

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04335

研究課題名(和文)小胞体とゴルジ体間のpH勾配に依存した新たなタンパク質品質管理機構の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of new protein quality control systems depending on the pH gradient between the ER and the Golgi

研究代表者

稲葉 謙次 (Inaba, Kenji)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：10423039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ERp44は小胞体局在性の酵素や構造未成熟の分泌タンパク質をゴルジ体で捕獲し小胞体に逆輸送することでタンパク質品質管理を行うPDI familyのタンパク質である。本研究期間中に、ERp44の結晶構造をpH7.5とpH6.5の二つの条件で解くことに成功した。さらに構造情報に基づく生化学的・生物物理学的および細胞生物学的解析を行うことにより、ERp44が小胞体とゴルジ体のpH依存的に構造を変化させ、基質との結合解離を制御する分子機構を解明した(Watanabe et al., PNAS 2017)。

研究成果の概要(英文)：ERp44 is a PDI-family member protein that transports back ER-resident enzymes and immature secretory proteins from the Golgi to the ER and thereby conducts protein quality control in the early secretory pathway. In this research project, we succeeded in crystal structure analysis of ERp44 at pH7.5 and pH6.5. Based on the structural information, we performed a series of biochemical, biophysical and cell biological studies. Consequently, we revealed the molecular mechanism by which ERp44 regulates the substrate binding and release in a pH-dependent manner (Watanabe et al., PNAS 2017).

研究分野：構造生物化学

キーワード：タンパク質品質管理 小胞体 ゴルジ体 X線結晶構造解析 ERp44 PDIファミリー

1. 研究開始当初の背景

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質が高次構造を形成するオルガネラである。正しい立体構造を獲得したタンパク質は分泌経路に沿ってゴルジ体を経由したのち、それぞれ指定の区画へと輸送される。一方、小胞体に局在すべきタンパク質や高次構造上未成熟な分泌タンパク質はゴルジ体から COPI 被覆小胞を介して小胞体へ逆輸送される。この経路において、PDI ファミリータンパク質の一つである ERp44 がそれら構造未成熟のタンパク質を選択的に認識・捕獲し、KDEL 受容体との結合を介して小胞体へ逆輸送することが発見されている。この機構において小胞体とゴルジ体間に存在する pH 勾配が極めて重要な役割を担い、ERp44 はこの pH 勾配を何らかの機構によりセンスし、C 末端テール領域の開閉を介して、逆輸送すべき基質との結合解離を制御することを我々は 2013 年に報告した (Vavassori, S., Masui, S. et al., *Mol. Cell*, 2013)。しかしながら、ERp44 による pH センシング機構および pH 依存的な ERp44 の構造制御機構は不明であった。また ERp44 による基質認識機構、さらには ERp44 と KDEL 受容体の相互作用機構についても全く知見が得られていなかった。

2. 研究の目的

構造生物学、生化学、細胞生物学的手法を駆使することにより、以下の 3 点を解明することを主目的とした。

(1) ERp44 がどのような機構により小胞体とゴルジ体間の pH 勾配をセンスし、C 末端テール領域の開閉が制御されるのか。

(2) C 末端テール領域が開くことにより、ERp44 がどのように Ero1 や他の逆輸送されるべき基質を選択的に認識し、結合するのか。

(3) KDEL 受容体はどのように ERp44 の RDEL 配列を認識し、そこに pH はどう関与するのか。

3. 研究の方法

(1) 主として X 線結晶構造解析により、小胞体の pH 条件 (pH7.2) とゴルジ体の pH 条件 (pH6.5) で ERp44 の結晶構造を解くことにより、ERp44 の pH センシング機構と pH 依存的な C 末端テール領域の開閉制御機構の解明に取り組んだ。

(2) ERp44 の構造情報に基づき、コンピュータモデリング並びに等温滴定熱カロリメトリーにより ERp44 による基質タンパク質

(Ero1 α など)の相互作用機構の解明に取り組んだ。

(3) 生化学的手法ならびに細胞生物学的手法、さらには系統的変異体解析を組み合わせることにより、ERp44-KDEL 受容体間の相互作用機構の解明に取り組んだ。

4. 研究成果

小胞体の生理的条件に近い pH7.2 とゴルジ体の生理的条件に近い pH6.5 の二つの条件で ERp44 の X 線結晶構造解析に取り組み、共に 2.1 オングストローム分解能で構造決定することに成功した。これら二つの状態の詳細な構造比較、さらには構造情報をもとに分子動力学計算を行うことにより、ERp44 の pH センシングに関わる領域、さらには pH 依存的に構造揺らぎが大きくなる領域、さらには pH 変化に伴う ERp44 のドメイン再配置の解明に至った。

ERp44 による基質認識機構についても、ERp44 の高分解能構造情報をもとに静電ポテンシャルを計算し、さらに基質である Ero1 とのドッキングモデルを構築することにより、両タンパク質間の相互作用部位を同定し、また系統的変異体解析や等温滴定熱測定実験により両タンパク質間の相互作用機構を解明するに至った。以上の構造生物化学的仕事については、2017 年に PNAS 誌に報告した。

ERp44-KDEL 受容体間の相互作用機構についても分子構造レベルで解明するため、KDEL 受容体の大量発現精製系を構築し、現時点で 1 リットル培養あたり ~0.5 mg の精製 KDEL 受容体を得るに至っている。現在精製タンパク質を用いて、両タンパク質間の相互作用機構を解析中である。一方、ERp44、KDEL 受容体そして基質タンパク質である Ero1 α の三者を培養細胞中で共発現し、種々の条件下で免疫沈降を行うことにより、三者複合体が安定に形成される最適条件を検討した。これにより、複合体形成を制御する化学パラメータを同定すると同時に、今後クライオ電子顕微鏡などによる構造解析を視野に入れた複合体調製条件がおおよそ確立できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Watanabe S., Harayama M., Kanemura S., Sitia R. and Inaba, K.* "Structural basis of pH-dependent client binding by ERp44, a key regulator of protein secretion at the ER-Golgi interface" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114, 3224-3232 (2017) 【査読あり】
DOI: 10.1073/pnas.1621426114.

2. Maegawa, K., Watanabe, S., Noi, K., Okumura, M., Amagai, Y., Inoue, M., Ushioda R., Nagata, K., Ogura, T. and **Inaba, K.*** “The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation” *Structure*, 25, 846-857(2017) 【査読あり】 DOI: 10.1016/j.str.2017.04.001.

3. Arai, K., Takei, T., Okumura, M., Watanabe, S., Amagai, Y., Asahina, Y., Moroder, L., Hojo, H.*, **Inaba, K.*** and Iwaoka, M.* “Preparation of selenoinsulin as a long-lasting insulin analog” *Angewandte Chemie* 56, 5522-5526 (2017) 【査読あり】 DOI: 10.1002/anie.201701654.

4. Akaike, T., Ida, T., Wei, F.-Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Alam, M. M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., Nishimura, A., Morita, M., Tomizawa, K., Nishimura, A., Watanabe, S., **Inaba, K.**, Shima, H., Tamura, N., Minkyung, J., Fujii, S., Watanabe, Y., Ohmuraya, M., Nagy, P. Feelisch, M., Fukuto, J.M. and Motohashi, H. “CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics” *Nature Communications*, 8, 1177 (2017) 【査読あり】 DOI: 10.1038/s41467-017-01311-y.

5. Ushioda R, Miyamoto A, Inoue M, Watanabe S, Okumura M, Maegawa KI, Uegaki K, Fujii S, Fukuda Y, Umitsu M, Takagi J, **Inaba K.**, Mikoshiba K, Nagata K. “Redox-assisted regulation of Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(41):E6055-E6063 (2016) 【査読あり】

6. Kanemura, S., Okumura, M., Yutani, K., Ramming, T., Hikima, T., Appenzeller-Herzog, C., Akiyama, S. and **Inaba, K.*** “Human ER oxidoreductin-1 α (Ero1 α) undergoes dual regulation through complementary redox interactions with protein-disulfide isomerase”, *J. Biol. Chem.*, 291, 23952-23964 (2016) 【査読あり】

7. Cao, Z, van Lith, M., Mitchell, L. J., Pringle, M. A., **Inaba, K.** and Bulleid, N. J. “The membrane topology of Vitamin K Epoxide Reductase is conserved between human isoforms and the bacterial enzyme” *Biochem. J* 473, 851-858 (2016) 【査読あり】 DOI: 10.1042/BJ20151223.

8. Ramming, T., Kanemura, S., Okumura, M., **Inaba, K.*** and Appenzeller-Herzog, C.* “Cysteines 208 and 241 in Ero1 α are required

for maximal catalytic turnover”, *Redox Biology* 7, 14-20 (2016) 【査読あり】 DOI: 10.1016/j.redox.2015.11.004.

9. Watanabe, S., Kawashima, T., Nishitani, Y., Kanai, T., Wada, T., **Inaba, K.**, Atomi, H., Imanaka, T. and Miki, K. “Structural basis of a Ni acquisition cycle for [NiFe]-hydrogenase by HypA and its enhancer.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 7701-7706 (2015) 【査読あり】 DOI: 10.1073/pnas.1503102112.

10. Okumura, M., Kadokura, K., and **Inaba, K.*** “The structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum.” *Free Rad. Biol. Med.* 83, 314-322 (2015) 【査読あり】 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.010.

11. Ramming, T., Okumura, M., Kanemura, S., Baday, S., Birk, J., Moes, S., Spiess, M., Jenö, P., Berneche, S., **Inaba, K.** and Appenzeller-Herzog, C. “A PDI-catalyzed thiol/disulfide switch regulates the production of hydrogen peroxide by human Ero1” *Free Rad. Biol. Med.* 83, 361-372 (2015) 【査読あり】 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.011.

他 5 件

〔学会発表〕 (計 109 件)

1. **Inaba, K.** (invited)
“Structural basis of redox-dependent regulation of Sarco/Endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b (SERCA2b)”
日本生物物理学会年会、熊本、2017 年 9 月 19–21 日
2. **Inaba, K.**
“Structural and Mechanistic basis of pH- and Zn²⁺-dependent regulation of ERp44 for protein quality control in the early secretory pathway”
ER & Redox club meeting, Germany, Apr 26-29, 2017
3. **Inaba, K.** (invited)
“How do PDI family member proteins act on unfolded/misfolded proteins to ensure protein quality control in the early secretory pathway?” *Nascent chain biology meeting 2016*, Japan, Sept 1-3, 2016
4. **Inaba, K.** (invited)
“Dynamic natures of PDI family member

proteins that act on nascent chains in the endoplasmic reticulum” Nascent chain biology meeting, Tokyo, Japan, Oct. 1, 2015

5. **Inaba, K.** (invited)

“Dynamic natures of PDI family members in catalysis of oxidative protein folding and ER associated degradation” *EMBO meeting*, Birmingham, UK, Sept. 5-8, 2015

他 104 件

〔図書〕 (計 1 件)

1. Okumura, M., Watanabe, S. and **Inaba, K.** “Structural insights into disulfide bond formation and protein quality control in the mammalian endoplasmic reticulum” *Oxidative folding of Peptides and Proteins* (Royal Society of Chemistry) in press 【査読あり】

〔その他〕

ホームページ等

東北大学多元物質科学研究生体分子構造研究分野 (稲葉研究室) ホームページ：
<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/inaba/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 謙次 (Inaba Kenji)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：10423039