

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440050

研究課題名(和文)小胞体タンパク質品質管理における膜近傍の還元的なレドックスの生理的意義

研究課題名(英文)Physiological role of reducing redox state near membrane in ER protein quality control

研究代表者

寶関 淳(Hoseki, Jun)

京都大学・農学研究科・特任准教授

研究者番号：40423058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体レドックス状態を可視化できるERroGFP S4を開発し、ジスルフィド還元酵素ERdj5が酸化環境にある小胞体にて還元力を得て、ミスフォールドタンパク質の分解を促進する機序を明らかにした。小胞体膜近傍が小胞体内腔と比べ還元的事となること、そして、この還元的事なサブコンパートメントにERdj5が局在することでサイトゾル由来のグルタチオンの還元力を効率的に受け取り、分解すべきミスフォールドタンパク質を還元することでERADが促進されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have developed ERroGFP S4 which could visualize ER redox states and elucidated the mechanism by which an ER disulfide reductase, ERdj5 received reductive power in an oxidative environment of the ER and promoted degradation of misfolded proteins. We found that ERdj5 is localized near ER membrane where the redox state is more reducing than that in the ER lumen. Therefore, ERdj5 efficiently received reductive power of reduced glutathione derived from cytosol and promoted ERAD.

研究分野：細胞生物学

キーワード：レドックス 小胞体 グルタチオン

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の成熟の場であり、細胞内で合成されるタンパク質の3割をも占める。そのため、小胞体は厳格なタンパク質品質管理機構を有している。

小胞体は正しくフォールディングされたもののみを分泌経路に送り、そうでないものを小胞体内に留め、再びフォールディングさせる。それでも、どうしてもフォールディングできなかったものは識別され、サイトゾルへ逆行輸送後、ユビキチン・プロテアソーム系で分解される。この一連の分解系は、小胞体関連分解(ERAD: ER-associated degradation)と呼ばれる。遺伝的変異や様々なストレスにより、このような小胞体におけるタンパク質品質管理が破綻し、小胞体にミスフォールドしたタンパク質が蓄積した状態を小胞体ストレスといい、小胞体ストレス状態が継続すると様々な疾患発症の原因になると考えられている。

また、小胞体は成熟されるタンパク質の構造形成や機能発現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。これまでに、このような酸化環境にある小胞体におけるミスフォールドタンパク質の分解において、ジスルフィド還元酵素 ERdj5 が分解すべき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 ERAD を促進することが明らかにしてきた。さらに糖鎖構造を介して分解すべきミスフォールドタンパク質を認識するレクチン様タンパク質である EDEM1 と小胞体内の分子シャペロンである BiP と複合体を形成することで ERAD を促進する機構やその X 線結晶構造と生化学的及び細胞生物学的解析から、ERdj5 が Trx-like domain がタンデムに並び、C 末端ドメインに属する Trx3 及び Trx4 がジスルフィド還元活性を有することを明らかにした。

しかし、ERdj5 が酸化環境にある小胞体においてどのようにして還元力を得て、ジスルフィド還元酵素として機能しているかは不明なままであった。

## 2. 研究の目的

グルタチオンは小胞体において mM order で存在し、小胞体レドックスを規定する主要な分子であり、小胞体における還元力のソースであると考えられてきた。最近、小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 の還元力として還元型グルタチオンが必要な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、主に還元型として、小胞体膜に局在するグルタチオントランスポーターを介して小胞体内へ輸送されると考えられている。しかし、酸化環境にある小胞体では、還元型グルタチオンは容易に酸化されてしまうものと考えられる。ERdj5 が還元酵素として機能し、酸

化型となった後、再び機能するために還元されることが必要であるが、ERdj5 は高い還元力を有する、つまり小胞体のレドックス環境では酸化型が非常に安定であり、還元されにくいいため、サイトゾルから取り込まれたグルタチオンの還元力を効率良く利用することが必要である。しかしながら、その機構は不明であった。

そこで本研究では、サイトゾルより得た還元型グルタチオンの還元力を小胞体で有効に利用し、ERdj5 を還元することで、ERAD を促進する機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

サイトゾルより得た還元型グルタチオンの還元力を小胞体で有効に利用する機構として、小胞体において還元的なサブコンパートメントが存在することを着想した。還元的なサブコンパートメントであれば、グルタチオンの還元力を維持でき、これを有効に利用できると思われる。

小胞体における還元的なコンパートメントを同定するうえで、小胞体のレドックス状態を可視化計測することは有効な手段であるが、小胞体の酸化環境を計測可能なレドックスポテンシャルを有するレドックスプローブ roGFP-iL は、小胞体に発現されると安定性が不十分なため、小胞体のレドックス状態を可視化することが困難であった。

そこで、まず、roGFP-iL にスーパーフォルダーGFP 由来の既知の安定化変異を導入し、小胞体でも安定に発現し、小胞体のレドックス状態を計測できる新規プローブを開発した。これらを用いて、小胞体における還元的なコンパートメントを同定した。さらには小胞体におけるこの還元的なコンパートメントに ERdj5 が局在することを示し、それにより還元型グルタチオンの還元力を小胞体で有効に利用し、ERdj5 を還元することで、ERAD を促進する機構を明らかにした。

## 4. 研究成果

(1) 小胞体レドックス状態を可視化でき、小胞体内で安定に発現するレドックスプローブ ERroGFP S4 の開発

roGFP-iL を安定化させるためにスーパーフォルダーGFP 由来の4つの変異を導入したところ、小胞体においても安定に発現し、小胞体内のレドックス状態を可視化できる ERroGFP S4 の開発に成功した。

ERroGFP S4 を安定に発現する HeLa 細胞株を樹立し、その小胞体レドックス状態を計測したところ、酸化剤や還元剤の添加により、可逆的にレドックス変化を測定できることが確認でき、これに加えて、小胞体におけるミスフォールドタンパク質蓄積や小胞体ストレス惹起に伴うレドックス異常を検出す

ることができた。

したがって、本プローブの開発により、小胞体レドックスと小胞体タンパク質品質管理の連関を明らかにすることが可能となった。

(2) 小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 が局在する小胞体の還元的なサブコンパートメント

ERroGFP を用いて小胞体のレドックス状態を計測したところ、小胞体膜に繫留させた ERroGFP は小胞体内腔に拡散したものと比べて還元的なレドックス状態を示した。さらに、ERdj5 を roGFP と融合し、そのレドックス状態を測定したところ、小胞体膜に繫留させたときと同様に還元的なレドックス状態を示した。そのうえ、その還元的なレドックス状態は ERdj5 の酵素活性に依存しないこともわかった。

さらに、小胞体画分であるマイクロソームを弱い界面活性剤であるジギトニンにより可溶化したり、免疫電子顕微鏡観察を行った結果、小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 が還元的なレドックスサブコンパートメントである小胞体膜近傍に局在することが明らかとなった。

(3) 小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 が小胞体において還元力を得て、ERAD を促進する機構

サイトゾルで合成される還元型グルタチオンが小胞体膜を介して小胞体内腔に取り込まれるためには、小胞体膜タンパク質が必要であることを明らかにした。さらに、還元型グルタチオンが ERdj5 の活性に必要なシステイン残基の還元だけでなく、ERdj5 によるミスフォールドタンパク質の ERAD 促進にも必要であることも明らかにした。

したがって、サイトゾル由来の還元型グルタチオンは小胞体膜を介して小胞体に取り込まれることで小胞体膜近傍が還元的となること、そして、その結果として小胞体膜近傍に局在する ERdj5 が還元され、還元型 ERdj5 により小胞体における分解すべきミスフォールドタンパク質が還元され、ERAD が促進されることが明らかとなった。

## 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4件)

Sunita Maharjan, 奥 公秀, 津田 将志, 竇関 淳, 阪井 康能, Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition, *Scientific Reports*, 査読有, 4 巻, 2016, 5896, DOI:10.1038/srep05896

竇関 淳, 大石 麻水, 藤村 多嘉朗, 阪井

康能, Development of a stable ERroGFP variant suitable for monitoring redox dynamics in the ER, *Bioscience Reports*, 査読有, 3 6 巻, 2016, e00316, DOI:10.1042/BSR20160027

Sunita Maharjan, 阪井 康能, 竇関 淳, Screening of dietary antioxidants against mitochondria-mediated oxidative stress by visualizing of intracellular redox state, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 査読有, 8 0 巻, 2016, 726-734, DOI:10.1080/0916841.2015.1123607

奥 勇紀, 村上 一馬, 入江 一浩, 竇関 淳, 阪井 康能, Synthesized A $\beta$ 42 Caused Intracellular Oxidative Damage, Leading to Cell Death, via Lysosome Rupture, *Cell Structure and Function*, 査読有, 4 2 巻, 2017, 71-79, DOI:10.1247/csf.17006

[学会発表](計16件)

発表者: 竇関 淳, Antioxidants derived from foods protect redox aberration and cell death caused by proteasome inhibition, Bordeaux-Kyoto, 2014 年 5 月 5 日 - 6 日, Bordeaux (France)(招待講演)

発表者: 上野 豊, 奥 公秀, 竇関 淳, 阪井 康能, 小胞体関連分解における Trx2 の関与, 酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究会, 2014 年 9 月 1 日 - 2 日, 東京大学弥生講堂, (東京都)

発表者: 上野 豊, 奥 公秀, 竇関 淳, 阪井 康能, 小胞体関連分解における Trx2 の関与, 日本農芸化学会関西支部例会第 488 回講演会, 2015 年 1 月 31 日, 京都大学楽友会館, (京都市)

発表者: 竇関 淳, 大石 麻水, 阪井 康能, Stable ERroGFP variants are suitable for detection of ER redox state, Gordon Research Conference, "Thiol-based redox regulation & signaling", 2014 年 7 月 20 日 - 25 日, Girona (Spain)

発表者: Sunita Maharjan, 奥 公秀, 竇関 淳, 阪井 康能, Mitochondria trigger cytosolic oxidative stress under proteasome inhibition, Society for free radical biology and medicine's annual meeting 2014, 2014 年 11 月 19 日 - 23 日, Seattle (USA)

阪井 康能, 奥 公秀, 竇関 淳, Workshop "Visualization of Local Redox State in Cells: Its Application to Biology and Drug Screening", 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants 2015, 2015 年 6 月 22 日 - 24 日, Paris (France) (招待講演)

奥 勇紀、村上 一馬、入江 一浩、竇関 淳、阪井 康能、Intercellular Accumulation of Amyloid Beta Peptide Leads Lysosomal Membrane Permeabilization-Mediated Cell Death、15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants 2015、2015年6月22日 - 24日、Paris (France)

Sunita Mahajan、竇関 淳、阪井 康能、The mechanism underlying mitochondria dysfunction under proteasome inhibition、Cold Spring Harbor Asia Conferences-Mitochondria、2015年10月12日 - 15日、Suzhou (China)

藤村 多嘉朗、大石 麻水、Sunita Maharjan、竇関 淳、阪井 康能、プロテアソーム阻害に伴う小胞体レドックス異常の機序、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)、2015年12月1日 - 4日、神戸ポートアイランド(神戸市)

奥 勇紀、村上 一馬、入江 一浩、竇関 淳、阪井 康能、神経細胞内に蓄積したA $\beta$ 42が細胞死を引き起こす機構、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)、2015年12月1日 - 4日、神戸ポートアイランド(神戸市)

Sunita Mahajan、黒板 智博、竇関 淳、阪井 康能、The mechanisms underlying mitochondrial dysfunction under proteasome inhibition、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)、2015年12月1日 - 4日、神戸ポートアイランド(神戸市)

竇関 淳、レドックスが担うタンパク質恒常性の維持と異常、第11回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、2016年3月17日 - 18日、お茶の水女子大学(東京都)(招待講演)

竇関 淳、Sunita Maharjan、阪井 康能、プロテアソーム阻害による異常タンパク質がミトコンドリア障害、第68回日本細胞生物学会大会、2016年6月15日 - 17日、京都テルサ(京都市)

竇関 淳、奥 勇紀、藤村 多嘉朗、大石 麻水、奥野 友紀子、萩原 正敏、阪井 康能、小胞体における異常タンパク質発現に伴うレドックス変化とこれを回復させる薬剤探索系、第68回日本細胞生物学会大会、2016年6月15日 - 17日、京都テルサ(京都市)

黒板 智博、Sunita Maharjan、竇関 淳、阪井 康能、プロテアソーム阻害に伴う鉄代謝

異常・酸化ストレスとミトコンドリアストレス障害、2016年11月30日 - 12月2日、パシフィコ横浜(横浜市)

奥 勇紀、奥野 友紀子、萩原 正敏、竇関 淳、阪井 康能、小胞体でのミスフォールドタンパク質蓄積に伴うレドックス異常回復剤の同定とその機序について、日本農芸化学2017年大会、2017年3月17日 - 20日、京都女子大学(京都市)

〔図書〕(計2件)

竇関 淳、阪井 康能、プロテアソーム阻害が引き起こすレドックス異常と抗酸化食品成分による抑制、バイオサイエンスとインダストリー、査読有、73巻、2015、192-193

竇関 淳、阪井 康能、細胞内レドックス状態の可視化によるレドックスモジュレーター探索、バイオサイエンスとインダストリー、査読有、73巻、2015、198-201

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竇関 淳 (HOSEKI, Jun)

京都大学・大学院農学研究科・特任准教授  
研究者番号：40423058

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし