

「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」
平成25年度採択研究代表者

H27 年度
実績報告書

永田 和宏

京都産業大学
教授

小胞体恒常性維持機構：Redox, Ca^{2+} , タンパク質品質管理のクロストーク

§ 1. 研究実施体制

(1) 「永田」グループ

① 研究代表者：永田 和宏（京都産業大学総合生命科学部、教授）

② 研究項目

- ・ ERdj5/SERCA2b 系を中心としたカルシウム恒常性維持機構
- ・ カルシウム濃度によるERdj5活性の制御機構
- ・ ERADを中心としたタンパク質恒常性維持機構
- ・ サイトゾルにおけるタンパク質恒常性の破綻が小胞体のレドックスに及ぼす影響
- ・ オートファジーを制御する新規タンパク質ERdj8の機能解析

(2) 「稲葉」グループ

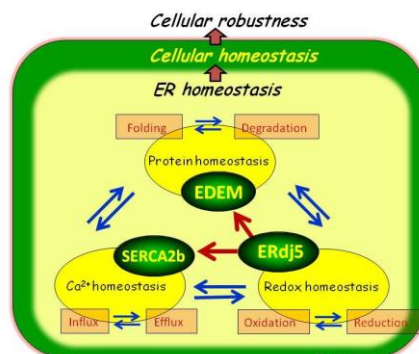
① 主たる共同研究者：稲葉 謙次（東北大学・多元物質科学研究所、教授）

② 研究項目

- ・ SERCA2b の結晶構造解析
- ・ ERdj5 の多機能性と構造多様性の相関
- ・ ERdj8 の大量発現精製系の確立と結晶構造解析

§ 2. 研究実施の概要

小胞体においては、小胞体の **robustness** (頑強性) を担保するために、3つの主要な恒常性維持機構が働いている。タンパク質、レドックス、カルシウムの恒常性 (ホメオスタシス) である。ERdj5 は小胞体に局在する初めての還元酵素であるが、基質の還元によって ERAD を促進するのみならず、小胞体カルシウムポンプである SERCA2b の小胞体内腔側のシステインを還元することによって、カルシウムの取り込みを活性化することを見出し、ERdj5 がカルシウム恒常性にも関与していることを発見した。セカンドメッセンジャーとしてのカルシウムの新たな調節機構の提示と、タンパク質・レドックス・カルシウムの3つの恒常性間のクロストークの実体解明を目指す研究である。



1) ERdj5/SERCA2b 系を中心としたカルシウム恒常性

維持機構: ERdj5 と SERCA2b が結合し、SERCA2b の活性を促進することを前年までに明らかにしてきた。ERdj5 が実際にカルシウムの取り込みを促進していることを、セミンタクト系を用いて直接証明したほか、ERdj5 による小胞体へのカルシウム取り込みは、小胞体内のカルシウムイオン濃度に応じて行われること、すなわちフィードバック制御がかかっていることを明らかにした。本研究は現在論文投稿中である。

2) カルシウム濃度による ERdj5 活性の制御機構: 上記1) に述べたようにカルシウムイオン濃度が低い時には ERdj5 は SERCA2b を活性化するが、高い時には ERdj5 による SERCA2b の活性化能力が低下していることを明らかにし、論文投稿中である。

3) ERAD を中心としたタンパク質恒常性維持機構: ERAD の分子機構を解明するために、ミスフォールドタンパク質を分解系へリクルートする因子 EDEM3 の結晶構造解析を目指していた。しかしながら、この結晶化が難しく現在ペンディング状態である。ERAD では EDEM と ERdj5 が共同して働くことを明らかにしているが、ERdj5 の還元力が ERAD には必須であることを明らかにしている。ERdj5 の還元力がどのように供給されているのかは、まだまったく明らかになっていない。ERdj5 の還元力のソースを探索する。

4) サイトゾルにおけるタンパク質恒常性の破綻が小胞体のレドックスに及ぼす影響: サイトゾルに polyQ を発現させると凝集体を形成する。この時、小胞体内腔のレドックス状態が還元方向へシフトすることを発見し、その成果は EMBO J. に発表した。このメカニズムをさらに追及するため、線虫の系を用いて、小胞体内レドックス因子を網羅的にノックダウンすることによって、小胞体恒常性にどのような影響が出るかを解析する。これはすでに系を立ち上げることができた。

5) オートファジーを制御する新規タンパク質 ERdj8 の機能解析: ERdj5 は本 CREST の大きな研究テーマであるが、その解析の過程で、新規ファミリータンパク質 ERdj8 をクローニングすることができた。ERdj8 はオートファジーを負に調節する小胞体膜タンパク質であることを明らかにしたので、このきわめて興味深い新規タンパク質の構造および機能を新たな研究テーマとして設定した。

1) J. Kirstein-Miles , D. Morito , T. Kakihana, M. Sugihara, A. Minnen, S.M. Hipp, C. Nussbaum-Krammer , U.F. Hartl, K. Nagata, R.I.Morimoto : Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments. *EMBO J.* 34(18):2334-2349 (2015)

2) Kotani Y, Morito D, Yamazaki S, Ogino K, Kawakami K, Takashima S, Hirata H, Nagata K. : Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. *Scientific Reports* 5:16161 (2015)

6) SERCA2b の結晶構造解析 : SERCA2b の大量発現系を確立し、バイセル法や Lipid Cubic Phase 法を用い、徹底的に結晶化条件を探索した。その結果、還元型 SERCA2b について 5.5Å 分解能のフルデータセットを収集することに成功した。現在、より高分解能の構造解析を目指してさらなる結晶化条件の最適化を試みている。また酸化型の SERCA2b についても、同様の手法により結晶化を開始しており、すでに微結晶を再現性よく得ている。より良質の結晶作製を目指し、サンプル調整条件および結晶化条件の探索を進めている。

7) ERdj5 の多機能性と構造多様性の相関 : ERdj5 が有する異なる二つの主たる機能（小胞体関連分解促進機能と SERCA2b 活性化機能）と構造多様性との相関を解明するため、ERdj5 の一分子動的構造解析および構造を一つに固定した変異体の機能解析を試みた。その結果、ERdj5 の動的構造性質が分子間ジスルフィド結合によりリンクしたオリゴマー形成の抑制に働き、ERAD の促進において重要な意味をもつことを明らかにした。

8) ERdj8 の大量発現精製系の確立と結晶構造解析 : 永田グループにおいてオートファジーのネガティブレギュレーターとして新たに見つかった ERdj8 の詳細な分子機構解明のため、ERdj8 の結晶構造解析に着手した。ERdj8 の小胞体ルーメン側ドメインおよび細胞質側ドメインについて、大腸菌を用いた大量発現精製系を確立させ、すでに結晶化スクリーニングを開始している。また ERdj8 の全長についても、ヒト細胞を用いた大量発現系の構築を進めている。

3) Watanabe, S., Kawashima, T., Nishitani, Y., Kanai, T., Wada, T., Inaba, K., Atomi, H., Imanaka, T. and Miki, K. “Structural basis of a Ni acquisition cycle for [NiFe]-hydrogenase by HypA and its enhancer.”

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112: 7701-7706 (2015)