

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」
研究課題「小胞体におけるタンパク質の品質管理機構」

研究終了報告書

研究期間 平成13年12月～平成19年3月

研究代表者：永田和宏
(京都大学再生医科学研究所・教授)

1 研究実施の概要

タンパク質の1次構造の解明が進むなか、残された大きな問題は、合成されたタンパク質が如何に正しい構造を形成し、もしフォールディングや会合の過程で不良品が現れた場合、如何にそれらをチェックして、再生ないしは分解処理するかという、タンパク質の品質管理 (quality control) の機構である。品質管理という研究領域は、まだやっと緒についたばかりとも言えるべき新しい分野であるが、分泌タンパク質や膜タンパク質の構造形成の場である小胞体における品質管理は、現在最も注目を集めている分野である。

本研究においては、小胞体におけるタンパク質の品質管理を3つに分けて考えている。即ち1) 新生ポリペプチドの正しいフォールディング (productive folding pathway)、2) 小胞体ストレスや遺伝子変異などによって蓄積する misfold タンパク質の分解 (小胞体関連分解、ERAD pathway)、および3) 小胞体ストレスを感知して転写誘導により分子シャペロンや ERAD 因子を合成、供給する unfold protein response (UPR) である。

特に1) と2) のバランスが、3) の UPR pathway を介して調節されていると考え、いずれも申請者が独自に発見し、その後この分野におけるキー因子であることがわかった数種のタンパク質 (カルネキシン, HSP47, IRE1 α , ATF6, EDEM など) を中心に研究を展開した。これら個々の機構を明らかにすることによって、小胞体における品質管理のクロストークの全体像を明らかにするのが、本提案研究の目標である。品質管理の破綻は、神経変性疾患やプリオン病を初めとする種々の「フォールディング異常病」を引き起こすことが知られ、本研究からもたらされる知的資産、社会への貢献度はきわめて大きいと考えられる。

永田グループは、主として小胞体に焦点を絞り、正常な構造から逸脱してしまったタンパク質がどのように処理されるか、特に分解へまわされる機構について研究を進めた。ただし、実際に分解を受けるのは、細胞質 (サイトゾル) 内であるので、サイトゾルにおける品質管理についても、解析を行うこととした。本研究の結果、以下に示す6つ大きな進展があった。

EDEM による異常タンパク質の小胞体関連分解 小胞体にミスフォールドしたタンパク質が蓄積してくると、まず PERK 経路を介した一時的な翻訳停止が働き、次に ATF6 経路を介した分子シャペロンの誘導が起こる。第3のステップでは、IRE 1-XBP1 経路を介した小胞体関連分解(ERAD)因子の誘導合成が起こり、最後の戦略として、PERK-ATF4 経路を介したアポトーシスへと繋がる。本研究グループでは、EDEM と呼ばれる新しい小胞体関連分解因子を発見した。EDEM は、ER マンノシダーゼにホモロジーを持つタンパク質として同定し、EDEM を過剰発現させることによって、ミスフォールドタンパク質の分解を促進することを明らかにしてきた。特に基質は、カルネキシンを介してフォールディングし、どうしてもフォールディングできない場合に、マンノースが8個にまでトリミングされた後、カルネキシンから EDEM に受け渡されることを明らかにした。その後、EDEM のホモログを新たに2種類発見し、EDEM2 及び EDEM3 と名付けた。EDEM3 には、マンノシダーゼとしての酵素活性が存在し、この酵素活性がミスフォールドタンパク質の ERAD に必須であることも明らかにした。

TRAP による ERAD の促進

TRAP (Translocon-associated protein) は、4つのサブユニ

ットからなる小胞体膜タンパク質である。TRAP は従来、小胞体にあるトランスロコンに適合するタンパク質として報告されてきたが、その機能については、依然不明である。我々は TRAP の 4 つのサブユニットが小胞体ストレスによって一斉に誘導されることを発見し、TRAP を RNAi によってノックダウンすることにより、ERAD が抑制されること、すなわち TRAP がミスフォールドタンパク質の ERAD に関与していることを示した。特に TRAP は、ミスフォールドしたタンパク質とは相互作用するが、正しくフォールドした基質とは相互作用せず、ミスフォールドしたタンパク質が小胞体からサイトゾルへ逆輸送される際に働くことによって、ERAD を促進していると考えられた。よって、逆輸送にもトランスロコンが働いていることを強く示唆するものである。

小胞体膜上に存在するユビキチンリガーゼ gp78 による ERAD の促進 小胞体から逆輸送されたミスフォールドタンパク質は、ユビキチンプロテアソーム系によって分解される。嚢胞性繊維症(Cystic fibrosis)の原因遺伝子である CFTR を基質として、CFTR Δ F508 の ERAD に、小胞体膜上に局在する E3 リガーゼ gp78 が関与することを明らかにした。さらに、基質と gp78 の結合には、gp78 上の CUE ドメインが関わっていることを明らかにした。また in vitro におけるユビキチン化実験において、gp78 はユビキチン鎖伸長因子 (E4 酵素) と呼ばれる活性を示すことを明らかにした。このとき CFTR Δ F508 の E3 としては、CHIP がユビキチンリガーゼとして関与していることをも明らかにした。ミスフォールドタンパク質の ERAD に E4 酵素が関与することを示した初めての例である。

小胞体ジスルフィド還元酵素による凝集体形成阻止と ERAD 促進 小胞体においてミスフォールドしたタンパク質が、トランスロコンを介して、小胞体からサイトゾルへ逆輸送されるためには、ミスフォールドした基質のジスルフィド結合が還元されていることが必須であると考えられる。小胞体内におけるレドックス関連酵素 ERdj5 が、還元活性を持つことを見出し、かつ ERAD を促進することを見出した。ERdj5 を過剰発現すると、ミスフォールドしたタンパク質の ERAD が促進された。ERdj5 に 4 箇所存在する CXXC モチーフに変異を入れると、SS 結合の還元活性はなくなった。興味深いことに、ERdj5 は J ドメインと呼ばれる HSP70 ファミリーの分子シャペロンが結合する領域を持っており、ERdj5 の還元活性は、分子シャペロン BiP によって制御されているということが明らかになった。さらに、ERdj5 は ERAD の鍵をにぎる EDEM とも相互作用することを明らかにした。よって、EDEM/ERdj5/BiP が複合体を作ることにより、1 本のポリペプチドになった基質を、チャネルを通して小胞体からサイトゾルへ逆輸送することが初めて示された。

Hsp47 欠損によるコラーゲンの凝集と小胞体ストレスの誘導 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。さらに、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。このとき、XBP1 のスプライシングが観察され、小胞体ストレス誘導が起こっていることがわかった。

細胞質シャペロニン CCT によるポリグルタミン凝集および毒性の抑制 細胞質シャペロニン CCT は、カゴ状の構造をもった分子シャペロンで、真核細胞の細胞質においてタンパク質のフォールディングを助ける。RNAi 法により CCT の量を低下させると、ポリグルタミンの凝集が促進され、逆に CCT を過剰発現させるとポリグルタミンの凝集が抑制されると共に神経細胞死を抑制し

た。また、インビトロの解析において、 β シートタンパク質の凝集阻害効果も見いだしており、CCTは β シート特異的に凝集を阻害する能力がある可能性があり、神経変性疾患等のフォールディング異常病への応用が期待される。

和田グループは、当初の研究構想として、細胞内で新しく作られた分泌系のタンパク質がどのようにして運命を決定され遂行されるかの具体的な機構解明の一環として、特に、1) ミスフォールディングしてトランスロコンを逆輸送されるタンパク質に対する還元を中心とした unfolding のメカニズム、2) productive folding の機構の解明、3) このような過程での解析のための新たな方法論開発を行うことを目的とした。本研究の結果、以下に示す2つの大きな進展があった。

小胞体におけるカーゴタンパク質ダイナミクス解析 フォールディングが複雑な生理的な基質として、メラノソームに局在する **tyrosinase** に注目し、温度制御により成熟化を同期させることが可能であるとわかったので、その際の分子の動きを調べた。**tyrosinase** の正しいフォールディングにはカルネキシンサイクルの関与が必要となるが、これを欠損する場合には凝集により不動となる分子集団が増大することを、蛍光消光回復法 (FRAP) で示した。しかし、非許容温度では最大回復率には差が無く、拡散係数もほとんど変わらなかった。そこで、微小共焦点空間における蛍光強度の揺らぎから分子の滞在時間を計測する蛍光相関分光法(FCS)を応用して、小胞体内でのカーゴタンパク質ダイナミクスの解析が可能かどうかを検討した。その結果、非許容温度でミスフォールドしている状態ではサブミリ秒の単純拡散の成分が消失するが、より遅い動きは維持されていることが、明らかになった。さらに、ミスフォールディングを解消した **tyrosinase** 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向かい輸送された。このような研究の過程で、FCS の極めて高い時間分解能を利用して、生細胞内での翻訳開始に関与する因子の分子間相互作用の検出に用いた例も報告した。さらに、モノメリックな赤色蛍光タンパク **mRFP1** が開発されたので、GFP と同時に励起して共焦点空間での蛍光強度揺らぎの共相関関数を求めることにより、2 分子間相互作用の生細胞内での検出に用いる可能性を示した。これらの知見は、ミスフォールドしていても、不可逆的なミスフォールディングでない限りは、分子は小胞体内を自由に動くことができることを示唆している。

そこで、さらに 1 分子の動きを直接観察することで、起きている反応を理解するというアプローチを進めた。小胞体内腔に蛍光標識されたタンパクを発現して、エバネッセント光による分子照明により、単一分子の観察が可能かどうかを調べた。解析の結果、最も単純な蛍光タンパク質を内腔に発現するとほぼ単純拡散に近い値が得られたが、N 型糖鎖を 2 カ所に結合させた場合には極めて速い k_{off} で膜と相互作用することがわかり、これはカルネキシンとの結合によらず分子のフォールディングの状態とは関係なかった。このことは FCS によっても遅い成分の出現として確認された。この膜からの解離は ATP を必要とし、膜に結合した状態では膜上を単純拡散するが、その動きは細胞を高浸透圧下に置いた場合には拘束された。高浸透圧は k_{off} にはほとんど影響しない。このような糖鎖を 2 個以上持つタンパク質の高浸透圧による拡散抑制は FRAP でも観測され、F-アクチンが関係することを示した。また、misfold した膜タンパク質の場合に、条件によって flow として定義される動きが観察されることも見出した。また、2 色同時観察により COPII でコートされた小胞体輸送部位へのカーゴタンパクの訪問頻度を解析した結果、フォールディングが完了してい

も輸送シグナルを持たない分子は輸送部位には入れないことを示した。

小胞体におけるカーゴタンパク質成熟化に参与する新規分子の探索 分泌系カーゴタンパク質の成熟化因子を探すというアプローチを、**siRNA** ライブラリを用いて行った。**siRNA** は、小胞体タンパクをコードする約 **500** 個の遺伝子産物から薬物代謝関係、トランスロケーション・プロセッシングなど基本構造の形成に必須な成分を除いた、約 **300** 個の遺伝子をターゲットするライブラリを作成して、実験に用いた。これらを、フォールディングを同期させることができる **tyrosinase-YFP** を安定発現する **COS7** 及び **HeLa** 細胞に導入し、リソソーム・エンドソームへの移行の効率が低下した細胞を調べた。一次スクリーニングで影響が観察されたターゲットには、異なる配列をターゲットとして新たな **siRNA** を合成し、この二次スクリーニングでも影響が観察された小胞体タンパクを、**tyrosinase** 成熟化に必須な因子と見なした。その結果、**19** 個の新たな因子を同定した。これらは、フォールディングや輸送など関与する過程がこれまでの知見から容易に予想されるものが約半数を占めたが、その関与が全く予想できない因子も含まれていた。たとえば、**olfactomedin-1** は、オリゴマー構造から予想されるよりも異常に遅い拡散を行うことから、内腔での粘性の形成に関与するものと思えることを示した。実際に上記の **1** 分子ダイナミクス観測を行うと、内腔での単純拡散において強い拡散バリアとして働くことがわかり、おそらく **tyrosinase** の凝集を防ぐことで、非許容温度での **foldability** の維持に必要である可能性を示唆した。

また、シグナルトラップの手法により単離された小胞体に主に局在する **D12** というタンパク質の機能解析を行った。これは、解析の結果、**Q-SNARE** として分類され、**syntaxin18** や **Sec22b** 等に結合する。この分子の発現抑制は顕著な細胞死を起し、異常なりポフスチンの蓄積が認められた。そこでリソソーム分解酵素の局在について調べると、膜タンパクは正常であるにもかかわらず局在とプロセッシングの異常が観察され、この分子は、リソソーム分解酵素の分泌系での品質管理に関与することを示した。一つの可能性として、小胞体 **SNARE** が細胞膜と **hemifusion** の状態で膜成分を細胞膜に供給して新生タンパク質は外部には漏らさないというモデルを考え、小胞体 **SNARE** の関与を調べ、少なくとも **Syntaxin18** 等の小胞体 **SNARE** は **phagocytosis** を促進することを報告した。

森グループは、平成15年度までの参加であったが、異常タンパク質応答（UPR）に関して新たに **IRE1・XBP1** 経路を発見し、この分野に大きな成果を残した。

UPR 経路を介した小胞体品質管理機構：ATF6 経路と IRE1-XBP1 経路 小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積した場合、小胞体内の恒常性を維持するためには分子シャペロンの作用により巻き戻して修復する（リフォールディング）か、小胞体関連タンパク質分解機構 ERAD により分解して処理しなければならないが、森グループは、このリフォールディングと分解の仕分けの仕組みを解明することを目的として解析を行った。異常タンパク質の小胞体内蓄積に応答して、哺乳動物では2つの転写誘導機構（ATF6 経路と IRE1-XBP1 経路）が活性化されることを既に明らかにしていたが、本研究により、ATF6 経路が主として分子シャペロンの転写誘導を担っているのに対し、IRE1-XBP1 経路が分子シャペロンだけでなく分解機構において重要な役割を果たす因子 EDEM の転写をも制御していることを見いだした。

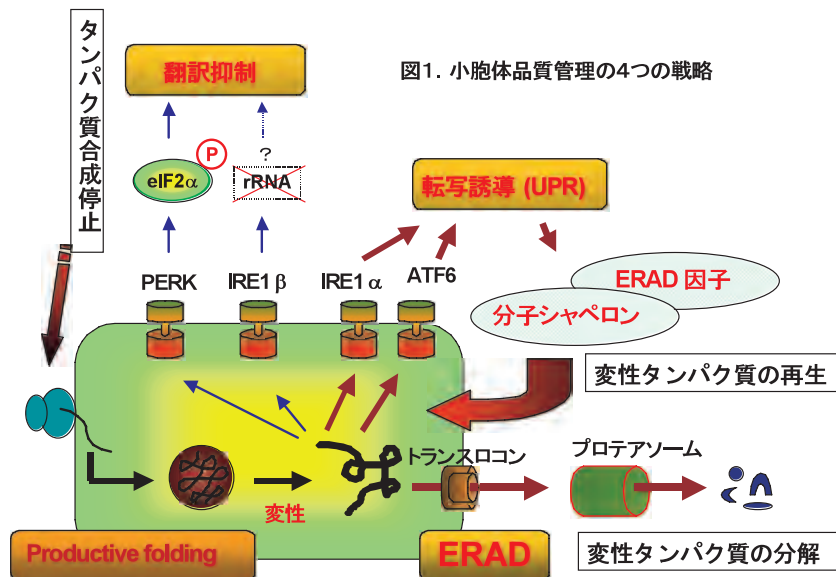
2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

タンパク質の正しい構造形成は、きわめて高度で複雑な過程を経てなされるものであり、細胞内ではその構造形成に失敗し、異常タンパク質となってしまうもの高頻度に出現すると考えられる。細胞内には、タンパク質の構造をチェックし、不良品が生じれば最終的な機能の場にまわすことなく処分するための、厳密で巧妙な品質管理の機構が用意されていると考えられている。

新生される全タンパク質の実に1/3は、分泌タンパク質および膜タンパク質として小胞体を経由するが、小胞体はこれらタンパク質の正しい構造形成に中心的な役割を果たすオルガネラである。翻訳と共役しながら小胞体に輸送されてきたポリペプチドは、フォールディング、ジスルフィド結合、糖鎖の付加およびトリミングをはじめとする種々の修飾を受け、正しくフォールディングしたタンパク質だけが小胞体からゴルジ体へと輸送される。この過程を productive folding と呼ぶ。一方、このような productive folding が破綻するような条件下では、分子構造に異常をきたしたタンパク質は、小胞体の中できわめて厳密な品質管理(quality control)を受けることが明らかになり、タンパク質の品質管理という側面から小胞体はもっともホットな研究対象となってきた。

小胞体における品質管理は、4つの過程にわけて考えることができる(図1)。正常な条件下では、a) productive folding が働いて新生ポリペプチドの正しい構造形成を担っている。しかし、糖鎖付



加が阻害されたり、変異タンパク質が発現したりして、異常タンパク質を蓄積するような条件下(小胞体ストレス)では、b) UPR (unfolded protein response) pathway が活性化されて、分子シャペロンが誘導され、小胞体フォールディング容量の増加と misfold タンパク質の再生がはかられる。同時に、c) 翻訳開始因子(eIF2α)のリン酸化を介して、多くのタンパク質の翻訳を一時的に抑制する。それ以上の異常タンパク質の合成を抑えることによってフォールディングの負荷を軽減するのである。それでも異常タンパク質の蓄積に対処できない場合は、d) それらをいったんサイトゾルまで逆輸送してユビキチン・プロテアソーム系で分解する、いわゆる小胞体関連分解(ERAD)

の系が働くことになる。

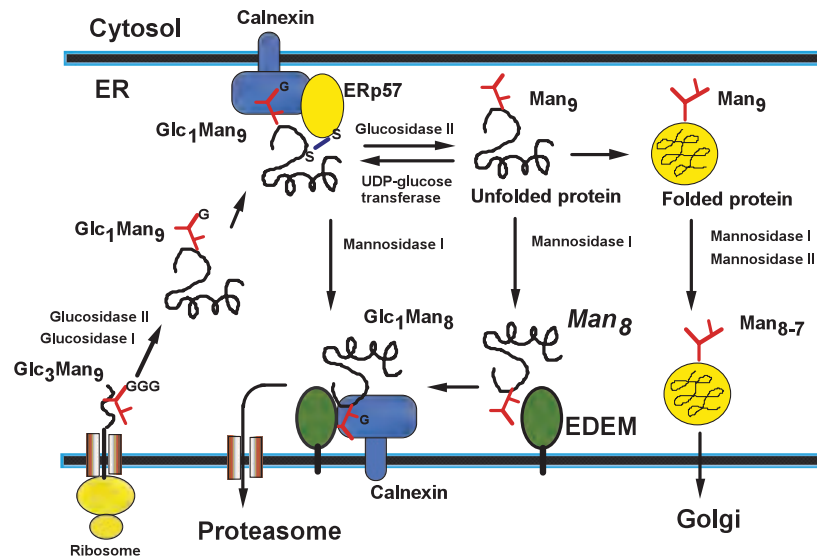
小胞体におけるタンパク質の品質管理は、工場などにおける製品の品質管理と驚くべき類似性を持っているが、一個の細胞において、このような幾重にも用意された品質管理機構が存在することは、タンパク質の正しい構造形成と、そのチェックおよび制御が、いかに細胞の生存にとって必須であるかを如実に物語るものである。本研究は、この小胞体におけるタンパク質の品質管理機構の詳細を明らかにすることを目的としてスタートした。

永田グループによる本研究初期の解析により、小胞体品質管理において EDEM というタンパク質が重要な鍵を握る働きを担っていることが明らかとなったため、和田グループと協力し、EDEM とカルネキシンサイクルとの関係をさらに詳細に解析した。これにより、基質は、カルネキシンを介してフォールディングし、ど

うしてもフォールディングできない場合に、マンノースが 8 個にまでトリミングされた後、カルネキシンから EDEM に受け渡されることを明らかにした (Science, 2003)。

さらに、EDEM に代表される分解系と、BiP に代表されるフォールディング助成系との使い分けについて調べる重要性となったため、森グループと永田グループの協力により、その発現制御に関して詳しく調べたところ、ATF6 経路は BiP に代表されるフォールディング助成系に、IRE1-XBP1 経路は EDEM に代表される分解系に、それぞれ重要な働きを担うことが明らかになった (Dev. Cell, 2001) (J. Cell Biol, 2006)。

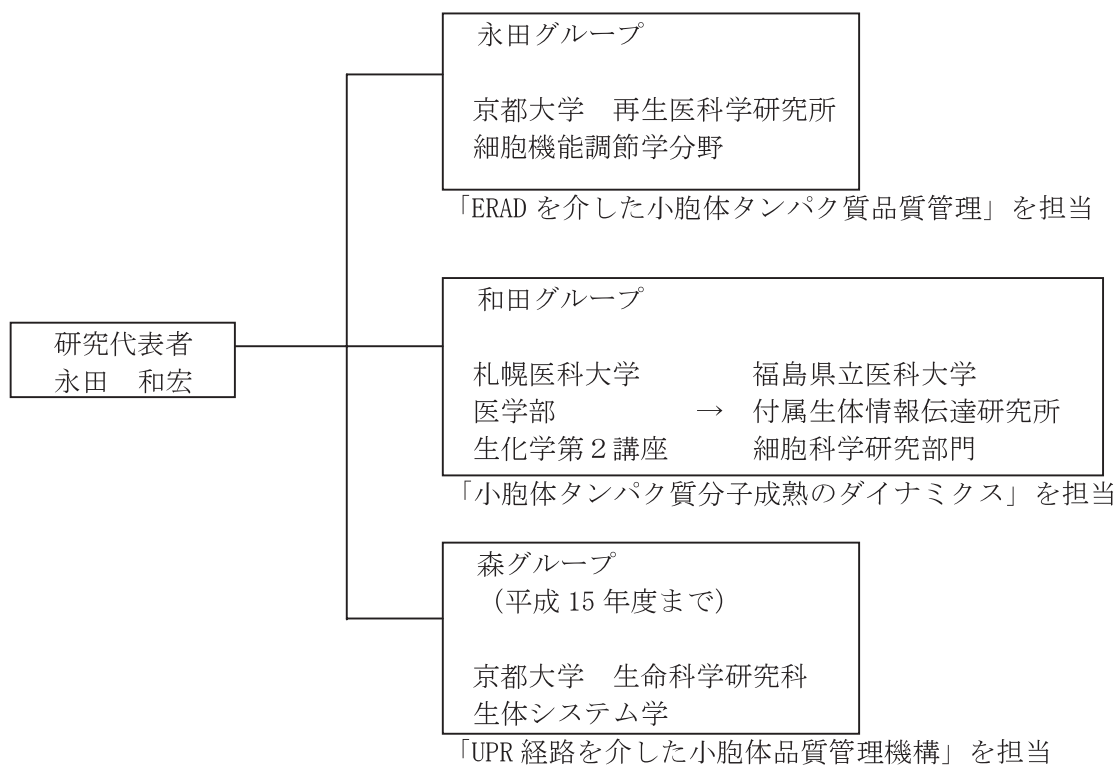
また、永田グループにおいては、ERAD の全体像を把握するため、その出入口であるトランスロコンの研究が必要となり、TRAP (Translocon-associated protein) が ERAD における逆行輸送に関与していることを明らかにした。さらに、この逆行輸送の際、分子内の SS 結合を切る必要があるが、その解析を進めた結果、ERdj5 が BiP 共役して、SS 結合の切断に関与することを示す知見を得た。続いて、サイトゾル側へ引き出された異常タンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム系で分解する必要があるが、このユビキチン化に GP78 という膜結合型ユビキチンリガーゼが寄与することを明らかにした。さらに、サイトゾルに引き出された異常タンパク質の品質管理にはサイトゾルの分子シャペロンが必要な可能性があるため、細胞質シャペロニン CCT の研究も行った。まず、インビトロの解析において、CCT が β シートタンパク質の凝集阻害効果をもつことを見だし (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006)、さらに、RNAi 法により CCT の量を低下させると、ポリグルタミンの凝集が促進され、逆に CCT を過剰発現させるとポリグルタミンの凝集が抑制されると共に神経細胞死を抑制することを見出した (Nat. Cell Biol., 2006)。



和田グループにおいては、小胞体内の異常タンパク質のダイナミクスを詳細に解析する必要が生じたため、小胞体内でのタンパク質のライブイメージング法の確立に力を注いだ。その結果、これまで非常に困難と考えられてきた、小胞体内での一分子観察に成功した。さらに、小胞体におけるカーゴタンパク質成熟化に関与する新規分子の探索を行い、**Syntaxin18** 等の小胞体 SNARE は **phagocytosis** を促進することを見出した(Mol. Biol. Cell, 2006)。

以上のように、3グループは互いに連携し合うことによって、小胞体タンパク質品質管理機構の詳細を明かにすることができた。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

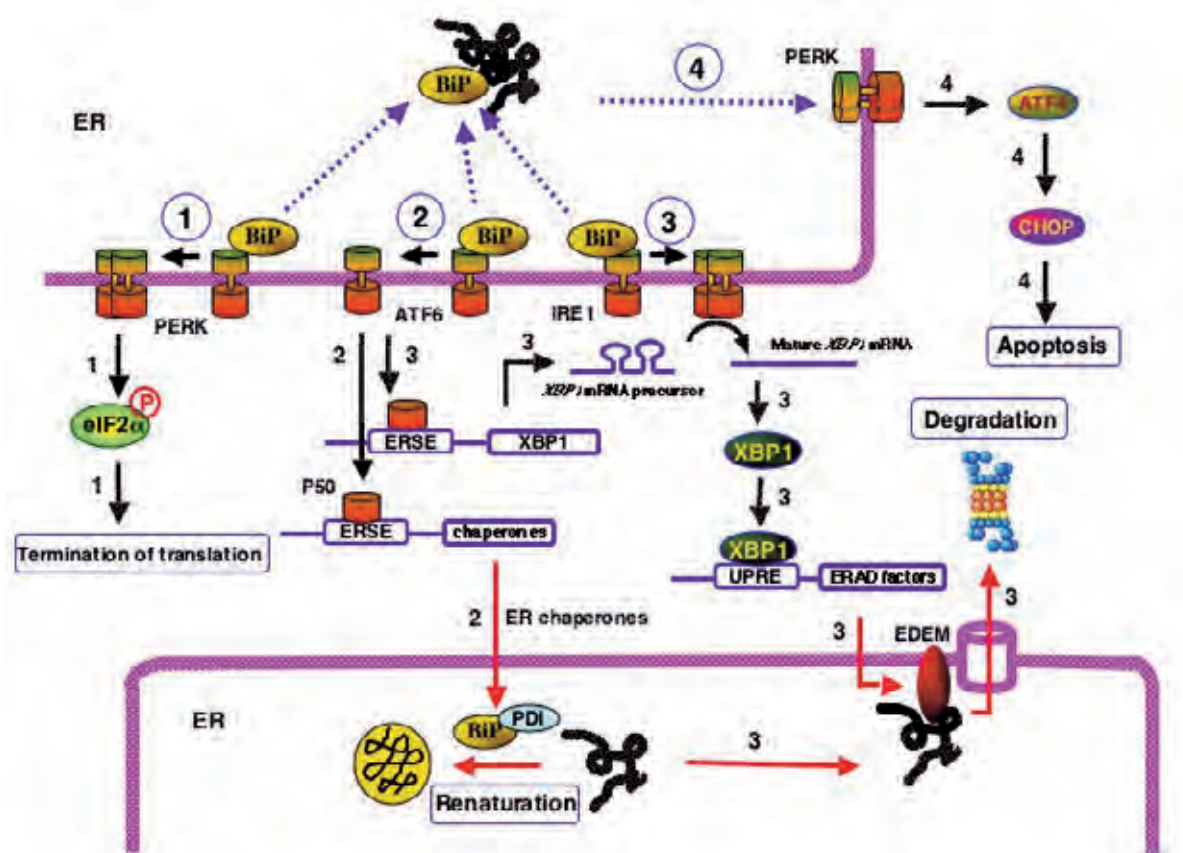
3.1 ERAD を介した小胞体タンパク質品質管理

(京都大学 永田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

(1)-1 EDEM を介した異常タンパク質の小胞体関連分解

小胞体にミスフォールドしたタンパク質が蓄積してくると、UPR (unfolded protein response) システムが活性化され、主として4つの品質管理機構が働き始める。まず PERK 経路を介した一時的な翻訳停止が働き、次に ATF6 経路を介した分子シャペロンの誘導が起こる。第3のステップでは、IRE1-XBP1 経路を介した小胞体関連分解(ERAD)因子の誘導合成が起こる。これらの経路では対応しきれない場合、最後の戦略として、PERK-ATF4 経路を介したアポトーシスが誘導される。このような一連の品質管理戦略



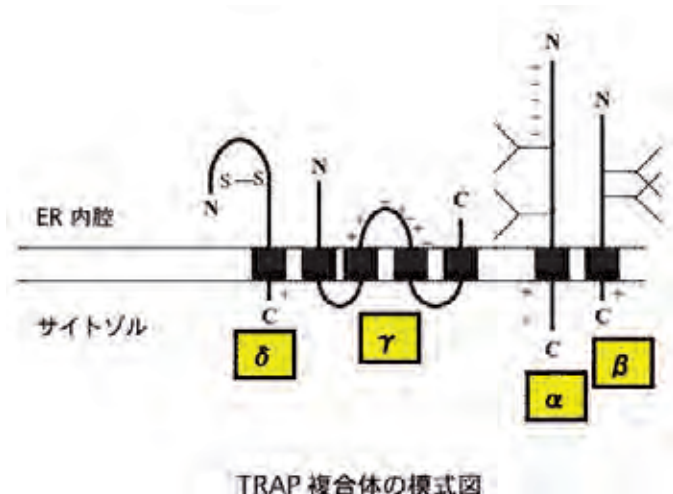
のもとに細胞は、ミスフォールドタンパク質の蓄積に対応している。本研究グループでは、EDEM と呼ばれる新しい小胞体関連分解因子を発見した。EDEM は小胞体中で Mannose 8B form の糖タンパク質を認識して、小胞体からサイトゾルへの逆輸送を促進し、ERADを促進する因子である。EDEMは正しくフォールディングされたタンパク質とミスフォールドしたタンパク質を見分け、ミスフォールドしたタンパク質のみを分解系へ持って行くことも明らかにした。特に基質は、カルネキシンを介してフォールディングし、どうしてもフォールディングできない場合に、マンノースが8個にまでトリミングされた後、カルネキシンから EDEM に受け渡されることを明らかにした。さらに、EDEM の過剰発現は、基質として用いたα1-antitrypsin NHK-variant の2量体化を抑制する働きがあることをも示し

た。その後、EDEM のホモログを新たに 2 種類発見し、EDEM2 及び EDEM3 と名付けた。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。EDEM1 と EDEM3 は、局在する組織が異なり、別々の細胞で EDEM ファミリータンパク質が機能していることも明らかにした。これらの研究結果は、EDEM とその関連タンパク質を介した ERAD 制御の詳細を明らかにしたものであり、小胞体品質管理の根幹をなすメカニズムの理解に大きく貢献するものであると考えられる。

(1)-2 TRAP によるミスフォールド ERAD の促進

TRAP (Translocon-associated protein) は、4 つのサブユニットからなる小胞体膜タンパク質である。TRAP は従来、小胞体にあるトランスロコンに会合するタンパク質として報告されてきたが、その本当の機能については、よくわかっていなかった言ってもよいと考えられる。我々は、初めに TRAP の 4 つのサブユニットが小胞体ストレスによって一斉に誘導されることを発見した。そこで、TRAP を RNAi によってノックダウンすることにより、その細胞内量を低下させて、ERAD への影響を解析した。すると、TRAP のノックダウンは、ERAD 機能の抑制をもたらすことがわかった。すなわち TRAP がミスフォールドタンパク質の ERAD

に促進的に作用することが示された。さらに、TRAP とミスフォールドタンパク質との相互作用を免疫沈降により解析したところ、TRAP は、ミスフォールドしたタンパク質とは結合するが、正しくフォールドした基質とは結合しないことが明かになった。興味深いことに、TRAP は、従来言われてきたように分泌タンパク質がトランスロコンを介して小胞体に挿入されるプロセスに関与するというよりは、ミス



スフォールドしたタンパク質が小胞体からサイトゾルへ逆輸送される際に働くことによって、ERAD を促進していると考えられる性質を示した。小胞体からサイトゾルへ逆輸送されるチャネルには、トランスロコンを通る説、及び Derlin がチャネルを作るという説、この 2 つの説が激しい議論になっているが、トランスロコンに会合する TRAP が ERAD に関係しているということから、逆輸送にもトランスロコンが働いていることを強く示唆するものである。よって、本研究で得られた TRAP に関する知見は、ミスフォールドしたタンパク質のサイトゾルへの逆行輸送に関し、トランスロコンを介した新しい経路の存在を示唆するものであり、新しい考え方を導入したものである。

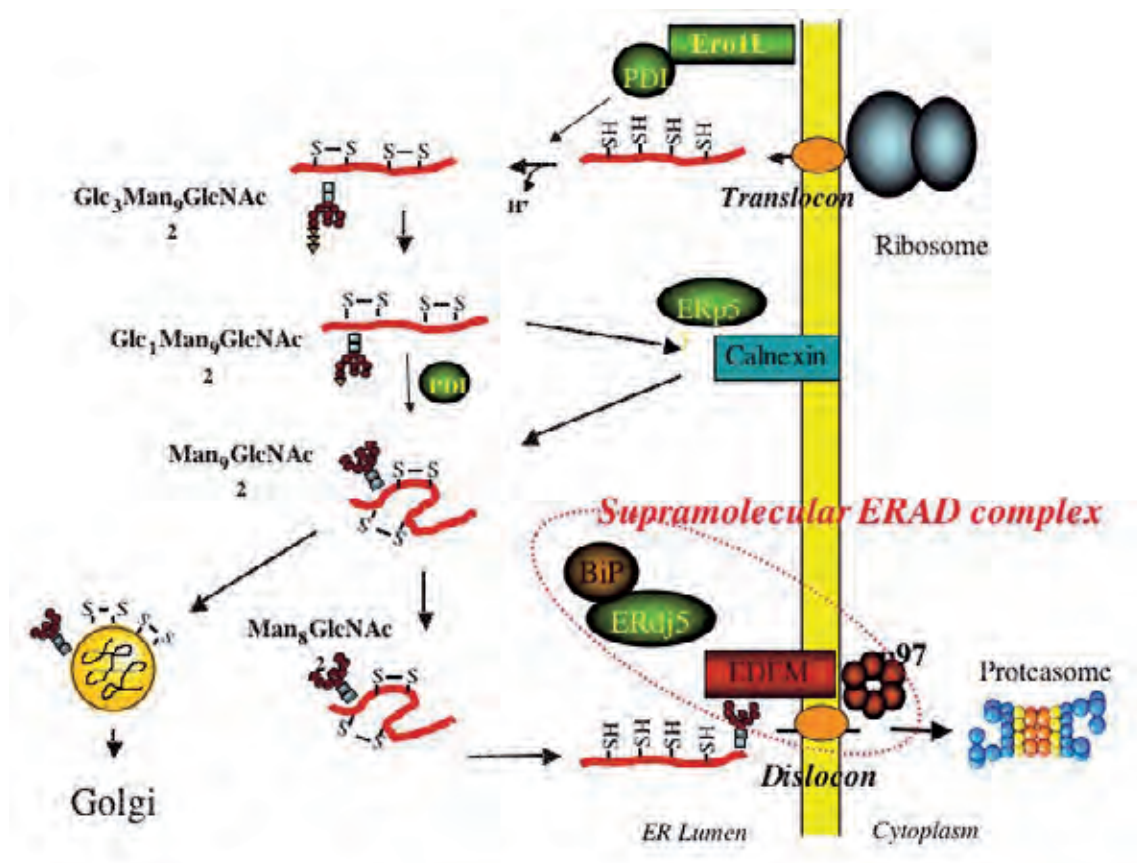
(1)-3 小胞体膜上に存在するユビキチンリガーゼ gp78 による ERAD の促進

小胞体から逆輸送されたミスフォールドタンパク質は、ユビキチンプロテアソーム系によって分解され、その際に E3 ユビキチンリガーゼによって、ユビキチンがミスフォ

ールドタンパク質に会合し、ポリユビキチン鎖を形成することによって、プロテアソームに認識されて分解される。我々は、嚢胞性繊維症(Cystic fibrosis)の原因遺伝子である CFTR を基質として、CFTR の ERAD に、小胞体膜上に局在する E3 リガーゼ gp78 が関与することを明らかにした。小胞体膜上には、gp78 の他に、HRD1 と呼ばれる E3 リガーゼも存在する。CFTR Δ F508 の ERAD には、HRD1 ではなく gp78 が関与していること、また基質と gp78 の結合には、gp78 上の CUE ドメインが関わっていることを明らかにした。さらに in vitro におけるユビキチン化実験において、gp78 はユビキチンがすでについている基質(モノユビキチン化基質)には、ユビキチンが付加されていない基質より、効率よくユビキチンを付加していく活性のあることを見出した。これはすなわち、ユビキチン鎖伸長因子(E4 酵素)と呼ばれる活性である。更に CFTR Δ F508 の E3 としては、CHIP がユビキチンリガーゼとして関与していることを明らかにした。これらの事実は CFTR Δ F508 の ERAD において、基質はまず CHIP によりモノあるいはオリゴユビキチン化され、さらに gp78 によってポリユビキチン化された後、プロテアソームによって、分解されることを示唆している。ミスフォールドタンパク質の ERAD に E4 酵素が関与することを示した初めての例である。したがって、異常タンパク質の ERAD を介した分解に関し、E3 と E4 の使い分けあるいは機能分担といった新しい考え方をもららしたのと言える。

(1)-4 小胞体ジシスルフィド還元酵素による凝集体形成阻止と ERAD 促進

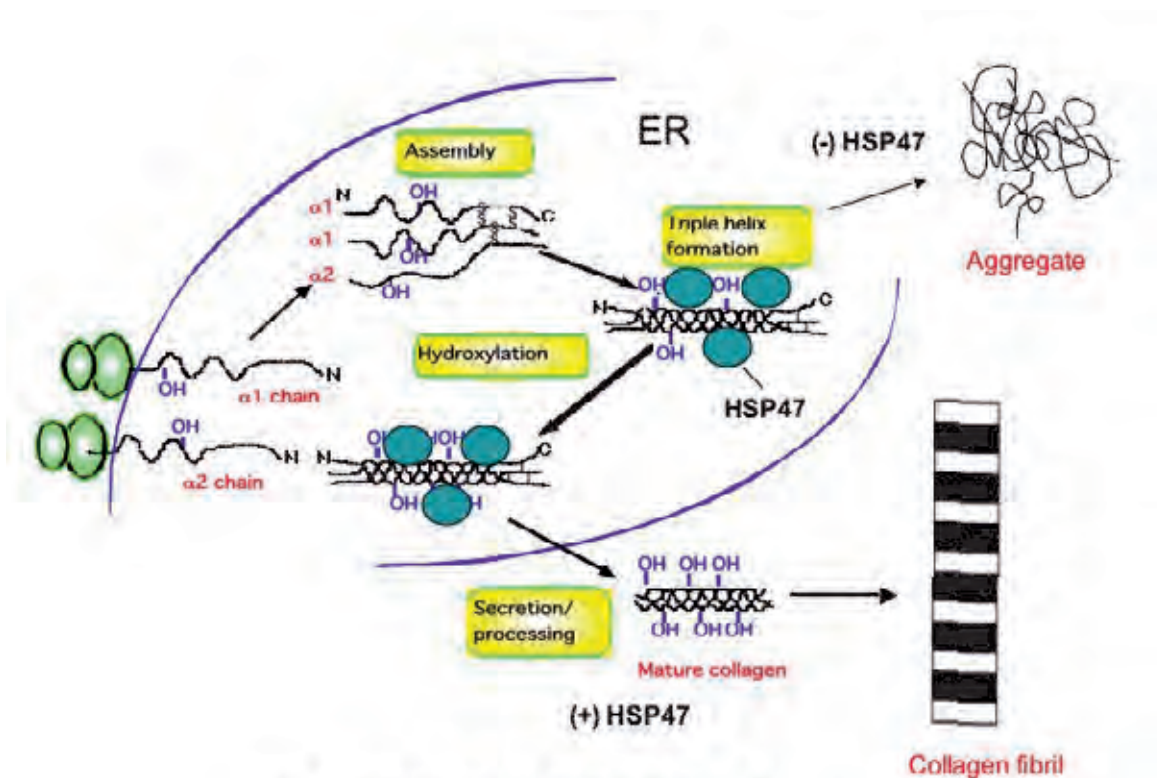
小胞体においてミスフォールドしたタンパク質が、トランスロコン(あるいはディスロコン)を介して、小胞体からサイトゾルへ逆輸送されるためには、ミスフォールドし



た基質のジスルフィド結合が還元されていることが必須である。さもなければ、高次構造をとりチャネルを通過することができない。ところが小胞体内は、強い酸化的な環境にあり、通常はジスルフィド結合の形成はなされるが、強い還元酵素の存在なくしては、その還元は考えられない。そこで小胞体におけるミスフォールドタンパク質の **ERAD** には、小胞体内のジスルフィド結合還元酵素が関わっていると、長い間考えられてきたが、これまでに小胞体内において、還元酵素の報告は全くなされていなかった。我々は、小胞体内におけるレドックス関連酵素 **ERdj5** が、還元活性を持つことを見出し、かつ **ERAD** を促進することを見出した。**ERdj5** を過剰発現すると、ミスフォールドしたタンパク質の **ERAD** が促進される。この時、ジスルフィド結合を介した基質タンパク質は、高分子からモノマーへのシフトが見られる。この高分子化の阻止と **ERAD** とは相関していた。かつ、**ERdj5** に 4 箇所存在する **CXXC** モチーフに変異を入れると、そのような還元活性はなくなった。**ERdj5** を精製し、*in vitro* で酵素活性を測定したところ、**ERdj5** は還元活性を持つことが明らかになった。小胞体におけるはじめての還元酵素である。興味深いことに、**ERdj5** は **J** ドメインと呼ばれる **HSP70** ファミリーの分子シャペロンが結合する領域を持っていた。小胞体内には、**BiP** と呼ばれる **HSP70** ファミリータンパク質が存在するが、*in vitro* で **ERdj5** の還元活性を測定すると、**BiP** が存在するとき、その還元活性が活性化されることが明らかになった。すなわち **ERdj5** の還元活性は、分子シャペロン **BiP** によって制御されているということが明らかになった。この **BiP** による制御は、細胞内でも示すことができた。**ERdj5** の過剰発現によって、**ERAD** は促進されるが、**J** ドメインに変異を入れ、**BiP** と結合できなくなった **mutant** を細胞に過剰発現させても、基質の高分子化は阻止されず、かつ **ERAD** の促進効果も見られなかった。すなわち **ERdj5** は、基質に結合し **BiP** による調節を受けて、基質のジスルフィド結合を還元し、1 本のポリペプチドにした後、小胞体からサイトゾルへ基質を逆輸送しているものと考えられた。さらに興味深いことに、**ERdj5** は我々の発見した **ERAD** の **key** 因子、**EDEM** とも相互作用することを明らかにした。このように **EDEM/ERdj5/BiP** が複合体を作ることにより、1 本のポリペプチドになった基質を、チャネルを通して小胞体からサイトゾルへ逆輸送するという、一連の過程が明らかになった。

(1)-5 Hsp47 欠損によるコラーゲンの凝集と小胞体ストレスの誘導

コラーゲン特異的分子シャペロン **HSP47** の遺伝子破壊によって、I 型コラーゲンの 3 本鎖ヘリックスの形成不全などが起り、コラーゲン繊維および基底膜が形成されず、マウスは胎生致死となることは、永田グループの研究により、すでに明らかとなっていた。本研究では、まず初めに、**HSP47** ノックアウトマウス胚の詳細な解析を行い、基底膜に **IV** コラーゲンが蓄積できなくなることを見出した。さらに発生が進むと、その影響により基底膜が断裂した。さらに、**CHOP** の誘導を介したアポトーシスがおこり、これにより胚が死んでしまうものと考えられた。そこで、**HSP47** によるプロコラーゲンの **productive folding** のプロセスを明らかにするため、すでに樹立済みの **HSP47** 欠損細胞株を用い、**HSP47** の欠損によって、基質プロコラーゲンの分子構造にどのような異常が起こるかを解析した。その結果、**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。**HSP47** 欠損細胞株では、**IV** 型コラーゲン分泌速度が低下し、分泌されたコラーゲンもプロテアーゼ感受性の検討から正しい 3 本鎖形成ができていない

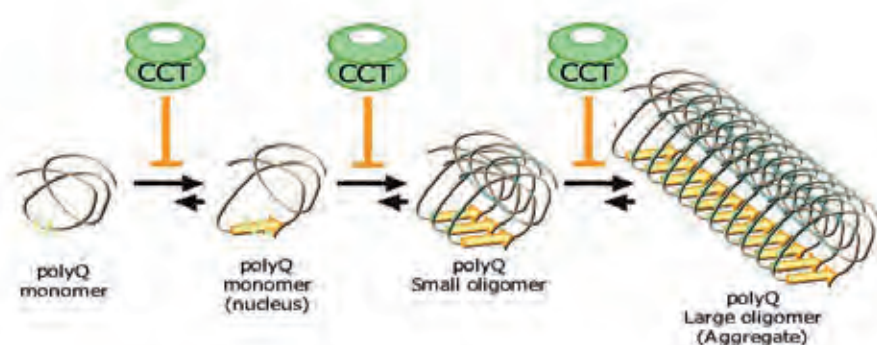


コラーゲンの成熟とHSP47の働き

ことがわかった。さらに、HSP47 ノックアウト細胞においては、分泌された I 型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た。すなわち、細胞外で太いコラーゲン繊維を形成できず、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していることがわかった。さらに、細胞内においても、小胞体内に蓄積したコラーゲンは、凝集体を形成しており、小胞体ストレス応答が引き起こされていることもわかった。これらの知見は、HSP47 がコラーゲンの生合成直後のに必須であり、productive folding に重要な働きを示すことを明らかにしたものである。

(1)-6 細胞質シャペロニン CCT によるポリグルタミン凝集および毒性の抑制

細胞質シャペロニン CCT は、カゴ状の構造をもった分子シャペロンで、真核細胞の細胞質においてタンパク質のフォールディングを助ける。タン



CCTによるポリグルタミン凝集の抑制

パク質内で伸長したポリグルタミン鎖は、 β シートを介したタンパク質凝集により、ハンチントン病のような致死的な病を発症させることが知られている。本研究において、RNAi 法により CCT の量を低下させると、ポリグルタミンの凝集が促進され、逆に CCT を過剰発現させるとポリグルタミンの凝集が抑制されると共に神経細胞死を抑制することを見出した。さらに、蛍光相関分光(FCS)方により、CCT 量の低下はポリグルタミンの凝集状態を変化させ可溶性の凝集体の増加をもたらすことがわかった。よって、CCT は初期の可溶性の時点でのオリゴマー形成の阻止に働いている可能性が示唆される。また、インビトロの解析においても、 $G\beta$ を基質として用いた実験から、CCT には β シートタンパク質の凝集を直接阻害する能力があることも見いだしており、CCT は β シート特異的に凝集を阻害する能力がある可能性がある。したがって、ポリグルタミン病以外でも、神経変性疾患等のフォールディング異常病の防止や治療に役立つ可能性があり、その応用が期待される。

(1)-7 MKKS タンパク質の解析

発生異常を主徴とする 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期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れば、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。

(2) 研究成果の今後期待される効果

タンパク質の品質管理という機構自体、その概念が提唱されたのは古いことではなく、現在も世界中の第一線の研究者が、その研究に力を注いでいる状態である。その中でも小胞体における品質管理機構は、最も重要な課題と考えられる。小胞体における品質管理機構においては、productive folding と分解が、いずれも UPR pathway を介してカップルし、互いに制御されているなど、きわめて巧妙なシステムを持っていることが特徴である。本研究においては、ERAD における EDEM とそのファミリータンパク質の機能の詳細を明かにし、さらに、EDEM とカルネキシンサイクルとの共役という重要な知見を得ることに成功した。すなわち、小胞体において異常タンパク質と正常タンパク質を見分ける機構の鍵を握る部分を解明したものである。よって、この研究分野への科学的貢献は非常に大きいものであると考えている。

アルツハイマー病を初めとして、ハンチントン病などの種々の神経変性疾患は、いずれもタンパク質の正しいフォールディングが破綻をきたしたために起こる病態であることが明らかになってきているが、神経変性疾患だけでなく、タンパク質の変異によって正常な構造形成が阻害された結果、様々な病態の生起することが多くの例において示され、これらは「フォールディング異常病」という新しい概念でくくられるよ

うになった。その例は現在でも続々と増え続けており、タンパク質の品質管理機構を明らかにすることは、これら病態を理解し、その治療戦略を練るうえでも避けることのできない課題となってきた。

本研究においても、タンパク質のフォールディング異常により神経細胞死を起こすことが知られるハンチントン病に関し、その原因となるポリグルタミンタンパク質と細胞質シャペロニン CCT の関連について研究を行い、CCT がポリグルタミンタンパク質の凝集と細胞毒性を抑制するという画期的な作用を発見するに至った。この研究から得られた知的資産は、そのまま特に臨床分野において社会貢献することが大きく期待される。

HSP47 はコラーゲン特異的分子シャペロンであるが、本研究により明らかとなった HSP47 による productive folding 促進の知見は、コラーゲン生合成時の品質管理機構を明らかにすることに大きく貢献したといっても過言ではない。今回得られらた HSP47 のもつコラーゲン産生に必須の機能の知見は、裏を返せば、HSP47 の機能を抑制することで、いまだまったく治療法の確立していない繊維化疾患の治療に応用できる可能性を示唆するものといえる。

また、現在も進行中のテーマである「小胞体においてミスフォールドしたタンパク質が、どのようにトランスロコンを介して、小胞体からサイトゾルへ逆輸送されるのか」は、非常に重要な課題である。今回の研究で明らかになりつつある、小胞体内におけるレドックス関連酵素 ERdj5 が BiP と共役してこの逆行輸送を促すシステムは、今後の詳細な解析により、小胞体品質管理機構の研究にとって非常に大きなブレイクスルーを生むものと期待される。

よって、本研究における成果は、タンパク質品質管理機構全体の理解にも大きく貢献できるものであり、さらに進化の過程で、どのように品質管理が普遍的に保持されてきたのか、また個別の発展を遂げてきたのかという問題に関し、その包括的な理解に重要な礎を築いたものと考えている。

3. 2 小胞体タンパク質分子成熟のダイナミクス (札幌医科大学～福島県立医科大学 和田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

(1)-1 モデル分泌タンパク質の成熟化の生化学的検討

モデル分子として、当初は α_1 アンチトリプシン^{NullHongKong}変異体を用いて、pulse-labeled した細胞 (HEK293) から調製したミクロソームを用いた場合に、膜外への逆輸送が見られるかどうかについて、検討を行った。この目的は、膜外逆輸送・分解に必要な因子の探索のための再構成であったが、細胞質添加による弱い分解促進は得られたものの、基質ジスルフィドの還元や脱糖鎖反応は検出できず、また、incubation の際のミクロソーム膜自体の不安定性が問題となり、このシステムでの解析は断念した。

その他のモデル系の探索の結果、より検出が容易なモデル分子として、フィブリノーゲンに注目した。この蛋白は、 α 、 β 、 γ サブユニットからなり、それぞれジスルフィド結合により共有結合した 6 量体 ($\alpha\beta\gamma$)₂ として分泌される巨大な分子であり、肝臓から分泌される糖タンパクとして最も生合成量の多いものの一つである。6 量体完成時点には 29 組のジスルフィド結合が形成される。これは古くからタンパク質科学による構造決定の対照となり、構造的な解析は最も速く進んだ蛋白の一つであるものの、その生合成過程については、余りよくわかっていない。

パルス・チェイス実験を用いた常法による生化学的な解析により、まず、その productive folding 過程としてオリゴマーのアッセムブリーについて分析した。その結果、すでに報告されているように、細胞内で既に会合した $\alpha\gamma$ 鎖に、新たに合成された β 鎖が取り込まれることは確認したが、全体のフォールディングの kinetics を考えた場合、この過程は、ほとんど翻訳と同時に起こり、反応の律速段階としては、これにより形成された互いに共有

結合した 3 量体 $\alpha\beta\gamma$ が、6 量体に変換される過程であることを示した (図 1)。ヒト肝ガン細胞である HepG2 細胞の場合では、他のサブユニット会合過程はほとんど翻訳と同時に完了するのに、この変換過程だけが 60 分以上かかり、変換効率が極めて低い過

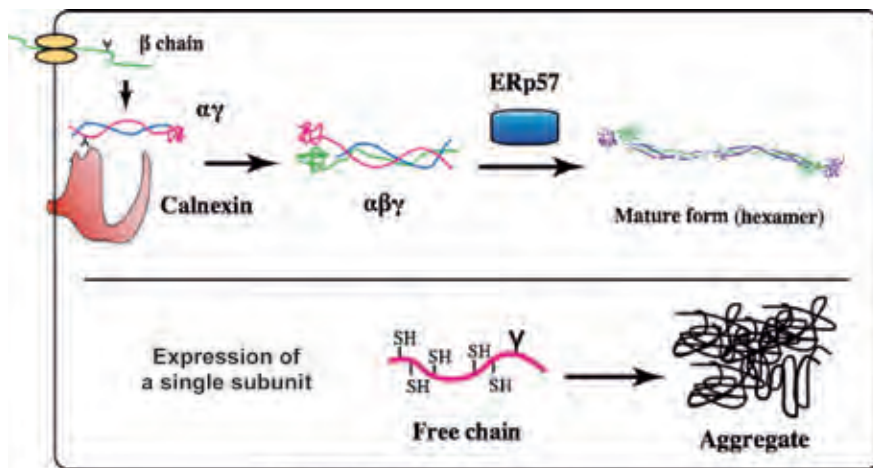


図1 ファイブリノーゲンの成熟化

程であることがわかった。さらに、この過程は、 α グルコシダーゼ阻害剤による遅延が起こり、カルネキシンサイクルがある程度は関与することが示された。

この過程は、基本的にジスルフィド結合の再編であるので、この中間体である 3 量体に一時的に共有結合するポリペプチドイソメラーゼファミリーが関与すると考えて、この中間体の免疫沈降などを調べた結果、ERp57 が特異的にこの 3 量体に結合し、さらに、過剰発現では、この過程を促進すること等から、この変換自体は ERp57 が、おそらくカルネキシン上において触媒することで、生理的な機能を持つ 6 量体を形成していると結論した (以上、

投稿中)。

次に、なぜ、このような複雑な会合過程を取るのかを調べた。まず、これらの生合成の直後に3つのポリペプチドが同時に会合することはできないかを調べたところ、もしそれが起きた場合には、巨大な凝集体を形成することがわかった。単独のサブユニットのみを発現した場合、あるいは、 $\beta\gamma$ のみを発現した場合でも同様であった。これらのミスフォールドしたファイブリノーゲンサブユニットは、TritonX100に可溶性、すなわち凝集性の低い分子に関しては、Mannosidase I/EDEMの経路によるマンノーストリミングに依存する逆向輸送によってプロテアソームに分解されることが示された。

しかし、TritonX-100に不溶性の巨大な凝集体を作った凝集体の場合は、むしろ小胞体から輸送されてリソソームによる分解を受けることが示された(図2)。様々な阻害剤と、免疫染色などによる解析により、この過程は、Sar1依存的な輸送であることを明らかにした。これが、オートファジーによるものではないかとの検討は、様々な角度から行ったが、その関与の可能性は大きくないものと結論された。さらに、このような巨大で不安定な構造を持つ分子がCOPII

経路で輸送されるためには、何らかの選択的な仕組みが必要であると考えた。そのような性質を持ち得るいくつかの候補タンパク質を検討した結果、SortilinとよばれるVps10ファミリーに属するリソソームタンパク質の関与

の可能性がもっとも高いことを示した(図2)。sortilinはTGNにおいてリソソーム分解酵素などのリソソームへの輸送を促すことが知られており、同時に、これは極端に疎水性の高いプロドメインを持つタンパク質の小胞体からの輸送を促進することが報告されている(J Biol Chem (2003) 278, 26311-26314)。これらの知見は、小胞体で、膜を介した逆向輸送ができない巨大な凝集体の場合には、sortilinのような受容体を介して小胞体から積極的に排出する可能性を示し、これまで記述されたことのない新たな分子機構が存在することが示唆された。(投稿準備中)

なお、凝集性の低いTritonX100に可溶性のミスフォールドしたフィブリノーゲンサブユニットの(プロテアソームによる

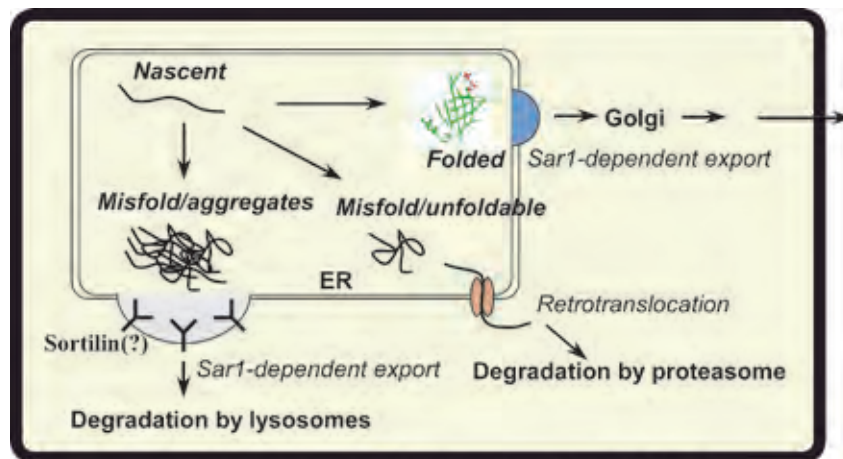


図2 ファイブリノーゲン凝集体はリソソームに輸送される

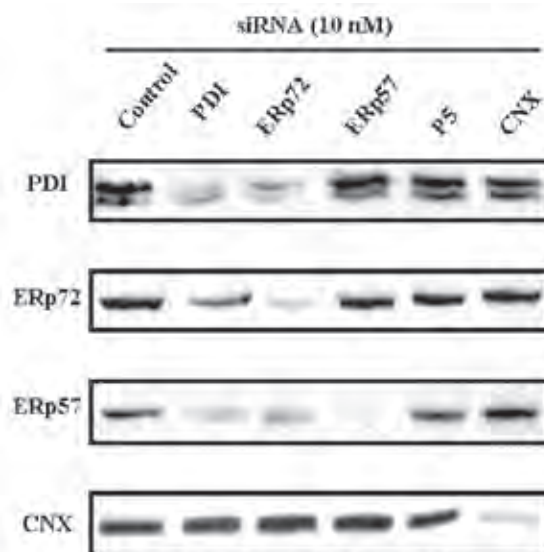


図3 個々のPDIファミリーの発現抑制は他のファミリーメンバーの発現に影響を与える

分解に先立つ) 逆向輸送に必要と思われる、ポリペプチドジスルフィドイソメラーゼ(還元)活性の関与についても検討を行った。しかし、この過程を調べるためには、小胞体内腔に様々なタンパク質を発現して調べていたところ、その分子性質にかかわらず、おそらく molecular crowding の効果により過剰発現自体によって著しい影響を示し、一方、siRNA を用いた発現抑制による検討もこれらのファミリーのいくつかが連動して変動したために(HeLa 細胞における siRNA の効果について図 3 に示した)、このような生化学的な解析で正確な生理的機能の解明を行うことは困難であると判断して、この方向でのアプローチは中断した。基本的に、カーゴ分子の運命は、その分子ダイナミクスを詳細に追い、解析することができれば機構を知ることも可能なはずなので、下記のような、生細胞での非侵襲性の解析法の開発を待つこととした。

(1)-2. 生細胞での分子ダイナミクスの解析

a) 細胞内でのフォールディングを同期させるモデル分子としてのチロシナーゼを用いた検討

現時点では、生きた状態での細胞において、非破壊的に分泌系カーゴタンパク質の成熟化過程を調べるには、フォールディングの状態を同期させるしかない。この目的では、これまではウイルス由来細胞膜タンパク質 VSV-G (vesicular stomatitis virus glycoprotein)の温度感受性変異分子(ts045)を使う方法が用いられてきたが、この分子のフォールディングは、比較的シンプルでカルネキシンサイクルもほとんど必要としない。そこで、フォールディングがカルネキシンサイクルに依存する生理的な基質として、メラノソームに局在するチロシナーゼに注目した。このメラニン産生を触媒する膜タンパク質は、多くのジスルフィド結合を持つ銅結合タンパクであり、非メラノサイトにおいてはリソソーム-エンドソームに局在し、野生型でもフォールディングの完了において極めて鋭敏な温度感受性を示す。さらに、この分子のフォールディングの状態は、L-DOPA を基質とした発色反応で容易に知ることが可能であり、小胞体からのリソソームへの輸送の有無と併せることで、分子の構造とそれを認識する機構側の解析が容易となるはずである。

解析の結果、39-40 度では分子はミスフォールドして L-DOPA 酸化活性を獲得できず、小胞体に蓄積するが、37 度にするフォールディングを再開してリソソームまで移行するので、このわずかに数度の温度変化によって成熟化を同期させることが可能であることがわかった。その際の分子の動きを調べたところ、この過程でのカルネキシンサイクルの関与は絶対的であり、これが機能しない場合には、凝集して観測時間内ではほぼ不動となる分子集団が増大することを、蛍光消光回復法 (FRAP)で示した。この非許容温度における可逆的なミスフォールディングは極めて安定で、何日も維持することができ、安定発現細胞すら単離することができた。なお、この状態もまた、カルネキシンサイクルの関与を絶対的に必要とした。

この「安定なミスフォールディング」という状態に、我々は興味を持ち、どのような状態にチロシナーゼがあるのかを次に調べた。蛍光消光回復法(FRAP)測定では、この状態でも、フォールドした状態と最大回復率には差が無く、拡散係数もほとんど

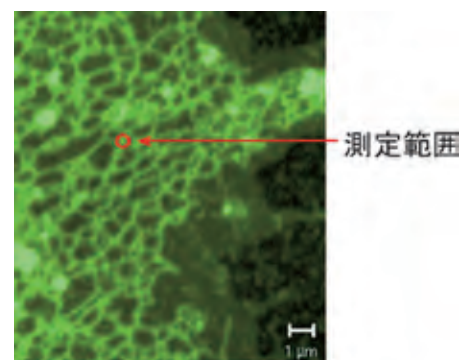


図4 FCSでの観測領域

変わらなかった。そこで、詳細な分子ダイナミクスを調べるために、微小共焦点空間（図 4 ではそのスケールを示す）における蛍光強度の揺らぎから分子の滞在時間を計測する蛍光相関分光法(FCS)を応用して、小胞体内でのカーゴタンパク質ダイナミクスの解析が可能かどうかを検討した。FRAP の時間分解能は事実上、数十ミリ秒程度しかなく、しかも解析は事実上一つの同じ速度の分子集団からなると仮定して行うが、ブラウン運動はそれよりも 100-1000 倍程度速く動くため、もし単純拡散に対する制御がある場合には判定がつかない。

最初に、どの程度の発現量であれば FCS で計測が可能かどうかを、測定時間におけるフォトブリーチングの度合いをパラメーターとして測定して検討した。その結果、発現量とフォトブリーチングとの間には、図 5 に示すような相関があり、領域で分子が飽和しないためには、1fL 内に 100 個以下であることが必要なこと、言い換えれば、これ以上の発現では、**molecular crowding** による非生理的な状況が作られていることを示した。

この測定結果からすると、通常の試薬を用いた発現ではほとんど極端な **molecular crowding** になっていることを示唆するので、新たに作成した手法 (Mol Biol Chem (2002) 13, 302-316)であるシリコン化したマイクロガラスビーズを用いて直接プラスミド DNA を細胞内に打ち込んで、2-3 時間後に観察するという手法によって、極微量の発現時におけるチロシナーゼの状態を調べた。興味深いことに、非許容温度で生合成したこのタンパク質は、**BrefeldinA** で小胞体からの輸送を止めた細胞で観察したフォールディングされたものとは異なり、図 5 に示したような化学的に固定された細胞での状態と類似の状態を示し自己相関関数を取ることができず、ただし、FRAP では明らかに **mobile** であるという、特殊な状態を取っていることが示された。さらに、 α -グルコシダーゼの阻害剤の存在下で非許容温度におくと、フォールディングの可逆性はたちまち失われてしまうが、この場合には、図 5 のようにフォトブリーチングの状態を測定しても、正常とさほど変わりの無いように見える自己相関関数を示した。ただし、この、フォールディングの可逆性を失っている場合には、FRAP で測定すると最大回復率の大きな低下が見られ、凝集が起きていることがわかった。ミスフォールディングを解消した **tyrosinase** 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向かい輸送された (以上、J Biol Chem (2004) 279, 51533-21542)。

b) 小胞体内腔における分子ダイナミクスの 1 分子レベルでの研究

分泌装置を理解するために必要な小胞体内腔での現象の解明は、細胞質側での反応機構の解明に比べてより困難で進展も遅く、誤謬を招きやすい傾向にある。これは主に、小胞体内での反応が細胞質に比べてさらに明確に非平衡であり、また、小胞体内腔の容積は細胞の容積に比べてずっと小さくしかも一定しない、という構造要因による。内腔の容積を正確に求めることは大変困難だが、単純拡散する分子を使って調べた結果とモンテカルロ・シミュレーションによるモデリングの結果から比較すると、モデルとされる培養細胞系では、小胞体内腔の容積は細胞質空間のおおよそ 1 割以下であることが知られている。従って基本的に細胞質での反応解析の手法をそのままこのような微小空間における分子機構の解明に応用するには、極めて慎重な検討が必要とされる。

実際、過剰発現を行って影響を観察するという我々も行ってきた通常の手法の場合、基質濃度と新たに加えた分子濃度の比を、生理的な状態に保つのは容易ではなく、どちらかが凌駕するという状態にしばしば陥り、得られた結果の評価が困難である場合も珍しくない。図 5 の FCS 測定の際のフォトブリーチングの解析は、どの程度で混雑度が限界に達し、

揺らぎがほとんど起こらないという飽和の状態になるかを調べたものだが、通常の実験に用いる発現レベルで容易に非生理的な状況に陥ることを示している。さらに、反応は基質濃度により決定されるが、内腔での反応の場合、特に個々の分子の濃度についてはほとんど正確な推定が不可能であり、このため、溶液中で再現されても、それが実際に生きている細胞内で起きているかどうかの判定は特に難しい。

分泌系タンパク質の成熟化過程においてもっとも理解しがたい現象の一つには、上記のチロシナーゼにおいても観察され、最初に VSVG において報告されたもの (Nature Cell Biol (2000) 2, 288) で、正しい立体構造の形成が許されずにミスフォールディングした状態にあるカーゴタンパク質が、不可逆な凝集体を形成せずに可動性を維持し、温度の低下に伴い、速やかに立体構造を再編して正しい安定な構造に変換できるという現象である。そもそも、小胞体内腔において内腔膜表面に不安定な新生タンパク質が、なぜそれぞれ異なる独自のキネティクスにより大きな破綻もなく成熟化して、ER exit sites というマイクロドメインに到着するという作業を連続的に行えるかは、個別の重要な成熟化に関与する因子が明らかになった現在でも、ほとんど理解することが難しい。

そこで、我々は、このような小胞体内での反応過程を理解するためには、生きた状態において、できる限り生理的に近い濃度で発現する個々の分子の挙動と運命を解析するための新しい方法論が必要であると考えた。その分子の運命は、その分子自体を直接追うことで知ることができる。そこで、小胞体内腔での 1 分子を直接可視化するという方法を探った。1 分子ダイナミクスは、上記のような FCS によっても、滞在時間に関する情報は得ることができる。しかし、conventional な FCS ではある空間内に滞在する 1 分子単位での蛍光変化を極めて高時間分解能で解析するが、微細な空間的情報については事実上、得ることができない。さらに、並進拡散と他の光化学的な反応の識別は明確ではなく、特に膜タンパク質の場合には、自己相関関数の中に、レーザー光の偏光特性のために回転の要素が加わることもあり、成分解析が容易ではない。実際に、膜タンパク質において観測される自己相関関数には、拡散だけでは説明の付かない成分の関与が非常に大きく含まれ、現時点ではそれらに対する理論的な検討がまだきちんと整備されていない。加えて、現在の FCS では、どうしても数十秒単位での平均化して個々の分子の動きを均すという作業が必要なために、1 分子反応解析という点では、あまりにもタイムスケールが大きい。

このために、1 分子を直接観察する方法について、別の手法の応用を考えた。細胞膜の分子に対しては、カバーガラス面からの距離に対して指数関数的に減衰するエバネッセント光による照明を利用する全反射顕微鏡を使うことで、1 分子を直接観察することは一般的に行われ、CCD の性能に依存した時間分解能で、生細胞での 1 分子ダイナミクスの解析が可能である。エバネッセント光は、用いるレンズの NA と励起波長により届く範囲が規定され、溶液では 200nm 程度しか照射範囲にないが、細胞内のように光の散乱した空間においては、より深度にまで照射範囲が届くことが知られている。実際に、この手法は細胞膜の裏打ち構造の観察などにも利用されてきた。このようなことを考えると、小胞体は細胞膜に結合しているので、エバネッセント光による分子照明は可能なはずである。ただし、斜光照明を利用した核膜孔を透過するタンパク質の解析を除いて、細胞内部での構造体での 1 分子の直接観察に用いられた例は知る範囲ではない。

そこで、小胞体内腔に蛍光標識されたタンパクを発現して、単一分子の観察が可能かどうかを調べた。その結果、時間分解能を十数ミリ秒程度以下にした場合には、一段階ブリ

ーチングをする小胞体内での単一分子を観察することが固定した細胞で確認され、1 分子の直接観察が可能であることがわかった。生細胞でのストリーミング撮影を行ってみると、モデル膜タンパク質の場合でも、細胞膜蛋白と比較して観察される時間がごく短く、照射領域に分子が頻繁に出入りしていると考えられた。これは小胞体の z 軸方向の厚みがエバネッセント光の有効照射領域よりも大きいからと考えられ、分子は照射される領域に自由に出入りできることが予想された。このために、通常的全反射顕微鏡による並進二乗拡散による解析だけでは、速い動きを示す成分が正しく反映されない。

そこで、新たな解析法を検討した。小胞体内での x-y 平面での動きがブラウン運動と見なせる場合には、このエバネッセント光で照射される領域からの消失の速度、すなわち分子の生存（滞在）時間の分布は、1 次元のブラウン運動における通過（滞在）時間解析として近似できるはずである。すなわち、1 次元での照射領域の通過時間の場合、a)エバネッセント照明の領域を [0, l] の空間としてタンパク質は 0 の方から入ってきて a よりも内側に来たときに初めて観察できる、b)これがもっともカバーガラス面に近い小胞体膜にぶつかった場合には同じ速度で跳ね返る、c)分子は z 軸のゼロよりマイナス方向に自由に拡散でき、跳ね返ってこない、と仮定する。この場合の [a, l] に滞在する顆粒の滞在時間 t の分布関数 P(t) は、下記のようになるはずである。

$$P(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi t^3}} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \left[(2nl+a) \exp \left\{ -\frac{(2nl+a)^2}{2t} \right\} + (2nl+l-a) \exp \left\{ -\frac{(2nl+l-a)^2}{2t} \right\} \right] dt$$

なお、この場合、分子の拡散係数は 1 とする。異なる速度で拡散する分子の場合は、通過時間 t に係数 d_A を乗じたものになるので、この係数 d_A を求めることで、空間因子である [a, l] が不明なため絶対値ではないにしてもすべての測定で同じと仮定すれば、分子の相対的な拡散速度は知ることができる。この関係は実際にモデル分子を用いた測定で確認された。また、x-y 平面での分子の動きは、時間 t の間における変位が $[\Delta x, \Delta y]$ であるとする、並進二乗拡散 $\langle \Delta x^2 + \Delta y^2 \rangle = 4Dt$ の関係から、拡散係数 D を算出することができる。この二つの解析によってより深部での全反射顕微鏡データの解析を行った（図 6）。この場合、もし同じ存在様式のタンパクで並進二乗拡散が同じでも生存時間が一方で短い場合には、（結合）反応が存在することを意味する。

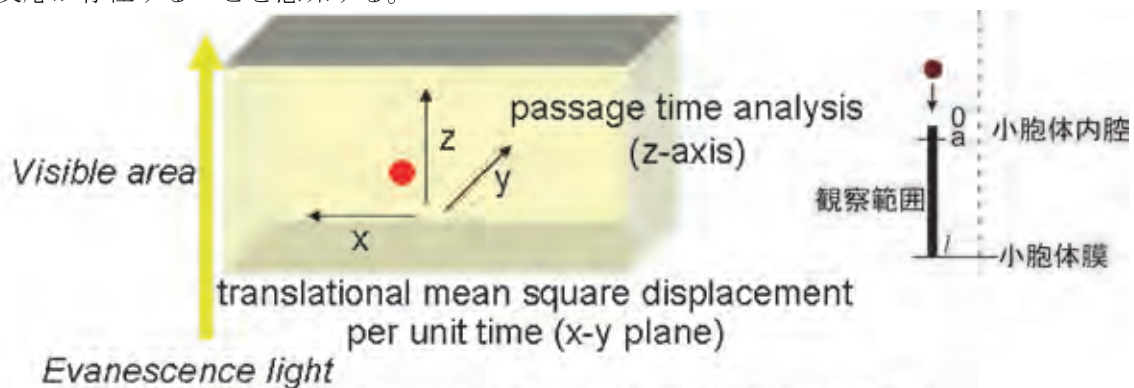


図6 小胞体内腔での1分子ダイナミクス解析

直接観察の際の時間分解能は、conventional なシステムでは最高でも 5 ミリ秒であるために、測定値は過小に評価している可能性はあるが、解析の結果、最も単純な蛍光タンパク質 YFP(yellow fluorescent protein)を内腔に発現すると、FCS で予測される単純拡散に比較的近い値が得られた。ところが、YFP の蛍光基の外部のループの部分に N 型糖鎖が付加されるような変異を加えた分子では、2 カ所に N 型糖鎖が結合した場合には、x-y 平面での並進

二乗拡散では、可溶性のタンパク質であるにもかかわらずモデル膜タンパク質と全く同一の値を示し、同時に z 軸方向の滞在時間解析では、膜蛋白よりも有意に短い値を示した。並進二乗拡散の場合には、最も短い測定時間での変位は無視されるので、この結果は、糖タンパク質が極めて短い k_{off} で膜との相互作用を行っている」と結論された。これは、このカーゴタンパク質のカルネキシンとの結合によらず分子のフォールディングの状態とは関係ない。また、FCS によっても、N 型糖鎖を 2 個持つ分子の場合には、単純拡散の他に、一桁遅い拡散時間を持つ成分の出現が確認された。

興味深いことに、この糖タンパクの膜からの解離は ATP の存在を必要とし、ATP が欠損すると、ほとんど完全に膜蛋白として挙動した。さらに、膜に結合した状態では膜上を単純拡散するが、その並進拡散は、

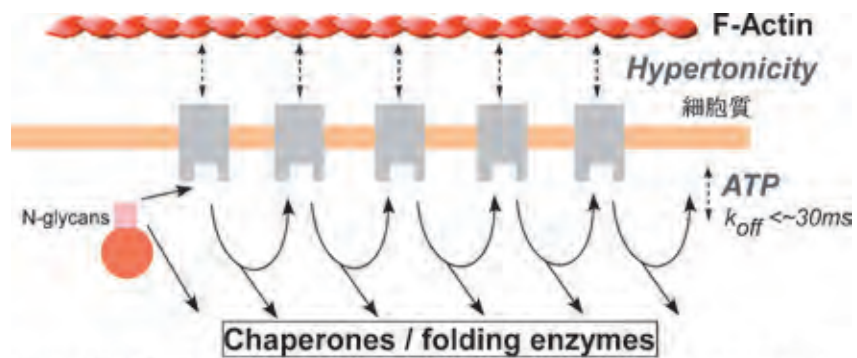


図7 N型糖鎖を介したカーゴタンパク質のダイナミクス

細胞を高浸透圧下に置いた場合にはほとんど停止し、強い拘束が起きることが示された。この高浸透圧処理は k_{off} にはほとんど影響せず、 $x-y$ 平面ではほとんど動かないにもかかわらず、滞在時間はそれほどの遅延しない。すなわち、このカーゴを結合する膜タンパク質との解離自体には高浸透圧は影響しないことがわかる。このような 1 分子ダイナミクスで観察された、糖鎖を 2 個以上持つタンパク質の高浸透圧による拡散抑制は、FRAP でも観測され、特に、膜タンパク質の場合に、著しい拡散停止が見られた。なお、この過程は完全に可逆的である。この拡散の拘束がなぜ起きるかを明らかにするために、細胞骨格の関与について調べてみると、F-アクチンがこの拘束に関係することが示され、内腔でのカーゴ蛋白の動きは、糖鎖を認識する受容体を介して細胞骨格による制御を受けていることを明らかにした (図 7)。このようなダイナミクスは、恒常的に不安定な立体構造を持つタンパク質を多く含む小胞体内腔において、カーゴタンパク質のフォールディング酵素などによる反応を損なうことなく、一時的に安定させるための機構として作用するという点で productive folding のため基盤であると考えられる。解離の過程が ATP の加水分解とリンクするのかどうかは、現時点では明らかでない。しかし、少なくとも、高浸透圧下のようなストレスの発生する条件下においては特に拡散速度を著しく低下させることで、非生産的な相互作用の進行を防ぐものと思える。

また、並進二乗拡散を調べることで、カーゴタンパク質の小胞体での動きは、結合が関与する単純拡散であることが示された。しかし misfold した膜タンパク質の場合に、flow として定義される動きが観察されることもある (図 8 にはその例を示す)。現時点ではこの意味合いは明らかではないが、凝集を防ぐためか、あるいは輸送と関連する可能性がある。さらに、2 色同時観察を行うことで COPII

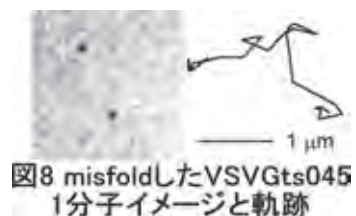


図8 misfoldしたVSVGts045 1分子イメージと軌跡

でコートされた小胞体輸送部位へのカーゴタンパク質の訪問頻度も計測できることを示した。少なくとも、上記のような人工的な可溶性カーゴタンパク質の場合、輸送部位からの

排除が示されている。このことは逆に、フォールドを完了した輸送されるべきカーゴタンパク質の **gating** の機構がある可能性を示唆する。このアプローチは、もっとも謎の多いこの過程、フォールディングとリンクした輸送の関連について、解析を可能にするものと期待される（以上、投稿中）。なお、この糖鎖に対する受容体の同定は、現在進行中ではある。

c) FCS を用いた生細胞での拡散解析

FCS の極めて高い時間分解能は、特に細胞質での可溶性因子の結合解析において強力な武器となる。これを利用して、生細胞内での翻訳開始に関与する因子の分子間相互作用の検出に用いた例も報告した (*Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102, 15688–15693)。この場合、**FCS** を使うことで、細胞を可溶化して行った密度勾配遠心による分画ではほとんど検出できなかった複合体の形成の確認に成功し、さらにおそらくリボソームを含む翻訳開始複合体と思われる巨大な分子との結合も観察することができた。また、モノメリックな赤色蛍光タンパク **mRFP1** が開発されたので、**GFP** と同時に励起して共焦点空間での蛍光強度揺らぎの共相関関数を求めることにより、2 分子間相互作用の生細胞内での検出に用いる可能性を示した (*Biochem. Biophys. Res. Com.* 324 849–854, 2004)。

この高い時間分解能を利用すると、ある単純拡散をする分子が細胞質にあるか、構造的な制約を受ける小胞体内腔にあるのかについて、予想される自己相関関数の差を測定することで、知ることができる可能性がある。そこで、フォールディングを完了することができず、速やかにプロテアソームによって分解されるアンチトリプシン nullHongKong 変異体 (NHK) を発現した細胞において、プロテアソーム阻害剤を加えることによる自己相関関数の変化を調べた。ミスフォールディングによる細胞質側への転位に伴う自己相関関数の変化を観測した。YFP 等の蛍光タグをつけても逆向輸送はやや遅れるものの進行し、最終的に細胞質に大部分が局在するようになる。測定の結果、分解阻害剤の添加に伴い、30 分以内に自己相関関数は速い方向にシフトすることが明らかになり、内腔から細胞質への逆向輸送が起きていることが示唆された。そこで、これを確認するために、YFP に対するポリクローナル抗体を細胞内にロードして、同様の実験を行ったところ、速い成分は消失し、遅い成分は残り、観察された自己相関関数の左方シフトが基質の内腔から細胞質への転移を反映していると考えられる。このような計測は、内腔から細胞質への逆向輸送のリアルタイムモニタリングを可能にすると考えられる。ただ、この測定系では、阻害剤添加後も翻訳は継続するので、測定にどうしても生合成後の異なる段階の分子を同時に観察していることになる。これを防ぐために、タンパク質合成阻害剤を分解阻害剤と同時に添加したところ、このような自己相関関数の分解阻害剤添加に伴うシフトは消失した。これが、ミスフォールドしたタンパク質の逆向輸送が、新たな翻訳を必要とするものなのか、あるいは極めて turnover の速いタンパク質がこの過程で必要とされるものなのか、この手法で判別することはできなかった（投稿準備中）。

(1)-3. 小胞体 SNARE の分泌系タンパク質成熟化における役割

小胞体に存在する **SNARE** 蛋白の生理機能について様々なモデルが提出されているが、カーゴタンパク質の成熟化における役割については知られていない。新たにシグナルトラップの手法により単離された小胞体に主に局在する **Q-SNARE** である **D12** を用いて、その機能解析を行ったところ、発現抑制により急速の細胞死を引き起こし、その過程を解析すると、

リポフスチンの異常な蓄積によるとリンクすることが明らかになり、分泌系カーゴタンパク質の正しい成熟化への関与の可能性が示された。リポフスチンの形成にはリソソームでの分解の異常が関係しているはずなので、リソソーム分解酵素の局在について調べると、膜タンパクは正常であるにもかかわらず、内腔の分解酵素の局在とプロセッシングの異常が観察された。その詳細な機構は明確ではないが、D12 がリソソーム分解酵素の成熟化に関与する

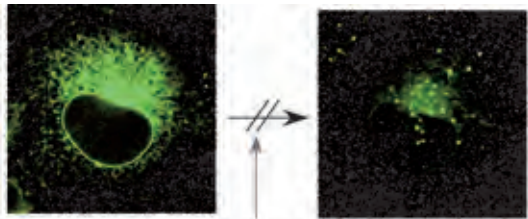


図9 Tyrosinase成熟化に必要な因子の網羅的探索というモデルを提出した (J Biol Chem (2006) 281, 4495–4506)。

2b で述べたように小胞体は細胞膜と結合して存在すること自体は明白であるが、両者の膜同士の直接の融合が **phagocytosis** の際に起きているのかどうか、あるいはそもそも小胞体の膜がファゴサイトーシスにおいて存在し関与するかどうかについては、激しい議論が繰り広げられている(Cell (2005) 123, 157–170)。もし起きているならば、小胞体内腔での不安定な新生タンパク質が細胞外に漏れ出すはずであり、高い食食機能を持つマクロファージなどは、食食の度に不安定な新生タンパク質を細胞外にまき散らしていることになる。しかし、これは考えにくく、実際に調べてみるとほとんど起きていない。一つの可能性として、小胞体 **SNARE** が細胞膜と **hemifusion** の状態で膜成分を細胞膜に供給して新生タンパク質は外部には漏らさないというモデルを考え、小胞体 **SNARE** の関与を調べ、少なくとも小胞体膜成分はファゴサイトーシスの最初期の過程で取り込まれ、小胞体 **SNARE** である **Syntaxin18** はこの過程を促進することを報告した (Mol Biol Cell (2006) 17, 3964–3977)。また、この過程は他の小胞体 **SNARE** によっても、様々な **kinetical** な影響を与えることがわかってきている。ごく最近、ミスフォールドしたタンパク質を内膜系から細胞質に逆向輸送されるのと同じ **Sec61** 経路で、**Class I** 分子によるエンドソーム・ファゴリソソーム系での抗原提示 **crosspresentation** が行われていることが報告され、我々の知見をサポートした(Immunity (2006) 25, 1–11)。しかしこのモデルで必須とされる **hemifusion** の可能性自体は証明が容易でなく、上記の全反射顕微鏡による 1 分子ダイナミクス解析を用いて検討を続けている。

(1)–4.小胞体におけるカーゴタンパク質成熟化に関与する新規分子の探索

これまで、小胞体でのタンパク質の成熟化に関与する分子装置の探索は、ほとんどの場合、それまでの知見とモデルに基づいて関連する分子を探索するという方向で主に進められてきた。この方法は、多くの成果をもたらしたが、ある提出されたモデルの発展という形でしか進展が望めず、全く異なる分子装置の場合であれば、知ることができない。しかし 3 でのプロジェクトに見るように、**siRNA** を用いることで、何らモデルに基づかない、すなわち、これまでの知見にバイアスされずに分泌系カーゴタンパク質の成熟化因子を探すというアプローチが可能となってきた。そこで、(株)RNAi 社の協力を得て、小胞体タンパクをコードする約 500 個の遺伝子産物から薬物代謝関係、トランスロケーション・プロセッシングなど基本構造の形成に必須な成分を除いた、約 300 個の遺伝子をターゲットするライブラリを作成した。なお **BiP** やシグナルペプチダーゼサブユニットや **Sec** 因子など、当然要求されると予想される因子群についても一連の **siRNA** を作成し、これらによる発現抑制は

チロシナーゼ成熟化を阻害することは確認した。測定は、siRNA ライブラリを、2a に記したように安定なミスフォールディングの状態を維持することのできるチロシナーゼ-YFP を安定発現する COS7 及び HeLa 細胞に導入し、チロシナーゼのリソソーム・エンドソームへの移行の効率を測定した (図 9)。一次スクリーニングで影響が観察されたターゲットには、異なる配列をターゲットとして新たな siRNA を合成し、この二次スクリーニングでも影響が観察された小胞体タンパクを、チロシナーゼ成熟化に必須な因子と見なした。その結果、19 個の新たな因子を同定した。これらの中には、ホフファチジン酸などの脱リン酸化を行う phosphatidic acid phosphatase 2b 等のように、関与するプロセスが、それらの分子に関する知見から容易に予想されるものが約半数を占めたが、その関与が全く予想できない因子も含まれていた。たとえば、olfactomedin-1 は、これまで脳に特異的に発現する機能不明な小胞体分子として知られていた。しかし、この分子は、今回用いた培養細胞を初め、多くの組織に発現することが確認された。その機能解析の結果、この分子はオリゴマー構造から予想されるよりも異常に遅い拡散を行うことから、内腔での粘性の形成に関与すると思えることを示した。実際に上記の 1 分子ダイナミクス観測を行うと、内腔での単純拡散において強い拡散バリアとして働くことがわかり、おそらくチロシナーゼの凝集を防ぐことで、非許容温度での foldability の維持に必要である可能性を示唆した (以上、投稿中)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究は、高等動物での極めて速やかで効率の良い分泌機能の理解のために、主に 2 つの新たな研究の方向性を示した。これまでの分泌系での研究は、大きな知見をもたらしてきたが、限界もまた見えてきている。

これまで小胞体内腔でのカーゴタンパク質の成熟化を担う分子機構の解明として用いられてきた方法は、従来からの生化学的な手法の延長であった。たとえば、分子シャペロンとの相互作用を示すには、細胞を界面活性剤により可溶化して、シャペロンを沈降させることによって、同時に結合してきたものを調べることで、可溶化直前の分子間相互作用を推定しようというものである。これは、可溶化の瞬間にほとんどの場合に 10^6 以上希釈され、それぞれの分子は、 10^{-12}M 以下の極端に低い濃度になる。この場合には新たな結合が起きる可能性は限りなく低いので、この操作の後にも結合してきたものは、生理的な条件下でも結合したと見なすという理屈で、これは合理的である。しかし、生理的な結合反応は、 K_m が 10^{-9}M よりも低いことは少なく、むしろ、 10^{-6}M 程度の反応がドミナントである場合が多い。これらの結合反応はこの手法では知ることができない。もう一つの深刻な問題は、小胞体内腔の容積は細胞質に比べて遙かに小さいので、同じような強さのプロモーターを用いて細胞質蛋白と同様にして発現した場合、細胞質におけるよりも容易に非生理的な条件に陥ってしまう。上節 (1)2-a に記したように、1fL 内に 100 個よりも多くの分子 (この場合は膜タンパク質) を発現すると、飽和状態になり、非生理的な molecular crowding の状態に陥ることがわかったが、これは通常の発現では容易に越える。この場合には濃度は一桁以上はあがっているはずなので、 K_m が高く生理的には進行しない結合反応でも起こりえる可能性がある。さらに別の問題として、分泌系カーゴタンパク質の成熟化反応は、顕著に非平衡なプロセスであり、立体構造の形成は COPII でコートされた小胞体マイクロドメインへの移行とリンクするが、この反応の解明には従来の手法ではほとんど太刀打ちできない、ということなどもある。

これらの問題をクリアするためのひとつの方法が分泌系カーゴタンパク質の 1 分子直接観察である。これは、個々の分子の動きをできる限り詳細に追うことができれば、その分子の分子量、結合状態等について知ることができるはずという考えに基づく。なお、ここで行った解析法では、単一分子の可視化にエバネッセント光を用いたために照明からごく近い部分しか見ることができず、このために、分子の滞在時間があまりにも短く、これを解析するためにはいくつかの仮定を設けなければならなかった。幸い、これに基づいた今回のような単純なモデリングでも有用性は示されたが、これがどの程度生細胞での geometry を反映しているものか、現在の細胞生物学の知識では判定が困難である。少なくとも、より現実的な小胞体の構造に対応した数学モデルの開発が必要なことは確かである。なお、もし今回のようなエバネッセント照明によるのではなく、斜光照明によるシステムが容易に使えるようになれば、十分な深度における分子の動きを長い時間スケールにおいて、また、より現実的なモデルに沿って成熟化の過程を追い、個々の分子の運命をフォローできるようになる可能性がある。これらは、ハード面の技術革新も必要であり、本報告に記した内容も本研究開始時点では現実的ではなかった。このアプローチで得られる情報量はハード、ソフト面での技術に大きく依存する。

さらに、このやり方を進めて二色励起による二分子同時観察が、分泌系カーゴタンパク質の生細胞での分子間相互作用を知るために強力なツールとして可能なはずであり、現在、検討を進めている。イメージングによる二分子相互作用の検出には、蛍光エネルギー転移 (FRET) を用いる方法や、揺らぎの同時性を利用する蛍光共相関分光法 (FCCS) 等があるが、二色励起による二分子同時観察では、FCCS と同様、非生理的な高レベルの発現を必要としないこと、判定に比較的誤りが少ない、というメリットがあり、FCCS とは異なり、空間に関する情報を得ることができるのはいうまでもない。研究成果に記したように、カーゴ蛋白の小胞体内輸送部位への訪問頻度の解析も比較的容易である。ただ、両方とも 1 分子での観察を目的とすると、通常は、視野の中に数十個の分子がランダムに飛び交っている状態になるので、両分子が出会う確率はかなり低くなる。相互作用を観察するには、長時間の記録が必要となるために、よりブリーチングを起こしにくい、長期照射に耐え得る蛍光プローブの作成など、技術的にクリアする必要のある問題は多い。さらに、x-y 平面で同じ場所に二つの分子が存在しても、z 軸では離れている可能性もある。これは、おそらく四次元で考えることである程度は解決できると予想されるが、慎重に考慮する必要がある。この場合にも、適切な数理モデルをたてる必要があるのは言うまでもない。

このようなアプローチは、最近投げかけられた疑問の解決にとっても強力な解決法となると期待される。我々は 10 年前に、カルネキシンサイクルが約 5 分程度の半減期で回り、この繰り返しの相互作用でトランスフェリンのフォールディングが進行することを、標識と、細胞分画とを組み合わせた生化学的な手法で証明した (EMBO J (1997) 16, 5420)。この中で、我々はこのサイクルが ATP 依存性のシャペロンサイクルと類似するという可能性を示唆した。このサイクルの存在は、既に生化学の教科書にも書かれている。ところが、最近、このサイクルに必須の酵素であるミスフォールドしたタンパク質へのグルコース添加酵素のノックダウンによっても、基質は長時間安定にカルネキシンに結合し続けるという予想外の観察が得られ、このサイクルの存在自体について疑問が提出された (Mol Cell (2005) 20, 503)。しかし、このサイクルの証明について、生化学的な研究方法によって、10 年前に出したデータ以上のものを示すことは大変難しい。このような問題に正確に答え

るためにも、分子の直接観察は最も有効と思える。

我々が示したもう一つのアプローチは、網羅的な発現抑制による小胞体内機能に関与する分子群の解明である。RNAi ライブラリは、他にもレンチウイルスを使う方法などが報告されており、すでに線虫ではゲノムワイドなノックダウン解析が報告されている。我々はこれをデータベースに基づいて、特定の分子集団に特化した siRNA ライブラリを作成することで、容易に行えることを示し、予想外に多くの因子がチロシナーゼの成熟化に関与することを示した。同時に、これらのライブラリを用いて、小胞体の特異的な三叉構造、あるいは、COPII でコートされた小胞体輸送部位の構造と分布に関与する遺伝子群のスクリーニングもほぼ完了している。すでに、我々の学会発表を受けて海外の研究者からの共同研究の申し込みもあり、多くの可能性を秘めている。このアプローチは、それまでの知見やモデルに基づかないという点で、これまでの生化学的手法とは大きく異なる。さらに、本アプローチでは、ゲノムワイドなライブラリを使用せずに、データベース上の情報を利用してターゲットとする遺伝子群を絞ることで、網羅的解析を一つのラボでスクリーニングと解析が可能な規模に落とすことができる。今後の問題点は、ターゲットとする機能が siRNA のトランスフェクション効率の低い細胞にしか存在しない場合の対処、また代謝回転が極めて遅い分子の場合、ということなどであろう。これらについては、さらなる技術の開発が必要とされる。このような網羅的解析の対象とする生物学的プロセスは多岐にわたる。本研究のように、スクリーニングさえ robust なものにして、ターゲットをデータベース上より限定したライブラリを作成することさえできれば、この目的のために大がかりなプロジェクトはもはや必要ではない。様々な研究室が対象とする多様な生物学的プロセスを特定の因子とリンクさせることができれば、それらの機能マップの作成に伴いシステムとしての生命現象の理解が進むと期待される。

3. 3 UPR 経路を介した小胞体品質管理機構 (京都大学 森グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積したという情報は核へ伝えられ、転写レベルで誘導された小胞体局在性の分子シャペロンや酵素（小胞体シャペロン）が異常タンパク質に対処することにより小胞体内の恒常性が維持される。哺乳動物ではこの転写誘導機構に、ATF6 経路と IRE1-XBP1 経路という 2 つの経路が関与していることをわれわれは明らかにしてきた。

それぞれの経路に特異的な転写因子（活性型 ATF6 と活性型 XBP1）の DNA 認識様式の違いから、IRE1-XBP1 経路が活性化されると ATF6 経路では誘導されない遺伝子の転写が誘導され得る。この IRE1-XBP1 経路に特異的な標的遺伝子を同定することは、小胞体におけるタンパク質の品質管理機構を理解する上で極めて重要と考えて検索した結果、EDEM という分子の転写誘導が ATF6 経路ではなく IRE1-XBP1 経路により媒介されることを見いだした。EDEM は小胞体局在性の膜タンパク質で、小胞体において高次構造が異常になった糖タンパク質をユビキチン・プロテアソーム系を使って分解する過程に重要な働きをすることが永田グループにより示されている。さらに、EDEM を転写誘導することができない IRE1 ノックアウト細胞は、異常糖タンパク質を効率的に分解することができないことを明らかにした。

さらに、EDEM の下流で働く小胞体膜貫通タンパク質 Derlin-2 および Derlin-3 を同定し、Derlin-2/3 をノックダウンした細胞では異常糖タンパク質の分解が阻害されることを明らかにした。Derlin-2/3 も EDEM と同様に IRE1-XBP1 経路により小胞体ストレスに応答して転写誘導された。

上記の結果と、ATF6 経路の主要な標的は小胞体シャペロンであること、並びに、活性化機構の違いから細胞内ではまず ATF6 が、次いで XBP1 が発現してくることを考え併せて次のような結論を導いた。小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積すると、細胞はまず ATF6 を活性化してシャペロンを誘導し、異常タンパク質の巻き戻しを計る。それでは不十分な場合には XBP1 を活性化し、シャペロンを誘導して異常タンパク質の巻き戻しを計るとともに EDEM や Derlin-2/3 を誘導して異常タンパク質の分解を始める。このように哺乳動物の小胞体ストレス応答は階層制を有し、状況に応じて層を転移させていくことを初めて実証した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

ATF6 経路と IRE1-XBP1 経路の使い分け機構が明かとなったため、今後、これらの系を制御してやることにより、小胞体におけるタンパク質のミスフォールディングを原因とする疾患の防止や治療に役立つことが期待される。

4 研究参加者

永田グループ (ERAD を介した小胞体タンパク質品質管理)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
永田 和宏	京大再生研	教授	研究の統括	H13, 12～H19, 3
細川 暢子	京大再生研	助教授	EDEM の解析	H13, 12～H19, 3
久保田広志	京大再生研	助手	HSP47 の解析	H13, 12～H19, 3
本間 貴之	京大再生研	CREST 研究員	HSP47 の解析	H14, 10～H19, 1
宝関 淳	京大再生研	CREST 研究員	小胞体酸化還元作用	H16, 4 ～H19, 3
門田 真奈	京大再生研	CREST 研究補助員	HSP47 の解析	H14, 4～H19, 3
金森 和美	京大再生研	CREST 研究補助員	EDEM の解析	H14, 4～H19, 3
石田 (上田) 玉美	京大再生研	CREST 事務員	事務	H14, 1～H19, 3
森戸 大介	京大再生研	大学院生	EDEM の解析	H14, 1～H19, 3
中村 純治	京大再生研	大学院生	HSP47 の解析	H14, 4～H19, 3
長澤 幸治	京大再生研	大学院生	HSP47 の解析	H14, 4～H19, 3
北村 朗	京大再生研	大学院生	HSP47 の解析	H15, 4～H19, 3
石田 義人	京大再生研	大学院生	HSP47 の解析	H16, 4～H19, 3
潮田 亮	京大再生研	大学院生	HSP47 の解析	H16, 4～H19, 3
平山 尚士郎	京大再生研	大学院生	HSP47 の解析	H16, 4～H18, 3
新木 和孝	京大再生研	大学院生	小胞体酸化還元作用	H17, 4～H19, 3
石川 善弘	京大再生研	大学院生	HSP47 の解析	H17, 4～H19, 3
里本 健輔	京大再生研	大学院生	EDEM の解析	H17, 4～H19, 3
杉浦 仁美	京大再生研	大学院生	小胞体還元作用	H17, 4～H19, 3
萩原 誠智	京大再生研	大学院生	EDEM の解析	H17, 4～H19, 3
真砂 有作	京大再生研	大学院生	CCT の解析	H17, 4～H19, 3
長束 優子				H14, 4～H18, 7
小田 裕香子				H14, 1～H18, 3
久保田進				H15, 4～H18, 3
奥井 大介				H16, 4～H18, 3
藪上 欣亮				H16, 4～H18, 3
内藤 素子				H14, 1～H14, 3
安田 邦彦				H14, 1～H14, 7
佐藤 啓二				H14, 1～H14, 10
吉田 尊雄				H14, 1～H15, 9
野崎 潤一				H14, 1～H14, 12
丸谷 寿裕				H14, 1～H16, 3
平尾 和義				H14, 4～H16, 3
松岡 泰弘				H14, 1～H17, 3

和田グループ(小胞体タンパク質分子成熟のダイナミクス)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
和田郁夫	札幌医科大学 ～福島県立医科大学	助教授 ～教授	研究総括、分子ダイナミクス	平成13年12月～ 平成19年3月
田村拓	札幌医科大学 ～福島県立医科大学	CREST 研究員～助手	productive folding ERAD	平成13年12月～ 平成19年3月
長屋寿雄	札幌医科大学 ～福島県立医科大学	CREST 研究員～助手	分子ダイナミクス	平成13年12月～ 平成15年10月
鎌田麻子	札幌医科大学	大学院生	分子ダイナミクス	平成13年12月～ 平成15年1月
邵軍	札幌医科大学	研究生	productive folding	平成13年12月～ 平成15年1月
田村舞子	福島県立医科大学	研究生～ 博士研究員	productive folding ERAD	平成15年3月～ 平成19年3月
初沢清隆	福島県立医科大学	講師～助教授	ER SNARE Phagocytosis	平成15年4月～ 平成19年3月
橋本仁志	福島県立医科大学	助手	分子ダイナミクス	平成15年10月～ 平成19年3月
竹内真由美	福島県立医科大学	技官	分子ダイナミクス 網羅的解析	平成15年3月～ 平成19年3月
橋本裕美	福島県立医科大学	技官	ER SNARE Phagocytosis	平成15年3月～ 平成19年3月
中野寛子	福島県立医科大学	CREST 研究補助員	分子ダイナミクス	平成17年12月～ 平成18年3月
三浦恵	福島県立医科大学	CREST 研究補助員	分子ダイナミクス	平成17年4月～ 平成19年1月
大橋功治	福島県立医科大学	CREST 研究員	分子ダイナミクス	平成17年4月～ 平成18年9月
野口陽一郎	福島県立医科大学	CREST 研究員	分子ダイナミクス	平成15年10月～ 平成17年3月
城尾晶子	九州大学	博士研究員	ER SNARE	平成16年9月～ 平成17年2月
西山亜里砂	RNAi 社～福島県立医科大学	博士研究員	網羅的解析	平成17年4月～ 平成19年3月

森グループ (UPR 経路を介した小胞体品質管理機構)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
森 和俊	京大生命科学	助教授	研究の統括	H14, 1～H15, 9
吉田 秀郎	京大生命科学	PRESTO 研究員	XBP1 の解析	H14, 1～H14, 3
灘中 里美	京大生命科学	CREST 研究員	ATF6 の解析	H14, 1～H15, 6
岡田 徹也	京大生命科学	大学院生	ATF6 の解析	H14, 1～H15, 9
山本 敬祐	京大生命科学	大学院生	ATF6 の解析	H14, 1～H15, 9
松居 利江	京大生命科学	大学院生	XBP1 の解析	H14, 1～H15, 9
山本 晃	京大生命科学	大学院生	ATF6 の解析	H14, 1～H15, 3
川崎 賢明	京大生命科学	大学院生	ATF6 の解析	H14, 4～H15, 9
鈴木 美絵	京大生命科学	大学院生	XBP1 の解析	H14, 4～H15, 9
武井 智子	京大生命科学	大学院生	XBP1 の解析	H14, 4～H15, 9
安達 雄亮	京大生命科学	大学院生	XBP1 の解析	H15, 4～H15, 9
和田 匡史	京大生命科学	大学院生	ATF6 の解析	H15, 4～H15, 9

5 招聘した研究者等

なし

6 成果発表等

永田グループ

(1)原著論文発表 (国内誌0件、国際誌34件)

T. KOIDE, Y. TAKAHARA, S. ASADA & K. NAGATA

Xaa-Arg-Gly triplets in the collagen triple-helix are dominant binding sites for the molecular chaperone HSP47. *J. Biol. Chem.* 277(8):6178-6182(2002)

J. NISHIZAWA, A. NAKAI, M. KOMEDA, T. BAN & K. NAGATA

Increased preload directly induces the activation of heat shock transcription factor1 in the left ventricular overloaded heart.

Cardiovas. Res. 55(2):341-348(2002)

K. SATO, K. YOMOGIDA, T. WADA, T. YORIHUZI, Y. NISHIMUNE, N. HOSOKAWA & K. NAGATA

Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J Biol Chem.* 277(40):37678-37684(2002)

K. YASUDA, K. HIRAYOSHI, H. HIRATA, H. KUBOTA, N. HOSOKAWA & K. NAGATA

The Kruppel-like factor Zf9 and proteins in the Spl family regulate the expression of HSP47, a collagen-specific molecular chaperone.

J Biol Chem. 277(47):44613-44622(2002)

N. YASUI, T. MORI, D. MORITO, O. MATSUSHITA, H. KOURAI, K. NAGATA, T. KOIDE

Dual-site recognition of different extracellular matrix components by anti-angiogenic / neurotrophic serpin, PEDF. *Biochemistry* 42(11):3160-3167(2003)

H. YOSHIDA, T. MATSUI, N. HOSOKAWA, R. J. KAUFMAN, K. NAGATA & K. MORIA.

time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response.

Develop. Cell. 4(2):265-271(2003)

Y. ODA, N. HOSOKAWA, I. WADA & K. NAGATA

EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin.
Science 299(5611):1394–1397(2003)

S. YOKOTA, H. KUBOTA, Y. MATSUOKA, M. NAITOH, D. HIRATA, S. MINOTA, H. TAKAHASHI, N. FUJII & K. NAGATA

Prevalence of HSP47 antigen and autoantibodies to HSP47 in the sera of patients with mixed connective tissue disease.
Biochem Biophys Res Commun. 303:413–418(2003)

N. HOSOKAWA, L. O. TREMBLAY, Z. YOU, A. HERSCOVICS, I. WADA & K. NAGATA

Enhancement of endoplasmic reticulum(ER) degradation of misfolded null Hong Kong - antitrypsin by human ER mannosidase I. *J. Biol. Chem.* 278(28):26287–26294(2003)

Y. YAMAZAKI, H. KUBOTA, M. NOZAKI & K. NAGATA

Transcriptional regulation of the cytosolic chaperonin θ subunit gene, Cctq, by Ets domain transcription factors Elk-1, Sap-1a, and net in the absence of serum response factor. *J. Biol. Chem.* 278(33):30642–30651 (2003)

K. NAGATA

HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 14:275–282 (2003)

J. NOZAKI, H. KUBOTA, H. YOSHIDA, M. NAITOH, J. GOJO, T. YOSHINAGA, K. MORI, A. KOIZUMI & K. NAGATA

The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in *Ins2^{+/Akita}* pancreatic beta cells
Genes Cells 9:261–270(2004)

S. OHASHI, H. ABE, T. TAKAHASHI, Y. YAMAMOTO, M. TAKEUCHI, H. ARAI, K. NAGATA, T. KITA, H. OKAMOTO, H. YAMAMOTO, T. DOI

Advanced glycation end products increase collagen-specific chaperone protein in mouse diabetic nephropathy.
J. Biol. Chem. 279(19):19816–19823(2004)

M. YAMASHITA, K. HIRAYOSHI & K. NAGATA

Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of stress protein HSP70 in vertebrates.
Gene 336:207–218(2004)

Y. MATSUOKA, H. KUBOTA, E. ADACHI, N. NAGAI, T. MARUTANI, N. HOSOKAWA & K. NAGATA

Insufficient folding of type IV collagen nad formation of abnormal basement membrane-like structure in embryoid bodies derived from HSP47-null ES cells.
Mol. Biol. Cell. 15:4467–4475(2004)

T. MARUTANI, A. YAMAMOTO, N. NAGAI, H. KUBOTA & K. NAGATA

Accumulation of type IV collagen in dilated endoplasmic reticulum leads to apoptosis *HSP47*-knockout mouse embryos through the induction of CHOP.
J. Cell. Sci. 117:5913–5922(2004)

- S. J. MARCINIAK, C. Y. YUN, S. OYADOMARI, I. NOVOA, Y. ZHANG, R. JUNGREIS, K. NAGATA, H. P. HARDING & D. RON
CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum.
Genes Develop. 18(24):3066–3077(2004)
- H. KUBOTA & K. NAGATA
Roles of collagen fibers and its specific molecular chaperone: analysis using HSP47-knockout mice.
Biol Sci Space. 18(3):118–119(2004)
- T. KOIDE & K. NAGATA
Collagen Biosynthesis
“Topics in Current Chemistry : Collagen 247” (Eds Brinckmann et al.) Springer-Verlag pp. 84–157(2005)
- 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/VCIPI35 are sequentially required for cell cycle-dependent reformation of the ER network.
Genes Cells. 10(10):989–999(2005)
- 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. 281(6):3432–3438(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. 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. 281(14):9650–9658(2006)
- N. HOSOKAWA, I. WADA, Y. NATSUKA & K. NAGATA
EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded α 1-antitrypsin has been accepted for publication.
Genes Cells. 11(15)465–476(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, Y. NISHIKAWA, S. ASADA, C.M. YAMAZAKI, Y. TAKAHARA, DL. 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. 281(16):11177-11185 (2006)

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.* 17:2346-2355 (2006)

S. KUBOTA, H. KUBOTA & K. NAGATA
Cytosolic chaperonin protects folding intermediates of G β from aggregation by recognizing hydrophobic β -strands
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(122):8360-8365 (2006)

A. KITAMURA, H. KUBOTA, C. PACK, G. MATSUMOTO, S. HIRAYAMA, Y. TAKAHASHI, H. KIMURA, M. KINJO, R. MORIMOTO & K. NAGATA
Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nature Cell Biol.* 8(10):1163-1169 (2006)

A. OGURO, T. SAKURAI, Y. FUJITA, S. LEE, H. KUBOTA, K. NAGATA & Y. ATOMI
The molecular chaperone HSP47 rapidly senses gravitational changes in myoblasts.
Genes Cells. 11, 1253-1265 (2006)

K. NAGASAWA, T. HIGASHI, N. HOSOKAWA, R. J. KAUFMAN & K. NAGATA
Simultaneous induction of the four subunits of TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation. *EMBO reports* in press

(2)その他の著作物

永田和宏：分子シャペロンによる蛋白質の品質管理と病態
環境と健康「健康指標プロジェクトシリーズ」Vol. 15, No. 2:51-63 (2002)

細川暢子、永田和宏：小胞体ストレスと小胞体関連分解
脳 21 Vol. 5, No. 2:14-18 (2002)

細川暢子、永田和宏：小胞体ストレスと小胞体関連分解 -小胞体品質管理に関与するマンノシダーゼ様タンパク質- グライコフォーラムサイト Beyond glycogens (谷口 直之編)
生化学工業 6 (2002)

永田和宏：コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 と繊維化疾患治療戦略
日本薬理学雑誌 121, pp4-14 (2003)

細川暢子、永田和宏：小胞体でつくられたタンパク質の運命
実験医学 Vol. 21, No7:892-897 (2003)

細川暢子、永田和宏：EDEMによる品質管理機構
生化学 第75巻第6号：512-519(2003)

永田和宏：タンパク質の品質管理とその破綻
実験医学増刊号「細胞内輸送研究の最前線」Vol. 21, No. 14:205-213(2003)

永田和宏：小胞体における蛋白質の品質管理戦略
第26回日本医学会総会誌[I]:9(2003)

久保田広志：細胞質シャペロニン CCT と細胞増殖
臨床化学 Vol. 32, No. 2:139-146(2003)

永田和宏、森正敬、河野憲二編著：細胞生物学 -驚異のミクロコスモス-
日本放送出版協会（放送大学教育振興会）（2003）

久保田広志、永田和宏：蛋白質のフォールディング監視機構
神経研究の進歩「蛋白質の品質管理と神経疾患」Vol. 48, No. 1:5-15(2004)

久保田広志：細胞質シャペロニン CCT -最も複雑なシャペロン？-
蛋白質核酸酵素「細胞における蛋白質の一生」Vol. 49, No. 7:875-876(2004)

永田和宏：タンパク質の品質管理と細胞の危機管理
蛋白質核酸酵素「細胞における蛋白質の一生」Vol. 49, No. 7:973-983(2004)

細川暢子：小胞体タンパク質品質管理と ERAD -EDEM 分子は糖タンパク質の ERAD を促進する-、蛋白質核酸酵素「細胞における蛋白質の一生」Vol. 49, No. 7:984-987(2004)

永田和宏：タンパク質の多様性獲得戦略
GYROS「ゲノム革命」Vol. 1, No. 7:134-145 (2004)

永田和宏：序文：悪貨が良貨を駆逐しないために：タンパク質の無法地帯における警察機能、細胞工学「階層別にみるタンパク質のフォールディングと品質管理：in vivo から細胞・個体レベルまで」（永田和宏編）Vol. 23, No. 12:1362-1363(2004)

細川暢子：小胞体関連分解（ERAD）
生体の科学「生命科学の New Key Word」Vol. 55, No. 5:416-417(2004)

永田和宏、遠藤斗志也：序：タンパク質社会学とは何か
実験医学「細胞内タンパク質の社会学」（永田和宏、遠藤斗志也編）Vol. 23, No. 15(2005)

遠藤斗志也、永田和宏：概論：タンパク質の一生とタンパク質社会学
実験医学「細胞内タンパク質の社会学」（永田和宏、遠藤斗志也編）
Vol. 23, No. 15:2228-2233(2005)

久保田広志：シャペロニンファミリータンパク質-その普遍性と多様性
実験医学「細胞内タンパク質の社会学」（永田和宏、遠藤斗志也編）
Vol. 23, No. 15:2266-2271(2005)

永田和宏：タンパク質社会における危機管理システム
実験医学「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏、遠藤斗志也編)
Vol. 23, No. 15:2321-2326(2005)

小田裕香子、森和俊：小胞体ストレス応答によって制御される Derlins
実験医学「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏、遠藤斗志也編)
Vol. 23, No. 15:2345-2351(2005)

長束優子、細川暢子、永田和宏：小胞体関連分解における EDEM ファミリータンパク質の機能、実験医学「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏、遠藤斗志也編)
Vol. 23, No. 15:2352-2357(2005)

細川暢子：小胞体タンパク質の品質を保証する細胞内メカニズム
化学と生物 Vol. 43, No. 9:600-606(2005)

久保田広志、永田和宏：コラーゲンと分子シャペロン
ティッシュ エンジニアリング 2006 (日本組織工学会編) 15-17(2006)

北村朗、久保田広志、永田和宏
ポリグルタミンタンパク質凝集を抑え神経細胞を守るシャペロニン CCT- β シート配列を認識し凝集体の増大を防ぐ分子シャペロン
バイオニクス Vol. 3, No. 12:72-73(2006)

久保田広志、北村朗、永田和宏：細胞質シャペロニン CCT が異常タンパク質凝集の初期過程を抑制して細胞毒性を防止する。
細胞工学 Vol. 26, No. 2:188-189(2007)

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議57件、国際会議22件)

永田和宏：分子シャペロン・概説
日本薬学会第122年会シンポジウム、千葉市、3月26日(2002)

永田和宏：コラーゲン特異的分子シャペロンHSP47の発現制御と繊維化疾患の治療戦略
日本薬学会第122年会シンポジウム、千葉市、3月26日(2002)

永田和宏：コラーゲン特異的分子シャペロンHSP47による細胞機能制御
第34回日本結合組織学会学術大会・第49回マトリックス研究会大会合同会議特別セッション、浜松市、4月4日(2002)

細川暢子：小胞体関連分解(ERAD)に関与する、EDEM蛋白質の機能解析
第55回日本細胞生物学会大会ワークショップ、横浜市、5月21日(2002)

Kazuhiro Nagata : A collagen-specific molecular chaperone HSP47: function and transcriptional regulation. Shriners Hospital seminar, Portland(USA), May 31(2002)

細川 暢子：糖蛋白質の小胞体関連分解
第7回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会、名古屋市、8月16日(2002)

内藤素子、鈴木義久、久保田広志、石川奈美子、呉溯帆、片岡和哉、永田和宏：ケロイドの病態形成と遺伝子, 第11回日本形成外科学会基礎学術集会シンポジウム、仙台市、10月3日(2002)

Kazuhiro Nagata, Yukako Oda & Nobuko Hosokawa : Quality control of the nascent proteins in the endoplasmic reticulum
The 4th APOCB for Cell Biology Congress, Taipei(Taiwan), November 4(2002)

永田和宏：小胞体品質管理戦略と分子シャペロン
13thフォーラムインドージン「生命機能と病の中の蛋白質フォールディング」、熊本市、11月29日(2002)

久保田広志：ERストレスの生化学的機構
第24回日本基礎老化学会シンポジウム、京都市、11月30日(2002)

永田和宏：基底膜構築に必須の分子シャペロン：HSP47
大阪大学蛋白質研究所講演会「基底膜研究の新展開」、吹田市、12月5日(2002)

細川暢子、和田郁夫、永田和宏：小胞体関連分解におけるEDEP蛋白質の機能
第25回日本分子生物学会年会ワークショップ、横浜市、12月11日(2002)

永田和宏、小田裕香子、細川暢子：小胞体におけるタンパク質の品質管理に関わる3つの糖鎖認識シャペロン様分子
第25回日本分子生物学会年会ワークショップ、横浜市、12月13日(2002)

永田和宏：分子からアプローチする細胞機能制御
京都大学医工薬連携形成ワークショップ「活動長寿を目指す生体機能の時空ナノ制御学の確率」、京都市、3月7日(2003)

永田和宏：小胞体における蛋白質の品質管理戦略
第26回日本医学会総会シンポジウム「細胞内情報伝達・分子細胞医学」、福岡市、4月4日(2003)

野崎潤一、久保田広志、吉田秀郎、内藤素子、吉永侃夫、森和俊、小泉昭夫、永田和宏：アキタマウス β 細胞株における転写因子ATF6及びXBP1活性化を介した小胞体シャペロンの誘導, 第56回日本細胞生物学会大会ワークショップ「病気と細胞生物学」、大津市、5月15日(2003)

細川暢子、和田郁夫、長束優子、永田和宏：小胞体品質管理に関わるEDEP蛋白質の機能解析、第56回日本細胞生物学会大会ワークショップ「タンパク質：生と死の生物学」、大津市、5月16日(2003)

吉田秀郎、松居利江、細川暢子、永田和宏、森和俊：小胞体ストレスに対する多段階的防御戦略、第56回日本細胞生物学会大会ワークショップ「タンパク質：生と死の生物学」、大津市、5月16日(2003)

松岡泰弘、久保田広志、安達栄治郎、永井尚子、細川暢子、永田和宏：マウスHsp47ノックアウト胚様体におけるIV型コラーゲンの分子構造異常及び基底膜の形成不全

第56回日本細胞生物学会大会ワークショップ「タンパク質：生と死の生物学」、大津市、5月16日(2003)

Kazuhiro Nagata, Yasuhiro Matsuoka, Toshihiro Marutani, Hiroshi Kubota : HSP47 : as a key molecule for molecular maturation of procollagen 5th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Ube, June 6(2003)

永田和宏：小胞体品質管理機構とERAD・EDEM
第7回バイオストレス・レドックス [融合] セミナー、池田市、6月13日(2003)

Kazuhiro Nagata : Quality Control Mechanism of the Unfolded Proteins in ER
The 7th International Congress(Genes, Gene Families and Isozymes), Berlin(Germany), July 20(2003)

Kazuhiro Nagata : HSP47 is essential for the molecular maturation of collagens and the formation of basement membranes.
Gordon Research Conferences(Collagen), New London(USA), July 29(2003)

細川暢子：糖タンパク質の小胞体関連分解
「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第1回夏期シンポジウム、浜松市、8月21日(2003)

Yukako Oda, Nobuko Hosokawa & Kazuhiro Nagata : EDEM cooperates with calnexin in the ER associated degradation of unfolded proteins. EURESCO Conferences(Biology of Molecular Chaperones), Tomar(Portugal), September 1(2003)

Kazuhiro Nagata : EDEM as one of key molecules in ER-associated degradation.
Institute for Research in Biomedicine Seminar, Bellinzona(Switzerland), September 5(2003)

Kazuhiro Nagata, Yukako Oda, Kazuyoshi Hirao & Nobuko Hosokawa : Possible functions of EDEM in the ERAD of terminally misfolded proteins. 1st International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, Quebec(Canada), September 11(2003)

Hiroshi Kubota, Shin-ichi Yokota, Yasuhiro Matsuoka, Toshihiro Marutani & Kazuhiro Nagata : Prevalence of HSP47 antigen and autoantibodies against HSP47 in the sera of patients with mixed connective tissue disease. 1st International Congress on Stress Responses in Biology and medicine, Quebec(Canada), September 13(2003)

永田和宏：小胞体におけるタンパク質のfoldingと品質管理
京都大学再生医科学研究所開所5周年シンポジウム、京都市、10月6日(2003)

永田和宏：小胞体分子シャペロン：タンパク質のfoldingから品質管理まで (Protein quality control in the endoplasmic reticulum)
第76回日本生化学会大会マスターズレクチャー、横浜市、10月17日(2003)

Kazuhiro Nagata : ER associated degradation and EDEM
第76回日本生化学会大会シンポジウム「細胞機能の発現と調節」、横浜市、10月18日(2003)

細川暢子：糖タンパク質の小胞体関連分解

平成15年度生化学会近畿支部シンポジウム「細胞内品質管理のダイナミズム」、京都市、
11月21日(2003)

Kazuhiro Nagata: ER-associated degradation: Possible function of EDEM.

10th Congress of the Federation of Asian and Oceanic Biochemists and Molecular Biologists, Bangalore (India), December 9 (2003)

Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata: ER Degradation of Glycoproteins

第26回日本分子生物学会年会シンポジウム「糖鎖細胞生物学の新展開― あいまいさ ―」を
越えて―、神戸市、12月11日(2003)

細川暢子：糖タンパク質の小胞体関連分解

第7回理研シンポジウム「生体分子の化学」、和光市、12月18日(2003)

永田和宏：小胞体におけるProtein Foldingと分解

日本薬学会北陸支部特別講演会、金沢市、12月19日(2003)

永田和宏：小胞体関連分解：タンパク質の品質管理戦略

第77回日本薬理学会年会シンポジウム「創薬ターゲットとしてのタンパク質フォールデ
ィングと小胞体機能」、大阪市、3月10日(2004)

Kazuhiro Nagata, Nobuko Hosokawa: ER-associate degradation: EDEM, soluble EDEM and
more...

The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama (Japan),
April 16 (2004)

Kazuhiro Nagata, Nobuko Hosokawa: Is EDEM a lectin-like chaperone involved in ERAD?
―EDEM, soluble EDEM and more...

Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones and the Heat Shock Response"
Cold Spring Harbor (USA), May 5~9 (2004)

久保田広志：線維タンパク質をつくる分子シャペロン

みらいせんい展・生命系イベントシンポジウム「細胞はナノファイバーで動かされてい
る!」、東京都、7月13日(2004)

永田和宏：コラーゲン線維と分子シャペロン

みらいせんい展・生命系イベントシンポジウム「細胞はナノファイバーで動かされてい
る!」、東京都、7月14日(2004)

細川暢子：小胞体の品質管理機構―細胞内メカニズム―

千里ライフサイエンスセミナー「タンパク質のクオリティコントロールとその破綻」、豊
中市、9月7日(2004)

永田和宏：小胞体品質管理の分子機構

国立遺伝研第995回バイオロジカルシンポジウム、三島市、9月21日(2004)

久保田広志、永田和宏：コラーゲンファイバーとその分子シャペロンの役割：HSP47-KOマウスの研究から

日本宇宙生物科学会第18回大会シンポジウム「動物細胞の重力適応：タンパク質ダイナミクスとファイバーシステム」、豊明市、10月1日(2004)

細川暢子、平尾和義、中村純治、長束優子、和田郁夫、永田和宏：糖タンパク質の小胞体関連分解：小胞体マンノシダーゼI、EDE1、EDE1ホモログタンパク質は、いずれも糖タンパク質のERADを促進する

第77回日本生化学会大会シンポジウム「糖タンパク質のフォールディングとプロセッシングの品質管理」、横浜市、10月15日(2004)

久保田広志、山崎裕自、吉田尊雄、安永卓生、北村朗、小田裕香子、永田和宏：

MCKUSICK-KAUFMAN SYNDROME タンパク質：中心体に豊富な新規シャペロン

第77回日本生化学会大会ワークショップ「分子シャペロン」、横浜市、10月15日(2004)

Kazuhiro Nagata : Productive folding and quality control of nascent proteins in the endoplasmic reticulum

IFMS, IMEG, CDB Joint Forum、神戸市、11月22日(2004)

Nobuko Hosokawa, Ikuo Wada, Kazuhiro Nagata : α -Mannosidase-like proteins involved in glycoprotein ERAD

第27回日本分子生物学会大会ワークショップ「タンパク質の品質管理とその破綻」、神戸市、12月9日(2004)

永田和宏：タンパク質はどのように作られ、どのように壊されるのか？

京都大学再生医科学研究所平成16年度学術講演会、京都市、12月17日(2004)

永田和宏：分子シャペロンとタンパク質品質管理

中部大学生物機能開発研究所シンポジウム、春日井市、2005.2.18

永田和宏：組織繊維化におけるコラーゲン特異的分子シャペロンHSP47の役割と治療戦略

第125回日本薬学会大会シンポジウム、東京都、2005.3.29

永田和宏 : Productive Folding and Quality Control of Proteins

理化学研究所・井川特別研究室シンポジウム（特別講演）、和光市、2005.4.8

永田和宏：ストレスに対応する反応と細胞の危機管理

第82回日本生理学会大会「若手の会」シンポジウム（基調講演）、仙台市、2005.5.18

Kazuhiro Nagata : Different mechanisms of the acceleration of ER-associated degradation by EDEM family proteins.

EMBO-FEBS WORKSHOP on Biology of Molecular Chaperones, Zakopane (Poland)、2005.5.30

Kazuhiro Nagata : Substrate recognition by HSP47, a collagen-specific molecular chaperone, as a member of serpin superfamily.

SERPINS 2005 The 4th International Symposium on Serpin Structure, Function and Biology, Cairns (Australia)、2005.6.7

Kazuhiro Nagata : Essential role of Collagen-Specific Molecular Chaperone HSP47
International Symposium on "Membrane Dynamics and Cell Regulation"、福岡市、
2005. 6. 29

永田和宏：小胞体関連分解：EDEMファミリーからユビキチン化まで
第5回日本蛋白質科学会年会シンポジウム、福岡市、2005. 7. 2

永田和宏：コラーゲン特異的分子シャペロンHSP47と繊維化疾患
第1回京都肝セルバイオロジー研究会（特別講演）、京都市、2005. 7. 16

永田和宏：糖鎖を認識するEDEMファミリータンパク質による小胞体関連分解
第25回日本糖質学会年会シンポジウム、大津市、2005. 7. 20

永田和宏：タンパク質のproductive foldingと品質管理
第17回高遠・分子細胞生物学シンポジウム「細胞生物学のカッティングエッジ」
（特別講演）、高遠町、2005. 8. 18

細川暢子：小胞体の品質管理機構
第7回GGA-HSP勉強会（特別講演）、東京都、2005. 8. 27

Kazuhiro Nagata : ER-associated degradation of misfolded proteins by EDEM and EDEM
family proteins
Second International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine、
Tomar (Portugal)、2005. 9. 25

菊池唯史、細川暢子、永田和宏、鈴木匡、宮田敏行、小亀浩市：小胞体膜蛋白質HerpはPNGase
と結合し、小胞関連分解基質の脱糖鎖を促進する
第78回日本生化学会ワークショップ「小胞体の蛋白質品質管理」、神戸市、
2005. 10. 19

Kazuhiro Nagata : ER stress and ER-Associated degradation of misfolded proteins :
The 18th Naitoh Conference、Shonan (Japan)、2005. 10. 28

Kazuhiro Nagata : Several components involved in ER-associated degradation of
misfolded glycoproteins
International Symposium on Life of Proteins、Awaji (Japan)、2005. 11. 1

Kazuhiro Nagata, Yoshihito Ishida, Hiroshi Kubota : Role of collagen-specific
molecular chaperone HSP47 in the correct folding and
fibril formation of procollagens ; lessons from mice and cells disrupted with
hsp47 gene 6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium、Hawaii (USA)、
2005. 12. 4

永田和宏：小胞体関連分野に関わるいくつかの因子
第28回日本分子生物学会年会シンポジウム「小胞体ストレスとタンパク質の品質管
理」、福岡市、2005. 12. 7

久保田進、久保田広志、永田和宏：細胞質シャペロンCCTは疎水性 β シートを認識し凝集を抑制する：三量体Gタンパク質 β サブユニットを用いた解析
第28回日本分子生物学会年会ワークショップ「蛋白質のフォールディング／プロセスングによる細胞機能調節とその破綻」、福岡市、2005.12.9

永田和宏：細胞内タンパク質品質管理の分子機構
京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科研究セミナー、京都市、2005.12.14

永田和宏：新しい測定技術を用いたタンパク質フォールディングの解析
特定領域研究「界面物理」班会議特別講演、京都市、2006.3.17

Kazuhiro Nagata : Cytosolic Chaperonin CCT: substrate recognition and the role in protein quality control
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、Kyoto(Japan)、2006.6.23

Kazuhiro Nagata, Susumu Kubota, Akira Kitamura, Shoshiro Hirayama, Hiroshi Kubota : Cytosolic chaperonin CCT/TRiC prevents the aggregation of β -sheet-containing proteins
2006 FASEB Summer Research Conferences Protein Folding in the Cell、Vermont(USA)、2006.8.2

永田和宏：細胞内におけるタンパク質の品質管理機構
産総研セミナー、東京都、2006.8.17

永田和宏：分子シャペロンによるタンパク質のフォールディングと品質管理
2006年秋季第67回応用物理学会学術講演会シンポジウム、草津市、2006.8.30

永田和宏：コラーゲン特異的分子シャペロンHSP47と繊維化疾患
第2回産学情報交流会、京都市、2006.10.20

Kazuhiro Nagata : Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. APOCB2006、北京(China)、2006.10.28

永田和宏：タンパク質の品質管理機構
聖マリアンナ医科大学大学院セミナー、川崎市、2006.11.8

永田和宏：細胞内タンパク質の品質管理機構
大阪大学微生物病研究所学術講演会、吹田市、2006.12.15

② 口頭発表 (国内会議14件、国際会議1件)

Kunihiko Yasuda, Kazunori Hirayoshi, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : Identification of cis-elements and transcription factors that regulate the tissue specific expression of HSP47. 第34回日本結合組織学会学術大会・第49回マトリックス研究会大会合同会議、浜松市、4月4日(2002)

Yasuhiro Matsuoka, Eihiro Adachi, Naoko Nagai, Nobuko Hosokawa, Hiroshi Kubota,

Kazuhiro Nagata : Embryoid bodies derived from HSP47-knockout embryonic stem cells are deficient in basement membrane formation during embryonic development.

第34回日本結合組織学会学術大会・第49回マトリックス研究会大会合同会議、
浜松市、4月4日(2002)

Takaki Koide, Yoshifumi Takahara, Shinichi Asada, Kazuhiro Nagata : Substrate-binding specificity of HSP47, a procollagen-specific molecular chaperone.

第34回日本結合組織学会学術大会・第49回マトリックス研究会大会合同会議、浜松市、
4月4日(2002)

石川奈美子、内藤素子、久保田広志、呉潮帆、片岡和哉、山脇吉朗、永田和宏、鈴木義久：
ケロイドにおけるstromyelin-3の発現

第11回日本形成外科学会基礎学術集会、仙台市、10月3日(2002)

野崎潤一、久保田広志、吉田秀郎、内藤素子、吉永侃夫、森和俊、小泉昭夫、永田和宏：
転写因子ATF6及びXBP1活性化を介した小胞体ストレス応答によるアキタマウス脾 β 細胞株小胞体シャペロンの誘導第7回臨床ストレス蛋白質研究会、名古屋市、11月23日
(2002)

Yasuhiro Matsuoka, Eijichiro Adachi, Naoko Nagai, Nobuko Hosokawa, Hiroshi Kubota
& Kazuhiro Nagata : IMPAIRMENT OF BASEMENT MEMBRANE FORMATION IN EMBRYOID BODIES
LACKING THE GENE OF HSP47 DURING TO THE MATURATION OF TYPE IV COLLAGEN

第11回国際基底膜シンポジウム、木更津市、3月6日(2003)

久保田広志、山崎裕自、安永卓生、北村朗、吉田尊雄、永田和宏 : Mckusick-Kaufman syndrome
タンパク質の生化学的解析 第8回臨床ストレス蛋白質研究会、徳島市、11月28日
(2003)

丸谷寿裕、山本章嗣、永井尚子、久保田広志、永田和宏 : HSP47ノックアウトマウスにおける
IV型コラーゲンの小胞体内保留による基底膜形成不全

第8回臨床ストレス蛋白質研究会、徳島市、11月28日(2003)

久保田広志、山崎裕自、吉田尊雄、安永卓生、北村 朗、小田裕香子、永田和宏 : 中心体
に豊富なシャペロニン様タンパク質MKKSPの病因変異体は急速な細胞内分解を受ける

第9回臨床ストレス蛋白質研究会、秋田市、11月3日(2004)

Yuko Natsuka : Cloning, expression, and characterization of EDEM homolog proteins.
Gordon Research Conference on Glycobiology, Ventura(USA)、2005.3. 8

石田義人、久保田広志、山本章嗣、Lynn Y Sakai、Hans-peter Bachinger、永田和宏：
Hsp47欠損繊維芽細胞におけるI型コラーゲン繊維形成不全と凝集体形成

第10回臨床ストレス蛋白質研究会、熊本市、2005.11.26

森戸大介、平尾和義、細川暢子、徳永文稔、田中啓二、岩井一宏、永田和宏：
小胞体膜貫通型ユビキチンリガーゼgp78のE4活性による 変異型CFTRのユビキチン化

第1回臨床ストレス応答学会大会、京都市、2006.11.22-23

Hiroshi Kubota, Akira Kitamura, Susumu Kubota, Shoshiro Hirayama and Kazuhiro Nagata :
Cytosolic chaperonin CCT prevents aggregation and toxicity of beta-sheet-rich

proteins through specific interactions.

第1回臨床ストレス応答学会大会シンポジウム「タンパク質のミスフォールディングと疾患」、京都市、2006.11.22-23

森戸大介、平尾和義、細川暢子、徳永文穂、田中啓二、岩井一宏、永田和宏：
小胞体膜貫通型ユビキチンリガーゼgp78のE4活性による 変異型CFTRのユビキチン化
第1回臨床ストレス応答学会大会、京都市、2006.11.22-23

平山尚志郎、山崎祐自、北村朗、小田裕香子、森戸大介、大川克也、木村宏、久保田広志、
永田和宏：McKusick-Kaufman syndromeタンパク質の疾患原因変異体はE3リガーゼCHIPを介
してユビキチン-プロテアソーム系で素早く分解される
第1回臨床ストレス応答学会大会、京都市、2006.11.22-23

久保田広志、北村朗、久保田進、平山尚志郎、永田和宏：細胞質シャペロニンCCTは β
シートタンパク質の凝集を防ぐ。日本分子生物学会2006シンポジウム「細胞内のタンパク
質社会と「品質管理」、名古屋市、2006.12.6

③ ポスター発表 (国内会議42件、国際会議25件)

2002年

Takao Yoshida & Tadashi Maruyama: Archaeal group II chaperonin mediates protein
folding in its *cis*-cavity with the closed built-in lid.
Cold Spring Harbor Meeting, Cold Spring Harbor (USA), May 1

佐藤啓二、蓬田健太郎、和田崇之、頼藤徹也、西宗義武、細川暢子、永田和宏：
新規コラーゲン様タンパク質、COL-T0の分泌タンパク質としての特徴
第55回日本細胞生物学会大会、横浜市、5月22日

山崎裕自、久保田広志、野崎正美、永田和宏：
細胞質シャペロニンCCTの θ サブユニットをコードする遺伝子Cctqの転写制御
第55回日本細胞生物学会大会、横浜市、5月22日

野崎潤一、久保田広志、吉田秀郎、内藤素子、吉永侃夫、森和俊、小泉昭夫、永田和宏：
Insulin-Akita mouse より樹立した膵ラ氏島 β 細胞株における小胞体ストレス応答
第55回日本細胞生物学会大会、横浜市、5月23日

小田裕香子、細川暢子、和田郁夫、永田和宏：ERAD経路においてEDEPと相互作用するタン
パク質との解析 第55回日本細胞生物学会大会、横浜市、5月23日

Kazuhiro Nagata: Collagen-specific molecular chaperone HSP47 is essential for the
correct folding and/or assembly of procollagen. Gene disruption and substrate
recognition. 3rd International Symposium on Serpin Biology, Structure and Function,
Chicago(USA), June 2-5

松岡泰弘、安達栄治郎、永井尚子、細川暢子、久保田広志、永田 和宏：Hsp47ノックアウト
マウス細胞はIV型コラーゲンの分子成熟及び基底膜形成に異常をきたす
第75回日本生化学会大会、京都市、10月14日～17日

野崎潤一、久保田広志、吉田秀郎、内藤素子、吉永侃夫、森和俊、小泉昭夫、永田和宏：

インスリン-アキタマウス由来膵ラ氏島β細胞株における転写因子ATF6とXBP1の活性化を介した小胞体ストレス応答 第25回日本分子生物学会年会、横浜市、12月11日～14日

小田裕香子、細川暢子、和田郁夫、永田和宏：ERAD経路におけるEDEP-calnexin complexの解析 第25回日本分子生物学会年会、横浜市、12月11日～14日

山崎裕自、久保田広志、野崎正美、永田和宏：
細胞質シャペロニンCCTシータサブユニットをコードする遺伝子CctqのEtsファミリータンパク質Elk-1, Sap-1a, Netによる転写制御 第25回日本分子生物学会年会、横浜市、12月11日～14日

2003年

丸谷寿裕、山本章嗣、久保田広志、永井尚子、永田和宏：HSP47ノックアウトマウス胚におけるIV型コラーゲンの小胞体内蓄積と基底膜形成不全
第56回日本細胞生物学会大会、大津市、5月14日

久保田広志、永田和宏：マウス細胞質シャペロニンのデルタサブユニットをコードする遺伝子Cctdの転写調節機構 第56回日本細胞生物学会大会、大津市、5月15日

小田裕香子、細川暢子、和田郁夫、永田和宏：ERADにおけるEDEPとcalnexinの機能解析
第56回日本細胞生物学会大会、大津市、5月15日

平尾和義、森戸大介、長束優子、細川暢子、林崎良英、永田和宏：EDEPに相同性を持つ小胞体内可溶性蛋白質の機能解析 第56回日本細胞生物学会大会、大津市、5月15日

山崎裕自、久保田広志、野崎正美、永田和宏：細胞質シャペロニンシータサブユニットをコードするCctq遺伝子のEts family protein (Elk-1, Sap-1a, Net)による転写制御
第56回日本細胞生物学会大会、大津市、5月15日

松居利江、吉田秀郎、細川暢子、永田和宏、森和俊：哺乳動物小胞体ストレス応答に関与するIRE1-XBP1経路の解析 第56回日本細胞生物学会大会、大津市、5月15日

Toshihiro Marutani, Akitsugu Yamamoto, Hiroshi Kubota, Naoko Nagai, Kazuhiro Nagata :
Hsp47 knockout mouse has no type IV collagen in basement membranes: accumulation in endoplasmic reticulum
5th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Ube, June 6

久保田広志、永田和宏：細胞質シャペロニンデルタサブユニット遺伝子 Cctdの発現調節を担う転写因子群の解析 第26回日本分子生物学会年会、神戸市、12月13日

山崎裕自、北村朗、吉田尊雄、久保田広志、永田和宏：発生異常をおこすシャペロニン様タンパク質MKKSPの分子生物学的解析
第26回日本分子生物学会年会、神戸市、12月13日

吉田尊雄、久保田広志、永田和宏：細胞質シャペロニンCCTの組換え体サブユニット機能解析 第26回日本分子生物学会年会、神戸市、12月13日

2004年

Nobuko Hosokawa, Ikuo Wada, Yuko Natsuka, Kazuhiro Nagata : EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded $\alpha 1$ -antitrypsin
第 5 7 回日本細胞生物学会大会、豊中市、5 月 2 6 ~ 2 8 日

Toshihiro Marutani, Akitsugu Yamamoto, Naoko Nagai, Hiroshi Kubota, Kazuhiro Nagata : Accumulation of incorrectly folded type IV collagen in dilated ER in hsp47 null mice, causes an ER stress resulting in apoptosis
第 5 7 回日本細胞生物学会大会、豊中市、5 月 2 6 ~ 2 8 日

Junji Nakamura, Kazuhiro Nagata Nobuko Hosokawa :
Differential expression of EDEM and sEDEM(EDEM soluble homologue)mRNAs during embryonic development of the mice
第 5 7 回日本細胞生物学会大会、豊中市、5 月 2 6 ~ 2 8 日

Yasuhiro Matsuoka, Hiroshi Kubota, Akira Kitamura, Kazuhiro Nagata : Mutational analysis of the ER molecular chaperone HSP47 for identifying the collagen-binding sites 第 5 7 回日本細胞生物学会大会、豊中市、5 月 2 6 ~ 2 8 日

Koji Nagasawa, Toshio Higashi, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : Simultaneous induction of all subunits of TRAP gene by ER stress
第 5 7 回日本細胞生物学会大会、豊中市、5 月 2 6 ~ 2 8 日

Kazuyoshi Hirao, Daisuke Morito, Yuko Natsuka, Nobuko Hosokawa, Yoshihide Hayashizaki, Kazuhiro Nagata : A soluble homologue of EDEM accelerate ER-associated degradation 第 5 7 回日本細胞生物学会大会、豊中市、5 月 2 6 ~ 2 8 日

Tetsuya Okada, Yukako Oda, Hiderou Yoshida, Randal J. Kaufman, Kazuhiro Nagata, Kazutoshi Mori : CERD, a novel component of ER-associated degradation machinery, regulated by the IRE1-XBP1 pathway
FASEB 2004 Summer Research Conferences, Vermont(USA), July 31-August 5

久保田広志、山崎裕自、吉田尊雄、安永卓生、北村 朗、小田裕香子、永田和宏 :
McKusick-Kaufman syndromeタンパク質 : 中心体に豊富な新規シャペロニン
第 7 7 回日本生化学会大会、横浜市、1 0 月 1 5 日

長束優子、平尾和義、中村純治、田村拓、和田郁夫、長束俊治、細川暢子、永田和宏 :
EDEMホモログ蛋白質の機能解析 第 7 7 回日本生化学会大会、横浜市、1 0 月 1 5 日

松岡泰弘、久保田広志、北村 朗、永田和宏 : ER分子シャペロンHSP47のコラーゲン結合部位 第 7 7 回日本生化学会大会、横浜市、1 0 月 1 5 日

Yuko Natsuka, Kazuyoshi Hirao, Junji Nakamura, Shunji Natsuka, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : Cloning Expression, and Characterization of EDEM Homolog Proteins
US/Japan Glyco 2004 Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, Hawaii(USA), November 18

A. Oguro, T. Sakurai, M. Otawa, K. Nagata, Y. Atomi : The change of HSP47, collagen specific molecular chaperone, expression in rat skeletal muscle may regulate collagen production with gravitational conditions

44rd American Society for Cell Biology Annual Meeting, Washington(USA), December 4-8

久保田広志、山崎裕自、吉田尊雄、安永卓生、北村 朗、小田裕香子、永田和宏：シャペロニン様Mckusick-Kaufman syndromeタンパク質の病因変異体はプロテアソーム依存的に急速に分解される 第27回日本分子生物学会大会、神戸市、12月9日

森戸大介、平尾和義、細川暢子、永田和宏：哺乳類HRD1ホモログの基質選択の解析
第27回日本分子生物学会大会、神戸市、12月9日

小田裕香子、岡田徹也、吉田秀郎、Randal J. Kaufman、永田和宏、森 和俊：IRE1-XBP1 経路で制御される新規遺伝子 CERD1/Derlin-2 の機能解析
第27回日本分子生物学会大会、神戸市、12月9日

Nobuko Hosokawa, Kazuyoshi Hirao, Yuko Natsuka, Junji Nakamura, Daisuke Morito, Ikuo Wada, Barry Sleno, Linda O. Tremblay, Annette Herscovics, Kazuhiro Nagata :
A novel soluble EDEM homolog enhances glycoprotein ERAD.
2005 ASBMB Annual Meeting, San Diego(USA)、2005.4.2-6

Hiroshi Kubota, Yuji Yamazaki, Akira Kitamura, Yukako Oda, Shoshiro Hirayama, Kazuhiro Nagata : Mckusich-Kaufman syndrome gene product is a chaperonin-like molecule abundant in the centrosome and degraded upon disease-causing mutation.
第58回日本細胞生物学会大会、さいたま市、2005.6.14-17

Yuko Natsuka, Kazuyoshi Hirao, Junji Nakamura, Taku Tamura, Ikuo Wada, Shunji Natsuka, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : Functional analysis of EDEM homologue protein. 第58回日本細胞生物学会大会、さいたま市、2005.6.14-17

Daisuke Morito, Kazuyoshi Hirao, Nobuko Hosokawa Kazuhiro Nagata :
Dissection of functional differences between two mammalian Hed1p orthologues: gp78 and mHRD1. 第58回日本細胞生物学会大会、さいたま市、2005.6.14-17

Koji Nagasawa, Toshio Higashi, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : TRAP complex is involved in ERAD pathway. 第58回日本細胞生物学会大会、さいたま市、2005.6.14-17

Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Kazuhiro Nagata : Aggregation of actin and tubulin by RNAi-mediated knockdown of cytosolic chaperonin CCT in human cells.
第58回日本細胞生物学会大会、さいたま市、2005.6.14-17

Yoshihito Ishida, Hiroshi Kubota, Hans-Peter Bachinger, Kazuhiro Nagata :
The lack of Hsp47 causes accumulation of type I collagen in the endoplasmic reticulum and defect in extracellular fibril formation.
第58回日本細胞生物学会大会、さいたま市、2005.6.14-17

Yasuhiko Matsuoka, Hiroshi Kubota, Akira Kitamura Kazuhiro Nagata :
Analysis of the collagen-binding sites by mutation of the ER molecular chaperone HSP47.
第58回日本細胞生物学会大会、さいたま市、2005.6.14-17

長束優子、平尾和義、中村純治、田村拓、和田郁夫、長束俊治、細川暢子、永田和宏 :
EDEM可溶性ホモログEDEM3はマンノシダーゼ活性を介してERADを促進する

第25回日本糖質学会年会、大津市、2005.7.20-22

Yukako Oda, Tetsuya Okada, Hiderou Yoshida, Randal J. Kaufman, Kazuhiro Nagata, Kazutoshi Mori : Derlin-2 Derlin-3 regulated by mammalian unfolded protein response are required for ER-associated degradation.
Second International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, Tomar (Portugal)、2005.9.25

菊池唯史、細川暢子、永田和宏、鈴木匡、宮田敏行、小亀浩市 :
小胞体膜蛋白質HerpはPNGaseと結合し、小胞関連分解基質の脱糖鎖を促進する
第78回日本生化学会、神戸市、2005.10.19-22

Nobuko Hosokawa, Kazuyoshi Hirao, Junji Nakamura, Daisuke Morito, Yuko Natsuka, Ikuo Wada, Pedro Romero, Barry Sleno, Linda O. Tremblay, Annette Herscovics, Kazuhiro Nagata : A novel soluble EDEM homolog enhances glycoprotein ERAD.
International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan)、2005.10.30-11.3

Hiroshi Kubota, Yuji Yamazaki, Akira Kitamura, Yukako Oda, Shosiro Hirayama, Kazuhiro Nagata : Mckusick-Kaufman syndrome gene product is a chaperonin-like protein shuttling between the centrosome and cytosol and degraded upon disease-causing mutations.
International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan)、2005.10.30-11.3

Daisuke Morito, Kazuyoshi Hirao, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : Dissection of functional differences between two mammalian Hrd1 orthologues : gp78 and mHRD1.
International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan)、2005.10.30-11.3

Yukako Oda, Tetsuya Okada, Hiderou Yoshida, Randal J. Kaufman, Kazuhiro Nagata and Kazutoshi Mori : Derlin-2 and Derlin-3 regulated by mammalian Unfolded Protein Response are required for ER-associated Degradation.
International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan)、2005.10.30-11.3

Susumu Kubota, Hiroshi Kubota, Kazuhiro Nagata : Cytosolic chaperonin CCT prevents WD40 repeat protein Gb from aggregation by trapping a hydrophobic surface of β -strands. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan)、2005.10.30-11.3

Koji Nagasawa, Toshio Higashi, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : Involvement of TRAP complex in ERAD pathway. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan)、2005.10.30-11.3

Yoshihito Ishida, Hiroshi Kubota, Akitugu Yamamoto, Lynn Y Sakai, Hans-peter Bachinger, Kazuhiro Nagata : Hsp47-null fibroblasts fail to form type I collagen fibrils due to improper folding and aggregation in the ER. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan)、2005.10.30-11.3

Yoshihiro Ishikawa, Janice A. Vranka, Kazuhiro Nagata and Hans-Peter Bachinger : Functional analysis of the CXXC motif in various proteins : Does this motif have protein disulfide isomerase activity? International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan)、2005.10.30-11.3

Hiroshi Kubota, Yasuhiko Matsuoka, Takayuki Homma, Akira Kitamura, Kazuhiro Nagata :
Hydrophobic residues neighboring the serpin loop of HSP47 is required for collagen binding

6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hawaii (USA)、2005. 11. 30-12. 5

Yoshihito Ishida, Hiroshi Kubota, Akitugu Yamamoto, Lynn Y. Sakai, Hans-peter Bachinger, Kazuhiro Nagata :

Defect in extracellular fibril formation of type I collagen due to its improper folding in the ER of HSP47-knockout fibroblasts

6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hawaii (USA)、2005. 11. 30-12. 5

Motoko Naitoh, Hiroshi Kubota, Mika Ikeda, Shigehiko Suzuki, Kazuhiro Nagata :
Chondro-osteogenic gene expression and accumulation of tendon-like matrix in the human dermal disease, keloid

6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hawaii (USA)、2005. 11. 30-12. 5

石田義人、久保田広志、山本章嗣、Bachinger Hans-peter、Sakai Lynn Y、永田和宏 :
Hsp47は小胞体における I 型コラーゲンの正しい三本鎖形成と凝集阻止に必須である

第 28 回日本分子生物学会年会、福岡市、2005. 12. 7-9

浅田真一、西川良美、山崎ちさと、本間大輔、高原佳史、永田和宏、北川幸己、小出隆規 :
HSP47によって認識されるコラーゲン様 3 本らせん上の構造モチーフの同定及び網羅的基質検索 第 53 回マトリックス研究会、箱根、2006. 3. 25-26

浅田真一、西川良美、高原佳史、山崎ちさと、本間大輔、大高章、永田和宏、北川幸己、小出隆規 :
コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の網羅的基質探索

日本薬学会第 126 年会、仙台市、2006. 3. 28-30

久保田広志、久保田進、永田和宏 : 細胞質シャペロニン CCT は三量体 G タンパク質 β サブユニットの疎水的 β シートを認識して凝集を抑制する

第 6 回日本蛋白質科学会年会、京都市、2006. 4. 24-26

Nobuko Hosokawa, Ikuo Wada, Kazuhiro Nagata : Involvement of N-linked oligosaccharides in the ERAD of misfolded human $\alpha 1$ -antitrypsin

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、Kyoto (Japan)、2006. 6. 18-23

Koji Nagasawa, Toshio Higashi, Nobuko Hosokawa, Randal J. Kaufman, Kazuhiro Nagata :
Mammalian TRAP complex, induced by ER stress, accelerates the degradation of misfolded proteins in the ER

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、Kyoto (Japan)、2006. 6. 18-23

Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Chan-Gi Pack, Gen Matsumoto, Shoshiro Hirayama, Yasuo Takahashi, Hiroshi Kimura, Masataka Kinjo, Richard I.

Morimoto, Kazuhiro Nagata : Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering oligomeric aggregation state

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、Kyoto (Japan)、2006. 6. 18-23

Koji Ohashi, Taku Tamura, Nobuko Hosokawa, Ikuo Wada :
Real-time analysis of retrotranslocation of terminally misfolded secretory proteins
by fluorescence correlation spectroscopy
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology,
Kyoto(Japan)、2006.6.18-23

Daisuke Morito, Kazuyoshi Hirao, Nobuko Hosokawa, Fuminori Tokunaga, Kazuhiro Nagata :
The clearance of misfolded CFTR mutant involves the ER membrane ubiquitin ligase,
gp78 2006 FASEB Summer Research Conferences Protein Folding in the Cell,
Vermont(USA)、2006.7.29-8.3

Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Chan-Gi Pack, Gen Matsumoto, Shoshiro Hirayama, Yasuo
Takahashi, Hiroshi Kimura, Masataka Kinjo, Richard I. Morimoto, Kazuhiro Nagata :
Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering oligomeric
aggregation state 2006 FASEB Summer Research Conferences Protein Folding in the Cell,
Vermont(USA)、2006.7.29-8.3

Shoshiro Hirayama, Yuji Yamazaki, Akira Kitamura, YUkako Oda, Daisuke Morito, Katsuya
Okada, Hiroshi Kimura, Hiroshi Kubota, Kazuhiro Nagata : Mckusick-Kaufman syndrome
protein shuttles to the centrosome and its mutants are rapidly degraded upon mutations
via ubiquitin-proteasome pathway.
日本分子生物学会2006、名古屋市、2006.12.6-8

(4)特許出願

- ・出願日 : 2003年4月21日
- ・名 称 : ケロイドの診断方法
- ・出願人 : 第一製薬株式会社
- ・発明者 : 永田和宏、内藤素子

- ・出願日 : 2006年
- ・名 称 : コラーゲン特異的分子シャペロンHSP47の測定方法
- ・出願人 : 学校法人北里学園
- ・発明者 : 渡邊昌彦、安達栄治郎、永田和宏、菊池史郎、平井和弥、小野里航、
細谷 智

- ・出願日 : 2006年12月4日
- ・出願番号 : 特願2006-327016
- ・名 称 : 小胞体還元酵素によるミスフォールドタンパク質の分解促進技術
- ・出願人 : 株式会社ロコモジェン
- ・発明者 : 永田和宏

(5)受賞等

- ①受賞 : 永田和宏 (平成17年度京都新聞大賞文化学術賞受賞)
- ②新聞報道 : Science (2003) 関連、Nature Cell Biol.(2006)関連

(6)その他特記事項 なし

和田グループ

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 18件)

Nagaya H, Wada I, Jia Y-J, Kanoh H. Diacylglycerol kinase δ suppresses ER-to-Golgi traffic through its SAM and PH domains. *Mol. Biol. Cell* 13, 1, 302–316, 2002

Taniguchi T, Kuroda R, Sakurai K, Nagahama M, Wada I, Tsuji A, Matsuda K. A critical role for the carboxy terminal region of the proprotein convertase, PACE4A, in the regulation of its autocatalytic activation coupled with secretion. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 290, 2, 878–884, 2002

Okiyoneda T, Wada I, Jono H, Shuto T, Yoshitake K, Nakano N, Nagayama S, Harada K, Isohama Y, Miyata T, Kai H. Calnexin Delta 185–520 partially reverses the misprocessing of the Delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* 526, 1–3, 87–92, 2002

Oda Y, Hosokawa N, Wada I, Nagata K. EDEM as an Acceptor of Terminally Misfolded Glycoproteins Released from Calnexin. *Science* 299, 5611, 1394–1397, 2003

Hosokawa N, Tremblay LO, You Z, Herscovics A, Wada I, Nagata K. Enhancement of Endoplasmic Reticulum (ER) Degradation of Misfolded NullHongKong α 1-Antitrypsin by Human ER Mannosidase I. *J. Biol. Chem.* 278, 28, 26287–26294, 2003

Takamura A, Adachi M, Wada I, Takayama S, Imai K. Accumulation of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulator BAG-1 on COPI-coated structures in gastric epithelial cells. *Int J Oncol* 23, 5, 1301–1308, 2003

Okiyoneda T, Harada K, Takeya M, Yamahira K, Wada I, Shuto T, Soten MAS, Kai H. F508CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol Bio Cell* 15, 2, 263–274, 2004

Kamada A, Nagaya H, Tamura T, Kinjo M, Jin H-Y, Yamashita T, Jimbow K, Kanoh H, Wada I. Regulation of immature protein dynamics in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279, 20, 21533–21542, 2004

Saito K, Wada I, Tamura M, Kinjo M, Direct detection of caspase-3 activation in single live cells by cross-correlation analysis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 324, 2, 849–854, 2004

Liu Y, Endo Y, Iwaki D, Nakata M, Matsushita M, Wada I, Inoue K, Munakata M, Fujita T. Human M-Ficolin Is a Secretory Protein That Activates the Lectin Complement Pathway. *J Immunol*, 175, 5, 3150–3156, 2005.

Kato-Homma M, Wada I, Suzuki T, Yamaki J, Krebs EG, Homma Y. CK2 phosphorylation of translation initiation factor eIF5 potentiates cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 43, 15688–15693, 2005

Joo-Okumura A, Hatsuzawa K, Tamura T, Nagaya H, Saeki K, Okumura F, Nagao K, Nishikawa M, Yoshimura A, Wada I. Involvement of a novel Q-SNARE, D12, in quality control of endomembrane system. *J Biol Chem* 281, 7, 4495–4506, 2006

Hosokawa N, Wada I, Natsuka Y, Nagata K. EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded alpha1-antitrypsin. *Genes to Cells* 11, 5, 465-476, 2006

Hirao K, Natsuka Y, Tamura T, Wada I, Morito M, Natsuka S, Romero P, Sleno B, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K, Hosokawa N. EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein ERAD and mannose trimming. *J. Biol. Chem.* 281, 14, 9650-9658, 2006

Harada K, Okiyonedo T, Hashimoto Y, Ueno K, Nakamura K, Yamahira K, Sugahara T, Shuto T, Wada I, Suico MA, Kai M. Calreticulin negatively regulates the cell surface expression of CFTR. *J Biol Chem*, 281, 18, 12841-12848, 2006

Hatsuzawa K, Tamura T, Hashimoto H, Hashimoto H, Yokoya S, Miura M, Nagaya H, Wada I. Involvement of Syntaxin 18, an Endoplasmic Reticulum (ER)-localized SNARE Protein, in ER-mediated Phagocytosis. *Mol Biol Cell* 17, 9, 3964-3977, 2006

Tomoichi Yokozeki, Shuji Wakatsuki, Kiyotaka Hatsuzawa, Roy A. Black, Ikuo Wada, Atsuko Sehara-Fujisawa.

Meltrin beta/ADAM19 Mediates Ectodomain Shedding of Neuregulin beta1 in the Golgi Apparatus: Fluorescence Correlation Spectroscopic Observation of the Dynamics of Ectodomain Shedding in Living Cells *Genes to Cells*, in press

(2)その他の著作物)

和田郁夫、長屋寿雄、田村拓、小胞体内でのタンパク質の動態、蛋白質核酸酵素（別冊「細胞における蛋白質の一生」）、49、7、1018-1022、2004

和田郁夫、長屋寿雄、田村拓、FCS と FRAP による細胞内分子の拡散、結合解析。「バイオイメージングがわかるー細胞内分子を観察する多様な技術とその原理」（羊土社）、62-75、2005

大橋功治、和田郁夫。FRAP と FCS を用いた拡散解析、「染色・バイオイメージング実験ハンドブック」（羊土社）、222-227、2006

初沢清隆、ファゴサイトーシスと抗原提示におけるメンブレントラフィック、実験医学、24、14、2104-2109、2006

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待講演（国内会議 5 件、国際会議 0 件）

細川暢子、和田郁夫、永田和宏。小胞体関連分解における EDEM タンパク質の機能。第 25 回日本分子生物学会、横浜、2002/12/11

和田郁夫、分子ダイナミクス観測による分泌系での品質管理機構の解析、第 57 回日本顕微鏡学会、札幌、2003/6/16

和田郁夫、小胞体内でのタンパク質の動態制御、第 77 回日本薬理学会年会、大阪、2004/3/9

和田郁夫、小胞体内でのタンパク質の動き～FCS を用いて、理研シンポジウム・蛍光相関分光で見る生体系の情報伝達、和光、2004/3/22

Hosokawa N, Hirao K, Nakamura J, Natsuka Y, Wada I, Nagata K. ER degradation of glycoproteins: ER mannosidase I, EDEM and soluble EDEM accelerates glycoprotein ERAD. 第 77 回日本生化学会, 横浜, 2004/10/15.

②口頭発表 (国内会議 9 件、国際会議 0 件).

細川暢子、和田郁夫、長束優子、永田和宏. 小胞体品質管理に関わる EDEM タンパク質の機能解析. 第 56 回日本細胞生物学会大会、滋賀、2003/5/16

長屋寿雄、田村拓、和田郁夫、小胞体内での蛋白質動態の解析、第 26 回分子生物学会年會、京都、2003/12/11

Tamura T, Hashimoto H, Noguchi Y, Hatsuzawa K, Mizuguchi J, Wada I. Analysis of fibrinogen biogenesis in and beyond the ER. 第 77 回日本生化学会 横浜, 2004/10/15.

Hosokawa N, Wada I, Natsuka Y, Nagata K. EDEM accelerate ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded $\alpha 1$ -antitrypsin. 第 57 回日本細胞生物学会大会、大阪、2004/5/28

Hosokawa N, Wada I, Nagata K. α -mannosidase-like proteins involved in glycoprotein ERAD. 第 27 回日本分子生物学会年會、神戸、2004/12/9

大橋功治、長屋寿雄、田村拓、和田郁夫. 小胞体内カーゴタンパク質のダイナミクス. 第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005/12/9

田村拓、和田郁夫. 凝集体の小胞体からの輸送について. 第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005/12/9

本間美和子、山木淳子、鈴木俊之、和田郁夫、本間好. CK2 phosphorylation of translation initiation factor eIF5 potentiates cell cycle progression. 第 78 回日本生化学会年會、福岡、2005/10/21

山下純、鈴木啓、川岸位多、田中健、大竹伸也、和久敬蔵、杉浦隆之、橋本仁志、和田郁夫: Coenzyme A-mediated redistribution of a Golgi-resident protein to the endoplasmic reticulum. Possible involvement of reverse reaction of acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. 第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005/10/20

③ポスター発表 (国内会議 14 件、国際会議 4 件)

小田裕香子、細川暢子、和田郁夫、永田和宏. EDEM 経路における EDEM-calnexin complex の解析. 第 55 回日本細胞生物学会大会、横浜. 2002/5/23

長屋寿雄、田村拓、和田郁夫. 小胞体繊維領域からの COPII コート解離の制御機構について. 第 75 回日本生化学会大会、京都、2002/10/16

小田裕香子、細川暢子、和田郁夫、永田和宏. EDEM 経路における EDEM-calnexin complex の解析. 第 25 回日本分子生物学会年會要旨集、横浜. 2002/12/12

小田裕香子、細川暢子、和田郁夫、永田和宏. The function of EDEM and calnexin in the ERAD pathway. 第 56 回日本細胞生物学会年會要旨集、大津、2003/5/16

城尾 晶子、初沢清隆、佐伯和子、村田昌之、吉村昭彦、和田郁夫. 新規小胞体タンパク質

D12 の機能解析. 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003/12/11

Natsuka Y, Hirao K, Nakamura J, Tamura T, Wada I, Natsuka S, Hosokawa N, Nagata K. Functional analysis of EDEM homologue proteins. 第 77 回 日本生化学会年回 横浜, 2004/10/15

Hatsuzawa K, Hashimoto H, Tamura T, Wada I. Involvement of ER-localized SNARE proteins in phagosome formation. 第 77 回日本生化学会 横浜, 2004/10/15.

城尾晶子, 初沢清隆, 橋本仁志, 佐伯和子, 吉村昭彦, 和田郁夫. 分泌系初期経路における t-SNARE D12 動態の解析. 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004/12/8

Okiyoneda T, Okiyoneda T, Harada K, Takeya M, Yamahira K, Wada I, Shuto T, Soten MAS, Kai H. F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. 第 57 回日本細胞生物学会大会、大阪、2004/5/28

Hashimoto H, Severin F, Lanoix J, Hatsuzawa K, Wada I, Nilsson T. Coatmer protein I (COPI) and rab proteins are needed for ER-Golgi transport and juxta nuclear positioning of the Golgi. 第 57 回日本細胞生物学会大会、大阪、2004/5/28

Glycoprotein dynamics in the endoplasmic reticulum. Nagaya H, Tamura T, Hashimoto H, Hatsuzawa K, Kinjo M, Wada I. Biophysical Society 49th Annual meeting, Long Beach, 2005/2/13

Hatsuzawa K, Hashimoto H, Hashimoto H, Tamura T, Wada I. ER-located SNARE proteins mediate membrane fusion between the ER and plasma membranes during phagosome formation. 第58回日本細胞生物学会大会プログラム, 埼玉, 2005/6/17

Hatsuzawa K, Hashimoto H, Yokoya S, Hashimoto H, Tamura T, Wada I. Involvement of Syntaxin 18, an ER-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis. 45th American Society for Cell Biology, サンフランシスコ, 2005/12/10

Hosokawa N, Hirao K, Natsuka Y, Nakamura J, Morito J, Wada I, Sleno B, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K. A novel soluble EDEM homolog enhances glycoprotein ERAD. ASBMB Annual Meeting, San Diego, 2005/4/3

Ohashi K, Tamura T, Hosokawa N, Wada I. Real-time analysis of retrotranslocation of terminally misfolded secretory proteins by fluorescence correlation spectroscopy. 20th IUBMB、京都、2006/6/23

Higa-Nishiyama A, Oguchi S, Tamura T, Hashimoto H, Hatsuzawa K, Wada I. Identification of factors required for structure and secretory function of the endoplasmic reticulum by siRNA screening. 20th IUBMB、京都、2006/6/23

Yamashita A, Miura M, Suzuki H, Kawagishi N, Tanaka K, Waku K, Sugiura T, Wada I. Coenzyme A-induced fission of Golgi complex. Possible involvement of reverse reaction of acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. 20th IUBMB、京都、2006/6/20

K Hatsuzawa, H Hashimoto, I Wada

The Sec22b SNARE protein inhibits the ER-mediated phagocytosis in J774 macrophages
46th Annual meeting of the American Society for Cell Biology, USA, 2006, 12, 13

(4)特許出願

国内出願 (1件)

「タンパク質分泌・輸送機構に関与する分泌・輸送機構関連タンパク質、ならびにこれらの同定・機能解析方法」、和田郁夫・西山亜里砂、(株)RNAi、2006/5/30、出願中

(5)受賞等 なし

(6)その他特記事項 なし

森グループ

(1)原著論文発表 (国内誌0件、国際誌4件)

Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J.* (2002) 366:585-94.

Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell.* (2003) 4:265-71.

Okada T, Haze K, Nakanaka S, Yoshida H, Seidah NG, Hirano Y, Sato R, Negishi M, Mori K. A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J Biol Chem.* (2003) 278:31024-32.

Oda Y, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J. Cell Biol.* (2006) 172: 383-93

(2)その他の著作物 なし

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待講演 (国内会議3件、国際会議 2 件)

第 25 回日本分子生物学会年会 横浜市西区 平成 1 4 年 1 2 月 1 2 日

小胞体ストレス応答における時間依存的相転移 [森 和俊 (京大院・生命科学, CREST)]

第 7 5 回日本生化学会大会、京都 平成 1 4 年 1 0 月 1 4 ~ 1 7 日

Role of transcriptional induction systems in the quality control of proteins in the endoplasmic reticulum [Kazutoshi Mori(1,2), Hiderou Yoshida(1,3), Toshie Matsui(1,2), Tetsuya Okada(1,2): (1)Graduate School of Biostudies, Kyoto University; (2)CREST; (3)PRESTO]

第 7 5 回日本生化学会大会、京都 平成 1 4 年 1 0 月 1 4 ~ 1 7 日

小胞体ストレス応答における IRE1-XBP1 経路の役割 [吉田秀郎 (1,2), 松居利江(1,3), 鈴木美絵(1,3), 川崎賢明(1,3), 岡田徹也(1,3), 森和俊(1,3): (1)京都大学大学院生命科学研究所; (2)科技団 PRESTO; (3)科技団 CREST]

キーストンシンポジウム 米国ニューメキシコ州タオス 平成15年3月5日
Roles of Transcriptional Induction Systems in the ER Quality Control [Kazutoshi Mori, Graduate School of Biostudies, Kyoto University & CREST, Japan Science and Technology Corporation, Japan]

ゴードンカンファレンス『Stress-induced Gene Expression』at Oxford, UK 平成15年7月28日 Roles of transcriptional induction programs in the quality control system in the endoplasmic reticulum [Kazutoshi Mori]

②口頭発表 (国内会議1件、国際会議0件)

野崎潤一、久保田広志、吉田秀郎、内藤素子、吉永侃夫、森和俊、小泉昭夫、永田和宏：アキタマウス膵β細胞株における転写因子 ATF6 及び XBP1 活性化を介した小胞体シャペロンの誘導。 第7回臨床ストレス蛋白質研究会、名古屋市、11月23日 (2002)

③ポスター発表 (国内会議2件、国際会議0件)

野崎潤一、久保田広志、吉田秀郎、内藤素子、吉永侃夫、森和俊、小泉昭夫、永田和宏：Insulin-Akita mouse より樹立した膵ラ氏島β細胞株における小胞体ストレス応答 第55回日本細胞生物学会大会、横浜市、5月23日 (2002)

野崎潤一、久保田広志、吉田秀郎、内藤素子、吉永侃夫、森和俊、小泉昭夫、永田和宏：インスリン-アキタマウス由来膵ラ氏島β細胞株における転写因子 ATF6 と XBP1 の活性化を介した小胞体ストレス応答 第25回日本分子生物学会年会、横浜市、12月11日～14日 (2002)

- (4)特許出願 なし
- (5)受賞等 なし
- (6)その他特記事項 なし

7 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H17.10.30-11.3	「タンパク質の一生」国際会議	淡路夢舞台 国際会議場	約350人	特定領域、CREST 他課題、学術創成との共催

8 結び

ポストゲノム時代の到来に伴い、プロテオミクスなどの言葉とともに、翻訳以降のタンパク質の機能発現および構造の解析に、研究の中心は移りつつある。そのような世界的な研究の発展の中で、タンパク質の品質管理機構の解明は、最も重要な課題の一つである。本研究は、わが国においてもっとも早くから一貫して、小胞体におけるタンパク質の productive folding pathway および品質管理機構の研究に携わり、この分野の研究に世界的にも大きな貢献をしてきた3つのグループが、それぞれ10年以上の研究の蓄積の上に、互いに相補的かつ有機的にプロジェクトを組むことによって、小胞体におけるタンパク質の品質管理機構の実体を明らかにしようとしたものである。

具体的には、小胞体における品質管理を、1) 新生ポリペプチドの正しいフォール

ディング (productive folding pathway) と、2) 小胞体ストレスや遺伝子変異などによって蓄積する misfold タンパク質の分解 (ERAD pathway) が、3) 小胞体ストレス応答 (UPR pathway) を介してカップルしていると考え、それぞれの機構の詳細と、これらの間の相互作用を明らかにすることによって、小胞体における品質管理の全体像の解明をめざしたものである。

本報告書で具体的に述べてきたように、3つのグループは、互いに協力し合うことによって、いくつもの重要な発見を成し遂げることができた。Productive folding 系と分解系間における UPR 経路の使い分けや、EDEM とカルネキシンサイクルとの共役の発見は、まさにその代表例と言えよう。また、和田グループによる、生細胞内における分子イメージング法を用いた新しい方法論の確立は、将来の科学技術の発展にも大きく貢献することであろう。

このように、基礎研究においても科学の発展に十分な貢献ができたと考えているが、のみならず、ポリグルタミン凝集の分子シャペロンによる抑制の研究を中心として示したきたように、医学的に応用可能な知見を得ることによって、社会的な貢献も成し遂げることができたと考えている。

よって、本研究は当初の基礎研究の目的を果たし、さらに、将来の応用へと続く礎を築くことができたものと考えている。

以上