

SDF2L1 は ERdj3 の小胞体局在及びシャペロン活性を制御する

花房 賢

要約

【研究背景】

小胞体は、真核細胞内で最も大きな膜構造をもった細胞小器官である。タンパク質が生物学的機能をもつためには正しい高次構造を形成する必要がある。そのために、小胞体には分子シャペロンタンパク質が存在し、タンパク質のフォールディングを効率よく行う機構が備わっており、タンパク質品質管理機構と呼ばれている。小胞体内にミスフォールドタンパク質が凝集蓄積すると細胞内のホメオスタシスが崩壊して、小胞体ストレス応答 (UPR) が誘導される。

小胞体シャペロンタンパク質 ERdj3 は、ホモテトラマーを形成する小胞体内腔糖タンパク質であり、小胞体内腔で唯一の HSP70 である BiP と相互作用して小胞体内のホメオスタシスを維持している。UPR の活性化によって ERdj3 の発現は誘導され、ミスフォールドタンパク質と共に細胞外に分泌される。

SDF2 (Stromal cell-derived factor 2) はマウスの間質細胞で同定されたタンパク質で、その後ホモログである SDF2L1 (Stromal cell-derived factor 2-like 1) が同定された。SDF2 及び SDF2L1 は BiP や ERdj3、その他のフォールディング酵素からなる ER シャペロン複合体と相互作用していることが報告されている。

【目的】

ERdj3 は、小胞体残留シグナルを持たないにもかかわらず、通常環境においては分泌が抑えられており、小胞体内でシャペロンとして機能している。この ERdj3 の小胞体内局在の制御機構は十分に解明されていない。また、細胞内で SDF2 及び SDF2L1 は ERdj3 と複合体を形成することは分かっているが、この複合体の機能は分かっていない。そこで、本研究では、ERdj3-SDF2L1 複合体のミスフォールドタンパク質に対する機能を解析すること、及び非ストレス環境下における ERdj3 の小胞体局在メカニズムの解明をめざした。

【結果】

ERdj3 あるいは SDF2L1 を発現させた細胞、もしくは ERdj3 と SDF2L1 を共発現させた細胞を用いて、ミスフォールドタンパク質の凝集を解析した。その結果、ERdj3 と SDF2L1 の単独発現では凝集体形成は抑制されなかったが、両者を共発現させた場合には著しく凝集が抑制された。また、ERdj3、SDF2L1 の過剰発現実験及び内在性 SDF2 および SDF2L1 のノックダウン実験から、ERdj3 の分泌は SDF2L1 によって抑制されることが明らかになった。SDF2L1 の小胞体残留シグナルを欠損させた変異体 (SDF2L1-ΔHDEL) では、ERdj3 の分泌抑制作用は検出されず、ERdj3 と共発現させても小胞体内

のミスフォールドタンパク質の凝集は抑制されなかった。一方、小胞体に留まる ERdj3 (ERdj3-KDEL)を発現させた細胞では、ミスフォールドタンパク質の凝集が抑制された。さらに、ERdj3-KDEL と SDF2L1-ΔHDEL を共発現させた細胞では、ERdj3 (ERdj3-KDEL) 単独で発現させた場合よりもミスフォールドタンパク質の凝集を強く抑制することが明らかになった。続いて、リコンビナントタンパク質を用いて、ERdj3-SDF2L1 複合体の機能を *in vitro* で解析した。*In vitro* において、ERdj3 は SDF2L1 と直接結合した。また、化学変性させた GST を基質に用いて ERdj3-SDF2L1 複合体のシャペロン機能を解析した。その結果、ERdj3 を単独で添加した場合でも変性 GST の凝集は抑制されたが、ERdj3-SDF2L1 複合体を添加した場合には、より強い凝集抑制効果が検出された。これらの結果は、細胞を用いた実験での結果と一致していた。

さらに、ERdj3-SDF2L1 複合体の化学量論を解析した。精製した ERdj3 はホモテトラマーを形成した。しかし、SDF2L1 が存在すると、ERdj3 は 2 分子の ERdj3 と 2 分子の SDF2L1 から成る、モル比 1:1 のヘテロテトラマーを形成することが明らかになった。これらの結果から、ERdj3 が小胞体でシャペロンとして機能するためには、SDF2L1 と複合体を形成して小胞体内に留まる必要があり、SDF2L1 と複合体を形成した ERdj3 のシャペロン活性は亢進することを明らかにした。

先行研究において、ヒト SDF2L1 及び、ヒト SDF2 の結晶構造解析を行い、両者の立体構造が明らかにされている。SDF2L1 及び SDF2 は MIR ドメインを 3 つ持っており、立体構造が類似していた。結晶構造解析の結果に基づき SDF2L1 変異体を作製し、SDF2L1 の機能に及ぼす影響を解析した。その結果、*In vitro* において、ERdj3 に対する結合性が低下する SDF2L1 変異体を同定することができた。さらに、これらの SDF2L1 変異体は、ERdj3 のシャペロン活性亢進作用も低下していた。これらの結果から、SDF2L1 による ERdj3 シャペロン活性の亢進には、両者が同じ区画に存在するだけでは不十分であり、強固な複合体を形成することが重要であることが示唆された。

【考察】

タンパク質が生物学的機能をもつためには正しい高次構造を形成する必要がある。そのために、小胞体には分子シャペロンタンパク質が存在し、タンパク質のフォールディングを効率よく行う機構が備わっており、タンパク質品質管理機構と呼ばれている。精製したタンパク質を用いた *in vitro* 実験及び細胞実験から、SDF2L1 が ERdj3 と複合体を形成することで ERdj3 のシャペロン活性を増幅させること、ERdj3-SDF2L1 複合体は ERdj3 ホモダイマーに対して SDF2L1 が 2 分子結合したヘテロテトラマーから構成されること、及び複合体を形成するために重要な SDF2L1 のアミノ酸を明らかにした。

ゴーシェ病の一因に、リソソームで働くグルコセレブロシダーゼ (GCCase) の変異体や、ミスフォールドタンパク質 α 1-アンチトリプシン Z 変異体の分解に、ERdj3 が関わる事が報告されている。本研究で ERdj3-SDF2L1 複合体の機能解明は、先述した ERdj3 の関わる疾患の重要な知見になると考えられる。