

分子細胞生物学研究室 Laboratory of Molecular and Cellular Biology

教授 永田 和宏 Prof. Kazuhiro Nagata, Ph.D

助教 潮田 亮 Assist. Prof. Ryo Ushioda, Ph.D

1. 研究概要

分子細胞生物学研究室では、「タンパク質の一生」を大きな研究の枠として設定し、タンパク質の誕生から死までのメカニズムを中心に、中でも、特に「分子シャペロンによるフォールディングと細胞機能制御」および「タンパク質品質管理機構」に焦点をあてて研究を進めている。

タンパク質は正しく合成され、正しい構造をとって初めて本来の機能を発揮するが、それには種々の分子シャペロンが重要な働きをしている。またいったん正しい機能を獲得したタンパク質も、細胞に不断にかかる種々のストレスによって変性したり、遺伝的変異によってどうしても正しい構造をとれないタンパク質も存在する。このようないわゆる不良タンパク質は、単に機能を持たないだけでなく、細胞毒性によって細胞死を誘導し、アルツハイマー病やパーキンソン病のような種々の神経変性疾患の原因ともなっている。従って、「タンパク質を正しく合成する productive folding」と、「ミスフォールドしたタンパク質を適正に処理するための品質管理機構」ともどもに研究することは、「タンパク質動態の恒常性」、「細胞レベルでの生命システムの恒常性の維持」という観点からは、必須の研究領域である。

本研究室では、上記のコンセプトに従って、以下の4つの主要なプロジェクトについて研究を進めている。いずれも、この一年でこれまで想定していなかった、インパクトの高い興味深い知見が得られた。

1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

コラーゲン合成においてコラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 は必須の役割を果たしている。Hsp47 はまた線維化疾患の増悪にも関与しており、この観点からは線維化組織での Hsp47 の阻害が重要である。Hsp47 阻害剤の探索を行い、得られた Hsp47 阻害化合物の一部について論文を発表し、新たなスクリーニング系の開発も同時に進め、より阻害効果の高い阻害化合物を探索している。このプロジェクトは製薬会社との共同研究に発展し、日本医療研究開発機構 (AMED) 産学連携医療イノベーション創出プログラム (ACT-MS) に採択された。

2) 小胞体におけるタンパク質品質管理、レドックス制御、カルシウム恒常性のクロストーク：小胞体恒常性維持の解明

小胞体でミスフォールドしたタンパク質はサイトゾルへ逆輸送されてからユビキチンプロテアソーム系によって分解される (ERAD)。この過程で ERdj5 という還元酵素が重要な役割を果たしていることをすでに報告したが、新たに、この ERdj5 がカルシウムポンプの活性を制御することによって、小胞体内のカルシウム恒常性維持を担っていることを発見した。レドックス制御を介したタンパク質品質管理とカルシウム恒常性のクロストークに注目している。

3) 新規小胞体膜因子によるオートファゴソームの大きさの制御機構の解明

オートファジーは細胞内のタンパク質やオルガネラそのものを分解処理する機構である。近年我々は、新規オートファジーの制御タンパク質である ERdj8 を発見した。本年一年間でこの ERdj8 の役割に関する研究が著しく進展し、ERdj8 がオートファゴソームの大きさを調節すること、そのことによって大きな分解基質の包み込みに必須であることを明らかにすることができた。本プロジェクトを推進してきた博士研究員山本洋平は、大阪大学歯学部助教として赴任することになった。

4) モヤモヤ病感受性遺伝子ミスチリンの機能解析

モヤモヤ病は日本人に多い脳血管疾患であり、一部に民族性・家族性の発症を認める。我々はモヤモヤ病の確実な遺伝因子として新規の巨大遺伝子ミスチリンをクローニングした (PLOS ONE, 2011)。これまで、ミスチリンタンパク質が AAA+ ATPアーゼ活性およびユビキチン化活性を示すことや、ゼブラフィッシュの血管・筋肉・神経発生に重要であること、USP15による正の制御を受けることなどを明らかにしてきたが (Sci Rep 2014, 2015, 2017)、最近ついに、ミスチリンの細胞内機能の同定に成功し、さらに解析を進めている (submitted)。

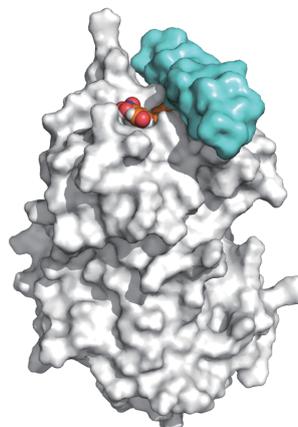
2. 本年度の研究成果

1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

Hsp47 は我々が発見し、長年研究を続けてきたタンパク質であるが、これまでの Hsp47 の研究を総説として発表した (S.Ito, K.Nagata *Semin Cell Dev Biol.* 2017)。Hsp47 は線維化疾患の増悪因子ともなり、有望な分子標的とされてきた。Hsp47 阻害剤の探索を行い、得られた Hsp47 阻害化合物の一部について論文を発表した(S.Ito et al, *J Biol Chem.* 2017)。新たなスクリーニング系の開発も同時に進め、より阻害効果の高い阻害化合物を探索している。このプロジェクトは製薬会社との共同研究に発展し、日本医療研究開発機構 (AMED) 産学連携医療イノベーション創出プログラムに採択され、臨床応用に向け精力的に研究が進められている。

蛍光相関分光法(FCS)を用いてコラーゲン添加時の蛍光ラベルした Hsp47 の拡散速度の変化から相互作用を解析でき、その相互作用は pH6.6 から 6.3 にかけて徐々に失われ、再度 pH7.3 に戻ると回復することが分かった。同一分子の pH 依存的なコラーゲンとの相互作用の回復を観察できたのは始めてである (Kitamura A et al, *BBRC* 2018)。

Unfold protein response(UPR)は小胞体に正しくフォールディングできていないタンパク質が存在する際の小胞体の恒常性を維持する応答である。小胞体膜タンパク質 IRE1 は UPR 時に活性化し、転写因子 XBP1 のスプライシングを通して、応答シグナルをサイトゾルへと伝達している。今回、分子シャペロン Hsp47 が Bip と競合し、IRE1 の活性化を調整していることが共同研究により明らかになった (Sepulveda D et al, *Mol Cell.* 2018)。この論文は雑誌の表紙を飾った (文責：伊藤)。

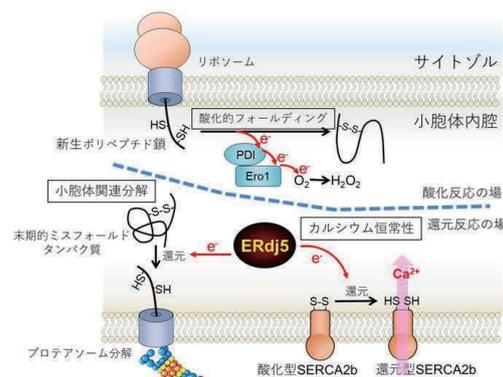


Hsp47(白)とコラーゲン(青)の相互作用を低分子化合物(黄)が阻害する。

2) 小胞体におけるタンパク質品質管理、レドックス制御、カルシウム恒常性のクロストーク：小胞体恒常性維持の解明

細胞内小器官の一つである小胞体では、タンパク質品質管理・レドックス制御・カルシウムホメオスタシスという三つの環境要因が影響を及ぼしあい、恒常性を維持している。我々は小胞体でジスルフィド還元活性に特化した還元酵素 ERdj5 を発見し、ERdj5 が小胞体のレクチンタンパク質 EDEM および分子シャペロン BiP と複合体を形成することを見出した。ERdj5 は小胞体で末期的にミスフォールドした分解基質のジスルフィド結合を自身の還元活性で切断し、小胞体からサイトゾルへの排出を促進し、タンパク質品質管理において重要な役割を果たしていることを見出した (R. Ushioda *et al.*, *Science* 2008; M. Hagiwara *et al.* *Mol.Cell* 2011; R. Ushioda *et al.* *Mol.Biol.Cell* 2013)。

さらに ERdj5 が小胞体膜上に存在するカルシウムポンプ SERCA2 のジスルフィド結合を自身の還元活性で開裂し、複合体を形成することで小胞体へのカルシウム流入を調節し、小胞体のカルシウム動態に影響を与えていることが明らかになった。さらに ERdj5 は小胞体内腔のカルシウム濃度を感受し、SERCA2 との複合体形成を調節していることを明らかにした (R. Ushioda *et al.*, *PNAS* 2016)。また、ERdj5 の還元メカニズムを解明するため ERdj5 の結合タンパク質の同定を行い、候補分子の同定に成功した。新たな因子を介し、これまで明らかにされてこなかった小胞体内腔の還元力導入機構について解明を進めている (文責：潮田)。



これまで、小胞体はEro1-PDIを中心とした酸化反応の場として捉えられていたが、還元酵素ERdj5の発見により、ジスルフィド還元反応が「タンパク質品質管理」、「カルシウム制御」を含む小胞体恒常性にとって非常に重要であるということが明らかになった。

3) 新規小胞体膜因子によるオートファゴソームの大きさの制御機構の解明

オートファジーは細胞内の大規模分解系の一つであり、恒常的に細胞内に生じる不良タンパク質や細胞小器官のクリアランスに大きく寄与している。近年、オートファジー分解に必要な膜成分が小胞体とミトコンドリアのコンタクトサイト (MAM) から生じることが報告され、MAM がオートファジーにおいて重要な役割を持つことが明らかになってきた。これまでに我々は小胞体膜に局在する新規タンパク質である ERdj8 をクローニングし、さらにそれが MAM に局在している結果を得ていた。さらに詳細な解析を行ったところ ERdj8 はオートファゴソームの大きさを制御することが見出された。すなわち初めてのオートファゴソームのサイズを制御する因子である。現在これまでの結果をまとめ論文投稿中である。今後、この ERdj8 のさらなる機能解析を行うことで、オートファジーの制御における新たな小胞体の概念を提案していきたい (文責: 山本)。

4) モヤモヤ病感受性遺伝子ミスチリンの機能解析

ミスチリンの酵素活性、ゼブラフィッシュ初期発生における重要性等は明らかになったが、一方でミスチリンが細胞内でどのような機能を持つタンパク質なのか明らかでなかった。このポイントを明らかにするため、ミスチリンの細胞内局在について詳細な解析を行い、ミスチリンが中性脂肪の貯蔵サイトである脂肪滴に局在し、脂肪分解を負に制御する因子であることを明らかにした。現在、これらの結果について論文投稿すると共に、さらに詳しい解析を進めている (submitted)。

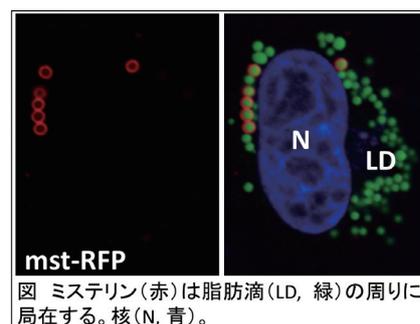


図 ミスチリン(赤)は脂肪滴(LD, 緑)の周りに局在する。核(N, 青)。

3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the productive folding of nascent polypeptides by molecular chaperones and protein quality control mechanism for misfolded proteins within the cells. Particularly, we have been devoted our activity on the following four major research projects:

1: Functional analysis of collagen-specific molecular chaperone Hsp47. Hsp47 is an endoplasmic reticulum (ER)-resident collagen-specific molecular chaperone essential for correct folding of procollagen in the ER (S.Ito, K.Nagata *Semin Cell Dev Biol.* 2017). Hsp47 could be a promising target for the management of fibrosis. We screened small-molecule compounds Col003 that inhibit the interaction of Hsp47 with collagen from chemical libraries and we found a molecule Col003 competitively inhibited the interaction and caused the inhibition of collagen secretion (S.Ito et al, *J Biol Chem.* 2017). We are developing a new screening system and are searching for more effective Hsp47 inhibitor. Collaborated with a pharmaceutical company this project was adopted by ACceleration Transformative research for Medical Innovation Setup scheme (ACT-MS) of Japan Agency for Medical Research and Development (AMED). We established a method for rapidly and quantitatively measuring the interaction between HSP47 and collagen in solution using fluorescence correlation spectroscopy. The diffusion rate of HSP47 labeled with Alexa Fluor 488 decreased upon addition of type I or III collagen. We observed dissociation of collagen from HSP47 at low pH and re-association after recovery to neutral pH (Kitamura A et al, *BBRC* 2018). Maintenance of ER proteostasis is controlled by a dynamic signaling network known as the unfolded protein response (UPR). IRE1 α is a key UPR transducer, determining cell fate under ER stress. Using cellular and biochemical analysis we found Hsp47 directly binds to IRE1 α , displacing the negative regulator BiP from the complex to facilitate IRE1 α oligomerization. We conclude that Hsp47 adjusts IRE1 α signaling by fine-tuning the threshold to engage an adaptive UPR (Sepulveda D et al, *Mol Cell.* 2018) .

2: Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation and Ca^{2+} flux. We identified ERdj5 as a disulfide-reductase in ER. ERdj5 forms the supramolecular complex with EDEM and BiP, and activates the degradation of proteins misfolded in the ER

by cleaving the disulfide bonds of misfolded proteins and by facilitating the retrograde transport of these proteins from the ER lumen into the cytosol, where they are degraded by ubiquitin-proteasome system, which is called as ERAD (R. Ushioda *et al.*, **Science** 2008; M. Hagiwara *et al.* **Mol. Cell** 2011; R. Ushioda *et al.* **Mol. Biol. Cell** 2013) .

We found that ERdj5 cleaves the disulfide bond of SERCA2, a Ca²⁺ pump on ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca²⁺ concentration in the ER and regulates the interaction with SERCA2. It suggests that redox activity of ERdj5 is involved not only in protein quality control but also in Ca²⁺ homeostasis in the ER (R. Ushioda *et al.*, **PNAS** 2016). Furthermore, we screened the interaction partner of ERdj5 to declare redox source of ERdj5. From MS analysis, we have identified the candidate of electron donor for ERdj5. We are trying to reveal the unknown mechanism of electron transfer into ER resident proteins.

3: ERdj8 regulates the size of autophagosomes to degrade large autophagic targets

Non-selective and selective-autophagy promote the degradation of several size of autophagic targets, and are also closely linked to several human diseases. Isolation membrane, which is a source of autophagosome, promotes the engulfment of autophagic targets of different sizes, from small protein aggregates to large organelles, by regulating the extension of its own membrane. However, the underlying regulatory mechanisms remain unexplained. Here we show that an ER-localized membrane protein, ERdj8, controls the size of autophagosomes through the regulation of isolation membrane extension as to allow engulfment of large autophagic targets. We show in mammalian cells that downregulation of ERdj8 generates small autophagosomes that fail to engulf the large autophagic targets such as 3 μ m latex beads (Lysophagy) and damaged mitochondria (Mitophagy), even though small autophagic targets such as 1 μ m latex beads and p62 were not affected. Consistently, knockdown of *dnj-8* (*Caenorhabditis elegans* ERdj8 homologue) in worm causes the accumulation of mitochondria in muscle, despite the complete elimination of the small sperm-derived paternal mitochondria. To conclude, the regulation of the autophagosomal size via ERdj8 is essential for the degradation of large autophagic targets and control the intracellular homeostasis.

4: Functional analysis of a novel protein, mysterin. We demonstrated that mysterin participates in the physiological angiogenesis during zebrafish embryogenesis (Liu, Morito *et al.*, **PLOS ONE**, 2011; Kotani, Morito *et al.*, *Sci Rep*, 2015) and that mysterin forms a huge toroidal oligomer and changes its overall structure through ATP-binding and hydrolysis (Morito *et al.*, **Sci Rep**, 2014). However, mysterin's physiological function in cells remains largely unclear. We explored mysterin binding proteins expecting their functional correlation with mysterin, and found that a deubiquitylating enzyme USP15 deubiquitylates and stabilizes mysterin in an isoform specific manner (Kotani, Morito *et al.*, *Sci Rep*, 2017). Moreover, we recently identified its significant involvement in lipid metabolism in cells (submitted).

4. 論文、著書など

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** in press

P. Sasikumar, K.S. AlOuda, W.J. Kaiser, L.M. Holbrook, N.Kriek, A.J. Unsworth, A.P. Bye, T. Sage, R. Ushioda, K. Nagata, R.W. Farndale, J.M. Gibbins : The chaperone protein HSP47: a platelet collagen binding protein that contributes to thrombosis and hemostasis **Journal of Thrombosis and Haemostasis** in press

C. Caba, Hyder A. Khan, J. Auld, R. Ushioda, K. Araki, K. Nagata, B. Mutus : Conserved Residues Lys57 and Lys401 of Protein Disulfide Isomerase Maintain an Active Site Conformation for Optimal Activity: Implications for Post-translational Regulation **Frontiers in Molecular Biosciences** in press

A. Kitamura, Y. Ishida, H. Kubota, CG. Pack, T. Homma, S. Ito, K. Araki, M. Kinjo, K. Nagata : Detection of substrate binding of a collagen-specific molecular chaperone HSP47 in solution using fluorescence correlation spectroscopy.

Biochem Biophys Res Commun. in press

D. Sepulveda, D. Rojas-Rivera, DA. Rodríguez, J. Groenendyk, A. Köhler, C. Lebeaupin, S. Ito, H. Urra, A. Carreras-Sureda, Y. Hazari, M. Vasseur-Cognet, MMU. Ali, E. Chevet, G. Campos, P. Godoy, T. Vaisar, B. Bailly-Maitre, K. Nagata, M. Michalak, J. Sierralta, C. Hetz. : Interactome Screening Identifies the ER Luminal Chaperone Hsp47 as a Regulator of the Unfolded Protein Response Transducer IRE1 α . **Mol Cell.**, in press

S. Ito, K. Ogawa, K. Takeuchi, M. Takagi, M. Yoshida, T. Hirokawa, S. Hirayama, K. Shin-Ya, I. Shimada, T. Doi, N. Goshima, T. Natsume, K. Nagata : A small-molecule compound inhibits a collagen-specific molecular chaperone and could represent a potential remedy for fibrosis

J. Biol. Chem. 292:20076-20085 (2017)

K. Maegawa, S. Watanabe, K. Noi, M. Okumura, Y. Amagai, M. Inoue, R. Ushioda, K. Nagata, T. Ogura & K. Inaba : The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation **Structure** 25:846-857 (2017)

Y. Kotani, D. Morito, K. Sakata, S. Ainuki, M. Sugihara, T. Hatta, S. Iemura, S. Takashima, T. Natsume and K. Nagata : Alternative exon skipping biases substrate preference of the deubiquitylase USP15 for mysterin/RNF213, the moyamoya disease susceptibility factor. **Scientific Reports** 7:44293 (2017)

K. Araki, R. Ushioda, H. Kusano, R. Tanaka, T. Hatta, K. Fukui, K. Nagata & T. Natsume: A crosslinker-based identification of redox relay targets. **Anal Biochem** 1(520):22-26 (2017)

S. Ito & K. Nagata : Biology of Hsp47 (Serpine H1), a collagen-specific molecular chaperone **Seminars in Cell and Developmental Biology** 62:142-151 (2017)

D. Morito and K. Nagata : Molecular Biology of Mysterin/RNF213 **Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Part III**, pp45-57 (2017)

D. Morito and K. Nagata : Physiological Role of Mysterin/RNF213 in Zebrafish **Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Part III**, pp59-67 (2017)

5. 学会発表など

招待講演、シンポジウム等

Kazuhiro Nagata : Regulation of Proteostasis and Calcium Homeostasis in the ER and of Autophagy. The 2017 Japan –NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease, Sendai (Japan), 2017.2.17

永田和宏 : ミステリンの生物学 第 13 回福岡脳神経血管内治療シナプス、福岡市、2017.04.14

Kazuhiro Nagata : Cross-talk of protein, redox and calcium homeostasis in the ER Proteostasis Mini-symposium at Northwestern, Evanston (USA), 2017.04.20

Kazuhiro Nagata : Protein quality control in the ER: ERAD and autophagy CNIO Frontiers Meeting “Molecular Chaperones in Cancer”, Madrid (Spain), 2017.05.02

永田和宏 : 小胞体恒常性の維持機構 日本生化学会中部支部例会、名古屋市、2017.05.20

永田和宏 : 膜であるヒトの内と外 ラボカフェスペシャル featuring サーチプロジェクト、大阪市、2017.05.24

Kazuhiro Nagata : Redox cascade protein folding in the ER International Symposium on Protein Quality Control, Nara (Japan), 2017.06.04

永田和宏 : Maintenance of ER homeostasis by redox cascade 第5回新学術領域研究「酸素生物学」全体班会議特別講演、吹田市、2017.06.17

Kazuhiro Nagata : Regulation of ER Homeostasis by Redox Signaling Gordon Research Conference "Stress Proteins in Growth, Development & Disease", Sundry River (USA), 2017.07.12

Kazuhiro Nagata : Cross-talk of protein, redox and calcium homeostasis in the ER Seminar to the National Institutes of Health (NIH), Bethesda (USA), 2017.07.21

Kazuhiro Nagata : Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum (Presentation of the Hans Neurath Award) Protein Society Annual Symposium, Montreal (Canada), 2017.07.24

Kazuhiro Nagata : Redox-mediated regulatory mechanism of ER homeostasis Seminar in McGill University, Montreal (Canada), 2017.07.26

Kazuhiro Nagata : Maintenance of ER homeostasis by ER redox network INM Institute Seminar, Saarbrucken (Germany), 2017.08.11

Kazuhiro Nagata : Redox-mediated regulatory mechanism of ER homeostasis The 8th CSSI International Congress on Stress Proteins in Biology and Medicine, Turku (Finland), 2017.08.16

永田和宏 : Redox-mediated regulation of ER homeostasis 2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸市、2017.12.09

学会発表

森戸大介 : モヤモヤ病タンパク質ミスチリンの同定と機能解析 第3回4大学1研合同研究会、京都市、2017.1.7-8 (口頭発表)

瀧野友愛、山本洋平、永田和宏 : ERdj8 regulates the size of autophagosomes to degrade large autophagic targets

第3回4大学1研合同研究会、京都市、2017.1.7-8(口頭発表)

堤智香、上垣日育、山下龍志、潮田亮、永田和宏 :

Zinc-dependent functional switching of ERp18, a novel thioredoxin homolog in the ER

第3回4大学1研合同研究会、京都市、2017.1.7-8(口頭発表)

山本洋平 : ERdj8 regulates the size of autophagosomes to degrade large autophagic targets

群馬大学生体調節研究所セミナー、前橋市、2017.2.2

(口頭発表)

森戸大介 : Mysterin, a unique enzyme associated with moyamoya disease 第307回熊本大学発生医学研究所セミナー、熊本市、2017.3.27 (口頭発表)

大村圭一、奥村正樹、前川憲一、金村進吾、井上道雄、天貝佑太、潮田亮、永田和宏、稲葉謙次 : ERdj5とBiPの共役による基質ジスルフィド結合の還元機構の解明

Disulfide reducing mechanism by which BiP facilitates catalysis of ERdj5 第17回日本蛋白質科学会年会、仙台市、2017.6.20-22

Michio Inoue, Nanami Sakuta, Satoshi Watanabe, Kunihito Yoshikaie, Masataka Umitsu, Yoshiki Tanaka, Ryo Ushioda, Yukinari Kato, Junichi Takagi, Tomoya Tsukazaki, Kazuhiro Nagata, Kenji Inaba Crystal structures of SERCA2b reveal the mechanism of its redox-dependent activity regulation.

第17回日本蛋白質科学会年会、仙台市、2017.6.20-22

潮田亮 : レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の解明 生理学研究所研究会「オルガネラダイナミクスの新規制御機構とその病態生理」、岡崎市、2017.05.31 (口頭発表)

Ryo Ushioda : Electron donor for disulfide reductase ERdj5 in ER International Symposium on Protein Quality Control, Nara (Japan), 2017.06.04