

分 子 機 能 制 御 学 部 門
Department of Molecular and Structural Biology

トランススケール構造生命科学分野

Division of Trans-Scale Structural Life Science

教授：稲葉 謙次

Professor : Kenji Inaba, Ph.D.

本分野では、細胞におけるタンパク質品質管理機構および化学環境恒常性維持機構について、構造生物学、細胞生物学、ケミカルバイオロジー、プロテオミクスなどのアプローチにより統合的に研究している。特に小胞体とゴルジ体からなる初期分泌経路におけるレドックス、亜鉛イオン、カルシウムイオンに依存した新たなタンパク質品質管理機構について、独自の研究を展開している。

令和 6 年度は、研究拠点を完全に九州大学に移し、稲葉謙次（主幹教授）、渡部聡（准教授）、天貝佑太（助教）、藤井唱平（学振 PD）、テクニカルスタッフ 2 名、博士課程大学院生 5 名、修士課程大学院生 4 名の計 15 名により、研究および教育活動を行なった。その結果、初期分泌経路に存在する分子シャペロン ERp44 による亜鉛イオンに依存した基質認識機構の解明、小胞体におけるレドックスと亜鉛イオンのクロストークの発見、初期分泌経路における真のカルシウムアトラスの解明、小胞体レドックス環境をセンスする新たなレポータータンパク質の開発などを達成した。

A. クライオ電子顕微鏡による ERp44-ERAP1 複合体の高分解能構造解析

真核生物の分泌経路には、会合未成熟な分泌タンパク質や小胞体局在シグナルを持たない小胞体酵素をゴルジ体から小胞体へと逆行輸送する仕組みが備わっている。シャペロンタンパク質 ERp44 は、ゴルジ体において小胞体へ輸送すべきクライアントタンパク質（以下、クライアントと呼ぶ）を分子間ジスルフィド結合を介して捕獲し、ゴルジ体膜に局在する KDEL 受容体を介して、クライアントを小胞体へ逆行輸送する。これまでに当研究室において、ERp44 とクライアントとの相互作用が小胞体とゴルジ体間の pH 勾配および分泌経路内の亜鉛イオンによって制御されることを明らかにした (Vavassori, Masui et al. *Mol. Cell* 2013, Watanabe et al, *PNAS* 2017, *Nat. Commun.* 2019)。しかし、ERp44 の多様なクライアントに対する分子認識機構や、小胞体において ERp44 がクライアントタンパク質を解離する分子機構の理解は不十分であった。

本研究では、ERp44 のクライアント認識機構の分子基盤を解明するため、クライアントの一つである小胞体酵素 ERAP1 と ERp44 との複合体について、クライオ電子顕微鏡単粒子解析に取り組んだ。観察された粒子の方向の偏りを改善するため、試料ステージを少し傾けて撮影したデータセットと組み合わせるなどの工夫により、最終的に 3.1 Å 分解能でクライオ電顕による構造解析に成功した。その結果、従来考えられていた分子間ジスルフィド結合を介した相互作用に加えて、ERp44 の C 末側の Trx ドメ

インが ERAP1 内の長いループ領域と相互作用し、その界面には亜鉛イオンが ERp44 と ERAP1 を繋ぐブリッジとして機能していることが判明した。小胞体ではゴルジ体と比べ亜鉛濃度が極端に低く、この濃度差を利用して、ERp44 が小胞体で亜鉛イオンおよびクライアントを解離することが強く示唆された。以上、亜鉛イオンに依存した ERp44 によるクライアントの認識・結合および解離の分子基盤が解明された。

B. 小胞体におけるレドックスと亜鉛イオンのクロストークの発見

小胞体とゴルジ体からなる初期分泌経路は、新規に合成された分泌タンパク質や膜タンパク質が天然型立体構造を形成し成熟する場である。天然型立体構造形成には、システイン残基間で形成されるジスルフィド結合の酸化、還元、異性化反応が重要である。当研究室ではこれまで、この酸化反応の上流に位置する酸化酵素 Ero1 α が、ゴルジ体で ERp44 シャペロンタンパク質と結合し、小胞体へと逆行輸送される分子機構を詳細に解析してきた。さらに最近、ゴルジ体において高濃度に維持される亜鉛イオンが ERp44 と結合することで、ERp44 と Ero1 α の結合を促進することを報告した (Watanabe, Amagai et al., *Nat. Commun.* 2019; Amagai et al., *Nat. Commun.* 2023)。

一方、小胞体はゴルジ体や細胞質よりも低い遊離亜鉛イオン濃度で維持されているが、小胞体から細胞質へ亜鉛イオンを輸送する亜鉛輸送体 ZIP7 を阻害したところ、小胞体の遊離亜鉛イオン濃度が劇的に上昇することを発見した。この時、ERp44 の小胞体からゴルジ体への移行が阻害されるとともに、小胞体の主たる酸化酵素である Ero1 α の一部が細胞外へと分泌した。さらに、精製タンパク質を用いた解析から、亜鉛イオンが Ero1 α の PDI 酸化活性を直接阻害することを明らかにした。その結果、ZIP7 阻害細胞では小胞体がより還元的な環境に変化し、さらに新規合成膜タンパク質のジスルフィド結合形成不全が起こることも突き止めた。これらの結果は小胞体の亜鉛恒常性の破綻がレドックスおよびタンパク質恒常性の破綻につながることを示しており、亜鉛イオンの新たな生理機能が明らかとなった。

C. 新たなカルシウムプローブの開発による初期分泌経路における真のカルシウムアトラスの解明

小胞体は、多様な細胞応答に関与するカルシウムイオン (Ca^{2+}) の細胞内貯蔵庫としても重要な役割を有する。一方、小胞体とともに初期分泌経路を構成するゴルジ体もまた、小胞体ほどではないものの高濃度の Ca^{2+} を保持している。過去に、小胞体から TGN に向かって、分泌経路では順に Ca^{2+} 濃度が減少していくというモデルが提唱されたが、測定に用いられたプローブの pH 感受性の問題や試料調製における人為的な操作の問題などから検証の余地があった。そこで、我々はゴルジ体の Ca^{2+} 濃度定量に適した新規カルシウムプローブ “CEPIA-Golgi” を開発し、ゴルジ体各層板の pH における

CEPIA-Golgi の Ca^{2+} に対する親和性を定量した。さらにこのプローブをトランスフェクションし、小胞体とゴルジ体各層板の Ca^{2+} 濃度定量をライブセルイメージングにより行った。その結果、従来のモデルとは異なり、*cis*-Golgi の Ca^{2+} 濃度はゴルジ体の中で最も低く維持され、小胞体とゴルジ体の間に大きな Ca^{2+} 濃度ギャップが存在することを見出した。さらに、*cis*-Golgi から TGN に向かって Ca^{2+} 濃度が上昇するという、より確からしいカルシウム濃度分布を描くことに成功した。次に、小胞体の Ca^{2+} ポンプ SERCA2 とゴルジ体の Ca^{2+} ポンプ SPCA1 を遺伝子破壊した細胞株を用いて、小胞体とゴルジ体の Ca^{2+} 濃度を定量したところ、SERCA2 欠損細胞では小胞体の Ca^{2+} 濃度のみが低下し、ゴルジ体の Ca^{2+} 濃度には影響しなかった。一方、SPCA1 欠損細胞ではゴルジ体の Ca^{2+} 濃度のみが低下し、小胞体の Ca^{2+} 濃度はほとんど変動がなかった。また、SERCA 阻害剤処理によって引き起こされる小胞体の Ca^{2+} 濃度低下がゴルジ体に伝播するかどうか観察したところ、いずれの層板においても Ca^{2+} 濃度変化は見られなかった。これらの観察結果から、小胞体とゴルジ体のカルシウム恒常性維持機構が互いに独立してはたらいっていることが示唆された。今後、ゴルジ体の Ca^{2+} 濃度勾配を形成する分子基盤とその細胞生理学的な意義を、タンパク質品質管理の観点から解明する予定である。

D. 小胞体レドックス環境をセンスする新たなレポータータンパク質の開発

小胞体のレドックス環境の制御は、分泌タンパク質の生合成さらには品質管理において極めて重要である。そこで、小胞体のレドックス環境を鋭敏に検出するための新規レポーターの開発も進めた。蛍ルシフェラーゼに多数のシステインを導入した改変型ルシフェラーゼ (FLuc*) に、分泌タンパク質のシグナル配列を連結することで、新たな小胞体レドックスセンサータンパク質を作製した。本融合タンパク質を発現する HeLa 細胞では、小胞体内で FLuc* 内に非天然型のジスルフィド結合が形成され、その活性が著しく減少する。一方、小胞体の環境が何らかの原因により還元的になると、非天然型ジスルフィド結合の形成が起こらず、FLuc* が正しく折り畳まれて活性が顕著に上昇する。よって、本融合タンパク質は小胞体のレドックス環境変化を検出するためのレポーターとして機能する。実際、ジスルフィド結合形成に必要な酸化力を PDI に供給する Ero1 α を薬剤によって特異的に阻害したところ、FLuc* 活性は有意に上昇した。逆に、Ero1 α を過剰発現したところ、FLuc* 活性が有意に低下した。更に、小胞体内に還元力を供給することが報告されている LMF1 を過剰発現すると、FLuc* のジスルフィド結合は還元され、FLuc* 活性が著しく上昇した。一方、LMF1 の細胞中における発現量を siRNA によって抑制すると、FLuc* 活性は低下した。以上の結果から、本レポーターは小胞体のレドックス環境ならびにジスルフィド結合形成能の評価に有用であることが示された。本成果は 2024 年 10 月に *iScience* 誌に報告した。

業績目録

原著論文

1. Kadokura, H., Harada, N., Yamaki, S., Hirai, N., Tsukuda, R., Azuma, K., Amagai, Y., Nakamura, D., Yanagitani, K., Taguchi, H., Kohno, K. and Inaba, K. (Oct 2024)
Development of luciferase-based highly sensitive reporters that detect ER-associated protein biogenesis abnormalities
iScience, 27, 111189
2. Auger, C., Li, M., Fujimoto, M., Ikeda, K., Yook, J.S., O'Leary, T.R., Caycedo, M.P.H., Cai, X., Oikawa, S., Verkerke, A.R.P., Shinoda, K., Griffin, P.R., Inaba, K., Stimson, R.H. and Kajimura, S. (Mar 2025)
Identification of a molecular resistor that controls UCPI-independent Ca²⁺ cycling thermogenesis in adipose tissue *Cell Metabol.* in press

著書

1. 稲葉 謙次
ハーパー「イラストレイテッド生化学」原著 32 版日本語訳本

学会発表

1. Kenji Inaba. (2024/6/14-15)
Structural and mechanistic basis of zinc-dependent protein quality control at the ER-Golgi interface. (招待講演)
2024 Joint Conference-KSPS-PSSJ, Sapporo, Japan.
2. Kenji Inaba. (2024/9/2-5)
Crosstalk between proteostasis and zinc homeostasis at the ER-Golgi interface. (招待講演)
International symposium, Multifaceted Protein Dynamics, Fukuoka, Japan.
3. Kenji Inaba. (2024/10/20-25)
Proteostasis and zinc homeostasis at the ER-Golgi interface. (招待講演)
EMBO ER meeting 2024 -The endoplasmic reticulum- Guardian of Cellular Homeostasis, Barga, Italy.
4. Kenji Inaba. (2024/12/1-5)
Structural basis of zinc-dependent protein quality control at the ER-Golgi interface. (招待講演)
ISZB2024, Merida, Mexico.
5. 藤井 唱平, 稲葉 謙次. (2024/6/11-13)
小胞体-ゴルジ体のカルシウム恒常性維持の新たな知見 (招待講演)

- 第24回日本蛋白質科学会年会, 札幌.
6. 稲葉 謙次. (2024/6/21-22)
小胞体とゴルジ体を舞台とした亜鉛恒常性維持とタンパク質恒常性維持の連携 (特別講演)
第50回生体分子科学討論会, 横浜.
 7. 稲葉 謙次. (2024/8/6)
亜鉛に依存した新たなタンパク質品質管理機構 (招待講演)
令和6年度第2回名古屋産学官・医連携研究会, オンライン.
 8. 渡部 聡. (2024/10/17-18)
クライオ電子顕微鏡で解き明かすヒト膜タンパク質の動的構造変化 (招待講演)
日本顕微鏡学会 2024年度若手シンポジウム, 福岡.
 9. 天貝 佑太, 稲葉 謙次. (2024/11/6-8)
 Zn^{2+} has a potential to regulate the redox homeostasis of the ER by inhibiting Ero1 α activity. (招待講演)
第97回日本生化学会年会, 横浜.
 10. 藤井 唱平, 稲葉 謙次. (2024/12/7-8)
タンパク質品質管理を支える小胞体-ゴルジ体のカルシウム恒常性維持機構. (招待講演)
CVMW2024 心血管代謝週間, 東京.
 11. 稲葉 謙次. (2025/1/30)
新たな概念の創出に向けて: ケミカルプロテオスタシス研究の最前線. (招待講演)
第31回東北大学学際フロンティア研究所セミナー, 仙台.
 12. 天貝 佑太. (2025/3/15)
過剰亜鉛が引き起こす小胞体レドックス恒常性の破綻. (招待講演)
レドックス R&D 戦略委員会第5回 春のシンポジウム「リユニオン」, 東京.
 13. 渡部 聡. (2025/3/21)
亜鉛を介したタンパク質品質管理機構の分子基盤. (招待講演)
岡山大学 クライオ電顕トモグラフィワークショップ 岡山.
 14. Satoshi Watanabe, Yoshiaki Kise, Kento Yonezawa, Mariko Inoue, Nobutaka Shimizu, Osamu Nureki and Kenji Inaba (2024/6/24-28)
Cryo-EM structure of full-length cargo receptor ERGIC-53 in complex with MCFD2. (ポスター発表)
21st IUPAB Congress 2024, Kyoto.
 15. Xiaolin Qian, Satoshi Watanabe, Zhenghao Chen, and Kenji Inaba. (2024/10/15)
Expression and purification of human copper transporting P1B type ATPase ATP7A toward its cryo-EM analysis. (ポスター発表)

- 日本顕微鏡学会 2024 年度若手シンポジウム 福岡.
16. 谷 代元, 渡部 聡, 稲葉 謙次. (2025/10/17-18)
Ca²⁺ポンプ SPCA1a を介したゴルジ体 Ca²⁺恒常性維持の構造基盤. (ポスター発表)
日本顕微鏡学会 2024 年度若手シンポジウム 福岡.
 17. Satoshi Watanabe, Kenji Inaba (2024/10/29-30)
Flexible motion and zinc-mediated regulation of a cargo receptor ERGIC-53 revealed by cryo-EM.
(口頭発表)
The 33rd Hot Spring Harbor International Symposium 2024 福岡
 18. Xiaolin Qian, Satoshi Watanabe, Zhenghao Chen, and Kenji Inaba. (2024/11/27-29)
Expression and purification of human copper transporting PIB type ATPase ATP7A toward its cryo-EM analysis. (ポスター発表)
第 47 回日本分子生物学会年会 MBSJ2024, 福岡.
 19. 森川 涼太, 藤井 唱平, 大内 さくら, 井澤 俊明, 稲葉 謙次. (2024/11/27-29)
分泌経路を構成するオルガネラのカルシウム濃度の定量化とその変動解析. (ポスター発表)
第 47 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 20. 谷 代元, 渡部 聡, 稲葉 謙次. (2025/11/27-29)
Toward elucidation of the mechanism of Golgi Ca²⁺ homeostasis mediated by a Ca²⁺ pump SPCA1a. (ポスター発表)
第 47 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 21. Yuta Amagai, Kenji Inaba. (2024/12/1-6)
ZIP7 controls zinc concentration and redox state in the ER. (口頭発表)
The 8th ISZB Meeting, Merida, Mexico.
 22. 稲葉 謙次. (2025/2/22)
細胞恒常性維持を支えるタンパク質群の構造生命科学 (口頭発表)
第 3 回医療・健康ユニットシンポジウム, 福岡.
 23. Shohei Fujii, Ryota Morikawa, Sakura Ouchi, Toshiaki Izawa and Kenji Inaba. (2025/3/17-20)
A newly developed calcium imaging system reveals the true calcium atlas in the early secretory pathway (口頭発表)
16th ER & Redox club meeting, Namur, Belgium.