

**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24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

高等動物細胞におけるジスルフィド結合形成ネットワークを網羅的かつ詳細に解析し、各酸化還元経路の機能的役割と作用機序を分子構造レベルで解明することを主目的とする。本目的達成のため、Ero1, Prx4 および PDI ファミリー各因子をノックアウトした DT40 細胞のライブラリーを構築し、各ノックアウト細胞における酸化的フォールディングを網羅的に解析する。また新たな酸化経路を同定できれば、その構造的基盤を確立するため、その経路を構成する因子の複合体の高分解能構造解析に取り組む。以上、構造生物学、細胞生物学、プロテオミクスすべての手法を導入し、最終的には高等生物細胞に張り巡らされた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基盤を完全解明することを目指す。

### 2. 研究の実施状況

H24 年度は、Ero1 に代わる小胞体内在性 PDI 酸化酵素として最近見つかった peroxiredoxin-4 (Prx4)に焦点をあて研究を進めた。Prx4 を介したジスルフィド結合導入経路について知見を得るため生化学実験、細胞生物学実験を行い、Ero1 が PDI を特異的に酸化する酵素であるのに対し、Prx4 は PDI ファミリータンパク質のうち ERp46 と P5 に特化した酸化酵素であることを明らかにした。また変性還元 RNase A を用いたリフォールディング実験を行い、P5 および ERp46 を介したジスルフィド結合導入は PDI を介した時よりも迅速に起こるものの、正しいジスルフィド結合を選択的に架ける能力において PDI より大きく劣ることが判明した。さらに興味深いことに、ERp46 あるいは P5 を介したジスルフィド結合導入と PDI によるジスルフィド結合の異性化が協同的に働くことにより、酸化的フォールディングが相乗的に加速されることも発見した。構造レベルでの仕事においても進展があり、Prx4 の活性部位を含む C 末端領域と P5 のチオレドキシンドメイン、および Prx4 の C 末端領域と ERp46 のチオレドキシンドメインの二種類の複合体の結晶構造解析に成功し、これら構造情報から Prx4-P5, Prx4-ERp46 複合体の構造モデルを構築するに至った(次頁図参照)。以上の研究成果について現在論文投稿中であり、近日中に受理されるものと思われる。

さらに Ero1 および Prx4 を起点としたジスルフィド結合形成ネットワークを網羅的に解析するため、Ero1, Prx4 およびこれらと反応性の高い PDI ファミリー各因子をノックアウトした

5種類のDT40細胞を構築することに成功した。各ノックアウト細胞における分泌蛋白質の産生量についてプロテオミクス解析を開始しており、まさにこれから興味深い実験結果が出始める段階である。

上記ジスルフィド結合形成ネットワークに関する仕事に加え、PDIファミリータンパク質の1つであるERp44を介したタンパク質品質管理機構の研究も進めた。ERp44は、小胞体内で働く酵素や未成熟の分泌タンパク質とGolgi体で結合し、それらをCOPI被覆小胞を介して小胞体内に逆輸送する働きがある。ERp44はa-b-b'の3つのチオレドキシンの様ドメインと約45残基から成るC末端tail(以下C-tailと呼ぶ)によって構成されており、基質との結合に関わるとされる疎水性表面はC-tailによって覆われている。我々はin vitroでの生化学解析の結果、ERp44のC-tailの開閉および基質タンパク質との親和性が小胞体(pH7.2)とゴルジ体(pH6.7)間のpH勾配によって厳密に制御されることを突き止めた。さら



Prx4-P5 複合体構造モデル

に系統的な変異体解析の結果、C-tailの開閉に関わるアミノ酸を同定し、それらアミノ酸のプロトン化、脱プロトン化がERp44によるpHセンシング機能を司ることを解明した。以上の成果はイタリアのRoberto Sitiaのグループと共同で進め、Molecular Cell誌に採択されるに至った。

### 3. 研究発表等

雑誌論文 計6件	(掲載済み一査読有り) 計3件 1. Sato, Y. and <u>Inaba, K.</u> * Disulfide bond formation network in the biological kingdoms <i>FEBS J.</i> 279, 2262-2271, 2012 2. 佐藤 吉美、 <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 生化学 Vol.84 No.9 p767-772, 2012 ★同号の表紙を飾る 3. 前川 憲一、 <u>稲葉 謙次</u> 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 化学と生物 Vol. 50 p484-487, 2012 (掲載済み一査読無し) 計0件 (未掲載) 計3件 1. Vavassori, S. <sup>†</sup> , Cortini, M. <sup>†</sup> , Masui, S. <sup>†</sup> , Sannino, S. <sup>†</sup> , Anelli, T., Caserta, I. R., Fagioli, C., Fornili, A., Mossuto, M. F., Degano, M., <u>Inaba, K.</u> and Sitia, R. ( <sup>†</sup> These authors contributed
-------------	---

様式19 別紙1

	<p>equally to this work.)  A pH-Regulated Quality Control Cycle for Surveillance of Secretory Protein Assembly.  <i>Molecular Cell</i> in press</p> <p>2. Okumura, M., Hashimoto, S., Nawata, M., Yutani, K., Hikima, T., Hamada, D., Hidaka, Y., Ito, L., Shiba, K., Hosokawa, K., Inoue, G., Maekawa, T., Imaoka, S., <u>Inaba, K.</u>, and Yamaguchi, H.  Bisphenol A Induces a Conformational Change in Protein Disulfide Isomerase  <i>Peptide Science</i> in press.</p> <p>3. <u>Kojima, R., Okumura, M. and Inaba, K.*</u>  Structural basis of protein disulfide bond formation in the bacterial periplasm and mammalian ER.  <i>eLS review.</i> in press</p>
<p>会議発表 計10件</p>	<p>専門家向け 計7件 (国際学会)</p> <p>1. Kojima, R., Sato, Y., Okumura, M., Hagiwara, M., Masui, S., Maegawa, K., Suzuki, M. and <u>Inaba, K.</u>  Structural basis for selective disulfide transfer from Prx4 to PDI family proteins. (oral)  Post-GCOE Symposium &amp; Retreat in Singapore with NUS &amp; TLLon Cell-fate Decision: Function and Dysfunction in Homeostasis, Singapore, 3/4-5, 2013</p> <p>(国内学会)</p> <p>2. 増井 翔史, Stefano Vavassori, Margherita Cortini, Roberto Sitia, <u>稲葉 謙次</u>  小胞体-ゴルジ体間の pH 勾配に依存した ERp44 による pH 依存的 Ero1a リテンション機構の解明  第 12 回蛋白質科学会年会 名古屋、6/20-22, 2012</p> <p>3. 佐藤 吉美、<u>稲葉 謙次</u>  高等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 (招待講演)  第 12 回日本蛋白質科学会年会 名古屋国際会議場、6/20-22, 2012</p> <p>4. <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・開裂システムの分子基盤 (招待講演)  東北大学多元研セミナー、仙台、7/10, 2012</p> <p>5. <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・開裂システム (招待講演)  京都大学ウイルス研セミナー、京都、9/14, 2012</p> <p>6. 増井翔史, Stefano Vavassori, Margherita Cortini, Roberto Sitia, <u>稲葉謙次</u>  小胞体-ゴルジ体間の pH 勾配に依存した ERp44 による小胞体内リテンション機構の解明 (口頭&amp;ポスター)  第 85 回日本生化学会大会 福岡、12/14-16, 2012</p> <p>7. 佐藤 吉美、小島 理恵子、増井 翔史、前川 憲一、鈴木 守、<u>稲葉 謙次</u></p>

様式19 別紙1

	<p>高等動物細胞における新たなジスルフィド結合形成経路- Prx4 と PDI ファミリータンパク質の巧みな関係プレー - (口頭&amp;ポスター) 第 85 回日本生化学会大会 福岡、12/14-16, 2012</p> <p>一般向け 計3件</p> <p>1. <u>稲葉 謙次</u> SSP 時代を振り返って (招待講演) 九州大学テニユアトラック制シンポジウム、福岡、5/23, 2012</p> <p>2. <u>稲葉 謙次</u> タンパク質品質管理を支えるジスルフィド結合形成ネットワーク (招待講演) 山形大学テニユアトラック制シンポジウム、福岡、11/2, 2012</p> <p>3. <u>稲葉 謙次</u> 細胞のタンパク質品質管理の仕組み (招待講演) 九州大学若手研究者交流セミナー、福岡、11/21, 2012</p>
<p>図書</p> <p>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</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p><a href="http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/pgpc/">http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/pgpc/</a></p> <p><a href="http://www.tagen.tohoku.ac.jp/modules/laboratory/index.php?laboid=87">http://www.tagen.tohoku.ac.jp/modules/laboratory/index.php?laboid=87</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>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11月21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採択者を演者とした若手研究者交流セミナーが開催され、そこで学内外の若手研究者を招いて、研究発表・議論を行った。</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

平成25年4月1日付けで東北大学多元物質科学研究所生体分子構造研究分野の教授に着任する。

## 実施状況報告書(平成24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	40,000,000	40,000,000	
間接経費	36,900,000	12,900,000	12,000,000	12,000,000	
合計	159,900,000	55,900,000	52,000,000	52,000,000	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	12,660,908	40,000,000	0	52,660,908	48,740,940	3,919,968	
間接経費	3,798,272	12,000,000	0	15,798,272	14,622,281	1,175,991	
合計	16,459,180	52,000,000	0	68,459,180	63,363,221	5,095,959	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	14,615,352	高速液体クロマトグラフィー、実験試薬、実験器具等
旅費	2,277,470	国内外学会発表、SPring8放射光実験等の出張
謝金・人件費等	31,437,110	学術研究員5名雇用、テクニカルスタッフ2名雇用
その他	411,008	学会誌投稿料等
直接経費計	48,740,940	
間接経費計	14,622,281	
合計	63,363,221	

## 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
高速液体クロマト グラフィー	HPLC system GL-7400	1	3,500,000	3,500,000	2012/8/6	九州大学
				0		
				0		