

「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)

「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、EDEM2 およびEDEM3と名付けたが、特にEDEM3について、現在その機能解析を行っている。また、EDEM1についてはノックアウトマウスを作成中である。

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。

3) 新たに動物細胞内のもっとも中核を担うと考えられている細胞質シャペロニンCCTに関する研究をCRESTのテーマとして加えた。CCTは8量体リング構造を持つ分子シャペロンであるが、その構造の複雑さ故に世界的にもほとんど研究が進んでいない。一方でMckusick-Kaufman症候群と呼ばれる遺伝病の原因遺伝子MKKSがCCTとホモロジーを持つことが明らかになったので、このMKKSがシャペロン様活性を持つのではないかと考え研究を進めている。病気を引き起こすMKKSの変異によって、このタンパク質が速やかに分解され

ることが明らかになりつつあり、本CRESTのテーマであるタンパク質の品質管理と病態との関連を探る上でも重要な知見を提供するものと期待している。

福島医大（和田）グループ

今年度は、異常分子の排除・抑制機構の解明、新たな研究手法の開発の一環として引き続き、(1)fibrinogenの6量体形成の分子機構、(2)小胞体内での単一分子動態測定、及び単一分子レベルでの分子間相互作用の検討、(3)カルネキシン・カルレティキュリンと結合するPDIファミリー、P5の機能解析、(4)p24ファミリーによるcargo分子の認識、(5)小胞体と融合したphagosomeにおける逆輸送機構の可能性について、研究を行った。その結果として、1分子動態解析によって小胞体内での分子の衝突を制御する機構の存在を示し、また巨大凝集体の排除のための機構の存在を示唆する結果を得た。さらに、小胞体内で成熟化する1分子のダイレクトな可視化にも成功し、新たな研究の可能性を示した。

2. 研究実施内容

京大再生研（永田）グループ

1) EDEMの機能的ホモログを同定し、それらをEDEM1, EDEM2, EDEM3と名付けた。EDEM1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EDEM2および3ホモログを同定、クローニングした。本年は特にEDEM3について解析を進めた。EDEM3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。しかしながら分解促進のメカニズムはEDEM1とEDEM3で異なっていることを明らかにした。即ち、EDEM1はマンノースの酵素活性を持たないのに対し、EDEM3はマンノースのトリミング活性を持ち、この酵素活性が分解促進活性に必須であることを明らかにした。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。（なお、昨年の実施報告でsolEDEMおよびEDEM3と仮に名前を付けていたものを、今回からはEDEM1, 2, 3で呼ぶことにし、昨年の報告書でEDEM3と呼んだものが、今回のEDEM2となった）

2) 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。これらの研究を2報の論文として発表した。さらに、HSP47のコンディショナルノックアウトによって組織特異的なHSP47の機能を明らかにすることと、HSP47の

構造機能相関を明らかにするため、X線結晶解析に取り組むとともに、HSP47上でのコラーゲン結合部位の特定を急いでいる。

3) 特異な遺伝病であるMckusick-Kaufman症候群の原因遺伝子として報告されたMKKS遺伝子は動物細胞の細胞質シャペロニンCCTと弱いホモロジーを持っている。MKKSがシャペロン機能を持っているかに興味を持ち研究を進めたところ、タンパク質の品質管理と本遺伝病の原因との間に予期しない密接な関係があることがわかってきた。すなわち、病気を引き起こすと報告されている変異のうち、特に重篤な病態をもたらす4つの変異を導入したMKKSタンパク質を動物細胞に発現させたところ、野生型のMKKSタンパク質に較べて、きわめて速やかに分解されてしまうことが明らかになり、MKKSタンパク質が分解されて、本来の機能を発揮できないために病気が引き起こされるのであること、MKKSタンパク質の品質管理機構による分解促進が病気の原因になっていることが明らかになった。現在、このMKKSタンパク質の細胞内における本来の機能を明らかにするための研究を進めている。

福島医大（和田）グループ

1) fibrinogen生合成の生化学的な解析により、misfoldingによりTritonX-100に不溶性の巨大な凝集体を作ったものは細胞質に逆向輸送されることなく、小胞体から輸送されてリソソームによる分解を受けることを示した。この過程はSar1依存的な輸送であり、小胞体でのEDEMを介した逆輸送ができない場合には何らかの受容体を介して小胞体から積極的に顆粒輸送により排出するという、これまで記述されたことのない新たな分子機構が存在することが示唆された。

2) foldabilityを維持する機構の解明のため、tyrosinaseのconditionalなfoldingを利用して、分子の動きについて蛍光消光回復法(FRAP)を用いて調べるとterminal misfoldingしていない場合はimmobileな集団が増大するが、foldabilityを保ちつつmisfoldした場合の拡散速度はfoldした場合とほとんど同程度であった。しかし、蛍光相関分光法(FCS)を用いた解析する事で、小胞体にはfoldabilityを維持するために、単純拡散を押さえ遅い輸送だけは許容する、というmobilityのレベルでの機構があると、結論した。

次に実際に1分子を直接見ることで、その制御を知ることが可能かどうか、検討を行った。全反射蛍光顕微鏡を用いると反射面からエバネッセント光の浸みだしが起こり、200nm以内にあるものが高輝度にハイライトされるので、細胞表面の分子は、これを利用して単一分子の可視化が可能となっている。小胞体は細胞膜極近傍にも存在するので、この手法を用いて、小胞体内での分子の可視化が行える可能性がある。そこで、全反射顕微鏡を用いて、高速度撮影を行う事で、小胞体内構造への拘束が起きるものについては、単一分子の可視化が可能であることを示した。さらに研究を進めて、小胞体には糖鎖に結合して分子の衝突を調節する、調節性の受容体が存在することも明らかにした。

3) カルレティキュリンに対してPDIファミリーの一つP5が親和性を示すので、その結合が生理的に意味があるのかどうかについて検討を行ったが、明確な結論は得られていない。

4) p24ファミリーの遺伝子ノックダウンの実験により、ヒト培養細胞において特定の蛋白質の小胞体からの輸送が起きなくなることを見いだした。それがfoldingとどのように関

連するののかについて、現在も検討を進めている。

5) phagocytosisの際の小胞体の関与について特定のSNAREが必要とされることを示し、特殊な中間体構造が形成されることを見いだしたが、その逆輸送との関連については現在検討中。

3. 研究実施体制

京大再生研（永田）グループ

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）

研究項目：1) EDEMおよびEDEMファミリータンパク質による小胞体品質管理機構、2) HSP47による小胞体におけるproductive foldingの機構、3) CCTおよびMKKSタンパク質によるproductive foldingの機構と本タンパク質の品質管理と病態の関係。

福島医大（和田）グループ

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）

研究項目：(1) fibrinogenの6量体形成の分子機構、(2) 小胞体内での単一分子動態測定、及び単一分子レベルでの分子間相互作用の検討、(3) カルネキシン・カルレティキュリンと結合するPDIファミリー、P5の機能解析、(4) p24ファミリーによるcargo分子の認識、(5) 小胞体と融合したphagosomeにおける逆輸送機構の可能性

4. 主な研究成果の発表

京大再生研（永田）グループ

(1) 論文（原著論文）発表

- F. KANO, H. KONDO, A. YAMAMOTO, AR. TANAKA, N. HOSOKAWA, K. NAGATA, & M. MURATA.
The maintenance of the endoplasmic reticulum network is regulated by p47, a cofactor of p97, through phosphorylation by cdc2 kinase.
Genes Cells. **10**(4):333-44(2005)
- J. NOZAKI, H. KUBOTA, H. YOSHIDA, M. NAITOH, J. GOJO, T. YOSHINAGA, K. MORI, A. KOIZUMI & K. NAGATA
The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in *Ins2^{+/Akita}* pancreatic β cells
Genes Cells **9**:261-270(2004)
- S. OHASHI, H. ABE, T. TAKAHASHI, Y. YAMAMOTO, M. TAKEUCHI, H. ARAI, K. NAGATA, T. KITA, H. OKAMOTO, H. YAMAMOTO, T. DOI
Advanced glycation end products increase collagen-specific chaperone protein in mouse diabetic nephropathy. *J. Biol. Chem.* **279**(19):19816-19823(2004)

- M. YAMASHITA, K. HIRAYOSHI & K. NAGATA
 Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of stress protein HSP70 in vertebrates.
Gene **336**:207-218(2004)
- Y. MATSUOKA, H. KUBOTA, E. ADACHI, N. NAGAI, T. MARUTANI, N. HOSOKAWA & K. NAGATA
 Insufficient folding of type IV collagen and formation of abnormal basement membrane-like structure in embryoid bodies derived from HSP47-null ES cells.
Mol. Biol. Cell. **15**:4467-4475(2004)
- T. MARUTANI, A. YAMAMOTO, N. NAGAI, H. KUBOTA & K. NAGATA
 Accumulation of type IV collagen in dilated endoplasmic reticulum leads to apoptosis *HSP47*-knockout mouse embryos through the induction of CHOP.
J. Cell. Sci. **117**:5913-5922(2004)
- S. J. MARCINIAK, C. Y. YUN, S. OYADOMARI, I. NOVOA, Y. ZHANG, R. JUNGREIS, K. NAGATA, H. P. HARDING & D. RON
 CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Develop.* **18**(24):3066-3077(2004)

福島医大(和田)グループ

(1) 論文(原著論文)発表

- Direct detection of caspase-3 activation in single live cells by cross-correlation analysis. Saito K, Wada I, Tamura M, Kinjo M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324(2), 849-854, 2004
- Regulation of immature protein dynamics in the endoplasmic reticulum. Kamada A, Nagaya H, Tamura T, Kinjo M, Jin H-Y, Yamashita T, Jimbow K, Kanoh H, Wada I. *J. Biol. Chem.* 279(20), 21533-21542, 2004