

I 各部門の研究活動の概況および業績

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7年度は，研究拠点を完全に九州大学に移し2年目をむかえ，稲葉謙次（主幹教授），渡部聡（准教授），天貝佑太（助教），藤井唱平（助教），蔡笑寒（特定プロジェクト助教），テクニカルスタッフ3名，博士課程大学院生5名，修士課程大学院生3名，研究学生3名の計19名により，研究および教育活動を行なった．その結果，小胞体へのグルタチオン輸送に関わる LMF1 の構造機能解析，クライオ電子顕微鏡によるゴルジ体銅イオンポンプ ATP7A の銅イオン輸送機構の解明，ゴルジ体カルシウムポンプ SPCA1a の亜鉛と銅による活性阻害機構の解明，初期分泌経路の真のカルシウムアトラスとその生理的意義の解明などを達成した．

A. 小胞体へのグルタチオン輸送に関わる LMF1 の構造機能解析

小胞体（ER）は分泌タンパク質のフォールディング過程におけるジスルフィド結合形成に必要な酸化的環境を提供している．一方で，誤ったジスルフィド結合の異性化や還元を促進するためには還元力の供給も必要であり，小胞体内のレドックス恒常性の維持は必須である．近年，小胞体膜タンパク質である Lipase maturation factor 1（LMF1）が，細胞質から ER 内腔への還元力輸送を介して ER レドックスバランスの維持に関与し，さらに lipoprotein lipase など一部の分泌タンパク質の成熟を促進する可能性が示唆された．本研究では，異なるレドックス条件下における LMF1 のクライオ電子顕微鏡（cryo-EM）構造を 2.5-3.7 Å の分解能で決定した．その結果，LMF1 はレドックス条件によって大きな構造変化を示さず，レドックス感受性システイン対 Cys231-Cys237 および Cys288-Cys322 が小胞体内腔側および細胞質側に互いに離れて位置し，チオール-ジスルフィド交換反応が起こる距離にはないことが明らかとなった．さらに，LMF1 の膜貫通領域内部にはキャビティが存在し，このキャビティがグルタチオン（GSH）などの小分子輸送の経路となる可能性が示唆された．実際，GSH 合成を阻害すると LMF1 過剰発現細胞により ER はより酸化的な環境となり，LMF1 を再構成したプロテオリポソームは顕著な GSH 取り込み活性を示した．しかしながら，このキャビティは膜を完全に貫通しておらず，その入口はサイトゾル側に露出せず，膜中央付

近に位置することが分かった. GSHがこの部位へ到達するためには未解明の機構が存在すると考えられる. 以上の結果は, LMF1 による GSH 輸送の構造基盤を明らかにするとともに, 小胞体レドックス恒常性維持における LMF1 の役割を示すものである. 本研究成果をまとめ, 現在論文投稿中である.

B. クライオ電子顕微鏡によるゴルジ体銅イオンポンプ ATP7A の銅イオン輸送機構の解明

銅イオン (Cu^+) は, 生体内の多種多様な酵素の補酵素として, 重要な生理プロセスを担っている. そのため, 体内における銅の恒常性維持は極めて重要である. P 型 ATPase の一種である ATP7A は, 小腸, 血管, 脳などで銅吸収に関わる. さらに, ATP7A はゴルジ体内腔への銅イオンの輸送や, 細胞内の銅イオン濃度に応じてゴルジ体と形質膜の間を移動することで, 細胞の銅イオン恒常性維持に寄与する. ATP7A の機能欠損は, 全身性の銅欠乏に伴う酵素活性不全を特徴とするメンケス病 (Menkes disease) を引き起こすが, ATP7A の立体構造や銅輸送メカニズムの詳細は不明であった. 本研究では, クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いて, 野生型ヒト ATP7A の 2 つの異なる中間状態 (E1-ATP および E2Pi) の構造を, それぞれ 3.9Å と 3.4Å の解像度で決定することに成功した. ATP7A の電顕マップにおいて, P 型 ATPase に特徴的な膜貫通ドメインと三つのサイトゾル側ドメインに加え, 金属結合ドメイン (MBD) に相当する 2 つの密度 (MBD5 と MBD6) が確認された. さらに変異導入によってタンパク質の純度と発現量を向上させることに成功し, E1-ATP 状態の解像度は 3.3Å まで改善した. その結果, E1-ATP 状態には 3 つの異なるコンフォメーションが存在し, 特に MBD5 または MBD6 が膜貫通ドメインの銅イオン取り込みゲート付近に位置する二つの構造が明らかとなった. すなわち, ATP7A 分子内には MBD5 または MBD6 を介した二つの銅イオン輸送経路が存在することが示唆された. また, ATP の加水分解と銅イオンの解離に伴う構造変化を詳細に解析したところ, ATP7A の A ドメインの動きは, 従来のカルシウムポンプ (SERCA2b) とは大きく異なることが判明した. ATP7A に特徴的なサイトゾル側ドメインの動きは, E1-ATP 状態において MBD5 または MBD6 が膜貫通ドメインに銅イオンを効率よく受け渡すのに適したものと考えられる. 以上の知見に基づき, 我々は ATP7A 分子が銅イオンを輸送する新たな分子機構を提唱するに至った. 現在, 本研究成果をまとめた論文を投稿準備中である.

C. ゴルジ体カルシウムポンプ SPCA1a の亜鉛と銅による活性阻害機構

哺乳類細胞において, 小胞体やゴルジ体は分泌タンパク質の生合成や品質管理を行うだけでなく, カルシウムイオン (Ca^{2+}) の貯蔵庫としても機能している. 我々はゴル

ジ体カルシウムポンプ SPCA1 のクライオ電顕構造を世界で初めて決定し、その分子機構の詳細を明らかにした (Chen et al., Sci. Adv. 2023) . さらに、種々の二価金属イオン存在下でヒト由来 SPCA1a の ATPase 活性を網羅的に測定することにより、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 存在下では ATP 活性を維持するのに対し、 Zn^{2+} および Cu^{2+} が SPCA1a に対して強い阻害効果を示すことを見出した。 Zn^{2+} による阻害効果は添加する Ca^{2+} の濃度依存的に解消されたことから、 Zn^{2+} が競合的阻害剤として作用することが示された。一方で、 Cu^{2+} による阻害は過剰な Ca^{2+} 存在下でも活性回復が見られず、 Cu^{2+} が不可逆的な阻害剤として作用することも明らかになった。

そこで、 Zn^{2+} と Cu^{2+} による異なる阻害メカニズムを分子構造レベルで解明するため、AMPPCP (ATP アナログ) 存在下での Zn^{2+} 結合型および Cu^{2+} 結合型の SPCA1a のクライオ電顕構造解析を行った。その結果、 Zn^{2+} は膜貫通領域において Ca^{2+} と同じ部位に結合するのに対し、 Cu^{2+} は SPCA1a の細胞質ドメインに結合することが示された。さらに興味深いことに、 Zn^{2+} 結合状態においては、結合した AMPPCP の γ -リン酸基が自己リン酸化を受けるアミノ酸残基 (Asp350) から離れた位置に配置しており、これが Zn^{2+} による ATPase 活性阻害の構造的要因であることが示唆された。

本研究成果は、 Zn^{2+} や Cu^{2+} の過剰蓄積が SPCA1a の機能を損ない、細胞内カルシウム恒常性を攪乱する可能性を示すものである。本知見は、SPCA1a の機能不全に関連する皮膚疾患や神経関連病態の理解に有用な情報を提供することが期待される。

D. 初期分泌経路の真のカルシウムアトラスとその生理的意義の解明

小胞体とゴルジ体からなる初期分泌経路は、分泌タンパク質・膜タンパク質の生合成の場として機能するだけでなく、細胞内における主要なカルシウムイオン (Ca^{2+}) の貯蔵庫としても働いている。内腔に高濃度に保持された Ca^{2+} は、タンパク質の立体構造形成を助ける分子シャペロンや効率的な輸送を促すカーゴ受容体の活性に重要である。我々はゴルジ体内腔の Ca^{2+} 濃度を正確に計測できる新規の Ca^{2+} インジケーター “CEPIA-Golgi” の開発を進めてきた。観察試料そのものを拡大する膨張顕微鏡法と超解像顕微鏡を組み合わせ、蛍光顕微鏡下でもゴルジ体リボン構造を保持したまま層板レベルで局在解析を可能とする手法を確立した。この手法により、細胞に発現させた CEPIA-Golgi が狙い通りの層板に標的化出来ていることを確かめた上で、ゴルジ体層板ごとの高精度かつ非侵襲的な Ca^{2+} 濃度定量に成功した。

さらに甲賀大輔博士 (旭川医科大)、久住聡博士 (鹿児島大) との共同研究により、内在性の小胞体カルシウムポンプ SERCA2 およびゴルジ体カルシウムポンプ SPCA1 の免疫電顕解析を行い、超薄連続切片からゴルジ体全体の三次元像を再構築することに成功した。さらにこれらの解析から、これらカルシウムポンプの小胞体膜およびゴルジ体膜上の 1 分子レベルでの分布を明らかにし、小胞体とゴルジ体の間の Ca^{2+} 濃度ギャ

ップや *cis*-Golgi から TGN にかけて形成される濃度分布を矛盾なく説明できることを示した。また、ゴルジ体のカルシウム恒常性の破綻が分泌タンパク質に与える影響を評価するため、SPCA1 欠損細胞を用いたプロテオーム解析を行い（新潟大・松本雅紀博士との共同研究）、得られた候補タンパク質について詳細な解析を進めた。小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送速度への影響は積み荷の種類によって異なっていたものの、GPI アンカータンパク質では顕著に SPCA1 欠損依存的なゴルジ体からの輸送の遅延が観察された。これらの知見は、ゴルジ体内腔のカルシウム恒常性維持機構が果たす生理的な役割を改めて明確に示すものであった。現在、本研究成果をまとめた論文を投稿準備中である。

業績目録

原著論文

1. 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., Kajimura S. (Jun 2025)
Identification of a molecular resistor that controls UCP1-independent Ca^{2+} cycling thermogenesis in adipose tissue.
Cell Metabol. 37:1311-1325.
2. Nanatani K., Guan L., Kanno R., Kawabata T., Watanabe S., Katsube S., Hariharan P., Hidaka M., Yamanaka T., Toda K., Fujiki T., Miyamoto A., Chiba F., Ogasawara S., Murata T., Inaba K., Mitsuoka K., Abe K., Yamamoto M., Koshiha S. (Sep 2025)
Elucidation of the structure and molecular mechanisms of the aspartate antiporter.
Commun. Biol. 8:1359.
3. Ogawa A., Watanabe S., Ozerova I., Tsai A.Y., Kuchitsu Y., Chong H.B., Kawakami T., Fuse J., Han W., Kudo R., Naito T., Sato K., Nakazawa T., Saheki Y., Hirayama A., Stadler P. F., Arisawa M., Araki K., Bar-Peled L., Taguchi T., Sawa S., Inaba K., Wei F.Y. (Oct 2025)
Adenosine kinase and ADAL coordinate detoxification of modified adenosines to safeguard metabolism.
Cell 188, 6151-6169.
4. Lee Y.H., Saio T., Watabe M., Matsusaki M., Kanemura S., Lin Y., Mannen T., Kuramochi T., Kamada Y., Iuchi K., Tajiri M., Suzuki K., Li Y., Heo Y., Ishii K., Arai K., Ban K., Hashimoto M., Oshita S., Ninagawa S., Hattori Y., Kumeta H., Takeuchi A., Kajimoto S., Abe H., Mori E., Muraoka T., Nakabayashi T., Akashi S., Okiyoneda T., Vendruscolo M., Inaba K., Okumura M. (Nov 2025)
 Ca^{2+} driven PDIA6 biomolecular condensation ensures proinsulin folding.

Nature Cell Biology 27:1952-1964.

5. Palazzo F.C., Torre M.D., Amagai Y., Han X., Tempio T., Valletti C., Manteiga J.G., Matsumoto M., Feige M., Sallese M., Inaba K., Sitia R., Anelli T. (Feb 2026)

A regulatory circuit operated by KDELR1 and KDELR3 fine-tunes the composition of the secretory pathway.

Cell Mol Life Sci. 83:126.

6. Amagai Y., Arai C., Yamamoto W., Watanabe S., Kowada T., Sitia R., Hoseki J., Mizukami J., Matsumoto M., Inaba K. (Mar 2026)

Zinc-redox crosstalk regulates proteostasis in the endoplasmic reticulum.

Nat. Commun. accepted

著書

1. Amagai Y. and Inaba K. (Jul 2025)

Zinc Homeostasis Ensures Protein Homeostasis in the Early Secretory Pathway.

Zinc in Biology: Molecular Structures, Cellular Processes and Living Systems; Royal Society of Chemistry, vol. 2, chapter 6, 96-113.

学会発表

1. Kenji Inaba. (2025/8/3-8)

Crosstalk between metallostasis and proteostasis in the early secretory pathway of human cells.
(招待講演)

Gordon Research Conference 2025 Cell Biology & Metals, Maine, USA.

2. Kenji Inaba. (2025/8/26-29)

Crosstalk between metallostasis and proteostasis at the ER-Golgi interface. (招待講演)

AMED-CREST International Symposium, Proteostasis in Biology and Medicine, Kyoto, Japan.

3. Kenji Inaba. (2025/9/17-19)

Cross-scale analysis unveils the mechanism of calcium homeostasis in the early secretory pathway.
(招待講演)

International symposium on cellular structural biology, Tokyo, Japan.

4. Yuta Amagai, Kenji Inaba. (2025/10/27)

Zinc homeostasis regulates proteostasis in the endoplasmic reticulum. (招待講演)

2nd France-Japan Workshop on Metallomics, Paris, France.

5. 稲葉 謙次. (2025/7/8-9)

初期分泌経路における金属恒常性維持とタンパク質恒常性維持. (招待講演)
生体機能関連科学・生物無機化学・生命金属科学合同サマースクール, 沖縄.

6. 渡部 聡, 本城 恵美, 稲葉 謙次. (2025/9/24-26)
Cryo-EM analysis of cargo transport and release by a cargo receptor ERGIC-53. (招待講演)
第 63 回日本生物物理年会, 奈良.
7. 稲葉 謙次. (2025/11/3-5)
小胞体とゴルジ体を舞台とした金属恒常性維持とタンパク質恒常性維持. (招待講演)
第 98 回日本生化学会年会, 京都.
8. 渡部 聡, Bui Ba Han, 稲葉 謙次. (2025/11/3-5)
ヒト由来亜鉛トランスポーター ZnT7 による亜鉛輸送の構造基盤とその生理的意義. (招待講演)
第 98 回日本生化学会年会, 京都.
9. 天貝 佑太, 稲葉 謙次. (2025/11/3-5)
亜鉛輸送体 ZIP7 による小胞体亜鉛制御が分泌タンパク質の成熟を支える. (招待講演)
第 98 回日本生化学会大会, 京都.
10. Xiaolin Qian, Satoshi Watanabe, Zhenghao Chen, and Kenji Inaba. (2025/12/03)
Structural basis of copper shuttling by the human Golgi-resident copper ion transporter ATP7A.
(招待講演)
第 48 回日本分子生物学会年会 MBSJ2025, 横浜.
11. 渡部 聡, 木谷 美思, 三宅 杏美子, 天貝 佑太, 稲葉 謙次. (2025/06/18-20)
ERp44 による亜鉛を介した基質認識・解離機構の構造基盤. (ポスター発表)
第 25 回日本蛋白質科学会年会, 姫路.
12. 谷 代元, 渡部 聡, 稲葉 謙次. (2025/06/18-20)
亜鉛イオンと銅イオンによるゴルジ体カルシウムポンプ SPCA1a の阻害機構. (ポスター発表)
第 25 回日本蛋白質科学会年会, 姫路.
13. 天貝 佑太, 稲葉 謙次. (2025/7/8-9)
ZIP7 機能低下による小胞体亜鉛蓄積とフォールディング障害. (ポスター発表)
生体機能関連科学・生物無機化学・生命金属科学合同サマースクール, 沖縄.
14. Yuta Amagai, Kenji Inaba. (2025/8/26-29)
Zinc-redox crosstalk regulates proteostasis in the endoplasmic reticulum. (ポスター発表)
AMED International Symposium "Proteostasis in Biology and Medicine", Kyoto, Japan.
15. Shohei Fujii, Sakura Ouchi, Ryota Morikawa, Satoshi Kusumi, Toshiaki Izawa, Daisuke Koga and Kenji Inaba. (2025/8/26-29)
Calcium homeostasis in the Golgi apparatus governs its morphology and function. (ポスター発表)
AMED International Symposium "Proteostasis in Biology and Medicine", Kyoto, Japan.

16. Sakura Ouchi, Shohei Fujii, Ryota Morikawa, Satoshi Kusumi, Toshiaki Izawa, Shuhei Chiba, Kazumasa Ohashi, Daisuke Koga and Kenji Inaba. (2025/8/26-29)
Advanced imaging techniques unveil the authentic Ca^{2+} map in the Golgi apparatus. (ポスター発表)
AMED International Symposium "Proteostasis in Biology and Medicine", Kyoto, Japan.
17. Tai-Yuan Ku, Satoshi Watanabe, Kenji Inaba. (2025/09/17-19)
Cryo-EM analysis reveals distinct inhibitory mechanisms of Zn^{2+} and Cu^{2+} on SPCA1a, the Golgi-resident Ca^{2+} pump. (ポスター発表)
International symposium on cellular structural biology, Tokyo, Japan.
18. 藤井 唱平, 大内 さくら, 森川 涼太, 久住 聡, 井澤 俊明, 甲賀 大輔, 稲葉 謙次. (2025/11/3-5)
初期分泌経路のカルシウム恒常性破綻はゴルジ体形態と機能に異常を引き起こす. (ポスター発表)
第98回日本生化学会大会, 京都.
19. 大内 さくら, 藤井 唱平, 森川 涼太, 久住 聡, 井澤 俊明, 押川 清孝, 千葉 秀平, 大橋 一正, 松本 雅記, 甲賀 大輔, 稲葉 謙次. (2025/11/3-5)
超高精度イメージング技術が明らかにした真のゴルジ体 Ca^{2+} 恒常性維持機構. (ポスター発表 & 口頭発表)
第98回日本生化学会大会, 京都.