

**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23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 | 九州大学・生体防御医学研究所・准教授 |
| 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品質管理に関わるジスルフィド結合形成・開裂因子の作用機序の解明を目指した構造生物学的研究を遂行する。さらに、これら因子間の新規ネットワークとその機能的役割の解明を目指した細胞生物学的およびプロテオミクス的研究を新たに展開する。

2. 研究の実施状況

細胞小器官の一つである小胞体で合成されるタンパク質の約 1/3 はジスルフィド結合の導入を伴う酸化的フォールディングを受けると言われており、その基質には生物学的にも医学的にも重要な免疫グロブリンや、インスリン、血液凝固因子などが知られている。近年、ジスルフィド結合の形成に関わる小胞体内在性酵素が相次いで報告され、高等動物細胞の小胞体にはジスルフィド結合形成のための複数の酸化経路が張り巡らされているという新たな概念が生まれつつある。中でも Ero1 と Peroxiredoxin-4 (Prx4)は小胞体内に高濃度で存在し、ジスルフィド結合を創り出す主要な酵素として注目される。

平成23年度は、Ero1 と Prx4 を起点とするジスルフィド結合形成ネットワークを明らかにするため、系統的な生化学実験、細胞生物学実験を主として行った。その結果、Ero1 は protein disulfide isomerase (PDI)のみを特異的に効率よく酸化するのに対し、Prx4 は小胞体中に約 20 種類存在する protein disulfide isomerase (PDI)ファミリータンパク質に対し幅広い反応性をもつことが示された。さらに我々は Prx4 の結晶構造解析にも取り組み、1.8 Å 分解能でその構造を解くことに成功した(次頁図参照)。この構造的知見から、Prx4 が PDI ファミリー蛋白質に対し幅広い反応特異性を示す分子基盤が明らかとなった。Ero1-PDI および Prx4-PDI ファミリー経路を介したモデル基質 (RNaseA) の酸化的フォールディングについても詳細に調べており、各 PDI ファミリータンパク質の機能的役割の相違についても重要な知見を得ている。これら構造生化学データを統合し、現在論文投稿準備中である。これに加え、種々のジスルフィド結合形成因子のノックダウンおよびノックアウト細胞のライブラリーの作成を着実に進めており、これら細胞を用いた生理学的データも今後多くさせる状況にある。

以上の研究進展に加え、Ero1, Prx4 の小胞体内局在に必須な PDI ファミリー因子の一つ ERp44 の pH 依存的な機能制御機構に関する研究(論文投稿中)、小胞体中に生じた構造異常糖タンパ

様式19 別紙1

ク質の排除（小胞体関連分解）に深く関わりジスルフィド結合還元酵素 ERdj5 と協同的に働く因子 EDEM の大量発現精製系の構築などにも取り組み、一定の成果をおさめている。すでに Ero1-ERp44 複合体, Prx4-ERp44 複合体および ERdj5-BiP-EDEM 三者複合体の構造決定に向けた幅広い結晶化スクリーニングを開始しており、本プログラムの研究期間中にこれら課題についても達成できるよう、精力的に取り組む。



本研究者によって解かれたマウス由来Prx4の結晶構造

3. 研究発表等

| | |
|-----------------------|--|
| <p>雑誌論文 計 7 件</p> | <p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> Araki, K. and <u>Inaba, K.*</u> Structure, mechanism and evolution of Ero1 family enzymes <i>Antioxid. Redox Signal.</i> (2012) 16 (8), 763-771 URL: http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2011.4418 <u>Inaba, K.</u> Crystal structure of Ero1α, a flavoenzyme responsible for protein disulfide generation in human cells <i>Spring 8 Research Frontier 2010</i> (2011) p24-25 Hagiwara, M., Maegawa, K., Suzuki, M., Nagata, K. and <u>Inaba, K.</u> Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident disulfide reductase ERdj5 <i>PF Activity Report 2010</i> (2011) p54-55 <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <u>稲葉 謙次</u> 小胞体内在性ジスルフィド結合還元酵素 ERdj5 によって促進される小胞体関連分解経路の構造的基盤 SPring8 利用者情報(2011) Vol. 16, p76-80 <p>(未掲載) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> Sato, Y. and <u>Inaba, K.*</u> (査読あり) Disulfide bond formation network in the biological kingdoms <i>FEBS J.</i> in press 前川 憲一、<u>稲葉 謙次</u> (査読あり) 小胞体品質管理に関わるジスルフィド結合還元酵素 ERdj5 の構造と機能 農芸化学会学会誌「化学と生物」 印刷中 佐藤 吉美、<u>稲葉 謙次</u> (査読あり) 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システム 生化学会 学会誌ミニレビュー 印刷中 |
|-----------------------|--|

様式19 別紙1

| | |
|------------------------|--|
| <p>会議発表 計 13 件</p> | <p>専門家向け 計 12 件 (国際学会)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Maegawa, K., Hagiwara, M., Suzuki, M., Nagata K. and <u>Inaba, K.</u> Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. The 21st Hot Spring Harbor Symposium jointly with 9th Global COE International Symposium, Fukuoka, Japan. 1/21, 2012 2. <u>Inaba, K.</u> Structural and mechanistic basis of protein disulfide bond formation in human cells The 10th G-COE international symposium on Stem Cells and Regenerative Medicine, Singapore. 12/22-23, 2011 3. Masui, S., Vavassori, S., Cortini, M., Sitia, R. and <u>Inaba, K.</u> ER retention of Ero1 is regulated by the pH-dependent C-terminal tail movement of ERp44 The 10th G-COE international symposium and 7th young investigators forum, Singapore. 12/22-23, 2011 4. <u>Inaba, K.</u> Structural and mechanistic basis of regulated and specific protein disulfide bond formation in human cells. Quality control: Folding and degradation of prerotins in the ER, Ascona, Switzerland. 9/11-16, 2011 5. <u>Inaba, K.</u> Structure and mechanism of the protein disulfide bond formation systems in human cells. ESF-EMBO symposium on glutathione and related thiols in living cells, Barcelona, Spain. 9/4-9, 2011 6. <u>Inaba, K.</u> Crystal structures of Ero1 and ERdj5 reveal the mechanisms of ER quality control in mammalian cells. The 6th international symposium of institute network, Tokyo, Japan. 6/9-10, 2011 7. Suzuki, M., Hagiwara, M., Maegawa, K., Hoseki, J., Nagata, K. and <u>Inaba, K.</u> Crystal structure of ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. Meeting of the American Crystallographic Association, Buffalo, U.S.A. 5/28-6/2, 2011 <p>(国内学会)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>稲葉 謙次</u> 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システム (招待講演) 北大薬学部セミナー、札幌 2/21, 2012 2. 増井 翔史、<u>稲葉 謙次</u> ヒト細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成システム Ero1-PDI の分子基盤 日本生物物理学会九州支部例会 2011、飯塚 12/4, 2011 3. <u>稲葉 謙次</u> タンパク質品質管理に関わるジスルフィド結合形成・開裂因子の構造的基盤 (招待講演) 岡崎統合バイオサイエンスセミナー、岡崎 6/4, 2011 4. 萩原 誠智、前川 憲一、鈴木 守、實関 淳、新木 和孝、潮田 亮、永田 和宏、<u>稲葉 謙次</u> (2011/6-27-29) 糖たんぱく質 ERAD における ERdj5 の役割 (若手最優秀発表賞選考会講演) 第 63 回日本細胞生物学会年会、札幌 6/27-29, 2011 5. 増井 翔史、飯田 裕果、鈴木 守、Stefano Vavassori、Roberto Sitia、<u>稲葉 謙次</u> ヒト細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成システム Ero1-PDI の分子基盤 第 11 回日本蛋白質科学会年会、大阪 6/7-9, 2011 <p>一般向け 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>稲葉 謙次</u> (2012, 2/22) PI になる前、なった後：勝負は続く (招待講演) 北大若手研究者交流会、札幌 |
| <p>図書 計 0 件</p> | |

様式19 別紙1

| | |
|-----------------------------|--|
| 産業財産権 出願・取得状 況 計0件 | (取得済み) 計0件 (出願中) 計0件 |
| Webページ (URL) | 九州大学 生体防御医学研究所 蛋白質化学分野 URL: http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/pgpc/ |
| 国民との科 学・技術対話 の実施状況 | 九州大学の WEB サイトの中に特色ある研究の取り組みとして、本プログラムの内容を公開し、研究目的・研究内容の情報発信を行った。 平成24年2月28日に、九州大学高等研究院の主催により最先端・次世代研究開発支援プログラム研究発表会が開催され、そこで他大学や企業からも研究者を招いて、ポスターによる研究発表を行った。 |
| 新聞・一般雑 誌等掲載 計0件 | |
| その他 | |

4. その他特記事項

第8回 日本学術振興会賞 受賞

研究題目：タンパク質の品質管理に関わるジスルフィド結合形成・開裂システムの解明

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

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 | 43,000,000 | 0 | 80,000,000 | 0 |
| 間接経費 | 36,900,000 | 12,900,000 | 0 | 24,000,000 | 0 |
| 合計 | 159,900,000 | 55,900,000 | 0 | 104,000,000 | 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 | 41,500,000 | 0 | 0 | 41,500,000 | 28,839,092 | 12,660,908 | 0 |
| 間接経費 | 12,450,000 | 0 | 0 | 12,450,000 | 8,651,728 | 3,798,272 | 0 |
| 合計 | 53,950,000 | 0 | 0 | 53,950,000 | 37,490,820 | 16,459,180 | 0 |

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

| | 金額 | 備考 |
|---------|------------|------------------------|
| 物品費 | 10,440,519 | 遠心機、実験試薬、実験器具類等 |
| 旅費 | 474,450 | 研究発表会、SPring8へ実験の為の出張等 |
| 謝金・人件費等 | 17,524,416 | 学術研究員3名、テクニカルスタッフ1名人件費 |
| その他 | 399,707 | 学会誌投稿料等 |
| 直接経費計 | 28,839,092 | |
| 間接経費計 | 8,651,728 | |
| 合計 | 37,490,820 | |

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 |
|-----------------------------|-----------------|----|--------------|--------------|-----------|-------------|
| 日立工機㈱製 微 量高速遠心機 | himac CF-15RXII | 1 | 820,000 | 820,000 | H24年2月15日 | 九州大学 |
| 株式会社トミ精工 製 微量高速冷却 遠心機 | MX-307 | 1 | 980,000 | 980,000 | H24年2月17日 | 九州大学 |
| | | | | 0 | | |