

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成27年度研究進捗評価用〕

平成24年度採択分
平成27年3月6日現在

レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の研究

Mechanism of the Maintenance of ER homeostasis by redox regulation



課題番号：24227009

永田 和宏 (NAGATA KAZUHIRO)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究の概要

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、それら3つの恒常性維持機構のクロストークの中心に、小胞体内腔側に局在する還元酵素、ERdj5が存在する。本申請では、これら3つの恒常性維持機構の制御因子としてのERdj5の役割を明らかにすることを目的とする。

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：小胞体においては3つの基本的な恒常性（ホメオスタシス）が維持されている。タンパク質の恒常性（protein homeostasis, proteostasisとも呼ばれるようになった）、レドックス恒常性（redox homeostasis）およびカルシウム恒常性（calcium homeostasis）である。これら3つは互いに独立して保たれているのではなく、緊密な相互作用のもとに維持されている。しかし、それらのクロストークについては、まだほとんど統合的な研究がなされていない。

申請者らは独自に発見した小胞体内腔の還元酵素ERdj5が、小胞体におけるタンパク質の品質管理、特に小胞体関連分解(ERAD)に関与するだけでなく、カルシウムATPase (SERCA2b)の活性化にも関与するという予備的データを得、その発見をもとに、小胞体における3つのホメオスタシスについて研究することにした。

2. 研究の目的

具体的に次の3つの目的を設定する。

- 1) ERdj5によるSERCA2b活性化の制御とカルシウム恒常性維持機構、
- 2) 小胞体関連分解(ERAD)を中心としたタンパク質恒常性維持機構、
- 3) 小胞体レドックス恒常性の維持機構

3. 研究の方法

ERdj5欠損細胞を用い、それにカルシウム

センサーを導入することにより小胞体へのカルシウム流入を測定し、SERCA2bの活性調節を測定する。

4. これまでの成果

1) ヒスタミン刺激による小胞体からのCa²⁺の一過的な流出が見られ、これは正常細胞ではすぐに小胞体に取り込まれるのに対し、ERdj5欠損細胞では再取り込みが遅延していること、欠損細胞にERdj5を再導入すると回復することから、ERdj5がSERCA2bを活性化していることが確認された。

2) ERdj5によるSERCA2bの活性化は、小胞体内の[Ca²⁺]が低い場合にのみ起こり、[Ca²⁺]が高い場合には、ERdj5がオリゴマーを形成することによってSERCA2bの活性化能を失っていることが明らかになった。

3) ERADにおいても、SERCA2bの活性化においても、ERdj5の還元活性が必須であるが、小胞体内腔における酸化的环境下で、どのようにERdj5が還元力を得るのか、還元力の提供因子を特定することが必須である。ERdj5のトラップ変異体を用いて、免疫沈降に質量分析を組み合わせることで網羅的に解析したところ、ERdj5に還元力を提供する新規因子を特定することに成功した。

4) サイトゾルにポリグルタミン (polyQ) などを発現させると凝集体を形成し、プロテオステイシスに破綻が生じる。この破綻は小胞体膜を介して、小胞体内腔側のレドックス恒常性に変化を与えることを明らかにした。

これは膜を介して、別のオルガネラ間で、異なるホメオステシス同士がクロストークを行っていることを意味し、きわめて興味深い現象である。

5. 今後の計画

1) ERdj5 による SERCA2b の活性化がどのようなメカニズムによって起こるのか、特に小胞体内腔側の2つのシステイン間の共有結合の開裂が構造にどのような影響を与えるかに焦点を絞って解析する。

2) ERdj5 に還元力を提供する新規因子を発見したので、この因子からどのように電子が流れ、ERdj5 の還元につながるのか、その電子伝達経路を明らかにする。

3) サイトゾルにおけるタンパク質恒常性の破綻が、どのような経路を介して、小胞体内腔のレドックス恒常性に変化を与えるのか、そのメカニズムを明らかにする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

【論文 (すべて査読あり)】

1) 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)

2) D. Morito, K. Nishikawa, J. Hoseki, A. Kitamura, Y. Kotani, K. Kiso, M. Kinjo, Y. Fujiyoshi & *K. Nagata: Moyamoya disease-associated protein myserin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state. *Scientific Reports* 24(4):4442 (2014)

3) 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 Cells* 19(3):209-224 (2014)

4) 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)

5) T. Kakahana, 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)

6) K. Araki, S. Iemura, Y. Kamiya, D. Ron, K. Kato, T. Natsume & *K. Nagata: Ero1 α and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases. *J. Cell. Biol.* 202(6):861-874(2013)

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

8) 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)

9) 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)

【国際会議への招待講演】

1) *K. Nagata: **EMBO Conference**, Heraklion (Greece), 2015.5.12

2) *K. Nagata: **GBC 65th Mosbacher Colloquium**, Mosbach (Germany), 2014.03.28

3) *K. Nagata: **International Mini Symposium** "Protein Folding and Disease", Akita (Japan), 2013.10.29

4) *K. Nagata: **Gordon Research Conferences** "Collagen", New London (USA), 2013.07.17

5) *K. Nagata: **Gordon Research Conferences** "Stress Proteins in Growth, Development & Disease", (*Plenary lecture*), West Dover (USA), 2013.07.07

6) *K. Nagata: **Symposium** "The Art of Living with Stress: a Lesson from Ferruccio Ritossa", Roma (Italy), 2013.04.26

7) *K. Nagata: **EMBO/EMBL Symposium** "Quality Control-From Molecules to Organelles", Heidelberg (Germany), 2012.09.21

8) *K. Nagata: **SFB594 3rd International Symposium** on Molecular Machines in Protein Folding and Protein Transport, Munich (Germany), 2012.07.24

【特許等知的財産の取得状況】

1) 出願日: H24年7月24日

出願番号: 特願2012-163835

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

出願人: 独立行政法人産業技術総合研究所、国立大学法人東北大学、学校法人京都産業大学

発明者: 夏目徹、永田和宏、伊藤進也、土井隆行、吉田将人

2) 出願日: H24年8月8日

出願番号: 特願2012-176344

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

出願人: 学校法人京都産業大学

発明者: 潮田亮、永田和宏

ホームページ等: <http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~nagata/index-j.html>