

高等動物の小胞体におけるタンパク質の 構造形成経路と分解経路

蜷川 暁

小胞体は、膜タンパク質や分泌タンパク質の生合成の場であり、それらのタンパク質の品質管理を行っている。この品質管理機構は、タンパク質の立体構造形成機構と分解機構からなり、*N*型糖鎖依存性によって大別される。*N*型糖鎖依存経路においては、*N*型糖鎖のグルコースを含んだ構造が認識され糖タンパク質の構造形成が促進されるが、構造形成できないと*N*型糖鎖のマノースのトリミングが進み、糖タンパク質が分解に導かれる。糖鎖非依存経路においては、小胞体シャペロンが中心となり、基質の構造形成、分解を促す。分解機構の特徴として、最終的なタンパク質の分解が細胞質のプロテアソームによって行われることがあげられる。これらの基本的な分子メカニズムは酵母から高等動物まで保存されているが、本稿では、高等動物の小胞体タンパク質品質管理機構を主に概説し、特に*N*型糖鎖依存分解経路に焦点を当て詳しく述べる。

1. はじめに

小胞体は、全タンパク質のおよそ1/3のタンパク質が生合成される場であり、細胞にとって必要不可欠な役割を果たす。小胞体において、新規合成される膜タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体膜に結合したリボソームによって、翻訳共役的に小胞体へと送り込まれる。小胞体の内腔では、最もメジャーな小胞体シャペロンBiPなどが新生タンパク質に結合し、膜内への挿入に寄与する。小胞体におけるタンパク質の翻訳後修飾として、PDI (protein disulfide isomerase) ファミリーが媒介するジスルフィド結合形成や、Asn-X-Ser/Thr (X≠Pro) からなるコンセンサス配列のAsnに結合する*N*型糖鎖修飾がよく知られている¹⁻³⁾。*N*型糖鎖は小胞体に入る80%のタンパク質を修飾し、細胞内外の生命現象に深く携わっているため非常に重要である。

これらの過程や小胞体シャペロンなどに介助されて、タ

ンパク質はそれぞれが機能発揮できる構造を獲得し、ゴルジ体以降の分泌経路へと進む。一方でどうしても正しい立体構造を獲得できないタンパク質は、小胞体から細胞質へと再び送り返され、最終的に細胞質のユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。この一連のシステムを小胞体関連分解機構 (ER-associated degradation: ERAD) と呼ぶ⁴⁻⁶⁾。構造異常タンパク質は、分化の過程⁷⁾、遺伝的変異⁸⁾、薬剤による影響下⁹⁾ などにおいて生じやすいことがわかっている。

このように小胞体の恒常性は、タンパク質の構造形成と分解を厳密に制御することによって保たれる。小胞体での構造形成経路と分解経路の基本的な分子メカニズムは、酵母から高等動物まで保存されているが、高等動物では進化の過程において遺伝子が多岐化し、それぞれが重複もしくは差別化した遺伝子機能を持つようになっている。これによって、高等動物の小胞体タンパク質品質管理機構は、それぞれの組織の要求に応えられるような柔軟性も持ち合わせるようになったと考えられる。高等動物における小胞体の構造形成経路と分解経路は、*N*型糖鎖との関わりによって*N*型糖鎖依存経路と*N*型糖鎖非依存経路に大別される。糖鎖依存経路では、特定の*N*型糖鎖構造を認識するレクチン分子がタンパク質品質管理において重要な役割を果たす。

また小胞体関連分解において、その基質のトポロジーと構造異常部位によって分解経路が分類される。酵母では、小胞体の内腔領域に欠陥部位があるタンパク質をERAD-L

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学教室ゲノム情報発現学学科 (〒606-8502 京都市左京区北白川追分町)

Molecular mechanism of protein folding and degradation machinery in the mammalian endoplasmic reticulum

Satoshi Ninagawa (Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto University, Kitashirakawa-oiwake, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan)

本総説は2020年度奨励賞を受賞した。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930476

© 2021 公益社団法人日本生化学会

(lumen), 膜内に欠陥部位がある膜タンパク質をERAD-M (membrane), 細胞質側に欠陥部位がある膜タンパク質をERAD-C (cytosol) によって処理する¹⁰⁾。高等動物では, ERAD-Lは, 欠陥部位を持つ小胞体可溶性タンパク質を処理するERAD-Ls (luminal soluble), 小胞体内腔領域に欠陥部位を持つ膜タンパク質を処理するERAD-Lm (luminal

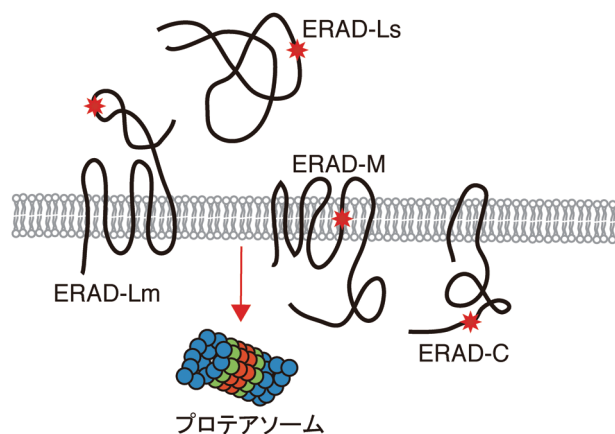


図1 高等動物における小胞体関連分解経路

基質のトポロジーとその構造異常の位置によって分解経路が違って来る。高等動物の小胞体関連分解においては, 可溶性タンパク質はERAD-Ls経路, 小胞体内腔側に構造異常部位がある膜タンパク質はERAD-Lm経路, 膜内領域に構造異常部位がある場合はERAD-M経路, 細胞質側に構造異常部位がある膜タンパク質はERAD-C経路によって分解処理される。酵母では, ERAD-Mと-Cに必要な分解因子の違いが明らかにされているが, 高等動物では, 明確な線引きは現在のところされていない。文献5より引用改変。

membrane) に分けられる (図1)¹¹⁾。これらのERAD経路では, それぞれに関わる小胞体関連分解因子群が異なっている。本稿では, 進化の過程で洗練されてきた上で複雑化している高等動物における小胞体タンパク質品質管理機構について, 特に筆者が研究を進めてきた糖鎖依存分解経路に着目し, まとめたい。小胞体関連分解における酵母と高等動物の相同点と相違点は, 最近筆者が執筆したレビューをご覧ください⁵⁾。

2. 糖鎖非依存構造形成経路と分解経路

高等動物の糖鎖非依存構造形成経路と分解経路において最もよく機能しているとされている分子は, 分子シャペロンであるBiP (GRP78) である。ヒトBiPは654アミノ酸からなり, N末端にはシグナル配列, nucleotide-binding domain (NBD) (25~408アミノ酸), C末端にはsubstrate-binding domain (SBD) (419~633アミノ酸) を持つ。BiPも含めたheat shock protein 70 (Hsp70) ファミリーは, ATP依存的に基質との結合・解離を行う。Hsp70ファミリー分子は, ATPが結合しているとオープンな構造になっており, この状態において基質の結合を待つ。そして, ATPが加水分解されADP結合型になると, 分子シャペロンはクロズドな状態に構造変化し, 基質と結合する¹²⁾。その後, nucleotide exchange factor (NEF) によって, 分子シャペロンからADPが放出され新たなATPが結合すると, 分子シャペロンは基質を解離し, オープンな構造に再び戻る (図2)。このサイクルはATPase活性を上昇させるJド

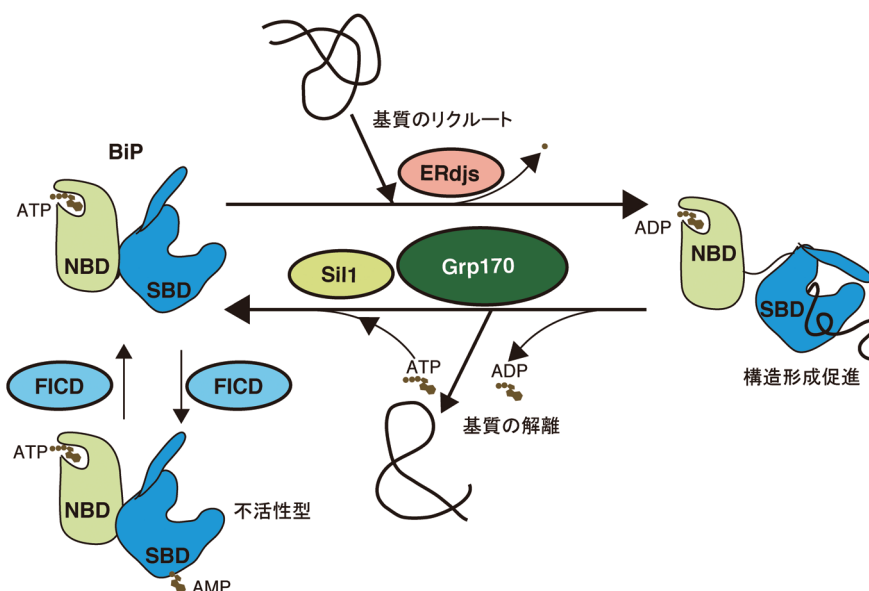


図2 糖鎖非依存構造形成の模式図

小胞体シャペロンBiPは, 基質の結合に伴い, ATPをADPに加水分解し, 基質をトラップする。ERdj3などのERdjファミリーは, 基質をBiPへリクルートし, ATP→ADPへの変換を促す。BiPによって基質の構造形成が促進されたのち, Grp170, Sil1などのヌクレオチド交換因子によってADPからATPへの交換や基質の解離が促される。近年, BiPはFICDによってAMP化, 脱AMP化されることがわかった。AMP化はBiPを基質と結合しにくくし, ERdjファミリーによるATP加水分解促進効果を抑制することで, 一時的に不活性型のBiPにする。NBD: nucleotide-binding ドメイン, SBD: substrate-binding ドメイン。

メインを有するDnaJタンパク質群によって制御されている。これらは分子シャペロンの機能を支援し、コシャペロンとも呼ばれる。特にBiPの場合、小胞体局在DnaJファミリー分子(ERdjs)が、その時々においてBiPとうまく協働することによって、基質の構造形成を助けたり分解を促進したりする必要不可欠な役割を果たしていると考えられている¹³⁾。このERdjsのうち、ERdj1, 2, 7は膜タンパク質として、ERdj3~6は可溶性タンパク質として発現する。以下にERdjsの役割を概説する。ERdj1は、小胞体へと合成されている新生鎖へBiPをリクルートすることに寄与する¹⁴⁻¹⁶⁾。ERdj2は、Sec63としても知られ、小胞体へのポリペプチド挿入の中心因子Sec61トランスロコンのコンポーネントであり、BiPと協働してSec61のチャネルを開くことを助ける^{17, 18)}。ERdj3は、基質と直接相互作用し、BiPへと基質を受け渡す¹⁹⁾。ERdj4とERdj5は、非糖タンパク質であるsurfactant protein Cの小胞体関連分解を促進すると報告された^{20, 21)}。ERdj4の遺伝子破壊マウスでは周産期において死に至りやすく、小胞体においてはプロインスリンの蓄積などがみられる²²⁾。チオレドキシン様ドメインを持つERdj5については、永田、潮田らによって精力的に解析がなされ、BiPと協働して機能し、小胞体関連分解に必要な還元酵素としての役割が報告された²³⁾。さらにERdj5は、LDL受容体の適切なジスルフィド結合形成にも寄与していることがわかった²⁴⁾。ただしERdj5の遺伝子破壊マウスは、目立った表現型が出ないため²⁵⁾、ERdj5の機能は、小胞体の酸化還元酵素が重複した機能を果たしていると考えられる。実際、小胞体において最もメジャーな酸化還元酵素PDIが、還元酵素として機能していることも明らかになっている^{26, 27)}。また最近では、ERdj5が、小胞体に局在するカルシウムポンプであるSERCA2bのシステインを還元することによってSERCA2bを活性化させ、小胞体のカルシウム濃度上昇に寄与することも明らかにされた²⁸⁾。小胞体ストレスによって転写誘導されるERdj6(p58)²⁹⁾は、シグナル配列を有しているが、小胞体のストレス状態によって細胞質局在³⁰⁾と小胞体局在³¹⁾が報告されている。ERdj6は、細胞質では翻訳共役的な分解促進効果³⁰⁾、小胞体ではBiPと協働するコシャペロンとしての機能が提案されている³¹⁾。ERdj7は、プロテオミクス解析によって同定されたが、機能的な解析は進んでいない³²⁾。

小胞体のNEFとしては、Grp170(HYOU1, ORP150)とSil1(BAP)がある。Grp170はNEFとしての役割だけではなく^{33, 34)}、直接基質に結合しシャペロンとしても機能する^{35, 36)}。近年では、Grp170が非糖タンパク質の分解に寄与すること³⁷⁻³⁹⁾や、基質の凝集を防ぐ効果も報告されている⁴⁰⁾。Sil1のNEF活性は2002年に示され、BiPが多く存在する分泌組織にSil1も多く存在する⁴¹⁾。ただしSil1は、Grp170とは異なり小胞体関連分解には寄与しない³⁸⁾。BiPに対するNEF活性だけでは小胞体関連分解を促進するには至らないようである。細胞内においてBiP, ERdj3, ERdj4, ERdj5, Grp170がどのようなポリペプチド鎖と直接結合し

やすいか調べたところ、BiPとERdj3はさまざまなポリペプチド鎖に広く結合した一方で、ERdj4, ERdj5, Grp170は凝集しやすい特定のポリペプチド鎖との結合がみられた⁴²⁾。コシャペロン、NEFに基質の嗜好性があると考えられ、それぞれがうまく使い分けられることによって、小胞体内の恒常性維持に貢献していると推測される。

またBiPのSBD内のThr518は、FICD(FIC domain-containing ER-localized enzyme)によってadenosine monophosphate (AMP)化、脱AMP化される^{43, 44)}。AMP化したBiPは、不活性化状態となり、ERdjsによるATPase活性促進効果をあまり受けず、基質との解離を6倍早める⁴⁵⁾。BiPの基質に対するジスルフィド結合の導入は、BiPと相互作用する酸化還元酵素P5⁴⁶⁾や、PDIなど^{47, 48)}のPDIファミリーによってなされることが考えられる。数あるPDIファミリー分子がそれぞれどのような基質を好んで酸化するのは、これからの解析が待たれる。

これらのようにBiPを中心として、小胞体の糖鎖非依存構造形成、糖鎖非依存分解経路が形成されている。BiPによって構造形成が促進されているタンパク質がどのタイミングで分解へと向かうのかは明確にはわかっていない。ERdj4, ERdj5, Grp170は分解への寄与も報告されているため、これらの分子の基質への結合が一つの引き金になるのかもしれないが、今後明らかにされるべき課題である。

3. N型糖鎖依存構造形成経路と分解経路

1) N型糖鎖依存構造形成経路とグルコースのトリミング

新生タンパク質に対して翻訳共役的に付加されるN型糖鎖は三つのグルコース、九つのマンノース、二つのN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)によって構成され、これをGlc₃Man₉GlcNAc₂(G3M9)と呼ぶ(図3A, B)。三つのグルコースのうち、α1,2結合した最外部のグルコースがGlucosidase Iによって一つトリミングされる⁴⁹⁾。次に、Glucosidase IIによってα1,3結合した二つのグルコースがトリミングされるが、この二つ目と三つ目のグルコーストリミング反応は連続的には起こらない^{50, 51)}。最初のグルコースがトリミングされることによって生じるG2M9は、糖鎖を認識するレクチンタンパク質Malectinによって認識される^{52, 53)}。このMalectinによるG2M9の認識は、構造異常タンパク質の分泌の抑制に寄与する可能性が提示されている。というのも、Malectinの過剰発現は、N型糖鎖付加部位を三つ持つ可溶性モデル分解基質であるNHKのメディアウム中への分泌を抑制し、小胞体のタンパク質品質管理を強めるからである⁵⁴⁾(NHKは、null Hong Kongの略称で、全長418アミノ酸のタンパク質であるα1-antitrypsinの342番目のアミノ酸のコドンにTCの2塩基欠損が起きフレームシフトした結果、357アミノ酸のタンパク質として発現している。NHKとα1-antitrypsinの全長を比較すると、NHKはC末端領域を20%欠失した変異体である)。G1M9は、小胞体のレクチンシャペロンであるCalnexin

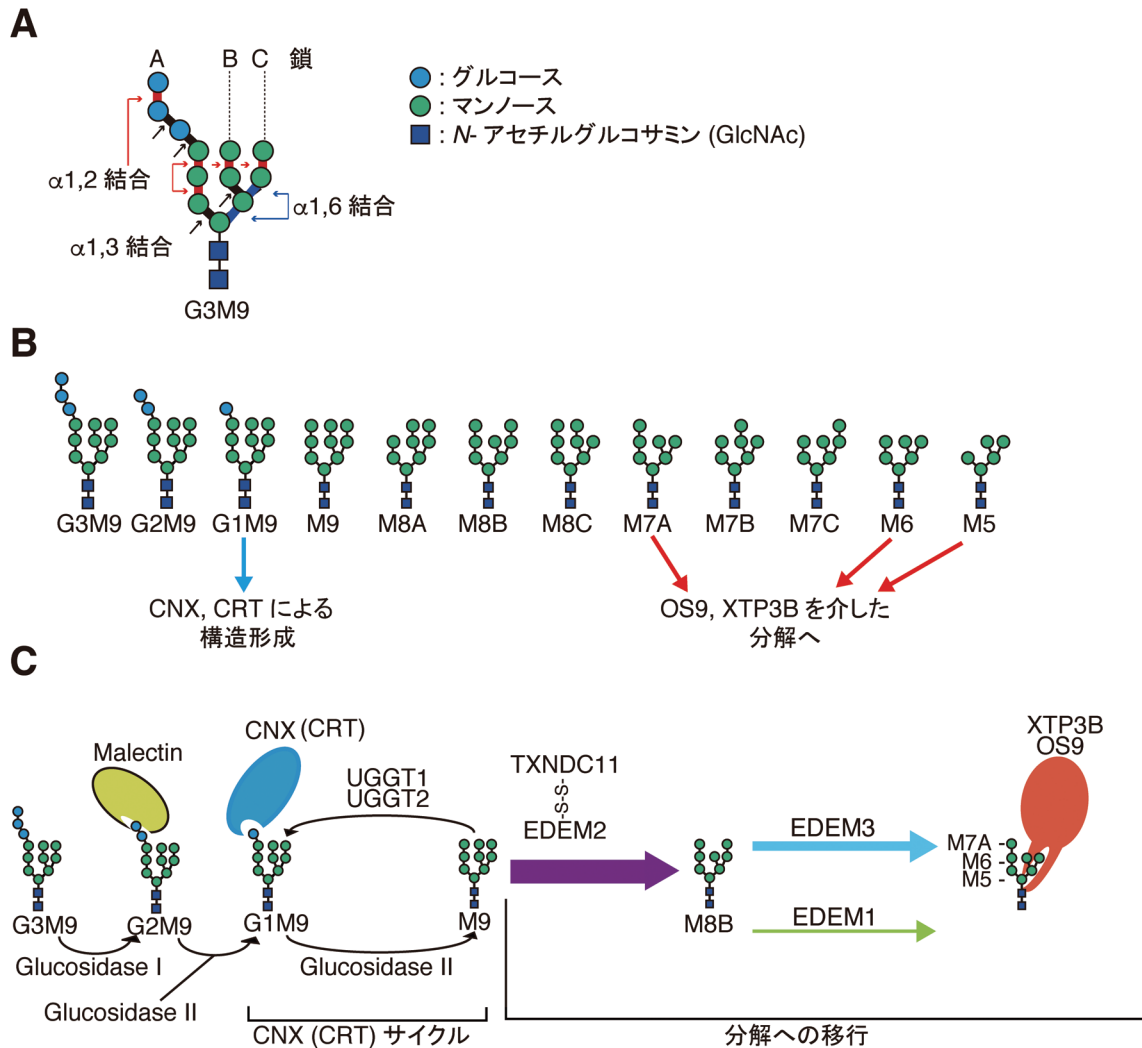


図3 N型糖鎖とそのトリミング経路の模式図

(A) N型糖鎖は、三つのグルコース、九つのマンノース、二つのN-アセチルグルコサミンからなる。左からA, B, C鎖と呼ぶ。α1,2結合は赤、α1,3結合は黒、α1,6結合は青によって示した。(B)それぞれのN型糖鎖の名称とその糖鎖構造を認識するレクチンによって促進される効果を示した。(C)小胞体におけるN型糖鎖のトリミング経路を示した。G3M9はGlucosidase Iによってトリミングされる。G2M9を持つ糖タンパク質は、Malectinによって認識され、Glucosidase IIによってトリミングを受ける。G1M9を持つ糖タンパク質は、レクチンシャペロンであるCNXやCRTによって認識され、構造形成が促進される。M9を持つ糖タンパク質は、タンパク質部分が構造形成していないと、UGGT1やUGGT2によってグルコースの再付加が行われ、糖鎖がG1M9となり、再びCNXやCRTによって糖タンパク質の構造形成が試みられる。これをCNX (CRT) サイクルと呼ぶ。M9は、安定的なジスルフィド結合形成したEDEM2-TXNDC11複合体によってトリミングされM8Bとなる。M8BからはEDEM1や主にはEDEM3がトリミングを行い、C鎖最外部のマンノースが一つトリミングされることによってα1,6-マンノシル結合が露出する。すると、それをレクチン分解因子OS9やXTP3Bが認識し、基質が分解へと導かれる。M8Bからどのような経路によってC鎖のα1,6-マンノシル結合が露出されるかは、詳しくわかっていない。M9から少なくとも2段階のマンノースのトリミングが分解シグナル露出に必要とわかる。文献5より改変引用。

(CNX) や、そのホモログである Calreticulin (CRT) に認識され、糖タンパク質の構造形成に寄与する^{55, 56)}。CNXは細胞質側のC末端に小胞体局在するためのRKPRREモチーフ（ダブルリシンモチーフに類似）を持つ膜タンパク質である。CRTは小胞体内腔側のC末端に小胞体局在シグナルであるKDEL配列を有する可溶性タンパク質である⁵⁷⁾。CNX, CRTともにproline-richドメイン（Pドメイン）を有し、ここで酸化還元酵素ERp57と結合する⁵⁸⁻⁶⁰⁾。ERp57は、Pドメイン結合領域を介してこれらレクチン

シャペロンと結合し、基質のジスルフィド結合形成を促進する。CNX, CRTにはそれぞれの基質特異性があり、CNXはヘマグルチニンなどの構造形成を促進しやすく^{61, 62)}、CRTはMHC class I⁶³⁾、bradykinin receptor⁶⁴⁾、A1AT ATZ⁶⁵⁾などの構造形成を促しやすい。一般的には、CNXは膜に近い基質を、CRTは可溶性の基質を好むともいわれている^{3, 66)}。M9までトリミングされた際に、糖タンパク質が構造形成していれば各々の機能すべき場へと輸送されるが、構造形成されていないと、UGGT1によって糖タンパ

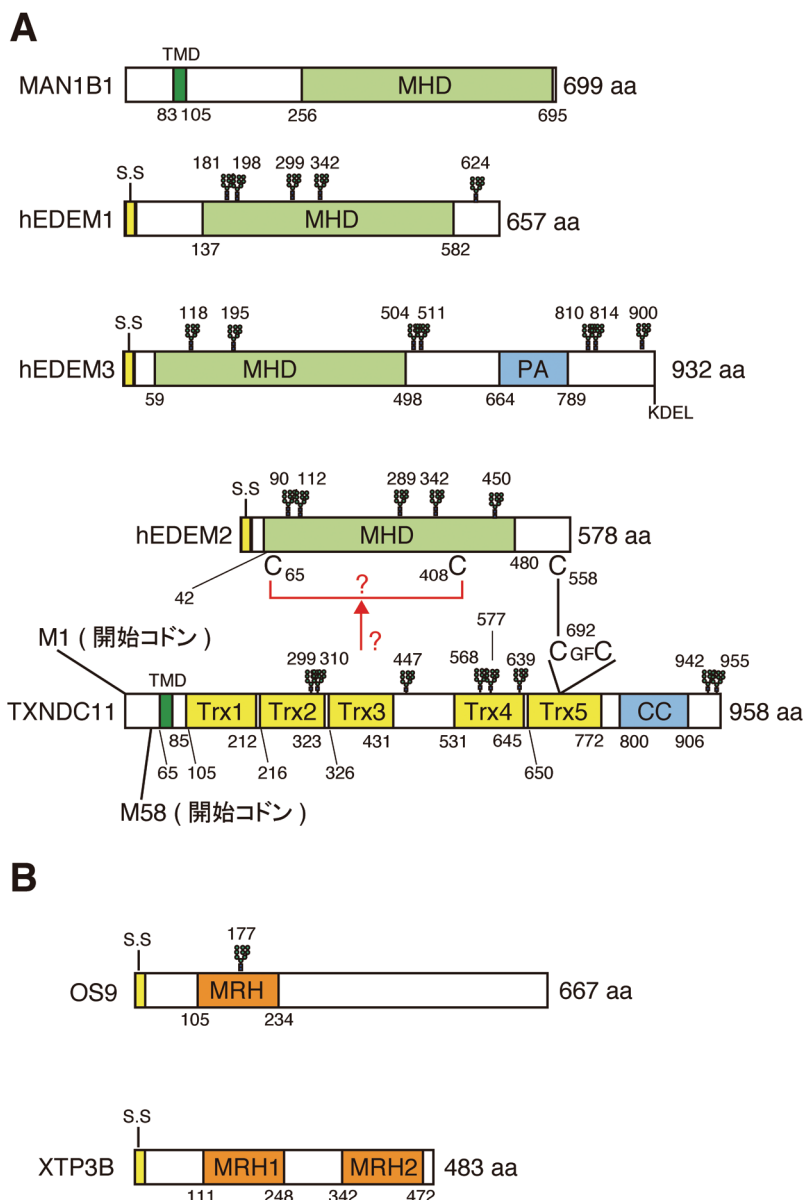


図4 *N*型糖鎖のマンノーストリミング酵素とマンノース構造認識レクチン分子の模式図

(A)それぞれmannosidase homologyドメイン (MHD)を持つ。S.S.はシグナル配列、TMDはトランスメンブレンドメインを表す。EDEM3は、プロテアーゼ相互作用ドメイン (PA)、TXNDC11は、チオレドキシン様ドメイン (Trx) やコイルドコイルドメイン (CC)を持つ。EDEM2のC558は、TXNDC11 Trx5内CXXCモチーフのN末端側のシステイン残基C692とジスルフィド結合形成する。この結合がEDEM2の酵素活性発揮に必要である。TXNDC11は二つの翻訳開始メチオニン (M1とM58)を有し、M1から翻訳開始した場合には、I型の膜タンパク質として発現するが、M58から翻訳開始した場合には、TMDがシグナル配列として機能し、可溶性TXNDC11が発現する。EDEM2のC65とC408も活性に必須であり、酵母の知見よりこれらがジスルフィド結合を形成している可能性がある。TXNDC11がこのジスルフィド結合形成を媒介しているかもしれない。(B)OS9, XTP3BにはMRH (mannose-6-phosphate receptor homology)ドメインが存在し、*N*型糖鎖構造を認識する。XTP3Bには二つのMRHドメインがあるが、その機能は議論されている。文献5より改変引用。

ク質のM9糖鎖にグルコースが再付加されG1M9となり、再びCNX/CRTによって構造形成が試みられる。この点からUGGT1はフォールディングセンサー酵素とも呼ばれている。*N*型糖鎖のグルコースの糖鎖構造を基盤としたこの精巧な構造形成サイクルをCNX (CRT) サイクルと呼ぶ (図3C)^{55, 56)}。UGGT1のパラログとしてUGGT2があり、UGGT1と比べて弱いグルコース付加活性を持つ⁶⁷⁾。最近、UGGT1は比較的大きな膜タンパク質を、UGGT2は

比較的小さな可溶性のタンパク質を基質として好むと報告された⁶⁸⁾。またグルコースの再付加による糖タンパク質の構造形成への寄与は限定的であり、CNX, CRTによって少なくとも一度G1M9の糖鎖を持つ基質の構造形成が促進されることの方が大きな意義を持つことが明らかになった。分泌タンパク質は、これらの構造形成過程を経て正しい立体構造を獲得し、ゴルジ体以降の分泌経路へと進むが、どのような*N*型糖鎖構造を有した状態において分泌さ

れていくかは明確にはわかっていない。構造形成に時間がかかる糖タンパク質は、よくトリミングされたN型糖鎖を有して次の区画へ輸送されると推測される。レクチン輸送因子ERGIC53はさまざまな構造のN型糖鎖に広く結合するが、レクチン輸送因子VIP36, VIPLはあまりトリミングが進んでいないN型糖鎖と相互作用しやすい⁶⁹⁾。小胞体から輸送された糖タンパク質はゴルジ体へ到達し、ゴルジ体では、高マンノース型N型糖鎖のマンノースをさらに刈り込んだ後に種々の糖転移酵素が複合型N型糖鎖へと修飾することが知られている。単糖ずつ刈り込むゴルジ体マンノシダーゼ群に加えて⁷⁰⁻⁷²⁾、1~3糖のグルコースが連結されたA鎖の最外部のマンノースを切除し、一度に2~4糖を遊離させる活性を持つendo- α -1,2-mannosidase (MANEA)⁷³⁻⁷⁵⁾も主にはゴルジ体(84%)や小胞体-ゴルジ体中間コンパートメント(15%)に存在しているため⁷⁶⁾、細胞はさまざまなN型糖鎖を持つ糖タンパク質に対して、ゴルジ体において柔軟に対応できるようにしていると考えられる。

2) N型糖鎖依存分解経路とマンノーストリミング

小胞体におけるM9からのマンノースのトリミングは、糖タンパク質が構造形成する段階から分解される段階へと導くことを意味する。そのためマンノースのトリミングは糖タンパク質の運命を決定するため、分子メカニズム解明の意義が大きい。しかし、高等動物におけるN型糖鎖のマンノース切除機構は、長年議論されていた。マンノースの切除を実行するマンノシダーゼ酵素の候補は、glycosyl hydrolase family 47 (GH47ファミリー)に属しmannosidase homologyドメイン(MHD)を持つMAN1B1(ER mannosidase I, ERman1)と、EDEM1(ER degradation enhancing α -mannosidase like protein1)、EDEM2、EDEM3からなるEDEMファミリーである(図4A)。MAN1B1は、II型の膜タンパク質として発現し、内腔側に大きなドメインを持ち、M9からM8Bへのトリミング活性が、細胞内の過剰発現や*in vitro*活性測定によって示された^{77, 78)}。また酵母のM9からM8Bへとトリミングを行うMns1とオーソログであることから、この知見は広く受け入れられた。MAN1B1の小胞体局在に関してはMAN1B1の細胞内における過剰発現により、CRTと共局在することから示されていた。そしてMAN1B1のM9からM5までのトリミング活性も遺伝子抑制法⁷⁹⁾や*in vitro*活性^{80, 81)}により支持され、小胞体における中心的なマンノシダーゼとしての機能は2000年代には疑念はなかった。しかし、2011年のSifersらの仕事によって状況が一変した。というのも、内在性MAN1B1を認識できる抗MAN1B1抗体による免疫染色によって、内在性MAN1B1はゴルジ体に存在することが明確に示されたからである^{71, 82)}。またMAN1B1にはゴルジ体においてのみ起こる修飾であるシアル酸の糖鎖付加も起こっていた。その後MAN1B1の結合タンパク質が網羅的に同定され、細胞質側にて γ -COPと作用することに

よって、小胞体関連分解基質をゴルジ体から小胞体へ送り返し、小胞体関連分解に貢献するという新規機能が示された⁸³⁾。MAN1B1の小胞体関連分解を促進する機能に、小胞体内腔側の酵素活性ドメインは必要なく、細胞質側が重要なことが明らかにされた^{84, 85)}。MAN1B1の細胞質側に小胞体関連分解を促す機能があることは驚きではあるが、進化的にも保存された酵素活性ドメインの細胞内の意義の解明が今後待たれる。

内在性MAN1B1のゴルジ体局在が明らかになり、小胞体においてM9からM8Bへとトリミングを行う酵素の分子実体が大きな問題となり、2014年に糖質の専門誌にも取り上げられている⁸⁶⁾。その候補として残るのはEDEM1、EDEM2、EDEM3であったが、その酵素活性については当時議論され続けていた。小胞体ストレス応答によって転写誘導される膜タンパク質として同定されたEDEM1は、精製しても酵素活性は得られなかったことや、マンノシダーゼとして機能するためのシステインが保存されていないことから、糖鎖を認識するレクチン活性があるのではないかと提案された⁸⁷⁾。そしてEDEM1のレクチン活性によって、小胞体膜上の小胞体関連分解因子SEL1Lを認識することで、基質を逆行輸送複合体へ運ぶことも示唆された⁸⁸⁾。一方でEDEM1の細胞内過剰発現によって、A鎖⁸⁹⁾もしくはC鎖⁹⁰⁾のマンノースをトリミングする活性が提案された。またCNXの膜領域とEDEM1の膜領域が相互作用し、CNXから基質を受け取っていることも報告された^{91, 92)}。ただしその後、EDEM1は可溶性タンパク質であると示されている⁹³⁻⁹⁵⁾。EDEM1とのホモロジーサーチによってEDEM1のパラログであるEDEM2とEDEM3が同定された。EDEM2は、その細胞内過剰発現により小胞体関連分解を促進することが示された^{94, 96)}。またEDEM2の精製タンパク質は酵素活性を発揮せず、マンノシダーゼ活性はないと報告されていた⁹⁶⁾。またEDEM3の細胞内過剰発現によってマンノースのトリミングを促進した結果、基質の分子量が小さくなったためにSDS-PAGEにおいて移動速度が上がった位置にバンドが出現することが示され、その酵素活性が支持されていた⁹⁷⁾。これらのようにEDEMファミリーのマンノシダーゼ活性の有無は議論され、サイエンスが大きく前進しない状況が続いていた。そこで、筆者らは内在性の遺伝子機能を強力に解析するために、組換えの起こりやすいニワトリBリンパ細胞であるDT40細胞と、その後のゲノム編集の技術革新に伴ってヒト結腸がん細胞であるHCT116細胞を用いて小胞体マンノシダーゼ候補群の遺伝子破壊株を作製した。そして細胞全体の糖鎖組成を調べると、予想外なことにEDEM2ノックアウト(KO)細胞では、マンノシダーゼ阻害剤であるキフネンシン処理と同程度までM9の量が顕著に増加していた。EDEM3 KO細胞、EDEM1 KO細胞ではM8Bの量が、この順に増加していた。ニワトリDT40細胞においてのみ作製したMAN1B1 KO細胞では、M9の量はあまり増加しなかったため、MAN1B1よりもEDEM2の方がはるか

にM9からのトリミングに貢献していることもわかった。個別の基質に関してもEDEM2 KO細胞やキフネンシン処理において、糖鎖のトリミングが抑制された結果、SDS-PAGEにおいてバンドが上方に出現した。EDEM2 KO細胞にEDEM2を戻すとバンドが下方にシフトし、マンノーストリミング活性が検出されたが、EDEM2の活性中心に点変異を入れたEDEM2 E117Q変異体では、マンノシダーゼ活性は戻らず、下方へのバンドシフトはみられなかった。EDEM2を遺伝子破壊することによって他のタンパク質が不活性化したということではなく、EDEM2の酵素活性中心が、機能していることがわかる。これらの明快な結果より、M9からはEDEM2が、M8BからはEDEM1と主にはEDEM3がトリミングを行うという従来のモデルを一新する小胞体でのN型糖鎖のマンノースのトリミングモデルを提唱した(図3C)⁹⁸⁾。酵母では、M8Bのみが多く検出されることに対して、高等動物ではM9とM8Bが蓄積されていたため、M9→M8B、M8Bからのマンノーストリミングによって分解基質を少なくとも2段階で選別するというダブルチェック機構の提案も初めて行った。筆者らが内在性の分解基質として同定した、糖鎖を三つ持ち糖鎖依存分解経路によってもっぱら分解されるATF6⁹⁹⁾も、糖鎖トリミングの貢献の大きい順、すなわちEDEM2 KO細胞、EDEM3 KO細胞、EDEM1 KO細胞の順に分解がよく遅延していた。

しかし上記モデルは、EDEM2には*in vitro*活性がない⁹⁶⁾、もしくは微弱である¹⁰⁰⁾と主張され、一部の研究者には受け入れられなかった。新規モデルの確立には、細胞内の強力な活性を支持するようなEDEM2の明確な*in vitro*活性の検出が必要であった。EDEMの酵母オーソログHtm1は、酸化還元酵素Pd1とジスルフィド結合を形成し、酵素活性を示すことがわかっていた¹⁰¹⁻¹⁰³⁾。筆者らはEDEM2単独では*in vitro*酵素活性の検出が難しいことがわかっていたため、Htm1と同様に、酸化還元酵素などとEDEM2が複合体を形成するのではないかと考え、細胞溶解液に対して非還元SDS-PAGE実験を行った。すると、75%程度のEDEM2が何かとジスルフィド結合を作り、複合体を形成していることが明らかになった。ジーントラップ法やCRISPRスクリーニング法により、小胞体関連分解の基質としてMHC class Iの分解を促す機能を持つと同定されたTXNDC11は、チオレドキシンドメインを五つ有しており、そのうちのCXXCモチーフを唯一持つTrx5に還元活性があるレダクターゼではないかと提案されていた。またTXNDC11は、EDEM2やEDEM3とも結合すると報告されていたため、この分子に筆者らは着目した。そしてTXNDC11 KO細胞ではEDEM2のジスルフィド結合依存的な複合体のバンドが消失することを見だし、TXNDC11がEDEM2と安定的な複合体を形成することを明らかにした。さらにTXNDC11 KO細胞では、EDEM2の細胞内酵素活性がなくなることがわかった。TXNDC11 KO細胞にTXNDC11を戻すとEDEM2の細胞内酵素活性が戻るが、

EDEM2とジスルフィド結合するシステインに点変異を入れたTXNDC11 C692Sを戻してもEDEM2の活性が戻らなかった。またEDEM2のC558A変異体だとTXNDC11とジスルフィド結合による安定的な複合体が消失し、酵素活性も失活していた。これらからTXNDC11 Trx5内CXXCのN末端側のC692がEDEM2のC558と安定的なジスルフィド結合形成することが、EDEM2の細胞内の酵素活性発揮に必要であると結論づけた。また当初の目的どおり、EDEM2-S-S-TXNDC11の精製を行い、遊離糖鎖M9と反応させると、明確なM8Bへのトリミング活性がついに検出された¹⁰⁴⁾。そして、これは精製の難しいEDEMファミリーにおいてどの糖鎖からどの糖鎖へとトリミングが起こっているか、はっきりと示す初めての報告となった。これにより2014年に筆者を中心として打ち立てた新規モデルが確立されたと考えている(図3C)。今後の反響を待ちたい。

EDEM3に関しては、ERp46がそのマンノシダーゼ活性を増強することが示されている。細胞内において、EDEM3単独の過剰発現によって、NHKの糖鎖のトリミングが進んだ結果、SDS-PAGEした際、NHKに由来する下方にスミアなバンドが多く出現する。その実験系にEDEM3に加えてERp46も過剰発現させると、さらに多くのNHKのスミアなバンドが検出された。また精製EDEM3と精製TCR α を反応させても、下方にスミアなバンドが現れたが、精製ERp46をそこに加えると、さらに多くのスミアなバンドが出現することが示された¹⁰⁵⁾。ただし、内在性EDEM3は、EDEM2とは違い、細胞内において何かと安定的なジスルフィド結合形成をしていないこともわかっているため(筆者ら未発表データ)、ERp46がEDEM3の酵素活性発揮に必須なのかどうかと、非常に興味深い点も残されている。EDEM3がM8Bからどのような経路によってトリミングを行い、分解シグナルとなる α 1,6糖鎖エピトープを露出させているのかも明らかにされていくべき課題である。またEDEM2と、EDEM1、EDEM3にはトリミング活性の違いがあるが、どのようにしてそれぞれの基質に特異的に働いているのかということも未解明である。基質を認識するマンノシダーゼ活性中心のポケットの構造などが明らかになれば、これが解決されると期待される。

3) α 1,6糖鎖エピトープ認識レクチン

酵母における小胞体関連分解の結果から、EDEMファミリーによってN型糖鎖のマンノーストリミングが進むと、それをレクチン因子が認識し分解を促進すると考えられるようになっていた。高等動物において、酵母レクチンのオーソログはOS9とXTP3Bの二つがある。OS9には糖鎖を認識するとされるmannose-6-phosphate receptor homology (MRH) ドメインが一つ存在し、XTP3BにはMRHドメインが二つ存在する(図4B)。OS9は、骨肉腫¹⁰⁶⁾や骨髄性白血病¹⁰⁷⁾において増加する遺伝子として同定され、細胞質で機能し、HIF-1 α と結合し分解を促すことが報告されていた¹⁰⁸⁾。しかしOS9にはシグナル配列があるため、小胞

体内腔における機能があると自然に考えられた。そして OS9 は、N 型糖鎖の C 鎖最外部のマンノースが一つトリミングされることによって露出する α 1,6 糖鎖エピトープを MRH ドメインによって認識し¹⁰⁹⁻¹¹²⁾、小胞体関連分解を促進することが示された¹¹³⁻¹¹⁵⁾。OS9 の構造も解かれ、OS9 は WW (ダブルトリプトファン) モチーフを中心として、C 鎖の露出した Man α 1, 6Man α 1, 6Man の三糖の認識を行うことが報告された¹¹¹⁾。また逆行輸送の中心となる E3 リガーゼ複合体に GRP94 と OS9 は協働して分解基質を運ぶことも示唆されている¹¹³⁾。

XTP3B に関しては、アフリカツメガエルにおいて、頭部形成に寄与する Krm2 に結合する因子として最初に同定された¹¹⁶⁾。その後 XTP3B の機能は OS9 と重複せず、小胞体関連分解には寄与しないと報告されていた^{113, 114, 117)}。むしろ XTP3B は、細胞内における過剰発現により小胞体関連分解を阻害するとも報告されていた^{117, 118)}。OS9 と XTP3B の両遺伝子抑制実験はいくつかの論文において行われていたが^{113, 114)}、一つの報告のみ、基質分解が大きく遅延し、OS9 と XTP3B の機能が重複し、小胞体関連分解に XTP3B が貢献すると発表していた¹¹⁾。XTP3B に二つ存在する MRH それぞれの *in vitro* 活性も解析されており、精製した XTP3B-Fc 融合タンパク質を用いて、XTP3B の N 末端に存在する MRH1 にはレクチン活性がなく、C 末端に存在する MRH2 が M5 などを認識することが示された¹¹⁹⁾。精製した Trigger factor-XTP3B を用いて、MRH2 がマンノースのトリミングが進んでいない M9 を認識するという別の報告もあった¹¹⁷⁾。

こうした中、OS9 と XTP3B のダブル KO (DKO) 細胞の解析が遂行され、OS9 と XTP3B の機能が重複しており、両者が小胞体関連分解を促進しているという報告がなされた。この明確な根拠として、OS9, XTP3B の DKO 細胞において、SDS-PAGE すると通常より下方に出現する N 型糖鎖を三つ持つ内在性分解基質 CD147 のバンドが検出された。これは、OS9 や XTP3B がいないため、糖鎖がよくトリミングされた CD147 が分解されず残ってきたと考えられる。このバンドはそれぞれのシングル KO 細胞、すなわち OS9 KO 細胞や XTP3B KO 細胞では検出されない。また精製 XTP3B の *in vitro* の結果とは矛盾しているが、XTP3B の MRH1 がその分解に必要なこともわかった。さらに意外なことに、OS9 KO 細胞では、XTP3B がより機能するようになり、N 型糖鎖付加部位を変異させた糖鎖を持たない NHK-QQQ の分解が遅延することも示された。非糖分解基質に対して XTP3B が機能することは一見驚きであるが、OS9 がない場合、XTP3B が MRH2 を介して SEL1L の五つある N 型糖鎖のうち、よくトリミングが進んでいる 4 番目の N431 の N 型糖鎖に結合し、非糖分解基質の分解を抑制するようである。まとめると、XTP3B は、分解すべき糖タンパク質に対しては MRH1 ドメインを介して分解を促進し、OS9 がない場合、分解すべき非糖タンパク質に対しては MRH2 ドメインを介して SEL1L に結合し分解を

抑制する¹²⁰⁾。XTP3B の MRH1 の分解促進機能と MRH2 の分解抑制機能の基質に応じた使い分けの意義、*in vitro* 糖鎖結合解析の結果との矛盾点の解決は今後の課題といえる。XTP3B の MRH1 は、おそらく α 1,6 糖鎖エピトープを認識すると考えられるが、*in vitro* においてどのような条件においてそれを認識するのかという点は興味深い。何かと複合体などを形成する可能性も考えられる。XTP3B にも、MRH2 には WW モチーフが存在し、ヒト、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、カタユウレイボヤ、ショウジョウバエまで保存されており (筆者による配列比較)、XTP3B の機能の根幹をなすと予想される。XTP3B において、そもそもなぜ二つの MRH ドメインを持つ機能が必要になったかという疑問点も、MRH それぞれの役割が整理されてくると明らかになるかもしれない。OS9, XTP3B ともに小胞体ストレス応答によって転写誘導され¹¹⁷⁾、小胞体関連分解の分解キャパシティによっても OS9 の量が制御される¹²¹⁾。OS9 と XTP3B の量比が、小胞体関連分解における糖タンパク質と非糖タンパク質の分解の微妙な強弱の調節をしているのかもしれない。

4) N 型糖鎖依存分解経路と非依存分解経路

酵母において、carboxypeptidase yscY (遺伝子名: Prc1) の G255R 変異体である CPY* は、小胞体関連分解のモデル基質として最もよく使われている。四つある CPY* の N 型糖鎖付加部位をなくした CPY*0000 では、分解が顕著に抑制されるため¹²²⁾、酵母の小胞体関連分解には N 型糖鎖が必須のように解釈されていた。一方で細胞内の遊離糖鎖の量としては、分解シグナルを呈していない糖鎖構造である M8B が最も多く、糖タンパク質も糖鎖に依存しない糖鎖非依存分解経路によっても処理されているとも考えられている^{123, 124)}。高等動物においては、NHK-QQQ の半減期は、NHK よりも早まり、この点において酵母と高等動物は大きく違うシステムによって機能していると考えられた^{120, 125)}。そのため筆者らは、高等動物において、N 型糖鎖依存分解経路と非依存分解経路の役割を詳細に調べた。ニワトリ DT40 とヒト HCT116 において N 型糖鎖のマンノースのトリミングが停止し、糖鎖依存分解経路がまったく機能しなくなる EDEM1, EDEM2, EDEM3 の多重遺伝子破壊株である EDEM トリプル KO (TKO) 細胞を作出し、解析に用いた。比較的構造形成していると考えられる ATF6, CD3 δ - Δ TM, EMC1 の分解は、もっぱら糖鎖依存分解経路に依存していた。一方で、全体の 20% の領域を欠失しているシビアナ構造異常領域を持った NHK は、EDEM TKO 細胞において初期の分解遅延が確認されたが、最終的には野生型細胞同様に分解処理された。これらの基質は共通の性質として N 型糖鎖を三つ有しており、CD3 δ - Δ TM と NHK はともに可溶性タンパク質である。そこで CD3 δ - Δ TM と NHK の基質の挙動の違いは、構造異常の度合いに由来すると仮定し、CD3 δ - Δ TM の β strand の中央にプロリンとアラニンの繰り返し配列 7 アミノ酸を挿入し構造を

大きく壊したCD3 δ - Δ TM-(33-7aa-34)と、EMC1の他のタンパク質との相互作用に関わっていると予想されるPQQ-likeドメインの大部分を欠失させたEMC1- Δ PQQを作製した。その結果、CD3 δ - Δ TM-(33-7aa-34)とEMC1- Δ PQQでは、NHKの挙動同様、EDEM TKO細胞において早い時間帯での分解遅延が観察されたが、最終的には野生型細胞の場合と同様に分解された。変異を入れたタンパク質の構造がより壊れていることは、トリプシン感受性アッセイ¹²⁶⁾や、筆者らが開発したPNGase感受性アッセイ^{127, 128)}

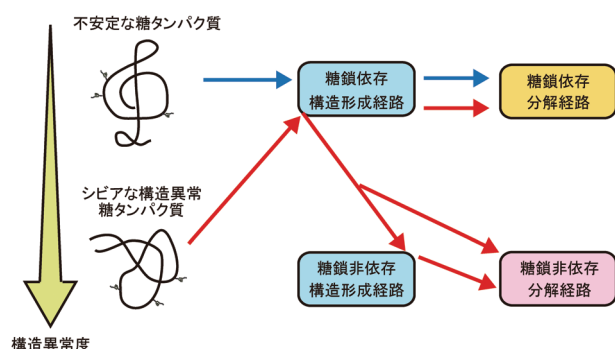


図5 糖タンパク質の分解経路は、構造異常の度合いによって決定される

不安定な糖タンパク質は、糖鎖依存構造形成経路に入り構造形成が促進された後、構造状態が悪いと糖鎖依存分解経路によって分解処理される（青矢印）。構造異常の度合いの高いシビアな構造異常糖タンパク質は、糖鎖依存分解経路に加えて糖鎖非依存分解経路によって分解処理される（赤矢印）。より毒性が高いと考えられるシビアな構造異常を持った糖タンパク質は糖鎖依存分解経路と糖鎖非依存分解経路の2経路により確実に分解される^{118, 127, 128)}。シビアな構造異常糖タンパク質が糖鎖非依存分解経路によって分解される経路の分子メカニズムは、未解明である。

によって示した。これらの結果より、高等動物において構造異常の度合いの高い分解基質は、糖鎖依存分解経路に加えて糖鎖非依存分解経路によって分解されることがわかった（図5）¹²⁹⁾。この報告に次いで、同様の報告が他誌に掲載されている^{120, 130)}。より毒性が高いと考えられるシビアな構造異常糖タンパク質を、二つの経路により確実に分解処理するシステムによって、高等動物は小胞体の恒常性を維持していると考えられる。

4. 小胞体膜上での小胞体関連分解因子の役割

1) 小胞体関連分解に関わるE3ユビキチンリガーゼ

小胞体関連分解における大きな問題の一つとして、逆行輸送チャネルの実体の同定があげられる。現在その中心として考えられているのが、小胞体関連分解における最もメジャーなE3ユビキチンリガーゼであるHRD1である。HRD1は、複数回膜貫通タンパク質で、細胞質側にユビキチン化を促進するRING (really interesting new gene) フィンガードメインを持ち（図6）^{131, 132)}、SEL1Lと複合体を形成する。SEL1Lは、小胞体内腔側に大きなドメインを持つ1回膜貫通型タンパク質であり、可溶性分解基質のアクセプターとして機能することが主な役割とされている^{113, 133, 134)}。実際に可溶性タンパク質の分解はSEL1Lが減少すると大きく抑制される^{11, 135)}。ただしSEL1Lまで基質が運ばれる分子メカニズムは、詳細には解析されていない。EDEM1, EDEM3, OS9, XTP3BがSEL1Lと結合する^{98, 120, 136)}ので、これらの可溶性小胞体関連分解促進因子が基質運搬因子の候補と考えられる。実際にEDEM1⁸⁸⁾やOS9¹¹³⁾は、その機能が提案されているが、決定打には

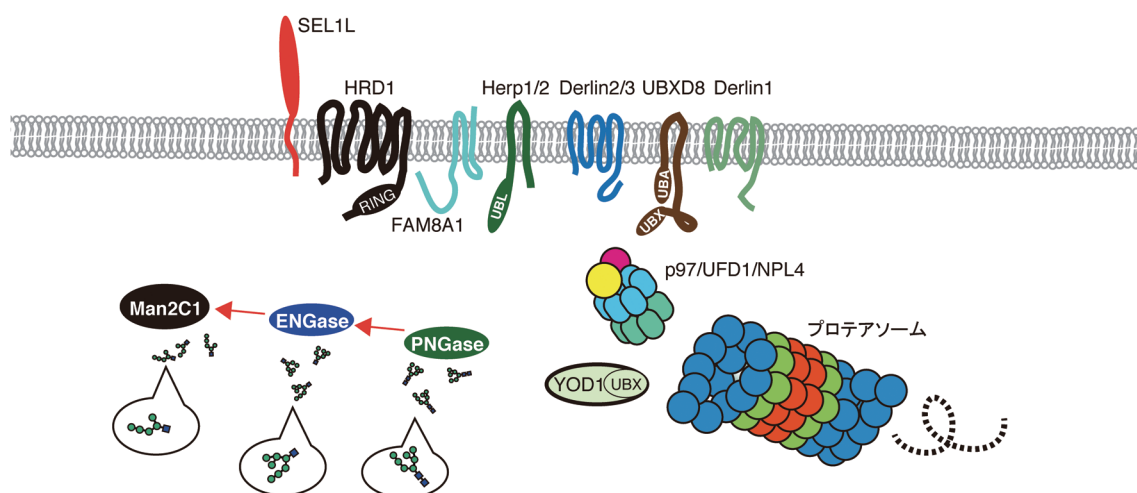


図6 HRD1-SEL1L複合体を中心とした、小胞体膜から細胞質における小胞体関連分解に関わる因子群 E3ユビキチンリガーゼであるHRD1はSEL1Lと小胞体関連分解の中心となる複合体を形成し、基質の分解を促進する。FAM8A1はHRD1のオリゴマー化に寄与する。Hsp1, Hsp2は、(Derlin1?), Derlin2, Derlin3などをHRD1複合体へリクルートすることに寄与する。UBXD8やDerlinファミリーは、ユビキチン化された基質の引き抜きを行うp97を小胞体膜へリクルートする機能を持つ。YOD1は分解基質の脱ユビキチン化を行い、プロテアソームによる基質分解に寄与する。分解基質に付加されたN型糖鎖は、PNGaseによって基質から遊離され、ENGase, Man2C1によって段階的な加水分解を受ける。RING: RING フィンガードドメイン, UBA: ubiquitin-associated ドメイン, UBX: ubiquitin regulatory X ドメイン, UBL: ubiquitin-like ドメイン。文献5より改変引用。

至っていない印象である。その一方で、SEL1Lが可溶性タンパク質だけでなく内在性の膜タンパク質ATF6⁹⁹⁾やIRE1¹³⁷⁾の分解にも寄与することも報告され、SEL1Lの小胞体関連分解における広範囲な役割が明らかにされている。また酵母のHrd1は、SEL1Lオースログである酵母Hrd3によって安定化されるが¹³⁸⁾、高等動物のHRD1によってSEL1Lが逆に安定化されるという報告もある¹²⁵⁾。

2) HRD1-SEL1L複合体の機能を補助する因子群

小胞体ストレスによって誘導される分子として同定されたHerp1は¹³⁹⁾、小胞体膜をヘアピン状に貫通し、N末端とC末端が細胞質側にある(図6)。そしてHerp1は2006年に酵母Usa1と機能的な相同性があることがわかり、小胞体関連分解への寄与が明らかになった¹⁴⁰⁾。HRD1とHerp1は結合し¹⁴¹⁾、HRD1による基質のユビキチン化を正に制御していることも明らかにされた¹⁴²⁾。またHerp1のパラログであるHerp2は、恒常的に発現しており、Herp1と機能的に重複することがわかった^{143, 144)}。Herp1は酵母Usa1とは違いHRD1のオリゴマー化を促進しないが、この機能は、酵母にはオースログがないFAM8A1によって代替されていると考えられる^{145, 146)}。HRD1のオリゴマー化によりHerp1がHRD1に結合しやすくなることも明らかにされている。Herp1はDerlin1¹⁴¹⁾やDerlin2¹⁴³⁾と結合し、HRD1複合体へDerlinsをリクルートする。ただしDerlin1よりもDerlin2の方が、HRD1複合体とより結合が強い^{147, 148)}。Derlinファミリーは、膜内プロテアーゼとして機能するRhomboidファミリーに属しDerlin1^{149, 150)}、Derlin2、Derlin3¹⁴⁷⁾からなり、それぞれ小胞体関連分解を促進する。これらDerlinファミリーのオースログである酵母Der1は、ERAD-L経路の基質分解に必要で、酵母Hrd1とともに逆行輸送のチャネルを形成することが、クライオ電子顕微鏡による構造解析の結果から提案されている¹⁵¹⁾。Derlin1とDerlin2はユビキタスに発現しているが、Derlin3の発現は組織特異性が高い¹⁵²⁾。6回膜貫通タンパク質であるDerlin1は、NHKの分解をRhomboidドメインを介して促進する^{153, 154)}。Derlin2とDerlin3には機能的な重複がみられ、Derlin1とは異なる基質をターゲットとしており、SEL1Lを必要とする基質の分解に必要なことが筆者らによって明らかにされた¹⁴⁴⁾。Derlin1に関しては、部分的な再構成系により逆行輸送のチャネルを形成していることを示唆する報告がある。しかし、基質としてpro- α ファクターの三つのN型糖鎖付加部位をなくした単純な構造タンパク質を用いていることや、膜には種々のタンパク質が存在する精製ミクロソームを用いている。そのため、使われた抗Derlin1抗体により逆行輸送が抑制されることは確かであるが、Derlin1が逆行輸送チャネルの中心を形成しているという決定打になっているとはいえない¹⁵⁵⁾。それぞれのDerlinファミリーが逆行輸送チャネルの形成に関わっているか、関わっているならどのように貢献しているのか、酵母においてHrd1とDer1が協働してチャネルを形成してい

たことと同様に¹⁵¹⁾、高等動物のDerlinファミリーがHRD1と協働するのかなど、今後の解析が待たれる。

3) 小胞体膜に局在するE3リガーゼ

酵母にはHrd1のパラログは存在していないが、ヒトではHRD1のパラログであるgp78も小胞体関連分解に寄与している。gp78はSEL1Lと複合体を形成しないことが要因として考えられるが¹¹⁶⁾、主に膜タンパク質の分解に関わる。HRD1とgp78のターゲットとなる分解基質は部分的には重複しており、両者ともに膜タンパク質であるBACE476や、NHKにBACEの膜領域を付与したNHK_{BACE}の分解¹¹⁾、またHMG-CoAレダクターゼ¹⁵⁶⁾の分解に関わっている。一方で、gp78独自の基質も存在しており、コレステロール・脂肪酸代謝に関与する酵素遺伝子の発現を増強するSREBP-SCAP複合体を小胞体にとどめるアンカー因子Insigの分解を促進する^{157, 158)}。また、CD3 δ の分解もHRD1には依存せず、gp78によって推進されることが報告されている^{11, 159)}。gp78の他にも小胞体膜上に存在するE3リガーゼとして、RMA1(RNF5)、RNF185、RNF170、TRC8(RNF139)、RNF145、TEB4(MARCH-6)などがあげられる⁵⁾。これらは高等動物では明確に分けられていない二つの分解経路であるERAD-M、ERAD-Cに関わっていると考えられている。TEB4を除いて酵母にはそれらのオースログは存在していない(TEB4のオースログ酵母Doa10は、ERAD-Cの中心因子として機能する¹⁰⁾)。進化とともに出現した上記E3リガーゼ群は、HRD1、gp78と重複した基質をターゲットとする場合もある。例をあげるとRNF145は、HRD1、gp78とともにHMG-CoAレダクターゼの分解を促進する¹⁵⁶⁾。小胞体膜上にさまざまなE3リガーゼが存在することは、それぞれの組織において、その場の要求に合わせた膜タンパク質の分解を遂行することに寄与しているのではないかと推測される。近年では、RNF185とTEB4が異なる膜タンパク質の構造を認識して分解に導いていることもわかってきており¹⁶⁰⁾、高等動物の小胞体関連分解に寄与するE3リガーゼの役割が少しずつ明らかになっている。

5. 逆行輸送チャネルからの分解基質の引き抜き

p97は、細胞内において大量に存在するタンパク質であり、そのコファクターによってその機能を多彩に変えることが知られている¹⁶¹⁾。小胞体から細胞質へ逆行輸送された基質は、E3リガーゼによってユビキチン化され、それを酵母Cdc48-Ufd1-Npl4/高等動物p97-Ufd1-Npl4複合体が認識し、細胞質へと引き抜く^{162, 163)}。つまりERAD-L、-M、-Cの三つの経路はここで統合される。この分子メカニズムは、酵母Cdc48複合体を用いてよく解析され、高等動物でも基本的には同様の分子機構が機能していると考えられる。Cdc48は、まず基質に結合したユビキチンの構造を解き、それを端緒として基質の構造もほどこき、細胞質へ

と基質を引き抜く^{164, 165)}。p97の小胞体膜へのリクルートは、UBXD8のubiquitin regulatory X (UBX) ドメインを介したり¹⁶⁶⁻¹⁶⁸⁾、DerlinファミリーのSHPボックスを介したりして行われる¹⁵³⁾。p97に引き出されたポリペプチド鎖は、UBXドメインを持つYOD1によって脱ユビキチン化され¹⁶⁹⁾、プロテアソームによる分解を受ける。N型糖鎖は、プロテアソームによる基質分解の障害となるため、プロテアソームサブユニットとも相互作用する¹⁷⁰⁾ NGLY1 (PNGase) によって取り除かれる¹⁷¹⁻¹⁷⁴⁾。遊離した糖鎖は、ENGase¹⁷⁵⁾、Man2C1^{176, 177)} による段階的なプロセッシングを受け、リソソームによって分解される³⁾。こうして、小胞体内に局在していたポリペプチド鎖とN型糖鎖は、適切に処分される。

6. おわりに

高等動物における小胞体タンパク質品質管理機構は、細胞質においてみられるような(糖鎖に依存しない)分子シャペロンによる構造形成、分解機構と、小胞体を通過するタンパク質の大部分に結合するN型糖鎖を巧妙に利用した構造形成、分解機構によって織りなされている。特に分解機構は、最終的には細胞質のプロテアソームによって分解を執行するため、基質の認識、逆行輸送チャンネルへのリクルート、逆行輸送、ユビキチン化、細胞質側からの基質の引き抜き、N型糖鎖の遊離、プロテアソームでの分解と、必須ステップが多いため、それに伴って関わる遺伝子も増加し、重要な研究課題が多く提示されている。そして生体内での意義も大きく、小胞体関連分解は、60種類以上の疾患と関わっていることもわかっている¹⁷⁸⁾。

小胞体品質管理を行う因子に関して、酵母の遺伝子が進化的に多岐化した場合でも、高等動物の生命活動において必要不可欠であることも多い。小胞体関連分解因子群の知見としては、Derlin1¹⁷⁹⁾、Derlin2¹⁸⁰⁾、HRD1¹⁸¹⁾を遺伝子破壊したマウスでは、それぞれ7日、13.5日、13.5日において胚性致死となる。Herp1の遺伝子破壊マウスでは小胞体ストレスの影響からブドウ糖負荷試験において通常のように血糖値が下がらないという状態になり¹⁷⁹⁾、gp78の遺伝子破壊マウスでは、非アルコール性脂肪性肝炎を発症する¹⁸²⁾。ただし、Derlin3¹⁷⁹⁾の遺伝子破壊マウスは表現型に大きな変化がなく産まれてくる。

構造形成促進する因子の遺伝子破壊マウスに関して、CNX遺伝子破壊マウスでは発育不全や有髄神経繊維の喪失に伴う運動不全になり^{183, 184)}、CRT遺伝子破壊マウスでは胎生期18日には心臓の機能不全によりその多くは胚性致死となる¹⁸⁵⁾。ERp57遺伝子破壊マウスは、CNX遺伝子破壊マウスよりもシビアな表現型を示し、胚性致死であり、そのB細胞特異的なコンディショナル遺伝子破壊マウスでは、ERp57はMHC class Iの酸化還元には関与しないが、安定的な複合体形成に寄与することが明らかになっている¹⁸⁶⁾。近年の論文において、細胞を用いた実験によっ

てUGGT1のグルコースの再付加による構造形成の寄与は限定的でCNX (CRT) による構造形成の方が重要と示された⁶⁸⁾。こうした中でも、UGGT1遺伝子破壊マウスは胚性13日において致死となり、CNX遺伝子破壊マウスよりもUGGT1遺伝子破壊マウスの方がシビアな表現型を示すことは¹⁸⁷⁾、現在までに研究者らによって進んでいる解析の到達点や生体の奥深さも感じさせる。

小胞体関連分解の大きな問題の一つとして取り上げられてきていた逆行輸送のチャンネルに関しては、酵母においてはHrd1-Der1を中心とした複合体が形成していることが構造的にわかってきている¹⁵¹⁾。高等動物では、光架橋解析や構造解析などがまだまだ進んでおらず、逆行輸送チャンネルに関する知見は少ないが、HRD1-SEL1Lの複合体だけでなく、他の複数回膜貫通型の小胞体関連分解因子が特定の基質に対して逆行輸送チャンネルを形成していることも考えられる。その候補となるE3リガーゼやDerlinファミリーは進化的に遺伝子が多岐化しており、酵母に比べて高度な複合体を形成しているのかもしれない。

酵母では、遺伝子破壊が容易かつ機能的に重複した遺伝子が少ないことを主な理由として、比較的早い段階で統一の見解に至ってきたが、高等動物においては、難問に対して解決まで時間が長くかかってきた印象がある。近年のゲノム編集技術の発展によって、高等動物においても、内在性の遺伝子の機能解析をより強力に進められるようになり、それまで議論されていた遺伝子の機能も明確にされる場合も多い。本稿でも疑問点を提示してきたように現在でも課題は多く、今後どのような研究成果が出されるのか、矛盾点がどのように解決されていくのか、筆者も当該分野の問題解決の一部に貢献できればうれしく思う。

謝辞

筆者の研究生活を終始、そして現在もご指導、ご鞭撻してくださっている京都大学森和俊先生、研究室にも所属させていただき筆者の糖質研究を力強く推進していただいたExCELLS加藤晃一先生、また多くの共同研究者の方々に深く感謝申し上げます。本研究は、科学研究費補助金基盤研究(C) (18K06216)、公益財団法人武田科学振興財団、公益財団法人小林財団にご支援いただきました。

文 献

- 1) Helenius, A. & Aebi, M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 1019-1049.
- 2) Breitling, J. & Aebi, M. (2013) N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a013359.
- 3) Suzuki, T., and Fujihira, H. (2020) Folding and quality control of glycoproteins. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, **B978-0-12-409547-2.14947-9**.
- 4) Brodsky, J.L. & Skach, W.R. (2011) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from

- yeast and mammalian cell systems. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23**, 464–475.
- 5) Ninagawa, S., George, G., & Mori, K. (2020) Mechanisms of productive folding and endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins and non-glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **1865**, 129812.
 - 6) Preston, G.M. & Brodsky, J.L. (2017) The evolving role of ubiquitin modification in endoplasmic reticulum-associated degradation. *Biochem. J.*, **474**, 445–469.
 - 7) Gass, J.N., Gunn, K.E., Sriburi, R., & Brewer, J.W. (2004) Stressed-out B cells? Plasma-cell differentiation and the unfolded protein response. *Trends Immunol.*, **25**, 17–24.
 - 8) Lukacs, G.L. & Verkman, A.S. (2012) CFTR: folding, misfolding and correcting the $\Delta F508$ conformational defect. *Trends Mol. Med.*, **18**, 81–91.
 - 9) Ninagawa, S., Tada, S., Okumura, M., Inoguchi, K., Kinoshita, M., Kanemura, S., Imami, K., Umezawa, H., Ishikawa, T., Mackin, R.B., et al. (2020) Antipsychotic olanzapine-induced misfolding of proinsulin in the endoplasmic reticulum accounts for atypical development of diabetes. *eLife*, **9**, e60970.
 - 10) Vashist, S. & Ng, D.T.W. (2004) Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J. Cell Biol.*, **165**, 41–52.
 - 11) Bernasconi, R., Galli, C., Calanca, V., Nakajima, T., & Molinari, M. (2010) Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-L substrates. *J. Cell Biol.*, **188**, 223–235.
 - 12) Yang, J., Nune, M., Zong, Y., Zhou, L., & Liu, Q. (2015) Close and allosteric opening of the polypeptide-binding site in a human Hsp70 chaperone BiP. *Structure*, **23**, 2191–2203.
 - 13) Pobre, K.F.R., Poet, G.J., & Hendershot, L.M. (2019) The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J. Biol. Chem.*, **294**, 2098–2108.
 - 14) Dudek, J., Greiner, M., Muller, A., Hendershot, L.M., Kopsch, K., Nastainczyk, W., & Zimmermann, R. (2005) ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1008–1014.
 - 15) Blau, M., Mullapudi, S., Becker, T., Dudek, J., Zimmermann, R., Penczek, P.A., & Beckmann, R. (2005) ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1015–1016.
 - 16) Benedix, J., Lajoie, P., Jaiswal, H., Burgard, C., Greiner, M., Zimmermann, R., Rospert, S., Snapp, E.L., & Dudek, J. (2010) BiP modulates the affinity of its co-chaperone ERj1 for ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **285**, 36427–36433.
 - 17) Haßdenteufel, S., Johnson, N., Paton, A.W., Paton, J.C., High, S., & Zimmermann, R. (2018) Chaperone-mediated Sec61 channel gating during ER import of small precursor proteins overcomes Sec61 inhibitor-reinforced energy barrier. *Cell Rep.*, **23**, 1373–1386.
 - 18) Meyer, H.A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K.U., & Hartmann, E. (2000) Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14550–14557.
 - 19) Shen, Y. & Hendershot, L.M. (2005) ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 40–50.
 - 20) Dong, M., Bridges, J.P., Apsley, K., Xu, Y., & Weaver, T.E. (2008) ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2620–2630.
 - 21) Lai, C.W., Otero, J.H., Hendershot, L.M., & Snapp, E. (2012) ERdj4 protein is a soluble endoplasmic reticulum (ER) DnaJ family protein that interacts with ER-associated degradation machinery. *J. Biol. Chem.*, **287**, 7969–7978.
 - 22) Fritz, J.M., Dong, M., Apsley, K.S., Martin, E.P., Na, C.L., Sitaraman, S., & Weaver, T.E. (2014) Deficiency of the BiP co-chaperone ERdj4 causes constitutive endoplasmic reticulum stress and metabolic defects. *Mol. Biol. Cell*, **25**, 431–440.
 - 23) Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D.Y., & Nagata, K. (2008) ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science*, **321**, 569–572.
 - 24) Oka, O.B., Pringle, M.A., Schopp, I.M., Braakman, I., & Bulleid, N.J. (2013) ERdj5 is the ER reductase that catalyzes the removal of non-native disulfides and correct folding of the LDL receptor. *Mol. Cell*, **50**, 793–804.
 - 25) Hosoda, A., Tokuda, M., Akai, R., Kohno, K., & Iwawaki, T. (2009) Positive contribution of ERdj5/JPDI to endoplasmic reticulum protein quality control in the salivary gland. *Biochem. J.*, **425**, 117–125.
 - 26) Jang, I., Pottekat, A., Poothong, J., Yong, J., Lagunas-Acosta, J., Charbono, A., Chen, Z., Scheuner, D.L., Liu, M., Itkin-Ansari, P., et al. (2019) PDIA1/P4HB is required for efficient proinsulin maturation and ss cell health in response to diet induced obesity. *eLife*, **8**, e44528.
 - 27) He, K., Cunningham, C.N., Manickam, N., Liu, M., Arvan, P., & Tsai, B. (2015) PDI reductase acts on Akita mutant proinsulin to initiate retrotranslocation along the Hrd1/Sel1L-p97 axis. *Mol. Biol. Cell*, **26**, 3413–3423.
 - 28) Ushioda, R., Miyamoto, A., Inoue, M., Watanabe, S., Okumura, M., Maegawa, K.I., Uegaki, K., Fujii, S., Fukuda, Y., Umitsu, M., et al. (2016) Redox-assisted regulation of Ca^{2+} homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E6055–E6063.
 - 29) Yan, W., Frank, C.L., Korth, M.J., Sopher, B.L., Novoa, I., Ron, D., & Katze, M.G. (2002) Control of PERK eIF2 α kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15920–15925.
 - 30) Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, E.A., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H.P., Goodman, A.G., Harant, H., Garrison, J.L., et al. (2006) Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell*, **126**, 727–739.
 - 31) Rutkowski, D.T., Kang, S.W., Goodman, A.G., Garrison, J.L., Taunton, J., Katze, M.G., Kaufman, R.J., & Hegde, R.S. (2007) The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 3681–3691.
 - 32) Zahedi, R.P., Völzing, C., Schmitt, A., Frie, M., Jung, M., Dudek, J., Wortelkamp, S., Sickmann, A., & Zimmermann, R. (2009) Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7. *Proteomics*, **9**, 3463–3473.
 - 33) Weitzmann, A., Volkmer, J., & Zimmermann, R. (2006) The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of Sil1 function in man and mouse. *FEBS Lett.*, **580**, 5237–5240.
 - 34) Andreasson, C., Rampelt, H., Fiaux, J., Druffel-Augustin, S., & Bukau, B. (2010) The endoplasmic reticulum Grp170 acts as a nucleotide exchange factor of Hsp70 via a mechanism similar to that of the cytosolic Hsp110. *J. Biol. Chem.*, **285**, 12445–12453.

- 35) Lin, H.Y., Masso-Welch, P., Di, Y.P., Cai, J.W., Shen, J.W., & Subjeck, J.R. (1993) The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. *Mol. Biol. Cell*, **4**, 1109–1119.
- 36) Behnke, J. & Hendershot, L.M. (2014) The large Hsp70 Grp170 binds to unfolded protein substrates in vivo with a regulation distinct from conventional Hsp70s. *J. Biol. Chem.*, **289**, 2899–2907.
- 37) Buck, T.M., Plavchak, L., Roy, A., Donnelly, B.F., Kashlan, O.B., Kleyman, T.R., Subramanya, A.R., & Brodsky, J.L. (2013) The Lhs1/GRP170 chaperones facilitate the endoplasmic reticulum-associated degradation of the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.*, **288**, 18366–18380.
- 38) Inoue, T. & Tsai, B. (2016) The Grp170 nucleotide exchange factor executes a key role during ERAD of cellular misfolded clients. *Mol. Biol. Cell*, **27**, 1650–1662.
- 39) Cunningham, C.N., He, K., Arunagiri, A., Paton, A.W., Paton, J.C., Arvan, P., & Tsai, B. (2017) Chaperone-driven degradation of a misfolded proinsulin mutant in parallel with restoration of wild-type insulin secretion. *Diabetes*, **66**, 741–753.
- 40) Cunningham, C.N., Williams, J.M., Knupp, J., Arunagiri, A., Arvan, P., & Tsai, B. (2019) Cells deploy a two-pronged strategy to rectify misfolded proinsulin aggregates. *Mol. Cell*, **75**, 442–456.e4.
- 41) Chung, K.T., Shen, Y., & Hendershot, L.M. (2002) BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J. Biol. Chem.*, **277**, 47557–47563.
- 42) Behnke, J., Mann, M.J., Scruggs, F.L., Feige, M.J., & Hendershot, L.M. (2016) Members of the Hsp70 family recognize distinct types of sequences to execute ER quality control. *Mol. Cell*, **63**, 739–752.
- 43) Ham, H., Woolery, A.R., Tracy, C., Stenesen, D., Kramer, H., & Orth, K. (2014) Unfolded protein response-regulated Drosophila Fic (dFic) protein reversibly AMPylates BiP chaperone during endoplasmic reticulum homeostasis. *J. Biol. Chem.*, **289**, 36059–36069.
- 44) Preissler, S., Rato, C., Perera, L., Saudek, V., & Ron, D. (2017) FICD acts bifunctionally to AMPylate and de-AMPylate the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 23–29.
- 45) Preissler, S., Rato, C., Chen, R., Antrobus, R., Ding, S., Fearnley, I.M., & Ron, D. (2015) AMPylation matches BiP activity to client protein load in the endoplasmic reticulum. *eLife*, **4**, e12621.
- 46) Jessop, C.E., Watkins, R.H., Simmons, J.J., Tasab, M., & Bulleid, N.J. (2009) Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins. *J. Cell Sci.*, **122**, 4287–4295.
- 47) Araki, K., Iemura, S., Kamiya, Y., Ron, D., Kato, K., Natsume, T., & Nagata, K. (2013) Ero1- α and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases. *J. Cell Biol.*, **202**, 861–874.
- 48) Okumura, M., Noi, K., Kanemura, S., Kinoshita, M., Saio, T., Inoue, Y., Hikima, T., Akiyama, S., Ogura, T., & Inaba, K. (2019) Dynamic assembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative folding. *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 499–509.
- 49) Shailubhai, K., Pukazhenthi, B.S., Saxena, E.S., Varma, G.M., & Vijay, I.K. (1991) Glucosidase I, a transmembrane endoplasmic reticular glycoprotein with a luminal catalytic domain. *J. Biol. Chem.*, **266**, 16587–16593.
- 50) Totani, K., Ihara, Y., Matsuo, I., & Ito, Y. (2006) Substrate specificity analysis of endoplasmic reticulum glucosidase II using synthetic high mannose-type glycans. *J. Biol. Chem.*, **281**, 31502–31508.
- 51) Satoh, T., Toshimori, T., Yan, G., Yamaguchi, T., & Kato, K. (2016) Structural basis for two-step glucose trimming by glucosidase II involved in ER glycoprotein quality control. *Sci. Rep.*, **6**, 20575.
- 52) Schallus, T., Jaeckh, C., Fehér, K., Palma, A.S., Liu, Y., Simpson, J.C., Mackeen, M., Stier, G., Gibson, T.J., Feizi, T., et al. (2008) Malectin: a novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 3404–3414.
- 53) Schallus, T., Feher, K., Sternberg, U., Rybin, V., & Muhle-Goll, C. (2010) Analysis of the specific interactions between the lectin domain of malectin and diglucosides. *Glycobiology*, **20**, 1010–1020.
- 54) Chen, Y., Hu, D., Yabe, R., Tateno, H., Qin, S.Y., Matsumoto, N., Hirabayashi, J., & Yamamoto, K. (2011) Role of malectin in Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-dependent quality control of α 1-antitrypsin. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 3559–3570.
- 55) Lamriben, L., Graham, J.B., Adams, B.M., & Hebert, D.N. (2016) N-Glycan-based ER molecular chaperone and protein quality control system: The calnexin binding cycle. *Traffic*, **17**, 308–326.
- 56) Ihara, Y., Ikezaki, M., Takatani, M., & Ito, Y. (2020) Calnexin/calreticulin and assays related to N-Glycoprotein folding in vitro. *Methods Mol. Biol.*, **2132**, 295–308.
- 57) Kozlov, G. & Gehring, K. (2020) Calnexin cycle-structural features of the ER chaperone system. *FEBS J.*, **287**, 4322–4340.
- 58) Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H., & High, S. (1999) ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2573–2582.
- 59) Ellgaard, L., Riek, R., Herrmann, T., Güntert, P., Braun, D., Helenius, A., & Wüthrich, K. (2001) NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3133–3138.
- 60) Zapun, A., Darby, N.J., Tessier, D.C., Michalak, M., Bergeron, J.J., & Thomas, D.Y. (1998) Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J. Biol. Chem.*, **273**, 6009–6012.
- 61) Molinari, M., Eriksson, K.K., Calanca, V., Galli, C., Cresswell, P., Michalak, M., & Helenius, A. (2004) Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control. *Mol. Cell*, **13**, 125–135.
- 62) Hebert, D.N., Zhang, J.X., Chen, W., Foellmer, B., & Helenius, A. (1997) The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin. *J. Cell Biol.*, **139**, 613–623.
- 63) Gao, B., Adhikari, R., Howarth, M., Nakamura, K., Gold, M.C., Hill, A.B., Knee, R., Michalak, M., & Elliott, T. (2002) Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity*, **16**, 99–109.
- 64) Nakamura, K., Zuppini, A., Arnaudeau, S., Lynch, J., Ahsan, I., Krause, R., Papp, S., De Smedt, H., Parys, J.B., Muller-Esterl, W., et al. (2001) Functional specialization of calreticulin domains. *J. Cell Biol.*, **154**, 961–972.
- 65) Mohan, H.M., Yang, B., Dean, N.A., & Raghavan, M. (2020) Calreticulin enhances the secretory trafficking of a misfolded α 1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.*, **295**, 16754–16772.
- 66) Hebert, D.N., Garman, S.C., & Molinari, M. (2005) The glycan

- code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol.*, **15**, 364–370.
- 67) Takeda, Y., Seko, A., Hachisu, M., Daikoku, S., Izumi, M., Koizumi, A., Fujikawa, K., Kajihara, Y., & Ito, Y. (2014) Both isoforms of human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase are enzymatically active. *Glycobiology*, **24**, 344–350.
 - 68) Adams, B.M., Canniff, N.P., Guay, K.P., Larsen, I.S.B., & Hebert, D.N. (2020) Quantitative glycoproteomics reveals cellular substrate selectivity of the ER protein quality control sensors UGGT1 and UGGT2. *eLife*, **9**, e63997.
 - 69) Kamiya, Y., Satoh, T., & Kato, K. (2012) Molecular and structural basis for N-glycan-dependent determination of glycoprotein fates in cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 1327–1337.
 - 70) Shah, N., Kuntz, D.A., & Rose, D.R. (2008) Golgi alpha-mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9570–9575.
 - 71) Pan, S., Wang, S., Utama, B., Huang, L., Blok, N., Estes, M.K., Moremen, K.W., & Sifers, R.N. (2011) Golgi localization of ERManI defines spatial separation of the mammalian glycoprotein quality control system. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 2810–2822.
 - 72) Lal, A., Pang, P., Kalelkar, S., Romero, P.A., Herscovics, A., & Moremen, K.W. (1998) Substrate specificities of recombinant murine Golgi alpha1, 2-mannosidases IA and IB and comparison with endoplasmic reticulum and Golgi processing alpha1,2-mannosidases. *Glycobiology*, **8**, 981–995.
 - 73) Lubas, W.A. & Spiro, R.G. (1987) Golgi endo-alpha-D-mannosidase from rat liver, a novel N-linked carbohydrate unit processing enzyme. *J. Biol. Chem.*, **262**, 3775–3781.
 - 74) Lubas, W.A. & Spiro, R.G. (1988) Evaluation of the role of rat liver Golgi endo-alpha-D-mannosidase in processing N-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3990–3998.
 - 75) Sobala, L.F., Fernandes, P.Z., Hakki, Z., Thompson, A.J., Howe, J.D., Hill, M., Zitzmann, N., Davies, S., Stamatakis, Z., Butters, T.D., et al. (2020) Structure of human endo- α -1,2-mannosidase (MANEA), an antiviral host-glycosylation target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 29595–29601.
 - 76) Zuber, C., Spiro, M.J., Guhl, B., Spiro, R.G., & Roth, J. (2000) Golgi apparatus immunolocalization of endomannosidase suggests post-endoplasmic reticulum glucose trimming: implications for quality control. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4227–4240.
 - 77) Tremblay, L.O. & Herscovics, A. (1999) Cloning and expression of a specific human alpha 1,2-mannosidase that trims Man9GlcNAc2 to Man8GlcNAc2 isomer B during N-glycan biosynthesis. *Glycobiology*, **9**, 1073–1078.
 - 78) Gonzalez, D.S., Karaveg, K., Vandersall-Nairn, A.S., Lal, A., & Moremen, K.W. (1999) Identification, expression, and characterization of a cDNA encoding human endoplasmic reticulum mannosidase I, the enzyme that catalyzes the first mannose trimming step in mammalian Asn-linked oligosaccharide biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21375–21386.
 - 79) Avezov, E., Frenkel, Z., Ehrlich, M., Herscovics, A., & Lederkremer, G.Z. (2008) Endoplasmic reticulum (ER) mannosidase I is compartmentalized and required for N-glycan trimming to Man5-6GlcNAc2 in glycoprotein ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 216–225.
 - 80) Herscovics, A., Romero, P.A., & Tremblay, L.O. (2002) The specificity of the yeast and human class I ER alpha 1,2-mannosidases involved in ER quality control is not as strict previously reported. *Glycobiology*, **12**, 14g–15g.
 - 81) Aikawa, J., Matsuo, I., & Ito, Y. (2012) In vitro mannose trimming property of human ER alpha-1,2 mannosidase I. *Glycoconj. J.*, **29**, 35–45.
 - 82) Rymen, D., Peanne, R., Millon, M.B., Race, V., Sturiale, L., Garozzo, D., Mills, P., Clayton, P., Asteggiano, C.G., Quelhas, D., et al. (2013) MAN1B1 deficiency: an unexpected CDG-II. *PLoS Genet.*, **9**, e1003989.
 - 83) Pan, S., Cheng, X., & Sifers, R.N. (2013) Golgi-situated endoplasmic reticulum alpha-1, 2-mannosidase contributes to the retrieval of ERAD substrates through a direct interaction with gamma-COP. *Mol. Biol. Cell*, **24**, 1111–1121.
 - 84) Sun, A.H., Collette, J.R., & Sifers, R.N. (2020) The cytoplasmic tail of human mannosidase Man1b1 contributes to catalysis-independent quality control of misfolded alpha1-antitrypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 24825–24836.
 - 85) Iannotti, M.J., Figard, L., Sokac, A.M., & Sifers, R.N. (2014) A Golgi-localized mannosidase (MAN1B1) plays a non-enzymatic gatekeeper role in protein biosynthetic quality control. *J. Biol. Chem.*, **289**, 11844–11858.
 - 86) Haga, Y. (2014) ER or Golgi?: Localization of ER Alpha 1,2-Mannosidase I. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **26**, 103–105.
 - 87) Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A., & Nagata, K. (2001) A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.*, **2**, 415–422.
 - 88) Cormier, J.H., Tamura, T., Sunryd, J.C., & Hebert, D.N. (2009) EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex. *Mol. Cell*, **34**, 627–633.
 - 89) Olivari, S., Cali, T., Salo, K.E., Paganetti, P., Ruddock, L.W., & Molinari, M. (2006) EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**, 1278–1284.
 - 90) Hosokawa, N., Tremblay, L.O., Sleno, B., Kamiya, Y., Wada, I., Nagata, K., Kato, K., & Herscovics, A. (2010) EDEM1 accelerates the trimming of alpha1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans. *Glycobiology*, **20**, 567–575.
 - 91) Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P., & Paganetti, P. (2003) Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science*, **299**, 1397–1400.
 - 92) Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I., & Nagata, K. (2003) EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science*, **299**, 1394–1397.
 - 93) Zuber, C., Cormier, J.H., Guhl, B., Santimaria, R., Hebert, D.N., & Roth, J. (2007) EDEM1 reveals a quality control vesicular transport pathway out of the endoplasmic reticulum not involving the COPII exit sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4407–4412.
 - 94) Olivari, S., Galli, C., Alanen, H., Ruddock, L., & Molinari, M. (2005) A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 2424–2428.
 - 95) Hagiwara, M. & Nagata, K. (2012) Redox-dependent protein quality control in the endoplasmic reticulum: folding to degradation. *Antioxid. Redox Signal.*, **16**, 1119–1128.
 - 96) Mast, S.W., Diekmann, K., Karaveg, K., Davis, A., Sifers, R.N., & Moremen, K.W. (2005) Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins. *Glycobiology*, **15**, 421–436.
 - 97) Hirao, K., Natsuka, Y., Tamura, T., Wada, I., Morito, D., Natsuka, S., Romero, P., Sleno, B., Tremblay, L.O., Herscovics, A., et al. (2006) EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation

- and mannose trimming. *J. Biol. Chem.*, **281**, 9650–9658.
- 98) Ninagawa, S., Okada, T., Sumitomo, Y., Kamiya, Y., Kato, K., Horimoto, S., Ishikawa, T., Takeda, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., et al. (2014) EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *J. Cell Biol.*, **206**, 347–356.
 - 99) Horimoto, S., Ninagawa, S., Okada, T., Koba, H., Sugimoto, T., Kamiya, Y., Kato, K., Takeda, S., & Mori, K. (2013) The unfolded protein response transducer ATF6 represents a novel transmembrane-type endoplasmic reticulum-associated degradation substrate requiring both mannose trimming and SEL1L protein. *J. Biol. Chem.*, **288**, 31517–31527.
 - 100) Shenkman, M., Ron, E., Yehuda, R., Benyair, R., Khalaila, I., & Lederkremer, G.Z. (2018) Mannosidase activity of EDEM1 and EDEM2 depends on an unfolded state of their glycoprotein substrates. *Commun. Biol.*, **1**, 172.
 - 101) Clerc, S., Hirsch, C., Oggier, D.M., Deprez, P., Jakob, C., Sommer, T., & Aebi, M. (2009) Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, **184**, 159–172.
 - 102) Sakoh-Nakatogawa, M., Nishikawa, S., & Endo, T. (2009) Roles of protein-disulfide isomerase-mediated disulfide bond formation of yeast Mnl1p in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J. Biol. Chem.*, **284**, 11815–11825.
 - 103) Gauss, R., Kanehara, K., Carvalho, P., Ng, D.T., & Aebi, M. (2011) A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell*, **42**, 782–793.
 - 104) George, G., Ninagawa, S., Yagi, H., Saito, T., Ishikawa, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Imami, K., Ishihama, Y., Kato, K., et al. (2020) EDEM2 stably disulfide-bonded to TXNDC11 catalyzes the first mannose trimming step in mammalian glycoprotein ERAD. *eLife*, **9**, e53455.
 - 105) Yu, S., Ito, S., Wada, I., & Hosokawa, N. (2018) ER-resident protein 46 (ERp46) triggers the mannose-trimming activity of ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 3 (EDEM3). *J. Biol. Chem.*, **293**, 10663–10674.
 - 106) Su, Y.A., Hutter, C.M., Trent, J.M., & Meltzer, P.S. (1996) Complete sequence analysis of a gene (OS-9) ubiquitously expressed in human tissues and amplified in sarcomas. *Mol. Carcinog.*, **15**, 270–275.
 - 107) Kimura, Y., Nakazawa, M., & Yamada, M. (1998) Cloning and characterization of three isoforms of OS-9 cDNA and expression of the OS-9 gene in various human tumor cell lines. *J. Biochem.*, **123**, 876–882.
 - 108) Baek, J.H., Mahon, P.C., Oh, J., Kelly, B., Krishnamachary, B., Pearson, M., Chan, D.A., Giaccia, A.J., & Semenza, G.L. (2005) OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha. *Mol. Cell*, **17**, 503–512.
 - 109) 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**, 17061–17068.
 - 110) Mikami, K., Yamaguchi, D., Tateno, H., Hu, D., Qin, S.Y., Kawasaki, N., Yamada, M., Matsumoto, N., Hirabayashi, J., Ito, Y., et al. (2010) The sugar-binding ability of human OS-9 and its involvement in ER-associated degradation. *Glycobiology*, **20**, 310–321.
 - 111) Satoh, T., Chen, Y., Hu, D., Hanashima, S., Yamamoto, K., & Yamaguchi, Y. (2010) Structural basis for oligosaccharide recognition of misfolded glycoproteins by OS-9 in ER-associated degradation. *Mol. Cell*, **40**, 905–916.
 - 112) Satoh, T. (2012) Molecular and structural basis for sugar recognition by mannose 6-phosphate receptor homology domain-containing lectins and proteins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **24**, 193–202.
 - 113) Christianson, J.C., Shaler, T.A., Tyler, R.E., & Kopito, R.R. (2008) OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat. Cell Biol.*, **10**, 272–282.
 - 114) Tyler, R.E., Pearce, M.M., Shaler, T.A., Olzmann, J.A., Greenblatt, E.J., & Kopito, R.R. (2012) Unassembled CD147 is an endogenous endoplasmic reticulum-associated degradation substrate. *Mol. Biol. Cell*, **23**, 4668–4678.
 - 115) Bernasconi, R., Pertel, T., Luban, J., & Molinari, M. (2008) A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal. *J. Biol. Chem.*, **283**, 16446–16454.
 - 116) Cruciat, C.M., Hassler, C., & Niehrs, C. (2006) The MRH protein Erlectin is a member of the endoplasmic reticulum synex-expression group and functions in N-glycan recognition. *J. Biol. Chem.*, **281**, 12986–12993.
 - 117) Fujimori, T., Kamiya, Y., Nagata, K., Kato, K., & Hosokawa, N. (2013) Endoplasmic reticulum lectin XTP3-B inhibits endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded alpha1-antitrypsin variant. *FEBS J.*, **280**, 1563–1575.
 - 118) Hosokawa, N., Wada, I., Nagasawa, K., Moriyama, T., Okawa, K., & 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**, 20914–20924.
 - 119) Yamaguchi, D., Hu, D., Matsumoto, N., & Yamamoto, K. (2010) Human XTP3-B binds to alpha1-antitrypsin variant null(Hong Kong) via the C-terminal MRH domain in a glycan-dependent manner. *Glycobiology*, **20**, 348–355.
 - 120) van der Goot, A.T., Pearce, M.M.P., Leto, D.E., Shaler, T.A., & Kopito, R.R. (2018) Redundant and antagonistic roles of XTP3B and OS9 in decoding glycan and Non-glycan degrons in ER-Associated degradation. *Mol. Cell*, **70**, 516–530.e6.
 - 121) Hagiwara, M., Ling, J., Koenig, P.A., & Ploegh, H.L. (2016) Posttranscriptional regulation of glycoprotein quality control in the endoplasmic reticulum is controlled by the E2 Ub-conjugating enzyme UBC6e. *Mol. Cell*, **63**, 753–767.
 - 122) Kostova, Z. & Wolf, D.H. (2005) Importance of carbohydrate positioning in the recognition of mutated CPY for ER-associated degradation. *J. Cell Sci.*, **118**, 1485–1492.
 - 123) Hirayama, H., Seino, J., Kitajima, T., Jigami, Y., & Suzuki, T. (2010) Free oligosaccharides to monitor glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **285**, 12390–12404.
 - 124) Kanehara, K., Xie, W., & Ng, D.T. (2010) Modularity of the Hrd1 ERAD complex underlies its diverse client range. *J. Cell Biol.*, **188**, 707–716.
 - 125) 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.
 - 126) Ninagawa, S. & Mori, K. (2016) Trypsin sensitivity assay to study the folding status of proteins. *Bio Protoc.*, **6**, e1953.
 - 127) Ninagawa, S. & Mori, K. (2016) PNGase sensitivity assay to study the folding status of proteins. *Bio Protoc.*, **6**, e1952.

- 128) Liu, Y.C., Fujimori, D.G., & Weissman, J.S. (2016) Htm1p-Pdi1p is a folding-sensitive mannosidase that marks N-glycoproteins for ER-associated protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E4015–E4024.
- 129) Ninagawa, S., Okada, T., Sumitomo, Y., Horimoto, S., Sugimoto, T., Ishikawa, T., Takeda, S., Yamamoto, T., Suzuki, T., Kamiya, Y., et al. (2015) Forcible destruction of severely misfolded mammalian glycoproteins by the non-glycoprotein ERAD pathway. *J. Cell Biol.*, **211**, 775–784.
- 130) Leto, D.E., Morgens, D.W., Zhang, L., Walczak, C.P., Elias, J.E., Bassik, M.C., & Kopito, R.R. (2019) Genome-wide CRISPR analysis identifies substrate-specific conjugation modules in ER-associated degradation. *Mol. Cell*, **73**, 377–389.e11.
- 131) Kaneko, M., Ishiguro, M., Niinuma, Y., Uesugi, M., & Nomura, Y. (2002) Human Hrd1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation. *FEBS Lett.*, **532**, 147–152.
- 132) Kikkert, M., Doolman, R., Dai, M., Avner, R., Hassink, G., van Voorden, S., Thanedar, S., Roitelman, J., Chau, V., & Wiertz, E. (2004) Human Hrd1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **279**, 3525–3534.
- 133) Mueller, B., Klemm, E.J., Spooner, E., Claessen, J.H., & Ploegh, H.L. (2008) SEL1L nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 12325–12330.
- 134) Mueller, B., Lilley, B.N., & Ploegh, H.L. (2006) SEL1L, the homologue of yeast Hrd3p, is involved in protein dislocation from the mammalian ER. *J. Cell Biol.*, **175**, 261–270.
- 135) Ninagawa, S., Okada, T., Takeda, S., & Mori, K. (2011) SEL1L is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal proteins but not transmembrane proteins in chicken DT40 cell line. *Cell Struct. Funct.*, **36**, 187–195.
- 136) Saeed, M., Suzuki, R., Watanabe, N., Masaki, T., Tomonaga, M., Muhammad, A., Kato, T., Matsuura, Y., Watanabe, H., Wakita, T., et al. (2011) Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J. Biol. Chem.*, **286**, 37264–37273.
- 137) Sun, S., Shi, G., Sha, H., Ji, Y., Han, X., Shu, X., Ma, H., Inoue, T., Gao, B., Kim, H., et al. (2015) IRE1alpha is an endogenous substrate of endoplasmic-reticulum-associated degradation. *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1546–1555.
- 138) Gardner, R.G., Swarbrick, G.M., Bays, N.W., Cronin, S.R., Wilhovsky, S., Seelig, L., Kim, C., & Hampton, R.Y. (2000) Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J. Cell Biol.*, **151**, 69–82.
- 139) Kokame, K., Agarwala, K.L., Kato, H., & Miyata, T. (2000) Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.*, **275**, 32846–32853.
- 140) Carvalho, P., Goder, V., & Rapoport, T.A. (2006) Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell*, **126**, 361–373.
- 141) Okuda-Shimizu, Y. & Hendershot, L.M. (2007) Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Mol. Cell*, **28**, 544–554.
- 142) Kny, M., Standera, S., Hartmann-Petersen, R., Kloetzel, P.M., & Seeger, M. (2011) Herp regulates Hrd1-mediated ubiquitylation in a ubiquitin-like domain-dependent manner. *J. Biol. Chem.*, **286**, 5151–5156.
- 143) Huang, C.H., Chu, Y.R., Ye, Y., & Chen, X. (2014) Role of HERP and a HERP-related protein in Hrd1-dependent protein degradation at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **289**, 4444–4454.
- 144) Sugimoto, T., Ninagawa, S., Yamano, S., Ishikawa, T., Okada, T., Takeda, S., & Mori, K. (2017) SEL1L-dependent substrates require Derlin2/3 and Herp1/2 for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Cell Struct. Funct.*, **42**, 81–94.
- 145) Christianson, J.C., Olzmann, J.A., Shaler, T.A., Sowa, M.E., Bennett, E.J., Richter, C.M., Tyler, R.E., Greenblatt, E.J., Harper, J.W., & Kopito, R.R. (2011) Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat. Cell Biol.*, **14**, 93–105.
- 146) Schulz, J., Avci, D., Queisser, M.A., Gutschmidt, A., Dreher, L.S., Fenech, E.J., Volkmar, N., Hayashi, Y., Hoppe, T., & Christianson, J.C. (2017) Conserved cytoplasmic domains promote Hrd1 ubiquitin ligase complex formation for ER-associated degradation (ERAD). *J. Cell Sci.*, **130**, 3322–3335.
- 147) Lilley, B.N. & Ploegh, H.L. (2005) Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14296–14301.
- 148) Huang, C.H., Hsiao, H.T., Chu, Y.R., Ye, Y., & Chen, X. (2013) Derlin2 protein facilitates Hrd1-mediated retro-translocation of sonic hedgehog at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **288**, 25330–25339.
- 149) Lilley, B.N. & Ploegh, H.L. (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*, **429**, 834–840.
- 150) Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., & Rapoport, T.A. (2004) A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*, **429**, 841–847.
- 151) Wu, X., Siggel, M., Ovchinnikov, S., Mi, W., Svetlov, V., Nudler, E., Liao, M., Hummer, G., & Rapoport, T.A. (2020) Structural basis of ER-associated protein degradation mediated by the Hrd1 ubiquitin ligase complex. *Science*, **368**, 6489.
- 152) Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R.J., Nagata, K., & Mori, K. (2006) Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J. Cell Biol.*, **172**, 383–393.
- 153) Greenblatt, E.J., Olzmann, J.A., & Kopito, R.R. (2011) Derlin-1 is a rhomboid pseudoprotease required for the dislocation of mutant alpha-1 antitrypsin from the endoplasmic reticulum. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 1147–1152.
- 154) Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., & Ichijo, H. (2008) ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.*, **22**, 1451–1464.
- 155) Wahlman, J., DeMartino, G.N., Skach, W.R., Bulleid, N.J., Brodsky, J.L., & Johnson, A.E. (2007) Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system. *Cell*, **129**, 943–955.
- 156) Menzies, S.A., Volkmar, N., van den Boomen, D.J., Timms, R.T., Dickson, A.S., Nathan, J.A., & Lehner, P.J. (2018) The sterol-responsive RNF145 E3 ubiquitin ligase mediates the degradation of HMG-CoA reductase together with gp78 and Hrd1. *eLife*, **7**, e40009.
- 157) Song, B.L., Sever, N., & DeBose-Boyd, R.A. (2005) Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol. Cell*, **19**, 829–840.

- 158) Jo, Y., Lee, P.C., Sguigna, P.V., & DeBose-Boyd, R.A. (2011) Sterol-induced degradation of HMG CoA reductase depends on interplay of two Insigs and two ubiquitin ligases, gp78 and Trc8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20503–20508.
- 159) Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J.P., Tiwari, S., & Weissman, A.M. (2001) The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14422–14427.
- 160) van de Weijer, M.L., Krshnan, L., Liberatori, S., Guerrero, E.N., Robson-Tull, J., Hahn, L., Lebbink, R.J., Wiertz, E., Fischer, R., Ebner, D., et al. (2020) Quality control of ER membrane proteins by the RNF185/membralin ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell*, **80**, 374–375.
- 161) Bodnar, N. & Rapoport, T. (2017) Toward an understanding of the Cdc48/p97 ATPase. *F1000 Res.*, **6**, 1318.
- 162) Ye, Y., Meyer, H.H., & Rapoport, T.A. (2001) The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature*, **414**, 652–656.
- 163) Nakatsukasa, K., Huyer, G., Michaelis, S., & Brodsky, J.L. (2008) Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein. *Cell*, **132**, 101–112.
- 164) Twomey, E.C., Ji, Z., Wales, T.E., Bodnar, N.O., Ficarro, S.B., Marto, J.A., Engen, J.R., & Rapoport, T.A. (2019) Substrate processing by the Cdc48 ATPase complex is initiated by ubiquitin unfolding. *Science*, **365**, 6452.
- 165) Bodnar, N.O. & Rapoport, T.A. (2017) Molecular mechanism of substrate processing by the Cdc48 ATPase complex. *Cell*, **169**, 722–735.e9.
- 166) Suzuki, M., Otsuka, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Taniguchi, T., Hashimoto, H., Taniguchi, H., & Fujimoto, T. (2012) Derlin-1 and UBXD8 are engaged in dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at lipid droplets. *Mol. Biol. Cell*, **23**, 800–810.
- 167) Olzmann, J.A., Richter, C.M., & Kopito, R.R. (2013) Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 1345–1350.
- 168) Schrul, B. & Kopito, R.R. (2016) Peroxin-dependent targeting of a lipid-droplet-destined membrane protein to ER subdomains. *Nat. Cell Biol.*, **18**, 740–751.
- 169) Ernst, R., Mueller, B., Ploegh, H.L., & 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.
- 170) Katiyar, S., Li, G., & Lennarz, W.J. (2004) A complex between peptide: N-glycanase and two proteasome-linked proteins suggests a mechanism for the degradation of misfolded glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13774–13779.
- 171) Suzuki, T., Kwofie, M.A., & Lennarz, W.J. (2003) Ngly1, a mouse gene encoding a deglycosylating enzyme implicated in proteasomal degradation: expression, genomic organization, and chromosomal mapping. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 326–332.
- 172) Li, G., Zhao, G., Zhou, X., Schindelin, H., & Lennarz, W.J. (2006) The AAA ATPase p97 links peptide N-glycanase to the endoplasmic reticulum-associated E3 ligase autocrine motility factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8348–8353.
- 173) Suzuki, T., Huang, C., & Fujihira, H. (2016) The cytoplasmic peptide:N-glycanase (NGLY1)-Structure, expression and cellular functions. *Gene*, **577**, 1–7.
- 174) Fujihira, H., Masahara-Negishi, Y., Tamura, M., Huang, C., Harada, Y., Wakana, S., Takakura, D., Kawasaki, N., Taniguchi, N., Kondoh, G., et al. (2017) Lethality of mice bearing a knockout of the Ngly1-gene is partially rescued by the additional deletion of the Engase gene. *PLoS Genet.*, **13**, e1006696.
- 175) Suzuki, T., Yano, K., Sugimoto, S., Kitajima, K., Lennarz, W.J., Inoue, S., Inoue, Y., & Emori, Y. (2002) Endo-beta-N-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in processing of free oligosaccharides in the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9691–9696.
- 176) Costanzi, E., Balducci, C., Cacan, R., Duvet, S., Orlacchio, A., & Beccari, T. (2006) Cloning and expression of mouse cytosolic alpha-mannosidase (Man2c1). *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1580–1586.
- 177) Suzuki, T., Hara, I., Nakano, M., Shigeta, M., Nakagawa, T., Kondo, A., Funakoshi, Y., & Taniguchi, N. (2006) Man2C1, an alpha-mannosidase, is involved in the trimming of free oligosaccharides in the cytosol. *Biochem. J.*, **400**, 33–41.
- 178) Guerriero, C.J. & Brodsky, J.L. (2012) The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol. Rev.*, **92**, 537–576.
- 179) Eura, Y., Yanamoto, H., Arai, Y., Okuda, T., Miyata, T., & Kokame, K. (2012) Derlin-1 deficiency is embryonic lethal, Derlin-3 deficiency appears normal, and Herp deficiency is intolerant to glucose load and ischemia in mice. *PLoS One*, **7**, e34298.
- 180) Dougan, S.K., Hu, C.C., Paquet, M.E., Greenblatt, M.B., Kim, J., Lilley, B.N., Watson, N., & Ploegh, H.L. (2011) Derlin-2-deficient mice reveal an essential role for protein dislocation in chondrocytes. *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 1145–1159.
- 181) Yagishita, N., Ohneda, K., Amano, T., Yamasaki, S., Sugiura, A., Tsuchimochi, K., Shin, H., Kawahara, K., Ohneda, O., Ohta, T., et al. (2005) Essential role of synoviolin in embryogenesis. *J. Biol. Chem.*, **280**, 7909–7916.
- 182) Zhang, T., Kho, D.H., Wang, Y., Harazono, Y., Nakajima, K., Xie, Y., & Raz, A. (2015) Gp78, an E3 ubiquitin ligase acts as a gatekeeper suppressing nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and liver cancer. *PLoS One*, **10**, e0118448.
- 183) Denzel, A., Molinari, M., Trigueros, C., Martin, J.E., Velmurugan, S., Brown, S., Stamp, G., & Owen, M.J. (2002) Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 7398–7404.
- 184) Kraus, A., Groenendyk, J., Bedard, K., Baldwin, T.A., Krause, K.H., Dubois-Dauphin, M., Dyck, J., Rosenbaum, E.E., Kornigut, L., Colley, N.J., et al. (2010) Calnexin deficiency leads to dysmyelination. *J. Biol. Chem.*, **285**, 18928–18938.
- 185) Mesaali, N., Nakamura, K., Zvaritch, E., Dickie, P., Dziak, E., Krause, K.H., Opas, M., MacLennan, D.H., & Michalak, M. (1999) Calreticulin is essential for cardiac development. *J. Cell Biol.*, **144**, 857–868.
- 186) Garbi, N., Tanaka, S., Momburg, F., & Hammerling, G.J. (2006) Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat. Immunol.*, **7**, 93–102.
- 187) Molinari, M., Galli, C., Vanoni, O., Arnold, S.M., & Kaufman, R.J. (2005) Persistent glycoprotein misfolding activates the glucosidase II/UGT1-driven calnexin cycle to delay aggregation and loss of folding competence. *Mol. Cell*, **20**, 503–512.

著者寸描

●蜷川 暁（にながわ さとし）



京都大学大学院理学研究科生物科学専攻
生物物理学教室ゲノム情報発現学分科
特定助教、博士（理学）。

■略歴 1981年岡山県に生る。2000年岡
山県立岡山一宮高等学校卒業。05年京都
大学理学部卒業。07年同大学院理学研究
科修士課程修了。11年3月同大学院理学
研究科博士後期課程単位取得退学。11月
博士（理学）学位取得。12月より特定研

究員（ここまで森和俊研究室所属）。14年4月～15年6月岡崎
統合バイオサイエンスセンター生命動秩序形成研究領域生命分
子研究部門特任研究員（加藤晃一研究室所属）。15年7月京都
大学大学院理学研究科特定研究員。18年1月より特定助教（森
和俊研究室所属）。

■研究テーマ *N*型糖鎖のマンノーストリミングを中心とした
小胞体タンパク質品質管理機構の解明。

■抱負 重要な基礎的現象を解明し、発展させていきたい。

■ウェブサイト <http://www.upr.biophys.kyoto-u.ac.jp/>

■趣味 サッカー、将棋。