

永田 和宏

京都産業大学タンパク質動態研究所  
所長・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 (京都産業大学タンパク質動態研究所 所長・  
総合生命科学部 教授)
- ② 研究項目
  - ・ERdj5 の還元力の上流因子を探る
  - ・新規小胞体タンパク質 ERdj8 によるオートファジーの制御

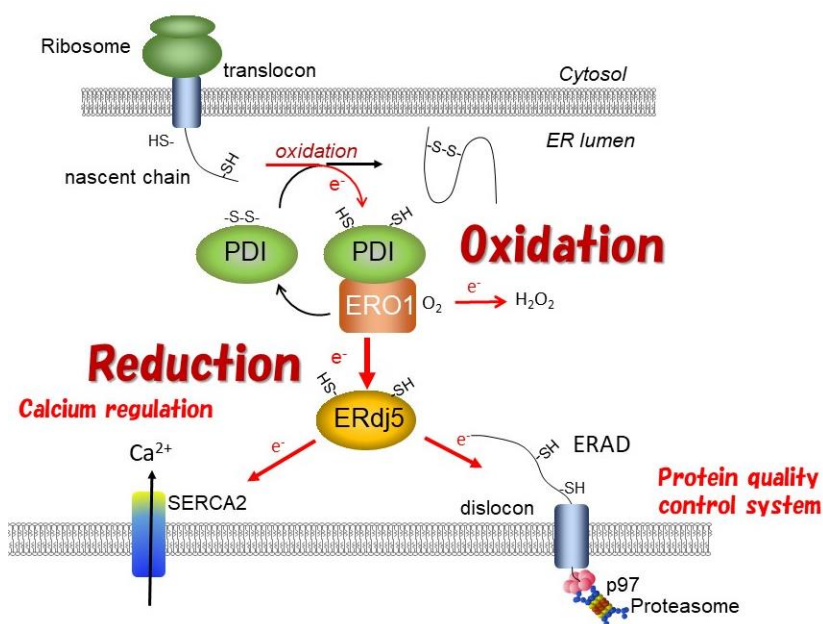
### (2)「稲葉」グループ

- 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 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 の還元力の上流因子を探る:** ERdj5 が SERCA2b を還元して、活性化し、Ca<sup>2+</sup>の小胞体への取り込みを促進することを明らかにしたが、小胞体という酸化的环境下で如何に還元力を得るのかは、この分子機構を探るうえできわめて重要な問題である。ERdj5 に結合する因子、および CXXC モチーフを介して酵素的に相互作用する因子の探索を、質量分析、免疫沈降などによって検討した。その結果、小胞体の代表的な酸化酵素である Ero1 が ERdj5 に還元力を与えているという予備的なデータを得た。電子伝達の経路として考えると、新生鎖から PDI に渡された電子は、Ero1 を通じて、通常は分子状酸素に渡されて過酸化水素を生成する。しかしながら、我々の得た結果からは、Ero1 から ERdj5 に直接電子を渡す経路が存在する可能性を強く示唆している。これは小胞体内の還元力が新生鎖のシステイン残基に由来することを示しており、極めて興味深い結果と考えられる。

右図のように、従来は新生鎖が酸化されてジスルフィド結合を形成する際に生じる電子は、PDI に渡され、それは Ero1 に伝達されたのち、Ero1 の分子内を経由して、分子状酸素へ渡るとするのが定説であった。このことから Ero1 は酸化酵素とみなされていたのであるが、我々が発見した新規の電子伝達経路によって、Ero1 は ERdj5 を還元することのできる還元酵素としての活性を持っていることが明らかとなった。



ここでさらに興味深いのは、従来小胞体における還元力は、サイトゾルから小胞体の膜を介して 1) 低分子還元物質が輸送される、あるいは、2) 膜タンパク質の分子内を電子が転移されることによってもたらされるという2つの可能性が考えられてきたが、それらとはまったく異なった新規な経路、すなわち新生鎖の酸化によって生じた電子を利用するという方法を提示したことになる。これはパラダイムシフトとも言うべき新知見である。

• **酸化型および還元型 SERCA2b の結晶構造解析:** 大量発現および精製に成功した野生型 SERCA2b について Lipid Cubic Phase (LCP) 法を用いて新たな結晶化を試み、還元型 SERCA2b について 3.45 Å 分解能、酸化型 SERCA2b について 3.20 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。それぞれについて分子置換法で位相を決定し、モデリングおよび

構造精密化を行い、AMPPCP 結合型の SERCA2b の結晶構造解析が完了した。その結果、SERCA2b の ATP 結合様式、カルシウム結合様式が示されるとともに、SERCA2b に特徴的な TM11 の位置及びその近傍の TM 領域との相互作用が明らかとなった。構造情報に基づく変異体解析の結果、TM11 が関わる複数の相互作用が SERCA2b の活性を制御していることを明らかにした。また界面活性剤のさらなる検討の結果、カルシウム非存在下において安定した SERCA2b の調製に成功した。調製した精製標品を用いて LCP 法によって微結晶ながら E2-P 及び E2-Tg の結晶を得ることができた。

・新規小胞体タンパク質 ERdj8 によるオートファジーの制御: ERdj8 は永田グループによって見出された新規小胞体膜タンパク質であるが、小胞体膜上のミトコンドリアとのコンタクトサイトに局在することからオートファジーに関連する因子ではないかと研究を進めた。その結果、ERdj8 をノックダウンするとオートファジーが活性化する、すなわち負の制御因子であることが明らかになった。特筆すべきは、ERdj8 ノックダウンによって1mm 以下の小さなオートファゴソームが増えること、逆に過剰発現させると、大きなオートファゴソームが増加することがわかった。これは ERdj8 がオートファゴソームのサイズの調節因子として働いていることを示唆している。

これまでオートファジーの負の制御因子としてルビコンなどが報告されているが、オートファゴソームのサイズの調節に関する因子の発見は初めてであり、ERdj8 の研究を進めることによって、なぜ通常の状態では1mm 程度の大きさのオートファゴソームが作られるのか、そのメカニズムに迫る研究が期待される。

・ERdj8 の大量発現精製系の確立と構造解析: 永田グループにより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、ヒト培養細胞を安定発現株の構築に成功し、発現誘導および界面活性剤の最適化を進めた。最適化の結果、1L 培養液から約 0.3mg の精製タンパク質が得られるようになり、すでに結晶化実験に取り組んでいる。また、クライオ電子顕微鏡による構造解析に向け、近日中に一般ユーザに公開予定の東大のクライオ電子顕微鏡装置の下見やオペレーターとの綿密な議論を行った。ERdj8 の小胞体ルーメンドメインについても、複数の異なる長さのコンストラクトを作製し、ヒト培養細胞を用いた発現系の構築に取り組んでいる。

代表的な原著論文:

S. Ito, K. Ogawa, K. Takeuchi, M. Takagi, M. Yoshida, T. Hirokawa, S. Hirayama, K. Shin-Ya, I. Shimada, T. Doi, N. Goshima, T. Natsume, K. Nagata :

A small-molecule compound inhibits a collagen-specific molecular chaperone and could represent a potential remedy for fibrosis

*J. Biol. Chem.* 292:20076-20085 (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*, 25, 846-857(2017)

Y. Kotani, D. Morito, K. Sakata, S. Ainuki, M. Sugihara, T. Hatta, SI Iemura, S. Takashima, T. Natsume and K. Nagata :

Alternative exon skipping biases substrate preference of the deubiquitylase USP15 for mysterin/RNF213, the moyamoya disease susceptibility factor.

*Scientific Reports* 7:44293 (2017)