 DNAJB12 抗体を加え、4 $^{\circ}$ C で 45 分間インキュベートした。その後、20 μ l (50%bed vol) のプロテイン A を加えた。その間、サンプルを含むチューブは 4 $^{\circ}$ C で、上下にゆっくりと回転させた。抗原と抗体を結合させた後、非特異的に抗体ビーズに結合しているタンパク質を除く目的で、ビーズは Protease inhibitor を含んでいない 1ml Lysis buffer で 3 回洗浄した。次に、ビーズから DNAJB12 およびこれと結合しているタンパク質を遊離させるために、ビーズに 2 \times SDS sample buffer を 60 μ l 加え、室温で 30 分間静置後、更に、65 $^{\circ}$ C、10 分で変性

処理した。このようにして得られた最終サンプルを免疫沈降サンプルとして用いた。

DNAJB12 に結合している p62 の検出： 上記免疫沈降サンプル (10 μ g) を 7.5% の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、イムノブロットを行った。過剰発現及び内在性の DNAJB12 に結合している p62 を検出した。

免疫抗体染色法による内在性 DNAJB12 と p62 の細胞内局在の観察

HeLa 細胞を No.1S coverglass(松浪硝子)を敷いた 6 well プレート (costar カタログ No 3516 Corning Incorporated) に 0.6×10^6 cell/dish の密度で播き培養した。さらに一部の細胞に関しては細胞固定前にプロテアソーム系の阻害剤である MG132 を 3 時間処理した。その後、1% 酢酸 / 99% エタノールで 15 分間処理し、細胞の固定を行なった。次に 15 分間ジギトニン (50 μ g/mL) / PBS で細胞膜透過処理を行なった後、3% BSA / PBS でブロッキングした。この細胞に対して抗 DNAJB12 抗体及び抗 p62 抗体 (3% BSA / PBS でそれぞれ 100 倍、500 倍に希釈) を一時間反応させた。その後 PBS で 3 分間、5 回洗浄後、細胞に二次抗体 (guinea pig Alexa Fluor 647 及び rabbit Alexa Fluor 488 それぞれ 3% BSA / PBS で 200 倍希釈) を一時間室温で反応させた。さらに先ほどと同様に細胞の洗浄を行った。次に細胞を ProLong Gold (Invitrogen) で封入後、OLYMPUS 社製、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV1000 で観察した。

パルス-チェイス実験

2.0×10^5 cell/dish の HEK293T 細胞を 6 well のコラーゲンコートプレート (IWAKI) に播種し、5% CO_2 、37°C の条件で 24 時間培養後、Effecten (QIAGEN) を用いて DNAJB12-Flag をトランスフェクションした。さらに 24 時間培養した後、メチオニン、システインフリーの DMEM (GIBCO) (10% FBS) を用いて 15 分間インキュベートした。その後、 ^{35}S -EXPRESS protein labeling mixture (PerkinElmer) を用いて標識を行った。10 分間の標識の後、培地を通常の DMEM に交換し培養を継続した。経過時間ごとに細胞を 1 ml の PBS で洗浄後、回収した。タンパク質を抽出するため、回収した細胞に 100 μ l の Laemmli sample buffer を加えてシリンジナイズを行い、15000rpm、4°C で 15 分間遠心

した。回収した上清に、900 μ l の RIPA lysis buffer [50mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 0.5% deoxycholic acid]を加えて希釈し、サンプル調製を行った。その際、タンパク質分解を押さえる目的で Protease inhibitor (2 μ g/ml Pepstatin A, 2 μ g/ml Leupeptin, 1mM Bsnzamidine, 1mM PMSF) を加えた。

非特異的にビーズに結合するタンパク質を除く目的で、上記サンプルに 5 μ l の protein A-coupled Sepharose beads (GEHealthcare)を加え、4°Cで15分間、プレクリアを行った。その後、遠心して上清を回収し、そこに2 μ lの抗 p62 抗体を加え、4°Cで45分間、抗原抗体反応を行った。次に、20 μ l の protein A-coupled Sepharose beads (GEHealthcare)を加え、4°Cで1時間、回転させながらインキュベートした。その後非特異的にビーズに結合しているタンパク質を除く目的で、1mlの0.2% SDS RIPA lysis buffer [50mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 0.2% SDS, 0.5% deoxycholic acid]で3回洗浄した。次に、ビーズに60 μ lのLaemmli sample bufferを加えて室温で30分静置した後、65°C、10分の熱変性処理を行った。以上の行程から得られたサンプルを最終サンプルとして用いた。最終サンプルのうち20 μ lを、11.25%のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。SDSポリアクリルアミドゲルを乾燥させた後、IPプレートに密着させ、2日後にBAS2500 (Fujifilm)により放射性シグナルを検出した。

DNAJB12 ノックダウン時におけるデスレセプター系アポトーシス検出実験

HEK293T細胞にsijb12#1またはsilucを導入後、24時間後に細胞培養液中にリガンドであるTRAILを添加し、デスレセプターを介したアポトーシスを誘導した。アポトーシスを起こした細胞を観察するためには、アポトーシスを誘導する30分前にCellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent(Invitrogen)を細胞培養液中に添加した。この試薬は通常状態ではDEVDペプチドによって核染色試薬が保護され、蛍光を発しない状態になっている。caspase-3/7が活性化しアポトーシスが促進された状態になると、活性型caspase-3/7によってDEVDペプチドが切断され、蛍光色素が核酸に結合できるようになり、蛍光が検出される。この実験では共焦点レーザー顕微鏡を用いて、アポトーシスをおこした細胞が発する蛍光を観察した。

結果

DNAJB12 と相互作用するタンパク質の同定

出芽酵母では、サイトゾルの構造異常タンパク質のモデル基質のいくつかは、小胞体膜上までリクルートされた後、プロテアソーム系で分解される。この際、小胞体膜上にアンカーされているサイトゾルの DnaJ タンパク質である Ydj1 が、サイトゾルの Hsp70 である Ssa1 と協調的に働くことにより、モデル基質の分解を促進する (Metzger et al., 2009)。トポロジー的に Ydj1 と DNAJB12 は似ていることから、私は、DNAJB12 はサイトゾルのタンパク質の分解にも関与しているのではないかとこと予想した。本章では、この点に関して何らかの手がかりを得る目的で、まず DNAJB12 と相互作用しているタンパク質を同定することにした。

このためには、DNAJB12 および DNAJB12 と結合しているタンパク質を細胞ライゼートから精製したのち、そのなかに含まれるタンパク質をマススペクトル法で解析した。より具体的には次のように実験をおこなった。まず、細胞ライゼート中の DNAJB12 の精製を容易にする目的で、DNAJB12 の C 末端に Flag タグを付加した DNAJB12 (DNAJB12-Flag) を HeLa 細胞に過剰発現させた。次に、細胞を非変性条件下で溶解した。その後、抗 Flag 抗体-Agarose ビーズを用いて免疫沈降を行い、DNAJB12 およびこれに結合しているタンパク質を分離精製した。

次に、DNAJB12 と相互作用するタンパク質を検出するために、免疫沈降後のサンプルを SDS-PAGE で分離後、ゲル中のタンパク質を CBB 染色した (図 10)。その結果、DNAJB12-Flag を過剰発現させた細胞から調製したサンプルには、コントロールに存在しない 19 本のバンドが確認された。そのうち 16 本のバンドのマススペクトル解析を行い、その中に含まれるタンパク質を同定した。

マススペクトル解析の結果、合わせて、57 種類のタンパク質が検出された (表 2~4)。その細胞内における局在は次のようになる。即ち、24 種類がサイトゾルに (表 2)、6 種類が小胞体に局在するタンパク質であった (表 3)。形質膜のタンパク質や分泌タンパク質なども、6 種類が検出された (表 3)。その他 21 種類はミトコンドリアや核内に局在する (と推測される) タンパク質であった (表 4 及び 5)。

第一章で記述したように、Hsc70 と DNAJB12 が結合することは既に確認している。この Hsc70 は今回の実験でも検出された。また、検出されたペプチドの種類は、Hsc70 のものが、今回同定した 57 種類のタンパク質のうちで、2 番目に多かった。このことから、今回用いた実験条件は DNAJB12 と相互作用するタンパク質を精製する上で、適切なものであったと判断した。

先に述べたように、サイトゾルまたは小胞体に局在するタンパク質は、DNAJB12 と相互作用する可能性がある。今回同定されたタンパク質のうち、このような局在を示すものは 30 種類ある。そのなかで、私はサイトゾルに局在する p62 に注目した (表 2 及び図 11)。

p62 (A170/Sqstm1) は真菌や植物には存在せず、多細胞動物に保存されている。多細胞生物の細胞内において p62 は、アポトーシスや抗酸化ストレス応答など、様々な細胞内プロセスを制御していることが知られている (図 12-A, B) (Moscato, J., and Diaz-Meco, M.T. 2009)。

これらの制御において、p62 の細胞内存在量が重要な意味を持つことが知られている。即ち、ロックダウンにより細胞内の p62 の発現を減少させると、デスレセプター系のアポトーシスが著しく抑制されることが報告されている (Jin et al., 2009)。また、細胞内で p62 を過剰発現させると、酸化ストレス応答が過剰に亢進することも報告されている (Komatsu et al., 2010)。これらのことから、細胞内において p62 の存在量が一定レベルに保たれることが、細胞の恒常性維持に重要であることがわかる。

さらに、最近、p62 の一部が小胞体膜近傍に局在していることも報告された (Itakura and Mizushima 2011)。よって、p62 は小胞体膜上で DNAJB12 と相互作用する可能性がある。事実、先述したように DNAJB12 と相互作用する因子の候補として p62 が同定された。

以上のことから私は DNAJB12 が小胞体膜上で p62 の一部を分解することによって、アポトーシスをはじめとする細胞内プロセスを制御しているのではないかと予想した。

DNAJB12 と p62 は実際に結合する

はじめに、DNAJB12 が p62 と実際に結合しているかどうかを、再度、免疫沈降実験をおこなうことによって調べた。まず、HeLa 細胞に DNAJB12-Flag を過剰発現させ、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行った。次に、免疫沈降画分に含ま

れるタンパク質を SDS-PAGE によって分離した後、抗 p62 抗体を用いてイムノブロットを行った。その結果、約 60kDa の位置にバンドが検出され、p62 が DNAJB12 と共沈降していることが確認できた (図 13-A、レーン 2)。一方、DNAJB12-Flag を発現していない細胞から調製したサンプルを用いた場合には、p62 は検出されなかった (図 13-A、レーン 1)。このことから、p62 は、確かに、DNAJB12-Flag と結合していることがわかった。

上記の実験では細胞内で過剰生産された DNAJB12 と p62 の相互作用を調べている。次に、内在性 DNAJB12 と p62 とが結合するかどうかを調べることにした。HeLa 細胞ライセートから、DNAJB12 及びこれに結合したタンパク質を免疫沈降によって回収し、免疫沈降画分に p62 が含まれるかどうかを調べた。この免疫沈降には抗 DNAJB12 抗体を利用した。その結果、この場合にも DNAJB12 と p62 の共沈降が確認された (図 13-B、レーン 2)。一方、Non-immune serum で免疫沈降した場合には p62 は検出されなかった (図 13-B、レーン 1)。このことから、内在性の DNAJB12 も p62 と結合していることが明らかになった。

DNAJB12 と p62 の細胞内局在

先述したように、内在性の DNAJB12 と p62 が結合したことから、それぞれの一部が共局在している可能性がある。この点について調べる目的で、HeLa 細胞中における DNAJB12 と p62 の局在を免疫抗体染色により観察した。その結果、DNAJB12 が形成する構造体の近傍にも p62 が観察された (図 14-A,B,C)。この結果から DNAJB12 と p62 の一部は近接して局在することが明らかになった。

DNAJB12 はユビキチン-プロテアソーム系で p62 の分解を促進する

先述したように、DNAJB12 は基質となる膜タンパク質のプロテアソームによる分解を促進する。また、上記の解析によって細胞内において一部の DNAJB12 と p62 が結合していることも明らかになった。このことから、私は DNAJB12 が p62 の一部をユビキチン-プロテアソーム系で分解促進する可能性を予想した。

このモデルを検証するため、DNAJB12 を細胞に一過的に発現させ、p62 への影響を調べた。具体的には、まず、HEK293T 細胞に DNAJB12-Flag を一過的

に発現させた。次にこの細胞中のタンパク質を、Laemmli sample buffer で可溶性化し、SDS-PAGE によって分離した後、抗 p62 抗体を用いてイムノブロットを行った (図 15)。その結果、DNAJB12 過剰発現により、p62 の蓄積量が低下していることがわかった (図 15-A レーン 3)。このことから、DNAJB12 が p62 の分解を促進している可能性が予想された。

もし、ここで想定しているタンパク質分解がユビキチン-プロテアソーム系を介して起こっていれば、ユビキチン-プロテアソーム系の阻害剤により p62 の蓄積量は増えるはずである。このことを調べる目的で、20uM の MG132 を細胞に添加したところ、p62 の蓄積量が増大した (図 15-A, レーン 4)。これらの結果から DNAJB12 はユビキチン-プロテアソーム系で p62 の分解を促進していることが予想された。

次に、DNAJB12 が p62 の分解を実際に促進しているかどうかを調べるためにパルス-チェイス実験を行った。このためにはまず、HEK293T 細胞を ³⁵S-メチオニン/システインを含んだ培地中で 10 分間インキュベートし、新規に合成されたタンパク質を標識した。その後、通常の培地に戻し、放射性同位体で標識されたタンパク質の運命を時間経過で追跡した。このようにして得たサンプル中の p62 を免疫沈降によって回収した後、SDS-PAGE によって分離することによって、p62 の分解過程を追跡した (図 15-C)。DNAJB12-Flag を発現させた場合、時間経過と共に p62 の減少が確認できた (図 15-D)。また、同条件下、ユビキチンプロテアソーム系の阻害剤である MG132 を添加したところ、p62 の減少が明瞭に抑制された (図 15-D)。以上の結果から、DNAJB12 は p62 の分解をプロテアソーム系で促進することがわかった。

さて、細胞を MG132 で処理した後、内在性の DNAJB12 と p62 の局在を免疫抗体染色で観察したところ、核近傍に巨大な p62 の凝集体の形成が確認された。さらに、驚くべきことにその p62 の巨大な凝集体の周囲を囲むように DNAJB12 が観察された (図 14-D,E,F)。それではなぜ、このような凝集体が形成されたのであろうか？MG132 によってプロテアソーム系による p62 の分解が阻害されるはずである。その結果、この実験では分解を免れた p62 が DNAJB12 の近傍に蓄積したのかもしれない。

以上は DNAJB12 を過剰発現させたことによる、p62 への影響を調べたものである。次に内在性の DNAJB12 が p62 の分解の促進に関与するかどうかを検証することにした。そのために、DNAJB12 に特異的な siRNA を用いてノック

ダウンすることで内在性の DNAJB12 の発現量の抑制を行った。この際、siRNA は第一章で用いたものと同様の siRNA を使用した (図 8-A)。HEK293T 細胞に DNAJB12 siRNA (sijb12 #1) を一過的に導入したところ、p62 の蓄積量の増加が確認された (図 16-A レーン 2)。バンド強度の定量を行ったところ (図 16-B)、DNAJB12 のノックダウンにより、p62 の蓄積量が 2.5 倍に上昇していることが確認された。この結果から内在性の DNAJB12 が p62 の分解を促進している可能性が考えられた。それを明らかにするためにパルス-チェイス実験を行った。siRNA(sijb12#1)により、内在性の DNAJB12 の発現量を低下させた結果、コントロールの siRNA(siluc)に比べて、p62 の分解が遅延していた (図 16-C,D)。

これらの結果から、内在性の DNAJB12 は細胞内に存在している p62 の一部の分解を促進していることが明らかになった。また、この分解にはユビキチン-プロテアソーム系が利用されていることも明らかになった。

DNAJB12 のノックダウンにより、p62 の細胞内凝集体が著しく増加する

p62 は細胞内においてモノマー、ダイマー及びオリゴマーの状態が存在することが知られている。ここでは DNAJB12 の発現量の抑制が、細胞内の p62 の状態に及ぼす影響を免疫抗体染色によって調べた (図 17)。先述したノックダウンと同じ条件で、siRNA により DNAJB12 の発現量を抑制した結果、細胞内に p62 の凝集体が多数形成された (図 17-右下のパネル)。この結果から、DNAJB12 は細胞内の p62 の存在状態にも影響を及ぼすことが明らかになった。

DNAJB12 のノックダウンにより、アポトーシスが促進される

以上の解析から、DNAJB12 は p62 の細胞内存在量の制御に重要な役割を担っていることが分かった。それではこのような DNAJB12 による、p62 の存在量の制御は生命にとって、どのような意義があるのであろうか。

先述したように、p62 は細胞内において様々なシグナル伝達のプロセスに関与している。その一つにアポトーシスの制御がある。アポトーシスは様々な形態があるが、p62 はデスレセプター系のアポトーシスの制御に関与している (Jin et al., 2009)。この過程における p62 の役割は重要であり、p62 のノックダウンによって p62 の細胞内の発現量を低下させると、デスレセプター系のアポトーシスは抑制されてしまう。このような知見と上記の結果を考え合わせる

と DNAJB12 は p62 の一部の分解を促進することによって、デスレセプター系のアポトーシスを制御している可能性があるとは私は予想した。これが正しいとすれば、DNAJB12 の発現量を低下させると p62 の細胞内の蓄積量が増加し、デスレセプター系のアポトーシスが促進すると考えられる。そこで、このモデルを検証するために以下の実験を行った。

具体的には、DNAJB12 の発現抑制が、デスレセプター系のアポトーシスに対してどのような影響をもつのかを調べた。この実験において、デスレセプター系のアポトーシスを誘導するためには、それに対するリガンドである TRAIL を用いた。TRAIL を細胞培養液中に添加するとデスレセプターを介したアポトーシスが誘導される。この際、アポトーシスの観察には Invitrogen 社の CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent を用いた。この試薬は通常状態では DEVD ペプチドによって核染色試薬が保護され、蛍光を発しない状態になっている。caspase-3/7 が活性化しアポトーシスが促進された状態になると、活性型 caspase-3/7 によって DEVD ペプチドが切断され、蛍光色素が核酸に結合できるようになり、蛍光が検出される。よってアポトーシスを起こした細胞では、緑色の蛍光が観察される (図 18)。

この顕微鏡による蛍光観察の結果は TRAIL によってアポトーシス誘導後、その進行過程を撮影したものである (図 18)。その結果、DNAJB12 のノックダウンを行い、その発現量を低下させた場合、アポトーシスを起こしている細胞の割合が明らかに上昇した (図 18-下段パネル)。このことから、DNAJB12 はデスレセプターを介したアポトーシスの抑制において重要な役割を担っていることが明らかになった。

考察

今回、私は DNAJB12 がサイトゾルのタンパク質である p62 の分解を促進することを見出した。また、この DNAJB12 による p62 の分解促進にはユビキチン-プロテアソーム系が使われていることも明らかにした。さらに、DNAJB12 は、おそらく p62 の分解を促進することによって、アポトーシスの誘導を抑制していることも見出した。

これらの結論は、次のような結果に基づく。1)小胞体膜に局在する一回膜貫通タンパク質である DNAJB12 はサイトゾルに局在する p62 と結合した。2)DNAJB12 を細胞内で過剰発現したところ、内在性の p62 の分解が促進された。3)この DNAJB12 依存的な p62 の分解はプロテアソーム系阻害剤で抑制された。4)ロックダウンにより内在性の DNAJB12 の発現量を低下させると p62 の分解が顕著に抑制された。5) 同条件下、p62 の細胞内局在を観察したところ、細胞内に多数の p62 凝集体が観察された。6) 同条件下、デスレセプター系アポトーシスのリガンドである TRAIL を細胞に作用させたところ、アポトーシスが顕著に促進された。よって、DNAJB12 はアポトーシスの異常亢進を抑制するために必要であることがわかった。

過剰量の p62 が細胞内に存在すると細胞のアポトーシスを異常に亢進してしまうと予想される。よって、私は、DNAJB12 が p62 の一部を分解することによって、アポトーシスが正常な頻度でおこるよう、この過程を制御する役割を担っているのではないかと考えている(図 19)。

先述したように、p62 はアポトーシスや酸化ストレスを制御する役割をもつ。p62 は、これに加えて、選択的オートファジーと呼ばれる細胞内のプロセスにおいても重要な役割を果たしていることがわかりつつある。すなわち、p62 は、1)UBA ドメインを介してユビキチン化されたタンパク質やオルガネラと結合すると共に、PB1 ドメインを介して p62 同士が結合することにより、大きな凝集体を形成する。また、2) LC3-interacting region (LIR)を介してオートファゴソーム形成に必要な LC3 とも相互作用する (Komatsu et al., 2007)。以上の過程により、ユビキチン-プロテアソーム系では壊し得ない凝集化したユビキチン化タンパク質やオルガネラをオートファゴソームへ選択的に運び込むためのアダ

プターとして p62 が機能することが明らかにされている(Bjorkoy et al., 2005)。

重要なことに、この過程で p62 は基質と共にオートファジーで分解、代謝される。よって、p62 は選択的オートファジーの過程で分解されることがわかってきた。今回、私が示した結果から p62 はこれまで知られていたオートファジーだけでなく、ユビキチン-プロテアソーム系によっても分解、代謝されるということが分かった。さらにこのような p62 の分解が細胞の恒常性維持に重要であることも分かった。従って本研究は p62 の新しい代謝経路とその生理的役割を提唱するものである。

これまでの結果から、DNAJB12 は p62 の一部の分解を促進することによって p62 の細胞内レベルを一定に保つ役割があると考えられる。さて、p62 は細胞内で、モノマー、ダイマー及びオリゴマーの状態が存在することが知られている(Bjorkoy et al., 2005)。それではどのような状態の p62 が分解されているのであろうか？

この問いに対して以下のことを予想している。プロテアソームによるタンパク質分解のためには、タンパク質の立体構造を解き直径 2nm の通路を通し触媒活性をもつプロテアソーム内腔へ送り込む必要がある。したがって、p62 がオリゴマー化し凝集体を形成している場合、プロテアソームでは分解することはできない (Venkatraman et al., 2004)。このことから、私は凝集体を形成していないモノマーないしダイマー状態の p62 が DNAJB12 依存的にユビキチン-プロテアソーム系で分解されているのではないかと予想している。この際、特定のコンフォメーションをとる p62 のみが分解されているのか、あるいは構造は同じでも、過剰な分の p62 が分解を受けているのかは興味深い点である。

p62 は先述したように、アポトーシスや選択的オートファジーだけではなく酸化ストレス応答も制御する(Komatsu et al., 2010)(図 12-B)。多くの抗酸化タンパク質の遺伝子発現は転写因子 Nrf2 タンパク質によって制御される(Itoh et al., 1997; Itoh et al., 1999; Wakabayashi et al., 2003)。定常状態においては、Nrf2 は Cullin3 型ユビキチンリガーゼ複合体のアダプタータンパク質 Keap1 と結合し、ユビキチン化され、プロテアソームによって恒常的に分解される。この結果、定常状態において、過剰な抗酸化タンパク質の発現誘導が抑制されている(Motohashi and Yamamoto 2004)。

この酸化ストレス応答の制御において、p62 は酸化ストレス応答の促進に働くことが分かりつつある。すなわち、p62 は Nrf2 と Keap1 の結合領域に直接

かつ競争的に結合する。そして p62 が Keap1 に結合することによって、Nrf2 は Cul3 によるユビキチン化及びプロテアソームによる分解を逃れ、核へと移行する。この結果、核へと移行した転写因子 Nrf2 が抗酸化タンパク質の発現を誘導する(Komatsu et al., 2010)。事実、初代培養した肝細胞に p62 を過剰発現させ、p62 の細胞内存在量を増加させると、Nrf2 と Keap1 の相互作用が競合的に阻害されることが報告されている。その結果、Keap1 に結合せず、ユビキチン化を逃れた Nrf2 が核へと以降し、抗酸化タンパク質群を誘導する(図 12-B)。

マウス個体を用いた実験で Nrf2 による抗酸化タンパク質の発現誘導が続くと肝細胞の肥大化そして、肝障害が生じることも報告されている(Inami et al., 2011)。従って、抗酸化タンパク質の過剰発現は、細胞にとって有害であることが分かる。

一方、過剰量の p62 も抗酸化タンパク質の発現を異常亢進することから、細胞内において p62 の存在量が制御され、一定に保たれることが重要であると考えられる。これらの知見と、今回の私の結果から、私は DNAJB12 が余分な p62 の分解を促進することで、抗酸化タンパク質の過剰な発現誘導も抑制しているのではないかと予想している。今後、DNAJB12 のノックダウンを行うことで、抗酸化タンパク質群の発現誘導が上昇するかどうかについて、転写レベル及びタンパク質レベルで検証する予定である。

ユビキチン-プロテアソームシステムでは、分解を運命付けられたタンパク質は E1, E2, E3 の酵素反応を介して、ユビキチンを付加される。その後、ユビキチン鎖結合能を持つシャトルタンパク質がユビキチン化タンパク質をプロテアソームへ運ぶ(ユビキチン化タンパク質が直接プロテアソームに結合する場合もある)。その結果、標的タンパク質は分解される。この一連の過程において、標的タンパク質を認識し、これを直接ユビキチン化するのは E3 (ユビキチンライゲース) である。現在、E3 は高等動物では 600 以上見つかった。

第一章において、DNAJB12 は小胞体に局在する構造異常膜タンパク質をユビキチン-プロテアソーム系で分解促進することを記述した。この過程において、DNAJB12 と結合して基質のユビキチン化を促進する E3 として RMA1(RNF5) が他の研究グループから報告されている(Grove et al., 2011)。RMA1 は小胞体に局在する膜タンパク質で、CFTR の変異型である CFTR Δ F508 のユビキチン化を促進する(Morito et al., 2008)。

以下の点から、私は DNAJB12 が p62 の分解をユビキチン-プロテアソーム系

で促進する上での E3 として RMA1 を予想している。1)先述したように、DNAJB12 は小胞体に生じた構造異常膜タンパク質のユビキチン化を促進する RMA1 と結合し、共に基質の分解を促進する。2)細胞内における一部の p62 は小胞体膜近傍に局在する。先述したように、RMA1 自身も膜タンパク質である。よって、RMA1 と p62 の一部は、相互作用しやすいと考えられる。今後は RMA1 が p62 の分解促進及びユビキチン化に関与しているかどうかについても検証していきたい。

DNAJB12 のノックダウンを行い p62 の分解を抑制した場合には p62 がドット様の構造体を形成した (図 17)。この構造体がどのようなものであるかは現時点では不明である。今後はここに共局在する因子を免疫染色で観察する等により、その実体を調べる必要がある。一方、MG132 でプロテアソーム分解を抑制した場合にはより大きな p62 の凝集体が細胞中に一カ所観察された (図 14)。この凝集体は核近傍に局在することから、アグリソームという特殊な構造体であることが予測される (Johnston et al., 1998)。もしこの通りであるとする、その構造体中にはビメンチンが局在するはずで、このことを調べる必要がある。

今回の結果から、p62 は小胞体膜上のシステムも利用して分解されているということになる。現在のところ、なぜ p62 が小胞体膜上のシステムを利用して、分解されているのか？その意義については不明である。今後はその点についても調べていきたいと考えている。

図表

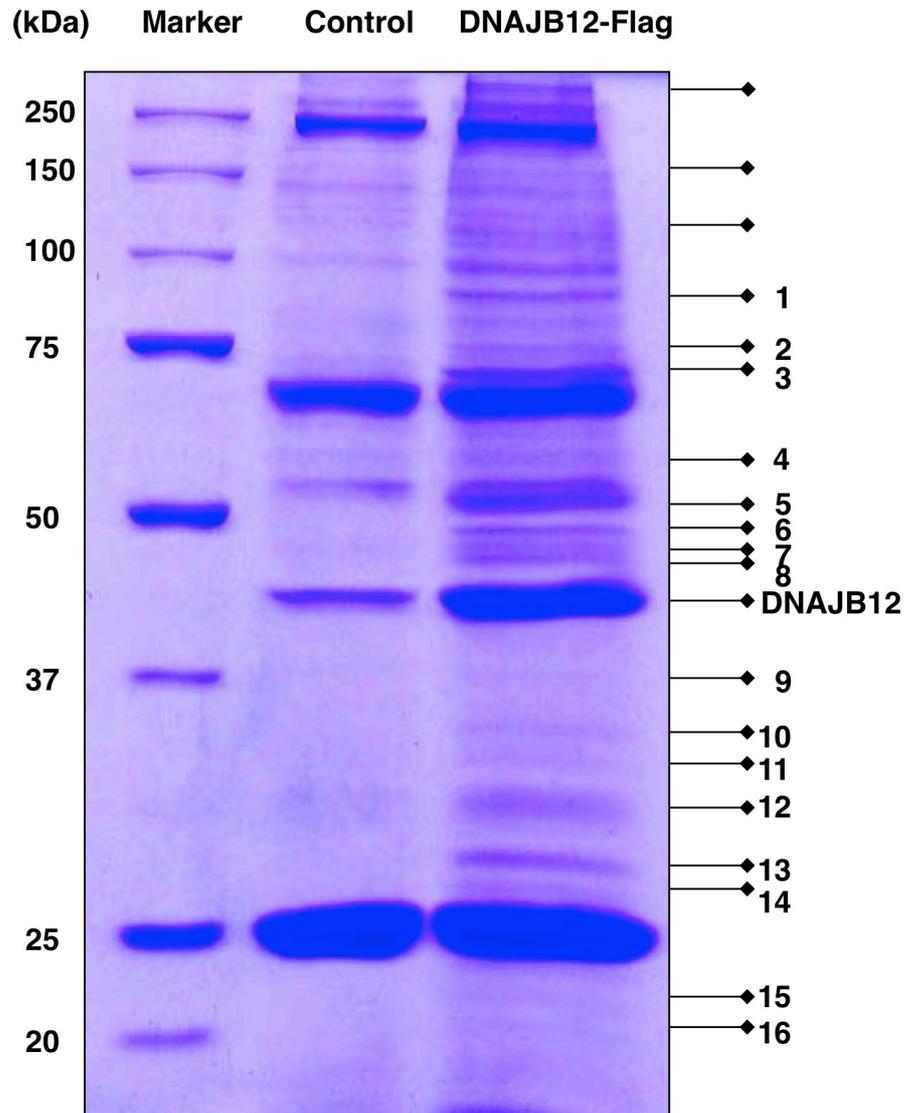


図 10 DNAJB12 相互作用因子の探索

DNAJB12-Flag を HeLa 細胞に過剰発現させ、非変性条件下で細胞を溶解後、抗 Flag アガロースビーズを用いて免疫沈降を行った。沈殿物を SDS-PAGE で分離後、ゲルの CBB 染色を行った。DNAJB12-Flag を過剰発現させた細胞に特異的に 19 本のバンドが確認された。そのうち 1 から 16 の番号で示した 16 本のバンドについてマスマスペクトル解析を行い、タンパク質を同定した。

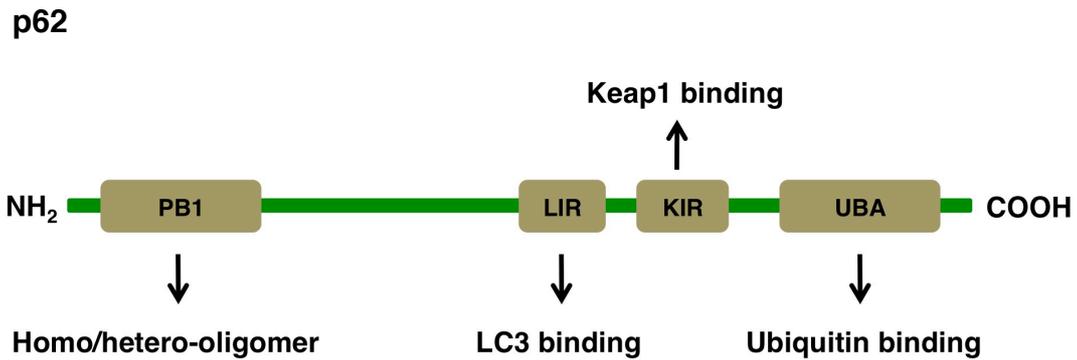
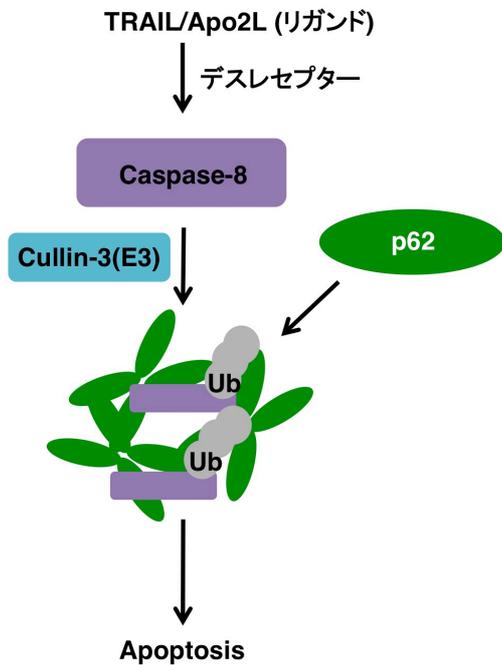


図 11 p62 (Sqstm1/A170)

p62 は全長 440 アミノ酸残基(62kDa)からなるサイトゾルのタンパク質である。N 末端にある Phox1 and Bem1p (PB1)ドメインで自己会合して、オリゴマーを形成することができる。また、C 末端側の ubiquitin-associated domain (UBA)はユビキチン結合能を持つことから、p62 はこのドメインを介してユビキチン化タンパク質と結合することにより、ユビキチン化タンパク質と凝集体を形成することができることも明らかになっている。さらに p62 は、C 末端側付近の LC3-interacting region(LIR)で、オートファゴソーム形成に必要なタンパク質 LC3 と結合する。また、Keap1-interacting region(KIR)を介して細胞の酸化ストレス応答で重要な役割をはたす Keap1 とも結合する。p62 は、このように、自身のもつ様々なドメインを介して、細胞内の種々の因子と相互作用することにより、細胞内の様々なプロセスを制御することが分かりつつある。

A



B

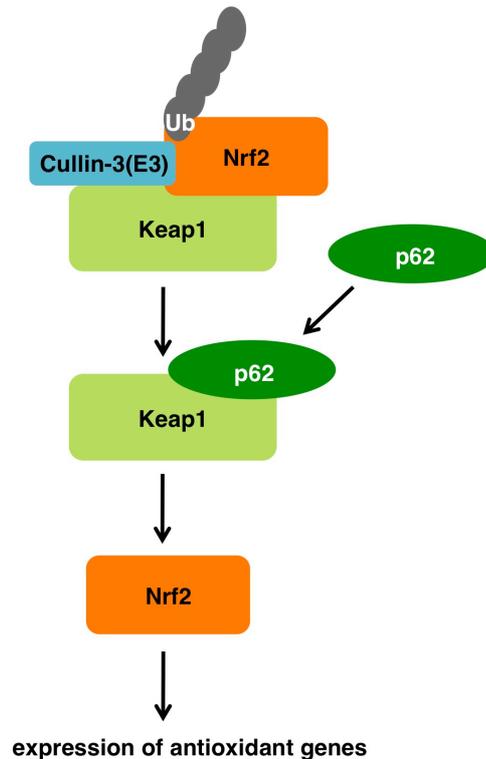
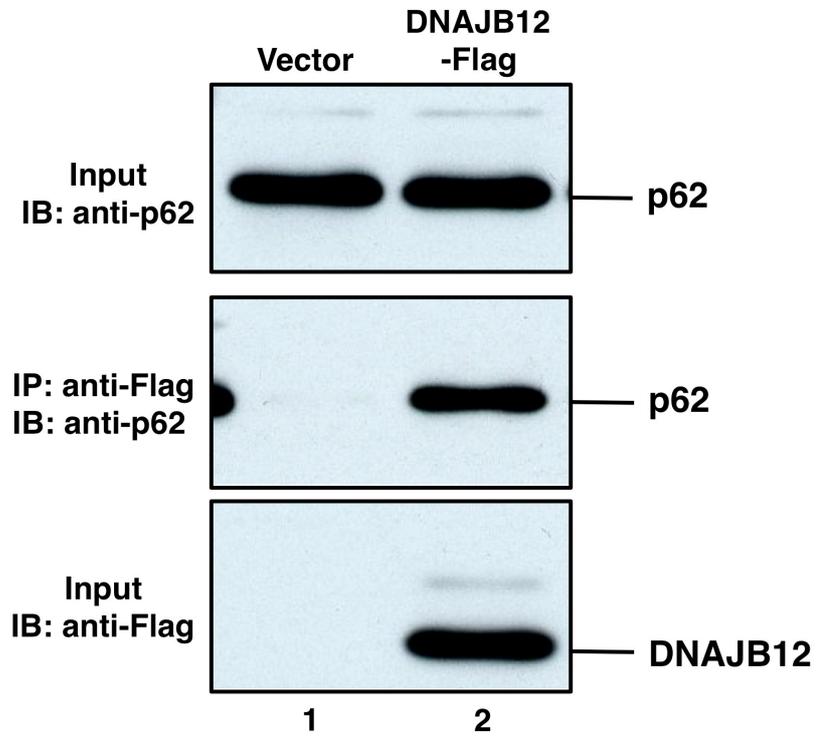


図 12 p62 はアポトーシスや抗酸化ストレス応答などの細胞内プロセスを制御する

- (A) p62 によるデスレセプター系アポトーシスの制御。細胞膜上のデスレセプターがリガンドと結合するとサイトゾルの E3 である Cullin3 がアポトーシス活性化因子 Caspase8 をユビキチン化する。次に、このようにしてユビキチン化された Caspase8 が p62 と凝集体を形成する。この凝集体形成が引き金となって、アポトーシスシグナルが下流へと伝達される。その結果、アポトーシスが亢進する。
- (B) p62 による酸化ストレス応答の制御。酸化ストレス応答においては、Nrf2 が抗酸化タンパク質の転写因子として働く。通常状態では、Nrf2 は Keap1-Cullin3 系の働きによってユビキチン化され、プロテアソームによって分解を受けるため抗酸化タンパク質の発現は抑制されている。Nrf2 と p62 は、Keap1 に直接かつ競合的に結合する。よって、p62 が Keap1 に結合することによって、Nrf2 は Cullin3 によるユビキチン化及びプロテアソ

ームによる分解を逃れ、核へと移行し、抗酸化タンパク質の発現が活性化
する。

A



B

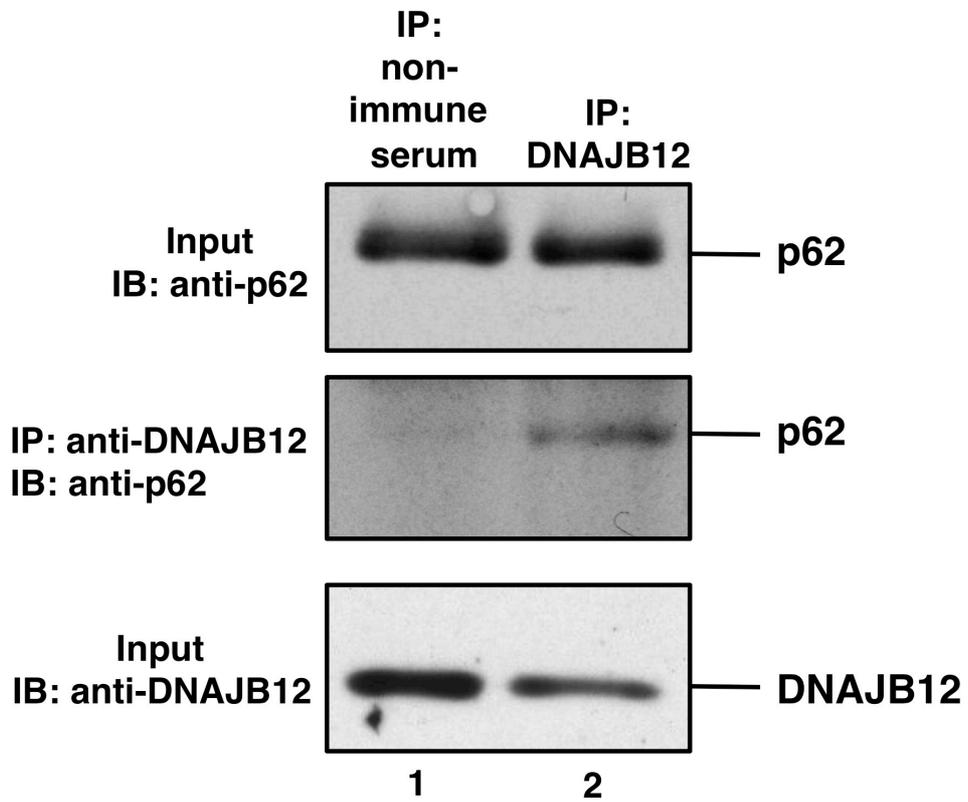


図 13 DNAJB12 は p62 と実際に結合する

(A) DNAJB12-Flag を過剰発現させた HeLa 細胞からライセートを調製した後、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行った。その後、ライセート(Input)と免疫沈降産物を SDS-PAGE で展開し、抗 p62 抗体及び、抗 Flag 抗体でイムノブロットを行った。

(B) HeLa 細胞からライセートを調製した後、抗 DNAJB12 抗体で免疫沈降を行った。その後、ライセート(Input)と免疫沈降産物を SDS-PAGE で展開し、抗 p62 抗体及び、抗 DNAJB12 抗体でイムノブロットを行った。

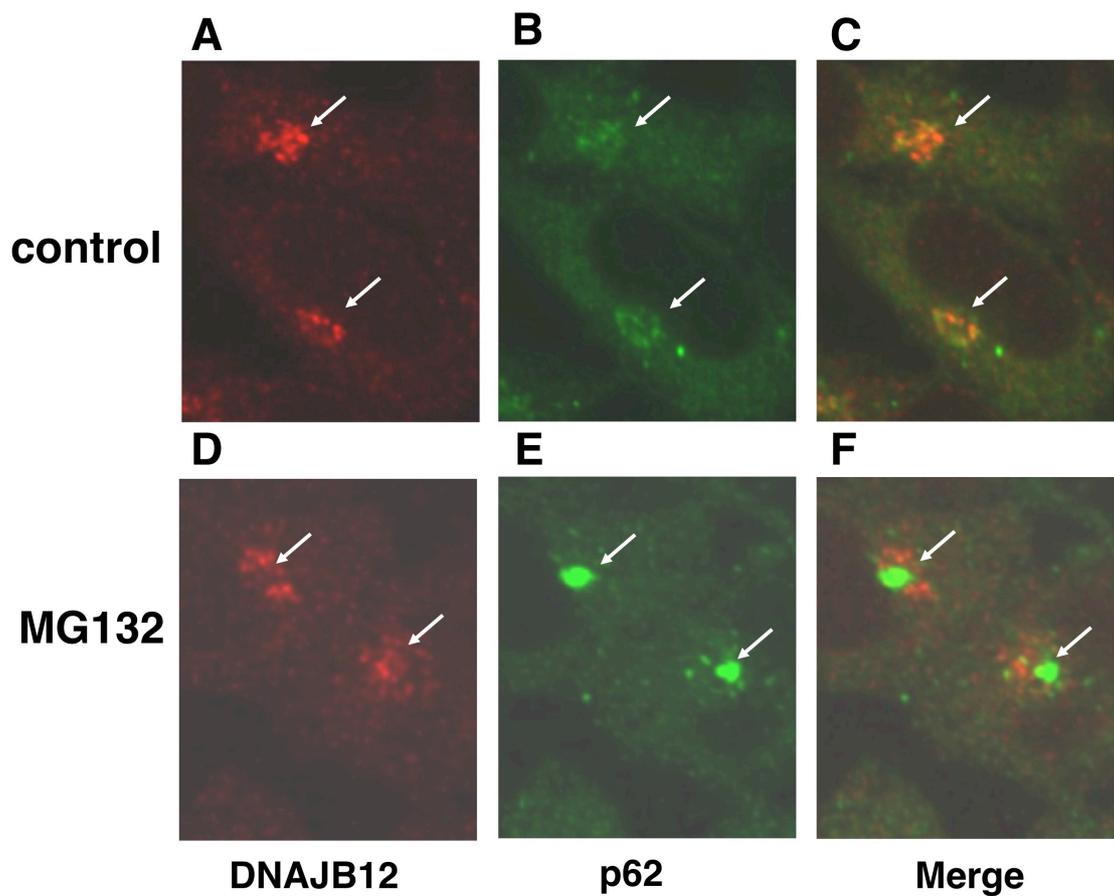
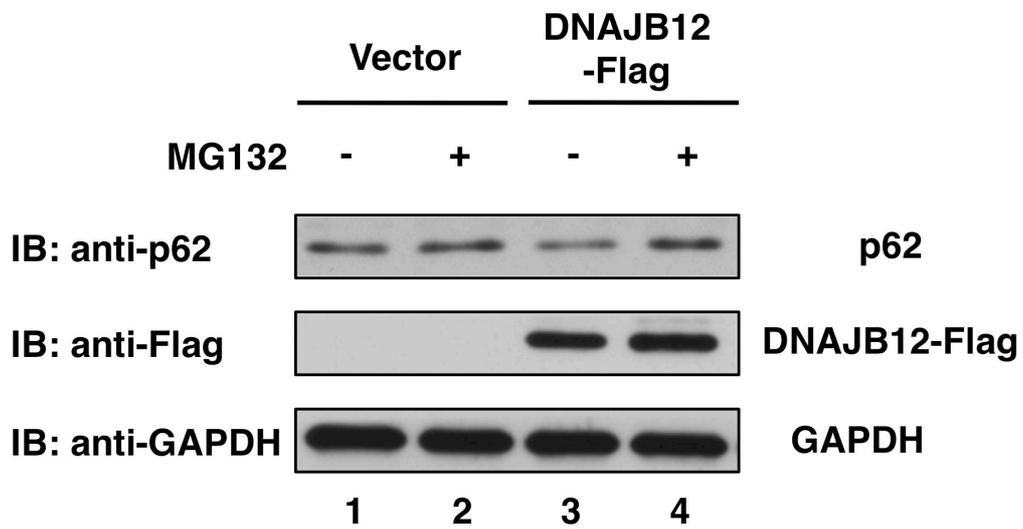


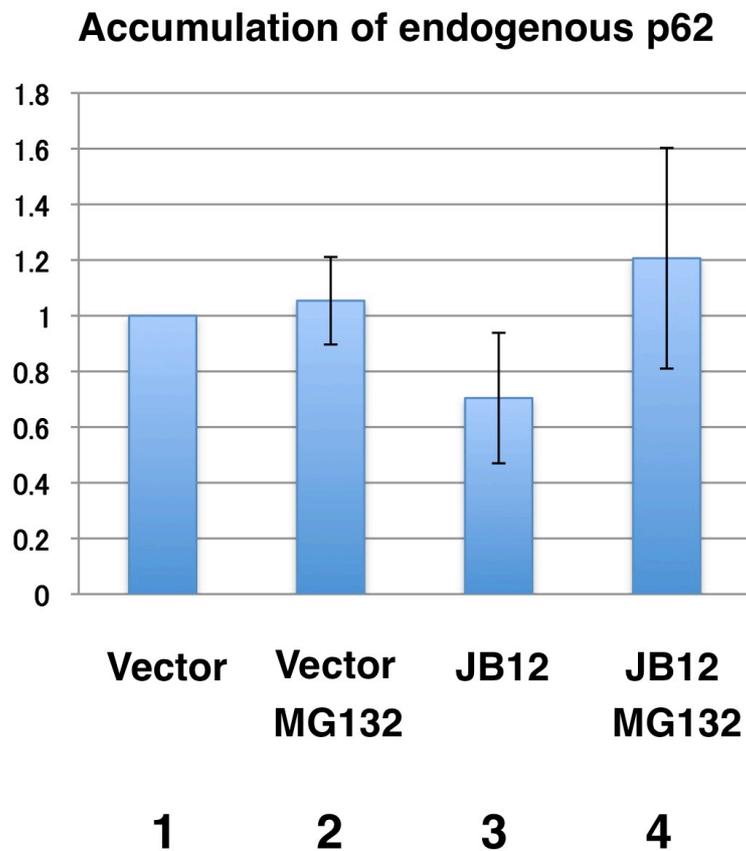
図 14 DNAJB12 と p62 の細胞内局在

HeLa 細胞において、DNAJB12 と p62 の細胞内局在を免疫抗体染色法により観察した。DNAJB12 の検出には抗 DNAJB12 抗体と Alexa647 が結合している二次抗体を用いた。一方、p62 の検出には抗 p62 抗体と Alexa488 が結合している二次抗体を使用した。また、下段パネル D,E,F においては細胞を固定する 3 時間前にプロテアソーム阻害剤である MG132 を細胞培養液に添加した。

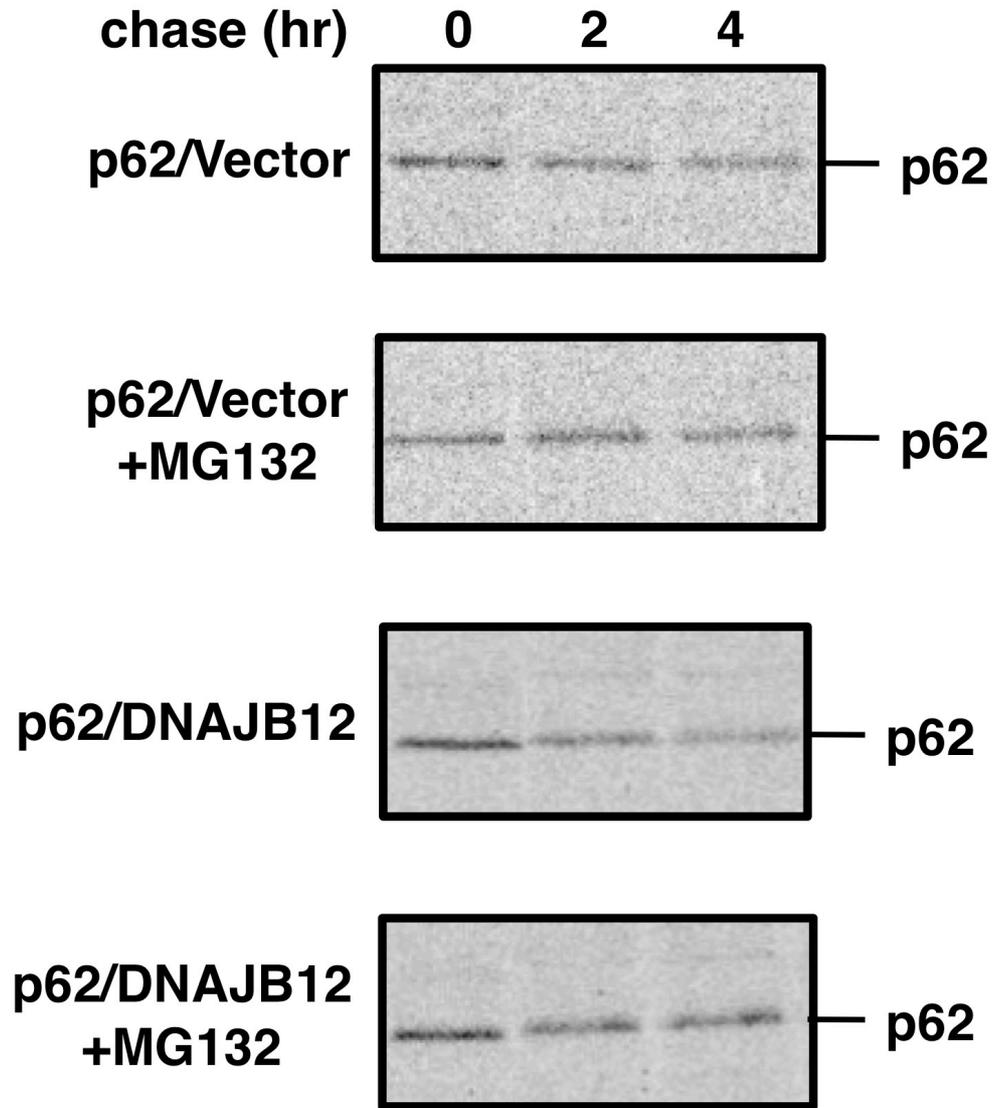
A



B



C



D

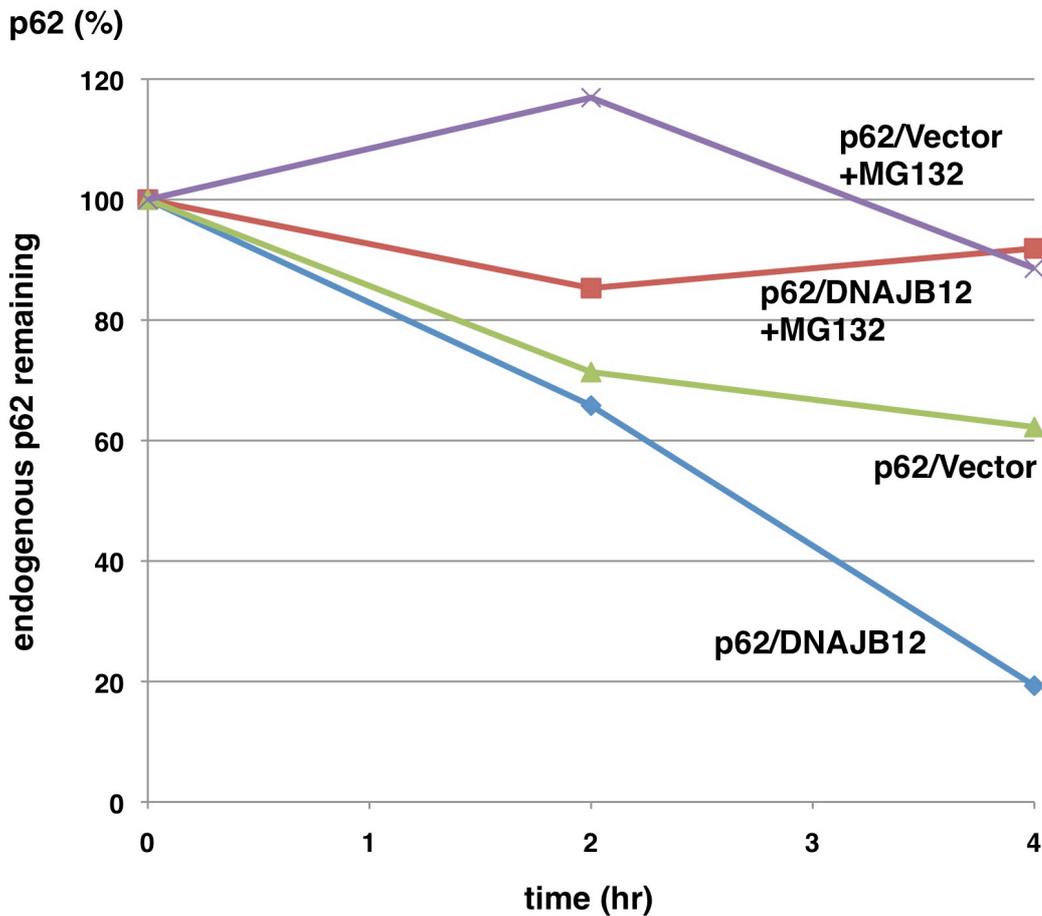


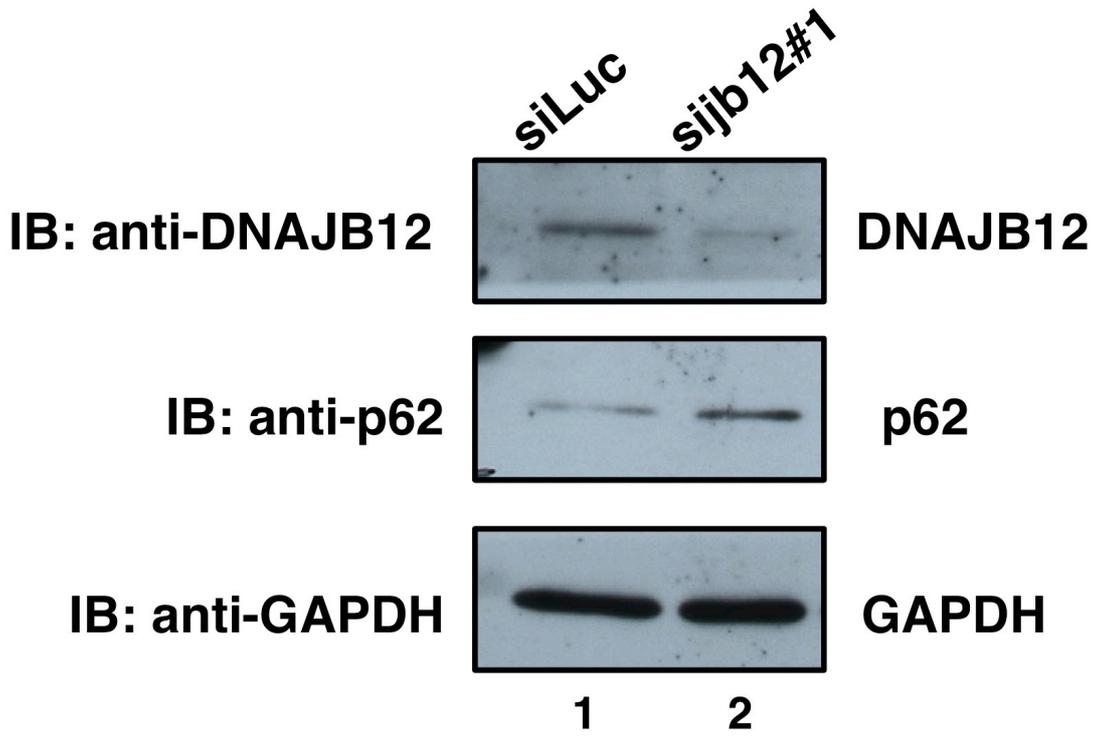
図 15 DNAJB12 はユビキチン-プロテアソーム系で p62 の分解を促進する

- (A) HEK293T 細胞に pCAGGS-DNAJB12-Flag または pCAGGS ベクター、を導入後、24 時間後に細胞を回収した。それぞれの細胞から調製したライセート中のタンパク質を SDS-PAGE で展開した後、抗 p62 抗体、抗 DNAJB12 抗体、抗 GAPDH 抗体でイムノブロットを行った。
- (B) パネル A のバンドの量を定量し、プロットした。3 回の独立した実験から標準偏差を求め Error bar として表示した。
- (C) HEK293T 細胞に pCAGGS-DNAJB12-Flag 及び pCAGGS ベクターを導入後、細胞を 24 時間培養した。次にこの細胞を ^{35}S -メチオニン/システインを含んだ培地中で 10 分間インキュベート(パルス)し、新規に合成されたタンパク質を標識した。その後、通常の培地に戻し培養を一定時間続けた (チェイス)。一部の細胞に対してはパルス及びチェイスの間、ユビ

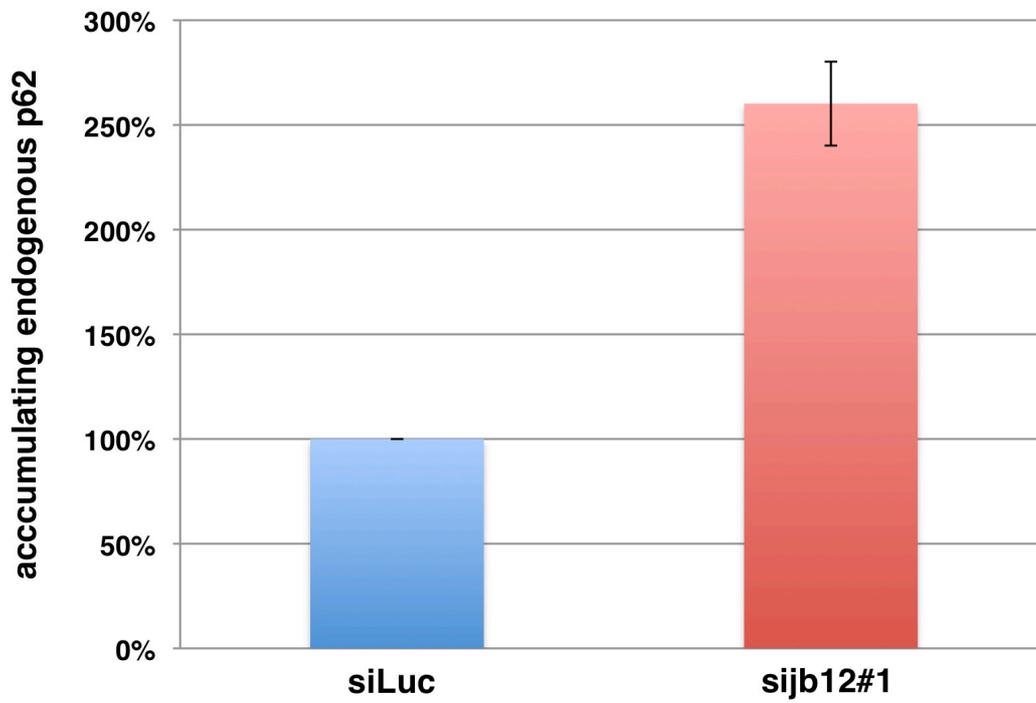
キチン-プロテアソーム阻害剤である MG132 を作用させた(20uM)。このようにして得たサンプル中の p62 を、抗 p62 抗体を用いた免疫沈降によって回収した後、SDS-PAGE によって分離することによって、p62 の分解過程を観察した。

(D) パネル C のバンドの量を定量し、プロットした。

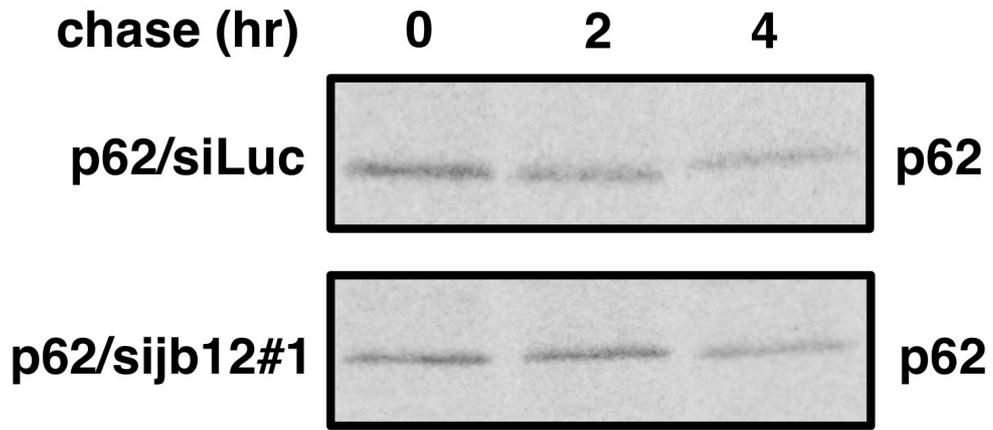
A



B



C



D

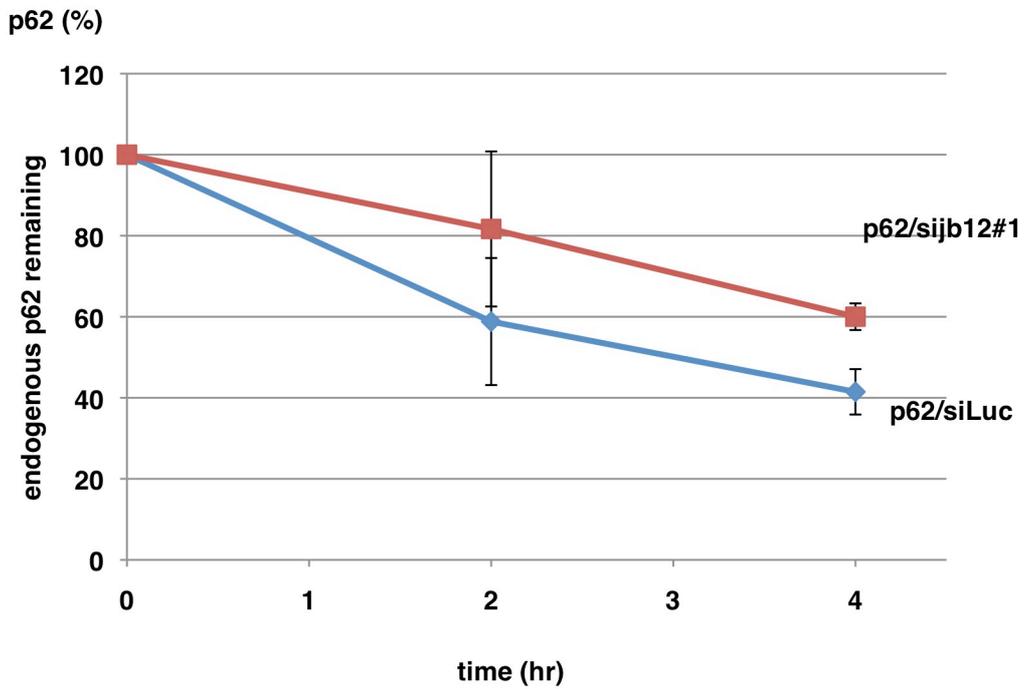


図 16 DNAJB12 のノックダウンにより p62 の分解が抑制される

- (A) HEK293T 細胞に sijb12#1 または siluc を導入後、24 時間後に細胞を回収した。それぞれの細胞から調製したライセート中のタンパク質を SDS-PAGE によって展開した後、抗 p62 抗体、抗 DNAJB12 抗体、抗 GAPDH 抗体でイムノブロットを行った。
- (B) パネル A のバンドの量を定量し、プロットした。3 回の独立した実験から標準偏差を求め Error bar として表示した。
- (C) HEK293T 細胞に sijb12#1 または siluc を導入後、細胞を 24 時間培養した。次にこの細胞を ³⁵S-メチオニン/システインを含んだ培地中で 10 分間インキュベート(パルス)し、新規に合成されたタンパク質の標識を行った。その後、通常の培地に戻し培養を一定時間続けた(チェイス)。このようにして得たサンプル中の p62 を、抗 p62 抗体を用いた免疫沈降によって回収した後、SDS-PAGE によって分離することによって、p62 の分解過程を観察した。
- (D) パネル C のバンドの量を定量し、プロットした。3 回の独立した実験から標準偏差を求め Error bar として表示した。

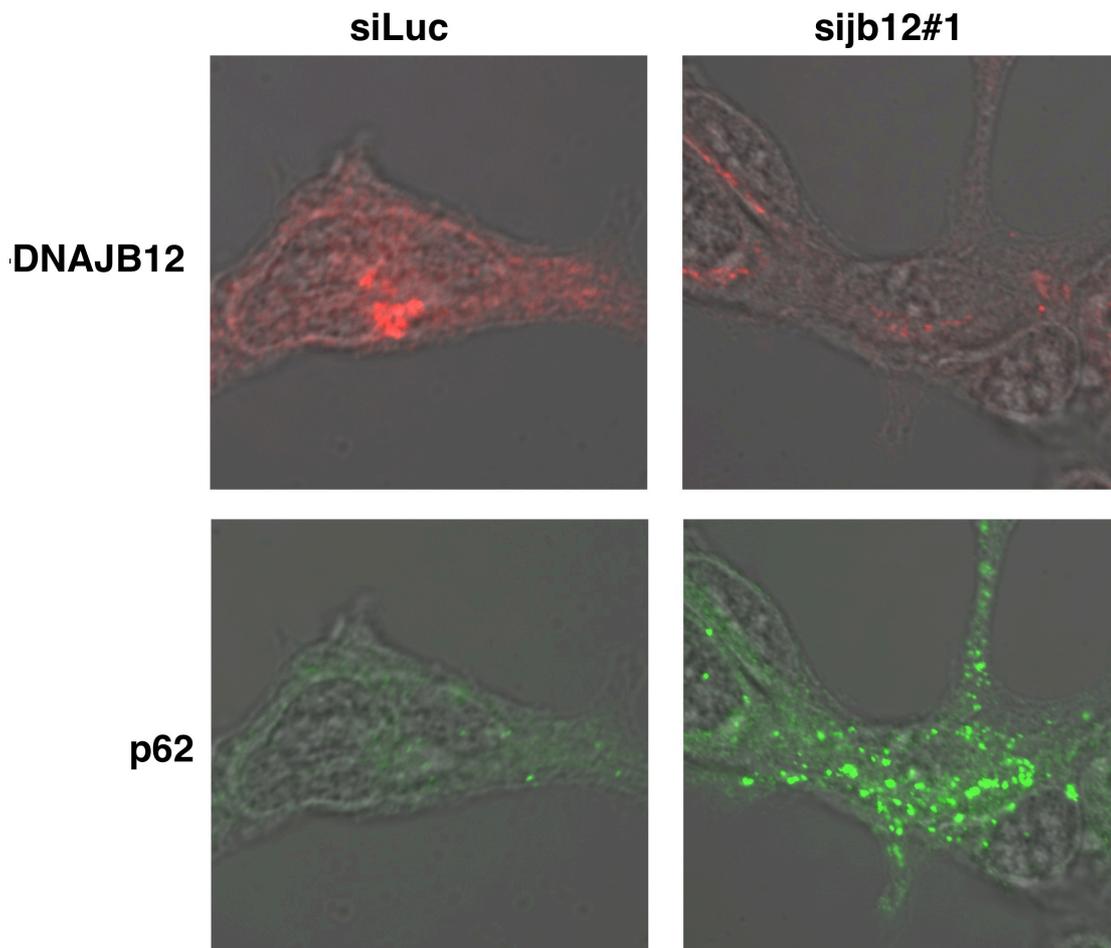


図 17 DNAJB12 のノックダウンにより p62 の分解が抑制される

HEK293T 細胞に sijb12#1 または siluc を導入後、24 時間後に細胞を固定した。その後、DNAJB12 と p62 の細胞内局在を免疫抗体染色法により観察した。DNAJB12 の検出には抗 DNAJB12 抗体と Alexa647 が結合している二次抗体を用いた。一方、p62 の検出には抗 p62 抗体と Alexa488 が結合している二次抗体を使用した。

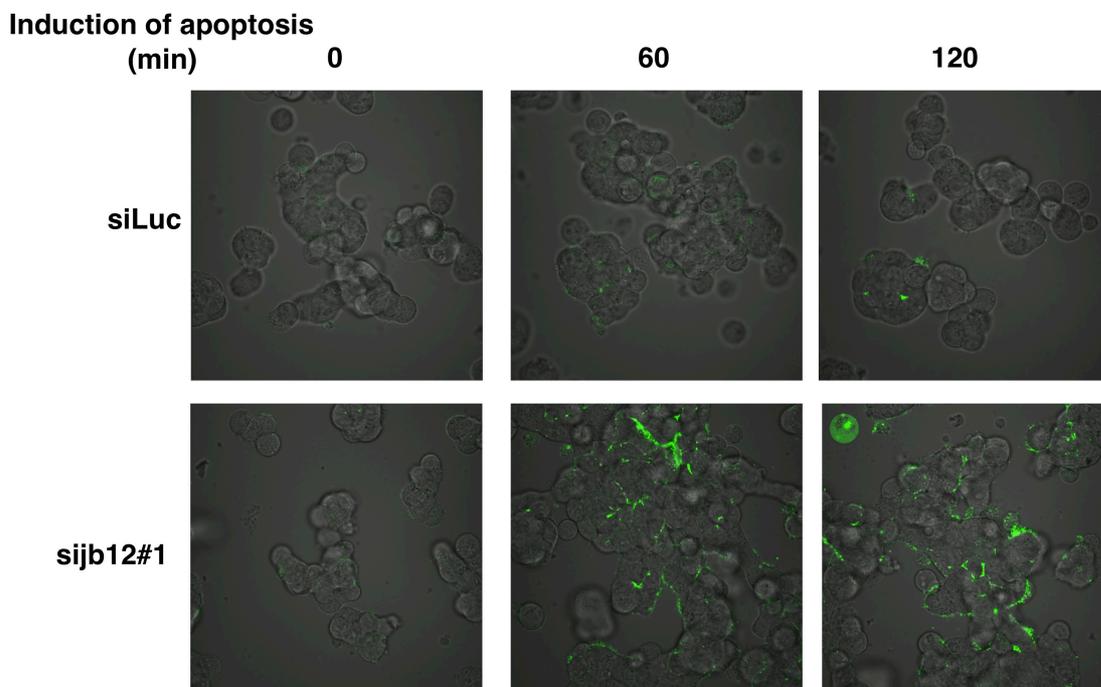
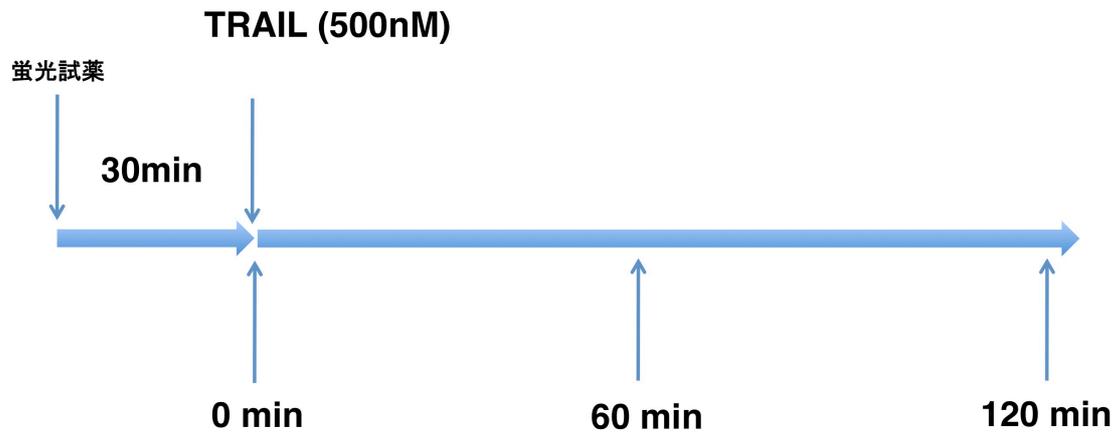


図 18 DNAJB12 のノックダウンにより、アポトーシスが促進される

HEK293T 細胞に sijb12#1 または siluc を導入後、24 時間後に細胞培養液中に TRAIL を添加し、デスレセプターを介したアポトーシスを誘導した。アポトーシスを起こした細胞を観察するためには、アポトーシスを誘導する 30 分前に蛍光試薬(CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent)を細胞培養液中に添加した。アポトーシスをおこした細胞が発する蛍光は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

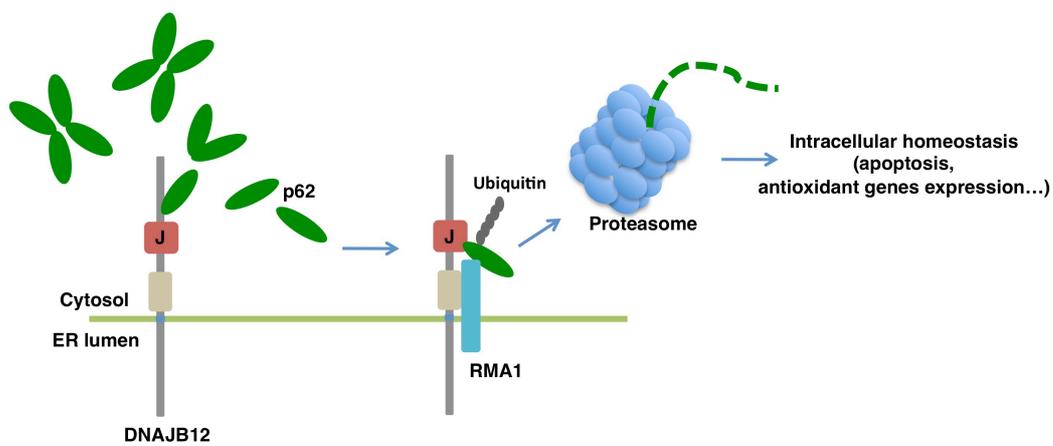


図 19 DNAJB12 は p62 の分解を促進することで細胞内恒常性の維持に寄与している
 本文を参照

表 2 DNABJ 結合タンパク質候補 (サイトゾル局在)

バンド No.	タンパク質名 (NCBI accession no.)	推定分子量	同定ペプチド数	評価ランク
1 (90kDa)	Hsp90 (20149594) Importin α (5107666)	83.2kDa 97.1kDa	11, 13, D 4, 4, D	A A
3 (70kDa)	Hsc70 (5729877)	70.8kDa	15, 18, D	A
4 (60kDa)	p62 (1145799)	47.5kDa	1, 2, D	A
6 (50kDa)	cAMP dependent kinase α subunit (4506063)	42.9kDa	2, 2, D	A
8 (40kDa)	Hdj2, DNAA1 (219588)	44.9kDa	2, 2, D	A
3 (70kDa)	Skb1Hs (2323410)	72.7kDa	3, 3, —	B
4 (60kDa)	TCP1 subunit 7 (5453607) Vimentin (340219)	59.4kDa 53.6kDa	1, 1, D 8, 13, nd	B B
8 (40kDa)	Inosine monophosphate dehydrogenase 2 (66933016) EF1 α (31092)	55.8kDa 50.0kDa	7, 8, nd 1, 1, D	B B
10 (30kDa)	Translation initiation factor (496902)	46.8kDa	1, 2, —	B
12 (30kDa)	Nascent protein-associated complex α subunit (5031931) Tropomyosin (825723)	23.4kDa 32.7kDa	3, 2, nd 2, 2, nd	B B
13 (30kDa)	G protein β polypeptide 2-like 1 (5174447)	35.0kDa	1, 2, nd	B
15 (25kDa)	Hsp27 (662841)	22.8kDa	2, 1, nd	B
2 (75kDa)	Thioredoxin peroxidase (4505591) BAG-3 (5868898)	22.1kDa 61.6kDa	1, 2, nd 1, 1, —	B C

3 (70kDa)	Tripartite motif-containing protein 25 (12585547)	71.0kDa	1, 1, —	C
9 (37kDa)	Twinfilin-1 (49456431)	42.2kDa	1, 1, —	C
	Serine-threonine kinase receptor-associated protein (4519417)	38.4kDa	1, 1, —	C
	26S proteasome regulatory subunit rpn8 (971270)	37.0kDa	1, 1, —	C
10 (30kDa)	Protein phosphatase 6, catalytic subunit (4506029)	35.1kDa	1, 1, —	C
14 (30kDa)	Proteasome 20S α subunit (296736)	24.5kDa	1, 1, nd	C

図 2 に示した、DNAJB12-Flag 発現細胞特異的バンドのマススペクトル解析によって同定されたタンパク質について、サイトゾルに局在する（と予想される）タンパク質を示す。リボソームタンパク質は除外した。バンド No. は図 2 に示した番号に対応する。分子量は、アミノ酸配列より推定した。同定ペプチド数は、1 回目と 2 回目の実験において検出されたペプチドの種類を示し、3 回目の実験については該当タンパク質のペプチドが検出されたか否かのみを示す。D は detected、— は not detected、nd はバンドのマススペクトル解析を行わなかったことを示す。評価ランクは、以下のように分類した。

A: 1, 2 回目の実験で複数種のペプチドが検出され、3 回目の実験でも検出されたタンパク質。

B: 1, 2 回目の実験で 1 種類のペプチドのみが検出され、3 回目の実験でも検出されたタンパク質。
もしくは、2 回目の実験で複数種のペプチドが検出されたタンパク質。

C: 2 回目の実験で検出されたが、1 種類のペプチドのみが同定されたタンパク質。

または、1 回目の実験でのみ検出されたが、複数種のペプチドが同定されたタンパク質。

表 3 DNAJB 結合タンパク質候補 (小胞体、分泌経路局在)

バンド No.	タンパク質名 (NCBI accession no.)	局在	推定分子量	同定ペプチド数	評価ランク
1 (90kDa)	Calnexin (10716563)	M, ER	67.6kDa	9, 13, D	A
2 (75kDa)	BiP (16507237)	S, ER	70.4kDa	16, 20, D	A
8 (40kDa)	KIAA0115, OST48 (473947)	M, ER	48.9kDa	2, 2, D	A
1 (90kDa)	α - glucosidase I (2344810)	M, ER	91.9kDa	2, 2, —	B
4 (60kDa)	Nicalin (13276641)	M, ER	63.0kDa	3, 4, nd	B
2 (75kDa)	Transferrin receptor (4507457)	M, PM	84.9kDa	1, 1, —	C
	ABC transporter subfamily F (3005931)	M, PM	71.3kDa	1, 1, —	C
10 (30kDa)	Annexin A2 (4757756)	S, secreted	38.6kDa	1, 1, —	C
11 (30kDa)	Emerin (4557553)	M, NI	29.0kDa	1, 1, —	C
12 (30kDa)	Dermcidin (16751921)	S, secreted	11.3kDa	1, 1, nd	C
13 (30kDa)	Dolichol-phosphate mannosyltransferase (2258418)	M, ER	29.6kDa	1, 1, nd	C
16 (25kDa)	Transmembrane protein 33	M, ?	28.0kDa	2, nd, nd	C

表 1 同様に、DNAJB12 結合タンパク質候補の中で、小胞体または分泌経路に局在する (と推測される) タンパク質を示す。バンド 2, 4, 8 についてはユビキチンのペプチドも検出された。局在の略称は以下の通りである。M; membrane protein, S; soluble protein, ER; 小胞体局在, PM; 細胞膜局在, secreted; 分泌タンパク質, NI; 核内膜

表 4 DNAB12 結合タンパク質候補 (ミトコンドリア局在)

バンド No.	タンパク質名 (NCBI accession no.)	推定分子量	同定ペプチド数	評価ランク
2 (75kDa)	NADH dehydrogenase 75kDa subunit (38079)	79.5kDa	2, 2, D	A
8 (40kDa)	Mitochondrial trifunctional protein β (4504327)	51.2kDa	4, 5, D	A
1 (90kDa)	Carnitine palmitoyltransferase (755646)	88.3kDa	1, 3, —	B
2 (75kDa)	Mitochondrial trifunctional protein α (595267)	83.0kDa	4, 5, —	B
10 (30kDa)	Sideroflexin 3 (31621303)	35.5kDa	4, 5, nd	B
12 (30kDa)	Sideroflexin 1 (23618867)	35.6kDa	2, 3, nd	B
13 (30kDa)	ATP synthase F1 complex γ subunit (4885079)	33.0kDa	2, 2, nd	B
14 (30kDa)	ADP/ATP translocase (113463)	32.9kDa	6, 6, nd	B
14 (30kDa)	Dicarboxylate carrier protein (6179584)	31.3kDa	1, 3, nd	B
2 (75kDa)	Mitochondrial Hsp70 (292059)	73.7kDa	1, 1, —	C
14 (30kDa)	NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit (4758788)	30.2kDa	1, 1, nd	C

表 1 同様に、DNAB12 結合タンパク質候補の中で、ミトコンドリアに局在する (と推測される) タンパク質を示す。

表 5 DNABJ12 結合タンパク質候補 (核内局在)

バンド No.	タンパク質名 (NCBI accession no.)	推定分子量	同定ペプチド数	評価ランク
1 (90kDa)	TEL2 (7705346)	91.7kDa	1, 1, D	B
2 (75kDa)	DEAD/H box polypeptide 3 (62087546)	77.5kDa	4, 6, —	B
	hnRNP M4 (187281)	77.5kDa	2, 4, —	B
5 (55kDa)	RuvB-like 1 (4506753)	50.2kDa	2, 3, —	B
8 (40kDa)	Thyroid hormone receptor interacter 13 (11321607)	48.6kDa	—, 2, D	B
9 (37kDa)	hnRNP chain A (56966800)	33.7kDa	2, 2, —	B
	B23 nucleophosmin (825671)	32.6kDa	2, 2, —	B
4 (60kDa)	Growth regulated nuclear 68 protein (226021)	66.8kDa	1, 1, —	C
9 (37kDa)	Replication factor C 4 (4506491)	39.6kDa	1, 1, —	C
10 (30kDa)	U2 snRNP auxiliary factor small subunit (5803207)	27.9kDa	1, 1, —	C

表 1 同様に、DNABJ12 結合タンパク質候補の中で、核内に局在する (と推測される) タンパク質を示す。

謝辞

はじめに、このような研究の機会を与えて下さった河野憲二教授に心から感謝致します。河野先生から提供して頂いた研究環境無くして、今日の結果は無いと思っております。そして木俣行雄准教授、都留秋雄助教、斉藤美知子助教、門倉広博士には色々な場面でお世話になりました。特に、門倉広博士には、私の研究についてのディスカッションや、研究の要である論理的な思考、そして論文作製について手厚くご指導して頂きました。本当にありがとうございました。そして、柳谷耕太特任助教には5年間、研究のだけではなく、公私ともにいいディスカッションをさせて頂きました。柳谷さんとディスカッションしている時間は本当に楽しかったです。

木村太地博士には、いま現在の研究のきっかけを頂きました。そして、修士課程から博士課程の1年目までの間、厳しく、そして温かくご指導して下さいました竹内雅人博士には心から感謝致します。ありがとうございました。そして、橋本純子さんには実験補助だけでなく、研究生活を送る上で色々なアドバイスをいただきました。ありがとうございました。

そして、私の研究を遂行する上で、楽しく過ごしやすい環境を提供してくれた河野研の皆様には非常に感謝しております。5年間、河野研で研究ができたことに感謝致します。また、大学での研究生活を送る上での健康管理や良いアドバイスを頂いた保健管理センター看護師 西山絹代さんに御礼申し上げます。また、この研究を遂行するにあたり、適切なアドバイスを頂きました川市正史教授、佐藤匠徳教授、石田靖雅准教授、木俣行雄准教授にはこの場をお借りして御礼申し上げます。

そして、本研究において、マスペクトル解析を行っていただきました、本学ベンチャービジネスラボラトリーに在籍しておられました桑野晶喜氏、横田直彦氏に厚く御礼申し上げます。また、第一章図 7-D、図 8-C、第二章図 15-C,D、図 16-C,D の実験は修士課程の桃原淑さんが、図 15-A は松本美香さんが、主体的に行ってくれました。桃原さんと松本さんに御礼申し上げます。

最後になりましたが、この奈良先端科学技術大学院大学で私が研究を行うことを支えてくれている家族に感謝致します。

参考文献

- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* *4*, 603-614.
- Carvalho, P., Goder, V., and Rapoport, T.A. (2006). Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* *2*, 361-373.
- Chevalier, M., Rhee, H., Elguindi, E.C., and Blond, S.Y. (2000). Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *J. Biol. Chem.* *26*, 19620-19627.
- Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* *2*, 70-77.
- Dong, M., Bridges, J.P., Apsley, K., Xu, Y., and Weaver, T.E. (2008). ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C. *Mol. Biol. Cell* *6*, 2620-2630.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 181-191.
- Gallione, C.J., and Rose, J.K. (1985). A single amino acid substitution in a hydrophobic domain causes temperature-sensitive cell-surface transport of a mutant viral glycoprotein. *J. Virol.* *2*, 374-382.
- Goldberg, A.L., and St John, A.C. (1976). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Annu. Rev. Biochem.* 747-803.

Grove, D.E., Fan, C.Y., Ren, H.Y., and Cyr, D.M. (2011). The endoplasmic reticulum-associated Hsp40 DNAJB12 and Hsc70 cooperate to facilitate RMA1 E3-dependent degradation of nascent CFTR Δ F508. *Mol. Biol. Cell* **3**, 301-314.

Hosoda, A., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2003). JPDI, a novel endoplasmic reticulum-resident protein containing both a BiP-interacting J-domain and thioredoxin-like motifs. *J. Biol. Chem.* **4**, 2669-2676.

Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A., and Nagata, K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.* **5**, 415-422.

Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., Kouno, T., Nakada, K., Hino, O., Watanabe, S., Ando, J., Iwadate, M., Yamamoto, M. *et al.* (2011). Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J. Cell Biol.* **2**, 275-284.

Itakura, E., and Mizushima, N. (2011). p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J. Cell Biol.* **1**, 17-27.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., and Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2**, 313-322.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **1**, 76-86.

Jin, Y., Zhuang, M., and Hendershot, L.M. (2009). ERdj3, a luminal ER DnaJ homologue, binds directly to unfolded proteins in the mammalian ER: identification of critical residues. *Biochemistry* 1, 41-49.

Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 7, 1883-1898.

Kampinga, H.H., and Craig, E.A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 579-592.

Klionsky, D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell. Sci. Pt 1*, 7-18.

Kurisu, J., Honma, A., Miyajima, H., Kondo, S., Okumura, M., and Imaizumi, K. (2003). MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress. *Genes Cells* 2, 189-202.

Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell.* 4, 463-477.

Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., and Cyr, D.M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* 1, 100-105.

Metzger, M.B., Maurer, M.J., Dancy, B.M., and Michaelis, S. (2008). Degradation of a cytosolic protein requires endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *J. Biol. Chem.* 283, 32302-32316.

Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* 8, 766-772.

Morito, D., Hirao, K., Oda, Y., Hosokawa, N., Tokunaga, F., Cyr, D.M., Tanaka, K., Iwai, K., and Nagata, K. (2008). Gp78 cooperates with RMA1 in

endoplasmic reticulum-associated degradation of CFTRDeltaF508. *Mol. Biol. Cell* *4*, 1328-1336.

Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2009). P62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell* *6*, 1001-1004.

Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.* *11*, 549-557.

Nakatsukasa, K., Huyer, G., Michaelis, S., and Brodsky, J.L. (2008). Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein. *Cell* *1*, 101-112.

Okuda-Shimizu, Y., and Hendershot, L.M. (2007). Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Mol. Cell* *4*, 544-554.

Schimke, R.T., and Doyle, D. (1970). Control of enzyme levels in animal tissues. *Annu. Rev. Biochem.* 929-976.

Shintani, T., and Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* *5698*, 990-995.

Sifers, R.N., Brashears-Macatee, S., Kidd, V.J., Muensch, H., and Woo, S.L. (1988). A frameshift mutation results in a truncated alpha 1-antitrypsin that is retained within the rough endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *15*, 7330-7335.

Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D.Y., and Nagata, K. (2008). ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science* *5888*, 569-572.

Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N., and Goldberg, A.L. (2004). Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and

release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol. Cell* *1*, 95-104.

Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R. *et al.* (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.* *3*, 238-245.

Ward, C.L., Omura, S., and Kopito, R.R. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* *1*, 121-127.

Yang, Y., Janich, S., Cohn, J.A., and Wilson, J.M. (1993). The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *20*, 9480-9484.

Youker, R.T., Walsh, P., Beilharz, T., Lithgow, T., and Brodsky, J.L. (2004). Distinct roles for the Hsp40 and Hsp90 molecular chaperones during cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation in yeast. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4787-4797.

Younger, J.M., Chen, L., Ren, H.Y., Rosser, M.F., Turnbull, E.L., Fan, C.Y., Patterson, C., and Cyr, D.M. (2006). Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* *3*, 571-582.

Yu, H., Kaung, G., Kobayashi, S., and Kopito, R.R. (1997). Cytosolic degradation of T-cell receptor alpha chains by the proteasome. *J. Biol. Chem.* *33*, 20800-20804.

Zahedi, R.P., Volzing, C., Schmitt, A., Frie, M., Jung, M., Dudek, J., Wortelkamp, S., Sickmann, A., and Zimmermann, R. (2009). Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7. *Proteomics* *13*, 3463-3473.