

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770158

研究課題名（和文） 小胞体GSHトランスポーターによる小胞体レドックス制御

研究課題名（英文） ER redox regulation by ER GSH transporter

研究代表者

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：40423058

研究成果の概要（和文）：グルタチオンは小胞体レドックス制御に必要な還元力であることがわかってきた。グルタチオンはサイトゾルで合成されるが、その小胞体への取り込みの機序は未だ不明なままである。小胞体に roGFP を発現する安定発現株から調製したマイクロソームを用い、内腔へのグルタチオンの取り込みを鋭敏に検出することで、小胞体内へのグルタチオン輸送に小胞体膜タンパク質が必要であることを明らかにし、さらにグルタチオン輸送を阻害する薬剤を同定した。

研究成果の概要（英文）：Glutathione is required for ER redox regulation. GSH is synthesized in cytosol while the mechanism by which GSH is transported into the ER is still unknown. We showed that ER membrane proteins are necessary for GSH transport into the ER and identified inhibitors for GSH transport into the ER by a sensitive detection system using roGFP for GSH transport into the ER.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：レドックス、小胞体

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体は細胞内で合成されるタンパク質の約 30% を占める分泌タンパク質及び膜タンパク質がフォールディング及び成熟されるオルガネラである。このような多量なタンパク質を扱うため、小胞体は厳格なタンパク質品質管理機構を持つ。小胞体においては正しくフォールディングしたのみが小胞体を出て、ゴルジ体を通り最終目的地へと送られる。正しくフォールディングできなかったタンパク質は小胞体内に留められ、リフォールディングされる。どうしてもフォールデ

ィングできなかったタンパク質は識別され、小胞体からサイトゾルへ逆行輸送され、ユビキチン・プロテアソーム経路により分解される。この一連の分解機構は小胞体関連分解と呼ばれる。

小胞体は成熟されるタンパク質の機能発現に必要なジスルフィド結合の形成に適した酸化環境にあり、そのレドックス環境の制御維持はタンパク質の品質管理において極めて重要である。その異常はミスフォールドタンパク質の蓄積、つまり小胞体ストレスの惹起を引き起こす。ひいては細胞死を引き

起こすことで神経変性疾患を始めとするフォールディング病の原因となる。

小胞体は、タンパク質のフォールディングに必要なジスルフィド結合形成に適した酸化環境にある一方で、ミスフォールドタンパク質の小胞体関連分解においては小胞体からサイトゾルへの逆行輸送に先立ってジスルフィド結合が開裂される必要がある。我々はこれまでに小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 がミスフォールドタンパク質のジスルフィド結合を還元することで小胞体関連分解を促進することを明らかにした。しかしながら、酸化環境にある小胞体において ERdj5 がジスルフィド還元酵素として機能するためには何らかの還元力を受け取る必要がある。また、小胞体におけるフォールディングにおいても間違ったジスルフィド結合を PDI や ERp57 といった小胞体酸化還元酵素によって掛け替える際に還元力が必要であり、これについてはグルタチオンが担っていることが知られている。

## 2. 研究の目的

グルタチオンは小胞体において mM order で存在するため、小胞体レドックスを規定する主要な分子であり、また小胞体における還元力のソースであることも明らかになってきた。グルタチオンはサイトゾルにおいて合成されるため、サイトゾルから小胞体膜を介して小胞体内腔へと運ばれるが、その小胞体内への取り込みの機序は未だ不明なままである。本研究ではグルタチオンの小胞体内腔への取り込みに関わるグルタチオントランスporterを同定し、グルタチオントランスporterによる小胞体レドックス制御機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

小胞体膜上におけるグルタチオントランスporterを同定するために、HEK293 細胞から分画したマイクロソーム画分を主に実験材料として用いた。グルタチオンの取り込みは、取り込みに伴う内腔の酸化還元酵素の還元を検出することにより同定した。この還元は酸化還元酵素におけるフリーなシステイン残基をポリエチレングリコールが結合したマレイミド試薬で修飾したことに伴う SDS-PAGE における泳動度の遅れにより検出した。また、レドックス依存的な蛍光特性を持つ roGFP を小胞体に発現させた細胞から調製したマイクロソームについては roGFP にグルタチオン添加に伴うレドックス依存的な蛍光変化を測定することで検出した。

## 4. 研究成果

HEK293 細胞由来のマイクロソームにグルタチオンを添加すると内腔のタンパク質で

ある ERp72 や ERdj5 の還元が観察された。一方で、マイクロソームから抽出したリン脂質から再構成したリポソーム内に封入した ERdj5 の還元はグルタチオンを添加しても観察されなかった。また、マイクロソームに低分子イオノフォアであるアラメチシンを加えてやるとグルタチオンの取り込みが促進された。これらの結果は、マイクロソームに含まれるタンパク質がグルタチオンの小胞体内腔への取り込みに必要であることを強く示唆する。さらに、小胞体内腔へのグルタチオンの取り込みを鋭敏に検出する系を構築するために、HEK293 細胞の小胞体に roGFP を発現する安定発現株を作製した。この安定発現株から調製したマイクロソームを用い、内腔へのグルタチオン取り込みに影響を与える様々な因子の検討を行った。その結果、プロテイナーゼ K 処理により、グルタチオンの取り込みが阻害を受けること、また ATP や ADP の添加はグルタチオンの取り込みに影響を与えないことがわかった。そこで、どのようなトランスporterがグルタチオントランスporterとして機能しているか明らかにするため、内腔へのグルタチオン取り込みを阻害するトランスporterインヒビターの探索を行った。その結果、有機アニオントランスporter (organic anion transporter, OATP) 阻害剤であるフルフェナミン酸がグルタチオン取り込みを阻害することがわかった。また、ATP や ADP の添加が影響を与えなかったことと一致して、ABC transporter の阻害剤はグルタチオンの取り込みに阻害効果を与えなかった。さらに HEK293 細胞で OATP family タンパク質である 2A1, 3A1, 4A1, 5A1 の knockdown をそれぞれ行った。しかしながら、これらの knockdown は HEK293 細胞から分画したマイクロソームにおけるグルタチオン取り込みに対する影響を与えず、また、細胞レベルでも酸化剤添加後の小胞体内レドックス状態の回復においてもその knockdown の影響が見られなかった。この結果は特定の OATP ではなく、複数の OATP が小胞体におけるグルタチオンの取り込みに関わっていることを示唆しているのかもしれない。いずれにせよ、本研究の成果は、今後小胞体グルタチオントランスporterを同定するうえで重要な知見を与えるものである。

## 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 2 件)

- ① 萩原誠智、前川憲一、鈴木 守、潮田 亮、新木和孝、松本悠史、竇関 淳、永田和宏、稲葉謙次、Structural basis of an ERAD

pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5, *Molecular Cell*, 査読有、41 巻、2011、432-444、DOI: 10.1016/j.molcel.2011.01.021.

- ② 奥 公秀、寶関 淳、市来弥生、阪井康能、A fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based redox sensor reveals physiological role of thioredoxin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letter*, 査読有、587 巻、2013、793-798、DOI:10.1016/j.febslet.2013.02.003.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 発表者：萩原誠智、前川憲一、鈴木 守、潮田 亮、新木和孝、松本悠史、寶関 淳、永田和宏、稲葉謙次、糖たんぱく質 ERAD における ERdj5 の役割/The role of ERdj5 in glycoprotein ERAD pathway、第 63 回日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 27 日-29 日、札幌市
- ② 発表者：寶関 淳、ジスルフィド還元酵素 ERdj5 による小胞体関連分解のレドックス制御、第 84 回日本生化学会大会シンポジウム「レドックス反応システムによる細胞制御機構」、2011 年 9 月 21 日、京都市(招待講演)
- ③ 発表者：潮田 亮、寶関 淳、永田和宏、Non-glycoprotein ERAD pathway serves as a backup system under ER stress、Cold Spring Harbor Asia Conference, “Protein Homeostasis in Health & Disease”、2011 年 9 月 26 日-30 日、China
- ④ 発表者：Omolola Afolayan、Eva-Rachele Pesce、寶関 淳、平山尚志郎、永田和宏、Caroline Knox、Gregory L. Blatch、Biochemical characterisation of Pfj2, a Plasmodium falciparum heat shock protein 40 chaperone potentially involved in protein quality control in the endoplasmic reticulum、South African Society for Biochemistry and Molecular Biology/Federation of African Societies of Biochemistry and Molecular Biology SASBMB/FASBMB Congress 2012、2012 年 1 月 29 日-2 月 1 日、South Africa
- ⑤ 発表者：寶関 淳、阪井康能、細胞内レドックス状態の可視化とこれを利用したレドックスモジュレーターの探索、疾病予防・食品機能開発評価システムに関するフォーラム、2012 年 3 月 13 日、京都市(招待講演)
- ⑥ 発表者：潮田 亮、寶関 淳、永田和宏 Glycosylation-Independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress、第 45 回日本発酵生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会ワークショップ、2012 年 5 月 28 日-31 日、神戸市
- ⑦ 発表者：寶関 淳、レドックス制御とタ

ンパク質品質管理、京都大学学際融合教育研究推進センター 生理化学研究ユニット 第 2 回シンポジウム、2012 年 6 月 13 日、京都市(招待講演)

- ⑧ 発表者：寶関 淳、阪井康能、永田和宏、Reduction mechanism of a disulfide reductase, ERdj5 in the oxidative redox environment of the ER、Gordon Research Conferences: Thiol-Based Redox Regulation & Signaling、2012 年 7 月 29 日-8 月 03 日、USA
- ⑨ 発表者：潮田 亮、寶関 淳、永田和宏、Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress、EMBO/EMBL Symposium “Quality Control-From Molecules to Organelles”、2012 年 9 月 19 日-22 日、Germany
- ⑩ 発表者：島並祐子、奥 公秀、寶関 淳、阪井康能、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるペルオキシソーム内レドックス制御因子の解析、日本農芸化学会関西支部第 478 回講演会、2013 年 2 月 2 日、京都市
- ⑪ 発表者：Maharjan Sunita、寶関 淳、奥 公秀、阪井康能、Involvement in mitochondrial function by antioxidants protects cellular oxidation caused by proteasome inhibition、日本農芸化学会関西支部第 478 回講演会、2013 年 2 月 2 日、京都市

[図書] (計 2 件)

- ① 阪井康能、寶関 淳、奥 公秀、レドックス異常を回復する化合物レドックスモジュレーターの探索：Redoxfluor の創薬への利用、遺伝子医学 MOOK、査読無、22 巻、2012、158-163
- ② 寶関 淳、奥 公秀、阪井康能、酵母のレドックス認識機構を応用した新しいセンサータンパク質の開発、FRAGRANCE JOURNAL、査読無、2 巻、2013、64-69

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.seigyo.kais.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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：40423058

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
なし ( )

研究者番号：