

永田 和宏

京都産業大学総合生命科学部  
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 による SERCA2b の活性化機構に関する細胞生物学的解析
  - ・ ERdj5 の還元力の上流因子を探る（論文準備中）
  - ・ 新規小胞体タンパク質 ERdj8 によるオートファジーの制御（論文投稿中）

### (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
  - ・ 酸化型および還元型 SERCA2b および SERCA2a の結晶構造解析
  - ・ 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

・ **ERdj5 による SERCA2b の酸化還元による活性制御機構の解明**：永田グループによって発見された小胞体の還元酵素 ERdj5 により、小胞体膜に存在するカルシウムポンプ SERCA2b のカルシウム取り込み活性の制御が行われる。その制御機構を明らかにし、この成果は *Proc. Acad. Sci. USA (PNAS)* 誌に発表された。ERdj5 により SERCA2b の小胞体内腔側の 2 つのシステインが還元されると SERCA2b が活性化され、小胞体内腔のカルシウムイオン濃度が上昇すると、ERdj5 がオリゴマーを形成することで SERCA2b から離れ、それを不活性化する。このような見事なフィードバック制御が働いていることを明らかにした。

・ **小胞体における還元力供給のメカニズム解明**：小胞体の酸化的環境下で、ERdj5 がどのように還元力を獲得するかは重要な、しかし未だに答の得られていない謎である。ERdj5 の上流を探る過程で、ERdj5 が小胞体の代表的な酸化酵素 ERO1 から電子を得ている、すなわち ERO1 によって還元されていることを突き止めた。これは小胞体に入ってきた新生鎖から電子を得ている可能性を示唆しており、これを確定できれば、極めてインパクトの強い報告になる。

・ **SERCA2b および SERCA2a の結晶構造解析**：大量発現および精製に成功した SERCA2b について新たに Lipid Cubic Phase 法を用いて結晶化を試み、還元型 SERCA2b について 3.6 Å 分解能、酸化型 SERCA2b で 3.4 Å 分解能のフルデータセットを収集することに成功した。分子置換法で位相を決定し、構造解析を行った。同様に、SERCA2b のスプライシングバリエーションである SERCA2a についても、3.3 Å 分解能での酸化型、還元型の結晶構造を決定した。これら 4 つの結晶構造を詳細に比較した結果、SERCA2b だけがレドックス依存的に構造変化を起こすことが判明した。具体的には、酸化型の SERCA2b では 11 番目の膜貫通領域 (TM11) の電子密度が完全に消失していたのに対し、還元型では TM11 の電子密度が確認できた一方でカルシウム結合部位に配位するカルシウムイオンの電子密度の占有率が大きく低下していた。このことから、SERCA2b では酸化還元状態によって TM11 の動き・配向が制御され、これに伴い他の TM ヘリックスを介して、カルシウムイオンとの結合・解離が影響を受けることが明らかとなった。以上の構造解析の結果は、SERCA2b の酸化還元による Ca<sup>2+</sup>ポンプ活性制御機構の理解の確かな一助となる。

・ **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 について、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系を確立させ、精製条件の最適化および結晶化スクリーニングを行った。現在までに各ドメインとも結晶は得られていないが、さらなる条件検索を継続中である。一方、全長 ERdj8 については、ヒト培養細胞を用いた安定発現株の構築に成功し、精製条件の検討を進めている。

代表的な原著論文

Ushioda, R., Miyamoto A, Inoue M, Watanabe S, Okumura M, Maegawa KI, Uegaki K, Fujii S, Fukuda Y, Umitsu M, Takagi J, Inaba K, Mikoshiba K, Nagata K.

Redox-assisted regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 113, E6055-E6063 (2016)

Watanabe S., Harayama M., Kanemura S., Sitia R. and Inaba, K. “Structural basis of pH-dependent client binding by ERp44, a key regulator of protein secretion at the ER-Golgi interface” *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 114, 3224-3232 (2017)

Maegawa, K., Watanabe, S., Noi, K., Okumura, M., Amagai, Y., Inoue, M., Ushioda R., Nagata, K., Ogura, T. and Inaba, K. “The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation” *Structure*, in press (2017)