

## I ゴルジ体ストレス応答の分子機構の解析

### Molecular Mechanism of the Golgi Stress Response

吉田秀郎・若林貞夫・谷口麻衣

Yoshida, H., Wakabayashi, S., Taniguchi, M.

ゴルジ体は分泌タンパク質の加工を行う細胞小器官であるが、ゴルジ体の細胞内での存在量は細胞の需要に応じて厳密に調節されており、分泌の盛んな細胞ではゴルジ体も著しく発達する。ゴルジ体を形成するための遺伝子は核に存在することから、ゴルジ体にはゴルジ体の機能が充足しているかどうか監視するセンサー分子が存在し、ゴルジ体の機能が不足すると、そのシグナルを核に伝達し、ゴルジ体を形成するための遺伝子の転写を誘導すると考えられる。このようなゴルジ体の量的調節機構であるゴルジ体ストレス応答の分子機構を解明するべく、これまでに、転写を制御するエンハンサー配列 **GASE** と転写制御因子 **TFE3** 及び **MLX** を同定した。現在、**TFE3** や **MLX** がゴルジ体ストレスによってどのように制御されているか解析している。

## II 小胞体ストレス応答を制御する 細胞質スプライシングの分子機構の解析

### Molecular Mechanism of Cytoplasmic Splicing Regulating the Endoplasmic Reticulum Stress Response

吉田秀郎・若林貞夫・谷口麻衣

Yoshida, H., Wakabayashi, S., Taniguchi, M.

小胞体は分泌タンパク質の合成を司る細胞小器官であるが、細胞内の小胞体の存在量は小胞体ストレス応答と呼ばれる機構によって制御されている。これまでに、小胞体ストレス応答依存的な転写誘導を制御するエンハンサー配列 **ERSE** や転写因子 **ATF6** 及び **XBP1** を同定した。

興味深いことに XBP1 の発現は、新規の mRNA スプライシング機構である細胞質スプライシングによって制御されていることを明らかにした。現在は、細胞質スプライシングの詳細な分子機構を解析している。

### III 血液凝固線溶制御調節タンパク質の構造と機能解析

Analysis of Structure-Function Relationship of Regulatory Proteins of  
Blood Coagulation and Fibrinolysis

小出武比古・若林貞夫

Koide, T., Wakabayashi, S.

血液凝固線溶の制御調節因子(主として、アンチトロンビンと HRG) の生理機能の確立を目指して研究を進めている。まず、アンチトロンビンについては、部位特異的変異導入法により、トロンビンや Xa 因子などのプロテアーゼ阻害機能発現に重要なアミノ酸残基を解析すると共に、ヘパリン非存在下で、ヘパリン存在下の血漿アンチトロンビンの活性と同等の活性を有する組換えアンチトロンビン変異体の創製を進めている。また、HRG については、血小板凝固および線溶における、それぞれ、フィブリノゲンおよびフィブリンとの相互作用を解析し、その制御調節因子としての生理機能の確立を目指している。

### IV プロテアソームの構造と機能の研究

Structural and Functional Studies of the Proteasomes

小出武比古・谷口麻衣

Koide, T., Taniguchi, M.

プロテアソームは、広く真核生物の細胞質、核および小胞体膜に存在する巨大プロテアーゼで、細胞周期・免疫・炎症・受精・アポトーシス・ストレス応答および品質管理機構における

小胞体関連分解などに関与し、生命活動の維持に極めて重要な役割を果たしている。我々は、プロテアソームの触媒作用を担っている 20S プロテアソームのタンパク質基質の分解特性や我々が始めて見出した高リン酸化 20S プロテアソームの機能とリン酸化の意義について研究している。また、我々がラット肝ミクロソームから世界に先駆けて精製した小胞体結合性プロテアソーム (ERb プロテアソームと命名) の構造的特徴(特に、膜結合の分子基盤)と ER ストレス下における ERb プロテアソームの小胞体膜への結合と構造異常タンパク質分解という小胞体関連分解(ERAD)における ERb プロテアソームの機能を明らかにすることを目指している。

## V 新生タンパク質の細胞内品質管理機構の解析

### Analysis of Quality Control Mechanism of Newly Synthesized Proteins in Mammalian Cells

小出武比古・谷口麻衣

Koide, T., Taniguchi, M.

細胞は、生命活動の維持のために、絶えず新しいタンパク質の合成を行っているが、遺伝子変異によって構造異常のタンパク質が合成された場合や、薬物によって正常に翻訳後修飾が受けられなかった場合には、新生タンパク質は高次構造異常となり、小胞体の「品質管理機構」によって異常分子として認識され、細胞内で選択的に分解される。この品質管理機構は、多段階かつ多経路の複雑なプロセスで、数多くの小胞体タンパク質が関与している。その詳細な機構を明らかにするため、アンチトロンビン、 $\alpha_1$ -アンチトリプシン、ヒスチジンリッチ糖タンパク質(HRG)などの血漿糖タンパク質の組換え変異体をモデルタンパク質として哺乳類培養細胞中に発現し、まず、その分泌量と分泌速度を定量し、分泌異常が確認されたものについては、分子シャペロンや糖鎖のプロセッシング過程における異常分子認識機構(特に、EDEM とそのホモログによるもの)および基質タンパク質と結合して分解経路に誘導する因子などによる品質管理機構を解析している。

## VI 抗凝固・抗血小板能を有する トロンビン誘導体の機能解析

Functional Analysis of Antithrombotic Thrombin Derivatives

小出武比古

Koide, T.

トロンビンはフィブリノゲン、XIII 因子、VIIIa 因子、Va 因子、XI 因子、PAR1、PAR4、トロンボモジュリン、プロテイン C など種々の凝固関連タンパク質に作用して、血液凝固とその制御の中樞を担う酵素であるが、このトロンビンの酵素としての活性を完全に無くし、上記の種々のトロンビン基質タンパク質との相互作用を選択的なものにした組換えトロンビン誘導体を創製し、トロンビンの基質に選択的に結合することによって、間接的にトロンビンの機能を抑制するという組換えトロンビン誘導体の抗凝固・抗血小板能を解析している。

### 発表論文 List of Publications

- I -1 Yoshida, H. (2009) ER stress response, peroxisome proliferation, mitochondrial unfolded protein response and Golgi stress response. **IUBMB Life**, 61, 871-879.
- I -2 吉田秀郎 「bHLH-ZIP 型転写因子群によるゴルジ体ストレス応答の制御ネットワーク」 「情報と細胞機能」研究会 (第3回; 札幌、2010年)
- I -3 吉田秀郎 愛媛大学医学部 プロテオ医学研究センター学術講演 「小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答」 (松山、2010年)
- I -4 吉田秀郎 「小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答」 秋田大学工学資源学部セミナー (秋田、2009年)
- II -1 Uemura, A., Oku, M., Mori, K. and Yoshida, H. (2009) Unconventional splicing of *XBPI* mRNA occurs in the cytoplasm during mammalian unfolded

- protein response. **J. Cell Sci.** 122, 2877-2886.
- II -2 \*Yoshida, H., Uemura, A. and \*Mori, K. (2009) pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. **Cell Struct. Funct.** 34, 1-10. (\*Corresponding author)
- II -3 吉田秀郎 「小胞体ストレス応答と疾患」 旭川医科大学セミナー (旭川、2009年)
- II -4 吉田秀郎 「細胞質スプライシングと小胞体ストレス応答」 慶應義塾大学先端生命科学研究所セミナー (鶴岡、2009年)
- III -1 川尻浩正・庄屋雄二・大江絵美・小出武比古：ヘパリン非依存性高活性アンチトロンビン組換え 2 重置換体の作製とその機能解析. 第 32 回日本血栓止血学会学術集会、北九州、6 月 4-6 日、2009.
- III -2 T. Koide, H. Kawajiri, E. Ooe and Y. Shoya: Activation of antithrombin by two sites mutations. 22<sup>nd</sup> Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis. Boston, USA, July 11-16, 2009
- III -3 大江絵美・庄屋雄二・小出武比古：Glu255 is the molecular basis for the low reactivity of antithrombin in the absence of heparin. 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9-12 日、2009.
- III -4 T. Ohta, Y. Ikemoto, A. Usami, T. Koide and S. Wakabayashi: High affinity interaction between histidine-rich glycoprotein and the cell surface type ATP synthase on T-cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1099-1107 (2009)
- III -5 T. Ohta, Y. Ikemoto, K. Saeki, T. Koide and S. Wakabayashi: Histidine-rich glycoprotein and concanavalin A synergistically stimulate a PI3 kinase-independent signaling pathway in leucocytes leading to increased cell adhesion and changes in cell morphology. *Cell. Immunol.* 259, 5-12 (2009)
- III -6 若林貞夫・益本綾香・小出武比古：フィブリノゲン分子内の HRG 結合部位の解析. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、10 月 21-24 日、2009.
- IV -1 谷口麻衣・西川隆顕・高須博巳・小出武比古：ER ストレスと小胞体膜結合性プロテアソーム (ER b プロテアソーム) による ERAD の促進. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、10 月 21-24 日、2009.

- IV-2 福田智美・矢部公彦・小出武比古： Implication of newly recognized phosphorylation of the proteasome. 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9-12 日、2009.
- V-1 谷口麻衣・小出武比古： Selective involvement of cargo receptors in the quality control of plasma glycoprotein mutants. 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9-12 日、2009.
- V-2 川尻浩正・庄屋雄二・大江絵美・小出武比古： ヘパリン非依存性高活性アンチトロンビン組換え 2 重置換体の作製とその機能解析. 第 32 回日本血栓止血学会学術集会、北九州、6 月 4-6 日、2009.

その他

- VII-1 M. Tanigawa(日大), T. Shinohara(日大), M. Saito(日大), K. Nishimura(日大), Y. Hasegawa(日大), S. Wakabayashi, M. Ishizuka(中大) and Y. Nagata(日大): D-Amino acid dehydrogenase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637. *Amino Acids* 38, 247-255 (2010)

## 大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 大江絵美：アンチトロンビンの機能を抑制している分子内基盤の解析
- 草間 望：血小板膜糖タンパク質受容体 GPIIb/IIIa とフィブリノゲンの結合に対する HRG の影響
- 福田智美：新しく見出された高リン酸化プロテアソームの特性解析とリン酸化の意義
- 宮川 演：新生糖タンパク質の品質管理機構における基質タンパク質の糖鎖修飾の影響
- 高須博巳：ER ストレス下における ERb プロテアソームの機能解析
- 山本剛士：新生糖タンパク質の品質管理機構における EDEM の機能解析

博士後期課程

- 奥 雅弥：ゴルジ体ストレス応答の分子機構の解析
- 上村 彰：小胞体ストレス応答を制御する細胞質スプライシングの分子機構の解析

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（新学術領域研究） 課題番号:21113511（平成 21 年度）  
研究課題 ロジスティクスの需要に応答した小胞輸送因子の発現調節機構  
研究代表者 吉田秀郎
- 2 科学研究費補助金（特定領域研究） 課題番号:20052014（平成 21 年度）  
研究課題 小胞体ストレス応答を制御する DECODE 回路の解明  
研究代表者 吉田秀郎
- 3 山田科学振興財団研究助成 課題番号:200080500007（平成 21 年度）  
研究課題 ゴルジ体ストレス応答によるアポトーシス・タンパク質分解・小胞輸送の制御  
研究代表者 吉田秀郎
- 4 花王株式会社共同研究費 課題番号:150080500016（平成 21 年度）  
研究課題 紫外線照射による小胞体ストレスの解析  
研究代表者 吉田秀郎
- 5 兵庫県立大学特別教育研究助成金（奨励研究）（平成 21 年度）  
研究課題 セルピン変異体をモデルタンパク質とした小胞体品質管理機構の解析  
研究代表者 谷口麻衣
- 6 科学研究費補助金（学術振興会特別研究員奨励費） 課題番号:201998（平成 21 年度）  
研究課題 高等動物のゴルジ体ストレス応答の解析  
研究代表者 奥 雅弥