

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16065

研究課題名（和文）亜鉛輸送体とErp44による初期分泌経路タンパク質品質管理機構の解明

研究課題名（英文）Protein quality control mechanisms in the early secretory pathway mediated by Erp44 and zinc transporters

研究代表者

天貝 佑太（Amagai, Yuta）

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：90773896

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体、ゴルジ体からなる初期分泌経路には、新規に合成された分泌タンパク質が正確な立体構造を形成できるように様々なタンパク質品質管理機構が備わっている。我々はこれまでに、このタンパク質品質管理機構に亜鉛が重要な働きを有することを見出ししてきた。しかしながら分泌経路内の亜鉛そのものがどのように制御されているのかはほとんど不明であった。本研究では、新規に開発した分泌経路内の亜鉛イメージング技術を用いて、ゴルジ体に局在する亜鉛輸送体タンパク質がどのように分泌経路内の亜鉛濃度維持に関わるかを解明した。さらに、亜鉛輸送体タンパク質の発現抑制がタンパク質品質管理に影響を与えることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、小胞体・ゴルジ体内の亜鉛濃度がどのくらいであるかはほとんど不明であった。私たちが開発した手法により、その値が明らかとなった。さらに亜鉛輸送体がどのように亜鉛濃度維持に関わっているかを発見することができた。これらの研究成果は、分泌経路における亜鉛の生理的な意義を考える上で重要な基礎的知見になると考えられ、本研究成果をもとに亜鉛生物学の発展に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Newly synthesized secretory proteins are natively folded in the early secretory pathway: the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. These organelles contain a number of systems to survey the quality of these proteins. We had found that zinc ions play a crucial role in this protein quality control system via an activation of Erp44, a member of PDI family. In this study, newly developed zinc imaging technology revealed how zinc transporters involve in the regulation of zinc homeostasis at the Golgi apparatus. Knockdown of the Golgi-localized zinc transporters induced malfunction of Erp44-mediated protein quality control in the early secretory pathway.

研究分野：生体機能化学

キーワード：Erp44 亜鉛輸送体 亜鉛 初期分泌経路 ゴルジ体 小胞体 タンパク質品質管理

1. 研究開始当初の背景

新規に合成された膜タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体内腔で正しい立体構造を獲得すると、小胞体を出芽する分泌小胞内へ取り込まれ、ゴルジ体を經由して目的部位へ運ばれて、そのタンパク質機能を発現する。小胞体局在タンパク質は、C末端にKDEL様配列を持つことで、ゴルジ体から小胞体へKDEL受容体により逆行輸送され、小胞体局在を維持する。しかしながら酸化のフォールディングに関わるEro1 α や、会合状態が未成熟なアディポネクチンやIgMは、小胞体へ逆輸送されるべきにも関わらずC末端KDEL様配列を有さない。ERp44はこれらのタンパク質をゴルジ体内腔で特異的に認識・結合し、C末端RDEL配列依存的に小胞体へ逆行輸送することで初期分泌経路内腔のタンパク質品質管理に寄与する。ERp44は、3つのチオレドキシシン様ドメインと、C末テールから構成されるPDIファミリータンパク質で、中性pH条件では、C末テールを閉じた構造を形成する。所属研究室では、ERp44が小胞体・ゴルジ体間のpH低下を認識して、酸性条件のゴルジ体でC末テールが開いた構造をとり、基質タンパク質と結合する分子機構を解明していた。

さらに私たちは、ERp44のC末テールの根元にHis残基がクラスターを形成していることに着目し、ここに亜鉛イオンが結合することでC末テールの構造が大きく変化し、基質タンパク質との結合能が劇的に上昇することを発見した。培養細胞を用いた実験では、亜鉛キレート剤であるTPENを処理し亜鉛を枯渇させると、ERp44がゴルジ体に蓄積することを発見した。さらに、ゴルジ体に局在し、ゴルジ体内腔方向へと亜鉛イオンを輸送するZnTファミリーメンバー(ZnT5, ZnT6, ZnT7)を発現抑制した細胞でも同様に、ERp44がゴルジ体に蓄積することを発見した。これらの結果から、ERp44はゴルジ体においてZnTファミリーメンバーと強調して亜鉛イオンを獲得して活性化することで、基質タンパク質を小胞体へと逆輸送することが明らかとなっていた。

しかしながら、ERp44が初期分泌経路内腔で亜鉛イオンを獲得するための分子機構の詳細は不明であり、分泌経路中における亜鉛イオンの恒常性維持機構とタンパク質品質管理機構が密接に関連する分子機構は全く不明であった。

2. 研究の目的

小胞体・ゴルジ体に局在する亜鉛輸送ファミリー(ZnTおよびZIP)に着目し、亜鉛イオン制御によるERp44機能制御機構を分子レベルで解明する。

本研究では、(1)ERp44を制御する特異的な亜鉛輸送体ファミリーメンバーの同定、(2)亜鉛輸送体を介した亜鉛イオン濃度変化の観測、(3)亜鉛輸送体によるERp44制御の分子機構の解析を行い、目的を達成する。

3. 研究の方法

(1) ERp44を制御する亜鉛輸送体の同定

細胞内局在制御機構：HeLa Kyoto細胞を用いて、各ZnTおよびZIPファミリーメンバーをそれぞれ発現抑制する。細胞を固定後、ERp44抗体とGM130抗体を用いて免疫染色する。共焦点レーザー顕微鏡を用いてERp44の細胞内局在変化への影響を観察した。

変化が見られた亜鉛輸送体に関して、siRNA耐性を持つcDNAを作製した。ノックダウンレスキュー実験を行い、ERp44の細胞内局在制御に与える効果を検証した。さらに活性変異体や過去に報告のある変異体を用いて同様の解析を行い、ERp44制御分子機構の探索を行った。

細胞内機能制御機構：ERp44の基質タンパク質であるEro1 α やERAP1、Prx4は、細胞内に過剰発現されると、ERp44のキャパシティを越えてしまい細胞外へ分泌される。各亜鉛輸送体を発現抑制した細胞に、ERp44基質タンパク質を過剰発現させ、その細胞外分泌量をウェスタンブロットによって検出した。

(2) 亜鉛輸送体を介した亜鉛イオン濃度変化の観測

共同研究によって開発された新規亜鉛検出プローブZnDA-1Hを用いて(Kowada et al., Cell Chem Biol, 2020)、ゴルジ体の亜鉛イオン濃度定量を行った。本技術では、Haloタグテクノロジーを用いることで指定のオルガネラに亜鉛プローブを特異的に局在させることが可能である。小胞体、シスゴルジ体、ミディアルゴルジ体、トランスゴルジ体にそれぞれ局在するHaloタグタンパク質発現プラスミドを準備し、それぞれのサブオルガネラにおける亜鉛イオン濃度定量を行った。さらに、ゴルジ体へ亜鉛イオンを流入するZnTメンバーを発現抑制した細胞を用いて同様の解析を行い、ZnTによるゴルジ体亜鉛イオン濃度制御機構を検討した。

(3) 亜鉛輸送体によるERp44制御の分子機構の解析

亜鉛輸送体とERp44が特異的に相互作用する可能性を想定し、オルガネラ内腔領域にFLAGタグ配列を挿入した亜鉛輸送体を準備し、細胞内におけるERp44との相互作用をPLA

(proximity ligation assay)によって検出することを試みた。

4. 研究成果

(1) ERp44 を制御する亜鉛輸送体の同定

はじめに、各 ZnT に対する siRNA をトランスフェクションした細胞の mRNA を抽出し、発現抑制効率をそれぞれ確認した。それぞれ目的遺伝子の発現抑制効果を確認し、また目的以外の ZnT メンバーに対しては mRNA 量に大きな変化を与えないことが明らかとなった。

細胞内局在制御機構：各 ZnT 発現抑制細胞を用いて ERp44 の細胞内局在を観察したところ、興味深いことに、ある 1 種類の ZnT を発現抑制するだけで十分に ERp44 がゴルジ体に蓄積する表現型を示すことが明らかとなった。この ZnT の cDNA をクローニングしたのち、siRNA 耐性変異を加えた発現プラスミドを作製した。ゴルジ体に局在するすべての ZnT をロックダウンした細胞に、siRNA 耐性 ZnT を発現させたところ、ERp44 のゴルジ体への蓄積が完全に解消した。さらに、亜鉛輸送に必須のヒスチジンとアスパラギン酸をそれぞれアラニンに置換した HADA 変異体では、この局在変化の回復が見られなかった。以上の結果から、この ZnT によってゴルジ体内に輸送される亜鉛イオンが ERp44 の細胞内局在制御に重要であることが明らかとなった。一方、他の亜鉛酵素の活性化に関わることが知られるジプロリンモチーフをアラニンに置換した PP-AA 変異体では、野生型同様に ERp44 の細胞内局在を回復させた。また、すべての ZnT を発現抑制した細胞に対して亜鉛イオノフォアである Zinc pyrithione を処理するだけで ERp44 の細胞内局在が回復した。これらの結果は、ERp44 は ZnT との特異的な相互作用を必要とせず、亜鉛イオン濃度が高い場所で亜鉛を獲得するものと考えられた。

細胞内機能制御機構：ZnT を発現抑制した細胞に、FLAG タグを付加した ERp44 基質タンパク質を過剰発現させ、細胞外に分泌した基質タンパク質量を検証したところ、ある種の ZnT を発現抑制した細胞では有意に分泌量が増加した。意外なことに、この ZnT は ERp44 の細胞内局在制御に強く関わる ZnT とは別のメンバーであった。

(2) 亜鉛輸送体を介した亜鉛イオン濃度変化の観測

ゴルジ体の各層板に局在する Halo タグタンパク質発現プラスミドを作製し、その場所における亜鉛イオン濃度測定を行なった。過去の報告に矛盾なく、我々の使用している HeLa Kyoto 細胞においても、ゴルジ体の遊離亜鉛濃度は小胞体よりも有意に高いことが明らかとなった。さらに面白いことに、ゴルジ体の中でも最上流領域は下流領域に比べて高い遊離亜鉛を保持していることが明らかとなった。各 ZnT を発現抑制した細胞についても同様に測定したところ、ERp44 の細胞内制御に関わる ZnT を発現抑制した際には、ゴルジ体の最上流領域の遊離亜鉛濃度が顕著に低下し、機能制御に関わる ZnT を発現抑制した際には、ミディアルからトランスゴルジ体領域の遊離亜鉛濃度が低下することが明らかとなった。

以上の結果を総合すると、ゴルジ体内でも上流領域の遊離亜鉛濃度の維持が ERp44 の正確な細胞内局在化に重要な一方で、ゴルジ体下流領域における遊離亜鉛濃度維持が ERp44 の機能発現には重要であると考えられた。

(3) 亜鉛輸送体による ERp44 制御の分子機構の解析

亜鉛輸送体のオルガネラ内腔領域に FLAG タグを付加した変異体を作製し、ERp44 との相互作用を検出しようと試みたが、この変異体は、ERp44 の細胞内局在を回復させる活性を見ることができなかった。様々な場所に FLAG タグを挿入して検討したが、いずれの場合においても ERp44 の局在を回復しなかった。このことから、亜鉛輸送体の内腔領域はそのタンパク質活性に必須であることが考えられた。また、(1)の研究成果から、ERp44 の細胞内局在調節には、ゴルジ体内の遊離亜鉛濃度が最も重要であり、亜鉛輸送体との特異的な相互作用はそれほど必要でないと考えられたため、本解析は中断することとした。

以上のように、ゴルジ体に局在する複数の ZnT 亜鉛輸送体は、それぞれ異なる機能を有し、複雑に ERp44 の制御に関わることが明らかとなった。これまで、ゴルジ体に局在する ZnT が異なる働きを持つことを示す知見はほとんど発表されておらず、亜鉛生物学分野において重要な研究成果を得ることに成功した。

研究成果について取りまとめ、論文投稿準備中である。

[参考文献]

Kowada et al., Cell Chemical Biology, 2020, 27, 12, 1521-1531.e8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 天貝佑太、山田桃、渡邊朝美、小和田俊行、渡部聡、水上進、稲葉謙次
2. 発表標題 亜鉛が制御する初期分泌経路のタンパク質品質管理機構
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Amagai, Momo Yamada, Tomomi Watanabe, Toshiyuki Kowada, Satoshi Naramoto, Satoshi Watanabe, Junko Kyojuka, Roberto Sitia, Shin Mizukami, Kenji Inaba
2. 発表標題 ZnT7 regulates ERp44 through the control of Zn ²⁺ concentrations at the ERGIC/cis-Golgi
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Amagai, Momo Yamada, Tomomi Watanabe, Toshiyuki Kowada, Satoshi Naramoto, Satoshi Watanabe, Junko Kyojuka, Roberto Sitia, Shin Mizukami, Kenji Inaba
2. 発表標題 Visualization of zinc in the ER and Golgi
3. 学会等名 14th ER & Redox Club Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Amagai, Momo Yamada, Tomomi Watanabe, Toshiyuki Kowada, Satoshi Naramoto, Satoshi Watanabe, Junko Kyojuka, Roberto Sitia, Shin Mizukami, Kenji Inaba
2. 発表標題 ERp44 acquires Zinc ions at the ER-Golgi intermediate compartment via ZnT7
3. 学会等名 The 6th Meeting of International Society for Zinc Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 天貝佑太 , 渡部聡 , 稲葉謙次	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 8
3. 書名 イメージング時代の構造生命科学「初期分泌経路における新たなタンパク質品質管理機構 ---亜鉛イオンとERp44の協奏」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------