

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「小胞体恒常性維持機構：Redox, Ca²⁺,
タンパク質品質管理のクロストーク」

研究終了報告書

研究期間 平成25年10月～平成31年3月

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)

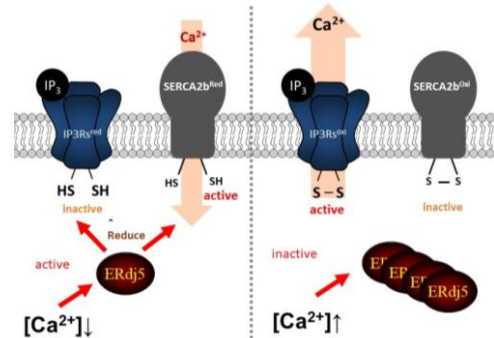
§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

小胞体は、分泌タンパク質、膜タンパク質合成の場であり、全タンパク質の実に三分の一は、小胞体において作られている。そのような重要な機能の維持制御のために、小胞体においてはタンパク質の品質管理機構のほかに、レドックス環境およびカルシウム濃度制御が重要な役割を持っている。永田グループは ERdj5 という新規レドックス因子を発見し、ERdj5 が小胞体におけるタンパク質の品質管理（特に小胞体関連分解による変性タンパク質の分解、ERAD）に関わっているだけでなく、還元酵素として小胞体のカルシウム恒常性維持に重要な働きをしていることを発見し、報告してきた。

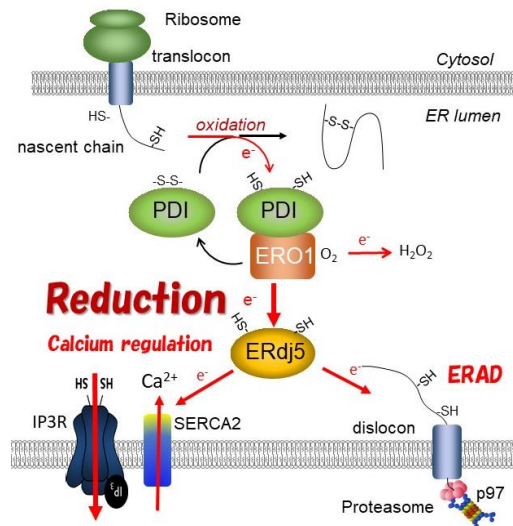
ERdj5 による ERAD および SERCA2b 活性化の分子機構を明らかにするために、稲葉グループを中心に ERdj5 および SERCA2b の構造解析をスタートした。X線結晶構造解析の結果、ERdj5 は従来解かれていた構造のほかに、もう一つ異なった構造が存在し、この二つの構造が動的平衡を保ちながら機能に関係していることを明らかにした。さらに SERCA2b について、カルシウムと ATP アナログが結合した状態で結晶構造解析が完了し、2019年3月に論文が受理された。

さらに永田グループでは ERdj5 が SERCA2b だけでなく、カルシウムチャネル IP3R の活性制御にもかかわっていることを明らかにした。IP3R は4量体を形成するがそのメカニズムについては不明であった。IP3R の小胞体内腔に存在する4つの Cys が4量体形成に必須であり、かつそのうちの2つがジスルフィド結合を形成することによって、活性制御が行われていることを明らかにした。ERdj5 はその還元活性によって、SERCA2b と IP3R を reciprocal かつ合目的的に制御している機構を明らかにしたことの意味は大きいと考えている。



ERdj5 のファミリータンパク質 ERdj8 がオートファジーの負の制御因子として働いていることを明らかにし、オートファゴソームの大きさの調節因子として働いていることを明らかにしたのも顕著な成果であった。ERdj8 によるオートファゴソームのサイズ調節については、現在論文改訂中であり、近く出版できるものと期待している。

もう一点、この期間の大きな、そして最大の成果と思っているものは、酸化的环境下にある小胞体に、いかにして還元力が提供されるか、その還元力(電子)の導入機構について、従来の概念を覆す、新たな経路を発見したことがあげられる。分泌タンパク質、膜タンパク質は翻訳と共役して小胞体内に導入されるが、このシステイン残基は酸化されてジスルフィド結合を作ることによってタンパク質の構造の安定化をはかる。この酸化によって、電子は PDI を介して、酸化酵素 Ero1 に受け渡される。この電子は最終的に酸素に受け渡されて過酸化水素を作るとされ、世界中でこの概念が定着している。永田グループでは、この電子が Ero1 から ERdj5 に受け渡されて、それが ERdj5 による還元力として利用される、すなわち小胞体への還元力導入の重要なソースは、新生ポリペプチドであるということ初めて明らかにした。現在、この発見については論文にしているところであり、トップジャーナルへの発表につなげたい。この Ero1 から ERdj5 への電子伝達については、稲葉グループによって解かれた、ERdj5 の2つの構造が極



めて重要な鍵となっており、本 CREST によって稲葉グループとの共同研究が可能となったからこそその成果である。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. ERdj5によるカルシウム恒常性調節機構の解明

概要: 哺乳動物細胞の小胞体における初めての還元酵素 ERdj5 を発見した。小胞体膜上のカルシウムポンプ SERCA2b、カルシウムチャネル IP3R はともに小胞体内腔の Cys 残基間のジスルフィド結合形成によって活性調節を受けることが知られていた。永田グループでは ERdj5 がその還元力によって、小胞体内 Ca イオン濃度が低い場合は SERCA2b を還元して Ca イオン流入を促進し、IP3R を還元することによってチャネルを閉鎖して Ca イオンの流出を抑えるという、極めて合目的な reciprocal regulation を司っていることを明らかにした。

2. SERCA2b の結晶構造解析による活性制御機構の解明

概要: 小胞体内のカルシウム恒常性維持において中心的役割を担うカルシウムポンプ SERCA2b のヒト培養細胞を用いた大量発現・精製系を確立し、E1-2Ca AMPPCP form と E2P form の二つの中間状態の結晶構造を解くことに成功した。これにより SERCA2b が特徴的に有する11番目の膜貫通ヘリックスによる活性制御機構について重要な構造的知見が得られた。さらに、E1-2Ca AMPPCP form については、酸化状態と還元状態の二つの状態について結晶構造を解くことに成功し、酸化還元による SERCA2b の活性制御機構についても分子構造レベルでの解明を進めた。

3. 小胞体に還元力を与える新規経路の発見とその生理的意味の解明

概要: 小胞体は酸化状態に維持されている。小胞体で還元酵素が働くためには、還元力を導入するメカニズムがなければならない。ERdj5 の上流因子を検索する方法によって、永田グループは、新生ポリペプチドが小胞体に入り、ジスルフィド結合を形成する際に放出される電子が、この還元力の源になっていることを、世界で初めて明らかにした。電子は新生鎖の Cys 残基から PDI に渡され、さらに Ero1 に転移される。電子は Ero1 の Cys ペアを移動した後、ERdj5 に受け渡され、これが ERdj5 の還元力として利用されていることを、生化学的、構造生物学的に明らかにした。小胞体への還元力の提供機構は、最後の難問として世界的な競争が行われてきた分野であるが、この成果は大きいものと考えている。

4. ERdj5 のファミリータンパク質 ERdj8 はオートファゴソームのサイズ調節を行う

概要: 永田グループでは、ERdj5 と同様、J ドメインとチオレドキシンドメインを持つ小胞体膜タンパク質 ERdj8 を発見した。ERdj8 はオートファジーを負に制御することを明らかにしたが、より重要なことは、ERdj8 はオートファゴソームのサイズを調節する初めての因子であることを見出したことである。ERdj8 をノックダウンすると小さなオートファゴソームが多く作られ、過剰発現すると数は少ないが大きなオートファゴソームが作られる。ノックダウンによって ERdj8 が少なくなると、ミトコンドリアのような大きな基質のオートファジーは起こらなくなる。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

該当なし

< 代表的な論文 >

1. 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 Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(41):E6055-E6063 (2016)
2. S. Hirayama, M. Sugihara, D. Morito, S. Iemura, T. Natsume, K. Nagata:

- Nuclear export of ubiquitinated proteins via the UBIN-POST system *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115(18):E4199-4208 (2018)
3. M. Sugihara, D. Morito, S. Ainuki, Y. Hirano, K. Ogino, A. Kitamura, H. Hirata & K. Nagata: The AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin cytoplasmic lipid droplets *J. Cell. Biol.* 218(3):949-960 (2019)
 4. Inoue, M., Sakuta, N., Watanabe, S., Zhang, Y., Yoshikaie, K., Tanaka, Y., Ushioda, R., Kato, Y., Takagi, J., Tsukazaki, T., Nagata, K. and Inaba, K.* “Structural basis of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b regulation via transmembrane helix interplay” *Cell Reports*, 23, 1221-1230 (2019)
 5. Okumura, M.##, Noi, K.#, Kanemura, M., Kinoshita, M., Saio, T., Inoue, Y., Hikima, T., Akiyama, S., Ogura, T.* and Inaba, K.* (#equal contribution) “Dynamic assembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative folding” *Nature Chemical Biol.* 15, 499-509 (2019)
 6. Watanabe S.#, Amagai Y.#, Sannino S.#, Tempio T., Anelli T., Harayama M., Masui S., Sorrentino I., Yamada M., Sitia R*, and Inaba K*. (#equal contribution) “Zinc regulates ERp44-dependent protein quality control in the early secretory pathway.” *Nature Communications*, 10, 603 (2019)

§ 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

① 永田グループ

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)

研究項目:小胞体恒常性維持機構の分子細胞生物学的分子基盤の解明

具体的研究項目として以下のものを挙げる

1-1) ERdj5 による SERCA2b の活性化機構に関する細胞生物学的解析

1-2) ERdj5 の還元力の上流因子を探る

1-5) 新たな還元酵素 ERp18 とそれによる過酸化水素の除去機構

3-1) polyQ による小胞体内レドックス環境の変化

3-2) 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

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)

研究項目:小胞体恒常性維持機構の構造基盤の確立

具体的研究項目として以下のものを挙げる

1-3) SERCA2b, SERCA2a の結晶構造解析と活性制御機構の解明

1-4) ERdj5 による SERCA2b の活性亢進メカニズムの解明

2-1) ジスルフィド還元酵素ERdj5の新たな構造と小胞体関連分解促進機構

2-2) EDEM1, EDEM3の結晶構造解析

3-3) ERdj8の構造生物学的研究

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

該当なし