

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成25年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	タンパク質品質管理に関わるジスルフィド結合形成・開裂因子の分子基盤
研究機関・ 部局・職名	東北大学・多元物質科学研究所・教授
氏名	稲葉 謙次

1. 当該年度の研究目的

高等生物細胞の小胞体には、20種類以上にもおよぶPDIファミリータンパク質と複数のPDI酸化酵素からなる複雑なジスルフィド結合形成・開裂ネットワークが張り巡らされている。平成25年度は、高等生物細胞における新規に見つかった酸化酵素Prx4とEro1を起点としたジスルフィド結合形成経路の特異的な分子認識に基づく作用機序と、基質タンパク質の酸化的全フォールディングにおける機能的役割について構造生化学的手法により詳細に解明する。また各ジスルフィド結合形成経路の生理的役割について、プロテオミクスと遺伝子ノックアウト・ノックダウン技術を駆使することで網羅的に解析する。これら解析により得られた新しい知見を構造生化学的手法を中心とする各論的研究にフィードバックすることで、小胞体内のジスルフィド結合形成ネットワークの機能的役割と分子機構の全容を解明することを目指す。

2. 研究の実施状況

本年度は、新規に見つかったPDI酸化酵素Prx4を起点としたジスルフィド結合導入経路の同定と機能的役割について研究を進めた。その結果、従来見つけていたEro1-PDI酸化経路と新規Prx4-P5/ERp46酸化経路が協同的にはたらくことで、酸化的全フォールディングが相乗的に促進されることを明らかにし、*Scientific Report* 誌に発表した。さらにX線小角散乱法により、Prx4の特異的パートナータンパク質として同定されたERp46の他のPDIファミリータンパク質とは大きく異なる構造と機能を明らかにし、*Structure* 誌に発表した。さらに、小胞体ーゴルジ体間に存在するpH勾配に依存したERp44を介した新たなタンパク質品質管理機構について、イタリアのRoberto Sitia教授のグループと共同で、*Molecular Cell* 誌に発表した。

一方、小胞体に張り巡らされたシステインを介した酸化還元ネットワークの解明を目指し、遺伝子ノックアウトとプロテオミクス解析を組み合わせた網羅的解析を遂行した。ニワトリBリンパ球細胞DT40を用いて、Ero1 α 、Ero1 β 、Prx4、ERp46、P5、ERdj5の6種類のシングルノックアウト細胞とPrx4/P5、Prx4/ERp46、P5/ERp46の3種のダブルノックダウン細胞の作製に成功した。これら9種類のノックアウト細胞を用い、SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture)法によるプロテオミクス解析を開始した段階である。すでに、これらノックアウト細胞を一定時間培養する間に分泌されたタンパク質を調べたところ、細胞によって幾種かのタンパク質の分泌量に有意な差があることを確認している。まさに今、これらノックアウト細胞を用いた網羅的解析が本格的に始まったところである。

3. 研究発表等

雑誌論文 計 10 件	<p>(掲載済み一査読有り) 計 6 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kojima, R.[†], Okumura, M.[†], Masui, S., Kanemura, S., Inoue, M., Saiki, M., Yamaguchi, H., Hikima, T., Suzuki, M., Akiyama, S. and Inaba, K.* ([†]<i>These authors contributed equally to this work.</i>) “Radically different thioredoxin domain arrangement of ERp46, an efficient disulfide-bond introducer of the mammalian PDI family” <i>Structure</i>, 22, 431-443 (2014) 2. Sato, Y.[†], Kojima, R.[†], Okumura, M.[†], Hagiwara, M.[†], Masui, S., Maegawa, K., Saiki, M., Horibe, T., Suzuki, M. and Inaba, K.* ([†]<i>These authors contributed equally to this work.</i>) “Synergistic cooperation of PDI family member proteins in peroxiredoxin 4-driven oxidative protein folding” <i>Scientific Reports</i> 3, 2456 DOI: 10.1038 (2013) 3. Walden, P. M., Halili, M. A., Archbold, J. K., Lindahl, F., Fairlie, D. P., Inaba, K.* and Martin, J. L.* (*co-corresponding authors) “The α-proteobacteria <i>Wolbachia pipientis</i> protein disulfide machinery has a regulatory mechanism absent in γ-proteobacteria.” <i>PLoS One</i> 8 (11), e81440. Doi:10.1371 (2013) 4. Vavassori, S.[†], Cortini, M.[†], Masui, S.[†], Sannino, S.[†], Anelli, T., Caserta, I. R., Fagioli, C., Fornili, A., Mossuto, M. F., Degano, M., Inaba, K. and Sitia, R.* ([†]<i>These authors contributed equally to this work.</i>) “A pH-Regulated Quality Control Cycle for Surveillance of Secretory Protein Assembly.” <i>Mol. Cell</i> 50, 783-792 (2013) 5. Kadokura, H.*, Saito, M., Tsuru, A., Hosoda, A., Iwawaki, T., Inaba, K., Kohno, K.* (*co-corresponding authors) Identification of the redox partners of ERdj5/JPDI, a PDI family member, from an animal tissue.” <i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> 440, 245-250 (2013) 6. Kojima, R.[†], Okumura, M.[†], and Inaba, K.* ([†]<i>These authors contributed equally to this work.</i>) “Structural basis of disulfide bond formation in the bacterial periplasm and ER.” <i>Encyclopedia of Life Science</i>, DOI: 10.1002 (2013) <p>(掲載済み一査読無し) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. Appenzeller-Herzog, C., Inaba, K., Delaunay-Moisan, A. “Cell biology of cysteine-based molecular switches.” <i>Int. J. Cell Biol.</i> 2014, 157038-039 (2014) 8. Okumura, M.*, Hashimoto, S., Nawata, M., Yutani, K., Hikima, T., Hamada, D., Hidaka, Y., Ito, L., Shiba, K., Hosokawa, K., Inoue, T., Maekawa, S., Imaoka, S., Inaba, K., and Yamaguchi, H. “Bisphenol A induces a conformational change in protein disulfide isomerase” <i>Peptide Science</i>, 331-332 (2013) 9. 増井 翔史、Roberto Sitia、<u>稲葉 謙次</u>「分泌タンパク質の成熟化を監視する pH に依存的な新たなタンパク質品質管理機構の発見」ライフサイエンス新着論文レビュー2013 URL: http://first.lifesciencedb.jp/archives/7229 (2013) <p>(未掲載) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 10. 奥村 正樹、<u>稲葉 謙次</u>「哺乳動物細胞の小胞体におけるジスルフィド結合形成ネットワークの構造基盤」実験医学 (羊土社)、印刷中
----------------	--

様式19 別紙1

<p>会議発表 計 14 件</p>	<p>専門家向け 計 14 件 (国際学会)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Inaba, K. “Structural and mechanistic basis of protein disulfide bond formation network in mammalian cells” 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, Kyoto (2014, 3/23-26) <i>invited</i> 2. Okumura, M., Kojima, R., Masui, S., Hikima, T., Yamaguchi, H., Suzuki, M., Akiyama, S., Inaba, K. Structural basis of the newly identified disulfide-introducing pathway composed of Prx4 and ERp46. NIH-Tohoku university-JSPS Symposium, Sendai, (2013, 5/9-11) 3. Masui, S., Vavassori, S., Cortini, M., Sitia, R. and Inaba, K. “ER retention of Ero1α is regulated by the pH-dependent C-terminal tail movement of ERp44” NIH-Tohoku university-JSPS Symposium, Sendai, (2013, 5/9-11) <p>(国内学会)</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. 稲葉 謙次 小胞体におけるタンパク質品質管理に関わるジスルフィド結合形成ネットワークの分子基盤 (招待講演) 第36回日本分子生物学会年会 ワークショップ「ER-Post ERにおける膜プロテオスタシスネットワーク研究の最前線」、神戸 (2013, 12/3-6) 5. 奥村 正樹、小島 理恵子、増井 翔史、鈴木 守、秋山 修志、稲葉 謙次 “A radically different thioredoxin domain arrangement explains the efficient catalysis of disulfide-bond introduction by the PDI family member, ERp46” 第36回日本分子生物学会年会、神戸 (2013, 12/3-6) 6. 稲葉 謙次 「細胞のタンパク質品質管理の仕組み」第13回多元物質科学研究所研究発表会、仙台 (2013, 12/6) 7. 稲葉 謙次 「小胞体におけるタンパク質品質管理機構の分子構造基盤」第660回九州大学生体防御医学研究所セミナー、福岡 (2013, 12/18) 8. 稲葉 謙次 「細胞におけるタンパク質品質管理システムの構造基盤」(招待講演) 平成25年度日本生物物理学会東北支部会、仙台 (2013, 12/13) 9. 稲葉 謙次 「哺乳動物細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成ネットワークの分子基盤」(特別講演) 鳥取大学応用生物工学科セミナー、鳥取 (2013, 11/15) 10. 稲葉 謙次 「哺乳動物細胞におけるジスルフィド結合形成ネットワークの分子基盤」(招待講演) 平成25年度日本薬学会東北支部会 第12回生物化学若手研究者セミナー「酸化ストレス応等機構—研究の新展開」、仙台 (2013, 9/7) 11. 稲葉 謙次、佐藤 吉美、小島 理恵子、奥村 正樹、萩原 誠智「哺乳動物細胞におけるジスルフィド結合形成システムの構造と作用機序」第65回日本細胞生物学会年会 シンポジウム「プロテオスタシス：細胞内タンパク質の恒常性」(シンポジウム企画)、名古屋 (2013, 6/19-21) 12. 奥村 正樹、小島 理恵子、増井 翔史、引間 孝明、山口 宏、鈴木 守、秋山 修志、稲葉 謙次「PDI酸化酵素 Prx4 と PDI ファミリータンパク質 ERp46 による新たなジスルフィド結合導入経路の構造基盤」第13回日本蛋白質科学会年会、鳥取 (2013, 6/12-14)
------------------------	--

様式19 別紙1

	<p>13. 稲葉 謙次「哺乳動物細胞におけるジスルフィド結合形成ネットワークの構造と機能」 第13回日本蛋白質科学会年会 公募型シンポジウム、鳥取（2013, 6/12-14）</p> <p>14. 稲葉 謙次「細胞が備えるジスルフィド結合形成ネットワークの構造と分子機構」平成 24年度ナノマクロ物質・デバイス・システム創製アライアンス成果報告会（2013, 4/23, 北海道大学学術交流会館）</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>（取得済み）計0件 （出願中）計0件</p>
<p>Webページ （URL）</p>	<p>生体分子構造研究分野 稲葉研 http://www.tagen.tohoku.ac.jp/modules/laboratory/index.php?laboid=87</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>2014年2月28日、3月1日に東京（ベルサール新宿グランド）で開かれた「最先端研究開発プログラム(FIRST)・シンポジウム」(両日で327人来場)に参加し、本研究課題の成果と波及効果について、国民や他分野の研究者に向けポスター発表を行った。またその配布冊子においても、自身の研究について分かり易く解説した。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

特になし

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	123,000,000	83,000,000	40,000,000	0	0
間接経費	36,900,000	24,900,000	12,000,000	0	0
合計	159,900,000	107,900,000	52,000,000	0	0

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	3,919,968	40,000,000		43,919,968	43,919,968	0	0
間接経費	1,175,991	12,000,000		13,175,991	13,175,991	0	0
合計	5,095,959	52,000,000	0	57,095,959	57,095,959	0	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	22,639,873	CO2インキュベーター、クリーンベンチ等
旅費	1,875,890	学会参加旅費等
謝金・人件費等	18,004,662	博士研究員3名、実験補助員2名雇用(1名は 半年間のみ)
その他	1,399,543	論文投稿料等
直接経費計	43,919,968	
間接経費計	13,175,991	
合計	57,095,959	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
パナソニックヘルス ケア CO2インキュベ ーター	MCO-5ACUV-PJ	1	567,000	567,000	2013/12/5	東北大学
パナソニックヘルス ケア クリーンベン チ	MCV-91BNS-PJ	1	609,000	609,000	2013/12/5	東北大学