

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24227009

研究課題名(和文) レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の研究

研究課題名(英文) Mechanism of the maintenance of ER homeostasis by redox regulation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,700,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ではタンパク質、レドックス、およびカルシウムの3つの基本的な恒常性が維持されなければならないが、その中心に制御分子ERdj5が働いている。小胞体中の唯一の還元酵素ERdj5がカルシウムポンプSERCA2bに結合し、そのジスルフィド結合を還元することによって、小胞体へのカルシウムの取り込みが促進することを見出した。しかもERdj5自身がカルシウムイオン濃度によってオリゴマー状態を変化させ、低カルシウム時のみSERCA2bを活性化することを見出した(PNAS, 2016)。さらに、サイトゾルにおけるタンパク質恒常性と小胞体内腔におけるレドックス恒常性のクロストークがあることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Three major homeostasis in the ER, protein, calcium ion and redox, are closely regulating each other through a crosstalk. We found a novel ER-resident reductase ERdj5 and revealed that ERdj5 plays a pivotal role in facilitating the ER-associated degradation (ERAD) of misfolded proteins. We found that ERdj5 is also involved in the regulation of calcium ion pump SERCA2b through its reducing activity. ERdj5 reduces the disulfide bond in the ER lumen of SERCA2b and activates its ATPase activity. When Ca^{2+} concentration in the ER lumen is low, ERdj5 reduces and activates the SERCA2b, but when Ca^{2+} is high enough, ERdj5 makes a oligomer, which is no more active in activating the SERCA2b. Thus, ERdj5 regulates the SERCA2b activity by sensing the Ca^{2+} concentration in the ER lumen. We also revealed that the redox homeostasis in the ER is interfered by the protein homeostasis in the cytosol, which suggests the crosstalk between cytosolic protein homeostasis and ER redox homeostasis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 カルシウム恒常性 レドックス恒常性 プロテオステイシス

1. 研究開始当初の背景

小胞体は細胞内の全タンパク質の1/3を合成する細胞小器官である。小胞体内では正しくタンパク質を合成するための種々のシャペロンや、タンパク質品質管理に関わる多くのタンパク質が機能している。研究代表者らは、これまでに小胞体における変性タンパク質の小胞体関連分解 (ERAD) に関与する因子として ERdj5 を新たに同定していた。ERdj5 は変性タンパク質のジスルフィド結合を還元解離して ERAD を促進する、初めての小胞体内還元酵素であった。

ERdj5 が ERAD 促進に関与していることはすでに報告していたが、ERdj5 が他にも小胞体内において還元酵素として役割を持っているのではないかと考えられたが、予備的な結果から、ERdj5 が小胞体膜におけるカルシウムイオンポンプ SERCA2b の活性制御に関与している可能性が考えられた。本研究においては ERdj5 が SERCA2b の活性制御に関与することを明かにするとともに、他の還元反応への関与を検討し、以て、小胞体の恒常性維持に重要な役割を持っていることを明かにしようとした。

2. 研究の目的

小胞体において変性したタンパク質の除去機構 (小胞体関連分解、ERAD) を研究する過程で、新規還元酵素 ERdj5 を発見し、その機能解析を行った (*Science* 2008, *Mol Cell* 2011)。さらに、ERdj5 が小胞体カルシウムポンプ SERCA2b の活性を、還元力を介して調節しているという予備的な証拠を得た。小胞体ではタンパク質、レドックス、およびカルシウムの3つの恒常性が維持されなければならないが、それら3つの恒常性維持機構のクロストークの中心に ERdj5 という制御分子が存在することを示唆している。本研究では、これら3つの恒常性維持機構における ERdj5 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

主として培養動物細胞を用いて研究を行なう。ERdj5 と SERCA2b との結合を調べ、ERdj5 の過剰発現、ノックダウンなどによって、SERCA2b のジスルフィド結合の開裂がどうか、活性がどう変化するかを調べ、ERdj5 による SERCA2b の調節機構を明らかにした。

4. 研究成果

・小胞体におけるカルシウムポンプ SERCA2b の活性はレドックス制御を受けていることが知られているが、ERdj5 ノックアウト細胞ではカルシウム取り込みに遅延が見られることを、カルシウムセンサー (カメレオンなど) を用いることによって、明らかにした。これは SERCA2b の還元による活性制御に ERdj5 が還元酵素として作用しているということを示唆している。

・ERdj5 自体がカルシウムイオン濃度によ

てそのオリゴマー形成の変化を通じて、SERCA2b の活性化能を変化させているという新事実を明らかにすることができた。小胞体内のカルシウムイオン濃度が低い状態では ERdj5 がモノマーとして存在し、SERCA2b を活性化できるが、カルシウムイオン濃度が高くなるとオリゴマーを形成して、それ以上カルシウムの取り込みを行わないようにするという、きわめて合目的なシステムを作っていることが明らかになった。

・ERdj5 には従来我々が報告してきたものとは違った、もう一つの構造があることを明らかにし、これら2つの構造がダイナミックに遷移しつつ ERdj5 の機能制御が行われている可能性についてあきらかにすることができた。これらの成果は PNAS 誌に掲載された。

・ERdj5 の還元活性がどこから来ているのかについても研究を進めており、ERdj5 に還元力を与える上流分子の同定を進める。候補因子として Ero1 を同定した。新生鎖から電子を受け取った Ero1 は、ERdj5 に結合し、電子を与えることによって、ERdj5 を還元することがほぼ明らかになったことは大きな成果と言える。

・サイトゾルにおけるタンパク質恒常性の破綻が、小胞体内腔のレドックス環境を還元方向へシフトさせることを発見した。これは哺乳類細胞において確認できているが、線虫を用いた系でも同様の効果を確認し、この成果は EMBO J. 誌に掲載された。

・小胞体内の新規因子 ERp18 という比較的小さなレドックスタンパク質が、2量体から多量体への構造変化を通じて、その酵素活性を還元活性から過酸化水素除去活性へと変化させることを見出し、毒性のある過酸化水素の消去に関して、新しいシステムのあることを明かにした。

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 40 件)

1) S. Hirayama, M. Sugihara, D. Morito, S. Iemura, T. Natsume, K. Nagata :

Nuclear export of ubiquitinated proteins via the UBIN-POST system

Proc. Natl. Acad. Sci. USA

115(18):E4199-E4208 (2018)

doi.org/10.1073/pnas.1711017115

(査読有)

2) S. Ito, K. Ogawa, K. Takeuchi, M. Takagi, M. Yoshida, T. Hirokawa, S. Hirayama, K. Shin-Ya, I. Shimada, T. Doi, N. Goshima, T. Natsume, K. Nagata :

A small-molecule compound inhibits a collagen-specific molecular chaperone and could represent a potential remedy for

fibrosis

J. Biol. Chem. 292:20076-20085 (2017)

doi: 10.1074/jbc.M117.815936

(査読有)

3) Y. Kotani, D. Morito, K. Sakata, S. Ainuki, M. Sugihara, T. Hatta, SI Iemura, S. Takashima, T. Natsume and K. Nagata: Alternative exon skipping biases substrate preference of the deubiquitylase USP15 for mysterin/RNF213, the moyamoya disease susceptibility factor.

Scientific Reports 7:44293 (2017)

doi:10.1038/srep44293

(査読有)

4) R. Ushioda, A. Miyamoto, M. Inoue, S. Watanabe, M. Okumura, K. Maegawa, K. Uegaki, S.i Fujii, Y. Fukuda, M. Umitsu, J. Takagi, K. Inaba, K. Mikoshiba, K. Nagata: Redox-assisted regulation of Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5

Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

113(41):E6055-E6063 (2016)

doi: 10.1073/pnas.1605818113

(査読有)

5) S. Ito , K. Nagata

Mutants of collagen-specific molecular chaperone Hsp47 causing osteogenesis imperfecta are structurally unstable with weak binding affinity to collagen

Biochem Biophys Res Commun.

469(3):437-442 (2016)

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.028. Epub

2015 Dec 12

(査読有)

6) J. Kirstein-Miles , D. Morito , T. Kakihana, M. Sugihara, A. Minnen, S.M. Hipp, C. Nussbaum-Krammer , U.F. Hartl, K. Nagata, R.I.Morimoto :

Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments.

EMBO J. 34(18):2334-2349 (2015)

doi: 10.15252/embj.201591711. Epub 2015

Jul 29

(査読有)

7) D. Morito & K. Nagata

Pathogenic Hijacking of ER-Associated Degradation: Is ERAD Flexible ?

Mol Cell. 59:335-344 (2015)

doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.010

(査読有)

8) A. Kitamura , K. Nagata & M. Kinjo

Conformational analysis of misfolded protein aggregation by FRET and live-cell imaging techniques.

Int. J. Mol. Sci. 16(3):6076-6092 (2015)

DOI: 10.3390/ijms16036076.

(査読有)

9) K. Kawasaki , R. Ushioda , S. Ito, K. Ikeda, Y. Masago & K. Nagata

Deletion of the Collagen-specific Molecular Chaperone Hsp47 Causes Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis of Hepatic Stellate Cells.

J Biol Chem. 290(6): 3639-3646 (2015)

DOI: 10.1074/jbc.M114.592139.

(査読有)

10) D. Morito, K. Nishikawa, J. Hoseki, A. Kitamura, Y. Kotani, K. Kiso, M. Kinjo, Y. Fujiyoshi & K. Nagata

Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state

Scientific Reports 24(4):4442 (2014)

DOI:10.1038/srep04442.

(査読有)

11) A. Kitamura, N. Inada, H. Kubota, G. Matsumoto, M. Kinjo, R. I. Morimoto and K. Nagata

Dysregulation of the Proteasome Increases the Toxicity of ALS-linked Mutant SOD1

Genes to Cells 19(3):209-224 (2014)

DOI: 10.1111/gtc.12125. Epub 2014 Jan 23.

(査読有)

12) R.Ushioda, J.Hoseki & K. Nagata

Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress

Mol. Biol. Cell.

24(20):3155-3163(2013)

DOI:10.1091/mbc.E13-03-0138

(査読有)

13) T. Kakihana, K. Araki, S. Vavassori, S. Iemura, M. Cortini, C. Fagioli, T. Natsume, R. Sitia & K. Nagata

Dynamic regulation of Ero1 α and Prx4 localization in the secretory pathway

J. Biol. Chem. 288(41):29586-29594(2013)

DOI: 10.1074/jbc.M113.467845

(査読有)

14) M.Yagi-Utsumi, S.Yoshikawa, Y.Yamaguchi, Y.Nishi, E.Kurimoto, Y.Ishida, T.Homma, J.Hoseki, Y.Nishikawa, T.Koide, K.Nagata and K. Kato

NMR and mutational identification of the collagen-binding site of the chaperone Hsp47.

PLOS ONE 7(9):e45930(2012)

10.1371/journal.pone.0045930.s001

(査読有)

15) 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)

10.1074/jbc.M111.333336. Epub 2012 May 3.

(査読有)

[学会発表] (計 199 件、内招待講演 59 件)

1) Kazuhiro Nagata :

Redox-mediated regulatory mechanism of ER homeostasis

The 8th CSSI International Congress on Stress Proteins in Biology and Medicine, Turku (Finland), 2017.08.16

2) Kazuhiro Nagata :

Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum

(Presentation of the Hans Neurath Award)

Protein Society Annual Symposium, Montrwal(Canada), 2017.07.24

3) Kazuhiro Nagata :

Regulation of ER Homeostasis by Redox Signaling

Gordon Research Conference “Stress Proteins in Growth, Development & Disease”, Sundry River(USA), 2017.07.12

4) Kazuhiro Nagata :

Protein quality control in the ER:ERAD and autophagy

CNIO Frontiers Meeting “Molecular Chaperones in Cancer”, Madrid(Spain), 2017.05.02

5) Kazuhiro Nagata :

ERdj5 and ERdj8 - Regulation of proteostasis and calcium homeostasis in the ER and negative regulation of autophagy

Cold Spring Harbor Meeting, Protein Homeostasis in Health and Disease, Cold Spring Harbor(USA), 2016.4.19

6) Kazuhiro Nagata :

A novel ER membrane protein, ERdj8, localizing at ER-mitochondria contact site as a negative regulator for macroautophagy

EMBO Conference, Autophagy signaling and progression in health and disease, Sardegna(Italy), 2015.9.9-12,

7) Kazuhiro Nagata :

ERdj5, an ER-resident reductase, regulates the activity of SERCA2, a calcium ATPase, in a $[Ca^{2+}]$ -dependent manner

EMBO conference “Molecular chaperones : From molecules to cells and misfolding diseases, Crete(Greece), 2015.5.12

8) Kazuhiro Nagata :

Crosstalk among protein, redox and calcium homeostasis in the ER.

JSCB Presymposium “Cutting-edge of stress-response and protein homeostasis”, Nara(Japan), 2014.6.10

9) Kazuhiro Nagata :

Crosstalk among protein, redox and calcium homeostasis in the ER

GBC 65th Mosbacher Colloquium, Mosbach(Germany), 2014.03.28

10) Kazuhiro Nagata :

Regulation of collagen synthesis by Hsp47 and P4H in combination with specific inhibitors

Gordon Research Conferences “Collagen”, New London(USA), 2013.07.17

11) Kazuhiro Nagata :

ER stress and protein quality control system in the ER.

Symposium “The Art of Living with Stress: a Lesson from Ferruccio Ritossa”, Roma(Italy), 2013.04.26

12) Kazuhiro 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

13) Kazuhiro Nagata :

Two distinct ERAD pathways for misfolded glycoproteins and non-glycoproteins
SFB594 3rd International Symposium on Molecular Machines in Protein Folding and Protein Transport, Munich(Germany),
2012.07.24

〔図書〕(計 4 件)

1) D.J. Klionsky, K.Nagata et al
Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy
Autophagy 8(4):445-544(2012)
LANDES BIOSCIENCE

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：細胞内の異常物質蓄積を伴う疾患の治療薬、バイオマーカー、診断薬、並びに、スクリーニング方法

発明者：永田和宏、山本洋平

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-174597

出願年月日：2015 年 9 月 4 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<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)連携研究者

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

(3)研究協力者

森戸 大介(MORITO, Daisuke)
京都産業大学・主任研究員

山本 洋平(YAMAMOTO, Yohei)
大阪大学・助教

伊藤 進也(ITO, Shinya)
京都産業大学・研究員