

「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。EDEMは正しくフォールディングされたタンパク質とミスフォールドしたタンパク質を見分け、ミスフォールドしたタンパク質のみを分解系へ持って行くことも明らかにした。さらに、EDEMのホモログと考えられる新規タンパク質を2つクローニングし、現在その機能解析を行っている。

2) コラーゲン特異的分子シャペロンHSP47の機能解析を進めている。HSP47が認識するコラーゲン上のコンセンサス配列については明らかにし得たので、今後はHSP47上のコラーゲン結合部位の特定を行う。また、コンディショナルノックアウト法を導入して、組織特異的にHSP47の遺伝子破壊を行い、どの組織でHSP47を破壊すると、どのタイプのコラーゲンが影響を受けるかなどについて解析を行う。

#### 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、分子ダイナミクス制御のレベル

での品質管理の可能性が示唆されてきた。これらの機構について、特に単一分子レベルでの分子動態・相互作用解析法を用いて、その意味と機序を解明する。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て、その成熟化と品質管理の分子機構を解明するためのあらたなシステムを作り、細胞毒性を持つ分子種の小胞体からの排除機構と正しい分子種の選別機構の解明を進める。

## 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。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EDEMと相互作用することを明らかにした。基質として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、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、まずカルネキシんにトラップされ、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EDEM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。

2) EDEMの機能的ホモログを同定した。EDEMはII型膜タンパク質であり、その大部分を小胞体内腔に露出しているが、その他に、小胞体内腔に可溶性タンパク質として存在するEDEMホモログ、soluble EDEMを同定、クローニングした。solEDEMも同様にミスフォールドタンパク質の分解を促進し、それはMan8型糖鎖依存的であった。現在、EDEMとsolEDEMの作用機構の違い、組織分布の違いなどについて解析を進めている。さらに、EDEM3と命名した第3のホモログをクローニングした。EDEM3に関しては、それがERADに関わるものかどうか、機能に関する情報は得られていない。

3) コラーゲン特異的分子シャペロンHSP47による、小胞体内でのproductive foldingに関する研究では、HSP47がIV型コラーゲンの3本鎖形成に必須の役割を担っていることを明らかにした。HSP47を欠損したES細胞から作られるembryoid bodyにおける基底膜形成に異常が見られること、それはIV型コラーゲンの3本鎖形成異常、ならびに分泌の遅延、さらに分泌後の速やかな分解によることをあきらかにした。また個体を用いた研究では、HSP47ノックアウトマウスの胎児において、同様に基底膜形成に著しい異常が観察されること、基底膜様構造は出来ているにも関わらず、IV型コラーゲンのメッシュワークが形成されないために、発生途上に基底膜が断裂してしまうことを明らかにした。このような基底膜の形成異常によって、胎児はアポトーシスを起して死亡する。このアポトーシスの誘導には、IV型コラーゲンが小胞体内に蓄積してしまうことがシグナルになっていることをあきらかにした。

### 福島医大（和田）グループ

目的：小胞体内腔で成熟する蛋白質のproductive foldingとERADの為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. HepG2細胞におけるフィブリノーゲン6量体形成過程の解析により、前年度までにcovalentな3量体から6量体への変換が律速であり、その過程にp100と名付けた分子が関与することを示したが、さらなる解析を進め、PDI familyの中でERp57がこの変換を促進することを示した。また過剰に合成される $\alpha$ - $\gamma$ 鎖複合体は小胞体に安定に繫留され、これはカルネキシンサイクルに依存することがわかったが、 $\gamma$ 鎖が複合体を作らない場合には分解された。この過程について、COS7細胞に $\gamma$ 鎖を単独で発現して調べたところ、多くはプロテアソームで分解されるが、残ったものは小胞体外に輸送され、リソソームで分解された。なぜ凝集体を作らない $\alpha$ - $\gamma$ 鎖のダイマーが繫留され、凝集体を作る $\gamma$ 鎖が選択的に小胞体から輸送されるかについて、小胞体で処理できないterminal misfolding productを排除する輸送装置の可能性が考えられるので、今後、検討を進める。

B. 小胞体内にはterminal misfoldingを防ぐためにダイナミクスを変える機構が存在することを蛍光相関分光法(FCS)を使って小胞体内でのたんぱく質の動きを計測することで明らかにし、報告した(J Biol Chem 279(20): 21533-21542, 2004)。さらにFRAP(蛍光消光回復法)を用いた計測と組み合わせた実験により、小胞体内の動き自体を糖鎖を介して調節する機構が存在することを見いだした。

### 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・教授）
- ② 研究項目：品質管理機構解明のための、小胞体内腔でのたんぱく質のダイナミクス解析と共有結合再編機構を中心とした研究

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文発表

##### 京大再生研グループ（永田和宏）

- Dual-site recognition of different extracellular matrix components by anti-angiogenic / neurotrophic serpin, PEDF.

N. YASUI, T. MORI, D. MORITO, O. MATSUSHITA, H. KOURAI, K. NAGATA, T. KOIDE

*Biochemistry* **42**(11):3160-3167(2003)

- A. time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response.  
H. YOSHIDA, T. MATSUI, N. HOSOKAWA, R. J. KAUFMAN, K. NAGATA & K. MORI  
*Develop. Cell.* **4**(2):265-271(2003)
  - 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)
  - Prevalence of HSP47 antigen and autoantibodies to HSP47 in the sera of patients with mixed connective tissue disease.  
S. YOKOTA, H. KUBOTA, Y. MATSUOKA, M. NAITOH, D. HIRATA, S. MINOTA, H. TAKAHASHI, N. FUJII & K. NAGATA *Biochem Biophys Res Commun.* **303**:413-418(2003)
  - Enhancement of endoplasmic reticulum(ER) degradation of misfolded null Hong Kong  $\alpha_1$ -antitrypsin by human ER mannosidase I.  
N. HOSOKAWA, L. O. TREMBLAY, Z. YOU, A. HERSCOVICS, I, WADA & K. NAGATA  
*J. Biol. Chem.* **278**(28):26287-26294(2003)
  - Transcriptional regulation of the cytosolic chaperonin  $\theta$  subunit gene, Cctq, by Ets domain transcription factors Elk-1, Sap-1a, and net in the absence of serum response factor.  
Y. YAMAZAKI, H. KUBOTA, M. NOZAKI & K. NAGATA *J. Biol. Chem.* **278**(33):30642-30651 (2003)
  - HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development.  
K. NAGATA *Seminars in Cell and Developmental Biology* **14**:275-282 (2003)
  - The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in *Ins2<sup>+/Akita</sup>* pancreatic  $\beta$  cells.  
J. NOZAKI, H. KUBOTA, H. YOSHIDA, M. NAITOH, J. GOJO, T. YOSHINAGA, K. MORI, A. KOIZUMI & K. NAGATA *Genes Cells* **9**:261-270(2004)
- 福島医大 (和田) グループ
- Hosokawa, N., Tremblay, L. O., You, Z., Herscovics, A., Wada, I., Nagata, K. Enhancement of Endoplasmic Reticulum (ER) Degradation of Misfolded Null Hong Kong  $\alpha_1$ -Antitrypsin by Human ER Mannosidase I. *J. Biol. Chem.* **278**(28) 26287-26294, 2003
  - Takamura, A., Adachi, M., Wada, I., Mitaka, T., Takayama, S., Imai K. Accumulation of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulator BAG-1 on COPI-coated structures in gastric epithelial cells. *Int. J. Oncol.* **23**(5):1301-1308, 2003
  - Okiyoneda, T., Harada, K., Takeya, M., Yamahira, K., Wada, I., Shuto, T.,

Soten, M.A.S., Kai, H. F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol. Biol. Cell*, 15(2): 563-574, 2004

(2) 特許出願

なし