

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：34304

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19058008

研究課題名（和文） 小胞体におけるタンパク質品質管理機構

研究課題名（英文） Quality control mechanism of misfolded proteins in the ER

研究代表者

永田 和宏 (NAGATA KAZUHIRO)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：50127114

研究成果の概要（和文）：

小胞体における品質管理機構のなかで、小胞体関連分解の分子機構について解析を行った。ミスフォールドタンパク質を **productive folding** から分解経路へ引き抜く因子 **EDEM1** の他に、小胞体における初めての還元酵素 **ERdj5** が、ミスフォールド基質のジスルフィド結合を還元することによって **ERAD** を促進することを見出した。**ERdj5** の結晶構造解析にも成功し、糖タンパク質の **ERAD** 経路の全体像を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the molecular mechanism of ER-associated degradation (ERAD). In addition to EDEM, which recruits the misfolded proteins from productive folding pathway to degradation pathway, we also found a novel reductase in the ER, ERdj5, is also involved in the acceleration of ERAD by cleaving disulfide bonds of the substrates. By using biochemical and structural analysis, we have revealed the substrate transfer pathway in the ERAD system; misfolded proteins are transferred from calnexin to EDEM1, ERdj5, BiP and finally to SEL1L in the ERAD complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	23,200,000	0	23,200,000
2008年度	23,200,000	0	23,200,000
2009年度	23,200,000	0	23,200,000
2010年度	23,200,000	0	23,200,000
2011年度	23,200,000	0	23,200,000
総計	116,000,000	0	116,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：小胞体、品質管理、小胞体関連分解、レドックス制御、分子シャペロン

1. 研究開始当初の背景

細胞内においては、合成され、いったん正しい構造へ折り畳まれたタンパク質も、不断に変性の危険にさらされている。また、遺伝

的変異などによって正しくフォールディングできないタンパク質の監視とハンドリングも細胞の生存にとって必須の防御システムである。本研究においては、主として小胞体にお

けるタンパク質の品質管理機構を研究することを目的とした。

その背景として、小胞体におけるミスフォールドタンパク質の分解（小胞体関連分解、ERAD）では、いったん基質はサイトゾルへ逆輸送された後にユビキチン・プロテアソーム系によって分解されることが明らかになり、国際的にもっともホットな領域になっている中、申請者らはERADのキー因子であるEDEM1という新規遺伝子をクローニングし、これが糖鎖を認識しつつミスフォールドタンパク質の分解促進に寄与していることなどを報告してきた（Science, 2003, Y. Oda, K. Nagata et al. 計4名, 4番目など）という経緯がある。

本研究は、このEDEM1から着想し、小胞体内レドックス制御の重要性を視野に入れながら、ERADシステムの分子機構の全体像に迫ろうというものである。

2. 研究の目的

(1) 小胞体関連分解における EDEM ファミリータンパク質の役割の解明

小胞体においてミスフォールドしたタンパク質は、小胞体内から逆輸送チャンネルを介して、サイトゾルへ逆輸送され、小胞体関連分解(ERAD)と呼ばれる機構により分解される。申請者らは、この分解の鍵となる因子として EDEM1 および EDEM ファミリータンパク質を発見した。①EDEM ファミリータンパク質の性質の解析、②EDEM に関連し、ERAD を促進する他の因子の同定・探索と、それらが EDEM 経路のどこに位置するのかの解析を行う。

(2) 小胞体レドックス関連因子によるミスフォールドタンパク質の分解制御の解明

小胞体においてはタンパク質はジスルフィド結合を介してフォールディング骨格を安定化するが、これには酸化酵素、イソメラーゼが関わっている。一方、ミスフォールドしたタンパク質がトランスロコンを通過するためには、ジスルフィド結合が還元され開裂していなければならない。ミスフォールドタンパク質の効率的な ERAD 促進のために、①小胞体におけるレドックスネットワークの解明、②とりわけ小胞体還元酵素の同定とクローニング、③それら還元酵素による基質タンパク質の凝集阻害、ジスルフィド結合の還元を通じてレトロトランスロケーションの促進について研究する。

3. 研究の方法

(1) EDEM ファミリータンパク質およびERAD 関連分子の研究は、永田が中心になって推進した。①組換え体EDEM の精製を通じて、タンパク質としてのEDEM がどのように基質認識

に関わるかを、レクチン活性、酵素活性、基質認識活性などについて解析。②EDEM と結合してERADを促進する他のERAD関連因子を同定し、それらの共同作用によるERADの全体像に迫る。③ERAD に関係するタンパク質として YOS9 が酵母で発見され、Man8B レクチンではないかと報告された。YOS9 はEDEM の下流因子と報告されたがこれについてはまったく明らかではない。この因子とEDEM との関係を詳細に検討。④ユビキチン化におけるE3 酵素、gp78 などがERAD に関与することを見いだし、これらの因子の関与とEDEM との関連を調べる。

(2) 小胞体レドックス制御とERAD との関連については、永田と稲葉が協力して行った。稲葉はこれまでに大腸菌ペリプラズムにおけるレドックス制御に関して顕著な業績を挙げてきた。永田と稲葉は協力しながら、次のような研究を行った。①小胞体におけるジスルフィド結合還元に関わる酵素の同定を行い、その還元力の定量、およびERAD 基質の還元に伴う分解の促進について解析を進める。②小胞体におけるレドックス関連因子間のジスルフィドネットワークを明らかにするため、各因子をRNAi のノックダウンしたのち、各因子のレドックス状態をプロテオーム的に解析し、小胞体におけるproductive folding およびERAD において、それらレドックスネットワークの重要性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) EDEM ファミリータンパク質およびERAD 関連分子の研究

①量が少ないこと、凝集性が高く安定なタンパク質として精製がむずかしいことなどから、EDEM の精製は困難を極めた。そこで細胞内に EDEM を発現させ、その性質を調べる方法に切り替え、その結果、EDEM はわずかながらマンノシダーゼとしての酵素活性を持つこと、非糖タンパク質にも結合性を有することから必ずしもレクチンとしての性質だけによって ERAD を促進しているのではないことを明らかにした。

②新しい方法論を採用して、EDEM1 に結合しERAD に関わる新規因子を探索した結果、ERdj5 という新しいタンパク質が、小胞体においてジスルフィド結合の還元酵素として働き、ERAD を促進していることを発見し、Science 誌に発表することができた。

③さらに ERdj5 が小胞体分子シャペロン BiP とも結合し、分解基質の受け渡しを行っていることを明らかにした。

④ERdj5 の X 線結晶構造解析を稲葉と共同で推進し、構造を解くことに成功した。ERdj5 は C 末端に位置するチオレドキシシン様ドメイン(Trx 3/4 ドメイン)を介して、ミスフォー

ルドした糖タンパク質を EDEM1 から受け取る一方、J ドメインを介して、基質を分子シャペロン BiP に受け渡す。また同じ C 末端領域に EDEM1 も基質も結合し、さらに還元活性のこの領域にあることを明らかにした。

⑤このような構造情報を用いて、分解基質がカルネキシン、EDEM1、ERdj5、BiP と受け渡され、最終的に ERAD 複合体の 1 つである SEL1L に受け渡されて、小胞体膜チャネル、ディスロコンからサイトゾルへ逆輸送される、ERAD 経路の全体像を明らかにすることに成功した。この成果は *Mol. Cell* 2011 に採択され、その表紙を飾ることになった。

⑥EDEM・ERdj5・BiP 経路は糖タンパク質の分解経路であるが、非糖タンパク質の分解経路がカルネキシン・EDEM 経路を使わず、BiP/ERdj5/BiP からなる一連の因子間をリレーされることによって分解されることを示すことができた。このように細胞内には、糖タンパク質、非糖タンパク質の 2 つの ERAD 経路があることを明らかにした。

(2) 小胞体レドックス制御と ERAD

①小胞体に局在する 21 種類の酸化還元酵素にタグを付け、免疫沈降によって相互作用するタンパク質を同定するインタラクトーム解析を行った。その結果、主たる酸化還元酵素 ERO1a に結合する数種類の酸化還元酵素群を見つけることができた。なかでも ERO1a は PDI と強い結合を示し、機能的にも互いに制御し合うハブ複合体を形成していた。また酸化力は ERO1a から PDI を経て、他の酸化還元酵素にも伝えられることを示すことができた。小胞体においては多くの酸化還元酵素が複雑なネットワークを形成しながら酸化還元反応を遂行していることが明らかになった。

③小胞体における主要な酸化酵素は Ero1a および PDI である。Ero1 による PDI の酸化が酸化反応の起点になっているが、この酸化反応における電子伝達経路を明らかにすることができた。酸素電極および SPR 解析を用いて、GSH (グルタチオン) から電子が PDI の a ドメインに、a ドメインから分子内伝達経路を経て、a' ドメインに移り、それから Ero1a に伝えられることを示すことができた。

③ERdj5 の他に小胞体において酸化還元に関与する因子の探索を行い、新たな酸化還元酵素 TMX4 を発見、クローニングすることに成功した。TMX4 は小胞体膜に局在する酸化酵素であり、タンパク質の構造形成に必須のジスルフィド結合形成に関与することを示すことができた。特に、TMX4 の小胞体内腔側に存在する CXXC モチーフが酸化に関与することを変異体作成などによって明らかにし、また TMX4 が小胞体分子シャペロンカルネキシンと相互作用することによって、新生ポリペプ

チド鎖にジスルフィド結合を導入することを示した。また同様に他の酸化還元酵素 Erp57 とも相互作用しつつ、その活性を發揮している可能性を示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 1 件)

①T. Ono, T. Miyazaki, Y. Ishida, M. Uehata and K. Nagata : Direct in vitro and in vivo evidence for interaction between Hsp47 protein and collagen triple helix.

J. Biol. Chem. 287(9):6810-6818(2012)

DOI : 10.1074/jbc.M111.280248

②Y. Masago, A. Hosoya, S. Kawano, A. Nasu, J. Toguchida, K. Fujita, H. Nakamura, G. Kondoh and K. Nagata : Molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation.

J. Cell Sci. 125(5):1118-1128(2012)

DOI : 10.1242/jcs.089748

③K. Araki and K. Nagata : Functional in vitro analysis of ERO1 and protein-disulfide isomerase (PDI) pathway.

J. Biol. Chem. 286(37):32705-32712(2011)

DOI : 10.1074/jbc.M111.227181

④M. Hagiwara, K. Maegawa, M. Suzuki, R. Ushioda, K. Araki, Y. Matsumoto, J. Hoseki, K. Nagata and K. Inaba : Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5

Mol. Cell 41(4):432-444(2011)

DOI : 10.1016/j.molcel.2011.01.021

⑤J. Hoseki, H. Sasakawa, Y. Yamaguchi, M. Maeda, H. Kubota, K. Kato and K. Nagata : Solution structure and dynamics of mouse ARMET

FEBS. Letters. 584:1536-1542 (2010)

DOI : 10.1016/j.febslet.2010.03.008

⑥Y. Sugiura, K. Araki, S. Iemura, T. Natsume, J. Hoseki and K. Nagata : The novel thioredoxin-related transmembrane protein TMX4 has reductase activity

J. Biol. Chem. 285(10):7135-7142 (2010)

DOI : 10.1074/jbc.M109.082545

⑦N. Hosokawa, Y. Kamiya, D. Kamiya, K. Kato & K. Nagata : Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-Glycans

J. Biol. Chem. 284(25):17061-17068 (2009)

DOI : 10.1074/jbc.M809725200

⑧ Y. Ishida, A. Yamamoto, A. Kitamura, S. R. Lamande, T. Yoshimori, F. B. John, H. Kubota and K. Nagata : Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection.
Mol. Biol. Cell. 20:2744-2754(2009)
DOI: 10.1091/mbc.E08-11-1092

⑨ R. Ushioda, J. Hoseki, K. Araki, G. Jansen, D. Y. Thomas and K. Nagata : ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER.
Science 321(5888):569-572(2008)
DOI : 10.1126/science.1159293

⑩ N. Hosokawa, I. Wada, K. Nagasawa, T. Moriyama, K. Okawa, and K. Nagata : 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(2008)
DOI : 10.1074/jbc.M709336200

⑪ D. Morito, K. Hirao, F. Tokunaga, N. Hosokawa, D. M. Cyr, K. Tanaka, K. Iwai and K. Nagata : Gp78 cooperates with RMA1 in ER-associated degradation of CFTRΔF508
Mol. Biol. Cell. 19:1328-1336(2008)
DOI : 10.1091/mbc.E07-06-0601

⑫ S. Hirayama, Y. Yamazaki, A. Kitamura, Y. Oda, D. Morito, K. Okawa, H. Kimura, D. M. Cyr, H. Kubota and K. Nagata : MKKS is a centrosome-shuttling protein degraded by disease-causing mutations *via* CHIP-mediated ubiquitination.
Mol. Biol. Cell. 19:899-911(2008)
DOI : 10.1091/mbc.E07-07-0631

[学会発表] (計 153 件、以下招待講演のみを記す)

① K. Nagata : Protein quality control and proteostasis in the ER.
Cold Spring Harbor Asia Conference, "Protein Homeostasis in Health & Disease", Suzhou(China), 2011.9.29

② K. Nagata and R. Sitia : Regulation of redox homeostasis in the ER
Conference on Quality Control: Folding and Degradation of Proteins in the Endoplasmic Reticulum, Ascona(Switzerland), 2011.9.15

③ K. Nagata : Two distinct ERAD pathways contribute for maintaining the protein homeostasis in the ER
EMBO Conference "The biology of Molecular Chaperones", Grunlsee(Austria), 2011.5.22

④ K. Nagata : Regulation in the electron transfer cascade among the oxidoreductases in the endoplasmic reticulum.
The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, 2010.9.14

⑤ K. Araki, R. Ushioda, J. Hoseki and K. Nagata : Quality control & Redox regulatory network
Gordon Research Conference, Lucca (Italy), 2010.5.11

⑥ K. Nagata : Two distinct ERAD pathways for misfolded glycoprotein and non-glycoprotein.
4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. Plenary lecture, Sapporo, 2009.10.06

⑦ K. Nagata : Quality control of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum.
21th IUBMB International Congress and 12th FAOBMB Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai(China), 2009.08.05

⑧ K. Nagata : Revisiting of collagen-specific molecular chaperone Hsp47: Fate of procollagen with or without Hsp47.
Yokosuka Science Festa 2009 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium. Opening Lecture, Shonan, 2009.06.04

⑨ K. Nagata, Y. Masago, Y. Ishida : Revisiting of collagen-specific molecular chaperone HSP47: Alternative degradation pathway of misfolded procollagen in the ER; ERAD and autophagy
Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones and stress Response", Cold Spring Harbor(USA), 2008.05.01

⑩ K. Nagata : Collagen-specific molecular chaperone HSP47
7th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Cairns(Australia), 2007.10.30

⑪ K. Nagata : Thiol reductase ERdj5 accelerates the ER-associated degradation by cleaving intermolecular disulfide bonds of misfolded proteins.

Gordon Research Conference, Stress Proteins in Growth, Development & Disease, Oxford(UK), 2007.08.21

⑫ K. Nagata : A novel thiol reductase ERdj5 accelerates ER-associated degradation by cleaving the intermolecular disulfide bonds of misfolded proteins.

FASEB Summer Research Conference, Proteins Folding in the Cell, Palm Springs(USA), 2007.07.30

[図書] (計4件)

① K. Araki and K. Nagata : Protein Folding and Quality Control in the ER
Cold Spring Harbor Perspectives in Biology "Protein Homeostasis", *Cold Spring Harbor Laboratory press* pp.121-145(2011)

[その他]

ホームページ :

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~nagata/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 和宏 (NAGATA KAZUHIRO)
京都産業大学・総合生命科学部・
教授
研究者番号 : 50127114

(2) 研究分担者

稲葉 謙次 (INABA KENJI)
九州大学・生体防御医学研究所・
特任准教授
研究者番号 : 10423039

(3) 連携研究者

該当なし