

# 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、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、従来知られてきた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。この酸化環境で、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 (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 (R. Ushioda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2016)。また、ERdj5 の欠損はサイトゾルのカルシウムイオン恒常性破綻を招き、ミトコンドリアの異常断裂を引き起こすことを明らかにした (R. Yamashita et al., *Sci. Rep.* 2021)。

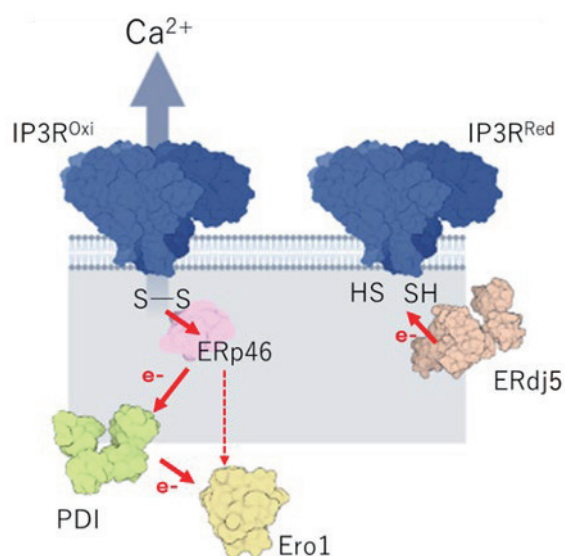


図 1. 小胞体カルシウムイオンチャンネル IP3 受容体のレドックス制御

今回、小胞体カルシウムイオンチャンネル IP3 受容体の制御因子の探索のため、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 を用いて小胞体内腔の酸化還元酵素群の遺伝子欠損細胞株を複製し、IP3 受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$  放出活性や細胞内環境の変化を解析した。多くの酸化還元酵素の遺伝子欠損細胞で  $\text{Ca}^{2+}$  放出活性の変化が観察されましたが、直接的な制御因子として酸化酵素 ERp46 と還元酵素 ERdj5 を同定した。ERp46 は IP3 受容体を酸化することによって  $\text{Ca}^{2+}$  放出活性を正に制御し、逆に ERdj5 は IP3 受容体を還元することによって負に制御することを明らかにした (図 1, S. Fujii et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* in press)。また、この制御は、IP3 受容体の小胞体内腔の酸化還元状態に依存しており、まったく新しい  $\text{Ca}^{2+}$  放出活性制御であることがわかった。これらの研究成果から、小胞体内腔のレドックス環境の変化がこれらの酵素を介して IP3 受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルに異常を引き起こす可能性が示唆された。このことは、疾患や老化など小胞体内腔のレドックス環境の変化と  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルとの関係を結びつける重要な知見となるだろう。

これまで我々は、ERdj5 が小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ SERCA2b の活性化にも寄与することを明らかにし、ERdj5 の細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  恒常性における重要性を示してきました。本研究の成果とあわせて、ERdj5 は  $\text{Ca}^{2+}$  を取り込むポンプを正に制御し、 $\text{Ca}^{2+}$  を放出するチャンネルを負に制御するという合理的な  $\text{Ca}^{2+}$  制御機構を見出した。小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低下した時に、効率よく  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を回復させる合目的な  $\text{Ca}^{2+}$  恒常性維持機構モデルを提唱出来た。

### 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 mechanisms for misfolded proteins within the cells. Particularly, we have devoted our activity to the following two major research projects:

**Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation, and  $\text{Ca}^{2+}$  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 Ca<sup>2+</sup> pump on the ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the ER (R. Ushioda et al., **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2016). Furthermore, the 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 the 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 Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> by SERCA2b. Then, we found that the reductase ERdj5 affects the Ca<sup>2+</sup> release activity of the IP3R (S. Fujii et al., **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** in press) . Additionally, we found that ERdj5 deficiency causes mitochondrial fragmentation due to Ca<sup>2+</sup> homeostatic disruption (R. Yaamashita et al., **Sci. Rep.** 2021) . It was clarified that redox regulation by ERdj5 is involved in the uptake and release of calcium ions in the ER.

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

Shohei Fujii, Ryo Ushioda\* and Kazuhiro Nagata\*. Redox states in the endoplasmic reticulum directly regulate the activity of calcium channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. **Proc Natl Acad Sci USA.** in press

Hiroki Tanemura, Kenji Masuda, Takeshi Okumura, Eri Takagi, Daisuke Kajihara, Hirofumi Kakihara, Koichi Nonaka, Ryo Ushioda\*: Development of a stable antibody production system utilizing an Hspa5 promoter in CHO cells, **Scientific Reports.** 12, Article number: 7239 (2022)

##### 著書

潮田亮 : 小胞体局在還元酵素ERdj5の欠損が引き起こすミトコンドリア断裂、総合学術研究所所報第17号、115-120 (2023)

上垣日育、永田和宏、潮田亮 : 小胞体プロテオスタシスの新常識—酸化反応の場としての小胞体から還元反応の場へ、実験医学増刊40(12)、250-258(2022)

#### 5. 学会発表など

Ryo Ushioda: A new platform formed by JDP-Hsp70 for protein quality control in the ER, J-domain proteins from molecular mechanisms to diseases International Workshop (CSSI), Poland, 2023.3.29-2023.4.1 (招待講演)

潮田亮 : レドックス制御に基づく小胞体ホメオスタシスの理解、第2回日本医学会連合 Rising Star リトリート、淡路市、2023.3.5-2023.3.6 (招待講演)

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制御機構の解明、第45回日本分子生物学会年会、千葉県、2022.11.30-2022.12.2 (口頭)

堤智香、田原諒佑、坂本龍太、渡邊弘樹、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輸送機構の解明、第45回日本分子生物学会年会、千葉県、2022.11.30-2022.12.2 (口頭)

杉澤亜美、潮田亮：液-液相分離によって形成される新たなタンパク質品質管理プラットフォーム、第 45 回日本分子生物学会年会、千葉県、2022.11.30-2022.12.2（口頭）

潮田亮：小胞体における新たなタンパク質品質管理プラットフォームの形成、第 95 回日本生化学会大会 シンポジウム、名古屋市、2022.11.9-2022.11.11（口頭）

杉澤亜美、潮田亮：液-液相分離によって形成される新たなタンパク質品質管理プラットフォーム、第 95 回日本生化学会大会、名古屋市、2022.11.9-2022.11.10（口頭）

Ryo Ushioda：ER Redox shift through the ribosome translation、第 60 回日本生物物理学会年会、函館市、2022.9.28-2022.9.30（口頭）

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、学術変革領域(A)「硫黄生物学」第 2 回領域会議、福岡市、2022.8.6-2022.8.8（口頭）

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新たな活性化機構、学術変革領域(A)「硫黄生物学」第 2 回領域会議、福岡市、2022.8.6-2022.8.8（ポスター）

渡邊弘樹、堤智香、永田和宏、潮田亮：小胞体に形成される局所的な還元環境の同定、学術変革領域(A)「硫黄生物学」第 2 回領域会議、福岡市、2022.8.6-2022.8.8（ポスター）

杉澤亜美、潮田亮：近接依存性標識を用いた小胞体タンパク質品質管理機構の評価、第 15 回小胞体ストレス研究会、京都市、2022.7.30-2022.7.31（ポスター）

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ATF6 制御機構の解明、第 15 回小胞体ストレス研究会、京都市、2022.7.30-2022.7.31（ポスター）

藤井唱平、潮田亮：小胞体の機能を支えるオルガネラ環境の探求、第 15 回小胞体ストレス研究会、京都市、2022.7.30-2022.7.31（ポスター）

潮田亮：レドックス制御を介した小胞体恒常性維持機構、第 15 回小胞体ストレス研究会、京都市、2022.7.30-2022.7.31（口頭）

葛西綾乃、潮田亮：コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の負荷に応答した転写調節機構 の解明、第 15 回小胞体ストレス研究会 若手の会、京都市、2022.7.29（口頭）

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ATF6 制御機構の解明、第 15 回小胞体ストレス研究会 若手の会、京都市、2022.7.29（優秀発表賞 受賞）

杉澤亜美、岸本哲弘、潮田亮：近接依存性標識を用いた小胞体タンパク質品質管理機構の評価、第 74 回日本細胞生物学会大会、東京都、2022.6.28-2022.6.30(2022.6.30)（ポスター）

潮田亮：レドックス制御を介した小胞体タンパク質品質管理、第 3 回 日本結合組織学会若手セミナー、オンライン、2022.6.24（招待講演）

Ryo Ushioda: Maintenance of Endoplasmic Reticulum Homeostasis through Redox Regulation, Cellular and Protein Homeostasis webinar, Online, 2022.6.14（招待講演）

潮田亮：酸化反応の場としての小胞体から、還元反応の場としての小胞体へ、微研セミナー、吹田市、2022.6.10（特別講演）

杉澤亜美、岸本哲弘、潮田亮：近接依存性標識を用いた小胞体タンパク質品質管理機構の評価、第 68 回日本生化学会近畿支部例会、滋賀県、2022.5.28（口頭）

和田匠太、永田和宏、潮田亮：ドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーATF6 制御機構の解明、第 68 回日本生化学会近畿支部例会、滋賀県、2022.5.28（優秀発表賞 受賞）

## 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(B)

課題名：一過的・局所的に出現する小胞体還元環境の解明

研究代表者：潮田亮、取得年度 2022-2026 年

科学研究費補助金・学術変革領域研究(A)

課題名：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

研究代表者：潮田亮、取得年度：2021-2025 年

科学研究費補助金・学術変革領域研究(A)

課題名：硫黄生物学研究推進のための国際連携とインフラ整備

研究分担者：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：2021-2022 年

資生堂株式会社

課題名：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：2022 年

## 2) 学外活動

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

潮田亮：小胞体ストレス研究会 世話人

潮田亮：第 15 回小胞体ストレス研究会大会長

Ryo Ushioda: 4th International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine, the 12th International NO Conference & The 22nd NOSJ, Organizing committee member

Ryo Ushioda: Journal of Biochemistry Associate Editor

潮田亮：京都第二赤十字看護専門学校 非常勤講師

## 3) アウトリーチ活動

潮田亮：京都市立紫野高等学校：高大接続授業「タンパク質が光る！？病気の原因になる！？タンパク質が織りなす不思議な世界」

潮田亮：追手門学院大手前高等学校 模擬授業「生命を「カタチ」作るもの」

## 4) 受賞歴

(1) 和田匠太：第 68 回日本生化学会近畿支部例会 優秀発表賞

(2) 和田匠太：第 15 回小胞体ストレス研究会 若手の会 優秀発表賞

潮田研ホームページ

<https://ushioda-lab.com/>







写真1: 京都大学生命科学研究科 井垣研究室との交流会



写真2 第15回小胞体ストレス研究会スタッフ記念撮影