

論文内容要旨

Role of the E3 ubiquitin ligase HRD1 in the
regulation of serotonin transporter function

(セロトニントランスポーターの機能制御における

E3 ユビキチンリガーゼ HRD1 の役割)

Biochemical and Biophysical Research

Communications, in press

医系科学研究科 神経薬理学

(主指導教員：酒井 規雄教授)

医系科学研究科 神経生理学

(副指導教員：橋本 浩一教授)

医系科学研究科 神経薬理学

(副指導教員：田中 茂講師)

田口 慧

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

セロトニントランスポーター(SERT) は、神経終末においてセロトニンを再取り込みすることにより、セロトニン神経伝達の終了を担う膜タンパク質である。SERT は気分障害、不安障害、自閉症などに関与する分子であり、抗うつ薬の作用点としてもよく知られている。SERT は、小胞体 (ER) で翻訳され、まず high mannose type の不完全な糖鎖修飾を受ける。その後ゴルジ体に運ばれ、完全な糖鎖修飾を受けた後に形質膜に発現することで機能を発揮する。そして、形質膜に発現した機能的 SERT はエンドサイトーシスにより細胞質に取り込まれリソソームにより分解されることが知られている。一方、折りたたみ不全が生じた SERT はほとんど形質膜には輸送されず、小胞体に蓄積する。折りたたみ不全が生じた SERT は小胞体において小胞体関連分解 (ERAD) により分解されると考えられている。しかしながら、その詳細な機構については未だに明らかにはなっていない。したがって、本研究では ERAD において中心的な役割を果たすユビキチンリガーゼである HRD1(HMG-CoA reductase degradation protein)に着目し、HRD1 が SERT 機能調節に与える影響を明らかにするため、以下の検討を行った。

実験には HRD1 を安定過剰発現させた HEK293 細胞および HRD1 si RNA を導入した COS7 細胞を用いた。これらの細胞に野生型 SERT (WT-SERT) および SERT の折りたたみ不全変異体と考えられる SERT C 末端欠損変異体(SERT Δ C)を発現させ、シクロヘキシミド(CHX)チェイスアッセイによる SERT 分解、免疫沈降による SERT ユビキチン化、SERT と HRD1 の相互作用、免疫染色による SERT と HRD の局在、SERT の基質取り込み活性、SERT タンパク発現を検討した。

CHX チェイスアッセイによって SERT タンパク質の分解に対する HRD1 の影響について検討した。HRD1 の過剰発現は WT-SERT および SERT Δ C の分解を有意に増強した。また、HRD1 si RNA による HRD1 のノックダウンは WT-SERT および SERT Δ C の分解を有意に抑制した。次に、HRD1 の過剰発現とプロテアソーム阻害剤 MG132 による処理が SERT のユビキチン化に及ぼす影響を調べた。HRD1 の過剰発現は SERT のユビキチン化を促進し、その効果はプロテアソーム阻害剤 MG132 を投与することでさらに増大した。免疫沈降の結果、HRD1 は MG132 の存在下で SERT と相互作用することが明らかになった。さらに免疫蛍光染色において HRD1 は細胞内に局在する SERT と一部共局在しており、特に ER 内の SERT Δ C の凝集体と共局在していることが観察された。最後に HRD1 ノックダウン COS-7 細胞を用いて、SERT のタンパク質発現レベルおよび取り込み活性に対する HRD1 の効果を調べた。HRD1 のノックダウンによって、SERT タンパク発現が有意に上昇した。また、トランスフェクションの 1 日後において基質取り込み活性も上昇した。これらの結果は、HRD1 が SERT のタンパク質レベルを変化させることで SERT の機能を調節していることを示唆している。

今回の研究において、完全な糖鎖修飾を受けた成熟 SERT の分解も HRD1 の影響を受けていることが示されたことから、正常に折り畳まれた SERT もまた、ERAD によって誤って分解される可能性が考えられる。あるいは、分子シャペロン等の作用により、折りたたみ不全 SERT を正常に折り畳まれた SERT に変換する ER ストレスに対する防御機構が存在する可能性もある。HRD1 は、折りたたみ不全 SERT の分解を促進するため、正常 SERT への変換が低下し、

結果として完全な糖鎖修飾を受けた成熟 SERT が減少する可能性も考えられる。

これらの結果から、HRD1 は ERAD を介した SERT の分解に関与することで、SERT の膜輸送と機能制御に寄与していることが示唆された。HRD1 は、様々な SERT 関連疾患の発症に関与している可能性がある。