

関西学院大学 研究成果報告

2019年 3月 13日

関西学院大学 学長殿

所属： 理工学部
職名： 准教授
氏名： 沖米田 司

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input checked="" type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	エンドソーム局在RING型ユビキチンリガーゼの機能解析
研究実施場所	理工学部 生命医化学科 沖米田研究室
研究期間	2018年4月1日 ～ 2019年3月31日 (12 ヶ月)

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

申請者は、嚢胞性線維症(Cystic Fibrosis, CF)に関わる形質膜タンパク質CFTR Δ F508変異体をモデルタンパク質として、形質膜における異常膜タンパク質のユビキチン化機構を世界で初めて解明した(Okiyoneda, Science 2010). 形質膜に存在する構造異常タンパク質は、細胞質の分子シャペロン複合体に認識され、シャペロン結合型ユビキチンリガーゼCHIPによりユビキチン化された結果、速やかにエンドサイトーシスされ、リソソーム分解される(Okiyoneda, Curr Opin Cell Biol 2011). 申請者は、形質膜品質管理におけるユビキチン化機構の全貌解明を目指して、ゲノムワイドな網羅的siRNAスクリーニング(約600種類)をCF患者由来気道上皮細胞で行った結果、RING型ユビキチンリガーゼRFFLが Δ F508 CFTRの形質膜からの分解に関与する可能性を見いだした(Okiyoneda, Dev Cell 2018). RFFLはFYVE-like domainとRING domainを有し、エンドソームに局在することが報告されているが、その機能は明らかではない. 我々の予備解析の結果、RFFLはRab7およびRab9と共局在し、後期エンドソームに局在することがわかった. RFFLノックダウンにより、post-Golgi区画に存在する Δ F508 CFTRのユビキチン化、特にK63結合型ポリユビキチン化が抑制されることを見いだした. 従って、RFFLは形質膜からエンドサイトーシスされた Δ F508 CFTRをエンドソームでK63結合型ポリユビキチン化することで、効率的なリソソーム分解を促進する可能性が考えられる. しかしながら、RFFLがどのように基質である膜タンパク質を認識し、ユビキチン化を制御するのか、また、CFTR変異体以外のタンパク質を基質とし、その発現量や細胞内挙動を制御するのか、その詳細な分子機構や生理的役割

は不明である．そこで、本研究では、ユビキチンリガーゼRFFLによる形質膜異常タンパク質品質管理の分子機構と生理的役割を理解することを第一の目的とした．

RFFL 結合因子探索から、RFFLの補助因子、および、CFTR以外の基質タンパク質の同定を行うことで、RFFLによるユビキチン化機構とその生理的役割を探った．RFFL-BirA* 安定高発現CFBE細胞を樹立し、BioID(proximity-dependent biotin identification)法により、RFFL複合体を細胞内でビオチン化し、ホモジネートから複合体をNeutravidin beadsで単離後、質量分析により同定を行った．その結果、リサイクリングエンドソームに局在し、トランスフェリン受容体(TfR)など積荷タンパク質の形質膜へのリサイクリングを制御する Rab11 effector (EHD1, MICALL1, Rab11-FIP1C, -FIP2, -FIP5)を RFFL 結合タンパク質候補分子として同定した．免疫沈降法により、RFFLがこれらの Rab11 effector と結合すること、さらに、ユビキチンリガーゼ活性を失った RFFL RING domain 点変異体はこれらの分子とより強固に結合することを明らかにした．RFFL がこれらの Rab11 effector を直接認識し、そのユビキチン化を制御する可否かを明らかにするために、Rab11 effector タンパク質を大腸菌または哺乳類動物細胞から精製し、in vitro ubiquitination assay を行った．その結果、RFFL はこれら Rab11 effector (EHD1, MICALL1, Rab11-FIP1C, -FIP2, -FIP5)を直接認識し、そのユビキチン化を促進することが明らかとなった．Rab11 effector の細胞内でのユビキチン化レベルも RFFL により制御されるか否かを過剰発現実験および RFFL ノックアウト実験により検証した．その結果、RFFL 過剰発現は Rab11 effector 特に Rab11-FIP2 のユビキチン化を促進した．また、RFFL RING domain 点変異体の過剰発現は、Rab11 effectorのユビキチン化、特に、モノユビキチン化を阻害した．さらに、RFFL ノックアウト細胞を CRISPR/CAS9法で樹立し、RFFL ノックアウトによるRab11 effectorのユビキチン化レベルへの影響を調べた．その結果、RFFL ノックアウトは Rab11-FIP1C のユビキチン化を有意に抑制した．従って、RFFL は Rab11 effector のユビキチン化レベルの制御に関与することが明らかとなった．

最後に、RFFL が関与する Rab11 effector のユビキチン化阻害により、TfR 等の積荷タンパク質のリサイクリングに影響を受けるか否かを調べた．RFFL ノックアウトは TfR のリサイクリングには影響を与えなかった．その理由として、RFFL ノックアウトは Rab11 effector の1つである Rab11-FIP1C のみ影響を与えるため、他の Rab11 effector (EHD1, MICALL1, Rab11-FIP2, -FIP5)がRab11-FIP1C の機能を補完する可能性が考えられた．一方で、RFFL RING domain 点変異体の過剰発現は RFFL と結合する Rab11 effector(EHD1, MICALL1, Rab11-FIP1C, -FIP2, -FIP5)すべてのユビキチン化を抑制し、TfR のリサイクリングも阻害した．また、RFFL RING domain 点変異体の過剰発現はクラスリン依存的にエンドサイトーシスされるTfRや野生型CFTR のみではなく、クラスリン非依存的にエンドサイトーシスされる CD59 の形質膜へのリサイクリングも阻害した．さらに、RFFL RING domain 点変異体の過剰発現はRab5 陽性の初期エンドソームと Rab11 陽性のリサイクリングエンドソームの分離を阻害し、リサイクリングエンドソームの形態異常を引き起こした．以上の結果より、RFFL による Rab11 effector (EHD1, MICALL1, Rab11-FIP1C, -FIP2, -FIP5) のユビキチン化制御はリサイクリング経路の正常な機能および形態維持に重要であることが明らかとなった．本知見は国際誌 Journal of Cell Science (Sakai R et al) 2019年2月号で発表した．

以上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。