

SEL1L の分解中間体はポリグルタミンタンパク質の細胞質での凝集を促進する

服部 徳哉

目次

1. 要旨
2. 略語表
3. 背景
 - 3-1 小胞体の役割
 - 3-2 小胞体におけるタンパク質の品質管理機構
 - 3-3 小胞体ストレスと UPR(Unfolded Protein Response)
 - 3-4 ERAD
 - 3-4-1 小胞体内でのタンパク質の高次構造形成
 - 3-4-2 認識と輸送(recognition and deliver)
 - 3-4-3 逆行輸送(retrotranslocation)
 - 3-4-4 分解(degradation)
 - 3-5 ERAD に関わる細胞内因子
 - 3-5-1 HRD1
 - 3-5-2 SEL1L
 - 3-5-3 Derlin1/2/3(Derlins Family)
 - 3-5-4 OS-9, XTP3-B
 - 3-5-5 UBC6/UBC6e(UBE2J1)
 - 3-5-6 p97
 - 3-5-7 Derlin1/2/3(Derlins Family)
 - 3-5-8 その他の因子
 - 3-6 ハンチントン病とポリグルタミンタンパク質
 - 3-7 プロテアソームの機能不全と疾患
 - 3-8 研究目的
4. 結果
 - 4-1 SEL1L の分解を阻害すると、分解中間体が検出される
 - 4-2 SEL1L の分解中間体は細胞質で検出される
 - 4-3 SEL1L の分解中間体は、細胞質に逆行輸送されたのち生じる
 - 4-4 小胞体レクチンである OS-9 や XTP3-B は SEL1L の分解を抑制する

- 4-5 内在性の SEL1L は小胞体ストレス状況下で分解される
- 4-6 SEL1L の C 末端領域に存在するプロリンに富んだ領域が SEL1L の分解中間体の形成に必要である
- 4-7 SEL1L の分解中間体は細胞質での polyQ 凝集体形成を促進する
- 4-8 SEL1L の分解中間体は、細胞質における polyQ 凝集体と結合する
- 4-9 SEL1L の SLR 領域が polyQ 凝集体形成を促進する

5. 考察

- 5-1 SEL1L の分解中間体は細胞質側で検出される
- 5-2 SEL1L は小胞体から細胞質側に引っ張り出されたのち切断される
- 5-3 ER レクチンである OS-9 や XTP3-B は SEL1L の安定化に寄与する
- 5-4 SEL1L のプロリンに富む領域は、SEL1L の分解中間体の形成に関与する
- 5-5 SEL1L の分解中間体は aggregation-prone なタンパク質である polyQ76-GFP の凝集体形成を促進する

6. 実験材料および方法

7. 論文目録

8. 謝辞

9. 引用文献

1.要旨

小胞体関連分解 ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation)は、小胞体に蓄積した異常なタンパク質を分解することで小胞体内のタンパク質の品質管理に関与し、また、酵素の分解を介して、生体反応を調節している。

SEL1L は、小胞体膜に存在する 1 回膜貫通型タンパク質で、ubiquitin ligase (E3) である HRD1 と 1:1 の複合体を形成し、ERAD 基質の分解を行っている。

当研究室の先行研究により、HRD1 と複合体を形成できなかつた SEL1L は、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが示された。また、プラスミド上から発現させた SEL1L の分解をプロテアソーム阻害剤である MG132 で阻害すると、SEL1L の分解中間体の蓄積が観察された。そこで、今回 SEL1L の分解中間体に関する解析を行った。

細胞分画法を用いて解析した結果、SEL1L の分解中間体は、主に細胞質で検出されることが示された。また、過剰発現系や siRNA を用いたノックダウン系での解析から、小胞体内腔に存在するレクチン OS-9 や XTP3-B も HRD1 と同様に SEL1L の安定性を高めることが示された。また、SEL1L の C 末端側に存在するプロリン残基に富んだ領域が SEL1L の分解中間体の生成に必要であることが示された。

SEL1L の分解中間体の細胞質での役割を解析した。ポリグルタミンタンパク質は、グルタミン鎖が伸長していくと、細胞質内や核内に大きな凝集体を形成する。今回、ポリグルタミンタンパク質のモデルタンパク質である Htt-polyQ76-GFP を用いて解析を行った。その結果、SEL1L の分解中間体は Htt-polyQ76-GFP の凝集体形成を促進することが明らかになった。また、蛍光顕微鏡を用いた解析の結果、SEL1L の分解中間体は、凝集体を取り囲むように存在していた。凝集体形成に重要な SEL1L 内の領域を解析した結果、小胞体内腔領域に存在する SEL1L リピートが、凝集体形成促進に関与していることが示された。これらの結果から、SEL1L は、小胞体ストレス環境下などにおいて分解されて分解中間体を形成し、細胞質において aggregation-prone なタンパク質の凝集を促進していることが明らかになった。

2.略語表

α 1-AT	α 1-antitrypsin
AEBSF	4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride
Amp	Ampicillin
Asn	asparagine
ATP	adenosine triphosphate
Asp	asparatic acid
BiP	Immunogloblin heavy chain binding protein
CNX	calnexin
CRT	calreticulin
Cys	cystein
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
Der	degradation in the endoplasmic reticulum
Derlin	der1-like protein
Δ ss	signal sequence-deleted mutant
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
Doa10	degradation of Mat-alpha2-10 protein
DTT	dithiothreitol
EDEM	ER degradation enhancing alpha mannosidase-like protein
ER	endoplasmic reticulum
ERAD	endoplasmic reticulum-associated degradation
ERQC	endoplasmic reticulum quality control
FBS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescent protein
Glu	glucose
HA	hemagglutinin
HEK	human embryonic kidney
Herp	Homocystein-induced endoplasmic reticulum protein
His	histidine
HRD1(Hrd1p)	HMG-coA Reductase degradation protein 1
Htt	huntingtin
IgG	immunoglobulin G
LB	Lutia-Bertani

MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
mRNA	messenger RNA
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimide
NHK	α 1-antitrypsin variant null (Hong Kong)
n.s.	not significant
OS-9	osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum lectin
PEI	polyethylenimine
PBS	phosphate buffered saline
PBS(-)	phosphate buffered saline without calcium and magnesium
PCR	polymerase chain reaction
polyQ	polyglutamine
RING	Really Interesting New Gene finger domain
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
SEL1L	sel-1 suppressor of of lin-12-like
s.d.	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	serine
siRNA	short interfering RNA
SLR	SEL1L repeat
Thr	threonine
UBC	ubiquitin-conjugating enzyme E2
UGGT	UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase
XTP3-B	XTP3-transactivated gene B protein

3. 背景

3-1 小胞体の役割

小胞体(ER)は網目状に存在する細胞内小器官である。小胞体は滑面小胞体(sER)と粗面小胞体(rER)に分けられ、前者は、リボソームの付着がみられない小胞体で主に脂質合成やカルシウムイオン(Ca^{2+})の貯蔵などを行っている。一方、後者はリボソームの付着がみられる小胞体で、分泌タンパク質や膜タンパク質などの新生タンパク質の合成やプロセッシングに関与している。新たに合成されたタンパク質は小胞体にターゲットされ、そして N 結合型糖鎖の付加およびトリミング、ジスルフィド結合の形成および架け替え、オリゴマー形成といった過程を経て正しい高次構造を形成する。正しい高次構造を形成したタンパク質は、ゴルジ装置を通り、輸送過程でさらなる修飾を受けたのち、正しい細胞内コンパートメントに輸送されてその機能を発揮する。このように小胞体は非常に重要な器官であり、小胞体の恒常性の維持は生体にとって非常に重要である。

3-2 小胞体におけるタンパク質の品質管理機構

小胞体には品質管理機構(ERQC)が存在している。この品質管理機構によって細胞は正しい構造をとったタンパク質とそうでないミスフォールドしたタンパク質を厳しく選別し、正しい高次構造をとったタンパク質のみを分泌経路に輸送することができる(Ellegaard and Helanius 2003)。ERQC には、大きく分けて二つの機構がある。シャペロンなどの助けを借りて小胞体内で生合成されたタンパク質のフォールディングを促進する機構と、ミスフォールドしたタンパク質を分解する機構である。

3-3 小胞体ストレスと UPR(Unfolded Protein Response)

細胞内で新たに合成されたタンパク質は小胞体内でシャペロンの手助けを借りながらフォールディングを試みるが、必ずしもすべてのタンパク質が正しい高次構造を獲得できるわけではない。フォールディングの失敗により異常な構造をしたタンパク質が小胞体内に生じる。こうした異常タンパク質の蓄積は、小胞体に小胞体ストレス(ER stress) を引き起こす。重篤な小胞体ストレスは、細胞機能の異常や細胞死を引き起こす。小胞体ストレスは神経変性疾患や II 型糖尿病、嚢胞性線維症などの難病などに関連することが報告されている(Kopito 1999; Lindholm et al. 2006; Zhao and Ackerman 2006)。

細胞は、これらのタンパク質の蓄積を感知し、シャペロンや分解酵素の発現を誘導する。これを UPR という。哺乳類においては、UPR の経路は 3 つ(ATF6 経

路、IRE1 経路、PERK 経路)存在している。これらの経路は小胞体ストレスを感知し、それを回復するためのシャペロンや ERAD 因子などのタンパク質の発現を誘導し、また、タンパク質の発現を制御することで、小胞体にかかる負荷の軽減を試みる(Walter and Ron. 2011)。

3-4 ERAD

ERQC には、小胞体内のタンパク質のフォールディングを促進する機構と、ミスフォールドしたタンパク質を分解する機構がある。細胞内には、直接的に小胞体内の異常なタンパク質を分解する機構が存在する。これを小胞体関連分解(ERAD)という(Smith *et al.* 2011)。ERAD に関わる因子には、先述した UPR によって発現が誘導されるものもある。ERAD 以外にも小胞体内のタンパク質の分解経路としてオートファジーやリソソームによる分解も存在する。ERAD は、分解される基質として認識される領域(degron)の位置によって大きく 3 つのカテゴリーに分類される。細胞質に degron を持つ基質を分解する ERAD-C(Cytoplasmic)と膜貫通領域に degron を持つ基質を分解する ERAD-M(Membrane)、そして、小胞体内腔に degron を持つ基質を分解する ERAD-L(Luminal)である。ERAD は、小胞体内の異常なタンパク質を分解することで小胞体内のタンパク質の品質管理に関与しているばかりでなく、複合体を形成できなかったタンパク質の分解を促進することでタンパク質複合体の量自体を制御し、様々な生体反応に影響を与えている制御機構としての役割を担っている。ERAD は、小胞体内に蓄積した異常な構造のタンパク質や複合体を形成できなかったタンパク質などを認識し、それらを細胞質側に逆行輸送し、ユビキチン-プロテアソーム系で分解するというのが大きな流れである。以下に、ERAD の詳細について哺乳類における ERAD-L 機構を小胞体における新生タンパク質の高次構造形成を踏まえながら説明する。

3-4-1 小胞体内でのタンパク質の高次構造形成

小胞体内でのタンパク質の生合成は、ERAD ではないが、本分野を理解するうえで重要なので説明する。細胞質内で合成されたタンパク質は小胞体にターゲットされる。ターゲットされたタンパク質は、小胞体膜に組み込まれ、小胞体内腔に入っていく。小胞体で生合成されるタンパク質は、アスパラギン-任意のアミノ酸(プロリンを除く)-セリン/スレオニン(Asn-X-Ser/Thr)配列のアスパラギン残基に糖鎖が付加される。この糖鎖を N 結合型糖鎖という。ERAD においては、この糖鎖が非常に重要なシグナルを担っている。

翻訳と同時に小胞体内腔に挿入された新生タンパク質には、G3M9 糖鎖が付加される。G3M9 糖鎖が付加された新生タンパク質は、すぐさま小胞体内にあるグ

ルコシダーゼによって 2 個のグルコースが取り除かれ G1M9 糖鎖結合型タンパク質になる(Grinna and Robbins. 1979)。G1M9 糖鎖は、小胞体内にあるレクチンシャペロンであるカルネキシン(CNX)やカルレティキュリン(CRT)に認識される。これらのタンパク質に認識された新生タンパク質はフォールディングが促進される。続いてグルコシダーゼ II によってグルコースがトリミングされ M9 糖鎖結合型タンパク質になると CNX や CRT から解離する。この段階で正しい構造が取れていないタンパク質は、UDP グルコース転移酵素(UGGT)によってグルコースが一分子付加され、再び G1M9 糖鎖結合型タンパク質になる (Caramelo *et al.* 2004; Solda *et al.* 2007)。この G1M9 糖鎖結合型タンパク質は、CNX や CRT に認識され、再びフォールディングが行われる。このようにして、正しい構造をとるまでフォールディングが行われるシステムを CNX/CRT サイクルと呼ぶ。CNX/CRT サイクルは、糖鎖に依存したタンパク質の構造形成であるが、糖鎖に依存しないシャペロンなども存在し、それらも小胞体内のタンパク質の高次構造形成に関与している。

3-4-2 認識と輸送(recognition and deliver)

何度か CNX/CRT サイクルを回るうちに N 結合型糖鎖は、EDEM2 によって、マンノースがトリミングされて(George *et al.* 2020)、フォールディング途中のタンパク質は、M8B 糖鎖結合型タンパク質になる。M8B 糖鎖結合型タンパク質は、小胞体内の α マンノシダーゼである EDEM(ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein)などに認識され、さらなるマンノースのトリミングが行われる。EDEM は、マンノースがトリミングされたタンパク質を認識し、さらにマンノースをトリミングすると考えられている。そのため、正常な構造をとれなかったタンパク質はマンノースがトリミングされていく。ある程度マンノースがトリミングされた異常タンパク質は、最終的に MRH ドメインをもつレクチン OS-9 や XTP3-B などによって認識される(Hosokawa *et al.* 2010)。認識されたタンパク質は、細胞質側への逆行輸送を担う小胞体膜因子(レトロトランスロコン)へ受け渡される (Christianson *et al.* 2008; Hosokawa *et al.* 2008)。

3-4-3 逆行輸送(retrotranslocation)

レトロトランスロコンへ送られた基質は、レトロトランスロコンを経由して細胞質側に輸送される。レトロトランスロコンは、Sec61 や ERAD に関与するユビキチンライゲース E3 など、様々な可能性が示唆されていたが、現在では HRD1-Derlin 複合体が有力であると考えられている(Wu *et al.* 2020)。逆行輸送によって細胞質側に出てきた基質は、糖鎖が刈り取られ(Lee *et al.* 2005)、また、ユビキチンが付加される。いったんユビキチンが付加された基質は、どんどんとユ

ユビキチン鎖が伸長していく。ユビキチンが付加された基質は、AAA⁺ ATPase である p97 によって認識され、ATP の加水分解によって生じるエネルギーを用いて、小胞体から引っ張り出される。このようにして基質は、小胞体から細胞質に逆行輸送される。

3-4-4 分解(degradation)

p97 によって細胞質側に基質が引っ張り出される際、いったん基質からユビキチンがはがされる(脱ユビキチン化)(Ernst *et al.* 2009)。再度ユビキチンが付加された基質は、26S proteasome によって分解される(Claessen *et al.* 2011)(Fig.1)。

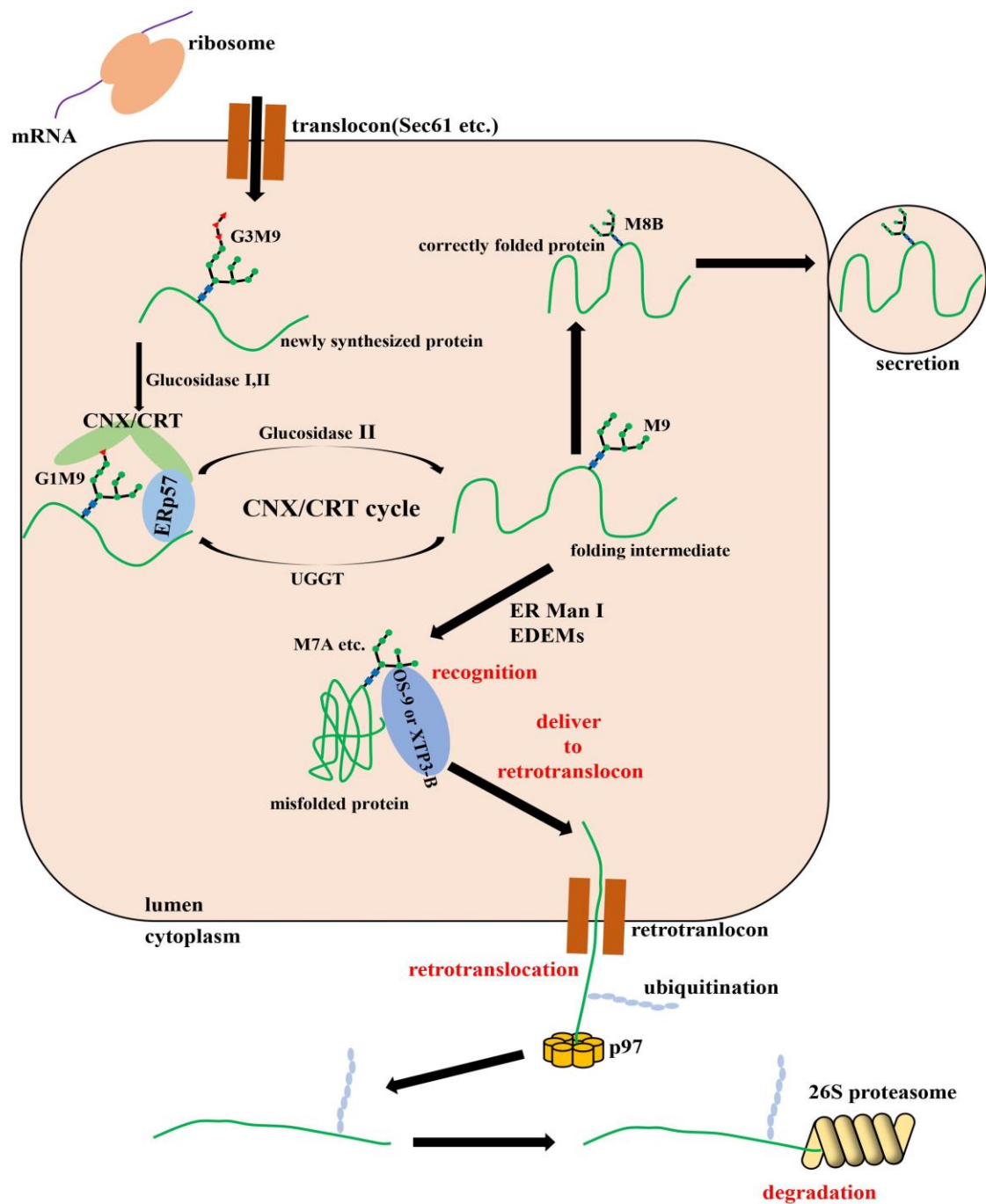


Fig.1 小胞体内での新生タンパク質の高次構造形成と ERAD

Sec61などのトランスロコンを経由して小胞体内に輸送された新生タンパク質は、糖鎖が付加される。小胞体のタンパク質の高次構造形成には糖鎖が重要なシグナルとなる。グルコシダーゼやマンノシダーゼなどによって糖鎖型を変えながら、CNXやCRTなどのシャペロンの助けを借り新生タンパク質は、正常な高次構造をとるようフォールディングを行う。

何度もフォールディングを試みる中で、ミスフォールドしたタンパク質は、マンノースがトリミングされる。マンノースがトリミングされた基質は、小胞体内腔に存在するレクチンに認識されレトロトランスロコンに受け渡される。レトロトランスロコンを経由しての細胞質への逆行輸送と共役して基質にはユビキチンが付加される。ユビキチン化された基質は細胞質のプロテアソームで分解される。

3-5 ERAD に関わる細胞内因子

先に ERAD の大まかな流れを論じたが、続いては、ERAD に関係する細胞内因子について本研究で研究対象とした分子を中心に論ずる(Fig.2A,B)。

3-5-1 HRD1

ERAD に関係するユビキチンライゲース E3 は、出芽酵母においては 2 種類 (Hrd1p, Doa10p) 存在している。また、哺乳類には Hrd1p のホモログである HRD1、gp78 や、Doa10p のホモログである TEB4、哺乳類にのみ存在する RMA1 などを含めて多数存在している。HRD1 は、哺乳類小胞体膜に存在する E3 で、様々な基質の ERAD に関係している (Burr *et al.* 2013)。HRD1 の C 末端側の細胞質領域には RING domain が存在しており、この領域が ERAD 基質のユビキチン化に関与している。HRD1 は、後述する SEL1L と 1:1 の複合体を形成し (Lilly *et al.* 2005)、ERAD において非常に重要な役割を担っている。

Cryo 電子顕微鏡を用いた解析により、酵母において Hrd1p は、Der1p とともにそれぞれ複合体を形成し、ERAD-L における基質の逆行輸送に関与している可能性が示唆されている (Wu *et al.* 2020)。しかしながら、*in vitro* の系では、Hrd1p 単独での基質の逆行輸送も示されている (Vasic *et al.* 2020)。Hrd1p 単独で逆行輸送が行われるのか、Der1p のような別の細胞内因子と協力して逆行輸送を行っているのか、それともその両者が存在し、互いに独立して逆行輸送に関与しているのかを含めて、基質の逆行輸送に関してはまだ十分に解明されていない。基質の逆行輸送には、Hrd1p の RING domain 内のリジン残基のユビキチン化が重要な役割を担っている可能性が示唆されている (Baldrige and Rapoport 2016)。しかし、このリジン残基のユビキチン化が、基質の逆行輸送にどのように関与しているのか、まだ十分に解明されていない。

3-5-2 SEL1L

SEL1L は、ER 膜に存在する type I 型 1 回膜貫通タンパク質である。SEL1L は、小胞体内腔領域にタンパク質-タンパク質間の相互作用に関与する TPR モチーフ様の SEL1L リピートをもつ (Joeng *et al.* 2016)。この領域は、ERAD における基質の認識やレクチンタンパク質との相互作用に重要な役割を担っていると考えられる。

SEL1L も HRD1 と共に ERAD において重要な役割をしている。ER 内腔領域は、OS-9 などの ER レクチンが運んできた基質を受け取るプラットフォームとしての役割を担っていると言われている。また、SEL1L の内腔領域を別のタンパク質に置換しても、野生型 SEL1L と同様に ERAD を促進した (Hosokawa and Wada. 2016)。この結果は、SEL1L の膜貫通領域が ERAD において重要な役割を

担っていることを示唆している。

3-5-3 Derlin1/2/3(Derlins Family)

Derlins は、出芽酵母における ERAD に関わる Der1p タンパク質のホモログである。Derlin1 は、哺乳類の ERAD において基質の引っ張り出しに重要な役割を担う細胞内因子として同定された(Lilly and Ploegh. 2004; Ye *et al.* 2004) 。 Derlin ファミリーは、3 種類存在しており、それぞれ Derlin1,2,3 と名付けられているが、それぞれがどのような機能をしているのか、などを含めて不明な点が多い。

Derlin1 には、rhomoid- pseudoprotease 領域が存在しており、この領域が ERAD-L 基質の認識そして細胞質への基質の引っ張り出しに重要な役割を担っていると考えられている(Greenblatt *et al.* 2011)。また、酵母において、Derlin ファミリーの 1 つで rhomoid- pseudoprotease タンパク質である Dfm1p が、小胞体膜タンパク質の ERAD において基質の引っ張り出しに関与しているという報告もある(Neal *et al.* 2018)。哺乳類における Dfm1p のホモログである RHBDL4 は、Dfm1p と異なり protease 活性を有しており、ERAD 基質を低分子に分解することで ERAD を促進していることが報告されている(Fleig *et al.* 2012)。

3-5-4 OS-9, XTP3-B

OS-9 や XTP3-B は、小胞体内腔に存在するレクチンタンパク質である。酵母では ERAD に関係するレクチンタンパク質は Yos9p の 1 つだが、哺乳類においては、OS-9 と XTP3-B の 2 種類が存在している。

OS-9 や XTP3-B は、MRH(mannose 6-phosphate receptor homology)ドメインを持ち、この領域で糖鎖を認識する。OS-9 には、MRH ドメインが 1 つ、XTP3-B には 2 つ存在している。OS-9、XTP3-B は、EDEM などによって糖鎖がトリミングされたタンパク質を認識して、SEL1L に受け渡す ERAD において重要な役割を担っていると考えられている(Hosokawa *et al.* 2010)。

最近、CRISPR-Cas9 で OS-9 や XTP-3B を欠損させた際、SEL1L が不安定になることが報告された。また、OS-9 単独や XTP3-B 単独、その両者を欠損させた際の ERAD への影響を解析した結果、XTP3-B は、非糖鎖修飾型基質の ERAD を阻害し、OS-9 とは拮抗的に働くことが示された(van der Goot *et al.* 2018)。

3-5-5 UBC6(UBE2J2)/ UBC6e(UBE2J1)

UBC6 や UBC6e は、小胞体膜に存在する ubiquitin conjugating enzyme E2 である。酵母には、ERAD に関係する E2 として Ubc6p と Ubc7p の 2 種類がある。哺乳類には、Ubc6p のホモログが、UBC6、UBC6e の 2 種類存在している。Ubc7p のホモログは UBC7 の 1 種類である。

UBC6 は、1 回膜貫通タンパク質で細胞質に活性部位を持つ。酵母の Ubc6p との相同性が 40%ある。

UBC6e は、1 回型膜タンパク質で細胞質に活性部位を持つ。UBC6e は、Ubc6p との相同性が 25%しかない。UBC6e は、HRD1 や RMA1 などの E3 と共に ERAD に関係することが報告されている(Burr *et al.* 2013; Younger *et al.* 2006)。

UBC6e を欠損させたマウスは、精子の形成に不全が生じる(Koenig *et al.* 2014)。最近、MEF 細胞において UBC6e を欠損させた際、SEL1L や EDEM、OS-9 などの ERAD enhancers と呼ばれる因子の発現量が増加することが報告された(Hagiwara *et al.* 2016)。また、UBC6e を欠損させた MEF 細胞においては、ERAD が活性化してしまい、本来分解されるべきではないタンパク質まで分解されてしまうことも報告されている。これらの結果は、UBC6e が、ERAD enhancers の分解に関与し、ERAD の調整を担う細胞因子である可能性を示唆している。しかしながら、UBC6e が直接的に ERAD enhancers の分解に関与しているのか、それとも、間接的に分解に関与しているのかを含めて不明な部分が多い。

3-5-6 p97

p97 は、細胞質に存在する AAA⁺ ATPase である。p97 は、6 量体で存在している。p97 は、ATP を加水分解した際に生じるエネルギーを用いて基質を細胞質に引っ張り出す役割をしていると考えられている。

酵母における p97 のホモログである Cdc48p は、よく解析されているので、こちらを解説する(Bodnar *et al.* 2017)。逆行輸送によって細胞質に引っ張り出された ERAD 基質は、ユビキチン鎖が付加される。Cdc48p と相互作用する UN(UFD1/NPL4)がこのポリユビキチン鎖を認識し、基質を Cdc48p に呼び込む。そして、Cdc48p は、ATP の加水分解によって生じるエネルギーを用いながら基質を解きほぐし細胞質側へと引っ張り出す。細胞質側に引っ張り出された基質は、DUB によって脱ユビキチン化され、細胞質に遊離する。遊離した基質は、細胞質において再度ユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。このようなメカニズムによって基質は、細胞質に引っ張り出されそして分解されると考えられている。

3-5-7 EDEM1,2,3

EDEMs は、小胞体内腔に存在する α マンノシダーゼである。哺乳類においては、EDEM ファミリーには、EDEM1、EDEM2、EDEM3 の 3 つが存在する。これらのタンパク質は、ERAD 基質を認識し、マンノースをトリミングすることで ERAD を促進すると考えられている。

3-5-8 その他の因子

HRD1 と Derlin の複合体形成に重要な Herp(酵母では Usa1p)や、ユビキチン化された基質の分解に関与する 26S proteasome など、様々な細胞因子が、ERAD に関与している。しかしながら、ERAD に関与するタンパク質については機能について不明な点が多く、今後の解析が必要である。



(B)

mammal	Yeast
HRD1/gp78	Hrd1p
SEL1L	Hrd3p
Derlin1,2,3	Der1p
OS-9/XTP3-B	Yos9p
UBC6/UBC6e	Ubc6p
EDEM1,2,3	Htm1p
Herp	Usa1p
p97	Cdc48p

Fig.2 ERAD に関与する細胞因子

(A)哺乳類における ERAD に関与する細胞因子を示す。EDEMs は、小胞体内で ERAD 基質のマンノースのトリミングに関与する因子である。小胞体内腔のレクチンである OS-9 や XTP3-B は、基質の糖鎖を認識し、SEL1L-HRD1 複合体に基質を輸送する。SEL1L は運ばれた基質を受け取るプラットフォームとしての役割をする。SEL1L が受け取った基質は、HRD1 や Derlins などが形成すると考

えられているレトロトランスロコンを経由して細胞質側へ逆行輸送される。Herp は、HRD1 と Derlins が複合体を形成するのに重要なタンパク質である。逆行輸送と共役して、基質にはユビキチンが付加される。基質のユビキチン化には HRD1 に代表される E3 や UBC6 や UBC6e に代表される E2 が担っている。p97 は、ユビキチンが付加された基質を認識し細胞質側へ引っ張り出す。細胞質内の 26S proteasome は、p97 によって細胞質側へ引っ張り出された基質を認識し、分解する。

(B)(A)で記述した ERAD に関係する主な細胞因子とその酵母におけるホモログを記載した。

3-6 ハンチントン病とポリグルタミンタンパク質

ハンチントン病は常染色体優性遺伝性の神経変性疾患である。舞踏運動などの不随意運動、精神症状、行動異常、認知障害などの症状が特徴である。コーカソイドでは人口 10 万人あたり 4~8 人ぐらい発症し、日本では人口 10 万人あたり 0.7 人ぐらい発症している。発病は 30 歳ぐらいが一番多いが、年齢を問わず発病する。

ハンチントン病の原因遺伝子は第 4 染色体に局在しているハンチンチン遺伝子である。ハンチンチン遺伝子のエクソン 1 にある CAG リPEAT 配列が伸長した polyQ を持つハンチンチンタンパク質の変異体が原因でハンチントン病は発症する(Sun *et al.* 2017)。CAG リPEAT 数は、健常者の場合およそ 17 から 20 回ほどであるが、ハンチントン病発病者の場合 35-40 回以上と、CAG リPEAT 数が増加している。

ハンチントン病に代表されるポリグルタミン病とは、一定以上の長さの polyQ(ポリグルタミン)鎖をもつタンパク質が引き起こす病気である。polyQ 鎖をもつタンパク質にはハンチンチンタンパク質以外にも TATA 結合タンパク質など様々なタンパク質がある。TATA 結合タンパク質はポリグルタミン鎖が伸長した時、脊髄小脳失調症 17 型を引き起こす。polyQ をもつタンパク質は核内や細胞質などの様々な領域において大きな凝集体を形成する(Li *et al.* 2000)。この凝集体が生じるメカニズムについては不明な点が多い。従来は、この凝集体こそが細胞毒性の原因として考えられてきたが、最近の研究から、この大きな凝集体にも毒性はあるが、それ以上に大きな凝集体を形成する以前の可溶性の比較的高い中間体の方が毒性の高い可能性が示唆された(Leitman *et al.* 2013)。どちらが細胞にとって深刻な影響を与えているかも含めて今後の解析が必要である。

polyQ タンパク質は、p97 やプロテアソームの機能を阻害することで、ERAD を阻害し、小胞体ストレスを引き起こすことが示されている(Hirabayashi *et al.* 2001)。ERAD の阻害と polyQ タンパク質が引き起こす障害についての関連性は今のところ不明である。そこで、本研究において SEL1L の分解中間体が polyQ タンパク質の凝集体形成に及ぼす影響について検討した。

3-7 プロテアソームの機能不全と疾患

ユビキチン-プロテアソーム系でのタンパク質の分解は、細胞周期(Zou and Lin. 2021)、シグナル伝達、免疫応答(Huber and Groll. 2021)、ERAD を含めたタンパク質品質管理(Hamazaki and Murata. 2020)など様々な生体反応において重要な役割を担っている。プロテアソームに機能不全が生じると、様々な細胞機能が障害される。

プロテアソームの不全が原因で引き起こされる疾患としては、ガン、老化、神経変性疾患などがある(Zou and Lin. 2021; Takahashi and Arimoto. 2021)。細胞間シグナル伝達に関わる多くの因子がユビキチン-プロテアソーム系で分解されている。様々なガンにおいて、プロテアソームの機能異常が報告されている(Paul. 2008)。ガン化の原因としては、細胞間シグナル伝達に関与するタンパク質の分解の制御が関与していると言われている。また、プロテアソームの機能不全と老化に関しては、ショウジョウバエの解析から明らかになっている。ショウジョウバエにおける老化に依存したニューロンの proteotoxicity(異常なタンパク質の蓄積による細胞毒性)を抑圧する遺伝子として、プロテアソームのサブユニットが同定された(Tonoki *et al.* 2009)。この結果は、老化におけるプロテアソームの重要性を示している。アルツハイマー病に代表される多くの神経変性疾患に観察される封入体を染色すると、ユビキチンが染色された(Mori *et al.* 1987)。この結果は、ユビキチン-プロテアソーム系の破綻は、神経変性疾患と関連することを示唆している。

細胞内に異常タンパク質を強制発現させると、プロテアソームがそれら进行处理できずに活性が低下する(Bence *et al.* 2001)。その結果、蓄積した異常タンパク質がアグリソームを形成する(Kopito. 2000)。このアグリソームは、ユビキチンを含んでおり、プロテアソームによって分解することができなかったタンパク質が蓄積して凝集体形成をした結果生じたものだと考えられている

プロテアソームの機能不全によるユビキチン化された基質の蓄積は、細胞にとって有毒である。近年の解析から、これらの基質を大きな凝集体に集積させることで、細胞毒性を抑制しているのではないのかといわれている(Matus *et al.* 2011)。また、凝集体形成を促進することで、オートファジーによる分解を促進しているのではないのかとも報告されている(Iwata *et al.* 2005)(Fig.3)。

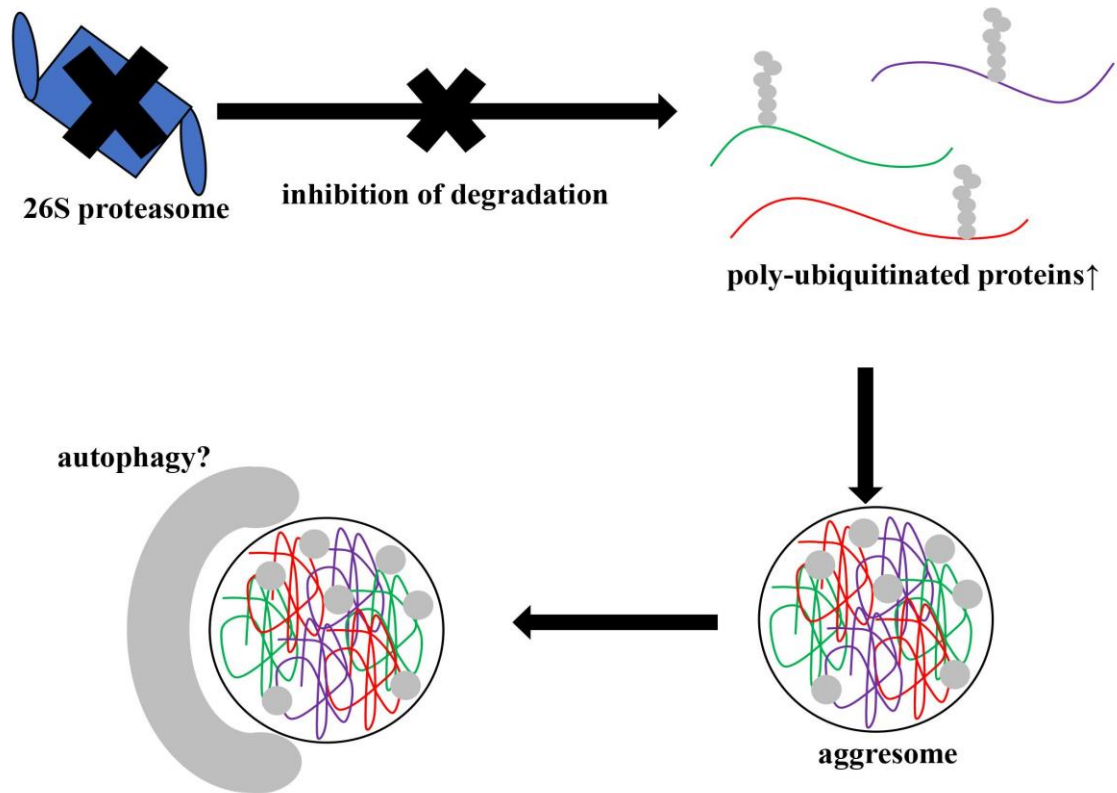


Fig.3 プロテアソーム機能障害と細胞の応答

遺伝的な変異や様々なストレスによって、プロテアソームの機能に障害が起これると、ユビキチン化された基質が蓄積する。これらのタンパク質の蓄積は、細胞毒性を示す。細胞はアグリソームを形成し、毒性を抑えようと試みる。アグリソームを形成することで、オートファジーによる分解を促進しているという報告もある。

3-8 研究目的

当研究室の先行研究により、内在性の SEL1L は HRD1 と複合体を形成できなかった時、非常に不安定になり、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが示された。また、単独でプラスミド上から発現させた SEL1L も非常に不安定で、速やかに分解された。しかしながら、SEL1L と HRD1 を共にプラスミド上から発現させると SEL1L は安定化した。この結果は、HRD1 は SEL1L の安定性を担保する細胞内因子であることを示している。

また、プラスミド上から発現させた SEL1L の分解をプロテアソーム阻害剤である MG132 で阻害すると、SEL1L の分解中間体の蓄積が観察された。一般的には、ERAD 基質は速やかに分解されるため、分解中間体の蓄積は観察されない。

そこで、SEL1L の分解のメカニズムを解明するため、SEL1L の分解を阻害した時に生じる分解中間体について解析を行い、SEL1L を安定化する HRD1 以外の因子の探索を行った。また、SEL1L の分解中間体が細胞にどのような作用を及ぼすかについて解析した。

これらを解析することによって、ERAD における SEL1L の役割ばかりでなく、まだ知られていない SEL1L の役割について理解しようとした。

4.結果

4-1 SEL1L の分解を阻害すると、分解中間体が検出される

SEL1L は、ERAD に関与する type I 型膜タンパク質である。SEL1L は、タンパク質間の相互作用に関与する SLR を 11 個有している(Fig.4A)。当研究室の先行研究により、SEL1L は短命なタンパク質で HRD1 と複合体を形成できなかった時、ERAD によって速やかに分解されることが明らかになった(Iida *et al.* 2011)。また、プロテアソーム阻害剤で SEL1L の分解を阻害すると、様々なサイズの SEL1L の分解中間体が検出された(Iida *et al.* 2011)。この SEL1L の分解中間体に関する情報を得るために解析を行った。野生型の SEL1L や C 末端側に HA タグをつけた SEL1L(SEL1L-HA)、N 末端側に S タグをつけた SEL1L(S-SEL1L)などを HEK293 細胞で発現させ、ウエスタンブロッティングで解析を行った。SEL1L の C 末端側 15 アミノ酸を認識する抗体で検出した結果、プロテアソーム阻害剤を添加していないとき分解中間体は検出できなかったが、プロテアソーム阻害剤で処理し ERAD を阻害した時、野生型 SEL1L、SEL1L-HA、S-SEL1L をそれぞれ発現させたどの細胞においても様々なサイズの分解中間体が検出された(Fig.4B lane 4,6,8)。SEL1L-HA を発現した細胞においては少しであるがバンドが上にシフトした(Fig.4B lane 4,6 を比較)。この結果は、HA タグの分シフトしたのであると考えられる。また、S タグを認識する抗体を用いて、同様の解析を行ったところ、MG132 で分解を阻害した時 S-SEL1L の分解中間体が確認された(Fig.4B lane 12)。同様に HA タグを認識する抗体を用いて解析を行ったところ、MG132 添加時に SEL1L-HA の分解中間体が検出された(Fig.4B lane 16)。これらの結果から、プロテアソームの活性が阻害された場合には、SEL1L タンパク質は切断され N 末端側も C 末端側の断片も検出されたと考えた。

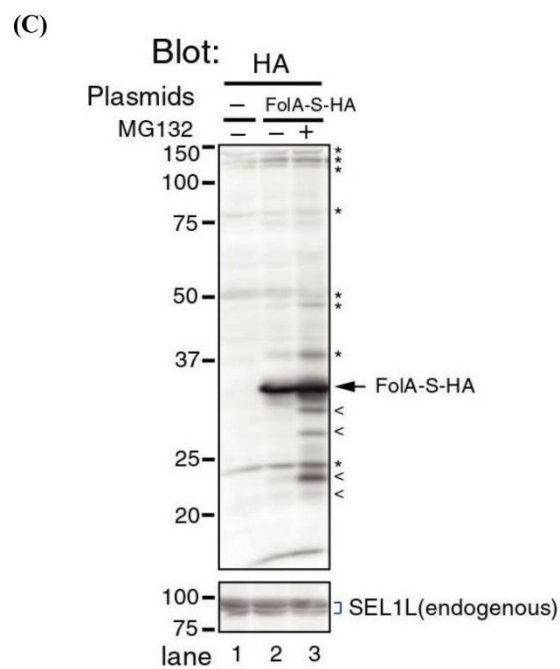
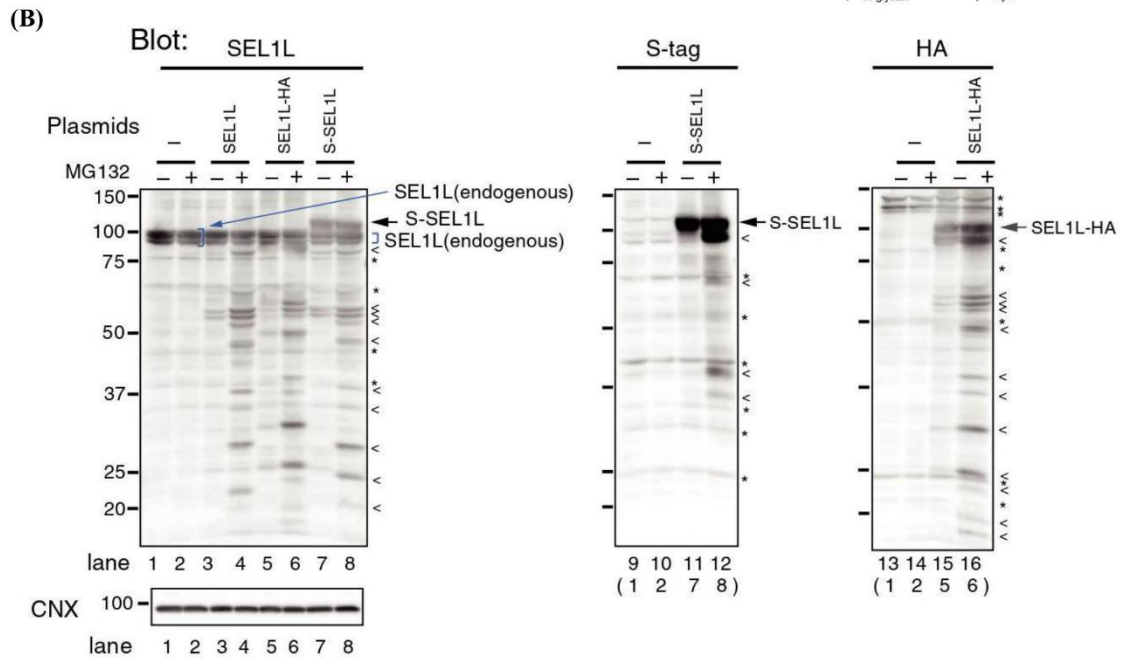
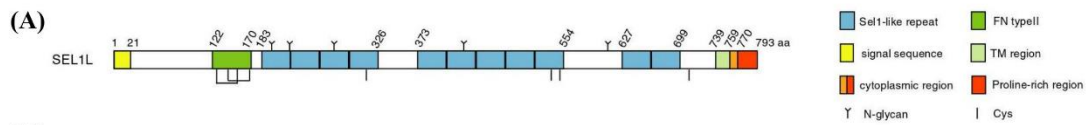
FolA は、大腸菌由来のタンパク質で、大腸菌においてジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の役割を担う。FolA は DHFR と異なり、哺乳類の細胞においては速やかに安定な構造をとる。FolA-S-HA は、SEL1L-HA の lumen 領域を FolA に置き換えたキメラタンパク質で、SEL1L の膜貫通領域と細胞質領域はそのまま残っている。先行研究によって FolA-S-HA は、野生型の SEL1L と同様に非常に不安定なタンパク質であることが示された(Hosokawa and Wada. 2016)。FolA-S-HA においても、同様に分解中間体が検出できるか解析を行った。その結果、プロテアソーム阻害剤を添加した際に、FolA-S-HA の分解中間体が検出された(Fig.4C lane3)。この結果は、SEL1L の膜貫通領域が、SEL1L の分解中間体の形成に重要な領域であることを示唆している。

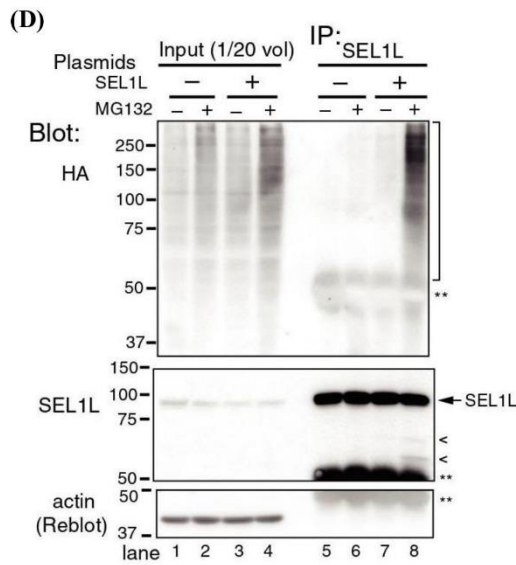
先行研究によって SEL1L は、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されるこ

とが示された(Iida *et al.* 2011)。そこで、分解中間体がユビキチン化されているのかどうかを検討した。野生型 SEL1L と HA-ubiquitin をトランスフェクションした細胞を免疫沈降法で解析した。その結果、ユビキチン化された SEL1L のバンドがスメア状に検出された。また、全長の SEL1L の分子量は約 100kDa であるが、100kDa よりも低分子量の領域にユビキチン化した SEL1L が検出された(Fig.4D)。この結果は、分解中間体もユビキチン化されることを示している。

続いて、パルスチェイス法を用いて S-SEL1L の安定性を解析した。先行研究と同様に(Iida *et al.* 2011; Hosokawa and Wada. 2016)、S-SEL1L は、プロテアソーム阻害剤添加時に、分解が著しく阻害された(Fig.4E)。また、S-SEL1L の分解中間体もプロテアソーム阻害剤添加時に検出された。

これらの結果から、SEL1L の分解中間体は、SEL1L が ERAD によって分解される過程で SEL1L タンパク質の切断が起こった結果生じたものであると考えられる。





(E)

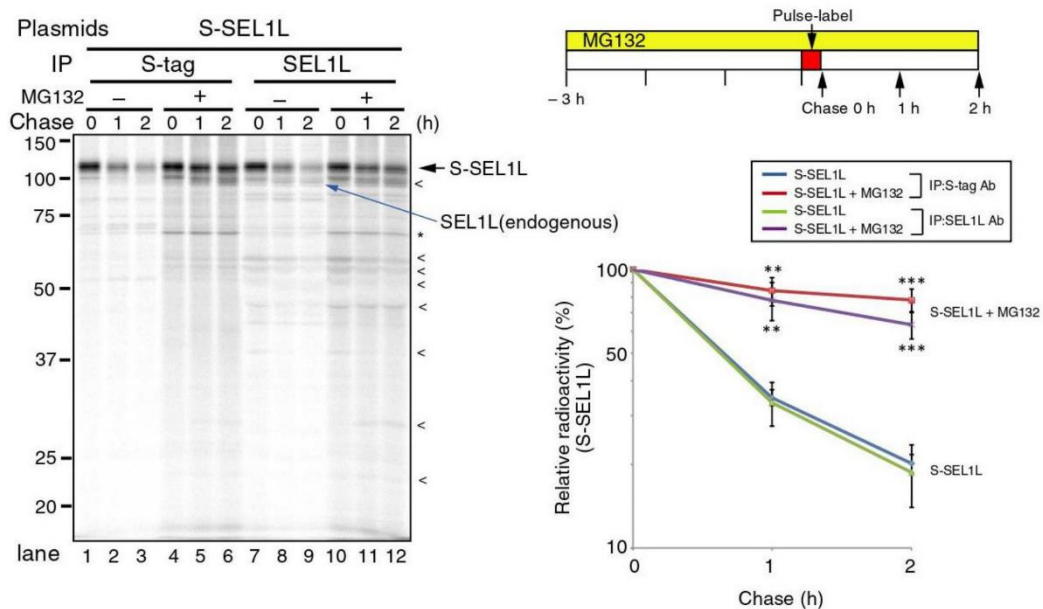


Fig.4 SEL1L の分解中間体はプロテアソーム阻害剤で処理した細胞で検出することができる

(A)SEL1L のモデル図。FN type II は、Fibronectin type II を、TM は、膜貫通領域を表す。

(B)HEK 293 細胞に野生型 SEL1L、S-SEL1L、SEL1L-HA をそれぞれトランスフェクションし、一定時間培養後、プロテアソーム阻害剤 MG132 を添加し、さらに 6 時間培養した。培養した細胞を 1%の NP-40 を含むバッファーで抽出し、上清を回収した。回収した上清を SDS-PAGE で分離した後、ウエスタンブロッティングで目的のタンパク質を検出した。青や黒、灰色の矢印は、それぞれ内在性の全長の SEL1L、全長の S-SEL1L、そして、全長の SEL1L-HA を示す。山括弧

は、SEL1L の分解中間体を示す。*は、抗体によって検出される非特異的なバンドを示す。

(C) HEK 293 細胞に Fola-S-HA をトランスフェクションし、(B)と同様に解析を行った。矢印は全長の Fola-S-HA を示す。山括弧は、Fola-S-HA の分解中間体を示す。

(D)HEK293 細胞に野生型 SEL1L と HA-ubiquitin をトランスフェクションしたのち、抗 SEL1L 抗体を用いて SEL1L タンパク質を免疫沈降し、解析をした。角括弧でくくられた領域はユビキチン化された SEL1L を示す。**は、使用した抗血清に含まれたウサギ IgG を示す。

(E)HEK293 細胞における S-SEL1L の安定性の解析。S-SEL1L を HEK293 細胞にトランスフェクションし、一定時間培養したのち、15 分の代謝ラベルをする 3 時間前に MG132 を添加し、培養した。S タグ抗体や SEL1L 抗体を用いて細胞内容物を免疫沈降した。矢印は、全長の S-SEL1L を示し、青の矢印は、内在性の SEL1L を示す。山括弧は、SEL1L の分解中間体を示す。*は、非特異的なバンドを示す。全長の S-SEL1L を定量化に用いた。独立した 3 回の実験を行い、平均値と標準偏差を示した。MG132 添加細胞と MG132 非添加細胞の結果の有意差を両側 Student's t 検定によって検定した。**は、 $P<0.01$ 、***は、 $P<0.001$ 。

4-2 SEL1L の分解中間体は細胞質で検出される

SEL1L をプロテアソーム阻害剤で処理すると、分解中間体が蓄積することが示されたが、この分解中間体に関して不明なことが多い。そこで、SEL1L の分解中間体に関する情報を得ようと試みた。

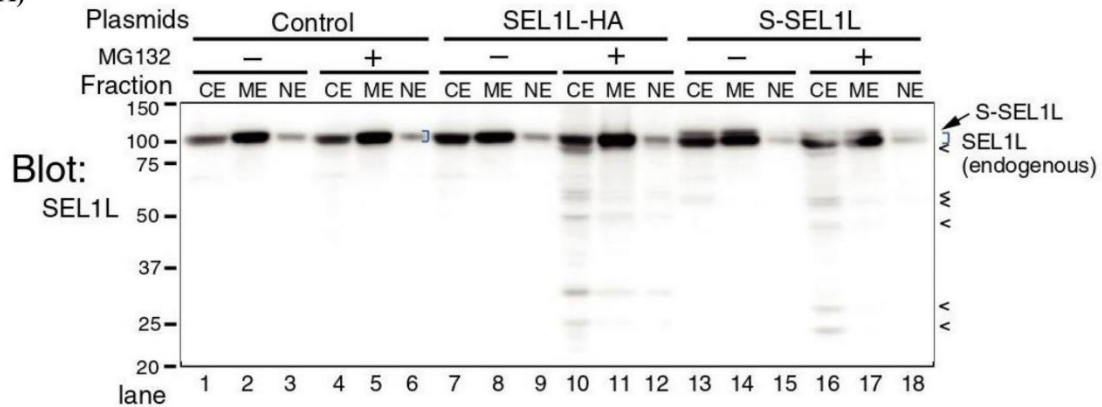
SEL1L の分解中間体は、小胞体中で生成されたのか、細胞質に引き出されたのちに生成されたのかを調べるために、分解中間体の細胞における局在を解析した。HEK293 細胞に SEL1L-HA や S-SEL1L をそれぞれトランスフェクションして培養後、プロテアソーム阻害剤を添加し、SEL1L の分解を阻害した。その後、培養細胞を Thermo Fisher Scientific 社製の Subcellular Fractionation Kit で細胞質画分(CE)、膜画分(ME)そして核画分(NE)に分画した。それぞれのサンプルを SDS-PAGE で分離し、SEL1L 抗体でシグナルの検出を行った。その結果、SEL1L-HA、S-SEL1L をトランスフェクションした細胞において、プロテアソーム阻害剤で SEL1L の分解を阻害すると、膜画分には全長の SEL1L が確認された(Fig.5A lane11,17)が、SEL1L の分解中間体は細胞質画分で確認された(Fig.5A lane10,16)。一般的に ERAD を阻害すると、ERAD 基質は小胞体内に蓄積するが、SEL1L においては細胞質側で分解中間体が確認された。同様の実験を S タグ抗体で解析をした。その結果も同様に、分解中間体は細胞質画分で検出された(Fig.5B lane 10)。

細胞質マーカーである Actin と HSC70/HSP70 はほとんどが細胞質画分で検出され(Fig.5C lane 1,4,7,10,13,16)、また、小胞体マーカーである calnexin はそのほとんどが膜画分で検出された(Fig.5C lane 2,5,8,11,14,17)。これらの結果は、Subcellular Fractionation Kit で細胞を分画した際、SEL1L の分解中間体は細胞質側に検出されることを示している。

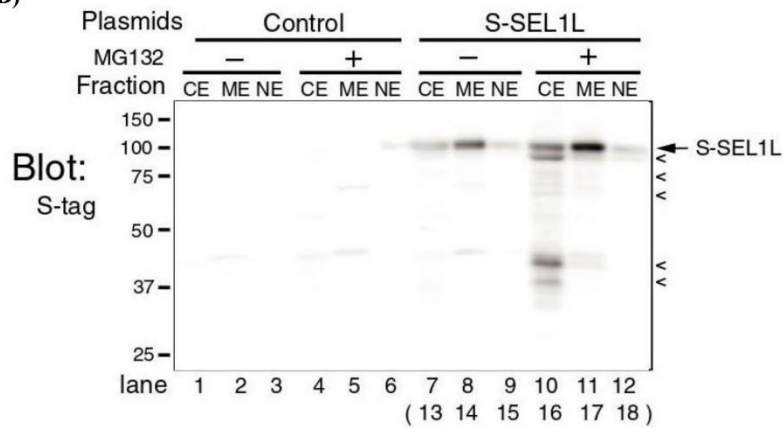
今回用いた Subcellular Fractionation Kit には界面活性剤が含まれており、これが膜に何かしらの影響を与え、分解中間体が細胞質側で検出された可能性が否定できない。そこで、界面活性剤を含まない条件で分画を行った。HEK293 細胞に SEL1L-HA や S-SEL1L をそれぞれトランスフェクションし培養後、プロテアソーム阻害剤を添加し、SEL1L の分解を阻害した。その後、30 ゲージ注射針を用いて細胞を破碎し、超遠心分離(100×k g)を行い、上清画分(Supernatant)とペレット画分(Pellet)に分けた。分画されたそれぞれのサンプルを SDS-PAGE によって分離し、SEL1L 抗体でシグナルの検出を行った。その結果、SEL1L の分解をプロテアソーム阻害剤で阻害すると、SEL1L の分解中間体は、ほとんどが上清画分で確認された(Fig.5D lane 7,11)。また、同じサンプルを S タグ抗体で検出した結果、やはり SEL1L の分解中間体はほとんどが上清画分で検出された(Fig.5E lane 7)。これらの結果は、界面活性剤を含まない条件で細胞を分画した時、SEL1L の分解中間体は上清画分で検出されることを示している。

これらの結果から、プロテアソームの活性を阻害すると、SEL1L の分解中間体は、細胞質に蓄積することが明らかになった。

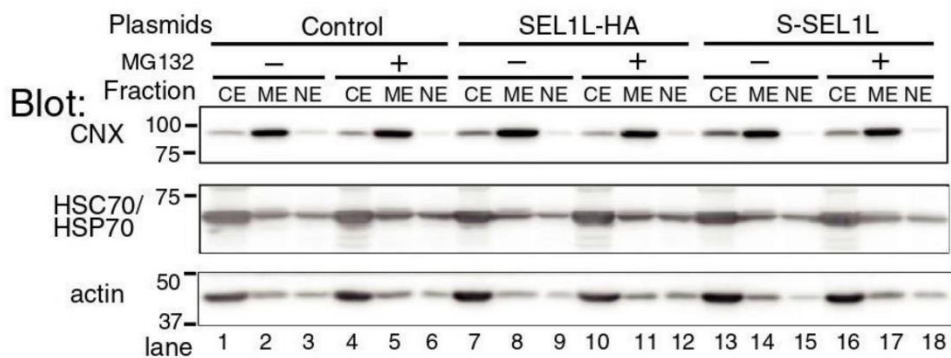
(A)



(B)



(C)



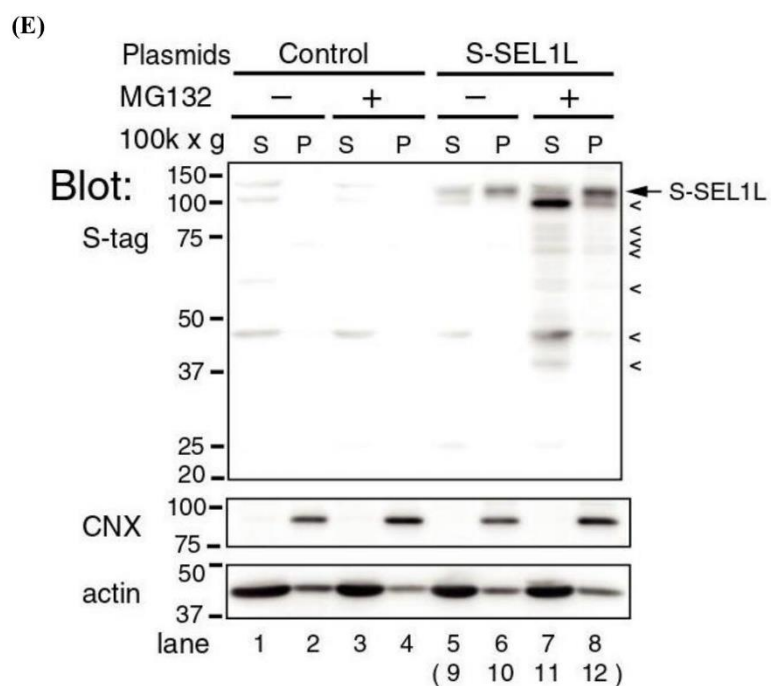
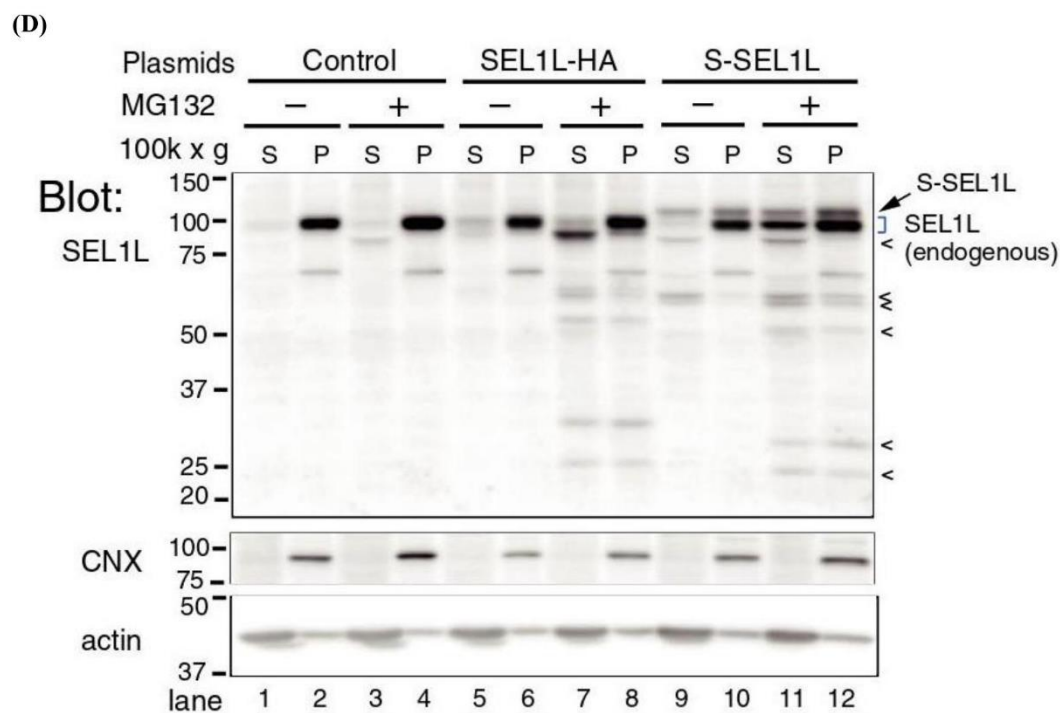


Fig.5 SEL1L の分解中間体は細胞質に蓄積する

(A) HEK293 細胞に SEL1L-HA や S-SEL1L をトランスフェクションしたのち、細胞を一定時間培養した。その後 MG132 を添加し、培養した。培養後の細胞を

Thermo Fisher Scientific 社製の Subcellular Fractionation Kit で細胞質画分(CE)、膜画分(ME)、核画分(NE)に分画し、10%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。特異的なシグナルを SEL1L 抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した。青の角括弧は内在性の SEL1L を示し、矢印は全長の S-SEL1L を、山括弧は分解中間体を示す。

(B)(A)の解析を S タグ抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した。

(C) (A)と同じサンプルを CNX(calnexin)、HSC70/HSP70、Actin 抗体を用いてウエスタンブロッティングで検出した。

(D) HEK293 細胞に SEL1L-HA や S-SEL1L をトランスフェクションしたのち、細胞を一定時間培養した。その後 MG132 を添加し、培養した。培養後の細胞を 30 ゲージの注射針を通すことで破碎した。破碎した細胞を 100×k g で 1 時間超遠心し、上清とペレット(マイクロゾーム)に分画した。10%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、特異的なシグナルを SEL1L 抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した。青の角括弧は内在性の SEL1L を示し、矢印は全長の S-SEL1L を、山括弧は分解中間体を示す。

(E)(D)と同じサンプルを用い、シグナルを S タグ抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した。矢印は全長の S-SEL1L を、山括弧は分解中間体を示す。

4-3 SEL1L の分解中間体は、細胞質に逆行輸送されたのち生じる

SEL1L は、8 個のシステイン残基を有しており、それらのいくつかはジスルフィド結合を形成する(Fig.4A)。一般的に、ジスルフィド結合が存在するタンパク質において、非還元条件下で SDS-PAGE を行うと、還元条件下で SDS-PAGE を行うよりもサンプルの移動が遅くなる。まず、最初に、SEL1L の分解中間体にジスルフィド結合が存在しているのか解析した。野生型の全長の SEL1L、SEL1L-HA、S-SEL1L を発現するプラスミドを HEK293 細胞にそれぞれトランスフェクシ、プロテアソーム阻害剤を添加後、細胞からタンパク質を抽出し、還元条件下(+DTT)、非還元条件下(-DTT)で SDS-PAGE を行い、SEL1L 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、全長の SEL1L においては非還元条件下において、還元条件下と比較をして移動度が遅くなった(Fig.6A lane 2 と 6、lane 3 と 7、lane 4 と 8 をそれぞれ比較)。一方、SEL1L の分解中間体は、非還元条件下、還元条件下においても移動度がほぼ同じであった(Fig.6A lane 2 と 6、lane 3 と 7、lane 4 と 8 をそれぞれ比較)。この結果は、全長の SEL1L はジスルフィド結合を形成しているが、SEL1L の分解中間体においてはジスルフィド結合を持たないことを示している。これはつまり全長の SEL1L は小胞体に存在しているが、SEL1L の分解中間体は非還元環境状態、すなわち細胞質に存在していることを示している。

次に、細胞質に SEL1L を発現して解析を行った。シグナル配列を持たない SEL1L-HA(Δ ssSEL1L-HA)を作製した。その結果、 Δ ssSEL1L-HA もユビキチン-プロテアソーム系で速やかに分解された(Fig.6B lane 4)。また、 Δ ssSEL1L-HA をプロテアソーム阻害剤によって分解を阻害すると、 Δ ssSEL1L-HA の分解中間体の蓄積が観察された(Fig.6B lane 3)。 Δ ssSEL1L-HA の分解中間体は、全長 SEL1L の分解中間体と同じ移動度を示した(Fig.6B lane 2,3 を比較)。これらの結果からも SEL1L 分解中間体が細胞質で生成される可能性が示唆された。

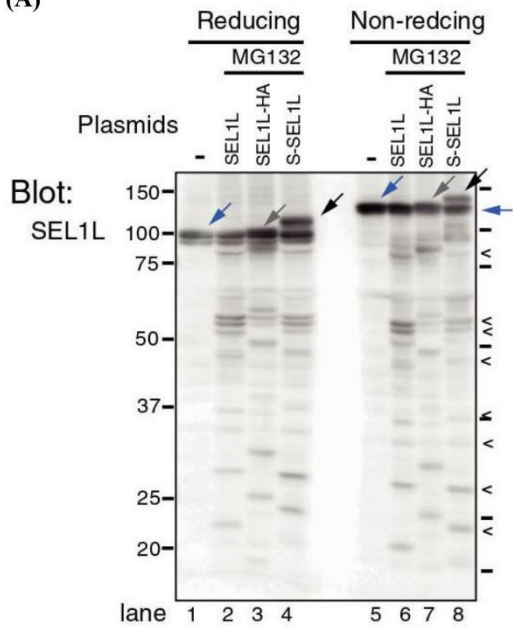
細胞には、小胞体ストレスが加わった際、小胞体タンパク質の輸送を阻害し細胞質側で分解する pre-emptive quality control が存在している(Kang *et al.* 2006)。小胞体に発現した SEL1L が細胞質側に逆行輸送され分解中間体を生成したのか、小胞体内腔に輸送されずに細胞質で生合成された SEL1L が分解されたのかを区別する必要がある。ERAD 基質においては、小胞体から細胞質へ逆行輸送された後、付加されている糖鎖が PNGase によって刈り取られるので(Suzuki. 2007)、細胞質での ERAD 基質は脱糖鎖型になる。PNGase 阻害剤である Z-VAD-FMK(Misaghi *et al.* 2004)を用いて検討した。Z-VAD-FMK の添加によって、全長の SEL1L の移動度に変化はなかったが、SEL1L 分解中間体の移動度は遅くなった(Fig.6C lane 3,4 を比較)。この結果は、全長の SEL1L は、糖鎖型であるが、SEL1L の分解中間体は脱糖鎖型であることを示している。また、PNGase によ

て糖鎖が取り除かれる際、取り除かれた部位のアスパラギン(中性)がアスパラギン酸(酸性)に変化し、その結果、脱糖鎖型のタンパク質の等電点は酸性側に移行する(Wiertz *et al.* 1996)。糖鎖が付加されず PNGase による脱糖鎖反応を受けない Δ ssSEL1L-HA をコントロールに用いて、等電点電気泳動を行った。その結果、SEL1L-HA の分解中間体は Δ ssSEL1L-HA の分解中間体よりも酸性側で検出された(Fig.6D)。この結果は、SEL1L の分解中間体が脱糖鎖型であることを示している。

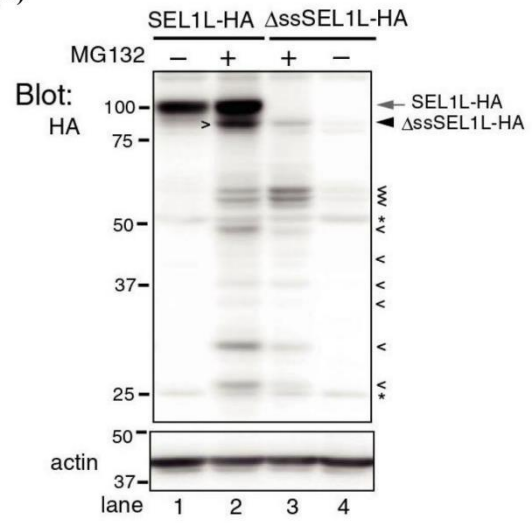
続いて、細胞質に存在している分解中間体が小胞体内で生じ細胞質側に逆行輸送されたものなのか、それとも逆行輸送されたのちに細胞質側で切断されて生じたものなのかを検討した。p97 は、 AAA^+ ATPase で ATP の加水分解によって生じるエネルギーを用いて ERAD の逆行輸送の際の基質の細胞質への引っ張り出しの役割を担っている(Wolf and Stolz. 2012)。p97 の阻害剤である NMS-873(Magnaghi *et al.* 2013)を用いて p97 の機能を阻害したところ、分解中間体は検出できなかった(Fig.6E lane 4)。この結果は、SEL1L 分解中間体は、いったん全長の SEL1L タンパク質が細胞質側に逆行輸送されたのち、細胞質内で切断されて生じたものであることを示している。

これらの結果から、SEL1L 分解中間体は全長の SEL1L タンパク質が細胞質に逆行輸送された後に切断されて生成すると考えられた。

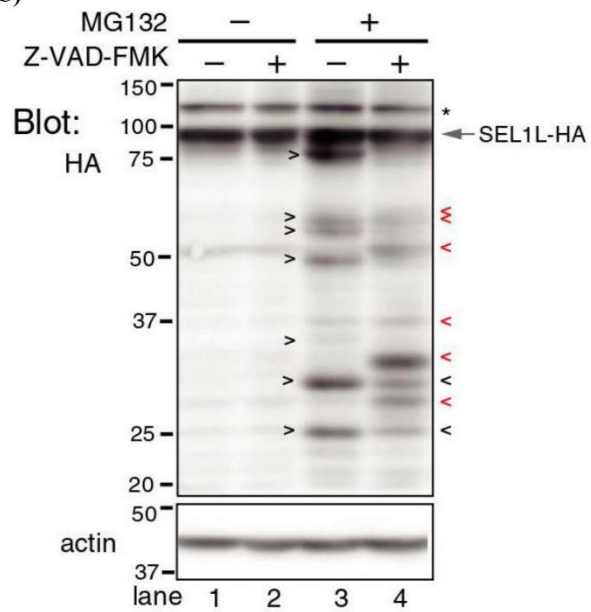
(A)



(B)



(C)



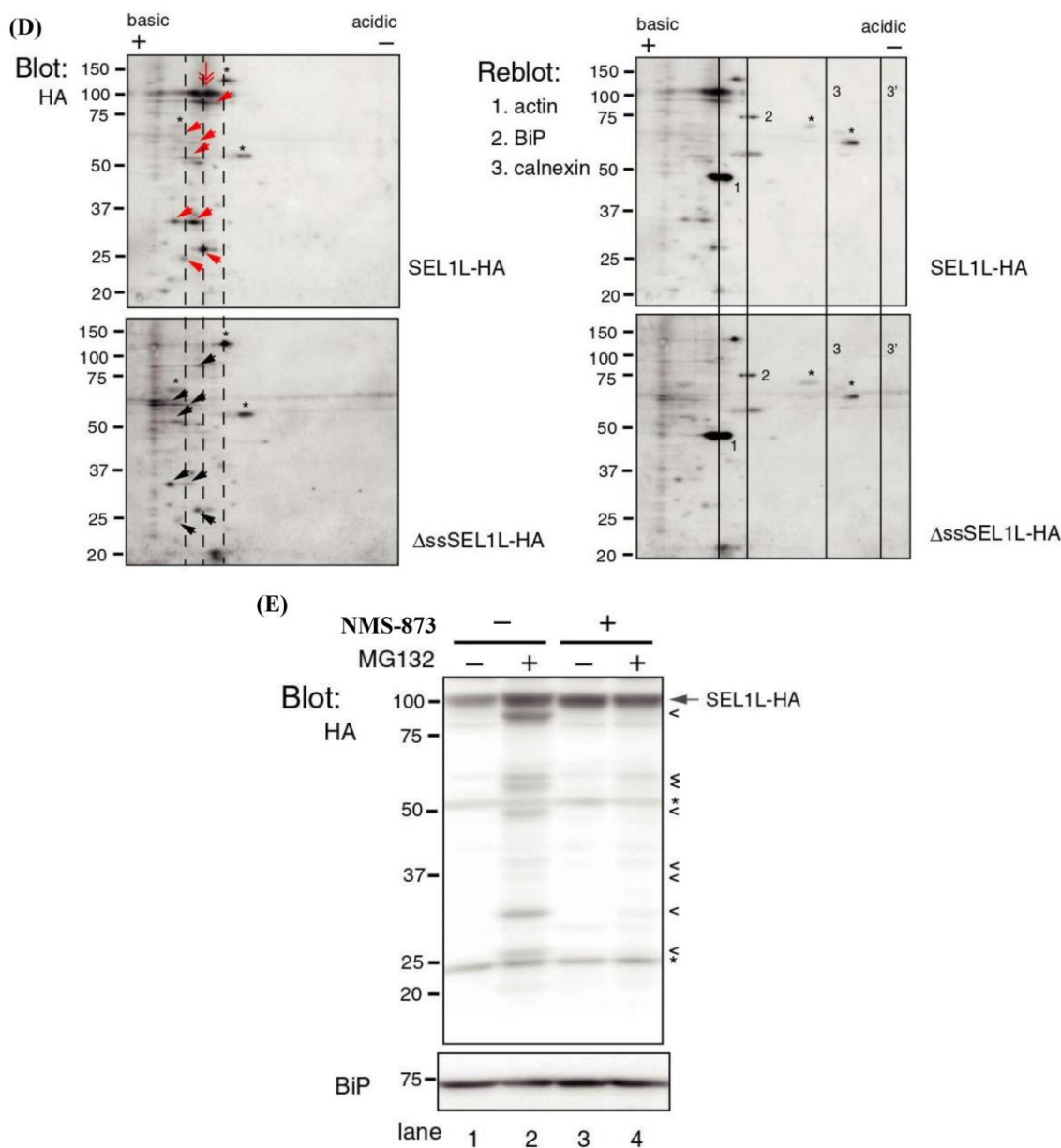


Fig.6 SEL1L の分解中間体は、還元型であり脱糖鎖型である

(A) HEK 293 細胞に野生型 SEL1L、S-SEL1L、SEL1L-HA をトランスフェクションし、一定時間培養後 MG132 を添加し、さらに培養した。培養した細胞を 1% の NP-40 を含むバッファーで抽出し、上清を回収した。回収した上清を DTT 存在下もしくは非存在下で SDS-PAGE を行った。シグナルを SEL1L 抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した。青、灰色、黒の矢印はそれぞれ内在性の SEL1L、SEL1L-HA、S-SEL1L を示す。山括弧は、SEL1L の分解中間体を示す。

(B) HEK 293 細胞に SEL1L-HA、 Δ ssSEL1L-HA をそれぞれトランスフェクションし、一定時間培養後 MG132 を添加し、さらに培養した。培養した細胞を 1% の NP-40 を含むバッファーで抽出し、上清を回収した。回収した上清を SDS-

PAGE で分離した後、HA 抗体を用いてウエスタンブロッティングで目的のタンパク質を検出した。矢印は SEL1L-HA を、矢頭は Δ ssSEL1L-HA を示す。山括弧は、SEL1L の分解中間体を示す。*は、HA 抗体による非特異的なシグナルを示す。

(C) HEK 293 細胞に SEL1L-HA をトランスフェクションし、一定時間培養後、MG132、Z-VAD-FMK をそれぞれ添加し、さらに培養した。培養した細胞を 1% の NP-40 を含むバッファーで抽出し、上清を回収した。回収した上清を SDS-PAGE で分離した後、HA 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い目的のタンパク質を検出した。赤の山括弧は Z-VAD-FMK を添加したことにより移動度に変化が見られたバンドを示す。

(D) HEK 293 細胞に SEL1L-HA、 Δ ssSEL1L-HA をそれぞれトランスフェクションし、一定時間培養後プロテアソーム阻害剤 MG132 を添加し、さらに培養した。培養した細胞を二次元等電点電気泳動し、シグナルを HA 抗体で検出した。赤の二重矢印は全長の SEL1L-HA を示す。赤の矢印は SEL1L-HA の分解中間体を、黒の矢印は Δ ssSEL1L-HA の分解中間体を示す。

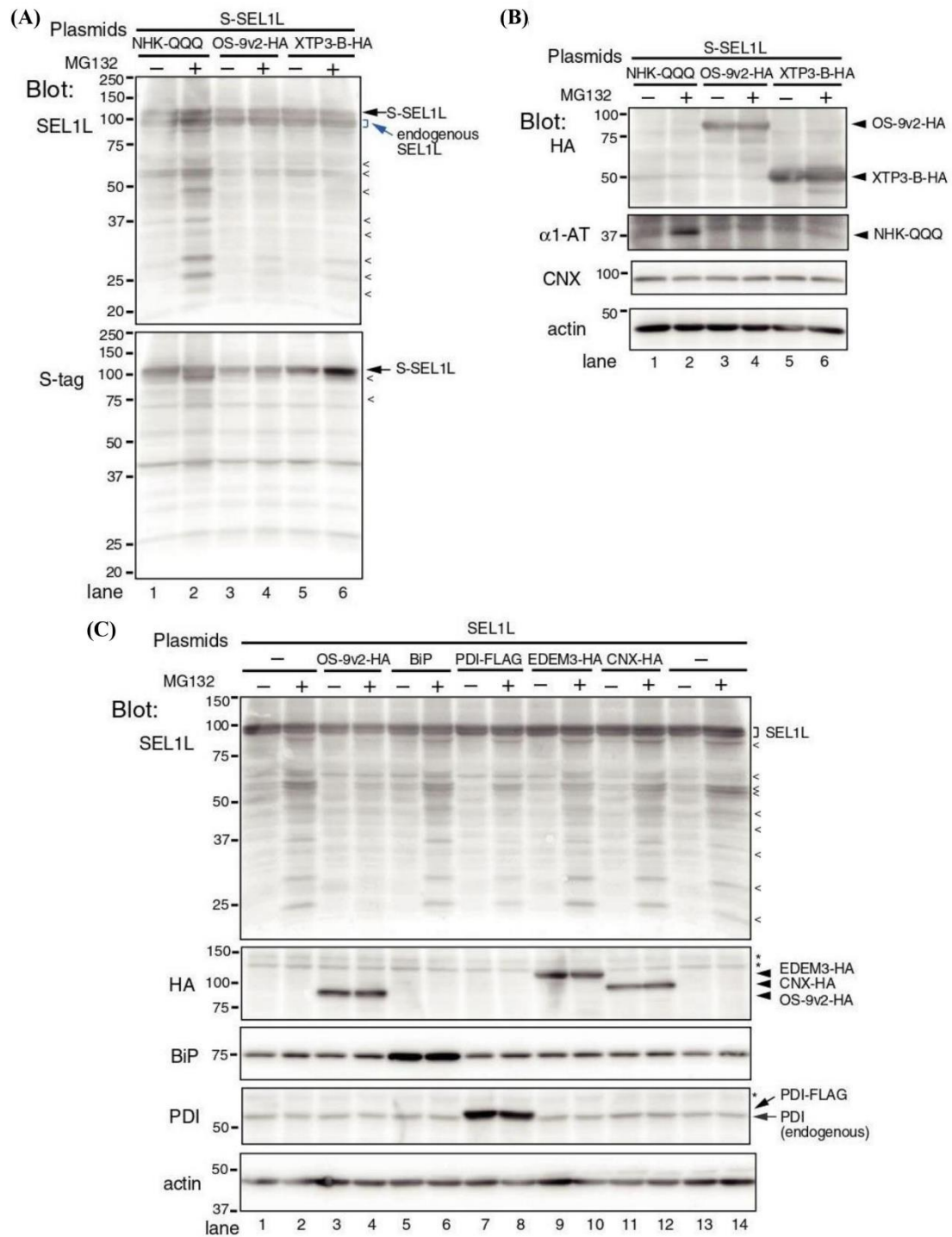
(E) HEK 293 細胞に SEL1L-HA をトランスフェクションし、一定時間培養後 MG132、NMS-873 をそれぞれ添加し、さらに培養した。培養した細胞を 1% NP-40 を含むバッファーで抽出し、上清を回収した。回収した上清を SDS-PAGE で分離した後、HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングで目的のタンパク質を検出した。矢印は全長の SEL1L-HA を示し、山括弧は、SEL1L-HA の分解中間体を示す。

4-4 小胞体レクチンである OS-9 や XTP3-B は SEL1L の分解を抑制する

ユビキチンリガーゼである HRD1 は、SEL1L と安定な複合体を形成し SEL1L の分解を抑制している(Iida *et al.*,2011)。HRD1 以外にも SEL1L の安定性に影響を与えている細胞内因子はないのか解析した。最初に、SEL1L と相互作用することが示されている小胞体レクチン OS-9 や XTP3-B について解析した。OS-9 や XTP3-B は、ERAD で分解される糖タンパク質の糖鎖部分を認識する重要な役割を担っている(Xu and Mg *et al.* 2015)。S-SEL1L を発現するプラスミドと OS-9-HA、XTP3B-HA を発現するプラスミドそれぞれを HEK293 細胞にトランスフェクションし、SEL1L の分解中間体の形成を解析した。その結果、OS-9 や XTP3-B を発現させると、SEL1L の分解中間体の形成が阻害された(Fig.7A lane 4,6)。一方、ERAD 基質である NHK-QQQ は、SEL1L と結合するが、SEL1L の分解中間体の形成に影響を与えなかった(Fig.7A lane 2)。また、SEL1L との相互作用が報告されているその他の小胞体タンパク質(BiP, PDI, EDEM3)についても解析した。その結果、これらの小胞体タンパク質は、SEL1L 分解中間体の形成には影響を与えなかった(Fig.7C lane 6,8,10)。SEL1L との相互作用が示されていない calnexin-HA も同様に SEL1L 分解中間体の形成に影響を与えなかった(Fig.7C lane 12)。

次に、内在性の OS-9 や XTP3-B が内在性 SEL1L の安定性に及ぼす影響を解析した。siRNA を用いて内在性の OS-9 と XTP3-B をノックダウンし、SEL1L の安定性を解析した。OS-9 に対する siRNA2 種類 (#2,3)を一緒に用いることで、OS-9 の発現量を著しく低下させることができた(Fig.7D lane4, Fig.7F)。OS-9 をノックダウンした時、SEL1L の発現量は低下した(Fig.7D lane 2,3,4, Fig.7E)。XTP3-B をノックダウンした時、SEL1L の発現量には影響を与えなかった(Fig.7D lane5,6)。ところが、OS-9 と XTP3-B の両方をノックダウンすると OS-9 を単独でノックダウンした時よりも、SEL1L の発現量は低下していた(Fig.7D lane 2,3,4,7,8 Fig.7E,F,G)。これらの結果から、SEL1L と複合体を形成する OS-9 や XTP3-B は、HRD1 と同じく SEL1L を安定化している可能性が示唆された。

続いて、OS-9 が SEL1L の関与する ERAD 基質の分解に及ぼす影響を解析した。パルスチェイス法を用いて SEL1L が関与する ERAD 基質である α 1-AT 変異体 NHK-QQQ の分解を解析した。SEL1L を単独で発現させると NHK-QQQ の分解は促進されるが、OS-9 を発現させるとコントロールと同程度に回復した(Fig.7H)。また、同時に SEL1L の分解も OS-9 依存的に抑制された(Fig.7I)。この結果は、SEL1L が安定化するほど ERAD が抑制されるという結果を示している。この結果は、HRD1 の共発現の場合(Hosokawa and Wada. 2016)と同様、SEL1L の安定化によって過剰な ERAD が抑制される可能性を示している。



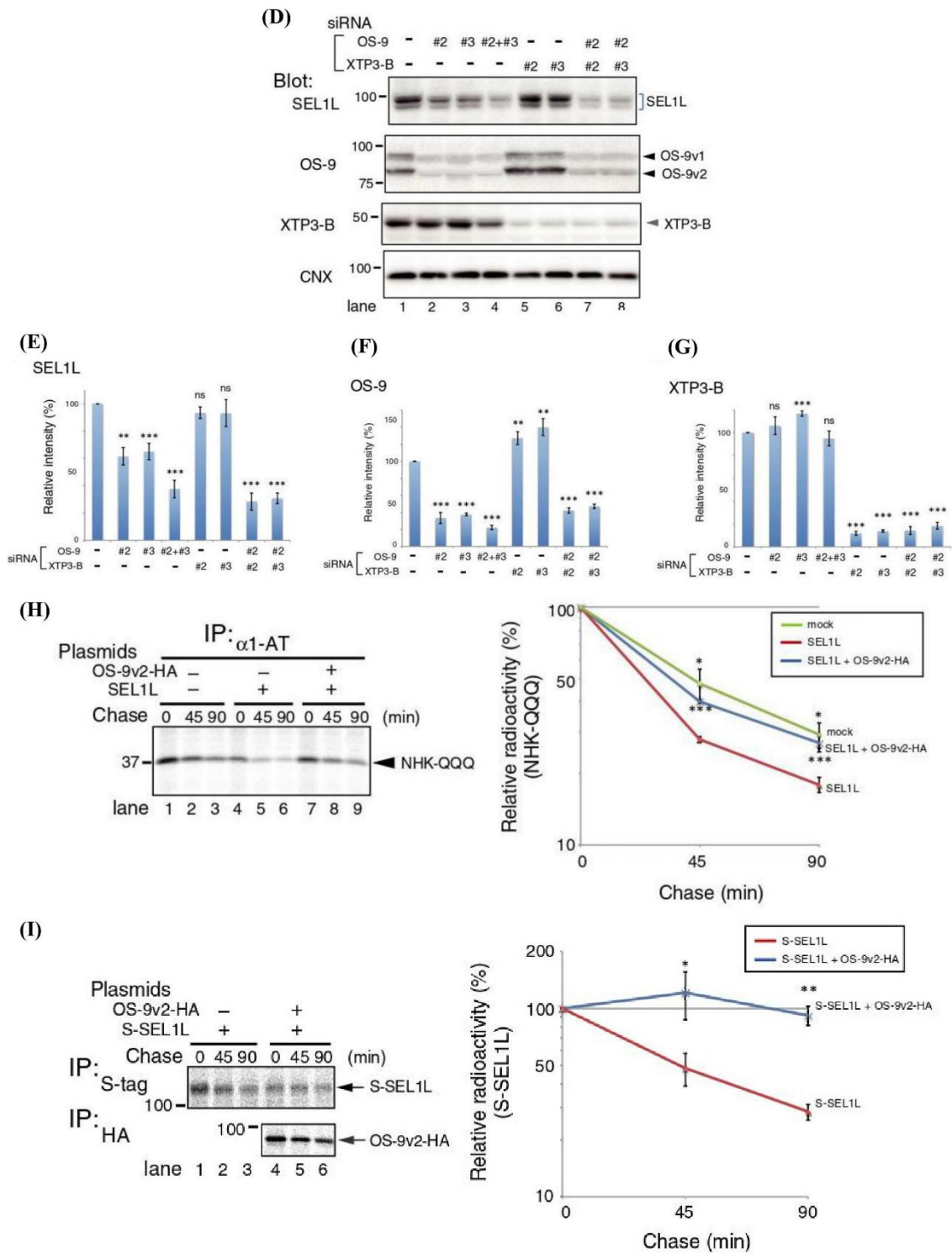


Fig.7 小胞体レクチンである OS-9、XTP3B は、SEL1L の分解中間体の蓄積を抑制する

(A, B) HEK293 細胞に S-SEL1L と NHK-QQQ、OS-9v2-HA、XTP3-B-HA をそれぞれトランスフェクションしたのち、一定時間培養した。その後 MG132 を添加し、

さらに培養を行った。培養後の細胞から上清を回収した。回収した上清を SDS-PAGE で分離した後、SEL1L 抗体、S タグ抗体、HA 抗体、 α 1-AT 抗体、CNX 抗体、Actin 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い目的のバンドを検出した。黒の矢印は S-SEL1L を、緑の矢印は内在性の SEL1L を、山括弧は、SEL1L の分解中間体を示し、黒の矢頭は、それぞれの目的とするタンパク質を示す。

(C)HEK293 細胞に SEL1L と OS-9v2-HA、BiP、PDI-FLAG、EDEM3-HA、CNX-HA をそれぞれトランスフェクションしたのち、(A,B)と同様に解析した。角括弧は、SEL1L を示し、山括弧は、SEL1L の分解中間体を示す。矢頭はそれぞれの目的とするタンパク質を示す。矢印は PDI-FLAG、内在性の PDI を示す。*は、抗体による非特異的なバンドを示す。

(D,E,F,G)HEK293 細胞に negative control siRNA、OS-9 特異的な siRNA(#2,3)、XTP3-B 特異的な siRNA(#2,3)および、その両方をトランスフェクションし、一定時間培養した。培養後の細胞から上清を回収した。回収した上清を SDS-PAGE で分離した後、SEL1L 抗体、OS-9 抗体、XTP3-B 抗体、CNX 抗体を用いたウエスタンブロッティングで目的のバンドを検出した。定量化してグラフにした。独立した 3 回の実験を行い、平均値と標準偏差を示した。negative control の siRNA を用いた時の結果とそれぞれ特異的な siRNA を用いた結果の有意差を両側 Student's t 検定によって検定した。n.s.は not significant($P>0.05$)、**は、 $P<0.01$ 、***は、 $P<0.001$ を示す。

(H)HEK293 細胞に NHK-QQQ、SEL1L、OS-9v2-HA をトランスフェクションし、培養した。培養後の細胞を 15 分間代謝ラベルし、特定の時間チェイスした。 α 1-AT 抗体を用いて免疫沈降し、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE で分離し、NHK-QQQ のシグナルを検出した。チェイス 0 時間を基準としたシグナルの強さを定量化し、グラフにした。独立した 3 回の実験を行い、平均値と標準偏差を示した。NHK-QQQ、SEL1L をトランスフェクションしたときの結果を NHK-QQQ のみをトランスフェクションしたときの結果、NHK-QQQ と SEL1L、OS-9v2-HA をトランスフェクションしたときの結果の有意差を両側 Student's t 検定によって検定した。*は $P<0.05$ ***は、 $P<0.001$ を示す。

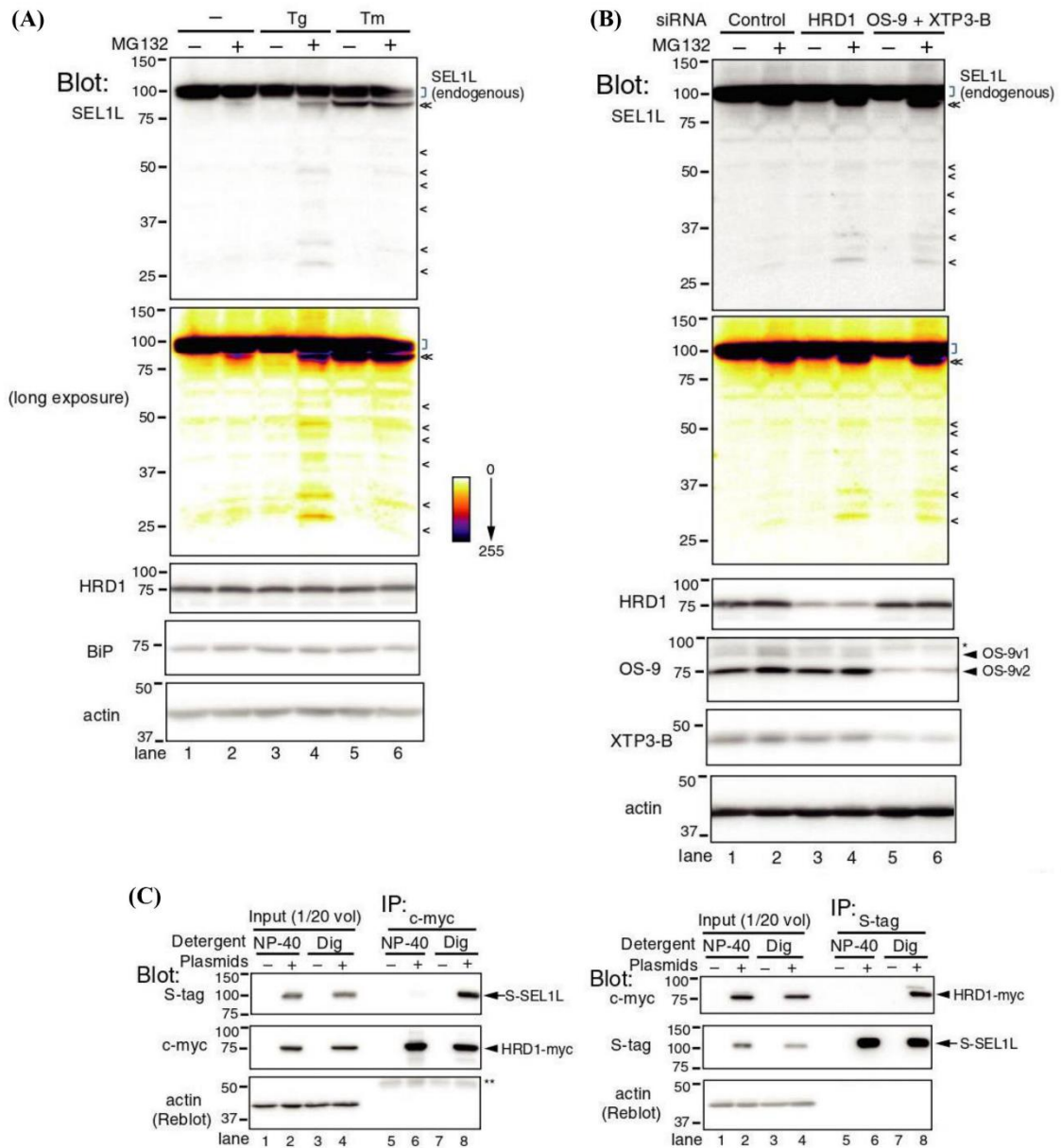
(I)HEK293 細胞に S-SEL1L、OS-9v2-HA をトランスフェクションし、培養した。細胞を 15 分間代謝ラベルし、特定の時間チェイスした。S タグ抗体、HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、SDS-PAGE で分離した。S-SEL1L、OS-9v2-HA のシグナルを検出し、チェイス 0 時間を基準としたシグナルの強さを定量化し、グラフにした。独立した 3 回の実験を行い、平均値と標準偏差を示した。S-SEL1L のみをトランスフェクションした結果と、S-SEL1L と OS-9v2-HA をトランスフェクションしたときの結果の有意差を両側 Student's t 検定によって検定した。*は $P<0.05$ 、**は、 $P<0.01$ を示す。

4-5 内在性の SEL1L は小胞体ストレス状況下で分解される

続いて、内在性の SEL1L はどのような条件下で分解が促進されるのかについて解析を行った。SEL1L の発現量は、小胞体ストレス(ER stress)下で増加する(Cattaneo *et al.* 2014)。そこで、小胞体ストレス下で、SEL1L の分解中間体がどのような挙動を示すのか解析した。HEK293 細胞に小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin(Ca^{2+} の取り込みに関与する SERCA の阻害剤)や tunicamycin(タンパク質の糖鎖修飾を阻害する)などをそれぞれ添加し、分解中間体の挙動を見た。その結果、小胞体ストレスを誘起しプロテアソーム阻害剤で SEL1L の分解を阻害すると、内在性 SEL1L の分解中間体のバンドを検出することができた(Fig.8A lane 4,6)。また、先行研究及び今回の解析から、HRD1 や OS-9、XTP3-B は SEL1L と複合体を形成して SEL1L を安定化させることが分かった(Iida *et al.*,2011)。これらの因子の欠乏は SEL1L を不安定化させると考えられる。内在性の HRD1 及び OS-9、XTP3-B をノックダウンしたところ SEL1L の分解中間体を検出することができた(Fig.8B lane 4,6)。これらの結果は、プラスミド上から発現した SEL1L は、内在性 SEL1L の挙動を反映していると考えられる。

今回解析に用いた SEL1L-HA や S-SEL1L が、HRD1-myc と複合体を形成し、内在性 SEL1L-HRD1 複合体と同様の機能を持つことを確認した。HRD1-myc と S-SEL1L の複合体の検出は界面活性剤に依存し、digitonin で可溶化した場合には、HRD1-myc と S-SEL1L の複合体の形成が確認されたが、NP-40 で可溶化した場合には検出できなかった(Fig.8C)(Christianson *et al.* 2008; Hosokawa and Wada. 2016)。また、SEL1L-HA や S-SEL1L が正しく膜に組み込まれて HRD1 と複合体を形成していることをアルカリ抽出法を用いて確認した (Fig.8D)。SEL1L-HA は、HRD1 と複合体を形成すると安定化し、その分解が抑制される(Hosokawa and Wada. 2016)。S-SEL1L についてもパルスチェイス法を用いて、解析した。その結果、単独で発現した S-SEL1L は速やかに分解されたが HRD1-myc と共に発現すると、S-SEL1L は安定化し分解が抑制された(Fig.8E)。また、先行研究により、HRD1-myc を単独で発現した時 NHK-QQQ の分解が抑制されるが、SEL1L-HA を共発現させると NHK-QQQ の分解が回復する (Hosokawa and Wada. 2016)。S-SEL1L についてもシクロヘキシミドチェイス法で NHK-QQQ の分解を観察した。HRD1-myc を単独で発現させた時は NHK-QQQ の分解が抑制されたが、S-SEL1L と共発現すると NHK-QQQ の分解が回復した(Fig.8F)。

以上の結果から、内在性 SEL1L タンパク質は小胞体環境下や結合パートナーである HRD1 や OS-9、XTP3-B が欠乏した場合には、分解されて、プロテアソームの機能を阻害すると分解中間体が検出されることが示された。



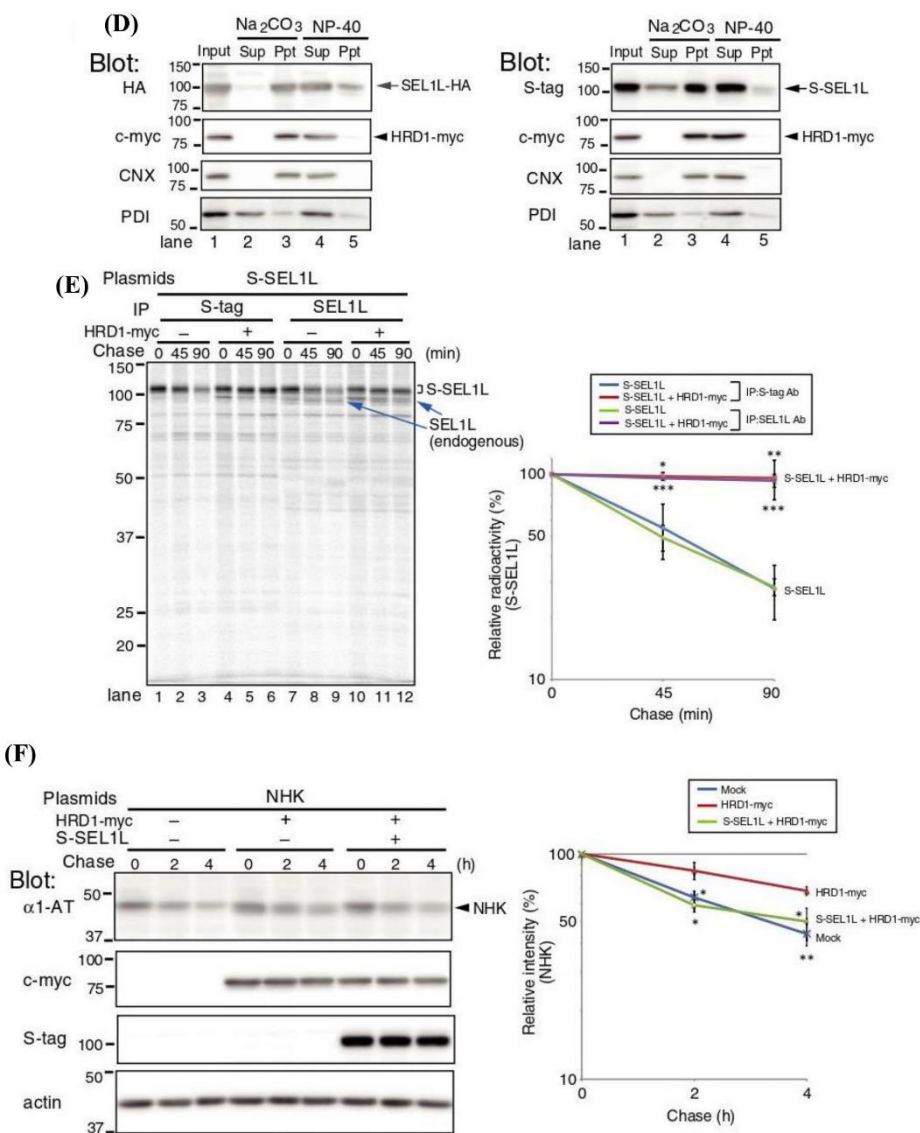


Fig.8 内在性 SEL1L の分解中間体は小胞体ストレス下で検出される

(A) HEK293 細胞を一定時間培養したのち、小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin (Tg) や tunicamycin (Tm) を添加した。添加後の細胞を一定時間培養したのち、1% NP-40 を含むバッファーで可溶化した。可溶性画分を SDS-PAGE で分離したのち、SEL1L 抗体を用いたウエスタンブロッティングで目的のバンドを検出した。SEL1L の分解中間体をより明瞭に検出するために、grayscale (上段) や imageJ の 'fire' (下段) を用いた。青の角括弧は内在性の SEL1L を示し、山括弧は、SEL1L の分解中間体を示す。

(B) HEK293 細胞に negative control siRNA 及び HRD1、OS-9、XTP3-B に特異的な siRNA をトランスフェクションした。細胞を一定時間培養したのち、MG132 を添加した。添加した細胞を培養したのち 1% NP-40 を含むバッファーで可溶化し

た。可溶性画分を SDS-PAGE で分離したのち、SEL1L 抗体を用いたウエスタンブロッティングで目的のバンドを検出した。SEL1L の分解中間体をより明瞭に検出するために、(A)と同様の解析を行った。青の角括弧は内在性の SEL1L を示し、山括弧は、SEL1L の分解中間体を示す。

(C)HEK293 細胞に S-SEL1L と HRD1-myc をトランスフェクションした。トランスフェクション後の細胞を一定時間培養した後、細胞を 1% NP-40(NP-40)あるいは 3% digitonin(Dig)で可溶化した。可溶化した細胞を c-myc 抗体(左)及び S タグ抗体(右)を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降後のサンプルを SDS-PAGE で分離したのち、S タグ抗体、c-myc 抗体、actin 抗体を用いたウエスタンブロッティングで目的のバンドを検出した。**は、使用した抗血清に含まれたマウス IgG を示す。

(D)HEK293 細胞に SEL1L-HA、S-SEL1L と HRD1-myc をトランスフェクションした。トランスフェクション後の細胞を一定時間培養した後、Fig.5D,E と同様にマイクロゾーム画分を分離した。0.1M Na₂CO₃ (alkaline solution)や 1% NP-40 を含んだバッファーを加え、インキュベーションした。サンプルを再び 100,000×g で超遠心し、上清(Sup)とペレット(Ppt)に分画した。サンプルを SDS-PAGE で分離したのち、HA 抗体(左)や及び S タグ抗体(右)、c-myc 抗体、CNX 抗体、PDI 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い目的のバンドを検出した。

(E)HEK293 細胞に S-SEL1L と HRD1-myc をトランスフェクションした。トランスフェクション後の細胞を一定時間培養した後、細胞を 15 分間代謝ラベルし、特定の時間チェイスした。S タグ抗体や SEL1L 抗体を用いて免疫沈降を行い、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離して、特定のシグナルを検出した。角括弧は S-SEL1L を、青の矢印は内在性の SEL1L を示す。S-SEL1L の細胞内残存量を定量化し、グラフに示した。独立した 3 回の実験を行い、平均値と標準偏差を示した。HRD1-myc をトランスフェクションした時の結果と HRD1-myc をトランスフェクションしていない時の結果との有意差を両側 Student's t 検定によって検定した。*は P<0.05、**は P<0.01、***は P<0.001 を示す。

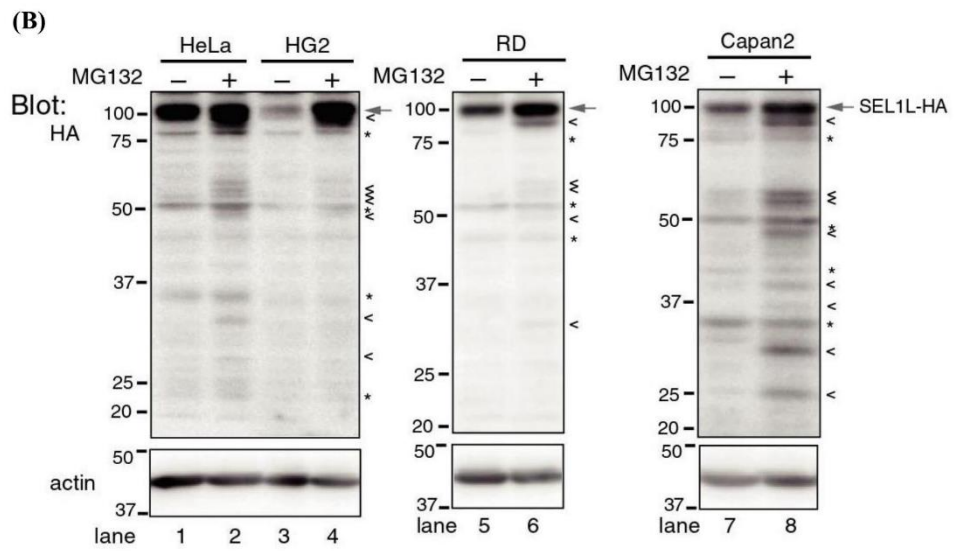
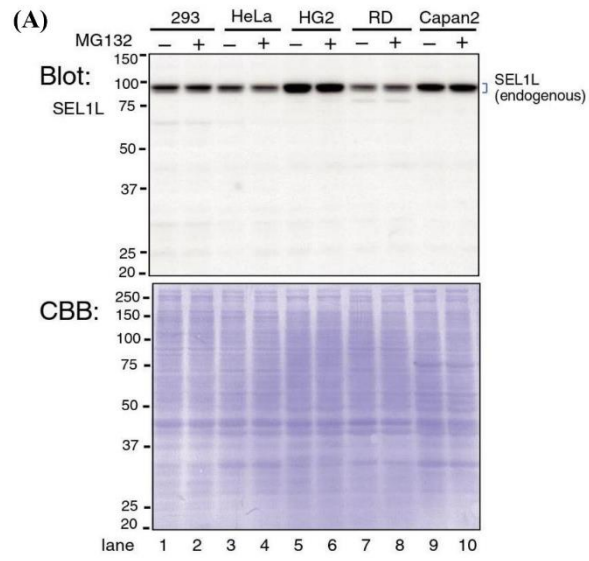
(F)HEK293 細胞に NHK、HRD1-myc 及び S-SEL1L をトランスフェクションした。細胞を一定時間培養したのち、シクロヘキシミドを添加し、所定の時間を培養した。1% NP-40 を含むバッファーで可溶化し、SDS-PAGE で分離した後、α1-AT 抗体を用いたウエスタンブロッティングで目的のバンドを検出した。NHK の細胞内残存量を定量化し、グラフに示した。NHK と HRD1-myc をトランスフェクションしたときに得られた結果とそれ以外の解析で得られた結果との有意差を両側 Student's t 検定によって検定した。*は P<0.05、**は P<0.01 を示す。

4-6 SEL1L の C 末端領域に存在するプロリンに富んだ領域が SEL1L の分解中間体の形成に必要である

SEL1L は、がんの進行に関与するという報告がなされている (Biunno *et al.* 2006)。そこで、様々ながん細胞における SEL1L の発現を解析した。用いた細胞は、HeLa(子宮頸がん)、HepG2(ヒト肝がん)、RD(横紋筋肉腫)、Capan2(すい臓がん)である。これらの細胞における内在性の SEL1L の発現量を解析した結果、細胞種によって発現量が異なっていた (Fig.9A)。また、プロテアソーム阻害剤による発現量の増加も観察されなかった (Fig.9A)。しかしながら、プラスミド上から SEL1L-HA を発現させたとき、すべての細胞属で分解中間体が検出された (Fig.9B)。

SEL1L 内の領域で分解中間体の形成に重要な領域を同定しようと試みた。SEL1L の C 末端側にはプロリン残基に富む領域があり、この領域には 2 個のアルギニン残基が含まれている (Biunno *et al.* 2006)。プロリンやアルギニンに富んだポリペプチドはプロテアソームと相互作用し、その機能を阻害する (Anbanandam *et al.* 2008)。そこで、SEL1L のこのプロリンに富んだ領域が SEL1L の分解中間体の形成に関わる可能性を考えた。この領域を欠損させた variant SEL1L- Δ PR-HA を作成し、解析を行った。すると、分解中間体の形成が確認され (Fig.9C)、SEL1L- Δ PR-HA の分解中間体は、対応する SEL1L-HA から生じる分解中間体よりも移動度が速かった。この結果は、SEL1L の切断は同じところで起こっていることを示している。しかしながら、SEL1L- Δ PR-HA の分解中間体は、野生型 SEL1L と比較し分解中間体のシグナルが弱かった。続いて、SEL1L- Δ PR-HA の安定性をパルスチェイス法を用いて解析した。その結果、SEL1L- Δ PR-HA は、SEL1L-HA よりもさらに速く分解されることが分かった (Fig.9D)。この結果は、SEL1L のプロリン残基に富んだ領域は、SEL1L の安定性に関係していることを示している。また、NHK-QQQ の分解における SEL1L- Δ PR-HA の影響を解析した。SEL1L-HA をトランスフェクションした細胞と比較して SEL1L- Δ PR-HA をトランスフェクションした細胞では、NHK-QQQ が速やかに分解された (Fig.9D)。これらの結果は、SEL1L の分解されやすさと ERAD 基質の分解の促進との正の関連性を示唆している。

これらの結果から、SEL1L の C 末端側に存在するプロリン残基に富んだ領域は、SEL1L の分解中間体の形成、そして、ERAD の調節に重要であることが示された。



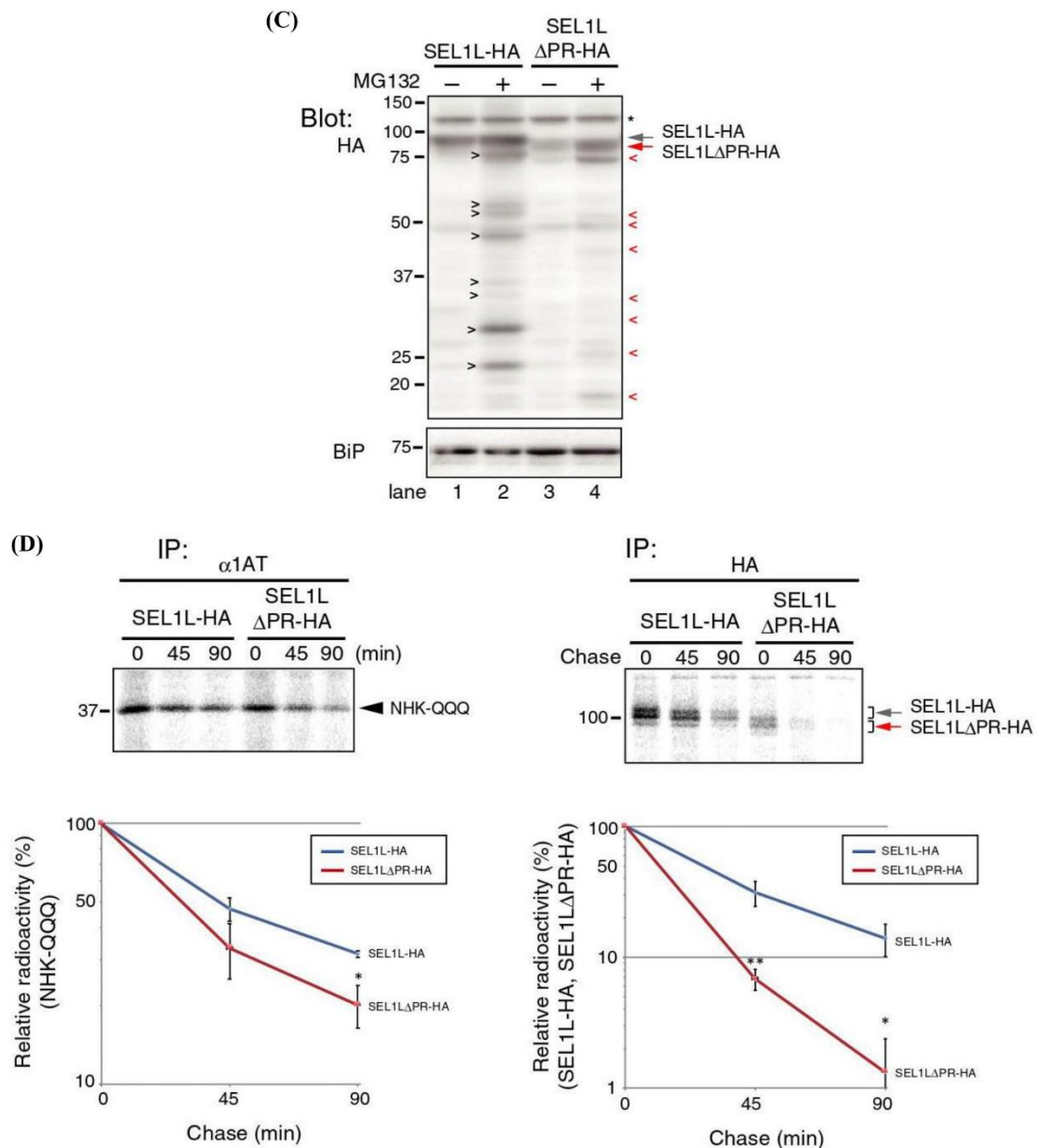


Fig.9 SEL1L のプロリンに富んだ領域は、SEL1L の分解中間体の形成に関与する

(A) HEK293 細胞、HeLa 細胞、HG2 細胞、RD 細胞、Capan2 細胞を一定時間培養したのち、抽出し、各レーン 40 μ g の細胞抽出液を泳動した。特定のシグナルを SEL1L 抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した(上段)。同じ membrane を CBB(Coomassie Brilliant Blue)染色した。青の角括弧は内在性の SEL1L を示す。

(B) HeLa 細胞、HG2 細胞、RD 細胞、Capan2 細胞に SEL1L-HA をトランスフェクションし、一定時間培養後 MG132 を添加し、さらに培養した。培養後の細胞

からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE で分離後、HA 抗体を用いたウエスタンブロットティングで目的のバンドを検出した。青の矢印は、全長の SEL1L-HA を示す。山括弧は、SEL1L の分解中間体を示す。*は、抗体によって検出された非特異的なバンドを示す。

(C)HEK293 細胞に SEL1L-HA、SEL1L Δ PR-HA をそれぞれトランスフェクションし、一定時間培養後、MG132 を添加した。細胞からタンパク質を抽出し SDS-PAGE で分離した。HA 抗体を用いたウエスタンブロットティングで目的のバンドを検出した。黒の矢印は全長の SEL1L-HA を赤の矢印は全長の SEL1L Δ PR-HA を示す。黒、赤の山括弧は、それぞれ SEL1L-HA、SEL1L Δ PR-HA の分解中間体を示す。*は、抗体によって検出された非特異的なバンドを示す。

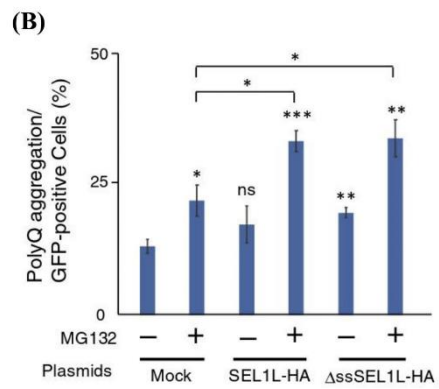
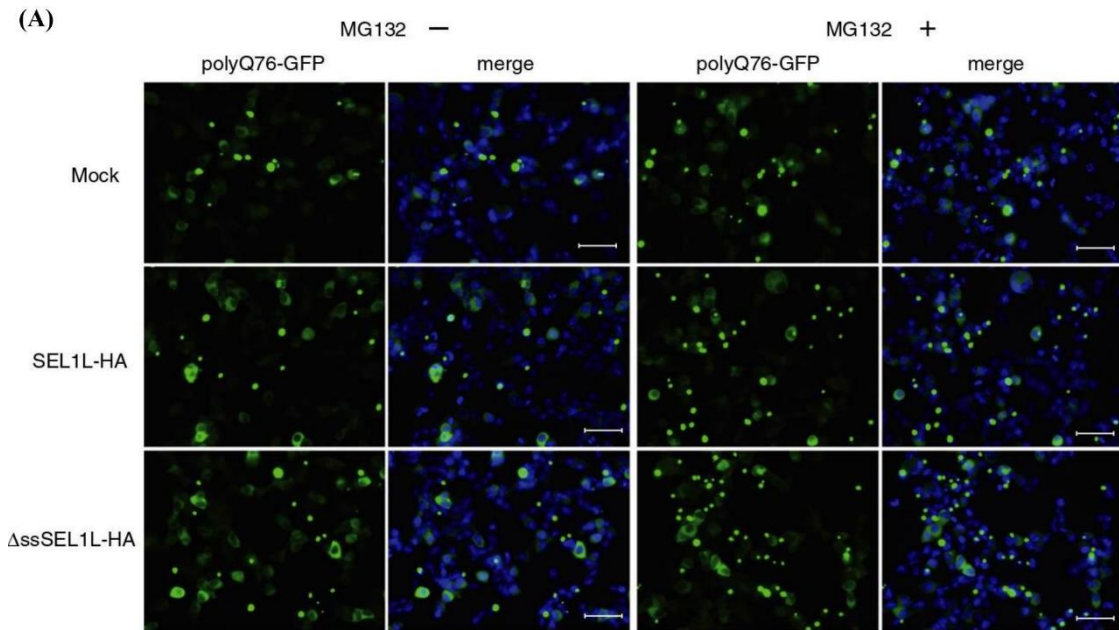
(D)(左)HEK293 細胞に NHK-QQQ、SEL1L-HA もしくは SEL1L Δ PR-HA をトランスフェクションした。一定時間培養した後、15 分間代謝ラベルし、特定の時間チェイスした。 α 1-AT 抗体を用いて免疫沈降を行い、そのサンプルを SDS-PAGE で分離し、シグナルを検出した。NHK-QQQ の細胞内残存量を定量化し、グラフに示した。独立した 3 回の実験を行い、平均値と標準偏差を示した。SEL1L-HA をトランスフェクションした結果と SEL1L Δ PR-HA をトランスフェクションした結果の有意差を両側 Student's t 検定によって検定した。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を示す。

(右) HEK293 細胞に SEL1L-HA もしくは SEL1L Δ PR-HA をトランスフェクションした。一定時間培養した後、15 分間代謝ラベルし、特定の時間チェイスした。HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、そのサンプルを SDS-PAGE で分離し、シグナルを検出した。SEL1L-HA、SEL1L Δ PR-HA それぞれの細胞内残存量を定量化し、グラフに示した。独立した 3 回の実験を行い、平均値と標準偏差を示した。SEL1L-HA をトランスフェクションした結果と SEL1L Δ PR-HA をトランスフェクションした結果の有意差を両側 Student's t 検定によって検定した。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を示す。

4-7 SEL1L の分解中間体は細胞質での polyQ 凝集体形成を促進する

続いて、細胞質における SEL1L の分解中間体が細胞機能においてどのような影響を及ぼすかについて解析した。SEL1L には 11 個の SLR(Sell-Like Repeat)領域が存在している(Fig.4A)。SLR 領域はタンパク質間の相互作用に重要な TPR(Tetratrico Peptide Repeat)領域と似ている。そこで、細胞質に蓄積した SEL1L の分解中間体がミスフォールドしたタンパク質と相互作用する可能性を考えた。ポリグルタミンタンパク質は、ハンチントン病や、その他の神経変性疾患に関与する病原性のペプチドである。このタンパク質は、細胞質や核内において大きな凝集体を形成する(Lieberman *et al.*,2019; Orr and Zoghbi 2007)。ポリグルタミンタンパク質に対する SEL1L の分解中間体の効果を調べるために Htt-polyQ76-GFP を用いた。ハンチンチンタンパク質はポリグルタミン鎖長が 35 以上になると細胞質に凝集体を形成し、ハンチントン病を引き起こすことが知られている。Htt-polyQ76-GFP は凝集体形成のモデルタンパク質である Htt-polyQ76 の C 末端に緑色蛍光タンパク質(EGFP)と FLAG タグを持つタンパク質である(Kim *et al.* 2002)。Htt-polyQ76-GFP と SEL1L を HEK293 細胞にトランスフェクションし、プロテアソーム阻害剤で SEL1L の分解を阻害し Htt-polyQ76-GFP 凝集体形成を解析した。すると、SEL1L-HA をトランスフェクションしたときの方が SEL1L-HA をトランスフェクションしていないときと比較して、Htt-polyQ76-GFP 凝集体形成の割合が著しく増加した(Fig.10A,B)。また、同様の解析を Δ ssSEL1L-HA でも行ったところ、 Δ ssSEL1L-HA をトランスフェクションしたときの方が Δ ssSEL1L-HA をトランスフェクションしていないときと比較して、Htt-polyQ76-GFP 凝集体形成の割合が増加した(Fig.10A,B)。これらの結果は、SEL1L の分解中間体は細胞質における polyQ 凝集体形成を促進していることを示している。

また、SEL1L の局在を免疫蛍光細胞染色法で解析した。SEL1L-HA を HeLa 細胞にトランスフェクションし、プロテアソーム阻害剤存在下、非存在下における局在を解析した。プロテアソーム阻害剤非存在下においては、SEL1L-HA は小胞体マーカーである calreticulin(CRT)と共局在したが、細胞質マーカーである HSC/HSP70 とは共局在しなかった。しかしながら、プロテアソーム阻害剤存在下においては、SEL1L-HA は CRT と共局在しているばかりでなく、HSC/HSP70 と共局在をしていた(Fig.10C)。この結果は、細胞分画の結果と同様に SEL1L の分解中間体が細胞質に蓄積していることを示している。小胞体にターゲットされず細胞質にとどまる Δ ssSEL1L-HA は、CRT とは共局在せず、HSC/HSP70 と共局在した(Fig.10C)。



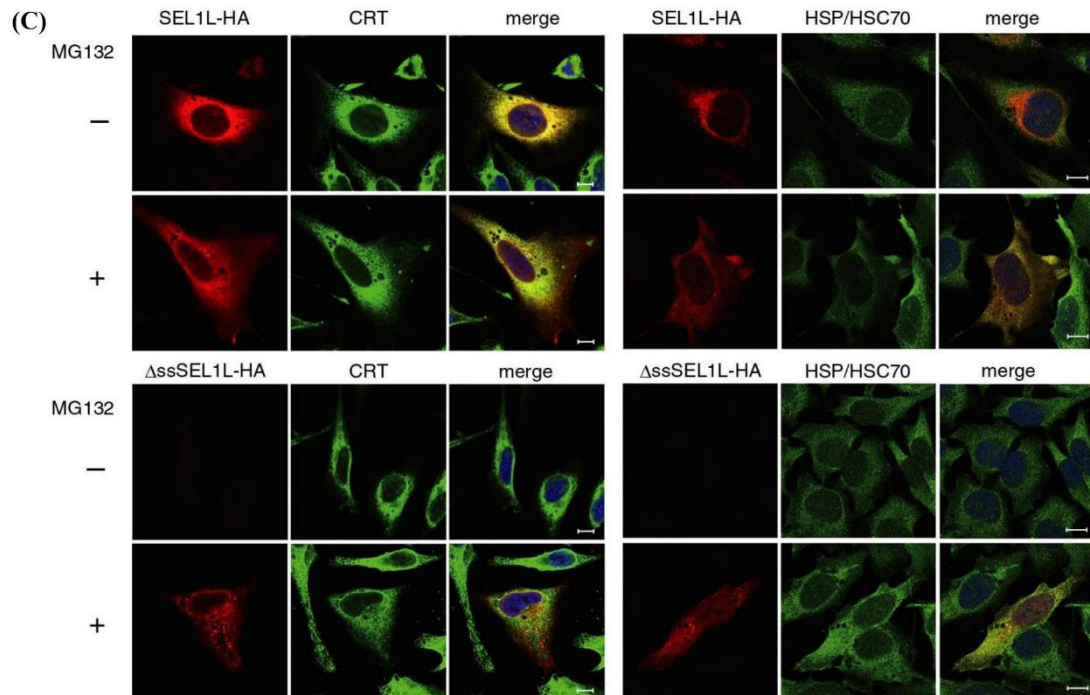


Fig.10 SEL1L は、Htt-polyQ76-GFP の凝集体形成を促進する

(A)HEK293 細胞に Htt-polyQ76-GFP と SEL1L-HA もしくは Δ ssSEL1L-HA をトランスフェクションし、24 時間培養した。Hoechst 33342 で核を染色し、蛍光顕微鏡で Htt-polyQ76-GFP を観察した。MG132 は、蛍光顕微鏡で観察する 6 時間前に添加した。Scale bar は 50 μ m を示す。

(B)(A)の実験結果から Htt-polyQ76-GFP 凝集体の数を数え、Htt-polyQ76-GFP がトランスフェクションされている細胞(約 300~500 個)に対する凝集体形成細胞の割合を求め、グラフにした。独立した 3 回の実験を行い、平均値と標準偏差を示した。Htt-polyQ76-GFP のみをトランスフェクションした細胞から得られた結果と SEL1L-HA をトランスフェクションした細胞から得られた結果、もしくは Δ ssSEL1L-HA をトランスフェクションした細胞から得られた結果の有意差を両側 Student's t 検定によって検定した。n.s.は not significant($P>0.05$)、*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ 、***は $P<0.001$ を示す。

(C)Hela 細胞に、SEL1L-HA、 Δ ssSEL1L-HA をそれぞれトランスフェクションし、一定時間培養後、MG132 を添加した。その後、細胞を固定し染色した。左側は、HA 抗体と CRT(小胞体マーカー)で染色した結果を、右側は、HA 抗体と HSP/HSC70(細胞質マーカー)抗体で染色した結果を示す。SEL1L-HA と Δ ssSEL1L-HA は Alexa Fluor 594 によって可視化し、CRT と HSP/HSC70 は Alexa Fluor 488 によって可視化した。scale bar は 10 μ m を示す。

4-8 SEL1L の分解中間体は、細胞質における polyQ 凝集体と結合する

SEL1L の分解中間体が Htt-polyQ76-GFP 凝集体形成促進にどのように関連しているのかを調べるために、まず、両者が共局在するかどうかについて検討した。HEK293 細胞に Htt-polyQ76-GFP と SEL1L-HA をトランスフェクションした細胞を用意し、免疫染色を行った。プロテアソーム阻害剤非存在下では、polyQ の大きな凝集体は小胞体外で観察された(Fig.11A) (凝集体が確認された 86 個の細胞のうち 80%以上の細胞)。一方、プロテアソーム阻害剤を添加した時、凝集体の観察された 94 個の細胞のうち 95%以上の細胞において、SEL1L の分解中間体は polyQ の凝集体をリング状に取り囲むように存在していた(Fig.11B)。これは細胞質シャペロンである Hsp70 や、TATA ボックス結合タンパク質 CREB 結合タンパク質に代表される転写調節因子が polyQ 凝集体を取り囲む様子に似ていた (Kim *et al.* 2002; Matsumoto *et al.* 2006) 。細胞質に発現する Δ ssSEL1L-HA を用いて同様の解析を行ったところ、凝集体が確認された 118 個の細胞のうち 70%以上において、同様のリング状の染色像が観察された (Fig.11C) 。また、15%位の細胞においては、 Δ ssSEL1L-HA と polyQ が完全に共局在していた (Fig.11C) 。

HeLa 細胞においても同様の解析を行った。その結果、polyQ 凝集体と SEL1L-HA を発現している 62 個の細胞のうち 90%以上の細胞でリング状の染色像が観察された。また、 Δ ssSEL1L-HA を発現している 92 個の細胞のうち 50%以上の細胞で、リング状の様式が観察された。20%以上の細胞においては、両者は完全に共局在していた(Fig.11D)。

polyQ23-GFP は、ポリグルタミン鎖が短く、通常は細胞内凝集体を形成しない。しかし、SEL1L-HA や Δ ssSEL1L-HA をトランスフェクションしたとき、少ないながらも大きな凝集体が観察される細胞もあった。SEL1L の分解中間体は、polyQ23-GFP をリング状に取り囲むものもあれば、polyQ23-GFP と共局在するものもあった(Fig.11E,F)。また、polyQ23-GFP の凝集体は、Htt-polyQ76-GFP の凝集体とは異なり、スポンジ状の比較的穏やかな凝集体であった。

これらの結果から、SEL1L の分解中間体は凝集傾向をもつタンパク質である Htt-polyQ76-GFP や通常は凝集体を形成しにくい polyQ23-GFP に対しても結合し、凝集体の形成を引き起こしていることが明らかになった。

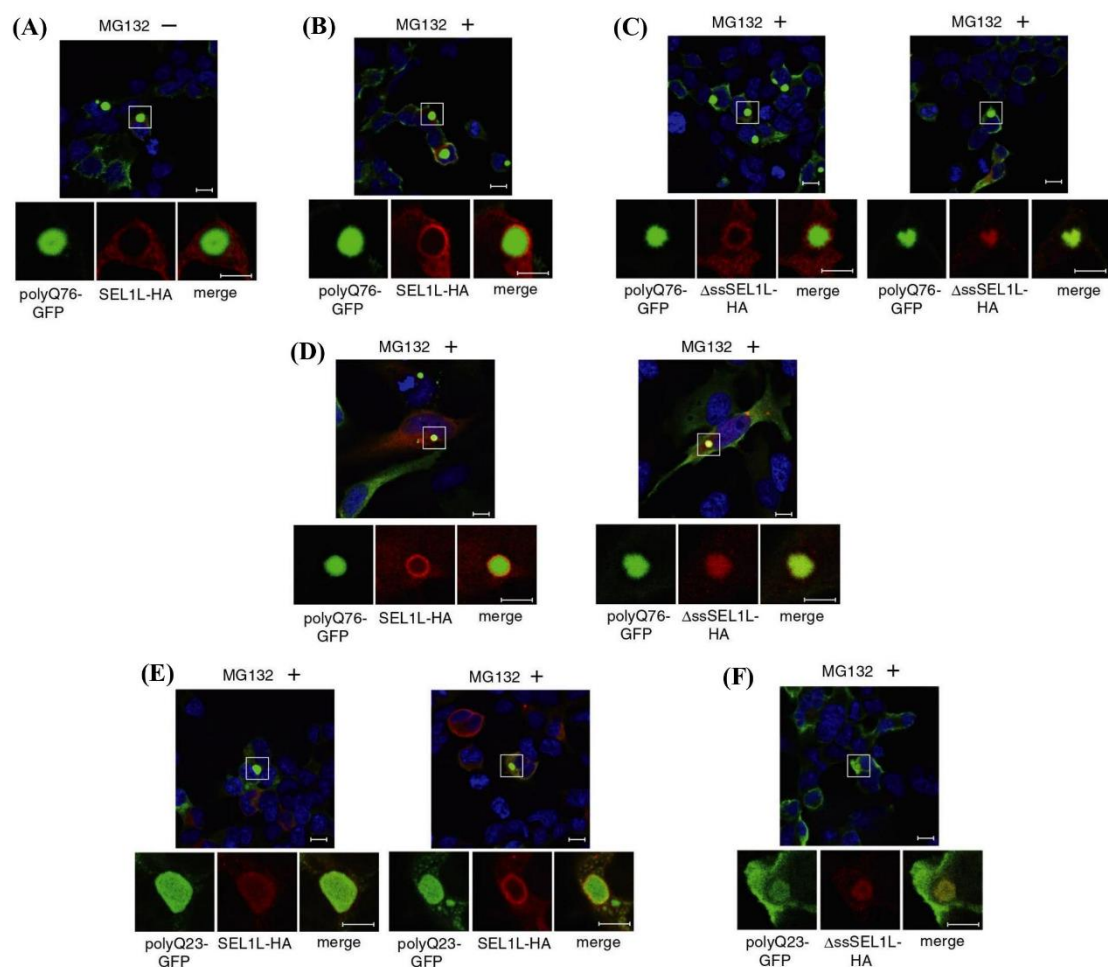


Fig.11 polyQ 凝集体の免疫細胞染色

(A) HEK293 細胞に Htt-polyQ76-GFP と SEL1L-HA をトランスフェクションし、培養した。培養後の細胞を固定し、HA 抗体と GFP 抗体を用いて染色した。HA 抗体は Alexa Fluor 596 で GFP 抗体は Alexa fluor 488 で可視化し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。scale bar は上段が 10 μ m、下段が 5 μ m を示す。核は DAPI で染色した。

(B) (A) と同様の解析を MG132 添加の条件で行った。MG132 は、細胞を固定する 6 時間前に添加した。

(C) (B) と同様の解析を Δ ssSEL1L-HA を用いて行った。

(D) (B, C) と同様の解析を HeLa 細胞で行った。

(E) (B) と同様の解析を Htt-polyQ23-GFP で行った。

(F) (E) と同様の解析を Δ ssSEL1L-HA を用いて行った。

4-9 SEL1L の SLR 領域が polyQ 凝集体形成を促進する

最後に、SEL1L のどの領域が polyQ 凝集体形成に重要なのかを解析した。タンパク質間の相互作用を担う SLR 領域が重要ではないのかと考え解析を行った。SEL1L の 5 番目から 9 番目の SLR 領域は、結晶構造が解析されている(Jeong *et al.* 2016)。そこで、この領域のみを発現するプラスミド(SEL1L-R5-9-HA)を作製し、polyQ 凝集体形成に及ぼす影響を調べた。その結果、SEL1L-R5-9-HA を発現させると、polyQ 凝集体形成が促進された(Fig.12A,B)。また、免疫染色を行うと、polyQ 凝集体をリング状に取り囲む像が観察された (Fig.12C)。

続いて、Filter-Trap-Assay を用いて polyQ 凝集体の形成を確認した。凝集体を形成しない polyQ23-GFP のみをトランスフェクションした細胞においては、凝集体の蓄積は観察されなかった。しかしながら、Htt-polyQ76-GFP と SEL1L-HA をトランスフェクションした細胞においては、凝集体が形成され、プロテアソーム阻害剤を加えると、より凝集体形成が促進された(Fig.12D)。また、 Δ ssSEL1L-HA や SEL1L-R5-9-HA を Htt-polyQ76-GFP とトランスフェクションした細胞において同様の解析を行ったところ、これらの SEL1L の variants は、Htt-polyQ76-GFP の凝集体形成を促進していた(Fig.12D)。

これらの結果から、SEL1L の SLR 領域が polyQ の凝集体形成の促進に重要であることが示唆された。

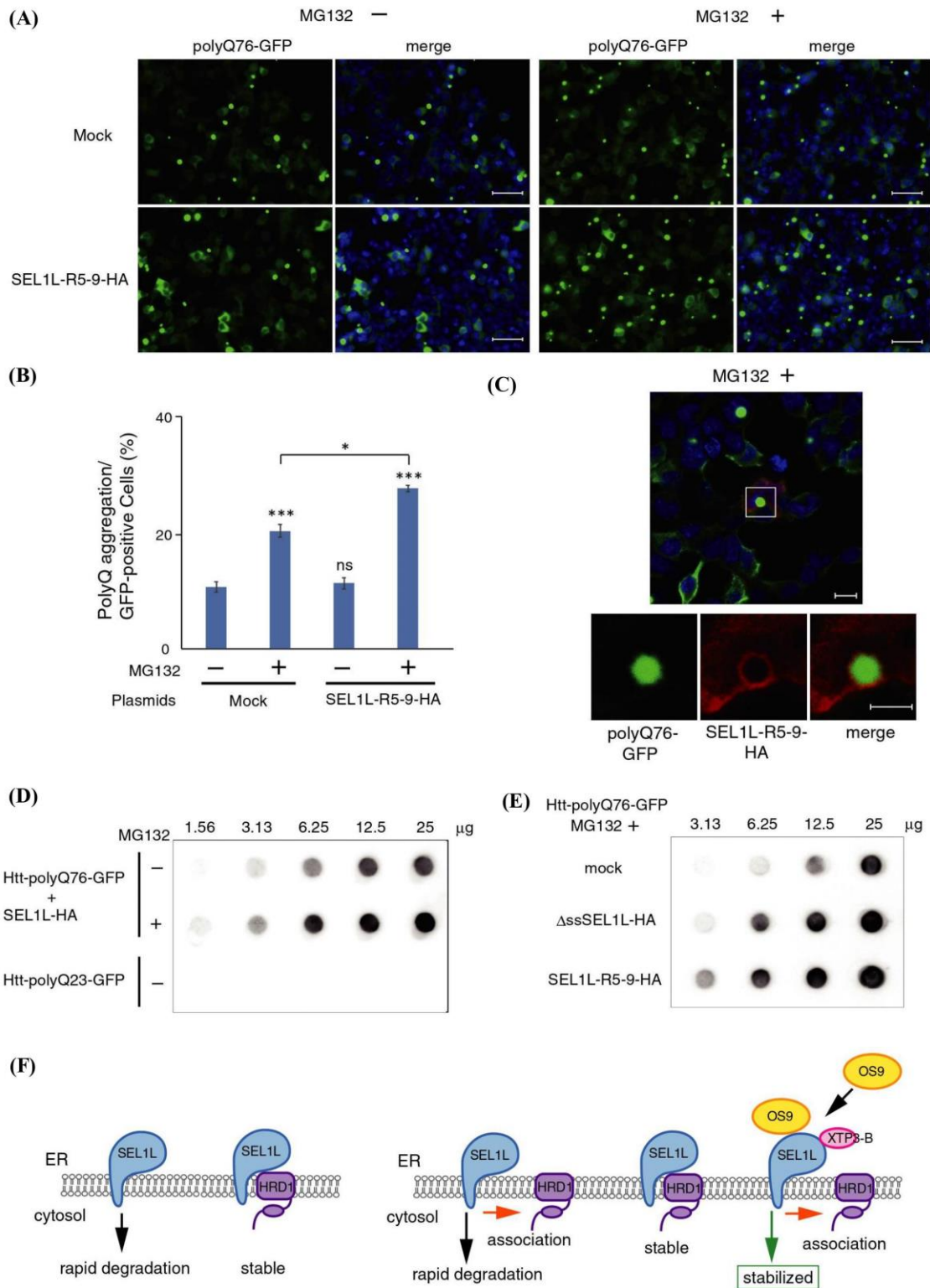


Fig.12 SEL1L repeat 領域は細胞質における polyQ 凝集体形成を促進する
 (A) HEK293 細胞に Htt-polyQ76-GFP と SEL1L-R5-9-HA をトランスフェクションし、24 時間培養した。Hoechst 33342 で核を染色し、蛍光顕微鏡で Htt-polyQ76-

GFP を観察した。MG132 は、蛍光顕微鏡で観察する 6 時間前に添加した。Scale bar は 50 μ m を示す。

(B) (A)の実験結果から Htt-polyQ76-GFP の凝集体の数を数え、Htt-polyQ76-GFP を発現している細胞に対する凝集体形成細胞の割合を求め、グラフにした。独立した 3 回の実験を行い、平均値と標準偏差を示した。Htt-polyQ76-GFP のみをトランスフェクションした細胞と Htt-polyQ76-GFP と SEL1L-R5-9-HA をトランスフェクションした細胞を比較し有意差を両側 Student's t 検定によって検定した。n.s.は not significant($P>0.05$)、*は $P<0.05$ 、***は $P<0.001$ を示す。

(C) HEK293 細胞に Htt-polyQ76-GFP と SEL1L-R5-9-HA をトランスフェクションして培養した。MG132 を添加し、さらに培養した。培養後の細胞を固定し、HA 抗体と GFP 抗体を用いて染色した。HA 抗体は Alexa Fluor 596 で GFP 抗体は Alexa fluor 488 で可視化し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。scale bar は上段が 10 μ m、下段が 5 μ m を示す。核は DAPI で染色した。

(D)HEK293 細胞に Htt-polyQ76-GFP と SEL1L- HA をトランスフェクション、もしくは、Htt-polyQ23-GFP のみをトランスフェクションした。トランスフェクション後の細胞を一定時間培養し、MG132 を添加し、さらに培養した。培養後の細胞を回収し、細胞抽出液を段階希釈して Filter-trap assay に用いた。

(E) HEK293 細胞に Htt-polyQ76-GFP と Δ ssSEL1L-HA もしくは SEL1L-R5-9-HA をトランスフェクションし (D)と同様の解析を行った。

(F)SEL1L-HRD1 複合体の模式図。以前の解析から、HRD1 と複合体を形成できなかった SEL1L は、非常に不安定でユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが明らかになった。今回 ER レクチンである OS-9 や XTP3-B も SEL1L の安定性を担保する細胞内因子であることが明らかになった。また、SEL1L とレクチンの複合体は、ER 膜内をより自由に移動して、ミスフォールドした基質を回収し、HRD1 と結合することによって基質を逆行輸送している可能性も考えられる。

5. 考察

5-1 SEL1L の分解中間体は細胞質で検出される

今回、SEL1L の分解について様々な情報を得ることができた。先行研究より、SEL1L の分解をプロテアソーム阻害剤で阻害すると分解中間体が形成されることが明らかになった (Iida *et al.* 2011)。今回の解析によってこの分解中間体は主に細胞質で検出されることが示された (Fig.5,6,10C)。一般的には、プロテアソーム阻害剤で ERAD を阻害したとしても、分解中間体の蓄積は観察されない。しかしながら、SEL1L はそのような一般的な基質と異なり細胞質に分解中間体が検出された。分解中間体が細胞質で検出される SEL1L 以外の基質が存在するのには興味深い課題である。

小胞体ストレスを誘起することや SEL1L に結合する OS-9 や XTP3-B、HRD1 をロックダウンすることによって、内在性の SEL1L の分解中間体が検出できた (Fig.8A,B)。この結果は、ER 膜タンパク質である HRD1 や ER レクチンである OS-9、XTP3-B と複合体を形成できなかった SEL1L は分解され、そして分解中間体を形成することを示している (Fig.13)。小胞体ストレスを誘起することによって SEL1L が分解されるのかについては、今後解析が必要である。

SEL1L は、膜貫通領域に親水性のアミノ酸や helix breaker として知られているグリシンやプロリンが存在している (LGPEWDL~~Y~~LMTH~~I~~ALLLGT~~V~~I 赤字が親水性アミノ酸、緑字が helix breaker アミノ酸)。SEL1L の膜貫通領域が、SEL1L の分解中間体の形成に重要なことが示唆された (Fig.4C)。これらの残基が SEL1L の安定性については ERAD の調節に影響を与えている可能性が考えられる。今後の解析で、膜貫通領域のどのアミノ酸が重要なのか、解析していきたい。

5-2 SEL1L は小胞体から細胞質側に引っ張り出されたのち切断される

SEL1L の分解中間体は細胞質側で検出された。分解中間体はどこで形成されるのであろうか。まず、SEL1L の分解中間体は、SEL1L が小胞体に輸送された後に、逆行輸送されて生成することを確認した。全長の SEL1L は、ジスルフィド結合を有しており、また、糖鎖型であった。一方、SEL1L の分解中間体はジスルフィド結合が存在しておらず、N 結合型糖鎖が除去された脱糖鎖型であった (Fig.6A,C,D)。これらの結果から、全長の SEL1L は、一旦小胞体に輸送されることが示された。次に、SEL1L の分解中間体は小胞体内腔で切断された後に細胞質に引き出されたのか、全長の SEL1L が細胞質に引き出された後に切断されたのかについて検討した。ロンボイドプロテアーゼが膜タンパク質を切断して ERAD による分解に関わることも報告されている (Fleig *et al.* 2012)。今回、基

質の細胞質への引っ張り出しに関与する細胞内因子である p97 の機能を阻害した時、SEL1L の分解中間体は検出できなかった(Fig.6E)。この結果は、SEL1L の分解中間体は小胞体内で切断された後に細胞質に逆行輸送されたのではなく、細胞質に逆行輸送された後に切断されたことを示している。

5-3 ER レクチンである OS-9 や XTP3-B は SEL1L の安定化に寄与する

HRD1 は、SEL1L と膜貫通領域で結合して SEL1L を安定化させる(Iida *et al.* 2011; Hosokawa and Wada. 2016)。今回の解析によって、ER レクチンである OS-9 や XTP3-B も SEL1L を安定化させることが分かった(Fig.7)。OS-9 あるいは XTP3-B のいずれかを共発現させると SEL1L の分解中間体の形成は抑制された(Fig.7A)。一方、XTP3-B を単独でノックダウンしたときに SEL1L の不安定化は観察されなかったが、OS-9 と XTP3-B の両方をノックダウンすると、OS-9 単独でノックダウンするよりも SEL1L が不安定になった。これらの結果は、XTP3-B も SEL1L の安定性を担保する因子であることを示している。XTP3-B を単独でノックダウンしたときに SEL1L の安定性に変化が確認されなかった原因は、おそらく XTP3-B をノックダウンしたときに相補的なメカニズムで OS-9 の発現が誘導されたことが原因であろうと考えられる。当研究室よりも先に van der Goot らは、CRISPR/Cas9 でこれらの ER レクチンをノックアウトしたときの SEL1L の安定性について解析をした(van der Goot *et al.* 2018)。その結果、OS-9、XTP3-B それぞれを単独でノックアウトした時 SEL1L の安定性に影響を与えなかったが、両者をノックアウトした時には SEL1L は不安定になった。この結果は、我々の結果と異なっている。相違の原因は、我々の解析は siRNA を用いた一過性のノックダウンの系であるが、彼らは CRISPR/Cas9 でのノックアウトの系であり、何らかの相補機構が働いた可能性が考えられる。

SEL1L のみを過剰発現させると NHK-QQQ などの ERAD 基質の分解が促進される。SEL1L と OS-9 を共発現した際 NHK-QQQ の分解は、コントロールレベルに抑制された(Fig.8H)。この結果は、SEL1L が安定化すると、ERAD が抑制されるというこれまでの結果と一致している(Iida *et al.* 2011; Hosokawa and Wada. 2016)。

OS-9 や XTP3-B が、SEL1L と複合体を形成し、SEL1L を安定化させた本研究の結果から、SEL1L と OS-9 や XTP3-B などのレクチンの複合体は、小胞体膜内をより自由に移動して、ミスフォールドした基質を回収し、HRD1 と結合することによって基質を逆行輸送している可能性も示唆された(Fig.12F)。

5-4 SEL1L のプロリンに富む領域は、SEL1L の分解中間体の形成に関与する

SEL1L の分解中間体の形成に重要な SEL1L 内の領域を解析した結果、SEL1L の C 末端側に存在しているプロリンに富む領域の重要性が示唆された(Fig.9C,D)。プロリンに富むペプチドは、プロテアソームの機能を阻害することが報告されている(Anbanandam *et al.* 2008)。SEL1L は、このプロリンに富む領域の存在のおかげで速やかな分解を免れているのではないだろうか。しかしながら、単独で発現した野生型 SEL1L も十分速やかに分解されている。先述したように、SEL1L の膜貫通領域は、非常に特殊なアミノ酸配列である。この特殊性が、SEL1L の細胞質への引っ張られやすさ、ひいては安定性に関与しているのかもしれない。また、SEL1L-ΔPR-HA を発現している細胞は、SEL1L-HA を発現している細胞よりも速やかに ERAD 基質である NHK-QQQ を分解した(Fig.9D)。この結果は、SEL1L の分解されやすさは、ERAD と関連があるという今までの結果を支持している。

ERAD に関わる E2 である UBC6e をノックアウトすると、精子の形成不全が起こることが報告されている(Koenig *et al.* 2014)。Hagiwara らは、この原因は、UBC6e をノックアウトしたことにより SEL1L や EDEM などの ERAD enhancer の分解が抑制されたことが原因であると報告している(Hagiwara *et al.* 2016)。UBC6e を欠損した細胞は、ERAD が活性化してしまい、本来分解されるべきではないタンパク質まで分解してしまう。その結果、精子形成に重要なタンパク質まで ERAD で分解してしまい、精子形成に不全が生じたのではないのかと、Hagiwara らは考察している。これらの結果は、行き過ぎた ERAD は、細胞にとって有害であることを示している。今回、SEL1L のプロリンに富んだ領域を欠損させると、ERAD が促進された(Fig.9D)。SEL1L のプロリンリッチドメインも、行き過ぎた ERAD を抑制している重要な領域ではないであろうかと考えられる。今回の解析によって、SEL1L が不安定になるほど ERAD が促進することが明らかになった。この結果は、Hagiwara らの結果と逆である。この相違については、UBC6e をノックアウトしたときの SEL1L の局在や分解中間体を解析することなどで明らかにしていきたい。

5-5 SEL1L の分解中間体は aggregation-prone なタンパク質である polyQ76-GFP の凝集体形成を促進する

SEL1L の分解中間体の細胞質での役割を解析した。その結果、SEL1L の分解中間体は、伸長したポリグルタミン鎖をもつタンパク質 polyQ76-GFP の凝集体形成を促進することが示された(Fig.10, Fig.12, Fig.13)。また、観察されたほとんどの polyQ76-GFP の凝集体において、SEL1L の分解中間体は polyQ76-GFP の凝集

体の周りを取り囲むように存在していた(Fig.11A,B)。一般的には凝集体を形成しない polyQ23-GFP においても少ないながらも凝集体が確認された(Fig.11E,F)。

ポリグルタミンタンパク質の凝集体形成を促進する SEL1L の部位を同定しようと試みた(Fig.12)。SEL1L は lumen 側に特徴的な Sel1-Like Repeat(SLR)領域を持つ。この領域は、タンパク質間の相互作用に関与すると言われていた TPR モチーフとよく似ている。この領域が、凝集体と相互作用することで凝集体の形成に関与しているのではないのかと考えた。SEL1L には、11 個の SLR 領域が存在している。5 番目から 9 番目までは結晶構造が定まっている(Jeong *et al.* 2016)。そこでこの領域のみをプラスミド上に構築し(SEL1L-R5-9)、凝集体形成に対する影響を解析した。その結果、polyQ76-GFP の凝集体形成の促進が観察された(Fig.12A,B,C,D, Fig.13)ことから、SEL1L の SLR 領域が凝集体の形成に重要であることが示された。

今回、SEL1L の分解中間体が aggregation-prone なタンパク質であるポリグルタミンタンパク質の凝集体形成を促進することを見出したが、凝集体形成を促進することで細胞にどのような影響を与えているのかは不明である。ポリグルタミンタンパク質は、ERAD において基質の引っ張り出しに関与する p97 やプロテアソームを阻害することで、ERAD を阻害している(Hirabayashi *et al.* 2001)。SEL1L の分解中間体が、ポリグルタミンタンパク質が引き起こす ERAD の不全に対してどのような影響を与えるのかを解析することは、SEL1L の細胞質での役割の解明に非常に重要であろう。

ハンチントン病は、ポリグルタミンタンパク質が凝集体を形成することが特徴である(Li *et al.* 2000)。凝集体が毒性を持ち、細胞に悪影響を与えていると考えられてきたが、近年の解析などから、凝集体自体にも毒性はあるが、凝集体を形成する前の可溶性の高い中間体の方が凝集体自体よりも毒性が高いとも報告されている(Leitman *et al.* 2013)。SEL1L は、凝集体の形成を促進することで aggregation-prone なタンパク質が引き起こす毒性を低減している可能性も考えられる。それとも SEL1L が凝集体の形成を促進することで細胞毒性を引き起こすのか。この問題の解決は、aggregation-prone なタンパク質の性質を理解するうえで非常に興味深い。

ポリグルタミンタンパク質以外にも α -synuclein や Amyloid- β など aggregation-prone なタンパク質があり、それぞれで凝集体形成機構が異なっている。これらの aggregation-prone なタンパク質に対して SEL1L はどのような影響を与えているのであろうか。これらの解析をすすめることが、aggregation-prone なタンパク質が引き起こす病態の解決に一役を担うかもしれない。

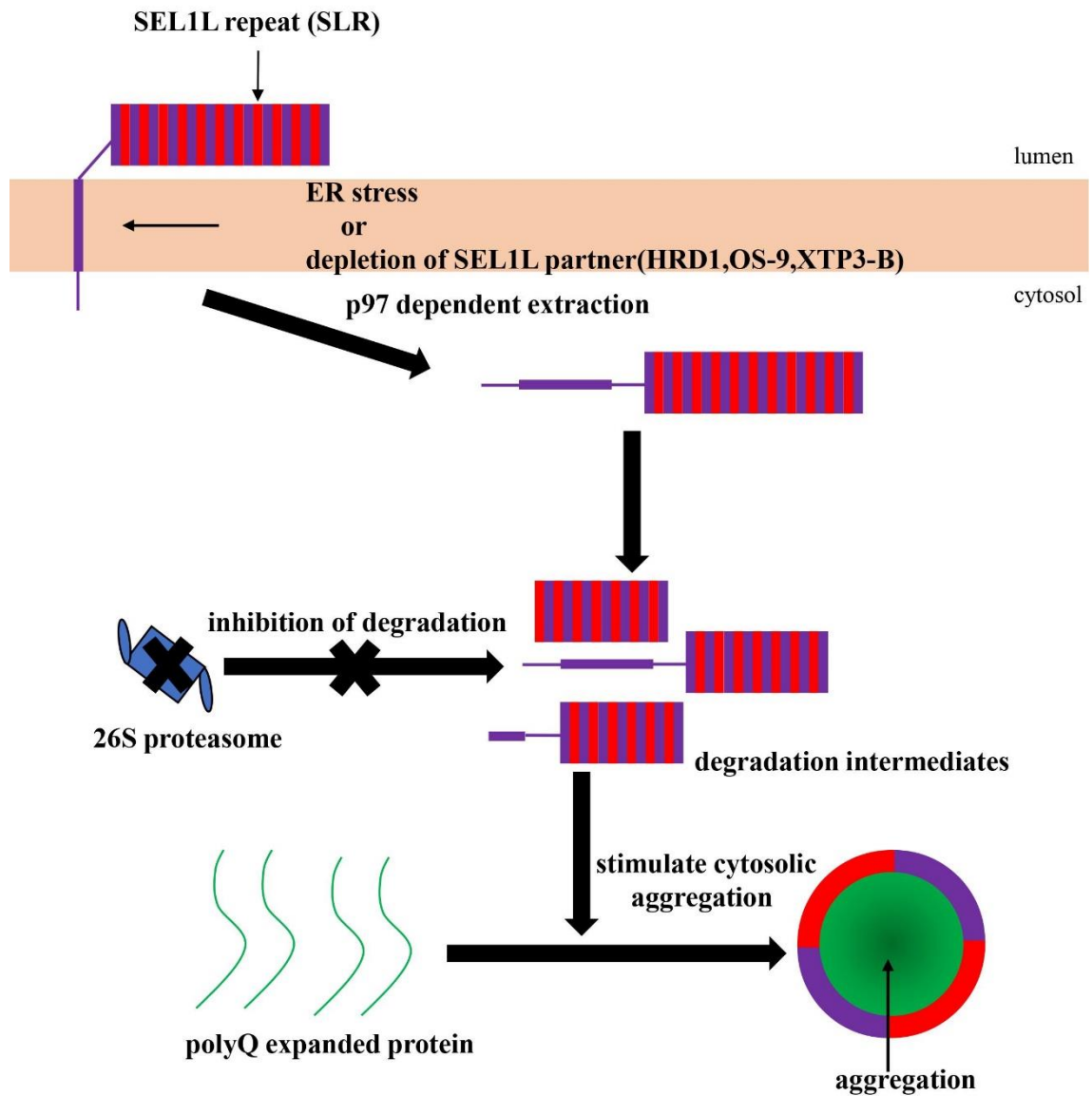


Fig.13 SEL1L の分解中間体の形成とその細胞への影響

p97 依存的に細胞質にでてきた SEL1L は切断され分解中間体を形成する。SEL1L の分解中間体は、ポリグルタミンタンパク質の細胞質での凝集を促進する。

最後に、SEL1Lの分解に関わるE2やE3は何であろうか。今回の解析では、SEL1Lの分解に関与するE2、E3共に明らかにすることはできなかった。Hagiwaraらは、UBC6e(UBE2J1)をノックアウトすると、SEL1Lが増加することを報告しているが(Hagiwara *et al.* 2016)、UBC6eが直接的にSEL1Lを分解しているのか、それとも間接的に関与しているのかは明らかになっていない。UBC6eとSEL1Lの分解についての解析は、今後なされるべき課題であるだろう。また、今回同定できなかったSEL1Lの分解に関与するE3についても、それがEDEMなどのERAD enhancer分子の分解にも関与するのを含めて非常に興味深い。

また、SEL1Lの逆行輸送に関与する因子についても明らかにできなかった。近年の解析から、出芽酵母において、Hrd1p-Der1p複合体がレトロトランスロコンである可能性が示唆された(Wu *et al.* 2020)。しかしながら、先行研究からHRD1はSEL1Lと複合体を形成し、SEL1Lを安定化させることが示されている(Iida *et al.* 2011)。哺乳類におけるSEL1Lの逆行輸送にHRD1が関与するとは考えにくい。Nealらは、出芽酵母において、DerlinファミリーのDfm1pが小胞体膜に存在するERAD基質の逆行輸送に関与していると報告している(Neal *et al.* 2018)。また、すべての小胞体膜タンパク質のERADにおいてDfm1pが基質の逆行輸送に関係していると報告されている(Flagg *et al.* 2021)。Dfm1pはrhomboid-pseudoproteaseタンパク質で、この領域が小胞体膜に存在するERAD基質の認識に関与していると言われている。哺乳類においても多くのrhomboid-pseudoproteaseタンパク質が存在し、ERADに関与していると言われている(Kandel and Neal. 2020)。今後の解析によって何がSEL1Lの逆行輸送に関与しているのか明らかにしたい。

ERADを含めたタンパク質の品質機構の破綻は様々な病気の原因となることが報告されている。SEL1Lの機能を含めてタンパク質の品質管理機構の解析を進めることにより、タンパク質品質管理機構の破綻が引き起こす病気の解決の一助になると考えられる。

6.実験材料および方法

実験試薬

試薬は特記したものを除き、ナカライテスク、同仁化学研究所、和光純薬工業、Sigma-Aldrich 製のものを使用した。

発現プラスミド

S-SEL1L 発現プラスミドは、Stanford 大学の Ron Kopito 博士より (Christianson *et al.* 2008)、Htt76-GFP-FLAG および Htt23-GFP-FLAG 発現プラスミドは、北海道大学先端生命科学研究院の北村朗博士より分与していただいた (Kitamura *et al.* 2006)。

NHK-QQQ、SEL1L-HA、FolA-S-HA、OS-9v2-HA、そして XTP3B-HA 発現プラスミドは、先行研究で作成された (Hosokawa and Wada.2016; Hirao *et al.* 2006; Hosokawa *et al.* 2008; Hosokawa *et al.* 2009)。

Δ ssSEL1L-HA 発現プラスミドは、N 末端側のシグナル配列(アミノ酸 2-21)を欠損させた SEL1L を作成し、sub-cloning によって pMH ベクター (Roche Applied Science 社) の *Hind*III-*Eco*RI サイトに組み込んだ。SEL1L- Δ PR-HA は、PRD (Proline Rich Domain; アミノ酸 770-793) を欠損させた SEL1L を作成し、sub-cloning によって pMH ベクターの *Hind*III-*Eco*RI サイトに組み込んだ。SEL1L-R5-9-HA は、SEL1L の SLR 5-9 領域(アミノ酸 352-537)の合成 DNA を pMH ベクターの *Eco*RI サイトに組み込んだ。

siRNA

今回用いた siRNA の配列を以下に示す。negative control siRNA として Stealth™ siRNA Negative Control Medium GC (Invitrogen) を用いた

OS-9 #2	5'-GGAAACGCUGCUGUCCAGUUUGUUA-3'
OS-9 #3	5'-GGAGGAGGAAACACCUGCUUACCAA-3'
XTP3-B #2	5'-UUUCCCACUAUCCUUGUCCUCAUGG-3'
XTP3-B #3	5'-UUUCCAUGACAUAUCUUCGUAAGUCC-3'
HRD1	5'-UUGAUCUGCAGCAUGGCGGCGUCCA-3'

抗体

マウスモノクローナル抗 HRD1/synoviolin 抗体は、聖マリアンナ医科大学の中島利博博士より分与していただいた。ウサギ抗 HSP70/HSC70 抗体は中部大学の犬塚健三博士より分与していただいた。ウサギ抗 SEL1L 抗体は先行研究で使用

したものを用いた(Iida *et al.* 2011)。ウサギ抗 GFP 抗体は、他の研究室の解析で用いたものを利用した(Sakurai *et al.* 2018)。その他の抗体は、以下に記す。

ウサギポリクローナル抗 HA 抗体	Rcenttec, Tokyo, Japan
ウサギポリクローナル抗 c-myc 抗体(9E10)	Santa Cruz Biotechnology , Dallas, TX, USA
マウスモノクローナル抗 c-myc 抗体(HA-7)	Santa Cruz Biotechnology , Dallas, TX, USA
マウスモノクローナル抗 HA 抗体	Sigma-Aldrich
ウサギポリクローナル抗 S タグ抗体	Abcam, Cambridge, UK
マウスモノクローナル抗 FLAG 抗体(M2)	Sigma-Aldrich
ウサギモノクローナル抗 OS-9 抗体	Abcam, Cambridge, UK
ウサギポリクローナル抗 XTP3-B 抗体	Sigma-Aldrich
ウサギポリクローナル抗 HRD1/synoviolin 抗体	Protein-Tech, Rosemont, IL, USA
ウサギポリクローナル抗 α 1-AT 抗体	Dako, Glostrup, Denmark
マウスモノクローナル抗 Actin 抗体	Millipore, Billerica, MA, USA
ウサギポリクローナル抗 CNX 抗体	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
ウサギポリクローナル抗 PDI 抗体	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
マウスモノクローナル抗 BiP 抗体	BD Transduction Laboratories
ヒツジポリクローナル抗 α 1-AT 抗体	The Binding Site, Birmingham, UK
HRP 標識抗ウサギ抗体 IgG 抗体	BTI, Thermo Fisher
HRP 標識抗マウス抗体 IgG 抗体	Zymed Laboratories Inc., Thermo Fisher
Clean-Blot IP Detection Reagent	Thermo Fisher Scientific. Rockford, IL, USA

一般的な分子学的手法

核酸電気泳動などといった一般的な分子生物学的手法、およびタンパク質の電気泳動については、Sambrook, Laemmli および Bradford(Laemmli. 1970; Bradford. 1976; Sambrook and Russel. 2001)の方法に従った。また、大腸菌で精製させた plasmid DNA の大量回収には、QIAGEN Plasmid Maxi Kit(QIAGEN)を使用し、付属の説明書に準じて行った。

細胞培養条件

HEK293 細胞、HeLa 細胞、HepG2 細胞、RD 細胞、そして Capan2 細胞は、低グルコース濃度(1g/L)または高グルコース濃度(4.5g/L)含有の Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(Sigma-Aldrich)に、Fetal Bovine Serum(FBS)を 10%になるように混合し、ペニシリン 100,00Unit/mL、ストレプトマイシン 10,000 μ g/mL の混合液を 1 %加えたものを培地として 37 °Cで、7 %炭酸ガスインキュベーターに

静置し培養した。

細胞へのプラスミド DNA および siRNA のトランスフェクション

細胞をポリ L リジンコートした 3.5cm ディッシュに播種し、24 時間培養した。細胞へのプラスミド DNA 導入は、Lipofectamine 2000(Invitrogen, Waltham, Ma, USA)、ViaFect(Promega, Madison, WI, USA)、もしくは polyethylenimine(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)を用い、siRNA 導入は Lipofectamine RNAi MAX(Invitrogen)を用いて取扱説明書に準じて行った。

培養液中に加えた試薬

MG132(Peptide Institutes, Osaka, Japan)、Z-VAD-FMK(Peptide Institutes)、NMS-873(Cayaman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)、thapsigargin(Sigma Aldrich)、tunicamycin(Sigma-Aldrich)は、DMSO に溶かし、それぞれ終濃度 20 μ M、30 μ M、2.5 μ M、1.5 μ M、そして 5 μ g/mL になるように培地に添加した。添加後特に断りがない限り 6 時間続培養した。

Cycloheximide(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)は、PBS に溶かし、終濃度 100 μ M になるように培地に添加した。

細胞の可溶化とウェスタンブロット法

PBS(-)で細胞を 2 回洗浄した後、3.5cm ディッシュ 1 枚当たり 150 μ L の 1% NP-40 を含む lysis バッファー(50 mM Tris-HCl(pH7.6)、150 mM NaCl、2 mM MEM、0.2 mM AEBSF、1 μ g/mL leupeptin、1 μ g/mL pepstatin)を加え、ラバーポリスマンで細胞を回収した。回収した細胞を氷上で 20 分間静置し、細胞を溶解させた。その後、4 $^{\circ}$ C、12,000rpm で 20 分間遠心し、上清と沈殿にわけて回収し、実験に用いた。遠心後の上清画分を回収し、cell lysate として解析に用いた。不溶性画分については、2% SDS を含む Laemmli のバッファーを加えて超音波発生装置(Misonix)を用いて超音波破碎することで可溶化した。

細胞抽出液に含まれるタンパク質は Laemmli のバッファーおよび還元剤である DTT を加えるもしくは加えずに、65 $^{\circ}$ C で 15 分加熱した。このサンプルを SDS-PAGE を行い、タンパク質を分離した。PVDF 膜(Millipore)にタンパク質を転写し、Blocking OneTMを用いて室温で 1 時間ブロッキングした。その後、膜を 0.1% Tween-20 を含む PBS(-)で 2 回洗浄し、CanGet Signal Solution1(TOYOBO)もしくは Blocking OneTM で希釈した 1 次抗体と常温で 1 時間または 4 $^{\circ}$ C で一晚反応させた。PBS-T で 2 回洗浄し、CanGet Signal Solution2(TOYOBO)もしくは Blocking OneTM で希釈した 2 次抗体と常温で 1 時間反応させた。最後に、PBS-T で 4 回洗浄したのち、Pierce Western Blotting Substrate(Thermo Fisher Scientific)を用いて化

学発光を行い、LAS-4000(GE Healthcare Bio-sciences, Uppsala, Sweden)を用いて特異的バンドを検出した。シグナル強度は ImageQuant software(GE Healthcere Bio-sciences)で定量化した。

代謝ラベルと免疫沈降

HEK293 細胞用いた代謝ラベルと免疫沈降は、先行研究を参照した(Hosokawa and Wada. 2016)。タンパク質に取り込まれた放射性同位体は、Typhoon FLA PhosphorImager(GE Healthcare Bio-sciences)で可視化した。シグナル強度は ImageQuant software(GE Healthcere Bio-sciences)で定量化した。

細胞分画

HEK293 細胞を Subcellular Fractionation Kit for Cultured Cells(Thermo Fisher Scientific)を用いて、取扱説明書に準じて細胞分画を行った。

また、同上の細胞を 30-G 注射針を通過させることで破碎した(Wada *et al.* 1997)。破碎する際には、等張バッファー(250 mM sucrose、10 mM HEPES(pH7.4)、1 mM CaCl₂)を用いた。破碎した細胞を 300×g で 5 分遠心し、その上清をもう一回 1,500g で 5 分間遠心した。遠心後のサンプルを上清とペレットに分離したのち、上清をさらに 100,000 g で 1 時間超遠心し、上清とマイクロソームに分離した。

Live-cell imaging (Hoechst 33342)

細胞を 3.5cm ディッシュで培養したのち、プラスミドをトランスフェクションした。顕微鏡で観察する 30 分前に Hoechst 33342(Dojindo, Kumamoto, Japan)で核を染色した。その後、LAS AF6000(Leica microsystems, Wetzlar, Germany)で画像を撮影した。

免疫蛍光細胞染色

HEK293 細胞や HeLa 細胞を 3.5cm ディッシュ上のカバーグラスで培養したのち、所定のプラスミドをトランスフェクションした。一定時間培養後、細胞を PBS(+)で 3 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS(-)を添加し 15 分間室温で静置することで細胞を固定した。PBS(-)で 3 回洗浄後、0.2% TritonX-100 を含む PBS(-)を加え 4 分間氷上に静置し透過処理を行った。透過処理後の細胞を 3 回 PBS(-)で洗浄したのち、ブロッキング溶液(PBS(-)、5% BSA、10%ヤギ血清)を添加し、常温で 30 分間静置した。その後、液を捨て、一次抗体を所定の濃度で希釈したブロッキング溶液を細胞に添加し、常温で 1 時間静置した。PBS(-)で 3 回洗浄し、二次抗体と DAPI を所定の濃度で希釈したブロッキング溶液を添加し、常温で遮光しながら 1 時間静置した。PBS(-)で 3 回洗浄したのち、マウン

ト剤である Prolong Gold(Molecular Probes)を用いてカバーガラスを被せて封入し、縁を覆うようにネイルマネキュアで密封した。蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡 SP8(Leica Microsystems)で取得し、LAS-X を用いて解析した。解析で用いた抗体は以下で示す

一次抗体

マウスモノクローナル抗 HA 抗体(HA-7)	Sigma-Aldrich
ウサギポリクローナル抗 CRT 抗体	Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA
ウサギポリクローナル抗 HSP/HSC70 抗体	中部大学大塚健三博士より分与
マウスモノクローナル抗 GFP 抗体	Roche

二次抗体

Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ抗体 IgG 抗体	Clontech, Takara Bio
Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗マウス抗体 IgG 抗体	Clontech, Takara Bio

Filter Trap Assay

Filter Trap Assay は、論文の方法を参照した(Wanker *et al.* 1999; Kitamura *et al.*2006)。HEK293 細胞を 0.5% TritonX-100 を含むバッファーを用いて回収し、超音波で破碎後、1% SDS を含むバッファーで可溶化した。可溶化したサンプルを希釈し、それぞれをポアサイズが 0.2 μ m の酢酸セルロースメンブレンにアプライした。SDS 耐性の polyQ 凝集体を GFP 抗体で検出した。

7.論文目録

主論文

本論文中に示した研究成果のうち SEL1L の分解中間体に関する解析については以下の論文に公表した。

SEL1L degradation intermediates stimulate cytosolic aggregation of polyglutamine-expanded protein

(SEL1L の分解中間体はポリグルタミンタンパク質の細胞質での凝集を促進する)

Tokuya Hattori, Ken Hanafusa, Ikuo Wada, Nobuko Hosokawa

2021 年 8 月発行

FEBS Journal, 第 288 巻第 15 号 4637 項～4654 項に掲載

Doi: 10.1111/febs.15761

8.謝辞

本研究は京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 細胞調節学分野 細川暢子准教授のもとで行われました。

細川暢子准教授には本研究を行うのに十分な環境の提供ばかりでなく研究者としての心構えも教えていただきました。実験におきましては、実験手法を基礎から丁寧に教えていただきました。また、得られた結果に対する考察や今後の研究の方向性に対しても頻繁に議論していただきました。この経験によって、相手に理解してもらおう発表の仕方や論理的に考えることの重要性を学ぶことができました。本当にありがとうございます。また、だれよりも遅くまで研究室に残り、作業に当たっている姿を何度も見かけました。その姿勢は、研究に対する情熱、粘り強く考えていくことの重要性を教えてくださいました。重ね重ね感謝申し上げます。

共同研究者である福島県立医科大学附属生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門 和田郁夫 教授には、本研究を行う上で重要な提言を多くいただき、この研究を大きく進歩することができました。この場を借りてお礼申し上げます。

北海道大学 先端生命科学研究院 生命機能科学研究門 北村朗助教、Stanford University の Ron R. Kopito 博士にはプラスミドを提供していただきました。感謝申し上げます。

龍谷大学 山崎正幸 准教授には、セミナーを通じて様々な論文を紹介していただき、最先端の知見について得ることができました。感謝申し上げます。

細胞調節学分野に所属していた氏家梓さんには細胞のカウントをしていただきました。卒業していった研究室の仲間たちも含めてこの場で感謝申し上げます。

時には厳しく時には優しく私を見守ってくださった、私に関わった多くの方々にこの場を借りて感謝申し上げます。

最後に、人間的にも経済的にも未熟な私を支えてくれた家族に心から感謝します。

9.参考文献

Anbanandam A, Albarado DC, Tirziu DC, Simons M, Veeraraghavan S (2008). Molecular basis for prolin- and arginine-rich peptide inhibition of proteasome. *J Mol Biol.*384(1):219-227

Baldrige RD and Rapoport TA (2016). Autoubiquitination of the Hrd1 ligase triggers protein retrotranslocation in ERAD. *Cell.*166(2): 394-407

Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292(5521):1552-1555

Biunno I, Cattaneo M, Orlandi R, Canton C, Biagiotti L, Ferrero S, Barberis M, Pupa SM, Scarpa A, Menard S (2006). SEL1L a multifaceted protein playing a role in tumor progression. *J Cell Physiol.*208(1):23-38

Bodnar NO, Rapoport TA (2017). Molecular mechanism of substrate processing by the Cdc48 ATPase complex. *Cell* 169(4):722-735

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*72:248-254

Burr ML, van den Boomen DJ, Bye H, Antrobus R, Wiertz EJ and Lehner PJ (2013). MHC class I molecules are preferentially ubiquitinated on endoplasmic reticulum luminal residues during HRAD1 ubiquitin E3 ligase-mediated dislocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 110 (35): 14290-14295

Caramelo JJ, Castro OA, de Prat-Gay G, Paradi AJ (2004). The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates. *J Biol Chem* 279: 46280-46285

Cattaneo M, Baronchelli S, Schiffer D, Mellai M, Caldera V, Sacconi GJ, Dalpra L, Daga A, Orlandi R, DeBlasio P, Biunno I (2014). Down-modulation of SEL1L, an unfolded protein response and endoplasmic reticulum-associated degradation protein, sensitizes

glioma stem cells to the cytotoxic effect of valproic acid. *J Biol Chem.*289(5) 2826-2838

Christianson JC, Thomas Ah, Tyler RE, Kopito RR (2008). OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* 10(3):272-282

Claessen JHL, Kundrat L and Ploegh HL (2011). Protein quality control in the ER: balancing the ubiquitin checkbook. *Trends in Cell Biology* 22: 22-32

Ellgaard L and Helenius A (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.*4: 181-191

Ernst R, Mueller B, Ploegh HL and Schlieker C (2009). The Otubain YOD1 is a deubiquitinating enzyme that associates with p97 to facilitate protein dislocation from the ER. *Mol.Cell* 36: 28-38

Feige MJ and Hendershot LM (2013). Quality control of integral membrane proteins by assembly-dependent membrane integration. *Mol Cell.*51(3):297-309

Flagg MP, Wangeline MA, Holland SR, Duttke SH, Benner C, Neal S, Hampton RY (2021). Inner-nuclear-membrane-associated degradation employs Dfm1-independent retrotranslocation and alleviates misfolded transmembrane-protein toxicity. *Mol Biol Cell.* 32(7):521-537

Fleig L, Bergbold N, Sahasrabudhe P, Geiger B, Kaltak L, Lemberg MK (2012). Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins. *Mol Cell* 47(4): 558-569

Gerge G, Ninagawa S, Yagi H, Saito T, Ishikawa T, Sakuma T, Yamamoto T, Imami K, Ishihama Y, Kato K, Okada T, Moro K (2020). EDEM2 stably disulfide-bonded to TXNDC11 catalyzes the first mannose trimming step in mammalian glycoprotein ERAD. *Elife.* doi; 10.7554/elife.53455.

Greenblatt EJ, Olzmann JA and Kopito RR (2011). Derlin-1 is a pseudoprotease required for the dislocation of mutant α 1-antitrypsin from the endoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol* 18(10): 1147-1152

Grinna LS, Robbins PW (1979). Glycoprotein biogenesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides. *J Biol Chem* 254: 8814-8818

Hagiwara M, Ling J, Koenig PA, Ploegh HL (2016). Posttranscriptional regulation of glycoprotein quality control in the endoplasmic reticulum is controlled by the E2 Ub-conjugating enzyme UBC6e. *Mol Cell*. 63(5): 753-767

Hamazaki J and Murata S (2020). ER-resident transcription factor Nrfl regulates proteasome expression and beyond. *Int J Mol Sci*. 23;21(10):3683

Hampton RY and Sommer T (2012). Finding the will and the way of ERAD substrate retrotranslocation. *Curr Opin Cell Biol* 4: 460-466

Hirabayashi M, Inoue K, Tanaka K, Ohsawa Y, Kamei Y, Popiel AH, Sinohara A, Iwamatsu A, Kimura Y, Uchiyama Y, Hori S, Kakizuka A (2001). VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ*. 8(10):9770984

Hirao K, Natsuka Y, Tamura T, Wada I, Morito D, Natsuka S, Romero P, Sleno B, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K, Hosokawa N (2006). EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J Biol Chem*.281(124):9650-9658

Hosokawa N, Wada I, Nagasawa K, Moriyama T, Okawa K and Nagata K (2008). Human XTP3-B forms an endoplasmic reticulum quality control scaffold with the HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex and BiP. *J Biol Chem* 283(30): 20914-20924

Hosokawa N, Kamiya Y, Kamiya D, Kato K, Nagata K (2009). Human OS-9, A lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *J Biol Chem*.284(25):17061-17068

Hosokawa N, Kato K and Kamiya Y (2010). Mannose 6-phosphate receptor homology domain-containing lectins in mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation. *Method Enzymol*. 480: 181-197

Hosokawa N and Wada I (2016). Association of the SEL1L protein transmembrane

domain with HRD1 ubiquitin ligase regulates ERAD-L. FEBS J. 283: 157-172

Huber EM and Groll M (2021). A nut for every bolt: subunit-selective inhibitors of the immunoproteasome and their therapeutic potential. Cells.29;10(8):1929

Iida Y, Fujimori T, Okawa K, Nagata K, Wada I, Hosokawa N (2011). SEL1L protein critically determines the stability of the HRD1-SEL1L endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) complex to optimize the degradation kinetics of ERAD substrates. J Biol Chem.286:16929-16939

Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR (2005). HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. J Biol Chem. 280(48):40282-40292

Jeong H, Sim HJ, Song EK, Lee H, Ha SC, Jun Y, Park TJ and Lee C (2016). Crystal structure of SEL1L: insight into the roles of SLR motifs in ERAD pathway. Sci Rep. 6: 20261

Kandel RR and Neal SE (2020). The role of rhomboid superfamily members in protein homeostasis: Mechanistic insight and physiological implications. Biochem Biophys Acta Mol Cell Res. 1867(10):118793

Kang SW, Rane NS, Kim SJ, Garrison JL, Tauton J, Hedge RS (2006). Substrate-specific translocational attenuating during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. Cell. 127(5): 999-1013

Koenig PA, Nicholls PK, Schmidt FI, Hagiwara M, Maruyama T, Frydman GH, Watson N, Page DC, Ploegh HL (2014). The E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2J1 is required for spermiogenesis in mice. J Biol Chem. 289(50):34490-34502

Kopito RR (1999). Biosynthesis and degradation of CFTR. Physiol Rev 79: S167-173

Kopito RR (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. Trends Cell Biol. 10(12):524-530

Kim S, Nollen EAA, Kitazawa K, Bindokas VP, Morimoto RI (2002). Polyglutamine

protein aggregates are dynamic. *Nat Cell Biol.*4(10):826-831

Kitamura A, Kubota H, Pack CG, Matsumoto G, Hirayama S, Takahashi Y, Kimura H, Kinjo M, Morimoto RI, Nagata K (2006). Cytosolic chaperon prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nat Cell Biol.*8(10):1163-1170

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*227(5259):680-685

Lee JH, Choi JM, Lee C, Yi KJ and Cho Y (2005). Structure of a peptide: N-glycanase-Rad23 complex: insight into the deglycosylation for denatured glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 9144-9149

Lieberman AP, Shakkottai VG, Albin RL (2019). Polyglutamine repeats in Neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pathol.*14:1-27

Lilly BN and Ploegh HL (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429: 834-840

Lilly BN and Ploegh HL (2005). Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 14290-14301

Lindholm D, Wootz H, Korhonen L (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 13: 385-392

Magnaghi P, D'Alessio R, Valsasina B, Avanzi N, Rizzi S, Asa D, Gasparri F, Cozzi L, Cucchi U, Orrenius C, Polucci Paolo, Ballinari D, Perrere C, Leone A, Cervi G, Casale E, Xiao Y, Wong C, Anderson DJ, Galvani A, Donati D, O'Brien T, Jackson PK, Lsacchi A (2013). Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nat Chem Biol.*9(9):548-556

Matsumoto G, Kim S, Morimoto RI (2006). Huntingtin and mutant SOD1 form aggregate structures with distinct molecular properties in human cells. *J Biol Chem.*281(7):4477-4485

Matus S, Glimcher LH, Hetz C (2011). Protein folding stress in neurodegenerative

diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol.* 23(2):239-252

Misaghi S, Pacold ME, Blom D, Ploegh HL, Korbel GA (2004). Using a small molecule inhibitor of peptide: N-glycanase to probe its role in glycoprotein turnover. *Chem Biol.*11(12):1677-1687

Mori H, Kondo J, Ihara Y (1987). Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science.*235(4796):1641-1644

Neal S, Jeager PA, Duttke SH, Benner C, Glass CK, Ideker T, Hampton RY (2018). The Dfm1 Derlin is required for ERAD retrotranslocation of integral membrane proteins. *Mol Cell* 69(2):306-320

Orr HT and Zoghbi HY (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci.*30:575-621

Paul S (2008). Dysfunction of ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. *Bioessays.*30(11-12):1172-1184

Sakurai C, Itakura M, Kinoshita D, Hashimoto H, Wada I, Hatsuzawa K (2018). Phosphorylation of SNAP-23 at Ser95 causes a structural alteration and negatively regulates Fc receptor-mediated phagosome formation and maturation in macrophages. *Mol Biol Cell.*29(13):1753-1762

Sambrook J and Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual* 3rd edition

Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 313:1086-1090

Solda T, Galli C, Kaufman RJ, Molinari M (2007). Substrate-specific requirements for UGT1-dependent release from calnexin. *Mol Cell* 27: 238-249

Sun YM, Zhang YB and Wu ZY (2017). Huntington's Disease: Relationship between phenotype and genotype. *Mol Neurobiol.* 54: 342-348

Suzuki T (2007). Cytoplasmic peptide: N-glycanase and catabolic pathway for free N-glycans in the cytosol. *Semin Cell Dev Biol.*18(6):762-769

Takahashi D and Arimoto H (2021). Selective autophagy as the basis of autophagy-based degraders. *Cell Chem Biol.* 15;28(7): 1061-1071

Takahashi M, Kitamura H, Kakita A, Kakihara T, Katsuragi Y, Nameta M, Zhang L, Iwakura Y, Nawa H, Higuchi M, Komatsu M, Fujii M (2018). USP10 is a driver of ubiquitinated protein aggregation and aggresome formation to inhibit apoptosis. *iScience.* 30(9):433-450

Tonoki A, Kuranaga E, Tomioka T, Hamazaki J, Murata S, Tanaka K, Miura M (2009). Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol Cell Biol.* 29(4):1095-1106

van der Goot AT, Pearce MMP, Leto DE, Shaler TA, Kopito RR (2018). Redundant and antagonistic roles of XTP3-B and OS-9 in decoding and non-glycan degrons in ER-associated degradation. *Mol cell.* 70(3):516-530

Vasic V, Denkert N, Schmidt CC, Stein A and Meinecke M (2020). Hrd1 forms the retrotranslocation pore regulated by auto-ubiquitination and binding of misfolded proteins. *Nat. Cell Biol* 3: 274-281

Wada I, Kai M, Sakane F, Kanoh H (1997). Promotion of transferrin folding by cyclic interactions with calnexin and calreticulin. *EMBO.*16(17):5420-5432

Walter P and Ron D (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 334(6059):1081-1086

Wanker EE, Scherzinger E, Heiser V, Sittler A, Eickhoff H, Lehrach H (1999). Membrane filter assay for detection of amyloid-like polyglutamine-containing protein aggregates. *Methods Enzymol.*309:375-386

Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Gueze HJ, Ploegh HL (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell.*84(5):769-779

Wolf DH, Stolz A (2012). The Cdc48 machine in the endoplasmic reticulum associated protein degradation. *Biochem Biophys Acta.*1823(1):117-124

Wu X, Siggel M, Ovchinnikov S, Mi W, Svetlov V, Nudler E, Liao M, Hummer G, Rapoport TA. (2020). Structural basis of ER-associated protein degradation mediated by the Hrd1 ubiquitin ligase complex. *Science* 368, eaaz2449

Xu C, NG DTW (2015). Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol.*16(12):742-752

Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D and Rapoport TA (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429: 841-847

Younger JM, Chen L, Ren HY, Rosser MFN, Turnbull EL Fan CY, Patterson C, Cyr DM (2006). Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell.*126(3): 571-582

Zhao L, Ackerman SL (2006). Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 18: 444-452

Zou T and Lin Z (2021). The involvement of ubiquitin machinery in cell cycle regulation and cancer progression. *Int J Mol Sci.* 27;22(11):575