

I 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多機能性プロテアーゼである。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初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。

II 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り、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も、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。この品質管理機構には、数多くの小胞体タンパク質が関与し、多段階の複雑なプロセスで、且つ、多経路で行われている。その詳細な機構を明らかにするため、アンチトロンビン、 α_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。

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 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 福田智美・矢部公彦・小出武比古：ブタ 20S プロテアソームの精製とリン酸化の解析. 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 12 月 9 – 13 日, 2008.
- I-2 K. Yabe and T. Koide: Inhibition of the 20S proteasome by a protein proteinase inhibitor: Evidence that a natural serine proteinase inhibitor can inhibit a threonine proteinase. *J. Biochem.*, 145, 217-227 (2009)
- III-1 T. Koide: Antithrombin and heparin cofactor II: Structure and functions. In Recent

Advances in Thrombosis and Hemostasis. (Eds. E.W. Davie and K. Tanaka), Springer, 177-189 (2008)

- III-2 T. Koide, M. Ohshima, Y. Takeuchi and S. Wakabayashi: Fibrinogen interacts with histidine-rich glycoprotein (HRG) at the multiple sites. XIXth Congress of International Society on Fibrinolysis and Proteolysis. Vienna, Austria, July 6-10, 2008.
- III-3 Y. Shoya, H. Kawajiri, E. Ooe and T. Koide: Structural basis for low inhibitory activity of antithrombin without heparin. 5th International Symposium on Serpin Biology, Structure and Function. Leuven, Belgium, July 12-16, 2008.
- III-4 大江絵美・庄屋雄二・小出武比古：アンチトロンビン Glu255 位各種組換え置換体のヘパリンコファクター活性. 第 31 回日本血栓止血学会集会. 大阪, 11 月 20 - 22 日, 2008.
- III-5 若林貞夫・大島政美・竹内芳美・小出武比古：フィブリノゲンの HRG 結合部位の解析. 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 12 月 9 - 13 日, 2008.
- III-6 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-7 T. Ohta, Y. Ikemoto, K. Saeki, T. Koide and S. Wakabayashi: Histidine-rich glycoprotein and concanavalin A synergistically stimulate the phosphatidylinositol 3-kinase-independent signaling pathway in leukocytes leading to increased cell adhesion and changes in cell morphology. *Cell. Immunol.* (2009), doi:10.1016/J.cellimm.2009.05.001.

その他

- V-1 小出武比古: 蛋白質の構造と機能の関係. “図説分子病態学, 第 4 版.” 一瀬白帝, 鈴木宏治 (編): 中外医学社, 40-45 (2008)

大学院生命理学研究科

博士後期課程

矢部公彦：プロテアソームの構造と機能に関する研究

木村智志：新生糖タンパク質品質管理機構における EDEM 機能の解析

庄屋雄二：タンパク質工学的手法を用いたアンチトロンビンの構造と機能相関の研究

博士前期課程

田原 亮：小胞体関連分解 (ERAD) における新しいプロテアーゼの解析

川尻浩正：高機能性アンチトロンビンの作製とその機能解析

西川隆顕：ER ストレス下における ERb プロテアソームの膜結合の増加と ERAD の促進

大江絵美：種々の Glu255 位置換アンチトロンビン組換え体の機能解析

草間 望：フィブリノゲンの活性化血小板膜への結合における HRG の関与

福田智美：プロテアソームの新規リン酸化部位と機能相関の解析

宮川 演：キフネンシン下での高次構造異常タンパク質の分泌促進機構の解析