

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06075

研究課題名(和文)免疫グロブリンMの成熟化に関するシャペロン複合体の分子機構の解明

研究課題名(英文)Structural analysis of chaperone complex for the IgM assembly

研究代表者

渡部 聡 (Watanabe, Satoshi)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：50432357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫グロブリンM (IgM)は、二組の軽鎖と重鎖で形成されたIgM単量体が、ジスルフィド結合で架橋された五または六量体として細胞外に分泌される。本研究ではIgMの生合成に関わるカーゴ受容体ERGIC-53の構造機能解析に取り組み、クライオ電子顕微鏡単粒子解析によって、全長構造を明らかにした。またIgMモノマーを始めとして未会合タンパク質の成熟化に関わるシャペロンタンパク質のERp44について、亜鉛に基づいた基質の結合・解離機構およびクライオ電顕による基質認識の分子基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、長年未解明であったERGIC-53の全長構造をクライオ電顕単粒子解析によって明らかにすることができた。構造解析によって血液凝固第V因子などの積荷の詳細な結合部位が明らかになり、また長いストーク領域を利用した効率的な輸送機構が明らかになった。これらの構造情報は、抗血液凝固薬の開発の基盤になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Immunoglobulin M (IgM) is secreted as a pentamer or hexamer formed by by disulfide bonds. In this study, we have investigated the structural and functional analysis of ERGIC-53, a cargo receptor involved in the biosynthesis of IgM, and determined its full-length structure by cryo-EM single-particle analysis. ERp44, a chaperone protein is also involved in the maturation of IgM monomers. We revealed the zinc-based substrate dissociation mechanism of ERp44. In addition, we have solved a cryo-EM structure of a complex between ERp44 and its client proteins, revealing molecular basis of its substrate recognition.

研究分野：構造生物化学

キーワード：カーゴ受容体 クライオ電子顕微鏡 シャペロン

### 1. 研究開始当初の背景

免疫グロブリン M (IgM) は、二組の軽鎖と重鎖で形成された IgM 単量体が、ジスルフィド結合で架橋された五または六量体として細胞外に分泌される。これまでの研究から、細胞の分泌経路において、小胞体で合成された IgM 単量体が小胞体シャペロンである ERp44 によって捕獲され、糖タンパク質の運搬を担う ERGIC-53 上で IgM の正確な会合体が形成されると考えられている。ERp44 は、未会合状態の分泌タンパク質や一部の小胞体局在タンパク質を、ゴルジ体から小胞体へと逆輸送させる役割を担っている。申請者は、異なる pH 条件下における ERp44 の高分解能結晶構造解析に成功し、細胞内の pH 勾配を利用した構造変化や、分子表面の電荷変化によって基質タンパク質との相互作用が制御されることを明らかにした (Watanabe et al., PNAS, 2017)。一方 ERGIC-53 は、小胞体とゴルジ体の中間区画である ERGIC に局在する一回貫通膜タンパク質であり、糖鎖修飾された様々な分泌タンパク質の小胞体からゴルジ体への輸送に関与している。全体構造は、糖鎖結合ドメイン(CRD)、ストークドメイン、膜貫通ヘリックス(TM)および ERGIC 局在モチーフで構成されており、ストークドメイン間で六量体を形成して機能すると考えられている。ERGIC-53 の変異は、血液凝固因子の運搬に障害が生じ、血液性疾患の原因となることが知られている。現在のところ、CRD ドメインのみが構造機能解析が進められている。

このように ERp44 および ERGIC-53 は、分泌経路におけるタンパク質品質管理機構において重要な役割を果たしている。しかし全長 ERGIC-53 の立体構造は未決定であり、六量体としての分子機構は不明な点が残されている。また IgM はじめ、様々な基質タンパク質と ERp44 との相互作用様式についても、十分には分かっていない。さらに IgM 生合成において ERp44 と ERGIC-53 は相互作用し、どのような機構で両者の相互作用が制御されているかは分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、ERGIC-53 および ERp44 の分子機構を明らかにするために以下の項目に取り組む。

- (1) 全長 ERGIC-53 の立体構造を決定し、全長 ERGIC-53 の分子機構を解明する。
- (2) ERp44 と IgM などの基質タンパク質との複合体の構造を決定し、基質認識機構を解明する。
- (3) ERp44-ERGIC-53 との相互作用解析を行い、その制御機構を明らかにする。さらに複合体の立体構造を決定し、相互作用様式を原子レベルで明らかにする。

### 3. 研究の方法

ヒト由来 ERGIC-53 の大量発現・精製方法を確立し、結晶構造解析またはクライオ電子顕微鏡によって全長の立体構造を原子レベルで決定する。大量発現では、ヒト培養細胞 HEK293T の発現誘導型安定発現株を樹立し、誘導物質 Cumate の添加によって ERGIC-53 を大量発現させる。構造解析に適した界面活性剤をスクリーニングし、ERGIC-53 の精製方法を最適化させる。精製サンプルが得られたら結晶化およびクライオ電子顕微鏡による構造解析に取り組み、その立体構造を明らかにする。

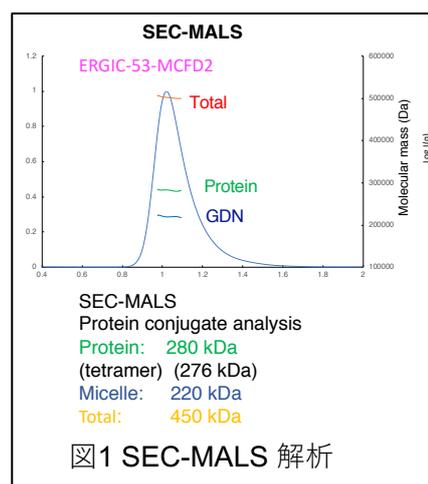
一方、ERp44 と基質タンパク質や ERGIC-53 との相互作用を、ゲルろ過クロマトグラフィーや等温滴定カロリーメトリーを用いて解析し、複合体形成や解離の条件を探索する。またに安定な複合体については、クライオ電子顕微鏡での構造解析に取り組む、相互作用様式を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) ERGIC-53 のクライオ電顕構造解析

ヒト由来全長 ERGIC-53 についてヒト培養細胞 HEK293T の発現誘導型安定発現株を樹立し、新規のアフィニータグ (PA タグ) を利用した抗体カラム、および界面活性剤のスクリーニングの結果、高純度で単分散の精製サンプルを得ることに成功した。

過去の研究から、ERGIC-53 は六量体として機能していると考えられてきたが、ネイティブ電気泳動などの結果に基づいた推定であり、検証の必要性が考えられた。そこで、より正確な溶液中の分子量を測定するために、KEK において SEC-MALS/SAXS に取り組んだ。SEC-MALS および Conjugate 解析方法を用いて、分子全体、界面活性成分と膜タンパク質成分の分子量を見積もった結果、ERGIC-53 は従来提唱された六量体ではなく四量体として存在してい



ることが分かった (図1)。一方 SEC-SXAS の散乱プロファイル結果から、2つの globular ドメインが長いリンカーで連結した分子形状が推定され、分子長が非常に長い(350 Å)構造を取ることが示唆された。また ERGIC-53 のパートナー分子 MCFD2 との複合体形成によって全体構造がより rigid な構造を取ることが示唆された。

次により高分解能において全長 ERGIC-53 および MCFD2 との複合体の構造を決定するため、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析に取り組んだ。まず 200kV のクライオ電顕 (Talos Arctica) を利用して、蛋白質濃度や、グリッドの種類、blotting パラメータの最適化に取り組んだ。最適化された条件では、長く伸びたダンベル状粒子が観察され (図2A)、この最適化したグリッドについて、300kV のハイエンドクライオ電顕 (Tian Krios G3) を利用して、約 5000 枚の電顕画像を取得した。分子長が長いため、ヘッド領域と TM 領域をそれぞれ分けてピックアップし、ERGIC-53 のヘッド領域について 2.5Å 分解能の電顕構造を決定した (図2B)。CRD 同士の相互作用によってカーゴ結合部位が形成されることを明らかにした。一方 Topaz プログラムを利用して全長粒子の自動拾いに成功し、全長のクライオ電顕構造を決定した (図2C)。四葉クローバーに類似した全長構造は CRD で構成されたヘッド領域、コイルドコイルで構成された細長いストークドメインと TM 領域で構成されており、3D variability analysis からストークドメインの柔軟な動きが可視化できた。またストークドメインが 90 度近く湾曲した構造も二次元平均像から確認できた。このように長いストークドメインの柔軟な動きによって効率的にカーゴを捕獲する機構が示唆された。

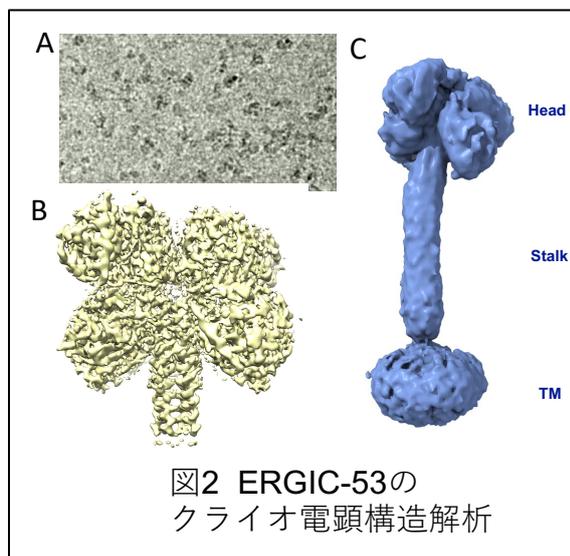


図2 ERGIC-53の  
クライオ電顕構造解析

## (2) 亜鉛に依存した ERp44 の基質認識機構の解明

IgM をはじめとして、Ero1 や ERAP1 などの ERp44 との相互作用解析および構造解析に取り組んだ。ERp44 のヒスチジンクラスターを有することに基づき、ERp44 が数百 nM の親和性で亜鉛と結合できることを突き止め、亜鉛イオンによって ERp44 と基質タンパク質との相互作用がより強化されることを発見した。さらに、亜鉛結合型 ERp44 の結晶構造解析によって亜鉛制御の分子基盤を解明した (Watanabe et al., Nat commun 2019)。次にゴルジ体から小胞体に逆行輸送後、どのように複合体が解離するかについては、生化学解析を行った。pH7.2 において、解離状態を調べて結果、ERp44 と基質との間のジスルフィド結合を還元するだけでは、複合体を解離させるには不十分であることが分かった。一方、亜鉛キレーターである TPEN 下では、大部分の複合体が解離しており、亜鉛のキレートが複合体の解離には必須であることが分かった。さらに解析の結果、細胞内では、高濃度に存在するグルタチオンが ERp44 からの亜鉛キレートに寄与していることが示唆された。

一方、基質の一つ ERAP1 について、ERp44 との安定な複合体調製に成功し、クライオ電顕による構造解析に取り組んだ。PEG 処理などによってさらに安定化させた複合体試料を用いて、30kV ハイエンドクライオ電子顕微鏡 (CryoARM300 II) を利用し約 6000 枚の電顕画像を取得し、最終的に 3.3 Å 分解能の ERp44-ERAP1 複合体のクライオ電顕構造を決定した。密度マップでは ERAP1 側の局所分解能は高く、各側鎖が確認できた。一方で、ERp44 の局所分解能は著しく低く、モデルの構築は困難であったが、3D Variability Analysis 解析の結果、ERp44 が ERAP1 に対してゆらゆらと揺れ動くように結合している様子が観察された。このように ERp44 は、ERAP1 のループ領域を介して柔軟性高く結合していることが示唆された。

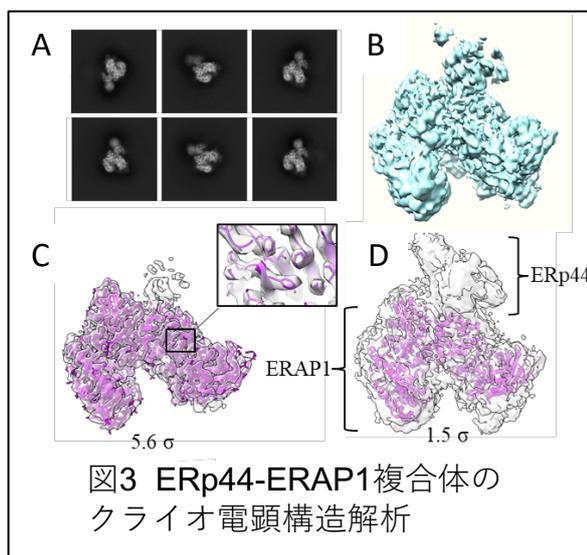


図3 ERp44-ERAP1複合体の  
クライオ電顕構造解析

### (3) ERp44 と ERGIC-53 との相互作用解析

最近の細胞生物学的実験から ERp44 の小胞体からゴルジ体への移行には、ERGIC-53 が関与していることが報告された。そこで精製サンプルを利用して、ゲルろ過クロマトグラフィー方法により両者の相互作用解析に取り組んだ。pH が亜鉛存在下などの様々な条件下で複合体形成を調べたが、いずれの条件でも複合体形成は確認できず、細胞中では、別の因子が複合体形成に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Satoshi, Amagai Yuta, Sannino Sara, Tempio Tiziana, Anelli Tiziana, Harayama Manami, Masui Shoji, Sorrentino Ilaria, Yamada Momo, Sitia Roberto, Inaba Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Zinc regulates ERp44-dependent protein quality control in the early secretory pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-08429-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 木谷美思, 渡部聡, 天貝佑太, 稲葉謙次
2. 発表標題 亜鉛結合性シャペロンERp44-基質複合体の形成・解離機構の解明とクライオ電顕構造
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部 聡 三宅杏美子 天貝佑太 稲葉謙次
2. 発表標題 亜鉛に依存したERp44-クライアント複合体の解離機構の解明
3. 学会等名 第21回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Watanabe, S., Kise, Y., Yonezawa, K., Shimizu, N., Nureki, O. and Inaba, K
2. 発表標題 Correlative structural analysis of a full-length cargo receptor ERGIC-53 in complex with its partner MCFD2
3. 学会等名 第59回生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部 聡、木瀬孔明、米澤健人、清水伸隆、濡木理、稲葉謙次
2. 発表標題 全長カーゴ受容体ERGIC-53と補助因子MCFD2との複合体のクライオ電顕構造
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Watanabe, Yuta Amagai, Sara Sannino, Amiko Miyake, Roberto Sitia, and Kenji Inab
2. 発表標題 A new role of cellular zinc for protein quality control in the early secretory pathway
3. 学会等名 第20回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天貝佑太, 山田桃, 小和田俊行, 渡邊朝美, 楢本悟史, 渡部聡, 経塚淳子, 水上進, Roberto Sitia, 稲葉謙次
2. 発表標題 亜鉛輸送体によるゴルジ体の亜鉛制御が ERp44機能を調節する
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅杏美子, 渡部 聡, 天貝佑太, 稲葉謙次
2. 発表標題 小胞体における亜鉛結合性シャペロンERp44とクライアントとの複合体の解離機構の生化学的解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部 聡
2. 発表標題 Structural basis of zinc-dependent protein quality control in the early secretory pathway
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Cell Biology of Metals (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部 聡, 天貝佑太, 山田桃, Roberto Sitia, 稲葉謙次
2. 発表標題 亜鉛イオンとシャペロンタンパク質ERp44による新たな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 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe S., Amagai Y. Sitia R. Inaba K
2. 発表標題 Structural basis of pH- and zinc-dependent multiple client recognition by ERp44
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Watanabe, Yuta Amagai, Sara Sannino, Manami Harayama, Shoji Masui, Momo Yamada, Roberto Sitia, and Kenji Inaba
2. 発表標題 Structural basis of zinc-dependent ERp44 regulation for protein quality control in the early secretory pathway
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave (国際学会)
4. 発表年 2018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 248
3. 書名 イメージング時代の構造生命科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞内の垂鉛の新しい生理的役割が明らかに <a href="http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/news_press/20190213/">http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/news_press/20190213/</a>
---

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
---------	---------