

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840079

研究課題名(和文)新規還元酵素ERdj5による小胞体恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文)ERdj5 mediated ER homeostatic mechanism

研究代表者

潮田 亮 (USHIODA, Ryo)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：30553367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：内在性ERdj5と小胞体カルシウムポンプSERCA2がジスルフィド結合を介してSERCA2ポンプの機能を制御していることを見出した。ERdj5自身が小胞体内腔のカルシウム濃度に応じて、オリゴマーを形成し、SERCA2との結合・解離が小胞体のカルシウム濃度に依存していることを証明した。また、コラーゲンの蓄積がオートファジーの阻害によって顕著に蓄積し、細胞死の原因になることをつきとめた。特に肝星細胞では小胞体ストレス依存的な細胞死が引き起こされ、このことは肝硬変の治療法に応用できる知見であった(K.Kawasaki, R.Ushioda et al. 2015 J. Biol. Chem.)。

研究成果の概要(英文)：We declared that ERdj5 interacts with SERCA2, which is a Ca²⁺ uptake pump, through the mixed disulfide bond. It suggests that ERdj5 reductase activity promotes SERCA2 pump function. Recently, we found the oligomer formation of ERdj5 depending on Ca²⁺ concentration in ER. These oligomer formation regulates the interaction with SERCA2. Additionally, we reported that accumulations of collagen by Hsp47 deficient lead to Cell death through ER stress by Autophagy inhibition. Especially, these cell death links to therapeutic for liver fibrosis (K. Kawasaki, R.Ushioda et al. 2015 J. Biol. Chem.)

研究分野：細胞生物学

キーワード：タンパク質品質管理 レドックス 小胞体関連分解 カルシウム恒常性

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は正しい構造を獲得することで、初めて本来の機能を有することとなる。細胞内小器官の一つである小胞体には、タンパク質の機能獲得・維持のためのタンパク質品質管理機構が備わり、タンパク質の正しい構造を維持するために多くの酵素や分子シャペロンが活躍している。また、小胞体はサイトゾルと比べ酸化的環境にあり、この環境はタンパク質の構造形成に必要なジスルフィド結合の形成に有利に働き、また小胞体中存在する PDI を始めとした酸化異性化酵素もジスルフィド結合を促進する。このように小胞体環境はタンパク質の構造形成には有利な環境にあると言える。しかし、これらの品質管理を受けてもなお正しい構造を獲得・維持できないタンパク質(ミスフォールドタンパク質)はタンパク質本来の機能を持たないばかりか、小胞体にストレスを与え、さらに自身で巨大な凝集塊を作り、細胞死を引き起こす原因となる。これら細胞死はアルツハイマー病やプリオン病などに代表される神経変性疾患の主要な原因と考えられており、小胞体ストレスは糖尿病などの多くの代謝異常病に関わることも近年、知られてきている。細胞にはこれら疾病に起因する異常タンパク質に対し、防御機構の側面として小胞体ストレス応答が存在する。しかし、これら防御機構に関しては不明な点も多く、メカニズムの解明は多くの疾病の原因究明に繋がることが期待されている。

一方、小胞体は細胞内カルシウム貯蔵庫としても重要な役割を果たしている。小胞体にはサイトゾルと比べて約1万倍の濃度でカルシウムイオンが貯蔵されており、ホルモンの調節性分泌や免疫反応など多様な細胞内応答が小胞体からサイトゾルへのカルシウム放出によって調節されている。逆にサイトゾルの恒常的なカルシウム濃度の上昇は細胞毒性を示し、サイトゾルのカルシウムイオンは速やかに小胞体へと取り込まなければならない。これら小胞体によるカルシウムの流入は小胞体膜上に存在するカルシウムトランスポーターが担っており、小胞体のカルシウムホメオスタシスの維持には欠かせない。

2. 研究の目的

我々は新たに内在性 ERdj5 と小胞体カルシウムポンプ SERCA2 がジスルフィド結合を介して結合することを見出した。SERCA2 の小胞体内腔側にはカルシウムイオンの輸送を調節することが知られているシステイン残基が存在し、ERdj5 の還元活性がタンパク質品質管理に留まらず、カルシウムホメオスタシスに影響を与える可能性が示唆された。ERdj5 によるレドックス制御がタンパク質品質管理とカルシウムホメオスタシスの

両環境要因に影響を与えるか、また逆に SERCA2 などカルシウムホメオスタシスに関わる因子が ERdj5 を介したタンパク質品質管理やレドックス制御に影響を与えるかを観察したいと考えている。本研究では ERdj5 に着目し、小胞体内で展開する複雑な恒常性維持機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 還元酵素 ERdj5 による SERCA2 を介したカルシウムホメオスタシスの制御

我々は内在性 ERdj5 がジスルフィド結合を介して SERCA2 と結合することをすでに明らかにしている。SERCA2 は小胞体膜上に存在するカルシウムポンプで、サイトゾルから小胞体へと輸送する。SERCA2 には小胞体内腔側に2つのシステイン残基が存在し、このシステイン同士はジスルフィド結合を形成し SERCA2 のポンプ機能を抑制することが知られている。以前から、このシステインを介してレドックス依存的に SERCA2 が制御されている可能性が議論されていたが、実際の調節メカニズムについては不明な点が多く、特にジスルフィド結合の切断に関しては今まで言及されていなかった。そこで、ERdj5 と SERCA2 の結合が SERCA2 のポンプ機能に影響を与えるか、また小胞体のカルシウムバランスに影響を与えるかを観察する必要がある。研究を進める上で、細胞内のカルシウム濃度を経時的に測定することが必須であり、Yellow Cameleon (YC) を用い、サイトゾルおよび小胞体内のカルシウム濃度を高い感度で測定できる系を確立している。YC はカルシウム結合サイトを持つカルモジュリンと YFP および CFP を融合したタンパク質を細胞内に発現させ、カルシウムの結合に伴う構造変化によって引き起こされる FRET (蛍光共鳴エネルギー移行) を利用したカルシウムインディケータである。また現在、ERdj5 をノックアウトしたマウスから樹立した MEF を用いて、小胞体へのカルシウム流入を観察している。

(2) カルシウムポンプ SERCA2 による ERdj5 の活性制御

今回の結合アッセイでは、内在性 ERdj5 と SERCA2 で安定的な結合が見出されており、ERdj5 の機能を SERCA2 が調節している可能性がある。ERdj5 の活性に関して以下のように測定法が確立している。

リコンビナント ERdj5 を用いた *in vitro* での解析

我々はリコンビナント ERdj5 の発現および精製法を確立しており、ERdj5 の還元活性はインスリン還元活性法を採用する予定である。また、タンパク質間相互作用は BIACORE (表面プラズモン共鳴) を用いて観察することが出来る。いずれもカルシウム濃度の影響

を観察し、実験を行う。

SERCA2 のレドックス状態の変化
哺乳類細胞を用いて、パルスチェイス法により ERAD 基質の分解を SERCA2 過剰発現またはノックダウンにより観察する。また、ERdj5 に存在するチオール基をマレイミド修飾し、レドックス状態の変化を細胞内で観察する。

(3) 小胞体レドックスネットワークの再構築に向けた網羅的なアプローチ

小胞体のレドックス環境はサイトゾルと比較して非常に酸化的に保たれている。小胞体は新生タンパク質のフォールディングの場であり、タンパク質のジスルフィド結合の形成(酸化)には有利な環境であるといえる。この環境を維持するために、小胞体には 20 種類を超えるチオレドキシンスーパーファミリが存在し、それらがネットワークを形成し、基質のジスルフィド結合を触媒している。ERO1/PDI 複合体を中心に酸化力は各チオレドキシンスーパーファミリに提供されている。これらレドックスネットワークの再構築は当該分野の 1 つの目標であるといえる。

4. 研究成果

新たに内在性 ERdj5 と小胞体カルシウムポンプ SERCA2 がジスルフィド結合を介して結合することを見出し、SERCA2 ポンプの機能を制御していることを見出した。実験計画にあるとおり、FRET を用いてカルシウム動態を観察し、加えて Fura2 や Indo1 などのカルシウム検出試薬を用いて確認した。ERdj5 ノックアウト細胞において優位に小胞体内腔のカルシウム濃度が低下し、また小胞体内腔へのカルシウム uptake が抑制されていた。計画(2)にある SERCA2b のレドックス状態を観察することに成功し、ERdj5 ノックダウン細胞では SERCA2b のレドックス状態が酸化的にシフトしており、ERdj5 が SERCA2b の還元酵素であることが証明された。また、最近 ERdj5 自身が小胞体内腔のカルシウム濃度に応じて、オリゴマーを形成し、SERCA2 との結合・解離が小胞体のカルシウム濃度に依存していることがわかった。この内容を含め論文投稿準備中である。

また、ケンブリッジ大学 David Ron 博士たちとの共同研究で、小胞体内腔のカルシウム濃度の低下が小胞体内腔の代表的な酸化還元酵素 PDI のモビリティが著しく低下し、不活化することをつきとめた。このとき、還元酵素 ERdj5 のモビリティは低下しておらず。このことはカルシウム濃度低下時に ERdj5 がその恒常性維持を保つために働きうることを証明した (Avezov E *et al.* 2015 *BMC Biol.*)。

さらに我々は小胞体レドックスネットワー

クの再構築として、ERdj5 の還元ソースの探索を試みた。還元酵素の酵素反応は素早く、ERdj5 の活性中心変異体を用いてトラップしたり、クロスリンカーを用いて結合を安定化し、結合タンパク質の MS 解析を行った。すでに酸還元反応に関わるいくつかの候補タンパク質を同定している。今後、候補タンパク質のクローニングおよびリコンビナント精製を行い、ERdj5 の還元活性にどのように影響を与えるか解析を進める予定である。また、*in vivo* の実験では細胞内における ERdj5 の活性を小胞体関連分解に焦点を当て、候補タンパク質の共発現またはノックダウンによって影響を観察する予定である。

また、小胞体品質管理において、コラーゲンの小胞体内蓄積がオートファジーの阻害によって顕著に蓄積し、細胞死の原因になることをつきとめた。特に肝星細胞では小胞体ストレス依存的な細胞死が引き起こされ、このことは肝硬変の治療法に応用できる知見であった (K.Kawasaki, R.Ushioda *et al.* 2015 *J. Biol. Chem.*)。

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 3 件)

Kawasaki K, Ushioda R*, Ito S, Ikeda K, Masago Y, Nagata K*
Deletion of the Collagen-specific Molecular Chaperone Hsp47 Causes Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis of Hepatic Stellate Cells.
J Biol Chem. 290. 3639-3646 (2015) (査読有)

Avezov E, Konno T, Zyryanova A, Chen W, Laine R, Crespillo-Casado A, Melo E, Ushioda R, Nagata K, Kaminski CF, Harding HP, Ron D*.
Retarded PDI diffusion and a reductive shift in poise of the calcium depleted endoplasmic reticulum
BMC Biol. 10;13(1):2(2015) (査読有)

R. Ushioda, J. Hoseki, K. Nagata*.
Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress.
Mol Biol Cell. 24(20):3155-63 (2013) (査読有)

[学会発表](計 7 件)

Ryo Ushioda : ERdj5-mediated ER

homeostatic mechanism
ER & Redox Club Meeting、 Venice
(Italy)、2015.4.15-17

潮田 亮、川崎 邦人、永田 和宏：還元
酵素 ERdj5 を介した小胞体恒常性維持
機構の解明. 第 37 回日本分子生物学会
年会、パシフィコ横浜（横浜市）
2014.11.25-27

Ryo Ushioda : ERdj5-mediated ER
homeostatic mechanism
日本生化学会大会シンポジウム、京都国
際会議場（京都市）、2014.10.15

潮田亮：還元酵素 ERdj5 を介した小胞
体恒常性維持機構. 第 9 回小胞体スト
レス研究会、徳島大学医学部（徳島市）
2014.7.4-5

潮田 亮、永田和宏. :還元酵素 ERdj5
を介した小胞体恒常性維持機構の解明.
第 66 回日本細胞生物学会大会、奈良県
新公会堂（奈良市）、2014.6.11-14

Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : ER
homeostatic mechanism through
disulfide reductase ERdj5. 第 8 回小胞
体ストレス研究会、金沢大学医学部（金
沢市）2013.10.25-26

Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata : ERdj5,
a disulfide reductase in the ER,
regulates Ca²⁺ homeostasis through
the activation of Ca²⁺ pump,
SERCA2b. Gordon Research
Conferences"Stress Proteins in Growth,
Development & Disease", West Dover
(USA), 2013.07.07-12

〔図書〕(計 2 件)

潮田 亮、永田 和宏
医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ、「小
胞体品質管理とその破綻に伴う小胞体
ストレス応答」(2015 掲載予定)

潮田 亮、永田 和宏
羊土社、実験医学、「レドックス制御によ
る細胞内タンパク質の品質管理」Vol.32、
No.14、2201-2207 (2014)

〔その他〕
ホームページ等

研究室ホームページによる紹介

http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~nagata/ushioda_profile.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

潮田 亮 (USHIODA, Ryo)
京都産業大学・総合生命科学部・助教
研究者番号：30553367