

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 小胞体におけるタンパク質の品質管理機構

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

永田 和宏 (京都大学再生医科学研究所 教授)

主たる共同研究者

和田 郁夫 (福島県立医科大学附属生体情報伝達研究所 教授)(平成13年12月～)

森 和俊 (京都大学大学院生命科学研究所 助教授)(平成14年1月～15年9月)

3. 研究内容及び成果:

本研究課題「小胞体におけるタンパク質の品質管理機構」においては、主として次のような5つの研究課題について研究を行い、成果を得た。

1. EDEM および ERAD 関連因子による小胞体内品質管理機構の研究(永田G)
2. HSP47 によるコラーゲン分子成熟過程の研究(永田G)
3. シャペロン CCT による productive folding とポリグルタミンタンパク質凝集阻止の研究(永田G)
4. 小胞体におけるカーゴタンパク質の成熟化とダイナミクスの研究(和田 G)

1. EDEM および ERAD 関連因子による小胞体内品質管理機構の研究

EDEM はミスフォールドしたタンパク質の品質管理に関わる因子として永田らが 2001 年に報告した新規分子である。ミスフォールドタンパク質の糖鎖を認識して、小胞体関連分解(ERAD)に回すレクチン様 ERAD 因子である。当該研究期間中に、まず EDEM が小胞体ストレス誘導機構のうち、XBP1-IRE1 経路によって誘導される初めての因子であることを共同研究者の森和俊らと共同で報告した(*Develop. Cell*, 2003)。次に、EDEM が小胞体分子シャペロン・カルネキシンと相互作用し、基質をカルネキシンから受け取ってディスロコンチャネルに回すことを明らかにした(*Science*, 2003)。さらに EDEM は我々が初めて見つけたものの他に、2種存在し、それらがファミリーを形成していることを明らかにした(*J. Biol. Chem.*, 2006)。特に EDEM2 は EDEM と異なり、マンノーストリミング活性をもち、その活性が ERAD 促進に必須であって、EDEM1 とは機能が異なることを示した。また EDEM がディスロコンチャネルの候補と報告されている Derlin2 および 3 と結合し、共に XBP1-IRE1 経路で誘導される Derlin2/3 とともに ERAD 複合体を形成していることを示した(*J. Cell Biol.* 2006)。

ERAD 関連因子としてトランスロコン会合複合体(TRAP)も同様に XBP1 経路によって誘導され、ERAD に関与していることを示し(*EMBO Rep.*, 再投稿中)、また ERAD における基質のユビキチン化に関しても、gp78 と呼ばれる酵母 Hrd1 ホモログがユビキチンの延長因子(E4 酵素)として働いている可能性を示した(投稿中)。

EDEM と相互作用する分子として ERdj5 を同定したのは、最近のもっとも大きな成果と考えられる。ERdj5 は CXXC モチーフを4つ持ち、かつ N 末端に Jドメインを持つ分子である。種々の実験の結果、ERdj5 は小胞体において還元活性をもつ初めての分子であり、その還元活性が ERAD において基質の SS 結合を開裂させることによって基質がディスロコンチャネルを通るのを可能にすること、ERdj5 は小胞体分子シャペロン BiP と結合して、ミスフォールドした基質のみを EDEM に受け渡すことをあきらかにした(投稿準備中)。

2. HSP47 によるコラーゲン分子成熟過程の研究

HSP47 はコラーゲン特異的分子シャペロンとして永田らが 1986 年に報告した分子である。HSP47 のノックアウトマウスは胎生致死になるが、胎児細胞中にプロコラーゲンが蓄積し、小胞体ストレスを引き起こすことにより、

アポトーシスを起こしていること(*J. Cell Sci.*, 2004)、胎児より得た hsp47^{-/-}細胞ではコラーゲン3本鎖形成に異常が起き(*Mol. Biol. Cell*, 2004)、分泌されたコラーゲンはコラーゲン繊維を形成できないこと(*Mol. Biol. Cell*, 2006)などを明らかにした。HSP47 が認識するコラーゲン上のアミノ酸配列についても成果があがり、HSP47 はコラーゲン3本鎖上の4つのアミノ酸を認識していることを明らかにした(*J. Biol. Chem.*2006)。

3. シャペロニン CCT によるポリグルタミンタンパク質凝集阻止の研究

CCT の基質認識に関して CCT が基質の β シート上の疎水性アミノ酸を特異的に認識していること (fXfXfX モチーフ) を、in vitro 翻訳系 (PURE system) を用いて明らかにし (*PNAS*, 2006)、かつ CCT がポリグルタミンタンパク質の凝集を阻止して、神経細胞死から細胞を保護していることを明らかにした (*Nature Cell Biol.*, 2006)。

4. 小胞体におけるカーゴタンパク質の成熟化とダイナミクスの研究

小胞体における基質タンパク質の productive folding のモデル基質としてフィブリンノーゲンを用いた。従来の報告と異なり、a, b, g の3量体形成以後の会合過程、すなわち6量体形成の過程が律速となり、それには ERp57 というジスルフィド結合異性化酵素が重要であることを明らかにした (投稿中)。また小胞体内における分子のダイナミズムを追跡するため、基質としてフォールディングの同調可能なチロシナーゼを採用し、蛍光相関分光法 (FCS) を in vivo に適用できるシステムを構築した。その解析からミスフォールドを解消したチロシナーゼは COPII コートで覆われる小胞体内のマイクロドメインからゴルジ体に輸送されることを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 2004)。さらに、生きた細胞内において、1分子のダイナミクスを追う手段としてエバネッセント場における FCS システムを構築した。

4. 事後評価結果:

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表: 国内0件、海外47件。口頭発表(ポスター発表を含む): 国内71件、海外28件。招待講演: 国内58件、海外23件。特許: 国内1件、海外0件

情報発信は十分に行われている。

特筆すべき発表論文:

• Oda, Y. et al. 2003 *Science* 299:1394-1397. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. 基質がカルネキシンで folding を受けた後、ミスフォールドしたものだけがカルネキシンから EDEM へ転移されるという経路を明らかにした点で意義が深く、*Science*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* など多くの雑誌でトピックとして取り上げられた。(引用回数 127 回)

• Yoshida, H. et al. 2003 *Develop. Cell* 4:265-271. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. 小胞体ストレス誘導機構 (UPR) のうち、EDEM が XBP1-IRE1 経路によって誘導される初めての ERAD 因子であることを報告し、多くの報告の先鞭をつける研究となった。(引用回数 129 回)

• Ishida Y. et al. 2006 *Mol. Biol. Cell* 17:2346-2355. Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in ER and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. HSP47 が無いと、プロコラーゲンは小胞体内で蓄積し、N-propeptide のプロセッシングに異常を生じ、N-propeptide の付いたままのフィラメントを分泌することによって、コラーゲン繊維束の形成に異常を生じることを明らかにした。

• Kubota S. et al. 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:8360-8365. Cytosolic chaperonin protects folding intermediates of Gb from aggregation by recognizing hydrophobic beta-strands. CCT の基質認識機構を明らかにし、基質上の認識配列を同定した。

• Kitamura A. et al. 2006 *Nature Cell Biol.* 8:1163-1169. Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. CCT がポリグルタミンタンパク質の凝集を防ぎ、神経細胞死の防御に働いていることを明らかにした。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

特に ERdj5 の発見は、EDEM と共同する因子というだけでなく、未知の部分が多い小胞体レドックス制御が品質管理に密接に関わることを示した点で意義が大きい。神経変性疾患の治療戦略を考える上で大きな波及効果を持つ。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

受賞: 永田和宏 京都新聞大賞・文化学術賞