

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

准教授 潮田 亮 Associate 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**」をとともども研究することは、「**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、3つの主要なプロジェクトについて研究を推進してきた。すなわち、

- 1) 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
- 2) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析
- 3) タンパク質品質管理に関わる新規システイン修飾

以下、プロジェクト1) について、この1年3か月で得られた知見について紹介する。

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)。この過程で潮田らにより、2008年に ERdj5 という還元酵素が発見され、ミスフォールドタンパク質の品質管理機構において重要な役割を果たしていることをすでに報告してきた (Science 2008, Mol. Cell 2011 など)。さらに 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 (PNAS 2016)。そのような経過から、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。小胞体はよく知られるように酸化的環境下にあるが、この酸化的環境において ERdj5 が還元活性を発揮するためには、何らかの方法によって還元力を得なければならない。言い方を変えれば、電子はどのようにして ERdj5 に伝達されるのか、小胞体はどのようにしてサイトゾルから電子を得ているのか、が避けて通れない大きな問題となる。これは小胞体というオルガネラに残された細胞生物学上の最大の謎の一つでもある。本研究室では、従来知られてきたのとはまったく異なる新たな方法によって、小胞体に電子が供給されているメカニズムを明らかにしつつある。また、小胞体内腔のレドックス環境がどのように構築されるのか、その機構解明にも挑戦している。

2. 本年度の研究成果

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。小胞体は酸化的フォールディングの場であり、そのレドックス環境はサイトゾルと比較し、酸化的環境に維持されている。また、多くの酸化酵素が存在し、酸化的フォールディングを触媒している (図 1-①)。

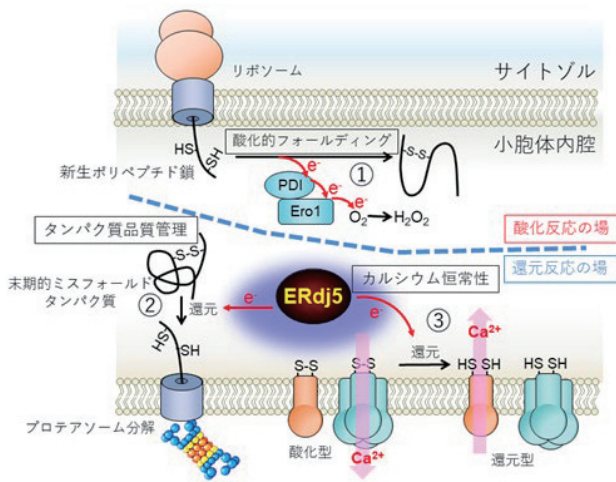


図 1. これまで小胞体は酸化的フォールディングを中心とした酸化反応の場として考えられてきた。一方、潮田らは小胞体内腔の還元反応の重要性を明らかにしてきた。

この酸化的環境で、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(図 1-②、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。さらにカルシウム制御として、小胞体局在のレドックス因子がカルシウムチャネル IP3 受容体の活性をレドックス依存的に制御することも見出し、ポンプとチャネルを ERdj5 の還元活性を介して、reciprocal にかつ合目的的に制御するという、極めて巧みな制御機構を明らかにしつつある (図 1-③)。

さらに ERdj5 の重要性を明らかにするため、ERdj5 ノックダウン/ノックアウトをした線虫、CRISPR/Cas9 を用いて樹立した ERdj5 欠損 HeLa 細胞、または MEF 細胞を用いて、ERdj5 欠損による細胞内異常を観察した。ERdj5 欠損細胞では、カルシウムイオン濃度依存的に活性化する Drp1 が活性化しており、Drp1 の GTPase 活性依存的にミトコンドリアのくびり切りが起こることを見出した。ERdj5 欠損によるミトコンドリア異常断裂はミトコンドリア機能の低下を引き起こし、細胞内での ROS を上昇させた。このことにより、細胞のアポトーシスを惹起させ、この細胞死は神経変性疾患などの疾患を悪化させる可能性も示唆される。また、線虫の ERdj5 欠損は線虫の寿命を低下させることも明らかにした。これらの知見は ERdj5 の制御に関し、その重要性を再認識する結果となった (R. Yamashita et al., Sci. Rep. 2021)。また、第一三共との共同研究で、CHO 細胞における抗体 (IgG) 産生について、Hspa5 プロモーターを利用した発現系を構築した。Hspa5 プロモーターを削ることで、これまでの発現系と比較しておよそ 2 倍の産生量を実現した (H. Tanemura et al., Sci. Rep. in press)。

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 two major research projects:

Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation, and Ca²⁺ flux. We identified ERdj5 as a disulfide-reductase in the endoplasmic reticulum (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 facilitating the retrograde transport of these proteins from the ER lumen into the cytosol, where they are degraded by the 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 SERCA2b, a Ca²⁺ pump on the ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca²⁺ concentration in the ER and regulates the interaction with SERCA2b. It suggests that the 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, Inaba group (Tohoku Univ.) and we elucidated the structure of SERCA2b (Inoue et al. Cell Rep. 2019). This information may help to understand the activation mechanism of SERCA2b pump through ERdj5. On the other hand, we have revealed the mechanism of the electron transfer to ERdj5 from the nascent chain. Furthermore, we summarized our previous works as a review of the redox-dependent endoplasmic reticulum homeostatic mechanism.

Here, we focused on the control of the Ca²⁺ pump and channel by the redox regulation in the ER. Here, we obtained the structural information of SERCA2b for understanding how ERdj5 promotes the influx of Ca²⁺ by SERCA2b. Then, we found that the reductase ERdj5 affects the Ca²⁺ release activity of the IP3R. Additionally, we found that ERdj5 deficiency causes mitochondrial fragmentation due to Ca²⁺ homeostatic disruption. It was clarified that redox regulation by ERdj5 is involved in the uptake and release of calcium ions in the ER. Then, we found that cytosolic calcium ions were constantly elevated in ERdj5-deficient cells. We also found that Drp1 is activated in a Ca²⁺-dependent manner, and that the activated Drp1 ruptures mitochondria (R. Yamashita et al., Sci. Rep. 2021).

4. 論文, 著書など

原著論文

Riyuji Yamashita, Shohei Fujii, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata: Ca²⁺ imbalance caused by ERdj5 deletion affects mitochondrial fragmentation, *Sci. Rep.* 11, Article number: 20772 (2021)

Hiroki Tanemura, Kenji Masuda, Takeshi Okumura, Eri Takagi, Daisuke Kajihara, Koichi Nonaka, Ryo Ushioda: Development of a stable antibody production system utilizing an Hspa5 promoter in CHO cells, *Sci. Rep.* in press

著書

藤井唱平、潮田亮: タンパク質品質管理を支える小胞体レドックス環境と電子伝達、生化学 93(5)、651-659 (2021)

5. 学会発表など

潮田亮: タンパク質品質管理を支える電子移動媒体としての超硫黄分子の役割、学術変革 A「硫黄生物学」第 1 回領域会議、オンライン、2022.3.19-20

和田匠太、永田和宏、潮田亮: レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーの感知機構の解明、超異分野学会 東京大会 2022、東京都、2022.3.4-5

堤智香、田原諒佑、永田和宏、潮田亮: 小胞体レドックス環境を構築するグルタチオン供給機構の解明、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜市、2021.12.1-3

潮田亮、上垣日育、山下龍志、永田和宏: ストレス応答としての小胞体レドックスシフトと恒常性維持、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜市、2021.12.1-3

XIAOHAN CAI、伊藤翔悟、野井健太郎、井上道雄、潮田亮、永田和宏、稲葉謙次: Mechanisms of ER-associated degradation pathway mediated by the cooperation of ERdj5 and BiP、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜市、2021.12.1-3

上垣日育、潮田亮: 小胞体還元酵素 ERp18 の亜鉛イオン依存的な活性制御の解明、レドックス R&D 戦略委員会「第 1 回若手シンポジウム」、オンライン、2021.11.8 (優秀発表賞受賞)

和田 匠太、潮田亮: レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサー-ATF6 の活性化機構の解明、レドックス R&D 戦略委員会「第 1 回若手シンポジウム」、オンライン、2021.11.8

和田匠太、潮田亮、永田和宏: 新たな小胞体ストレスセンサー-ATF6 制御機構の解明、第 94 回日本生化学会大会、オンライン、2021.11.3-5

潮田亮: ストレス応答としての小胞体レドックスシフト、第 94 回日本生化学会大会、オンライン、2021.11.3-5

Ryo Ushioda: Maintenance of Endoplasmic Reticulum Homeostasis through Redox Regulation, Paris Redox 2021, オンライン、2021.10.13-15 (招待講演)

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究 A

課題名：小胞体における活性酸素除去に関わる新たな分子機構の解明

研究分担者：潮田亮，取得年度：2018-2021 年

科学研究費補助金・学術変革領域研究(A)

課題名：新興硫黄生物学が拓く生命原理変革

研究代表者：潮田亮，取得年度：2021-2025 年

AMED-CREST

課題名：プロテオスタシスにおけるタンパク質構造形成機構の包括的解明

研究分担者：潮田亮，取得年度：2021-2026 年

武田科学振興財団・特定研究助成 [I]

課題名：膜輸送を介したオルガネラ恒常性維持と細胞機能 制御

共同研究者：潮田亮（研究代表者：遠藤斗志也）

取得年度：2020-2021 年

資生堂

課題名：ジメチルピラゾリルジメチルピリミジン塩酸塩によるチロシナーゼタンパク分解のメカニズム解明に関する研究

研究代表者：潮田亮，取得年度：2021 年

科研費再挑戦支援プログラム

課題名：小胞体レドックス環境の起源を紐解く

研究代表者：潮田亮，取得年度：2021 年

2) 学外活動

(1) 潮田亮：文部科学省 科学技術・学術政策研究所 専門調査委員

(2) 潮田亮：小胞体ストレス研究会 世話人

(3) 潮田亮：京都第二赤十字看護専門学校 非常勤講師

(4) 潮田亮：新学術領域「オルガネラゾーン」班友

3) アウトリーチ活動

(1) 潮田亮：日本・青少年サイエンス交流事業「さくらサイエンスプラン」に参加

(2) 潮田亮：日本学術振興会「ひらめき★ときめきサイエンス」実施

(3) 潮田亮：京都府立峰山高等学校 模擬授業「生命とは何かを追及する研究者」

研究室 HP：<https://ushioda-lab.com/>





写真1：2021年度 研究室メンバー集合写真



写真2：2021年度の大雪。Greiner製の板でスノーボードをしました。



写真3：2021年卒業式。田原君をはじめ、研究室メンバーが卒業しました。