

平成22年5月24日現在

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)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50127114

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：小胞体品質管理、レドックス、ジスルフィド結合、EDEM、ERdj5

1. 研究計画の概要

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することが判明しつつある。本研究では、これら因子の作用機序を分子構造レベルで詳細に解明し、かつ小胞体品質管理機構の全体像をも正確に記述・理解することを目的として、細胞生物学、生化学、構造生物学的研究を展開している。本研究は、ミスフォールドタンパク質が細胞内で蓄積することにより引き起こされる種々の病態の成因解明および治療戦略にも将来的につながり、医学的にも極めて貢献度の高いものである。

2. 研究の進捗状況

ERdj5 が EDEM および小胞体シャペロンである BiP と協同的にミスフォールドタンパク質の小胞体関連分解を促進する経路を発見し、その成果を *Science* 誌に報告した (Ushioda et al., *Science* (2008))。さらに、研究分担者である稲葉謙次との共同研究により ERdj5 全長の結晶構造解析を成功するに至った。この構造解析の結果、ERdj5 を構成する J ドメインおよび6つのチオレドキシンドメインの三次元的配置が明らかとなり、

ERdj5 が他の PDI family のタンパクとは異なる特徴的な全体構造を有することが判明した。得られた ERdj5 の構造情報を基に系統的な生化学的および細胞生物学的実験を行ない、EDEM との結合部位さらには基質タンパク質を還元する主要なレドックス活性ドメインを同定した。以上の研究により、EDEM と ERdj5 との協同による小胞体関連分解経路の作用機序を分子構造レベルで解明するに至り、本成果は現在論文投稿中である。

EDEM は糖タンパク質を特異的に認識し、その小胞体関連分解を促進するが、非糖タンパク質の分解経路は未同定であった。そこで糖鎖修飾を受けないモデル基質を作成し、その分解経路を詳細に検討した。その結果、EDEM に代わり BiP が主としてミスフォールドした非糖タンパク質を認識し、またこの場合も ERdj5 が誤ったジスルフィド結合を還元することで小胞体関連分解が促進されることが判明した。以上の研究により、糖鎖修飾の有無により異なる小胞体関連分解経路が確立されていることが強く示唆され、本研究成果について現在論文投稿中である。

さらに我々は、ヒト細胞の小胞体に存在する20種類にも及ぶ PDI family タンパク質間のシステインを介したレドックスネットワークの同定をプロテオミクス解析により進めた。まず、全ての PDI family タンパク質の遺伝子をクローニングおよびヒト細胞内で発現し、相互作用因子をマス解析により網羅的に同定した。さらに *in vitro* 精製系での定量的な解析も遂行し、PDI およびその再酸化因子である Ero1 を中心とした小胞体におけるレドックス経路を正確に記述するに至った。本成果は小胞体におけるレドックス制御機

構に関する多くの知見を与え、現在論文投稿中である。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

当初の目的に沿って順調に研究は進展し、期待以上の成果をあげていると考える。

4. 今後の研究の推進方策

以上の研究成果を踏まえ、残された重要課題として、研究分担者である稲葉博士と共同で、ERdj5 と協同的に働く因子 EDEM および BiP を含めた超分子複合体の高分解能構造解析を目指す。これにより、我々が現在提唱している EDEM による基質認識、ERdj5 による基質還元、そして ERdj5 から BiP への基質移行という一連の分子機構モデルの妥当性について、さらに深く追究する予定である。

さらに、我々が同定した PDi-Ero1 を中核とした小胞体レドックスネットワークの制御機構に関する研究を進展させる予定である。具体的には、Differential Thiol Trap and Display method (DTTD 法) という独自の技術を開発し、よりグローバルかつ緻密に小胞体タンパク質のレドックス状態を可視化することを試み、小胞体品質管理とレドックス制御機構に関するさらなる知見を得る。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 2 2 件)

①Y. Sugiura, K. Araki, S. Iemura, T. Natsume, J. Hoseki & K. Nagata: The novel thioredoxin-related transmembrane protein TMX4 has reductase activity. *J. Biol. Chem.* **285**(10):7135-7142 (2010)

②N. 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)

③Y. Ishida, A. Yamamoto, A. Kitamura, S. R. Lamande, T. Yoshimori, F. B. John, H. Kubota & 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)

④R. Ushioda, J. Hoseki, K. Araki, G. Jansen, D. Y. Thomas & K. Nagata: ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science* **321**(5888):569-572 (2008)

⑤D. Morito, K. Hirao, F. Tokunaga, N. Hosokawa, D. M. Cyr, K. Tanaka, K. Iwai & K. Nagata:

Gp78 cooperates with RMA1 in ER-associated degradation of CFTR Δ F508. *Mol. Biol. Cell.* **19**:1328-1336 (2008)

⑥S. Hirayama, Y. Yamazaki, A. Kitamura, Y. Oda, D. Morito, K. Okawa, H. Kimura, D. M. Cyr, H. Kubota & K. Nagata: MKKS is a centrosome-shuttling protein degraded by disease-causing mutations via CHIP-mediated ubiquitination. *Mol. Biol. Cell.* **19**:899-911 (2008)

⑦Inaba, 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)

⑧Inaba, 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**, 35042-35052 (2008)

[学会発表] (計 5 8 件)

①Kazuhiro Nagata: Quality control of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum. 21th IUBMB International Congress and 12th FAOBBM Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai (China), 2009. 08. 05

②Kazuhiro Nagata, Yusaku Masago, Yoshihito 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

[図書] (計 9 件)

①永田和宏、塩田浩平 (編): 医学のための細胞生物学、315 ページ、南山堂 (2009)

②永田和宏、中野明彦、米田悦啓、須藤和夫、室伏擴、榎森康文、伊藤維昭 (訳): ルーイン細胞生物学、681 ページ、東京化学同人 (2008)