

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 11 日現在

機関番号：34304

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2007～2011

課題番号：19GS0314

研究課題名（和文） タンパク質品質管理機構

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

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）： 細胞内には、タンパク質の品質を厳正に管理するためのシステムが存在する。特に分泌タンパク質や膜タンパク質の合成の場である小胞体には、分子シャペロンをはじめとしたタンパク質の productive folding を促すシステムと、一方でミスフォールドしたタンパク質を適正に処理するための分解促進システムが存在する。後者のシステムは小胞体関連分解（ERAD）機構と呼ばれ、ミスフォールドしたタンパク質を認識する因子、誤ったジスルフィド結合を開裂させる因子、サイトゾルへそれら基質を逆輸送するための因子など、幾つかの小胞体タンパク質が必須の因子として関与している。本研究による主な成果として、1）ERAD において重要な働きをする還元酵素 Erdj5 の結晶構造が明らかになり、基質がどのような分子間を受け渡されて分解にいたるのか、その一連の経路を明らかにした、2）従来、糖タンパク質の品質管理機構については研究が進んできたが、非糖タンパク質の ERAD 機構として、まったく新しい経路の存在することを明らかにした、3）productive folding によって新生タンパク質が正しく合成される過程で、小胞体内の酸化還元酵素（oxidoreductase, OR）によるジスルフィド結合形成は必須のプロセスであるが、小胞体内レドックスネットワークについて研究を行い、主要な酸化酵素 Ero1a から PDI、Erp46 などの OR にいたる酸化カスケードの存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Our study was performed by focusing two issues in protein quality control in the endoplasmic reticulum (ER). The first one was on the productive folding of nascent polypeptides by molecular chaperones and oxidoreductases in the ER. The second one was to reveal the quality control mechanism of ER-associated degradation (ERAD) system that eliminates the misfolded proteins from the ER. We found two novel factors involved in the ERAD, EDEM1 and Erdj5. In this term, mainly three issues on this proposal was addressed: 1) we succeeded to solve the crystal structure of Erdj5 that reduces the disulfide bonds in the misfolded proteins to be degraded and proposed the substrate transfer pathway in the ERAD system for glycoproteins, 2) we revealed the novel ERAD pathway for misfolded non-glycosylated proteins, and 3) we showed the electron transfer pathway in the process of oxidation including Ero1a, PDI and Erp46.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	89,500,000	26,850,000	116,350,000
2008 年度	85,600,000	25,680,000	111,280,000
2009 年度	89,500,000	26,850,000	116,350,000
2010 年度	89,500,000	26,850,000	116,350,000
2011 年度	89,500,000	26,850,000	116,350,000
総計	443,600,000	133,080,000	576,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：品質管理、フォールディング、レドックス、小胞体

### 1. 研究開始当初の背景

本研究を開始するにあたり、当研究室では小胞体品質管理機構の中心的役割を担う二つの因子を同定していた。一つは EDEM であり、もう一つは ERdj5 である。EDEM はミスフォールドタンパク質のマンノース 8 型を特異的に認識するレクチン様タンパク質であり、正しくフォールドされた正常なタンパク質と、分解されるべきミスフォールドタンパク質を見分ける必須の因子である。一方 ERdj5 は、ミスフォールドタンパク質内に誤って形成されたジスルフィド結合を特異的に還元し、EDEM と協同的に小胞体関連分解を促進する因子である。ERdj5 は、小胞体においてジスルフィド結合の形成・異性化に関わるとされる Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリーの酵素の一つであり、この因子の発見を皮切りに、小胞体品質管理とレドックス制御という観点で本格的に研究を開始するに至った。

### 2. 研究の目的

当研究室で発見同定した EDEM、ERdj5 によって促進される小胞体関連分解経路の作用機序を分子構造レベルで詳細に解明することを主目的とした。さらに、小胞体におけるチオール基をベースとしたレドックスネットワークを網羅的に同定し、小胞体品質管理とレドックス制御の関連性について新たな知見を得ることも重要課題とした。

### 3. 研究の方法

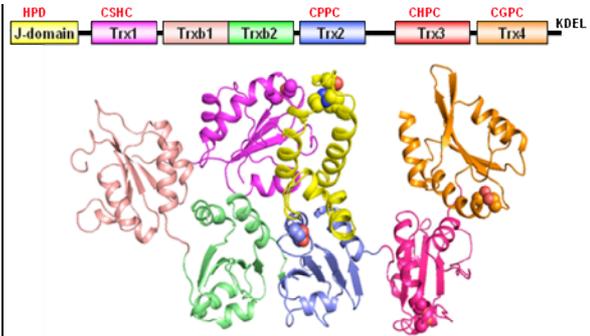
ERdj5 全長の高分解能構造解明を目指し、その X 線結晶構造解析に取り組んだ。さらに得られた構造情報を基に、系統的な生化学実験・細胞生物学実験を遂行し、基質の認識から、還元、サイトゾルへの逆行輸送といった一連の時空間的動態の解明を行った。

さらに小胞体に存在する 20 種類にも及ぶ PDI family タンパク質間のレドックスネットワークおよび PDI 酸化因子である Ero1 を中核とした電子移動経路を網羅的かつ厳密に捉えるため、プロテオミク的研究、特に Ero1a を中心としたインターラクトーム解析を遂行した。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規小胞体還元酵素 ERdj5 の結晶構造解析と ERAD における基質伝達経路の解明

共同申請者の稲葉謙次との共同研究により、ERdj5 の結晶化に成功し、その構造を 2.5 Å の解像度で決定することに成功した(図)。



ERdj5 は酸化還元活性を持った 4 つのチオレドキシンドメインのほかに、2 つの不活性のチオレドキシンドメインを持ち、還元活性は C 側クラスターの 2 つのドメインにあることを明らかにした。EDEM1 も C 側クラスターに結合し、基質も同様、まず C 側に結合することが明らかとなった。これらの構造情報を元に、基質の分解過程を明らかにした。基質はまずカルネキシンによってフォールディングが試みられるが、それに失敗すると、マンノースのトリミング後、EDEM1 に受け渡され、さらに ERdj5 の C 側に受け渡されてジスルフィド結合が還元される。そのうち、基質は分子シャペロン BiP に受け渡されて、ディスロコンチャネルを通して小胞体からサイトゾルへ逆輸送され、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となった。

#### (2) 非糖タンパク質の新規 ERAD 経路

非糖タンパク質の ERAD 経路についてはほとんどわかっていなかったため、糖鎖付加サイトを欠失した変異体を基質とし、解析をおこなった。その結果、非糖タンパク質は、まず BiP によって認識され、EDEM1 を介することなく ERdj5 に受け渡されることを明らかにした。ERdj5 によってジスルフィドの還元が起こったあとは、糖タンパク質と同様、BiP によってディスロコンチャネルまで運ばれ、分解にいたることが明らかとなった。さらに重要な点は、糖タンパク質の多くが小胞体ストレスなどによって変性した場合に、糖タンパク質 ERAD 経路が飽和するが、非糖タンパク質 ERAD 経路は、その場合にバックアップシステムとして機能することが明らかになったことである。このように、小胞体においては、糖タンパク質、非糖タンパク質の 2 つの ERAD 経路を用意しており、一方が溢れた場合に備えていることがわかった。

### (3) 小胞体におけるレドックスネットワークによる productive folding

小胞体には20種類以上のオキシドレダクターゼ(OR)が知られている。これは新生タンパク質のフォールディングが如何に重要であるかを示唆するものである。しかし、それら多くのORの機能は未知であるばかりでなく、それらの間の関係はほとんどわかっていない。

そこで我々はインターラクトーム解析により、もっとも重要な酸化酵素 Ero1a に結合するORを網羅的に調べた。その結果、Ero1aはPDIともっとも強く結合し、Ero1a/PDIが互いに活性を調節するハブ複合体を形成することを明らかにした。さらにEro1aによって酸化されたPDIが、さらに別のORを酸化する、いわゆるカスケード反応によって効率的に基質のジスルフィド結合形成を促進しているという新しいモデルを提唱するにいたった。

またEro1aによるPDIの酸化の際の、電子伝達経路を明らかにした。それによれば、GSHからPDIのN末側のチオレドキシンドメインaに受け渡された電子は、分子内を移動し、C末側のチオレドキシンドメインa'に移動すること、さらにカスケード反応の場合には、それとは違って、aドメインをスキップして、直接a'ドメインに移行するという新規の経路を明らかにした。これらORのカスケード反応を明らかにすることは、小胞体内のタンパク質の品質管理機構の理解にとってきわめて重要な知見を提供するものである。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計39件)

S.Vavassori, M. Cortini, S. Masui, S.Sannino, T.Anelli, I. R.Caserta, C.Fagioli, A.Fornili, M. F.Mossuto, M .Degano, K.Inaba, & R.Sitia : A pH-Regulated Quality Control Cycle for Surveillance of Secretory Protein Assembly.

*Molecular Cell* in press (2013) 査読有

T. Fujimori, Y. Kamiya, K. Nagata, K. Kato & N. Hosokawa : Endoplasmic reticulum lectin XTP3-B inhibits endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded  $\alpha$ 1-antitrypsin variant. *FEBS J.* in press(2013) 査読有

Y. Ishikawa, J. A. Vranka, S. P. Boudko, E. Pokidysheva, K. Mizuno, K. Zientek, D. R. Keene, A. M. Rashmir-Raven, K. Nagata, N. J. Winand and H. P. Bachinger : The mutation in cyclophilin B that causes hyperelastosis cutis in the American Quarter Horse does not affect

peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity, but shows altered cyclophilin B-protein interactions and affects collagen folding.

*J. Biol. Chem.* 287(26):22253-22265(2012)  
doi: 10.1074/jbc.M111.333336. Epub 2012 May 3. 査読有

T. 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 査読有

Y.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 査読有

K. 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 査読有

M. 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 査読有

J. 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 査読有

Y. 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 査読有

N. 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 査読有

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 査読有

Inaba, K., Murakami, S., Nakagawa, A., Iida,  
H., Kinjo, M., Ito, K. and Suzuki, M. : Dynamic  
nature of disulfide bond formation catalysts  
revealed by crystal structures of DsbB.  
*EMBO J* 28, 779-791 (2009)  
DOI: 10.1038/emboj.2009.21 査読有

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 査読有

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 査読有

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 CFTR $\Delta$ F508  
*Mol. Biol. Cell.* 19:1328-1336(2008)  
DOI : 10.1091/mbc.E07-06-0601 査読有

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 査読有

Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K., Akiyama,  
S., Ito, K. and Akiyama, Y. : A pair of circularly  
permuted PDZ domains control RseP, the S2P  
family intramembrane protease of E. coli.  
*J. Biol. Chem.* 283:35042-52 (2008)  
DOI : 10.1074/jbc.M806603200 査読有

〔学会発表〕(計 183 件、以下国際学会の招  
待講演のみを記す)

K. Nagata : Regulation of redox homeostasis  
in the ER.Cold Spring Harbor Meeting,  
Molecular Chaperones & Stress Responses,Cold  
Spring Harbor(USA),2012.05.02

K. Nagata : Two distinct ERAD pathways for  
misfolded glycoproteins and non glycoproteins  
SFB594 3<sup>rd</sup> International Symposium on  
Molecular Machines in Protein Folding and  
Protein Transport, Munich(Germany),  
2012.07.24

K. Nagata : Regulation and structure of a novel  
AAA+/ubiquitin ligase protein, mysterin  
EMBO/EMBL Symposium“Quality  
Control-From Molecules to Organelles-  
”,Heiderberg(Germany), 2012.09.21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 18 件)

D. Morito and K. Nagata :  
ER stress proteins in autoimmune and inflammatory diseases.  
*Frontiers in Inflammation* 3:48 (2012)

M. Hagiwara and K. Nagata :  
Redox-dependent protein quality control in the ER : folding to degradation.  
*Antioxidants & Redox Signaling* 16(10):1119-1128(2012)

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)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)  
名称 : 2 - ヒドロキシベンズアルデヒド化合物、これを含有するコラーゲン細胞外分泌阻害剤及び医薬品組成物  
発明者 : 夏目徹、永田和宏、伊藤進也、土井隆行、吉田将人  
権利者 : 同上  
種類 : 特許  
番号 : 特願 2012-163835  
出願年月日 : 2012 年 7 月 24 日  
国内外の別 : 国内

名称 : カルシウムポンプ制御物質のスクリーニング方法、メラニン色素合成阻害物質のスクリーニング方法、ベクター、並びに、細胞  
発明者 : 潮田亮、永田和宏  
権利者 : 同上  
種類 : 特許  
番号 : 特願 2012-176344  
出願年月日 : 2012 年 8 月 8 日  
国内外の別 : 国内

取得状況(計 0 件)

〔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・准教授  
研究者番号 : 10423039

(H23 : 連携研究者)

細川 暢子 (HOSOKAWA NOBUKO)  
京都大学・再生医学研究所・准教授  
研究者番号 : 00263153

寶関 淳 (HOSEKI JUN)  
京都大学・生理化学研究ユニット・特定准教授  
研究者番号 : 10423039