

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成19年度採択分

平成22年5月10日現在

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

氏名 **永田 和宏** (Kazuhiro Nagata)

所属研究機関・部局・職 京産大 総合生命科学部・教授



推薦の観点：「タンパク質品質管理機構」には多くの因子が関わっているが、この数年の網羅的な因子探しの時期を経て、それらがどのような複合体を形成して品質管理に関わっているか、また、基質タンパク質がどのような時空間的な動態変化を経て処理されていくかについて、これからまさに総合的な研究がなされようとしている。本研究遂行者らは、従来からわが国において品質管理の分野にもっともアクティブに関わってきたグループであり、大きな成果を挙げた。世界に伍してこの研究を進めるのに最適のチームである。

研究の概要：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、構造生物学の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。

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. 研究開始当初の背景

本研究を開始するにあたり、当研究室では小胞体品質管理機構の中心的役割を担う二つの因子を同定していた。一つは EDEM であり、もう一つは ERdj5 である。EDEM はミスフォールドタンパク質のマンノース 8 型を特異的に認識するレクチン様タンパク質であり、正しくフォールドされた正常なタンパク質と、分解されるべきミスフォールドタンパク質を見分ける必須の因子である。一方 ERdj5 は、ミスフォールドタンパク質内に誤って形成されたジスルフィド結合を特異的に還元し、EDEM と協同的に小胞体関連分解を促進する因子である。ERdj5 は、小胞体においてジスルフィド結合の形成・異性化に関わるとされる Protein Disulfide Isomerase (PDI)ファミリーの酵素の一つであり、この因子の発見を

皮切りに、小胞体品質管理とレドックス制御という観点で本格的に研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

当研究室で発見同定した EDEM, ERdj5 によって促進される小胞体関連分解経路の作用機序を分子構造レベルで詳細に解明することを主目的とした。さらに、小胞体におけるチオール基をベースとしたレドックスネットワークを網羅的に同定し、小胞体品質管理とレドックス制御の関連性について新たな知見を得ることも重要課題とした。

3. 研究の方法

ERdj5 全長の高分解能構造解明を目指し、その X 線結晶構造解析に取り組んだ。さらに得られた構造情報を基に、系統的な生化学実験・細胞生物学実験を遂行し、基質の認識から、還元、サイトゾルへの逆行輸送といった

一連の時空間的動態の解明を行った。

さらに小胞体に存在する 20 種類にも及ぶ PDI family タンパク質間のレドックスネットワークおよび PDI 酸化因子である Ero1 を中核とした電子移動経路を網羅的かつ厳密に捉えるため、プロテオミク的研究を遂行した。

4. これまでの成果

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。

5. 今後の計画

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。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Y.Sugiura, K. Araki, I. S. Iemura, T. Natsume, J. Hoseki & K. Nagata : The novel thioredoxin-related transmembrane protein TMX4 has reductase activity. *J. Biol. Chem.* **285**:7135-42 (2010)

N. 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**:17061-68 (2009)

Y. 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**:2744-54 (2009)

R. 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**:569-572 (2008)

D. 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 CFTRΔF508. *Mol. Biol. Cell.* **19**:1328-1336 (2008)

Inaba, 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)

Inaba, 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**:35042-52 (2008)

稲葉謙次、2009年12月 第7回日本分子生物学会三菱化学奨励賞

稲葉謙次、2009年4月 文部科学大臣表彰若手科学者賞