

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成13年度採択研究代表者

永田 和宏

(京都大学再生医科学研究所 教授)

「小胞体におけるタンパク質の品質管理機構」

1. 研究実施の概要

細胞は異常な蛋白質が生じた場合、それらを監視して再生ないしは分解処分する品質管理機構を備えている。本研究では小胞体における蛋白質の品質管理機構について、1) 蛋白質の正しいフォールディングを促進する機構、2) 不良蛋白質を分解する機構、および3) それら2つの機構に必要な因子をそれぞれ供給する機構の3つについて研究を進める。本研究は、品質管理の破綻による神経変性疾患をはじめとするフォールディング異常病の病態の理解および治療への道を開くものと期待される。

京大再生研（永田）グループ

- 1) 小胞体においてフォールディング異常を起したタンパク質の分解に関わる重要な因子としてEDEMを発見した。EDEMは小胞体中でMannose 8B formの糖タンパク質を認識して、小胞体からサイトゾルへの逆輸送を促進し、小胞体関連分解(ERAD)を促進する因子である。ERADにおける分解機構はまだ十分に明らかになっていないが、この研究はこのホットな分野で、初めて基質の受け渡しを明らかにしたものである。
- 2) ほ乳類は4つのインスリン遺伝子を持っている。そのうちIns2遺伝子の1つのalleleに点突然変異が起こったことによって生じる糖尿病モデルマウスとしてアキタマウスが知られている。今回、我々は、アキタマウスから膵β細胞を樹立し、この細胞においては小胞体分子シャペロン群が誘導されていること、さらにその転写に関わる2つの因子、ATF6とXBP1がともに活性化していることを見いだした。4つある遺伝子のうち、1つだけに変異が起こることによって、他の正常な3つの遺伝子から翻訳された正常なインスリン分子まで分泌されなくなり、糖尿病を起してしまうこのモデルマウス、モデル細胞は、小胞体ストレスおよび小胞体における品質管理を研究するのにきわめて興味深いモデルであり、今後の研究を発展させたい。

福島医大（和田）グループ

小胞体内で成熟化する蛋白のジスルフィド結合の形成と解裂、ダイナミクス等について、特に生細胞において解析する新たな実験系と手法を確立し、成熟化の分子機構を新たな角度から解明することを目的とする。これまでの研究で、細胞には、foldingに好ましくないrandom diffusionを避けるための機構が備わっており、同時にcargo分子を拡散さ

せるための能動輸送の機構が存在するような知見が得られた。これらの機構について、新たに開発中の単一分子レベルでの分子相互作用解析法も用いて、その機序を解明する。さらに、複雑なジスルフィド結合を持つモデル分子を用いることで、その成熟化と品質管理の分子機構を解明するための基礎実験に取り組み、ほぼ完了した。今後、そのモデル分子の先天性な欠損症をもたらす変異を中心として、その品質管理の詳細を解析してゆく。

京大生命科学（森）グループ

小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積した場合、小胞体内の恒常性を維持するためには分子シャペロンの作用により巻き戻して修復する（リフォールディング）か、小胞体関連タンパク質分解機構ERADにより分解して処理しなければならない。そこで、このリフォールディングと分解の仕分けの仕組みを解明することを目的として解析を行った。われわれは、異常タンパク質の小胞体内蓄積に応答して、哺乳動物では2つの転写誘導機構（ATF6経路とIRE1-XBP1経路）が活性化されることを明らかにしている。ATF6経路が主として分子シャペロンの転写誘導を担っているのに対し、今年度IRE1-XBP1経路が分子シャペロンだけでなく分解機構において重要な役割を果たす因子EDEEMの転写をも制御していることを見いだした。今後さらに、ATF6経路とIRE1-XBP1経路の役割分担を明確にし、タンパク質の品質管理における意義を明らかにしていきたい。

2. 研究実施内容

京大再生研（永田）グループ

1) 小胞体においてフォールディング異常を起したタンパク質の分解に関わる因子EDEEMは、小胞体中でMannose 8B formの糖タンパク質を認識して、小胞体からサイトゾルへの逆輸送を促進し、小胞体関連分解(ERAD)を促進する因子である。今回、我々は、EDEEMの作用機構をあきらかにする目的で、EDEEMと相互作用する因子について研究を進めた。

EDEMと相互作用する因子として、小胞体において蛋白質のproductive foldingに関わる分子シャペロンカルネキシンを同定した。カルネキシンは、その膜貫通ドメインを介してEDEEMと相互作用する。このとき、小胞体において、カルネキシンの機能的ホモログと考えられるカルレティキュリンとEDEEMは結合しなかった。これは従来小胞体において、機能的に同じと考えられてきた2つの分子シャペロンが、異なる機能を持っている可能性を示した初めてのデータである。

次に分解処理されるべき基質がどのように小胞体内の機能分子間を受け渡されて、最終的にサイトゾルへ逆輸送され、分解処理されるのか、その基質の受け渡しについて、我々の見いだしたEDEEM、カルネキシンを中心に研究を進めた。基質としては、代表的な可溶性基質である $\alpha 1$ アンチトリプシンの変異体 (null Hong Kong, NHK) を用いた。パルスチェイスと免疫沈降を組み合わせた実験などにより、NHKは、まずカルネキシンにトラップされ、そこでフォールディングを受ける。しかし変異により、フォールディングが完成しないので、次にEDEEMに受け渡され、最終的にサイトゾルへ輸送されることを明らかにした。EDEEMからどのようにトランスロコンにまで基質が受け渡

されるのかについては、まだ明らかではないが、この研究はERAD（小胞体関連分解）において、基質が複数の分子間をトランスファーされることを初めて示したものである。

さらにカルネキシンからEDEMへトランスファーする際のシグナルとして、マンノースが9個から8個にトリミングされることが必要であるが、このトリミングに関わるマンノシダーゼI（ER ManI）が、ERADを促進することも併せて明らかにした。ER ManIを過剰発現させた細胞においては、NHKの分解は通常の2倍程度に促進される。さらにEDEMとER ManIを同時に過剰発現させると、相乗効果ではなく、相加的な促進が見られた。ER ManIの過剰発現によって、基質は確かにMan8型の糖鎖を持ったものが増えていることも、細胞においてはじめて確かめられた。

2) アキタマウスから膵β細胞を樹立し、この細胞における小胞体ストレス応答について解析した。正常β細胞に比べ、アキタ型β細胞においては、GRP150, GRP94, BiPなどの小胞体分子シャペロンが一様に誘導されていることが明らかになり、これらの細胞では小胞体ストレスが起こっていることが示唆された。そこで最近、小胞体ストレス応答に関与することが明らかになった、ATF6およびXBP1という2つの転写因子の活性化について研究を進めた。

ウエスタンブロット、プロモーター・レポーター解析、転写因子導入実験などを組み合わせて、アキタ型β細胞においては、ATF6およびXBP1ともに、活性化されていることを明らかにした。小胞体ストレスにおいては、まずATF6が活性化され、遅れてXBP1が活性化するとされているが、アキタ型β細胞においては、変異インスリンを作り続けることによって、持続的な小胞体ストレスがかかり続ける状態にあると考えられ、このような状態にあっては、XBP1の方も常に活性化されているというのが新しい知見である。今後、なぜ4つある遺伝子の一個だけに変異が起こることによって、他の正常なインスリン分子の存在にも関わらず糖尿病が引き起こされるのかについて研究を継続する予定である。

福島医大（和田）グループ

目的：小胞体内腔で成熟した蛋白質のproductive foldingとERADの動態制御に関与する分子機構解析と、そのための生細胞での新たな実験系の確立

内容：A. 小胞体内遷移領域へのCOPIIコート集合への浸透圧ストレスの作用について解析した。その結果、a) COPIIコートの細胞質プールとの交換は、浸透圧変動で抑制されるがこれはリン酸化による信号伝達に依存しない、b) 高浸透圧における交換反応の抑制は Na^+/K^+ の変動による、c) 高浸透圧はER-YFPには影響しないが、cargo糖蛋白、calnexin及び糖蛋白cargo receptorには固有のkineticsで拡散速度抑制をもたらす、事を見いだした。これは下記の結果とあわせて、小胞体cargo分子は能動的に拡散しており、浸透圧ストレスは解除する可能性を示唆する。

B. チロシナーゼをモデルとして、その温度によるfoldingの可逆性を可能にする分子機構を知るために、成熟化の際の分子拡散速度について様々なレベルで調べた。その結果、a)

蛍光相関分光法(FCS)を用いて調べると、folding非許容温度ではチロシナーゼのブラウン運動はほとんど抑制され、folding許容温度になると抑制が解除されること、b)これに対して蛍光消光回復法(FRAP)ではfolding非許容温度でもfoldした分子と同程度の拡散速度が観察される、c)しかしこれは小胞体内腔成分に依存する、ことを見だし、小胞体では高温でのブラウン運動の抑制と共に内腔成分による分子のactiveな拡散が存在することを示す。

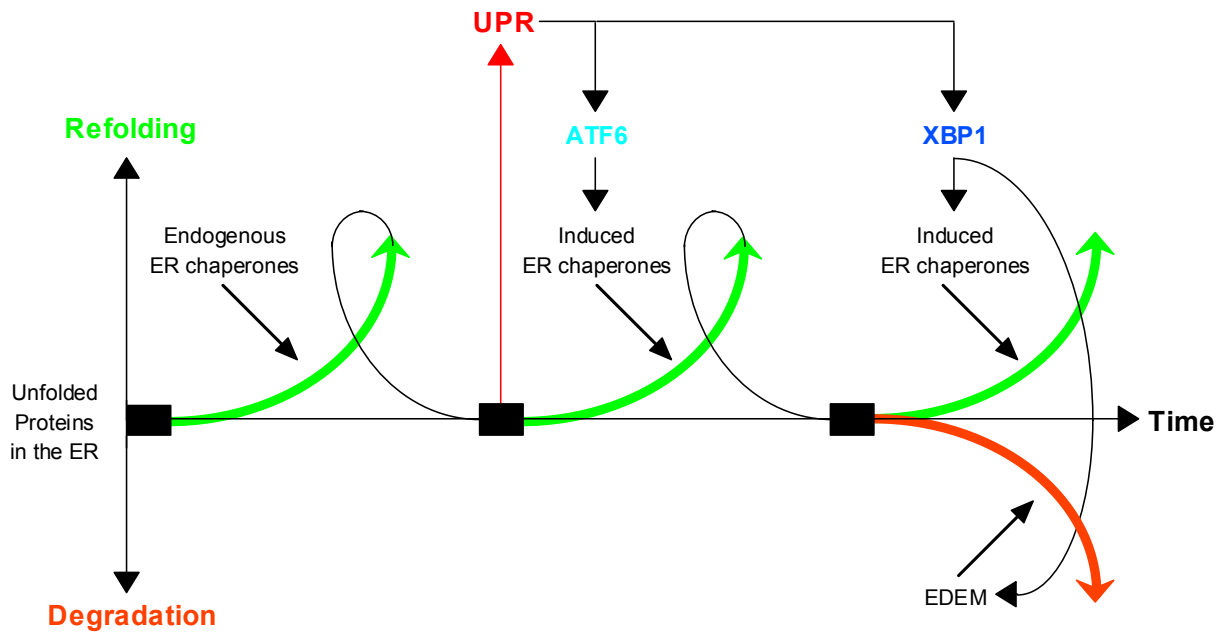
C. fibrinogenの6量体形成の分子機構：分泌蛋白質の成熟化のモデルとして、 α 、 β 、 γ 鎖が分子間・分子内ジスルフィド結合を形成して6量体となるfibrinogenの基本的なbiogenesisの解析を終えた。その結果、a)3量体 $\alpha\beta\gamma$ はcotranslationalに形成され6量体 $(\alpha\beta\gamma)_2$ となる過程が律速であり、b)新生の β は既に形成されている $\alpha\gamma$ 鎖に結合して3量体が作られ、その際に分子量100Kの蛋白(p100)が関与しその作用はERp57と競合する、c)オリゴマー構造を形成できない γ 鎖は主にプロテアソームにより分解されること等が示された。

京大生命科学（森）グループ

小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積したという情報は核へ伝えられ、転写レベルで誘導された小胞体局在性の分子シャペロンや酵素（小胞体シャペロン）が異常タンパク質に対処することにより小胞体内の恒常性が維持される。哺乳動物ではこの転写誘導機構に、ATF6経路とIRE1-XBP1経路という2つの経路が関与していることをわれわれは明らかにしてきた。

それぞれの経路に特異的な転写因子（活性型ATF6と活性型XBP1）のDNA認識様式の違いから、IRE1-XBP1経路が活性化されるとATF6経路では誘導されない遺伝子の転写が誘導され得る。このIRE1-XBP1経路に特異的な標的遺伝子を同定することは、小胞体におけるタンパク質の品質管理機構を理解する上で極めて重要と考えて検索した結果、EDEMという分子の転写誘導がATF6経路ではなくIRE1-XBP1経路により媒介されることを見いだした。EDEMは小胞体局在性の膜タンパク質で、小胞体において高次構造が異常になった糖タンパク質をユビキチン・プロテアソーム系を使って分解する過程に重要な働きをすることが永田グループにより示されている。さらに、EDEMを転写誘導することができないIRE1ノックアウト細胞は、異常糖タンパク質を効率的に分解することができないことを明らかにした。

上記の結果と、ATF6経路の主要な標的は小胞体シャペロンであること、並びに、活性化機構の違いから細胞内ではまずATF6が、次いでXBP1が発現してくることを考え併せて次のような結論を導いた。小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積すると、細胞はまずATF6を活性化してシャペロンを誘導し、異常タンパク質の巻き戻しを計る。それでは不十分な場合にはXBP1を活性化し、シャペロンを誘導して異常タンパク質の巻き戻しを計るとともにEDEMを誘導して異常タンパク質の分解を始める。このように哺乳動物の小胞体ストレス応答は階層制を有し、状況に応じて層を転移させていくことを初めて実証した。



3. 研究実施体制

京大再生研（永田）グループ

- ① 研究分担グループ長：永田和宏（京都大学再生医科学研究所・教授）
- ② 研究項目：小胞体におけるproductive foldingと分解による品質管理

福島医大（和田）グループ

- ① 研究分担グループ長：和田郁夫
（福島県立医科大学学生体情報伝達研究所細胞科学研究部門・教授）
- ② 研究項目：小胞体内腔で成熟した蛋白質のproductive foldingとERADの動態制御に関与する分子機構解析と、そのための生細胞での新たな実験系の確立

京大生命科学（森）グループ

- ① 研究分担グループ長：森和俊（京大大学生命科学研究科・助教授）
- ② 研究項目：UPR経路を介した小胞体品質管理機構

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

京大再生研（永田）グループ

- EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin.
Y. ODA, N. HOSOKAWA, I. WADA & K. NAGATA
Science 299(5611):1394-1397(2003)
- A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response.
H. Yoshida, T. Matsui, N. Hosokawa, R. J. Kaufman, K. Nagata and K. Mori

(2003) *Developmental Cell*, 4, 265-271.

- The Kruppel-like factor Zf9 and proteins in the Spl family regulate the expression of HSP47, a collagen-specific molecular chaperone.

K. YASUDA, K. HIRAYOSHI, H. HIRATA, H. KUBOTA, N. HOSOKAWA & K. NAGATA

J Biol Chem. 277(47):44613-44622(2002)

- Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary.

K. SATO, K. YOMOGIDA, T. WADA, T. YORIHUZI, Y. NISHIMUNE, N. HOSOKAWA & K. NAGATA

J Biol Chem. 277(40):37678-37684(2002)

福島医大（和田）グループ

- EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin.

Y. ODA, N. HOSOKAWA, I. WADA & K. NAGATA

Science 299(5611):1394-1397(2003)

- Okiyoneda T, Wada I, Jono H, Shuto T, Yoshitake K, Nakano N, Nagayama S, Harada K, Isohama Y, Miyata T, Kai H. Calnexin Delta 185-520 partially reverses the misprocessing of the Delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* ; 526(1-3):87-92, 2002

- Hirosaki, K., Yamashita, T., Wada, I., Jin, H-Y. and Jimbow K. Tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 require rab7 for their intracellular transport.

J. Inv. Dermatol. 119(2), 475-480, 2002

京大生命科学（森）グループ

- A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response.

H. Yoshida, T. Matsui, N. Hosokawa, R. J. Kaufman, K. Nagata and K. Mori (2003)

Developmental Cell, 4, 265-271.

(2) 特許出願

なし