

令和元年5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15085

研究課題名(和文) 分泌経路におけるERp44を介したタンパク質品質管理機構とその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of ERp44-mediated protein quality control system and its physiological significance in the early secretory pathway

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ERp44は小胞体局在タンパク質や、高次構造が未成熟なタンパク質を基質タンパク質としてゴルジ体で捕え、小胞体へ逆行輸送する事で、初期分泌経路のタンパク質品質管理に関わる。しかしながら、ERp44の高次生理機能には不明な点が多い。本研究では、ERp44結合タンパク質をBioID2を用いて網羅的に同定し、ERp44が細胞外基質と結合することが示唆された。また、一連の発現抑制実験から、ERp44を制御する因子として亜鉛トランスポーターを同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体-ゴルジ体内腔におけるタンパク質品質管理機構の破綻は、神経変性疾患の原因となることが知られており、その分子基盤の解明は重要である。また、亜鉛は必須微量元素の一つであり、亜鉛の欠損は様々な病態に関連することが知られているが、細胞中での働きについては、あまり理解されていなかった。本研究では、ERp44の生理機能および制御機構を解析することで、亜鉛が分泌経路におけるタンパク質品質管理に関わるという新たな生理機能が解明された。

研究成果の概要(英文)：ERp44 captures ER-resident proteins and immature secretory proteins in the Golgi and transports them back to the ER. In this way, ERp44 contributes to the protein quality control systems in the early secretory pathway. However, the biological significance of ERp44 is not fully understood. In this research, we identified ERp44-binding proteins by BioID2 method and found that ERp44 may participate in the production of extracellular matrix proteins. Furthermore, a series of knockdown experiments showed that zinc transporters regulate ERp44 in cells.

研究分野：機能生物化学

キーワード：タンパク質品質管理 ゴルジ体 小胞体 亜鉛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞において、新規に合成された分泌タンパク質や膜タンパク質は小胞体へ挿入され、立体構造が形成される。正しい立体構造を獲得したタンパク質は、ゴルジ体を経由して目的部位へ輸送され、細胞機能を発揮する。一方、小胞体局在タンパク質や、正しい高次構造が形成されていない分泌タンパク質がゴルジ体に到達すると、ゴルジ体内で選別され、小胞体へ逆行輸送される。この逆行輸送経路において、PDI ファミリーの一つである ERp44 が重要な働きを持つことが明らかとなっている。ERp44 は、3つのチオレドキシシン様ドメインとC末テールドメインから構成され、中性条件下では、C末テールが一つ目のチオレドキシシン様ドメイン上にある基質結合領域と結合した構造を持つ。ERp44 は小胞体からゴルジ体までに局在し、ゴルジ体において基質タンパク質と結合し、C末端 RDEL 配列を介して KDEL 受容体と複合体形成をすることで、ゴルジ体から小胞体へ基質タンパク質を逆行輸送する。これまでに、私たちの研究室では、小胞体-ゴルジ体間における pH 勾配が、ERp44 の機能を制御することを細胞生物学的解析、生化学的解析、結晶構造解析を組み合わせることで明らかにしてきた (Vavassori, Masui, et al., 2013, *Mol. Cell*, Watanabe, et al., 2017, *PNAS*)。すなわち、より酸性条件であるゴルジ体では、C末テール領域の構造変化が引き起こされ、ERp44 の基質結合部位が分子表面に露出し、基質タンパク質との親和性が上昇することを解明した。さらに、亜鉛イオンが ERp44 の C末テール中のヒスチジンクラスター領域に配位し、基質タンパク質との親和性が上昇する新規調節機構も見出していた。

以上の様に、ERp44 の制御機構の理解は進展してきた一方で、ERp44 の細胞中における高次生理機能は不明な点が多い。また、細胞中において ERp44 が亜鉛イオンによって制御されるための分子機構も全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、細胞中における ERp44 の高次機能と制御メカニズムを明らかにするために、(1)BioID2 を用いた ERp44 結合タンパク質の網羅的同定と、(2)亜鉛輸送体ファミリーの Zinc transporter (ZNT)に着目した、ZNT による ERp44 制御機構の検討の2点について解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞内で近傍タンパク質を非特異的にビオチン化する BioID2 を ERp44 に融合させた BioID2-ERp44 発現コンストラクトを作製し、ERp44 近傍に局在するタンパク質を網羅的にビオチン化修飾した。細胞を回収後、ミクロソーム画分を抽出し、オプティプレップを用いた密度勾配遠心によってさらにゴルジ体画分と小胞体画分に分離した。それぞれの画分を可溶化したのちに、ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズによって回収し、回収したタンパク質を質量分析によって同定し、ERp44 結合タンパク質を決定した。

(2) ゴルジ体に局在する ZNT サブファミリーの ZnT5、ZnT6、ZnT7 を同時に発現抑制した細胞を PFA 固定し、内在性 ERp44 を免疫染色することで細胞内局在を観察した。また、ZnT5、ZnT6、ZnT7 発現抑制細胞の培養上清を回収し、TCA 沈殿によって濃縮した後、ウェスタンブロットングを行うことで、ERp44 の基質タンパク質である Ero1 の細胞外分泌を解析した。

4. 研究成果

(1) 同定されたタンパク質を解析したところ、既に ERp44 の基質として知られている Ero1 や Prx4 が検出された。このことから、本実験手法が ERp44 基質タンパク質の同定に有効であることを確認した。検出されたタンパク質のうち、分泌タンパク質や膜タンパク質に特に注目すると、細胞外マトリクスを形成する分子が複数同定された。生体において、亜鉛の不足は皮膚疾患を引き起こすことと関連して、亜鉛による ERp44 制御は、細胞外マトリクスの正常な折りたたみと分泌に関与する可能性が示唆された。今後、この点について詳細な解析を継続していきたい。

(2) ゴルジ体には、ZNT ファミリーのうち ZnT5、ZnT6、ZnT7 サブファミリーが局在することが知られており、細胞質からゴルジ体内腔へ亜鉛イオンを輸送することが知られている。ZnT5/6/7 を同時に発現抑制した細胞では、ERp44 がゴルジ体に異常に蓄積する様子が観察された(図1)。さらに、亜鉛イオンと結合するヒスチジンをアラニン置換した ERp44(3HA)変異体も、ゴルジ体に蓄積する様子が観察された。これらの結果から、ERp44 はゴルジ体において ZnT5/6/7 を介して取り込まれた亜鉛イオンを受け取って、基質タンパク質を捕らえたのち、小胞体へ逆行輸送すると考えられた。

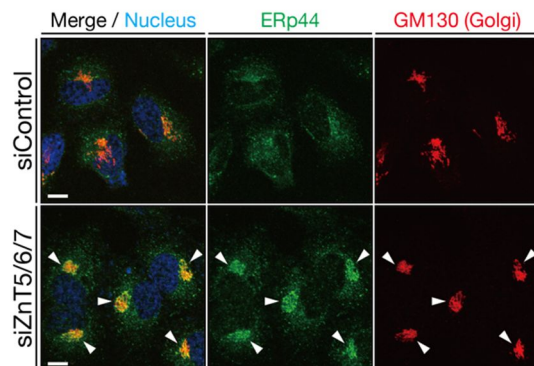


図1 (上段) 定常状態で ERp44 は小胞体全体と一部ゴルジ体に局在する。(下段) ゴルジ体に局在する亜鉛輸送体の発現抑制細胞では、ERp44 がゴルジ体に集積する(矢頭)。

この考えに合致して、ZnT5/6/7 発現抑制細胞では、ERp44 基質タンパク質である Ero1 の細胞外分泌量が増加しており、ERp44 の機能が阻害されていることが明らかとなった。これらの表現型は、亜鉛特異的キレーターである TPEN を処理した際と類似していた。さらに、TPEN 処理した細胞では、ERp44 と Ero1 の結合が減弱し、亜鉛イオノフォアである Zinc pyrithione 刺激によって、その結合が上昇した。これらのことから、細胞内においても亜鉛によって ERp44 機能が制御されることが明らかとなった。

以上のことから、亜鉛が ERp44 を介して小胞体-ゴルジ体のタンパク質品質管理機構に関与するという新しいコンセプトを提唱するに至った。本研究成果は、2019 年に *Nature Communications* 誌に報告した。

分泌経路におけるタンパク質品質管理機構の破綻は、神経変性疾患などの重大な疾病の原因となることが明らかとなっている。本研究成果は、亜鉛イオンがタンパク質品質管理機構の新たな制御因子となることを、分子から細胞レベルで解明した点で意義が大きい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) S. Watanabe*, Y. Amagai*, S. Sannino*, T. Tempio, T. Anelli, M. Harayama, S. Masui, I. Sorrentino, M. Yamada, R. Sitia# & K. Inaba# (*; equally contributed, #; co-corresponding authors), "Zinc regulates ERp44-dependent protein quality control in the early secretory pathway", *Nature Communications*, 査読あり、10 巻 603、2019
DOI: 10.1038/s41467-019-08429-1
- 2) Maegawa KI, Watanabe S*, Noi K*, Okumura M*, Amagai Y*, Inoue M, Ushioda R, Nagata K, Ogura T, Inaba K (*; equally contributed), "The Highly Dynamic Nature of ERdj5 Is Key to Efficient Elimination of Aberrant Protein Oligomers through ER-Associated Degradation", *Structure*, 査読あり、25 巻 846-857、2017
DOI: 10.1016/j.str.2017.04.001
- 3) Kenta Arai*, Toshiki Takei*, Masaki Okumura*, Satoshi Watanabe*, Yuta Amagai, Yuya Asahina, Luis Moroder, Hironobu Hojo#, Kenji Inaba#, Michio Iwaoka# (*; equally contributed, #; co-corresponding authors), "Preparation of Selenoinsulin as a Long-Lasting Insulin Analogue", *Angewandte Chemie International Edition*, 査読あり、56 巻 5522、2017
DOI: 10.1002/anie.201701654

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 山田桃、天貝佑太、渡部聡、Roberto Sitia、稲葉謙次、「ERp44 の機能制御に関わる亜鉛トランスポーターの同定」、第 4 1 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月、横浜
- 2) 天貝佑太、稲葉謙次、「初期分泌経路内のタンパク質品質管理における ERp44 の新たな生理的機能の探索」、第 4 1 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月、横浜
- 3) Yuta Amagai, Satoshi Watanabe, Sara Sannino, Momo Yamada, Tiziana Tempio, Manami Harayama, Roberto Sitia and Kenji Inaba, 「Zinc ions control the function of ERp44 for protein quality control in the early secretory pathway」、International Meeting "Proteins: from the cradle to the grave"、2018 年 8 月、滋賀
- 4) Yuta Amagai, Satoshi Watanabe, Sara Sannino, Manami Harayama, Shoji Masui, Tiziana Tempio, Momo Yamada, Iliaria Sorrentino, Tiziana Anelli, Roberto Sitia, Kenji Inaba, 「Zn²⁺ controls the function of ERp44 in the early secretory pathway」、CLS, Tokyo Tech. International Forum、2018 年 3 月、東京
- 5) 天貝佑太、渡部聡、原山麻奈美、山田桃、Sara Sannino, Roberto Sitia, 稲葉謙次、「亜鉛イオンは ERp44 によるタンパク質品質管理機構を制御する」、2017 年度生命科学系学会合同

年次大会、2017年12月、神戸

- 6) 天貝佑太, 渡部 聡, 原山麻奈美, 増井翔史, SaraSannino, Roberto Sitia, 稲葉謙次、「亜鉛イオンとの結合を介した ERp44 による分泌経路中のタンパク質品質管理機構」、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017年6月、仙台

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。