

「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 および EDEM2, EDEM3 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。同様の活性は EDEM2 および EDEM3 にも認められたが、特に EDEM3 は小胞体においてマンノースのトリミングに関わるマンノシダーゼ活性をもち、その酵素活性が ERAD に必須であることを明らかにした。また、EDEM1 についてはノックアウトマウスの作成に成功し、目下その表現型を解析中である。

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、HSP47 上のコラーゲン結合部位の特定、HSP47 の結晶構造解析のための結晶作りを行っているところである。また、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ため、コンディショナルノックアウト法を導入し、ES細胞を既に得ている。キメラマウスを得る実験にとりかかっているが、今後は組織特異的に HSP47 の遺伝子破壊を行う予定である。

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った。また神経変性疾患などポリグルタミン病の原因となるポリグルタミンを含んだタンパク質の凝集が、CCT によって抑制されるという結果を得、既に論文を投稿中である。

福島医科大(和田)グループ

小胞体での品質管理機構の解明における分子動態を中心とした新たな側面と技法の開発を行ってきた。前年度に引き続き、分泌系で機能するたんぱく質に関してこれまでのモデルでは説明できない現象、特にダイナミクスが関与する非生産的たんぱく質の抑制・排除機構に焦点を当てて解析を行うと同時に新たな手法を検討し、加えて網羅的な発現抑制によるスクリーニングを行って成熟化に関与するいくつかの新たな分子装置を明らかにした。

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EDEM3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。またEDEMがタンパク質の多量体化を抑えることによって分解へ導く、いわゆるシャペロン活性を持っていることも明らかにし、さらにEDEMのノックアウトマウスの作成にも成功した。ERADという観点からは、その他に、小胞体膜上のユビキチン化酵素(E3酵素) gp78がERADに関与すること、小胞体膜上のトランスロコンに結合するTRAP(translocon associated protein)複合体の4つのサブユニットがすべて小胞体ストレスによって誘導され、しかもERADに関わることを明らかにした。

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。特に今年度は、HSP47ノックアウト細胞においては、分泌されたコラーゲンの繊維形成に著しい異常が見られることを明らかにし、コラーゲンNプロペプチドのプロセッシングにも異常をきたすことによって、細胞外で太いコラーゲン繊維を形成できないことを明らかにした。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想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。この分解はCHIPというE3酵素を介したユビキチン化によって行われていること、MKKSタンパク質に変異が起こると、分解されるか、さもなくば凝集してしまい、いずれの場合もおそらくloss of functionによって病気を引き起こすことが明らかになった。

福島医科大(和田)グループ

1) misfold した巨大凝集体の小胞体からの排除機構の解明

fibrinogen サブユニットを単独で COS7 細胞に発現した場合に形成される凝集体の小胞体からの排除過程をモデルとして解析を行い、Vps10 ドメインを持つ膜タンパク sortilin が、少なくともそれらの排除機構の一部であり、受容体として機能していることを、発現抑制などにより示した。同時にこれら異常な構造体の輸送が misfold する分子の繫留装置の解除による可能性は低いという結論を得た。

2) 小胞体内腔における 1 分子ダイナミクス解析

小胞体が細胞膜のごく近傍にも存在することを利用して、evanescence 照明により N 型糖鎖を 2 個以上持つ場合には 1 分子観察が可能なことを見出し、これは immobile な構造体に拘束された分子に限定され、immobile な分子に対する蛍光相関分光法(FCS)の解析とあわせて N 型糖鎖を介する受容体が存在する事が示された。分泌蛋白の 9 割以上には N 型糖鎖が結合しているので、分子の動きに強い制約を与えることで terminal misfolding を防いでいる可能性が考えられる。実際にこの構造の形成阻害では terminal misfold した蛋白の凝集性を起こすことが示された。この受容体検索は下記 4 を用いて進行中。さらに FCS を用いた misfold した蛋白の逆輸送の real time imaging が可能なことを示した。

3) 新規小胞体 SNARE の機能解明

シグナルトラップにより単離された新規 ER tSNARE である D12 は、発現抑制や過剰発現

で調べると小胞体ーゴルジ間の輸送には影響をほとんど与えないが、その発現抑制は、急速なアポトーシスを引き起す。これらの現象に先立って、顕著なりポフスチンの形成が起きることに着目して解析を行うとリソソーム分解酵素の正しいターゲッティングが行われていないことを報告した。

4) 網羅的発現抑制によるカーゴタンパク成熟化に関与する因子の探索

小胞体を構成する成分のうち、トランスロケーション等の局在に必須なタンパクと明確にカーゴタンパク質成熟化には無関係なタンパクを除いた約300個の小胞体蛋白をターゲットとする siRNA ライブラリを作成し、先に報告した tyrosinase の成熟化の特性を利用して、この成熟化に必要な因子の検索を行った。これまでのところ、既に関与が証明されているカルネキシンサイクル、PDI ファミリー及び ERAD 系の因子を除いて分子動態制御が関係すると思われる新規因子として3個の因子が同定され、機能を解析した。

3. 研究実施体制

京大再生研（永田）「分子シャペロン」グループ

①研究分担グループ長：永田 和宏（京大再生研、教授）

②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

福島医科大（和田）「分子動態」グループ

①研究分担グループ長：和田 郁夫（福島医大、教授）

②研究項目：

- 1.凝集体の小胞体からの排除機構の解明
- 2.小胞体内における1分子ダイナミクス解析
- 3.SNARE による分泌系初期過程での品質管理
- 4.網羅的発現抑制による新規分子の探索

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

京大再生研(永田)グループ

- 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):333-344(2005)

- M.NAITOH, H.KUBOTA, M.IKEDA, T.TANAKA, H.SIRANE, S.SUZUKI & K.NAGATA Gene expression in human keloids is altered from dermal to chondrocytic and osteogenic lineage. *Genes Cells*. **10**(11):1081–1091(2005)
- T.YOSHINAGA, K.NAKATOME, J.NOZAKI, M.NAITOH, J.HOSEKI, H.KUBOTA, K.NAGATA & A.KOIZUMI Proinsulin lacking the A7–B7 disulfide bond, *Ins2 Akita*, tends to aggregate due to the exposed hydrophobic surface. *Biol. Chem.* **386**(11):1077–1085(2005)
- F.KANO, H.KONDO, A.YAMAMOTO, Y.KANEKO, K.UCHIYAMA, N.HOSOKAWA, K.NAGATA & M.MURATA NSF/SNAPs and p97/p47/VCIP135 are sequentially required for cell cycle-dependent reformation of the ER network. *Genes Cells*. **10**(10):989–999(2005)
- Y.ODA, T.OKADA, H. YOSHIDA, R.J.KAUFMAN, K.NAGATA & K.MORI Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J. Cell. Biol.* **172**(3):383–393(2006)
- K.HIRAI, S.KIKUCHI, A.KURITA, S.OHASHI, E.ADACHI, Y.MATSUOKA, K.NAGATA & M.WATANABE Immunohistochemical distribution of heat shock protein 47 (HSP47) in scirrhous carcinoma of the stomach *Anticancer Research* **26**:71–78(2006)
- T.KOIDE, S.ASADA, Y.TAKAHARA, Y.NISHIKAWA, K.NAGATA & K.KITAGAWA Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. Minimal structural requirement and spatial molecular orientation. *J. Biol. Chem.* in press
- K.HIRAO, Y.NATSUKA, T.TAMURA, I.WADA, D.MORITO, S.NATSUKA, P.ROMERO, B.SLENO, L.O.TREMBLAY, A.HERSCOVICS, K.NAGATA & N.HOSOKAWA EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein ERAD and mannose trimming. *J. Biol. Chem.* in press
- N.HOSOKAWA, I.WADA, Y.NATSUKA & K.NAGATA EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded $\alpha 1$ -antitrypsin has been accepted for publication. *Genes Cells*. in press
- T.KOIDE, Y.NISHIKAWA, S.ASADA, C.M.YAMAZAKI, Y.TAKAHARA, D.L.HOMMA, A.OTAKA, N.WAKAMIYA, K.NAGATA & K.KITAGAWA Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J. Biol. Chem.* in press
- Y. ISHIDA, H. KUBOTA, A.YAMAMOTO, A. KITAMURA, H.P.BACHINGER & K. NAGATA Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in ER and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis *Mol. Biol. Cell.* in press

福島医科大(和田)グループ

- A. J. Okumura, K. Hatsuzawa, T. Tamura, H. Nagaya, K. Saeki, F. Okumura, K. Nagao, M. Nishikawa, A. Yoshimura, I. Wada. Involvement of a novel Q-SNARE, D12, in quality

- control of endomembrane system. *J. Biol. Chem.* 281(7), 4495–4506, 2006
- M. K. Homma, I. Wada, T. Suzuki, J. Yamaki, E. G. Krebs, Y. Homma
CK2 phosphorylation of translation initiation factor eIF5 potentiates cell cycle progression.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102(43), 15688–15693, 2005
 - Y. Liu, Y. Endo, D. Iwaki, M. Nakata, M. Matsushita, I. Wada, K. Inoue, M. Munakata, T.
Fujita Human M-Ficolin Is a Secretory Protein That Activates the Lectin Complement
Pathway. *J. Immunol.*, 175(5):3150–3156, 2005.

(2) 特許出願 (国内出願件数のみ研究年報に掲載し公開)

H17 年度出願件数：1 件 (CREST 研究期間累積件数：1 件)