

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		小胞体関連分解(ERAD)における逆行輸送の in vitro 解析			
研究テーマ (欧文) AZ		In vitro analysis of the retrotranslocation of misfolded proteins from the ER			
研究氏 代表名 者	カナ字 CC	姓) ナカツカサ	名) クニオ	研究期間 B	2009～ 2010年
	漢字 CB	中務	邦雄	報告年度 YR	2011年
	ローマ字 CZ	NAKATSUKASA	Kunio	研究機関名	名古屋大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		中務邦雄 名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻			
<p>概要 EA (600字～800字程度にまとめてください。)</p> <p>分泌タンパク質が生合成される小胞体には、細胞内の約30%に相当する大量のタンパク質が取り込まれる。特に抗体産生細胞など、分泌に特化した細胞では、取り込まれる割合が劇的に高くなる。小胞体における分泌タンパク質の高次構造形成は、品質管理機構によって厳密にモニターされている。高次構造形成に失敗した異常タンパク質は、Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD)と呼ばれる分解系によって除去される。</p> <p>ERAD に関わる因子と経路の研究は、特に出芽酵母で進んでいる。基質に存在する構造異常の部位によって、経路は大きく3つに分類することができる。小胞体内腔の異常タンパク質は膜タンパク質 E3 リガーゼ Hrd1 に依存した経路、小胞体膜タンパク質で膜貫通ドメインに構造異常があるタンパク質も Hrd1 に依存した経路、小胞体膜タンパク質でサイトゾル側に構造異常があるタンパク質は別の膜タンパク質 E3 リガーゼ Doa10 に依存した経路で分解される。ERAD では基質の特異的な認識、サイトゾルへの逆行輸送が残された大問題であり、ほとんど手付かずの状態に残っている。</p> <p>本助成では特に Doa10 経路に着目して、最も単純な膜タンパク質である tail-anchor 型の人工基質を作製して、ERAD 全体を in vitro で再構成することを目指した。In vitro で tail-anchor 型の人工基質を転写翻訳させることに成功した。しかしながら、細胞から調製した小胞体画分への取り込み効率が5-10%しか得られなかった。その後のユビキチン化・サイトゾルへの抽出・プロテアソームによる分解を効率よく観察するには、少なくとも50%以上の取り込み効率が求められると考えている。現在は取り込み効率の上昇を目指すため、最近 tail-anchor 型基質の取り込みを促進すると考えられている Get complex の精製を行なっている。</p> <p>本研究ではまた、12回膜貫通タンパク質がユビキチン化を受けた後、サイトゾルへ抽出される経路の研究も行った。Floatation assay によって、膜結合型、サイトゾル可溶性の基質を効率よく分離することに成功した。現在は、基質の溶解度を保つのに必要な因子の探索を行なっている。</p>					
キーワード FA	小胞体	品質管理	膜タンパク質	分解	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入して下さい）									
雑誌	論文標題 GB								
	著者名GA		雑誌名GC						
	ページGF	～	発行年GE					巻号 GD	
雑誌	論文標題 GB								
	著者名GA		雑誌名GC						
	ページGF	～	発行年GE					巻号 GD	
雑誌	論文標題 GB								
	著者名GA		雑誌名GC						
	ページGF	～	発行年GE					巻号 GD	
図書	著者名HA								
	書名HC								
	出版者HB		発行年HD					総ページ HE	
図書	著者名HA								
	書名HC								
	出版者HB		発行年HD					総ページ HE	

欧文概要EZ（ワープロ作成原稿の切り貼りで結構です。）

Endoplasmic Reticulum-associated degradation (ERAD) is a part of the ER quality control that ensures only correctly folded proteins are transported to Golgi and to their final destination. Most ERAD substrates are degraded by the proteasome in the cytoplasm after ubiquitination by membrane-associated E3 ligase complexes. In yeast *Saccharomyces cerevisiae*, players involved in ERAD have intensively been searched over past ten years, however, it remains completely unclear how the ERAD substrates are specifically recognized and how these substrates are retrotranslocated to the cytosol before degradation. Our long term goal is to understand each biochemical reactions during ERAD and clarify the pathway through which specific substrates are degraded. Among the ER membrane proteins, tail-anchored proteins are the simplest and constitute a specific class. Taking advantage of its simple nature especially in vitro, we tried to develop the in vitro system that recapitulates the translocation, ubiquitination, extraction and degradation. Substrates were efficiently synthesized in vitro in rabbit reticulocyte lysate or in the PURESYSYSTEM. However, substrates were inserted into the ER-derived microsomes only up to -10% which was not efficient to see the subsequent steps. We are now trying to raise the insertion efficiency. We also investigated the mechanism by which misfolded polytopic membrane proteins were extracted after ubiquitination. We developed the assay to estimate the extraction of ubiquitinated substrates in vivo and succeeded in separating by floatation assay. We concluded that the extracted polytopic membrane proteins behave similarly to a soluble cytosolic protein in the cytoplasm. We are currently searching a bound protein which may keep the solubility of polytopic substrates.