

血液凝固因子の正常な分泌に必須なカーゴ受容体のクライオ電子顕微鏡構造解析

渡部 聡, 稲葉謙次

九州大学 生体防御医学研究所

Cryo-EM Structure of a Cargo Receptor for Normal Secretion of Blood Coagulation Factors

Satoshi WATANABE, Kenji INABA

Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

Abstract

血液凝固因子などの分泌タンパク質の細胞内輸送を担うカーゴ受容体 ERGIC-53 について, サイズ排除クロマトグラフィー - 多角度光散乱法 (SEC-MALS), サイズ排除クロマトグラフィー - 小角 X 線散乱法 (SEC-SAXS), およびクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析に取り組んだ。その結果, 全長 ERGIC-53 は四葉のクローバーに類似した四量体構造を取ることが明らかになり, ストック領域の動的な構造変化の可視化に成功した。また補助因子 MCFD2 の亜鉛結合部位が明らかになり, 亜鉛を利用したカーゴ輸送制御機構が示唆された。

1. はじめに

血液凝固因子などの分泌タンパク質は, 細胞内小器官である小胞体において合成後, 積荷 (カーゴ) として特異的なカーゴ受容体によって認識され, 効率よく細胞外へと分泌される。カーゴ受容体の一つである ERGIC-53 は, 補助因子 MCFD2 と協同して機能しており, 血液凝固第 V 因子, 第 VIII 因子や, アンチトリプシンなどの分泌糖タンパク質を小胞体で捕獲し下流のゴルジ体に輸送する役割を担っている。ERGIC-53 や MCFD2 の遺伝性変異は, 先天性血管疾患の原因であることが知られている。ERGIC-53 は, 細胞表層膜タンパク質やコロナウイルスなど RNA ウィル

スの表面糖タンパク質の細胞内輸送にも関与していることが報告されている (Fig. 1A) [1]。

ERGIC-53 は, 一回膜貫通タンパク質であり, 積荷の糖鎖を認識するドメイン (Carbohydrate recognition domain, CRD), ストックドメイン, 膜貫通ヘリックスで構成される (Fig. 1B)。C 末端の KKFF モチーフは, 小胞体とゴルジ体間のサイクルに必要と考えられている。これまでに ERGIC-53 の CRD については, 立体構造が結晶構造解析によって決定され, 糖鎖の認識機構の一端が明らかにされてきた。しかし, 全長 ERGIC-53 の立体構造は未解明であり, どのように様々な積荷タンパク質を ERGIC-53 が認識し輸送するかについては, ほとんど未解明であった。

2. 全長 ERGIC-53 の SEC-MALS/SAXS 解析

我々は, 全長 ERGIC-53 の分子機構を明らかにするため, その構造機能解析に取り組んだ。ヒト由来全長 ERGIC-53 について, HEK293T 培養細胞を用いた高発現系を構築し, 試行錯誤の上, 高純度試料の精製方法を確立した。これまで ERGIC-53 は六量体として機能していると長年考えられてきた [2]。しかし, 従来の六量体モデルは Native-PAGE での泳動度などに基づいた間接的な推定であり, 我々は ERGIC-53 の会合状態を再検証する必要があると考えた。そこで溶液中の絶対分子量を測定することができる SEC-MALS 法を用いて ERGIC-53 の絶対分子量を解析した [3]。

通常の SEC-MALS 解析では, 対象タンパク質分子について, ゲル濾過クロマトグラフィーで分離された画分の溶液中の分子量が決定される。そのため膜タンパク質の場合は, 膜タンパク質と付着している界面活性剤分子との総分子量が決定される。そこで本研究では, 膜タンパク質および界面活性剤それぞれの試料の濃度変化 (dc) に対する屈

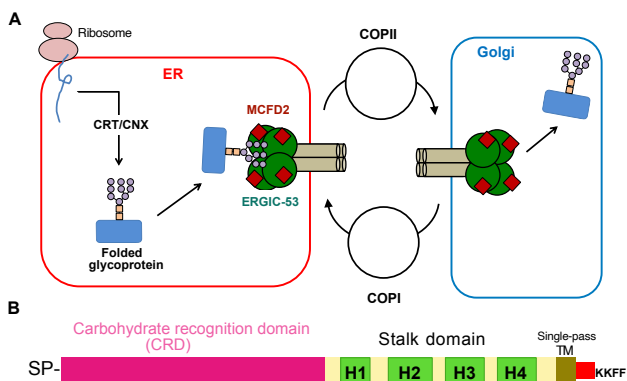


Figure 1 A. Cargo transport by ERGIC-53. In the early secretory pathway, newly synthesized secretory glycoproteins and membrane proteins are transported by ERGIC-53 complexed with MCFD2 from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. Target cargo proteins include blood coagulation factor V (FV) and factor VIII (FVIII), α 1-antitrypsin, IgM, ERp44, several membrane proteins such as GABA_ARs, and envelope glycoprotein from arenavirus coronavirus. B. Domain architecture of ERGIC-53.

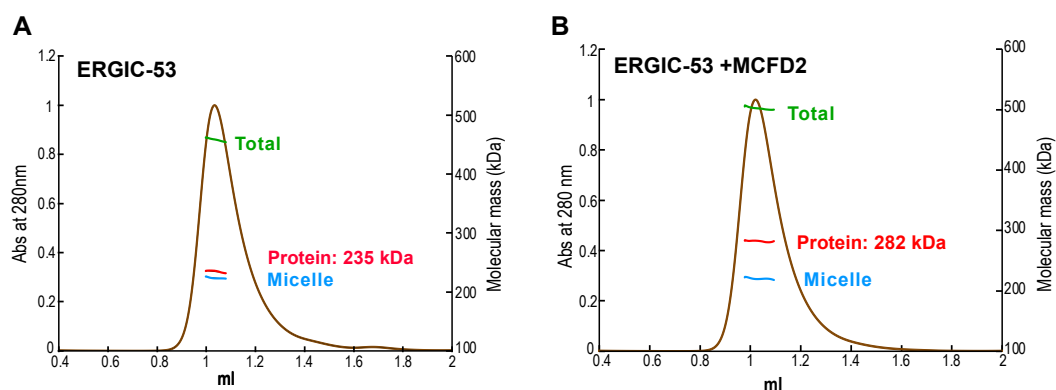


Figure 2 A,B. The SEC-MALS profiles of ERGIC-53 (A) and its complex with MCFD2 (B). Masses of the peak fractions determined by SEC-MALS analysis are indicated by the red lines for protein mass, cyan for micelle mass, and green for total mass.

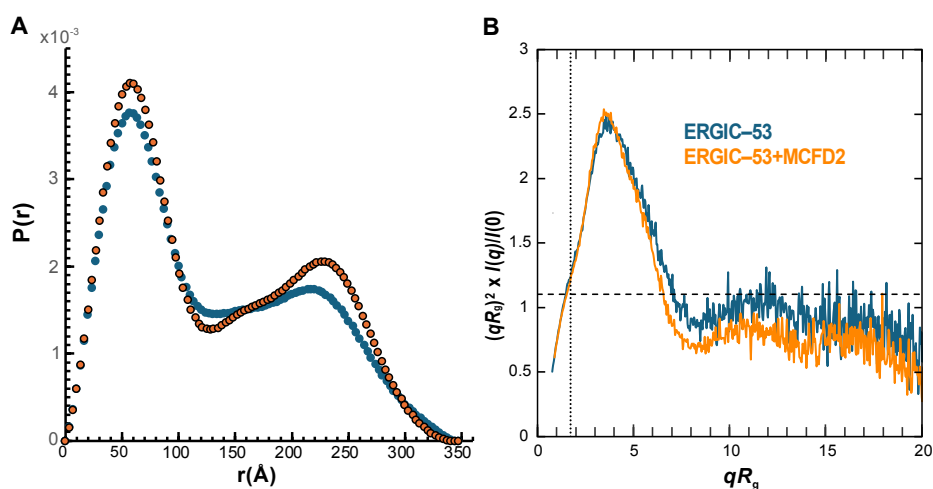


Figure 3 A. Pair distance distribution functions $P(r)$ of ERGIC-53 (blue) and its complex with MCFD2 (orange) determined from the SAXS profiles. B. The dimensionless Kratky plots of ERGIC-53 (blue) and the complex (orange) determined from the SAXS profiles. The dotted and dashed lines represent the positions of $\sqrt{3}$ and $3/e$, respectively, and the peak appears at this cross point for a typical globular protein

折率変化 (dn) の割合である dn/dc 値に基づき、吸光度変化と屈折率変化の両方を解析に用いた conjugate 解析によって、膜タンパク質と界面活性剤の分子量を個別に求めた。解析の結果、ERGIC-53 単独の分子量が 235 kDa と推定され、ERGIC-53 は六量体 (理論値: 331 kDa) ではなく四量体 (理論値 221 kDa) で存在していることが示された (Fig. 2A)。一方、ERGIC-53 と MCFD2 との複合体は 282 kDa と推定され、ERGIC-53 四量体に対して MCFD2 が 1 分子ずつ結合して複合体を形成している (理論値: 277 kDa) ことも分かった (Fig. 2B)。

さらに全長 ERGIC-53 の溶液構造情報を得るために、KEK-PF のビームライン BL-15A2 を利用して SEC-SAXS 解析に取り組んだ (Fig. 3) [3]。タンパク質分子内の二点間距離分布を表す $P(r)$ 関数では、二つの離れたピークが観察され、ERGIC-53 は分子長が 340 Å と非常に長く、ダンベル型の構造をとっていることが示唆された (Fig. 3A)。またタンパク質のフォールディング状態を評価する dKratky プロットにおいて、MCFD2 の存在下では高い qR_g 領域においてピーク値が低く、MCFD2 との複合体形成に

より ERGIC-53 の柔軟な動きが抑制されることが示唆された (Fig. 3B)。

2. ERGIC-53 のクライオ電子顕微鏡構造解析

2.1 ヘッド領域の高分解能構造

次に、全長 ERGIC-53 の立体構造をより詳細に明らかにするため、ERGIC-53 と MCFD2 との複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析に取り組んだ [3]。グリッドのスクリーニングおよびデータ収集では、東京大学大学院医学系研究科に設置されている Titan Krios (Thermo Fisher 社製) と東北大学未来型医療創成センターに設置されている CRYO ARM 300 II (JEOL 社製) を利用した。SEC-SAXS の結果から予想されたように、撮影した電子顕微鏡画像では、全長 ERGIC-53 の長く伸びたダンベル状の粒子が観察された。このユニークな形ゆえに、汎用的な自動粒子拾い上げプログラムでは、全長 ERGIC-53 粒子を認識することはできなかった。代わりに、ダンベル両端の重りにあたる球状部分を独立な粒子として拾い上げることによって、各領域の構造解析に取り組む、最終的にヘッド領域構造を 2.53 Å

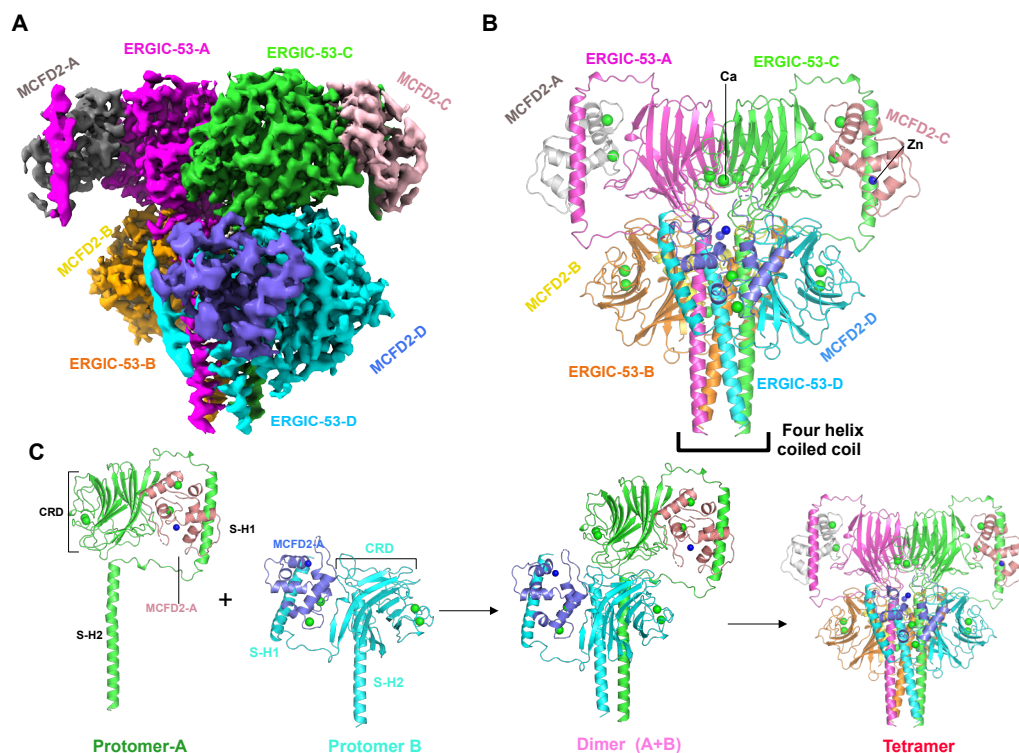


Figure 4 A, B Cryo-EM map (A) and structure (B) of the head region of the ERGIC-53-MCFD2 complex at 2.53Å resolution. Four ERGIC-53 protomers and four MCFD2 molecules are shown in different colors. Green and blue spheres represent calcium and zinc ions, respectively. C. Details of the tetrameric head assembly. Protomer-A with an upper-CRD configuration and protomer-B with a lower-CRD configuration form a dimer with vertically assembled CRDs, and then the two dimers are associated to form the tetramer with the four-helix coiled coil.

分解能で決定した (Fig. 4A)。ヘッド領域は、CRD、ストークヘリックス H1, H2 で構成されており、長いストークヘリックス H2 が、中央で 4 本集まって 4 ヘリックス・コイルドコイル構造を形成することで、ERGIC-53 が四量体を形成することが分かった (Fig. 4B)。補助因子 MCFD2 は、ERGIC-53 の各 CRD およびストークヘリックス間のループで形成された窪みに格納されており、ヘリックス H1 との相互作用が見られた (Fig. 4C)。興味深いことに、四量体中の 4 つの CRD は、並行に配置しているのではなく、2 つの CRD が上下に重なった二量体がさらに合わさって安定な 4 量体を形成することが分かった。

2.2 全長 ERGIC-53 の柔軟な構造変化の可視化

次に全長での構造解析に取り組んだ。まずヘッド領域の粒子座標を利用して、一部 (~100 枚) の電顕画像から全長 ERGIC-53 粒子を手動で拾い上げた。これらの粒子を、畳み込みニューラルネットワークを利用した自動粒子拾い上げプログラム (Topaz) [4] に学習させることで、全長粒子の自動粒子拾い上げに成功した。切り出した粒子群の二次元クラス平均像では、全体的に真っ直ぐなコンフォメーションをとったものや、大きく曲がった粒子が見られ、ストーク領域の柔軟性が示唆された (Fig. 5A)。さらに真っ直ぐなコンフォメーションの粒子を利用して、全長 ERGIC-53-MCFD2 複合体の 3 次元電顕マップを 6.8Å 分解能で決定した (Fig. 5B)。

全体構造は、四葉のクローバーに類似した構造を取っており、4 つの CRD を中心として構成されたヘッド領域、3 組の 4 ヘリックス・コイルドコイルで構成された細長いストーク領域、および膜貫通ヘリックス領域で構成されている (Fig. 5B)。SAXS の結果から予想されたように、全長の分子長は約 340Å であり、現在報告されている膜タンパク質の立体構造としては、もっとも“背が高い”構造であった。さらに三次元変動解析によって、決定した電顕マップの動的な動きを調べた結果、ストーク領域が、コイルドコイル間のループ領域を曲折点として柔軟に動いている様子を可視化することができた (Fig. 5C)。実際、測定した全長 ERGIC-53 粒子の二次元平均像では、ストーク領域がさらに 90 度近く曲がった像も観察されており (Fig. 5A)、ストーク領域が大きく動いていることが示された。以上の結果から、ストーク領域やヘッド領域の可動性を利用し、カーゴ結合部位であるヘッド領域の高さを調節することで、ターゲットの積荷分子を認識していることが示唆された。

2.3 亜鉛イオンによるカーゴ結合解離機構

過去に報告された MCFD2 の結晶構造では、N 末端領域の電子密度が確認されず、その領域の構造は未決定であった。一方、今回のクライオ電顕構造では、この領域の密度マップが観察され、αヘリックスのモデルを構築することができた (Fig. 6A)。興味深いことに、MCFD2 の N 末端

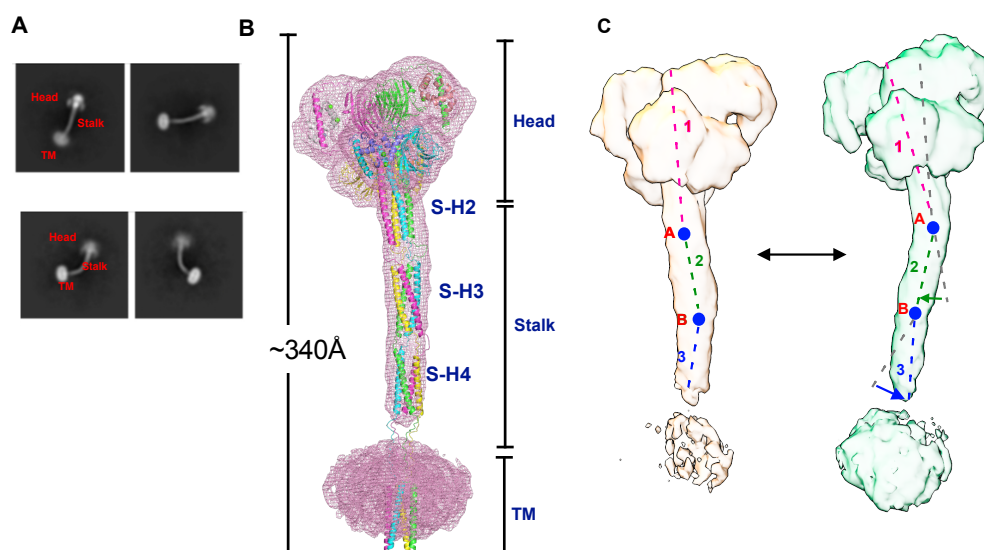


Figure 5 **A:** Representative 2D class-average images of the full-length ERGIC-53 particles. Some particles assume straight conformations (upper panels), while others show largely bent conformations (lower panels). **B:** Cryo-EM map and structure of the full-length ERGIC-53- MCFD2 complex with a straight conformation. **C:** 3D Variability Analysis (3DVA) of full-length ERGIC-53, revealing continuous conformational changes from the first (light orange) to the last frame (green). Blue circles represent hinges between the segments 1, 2, and 3 indicated by broken lines.

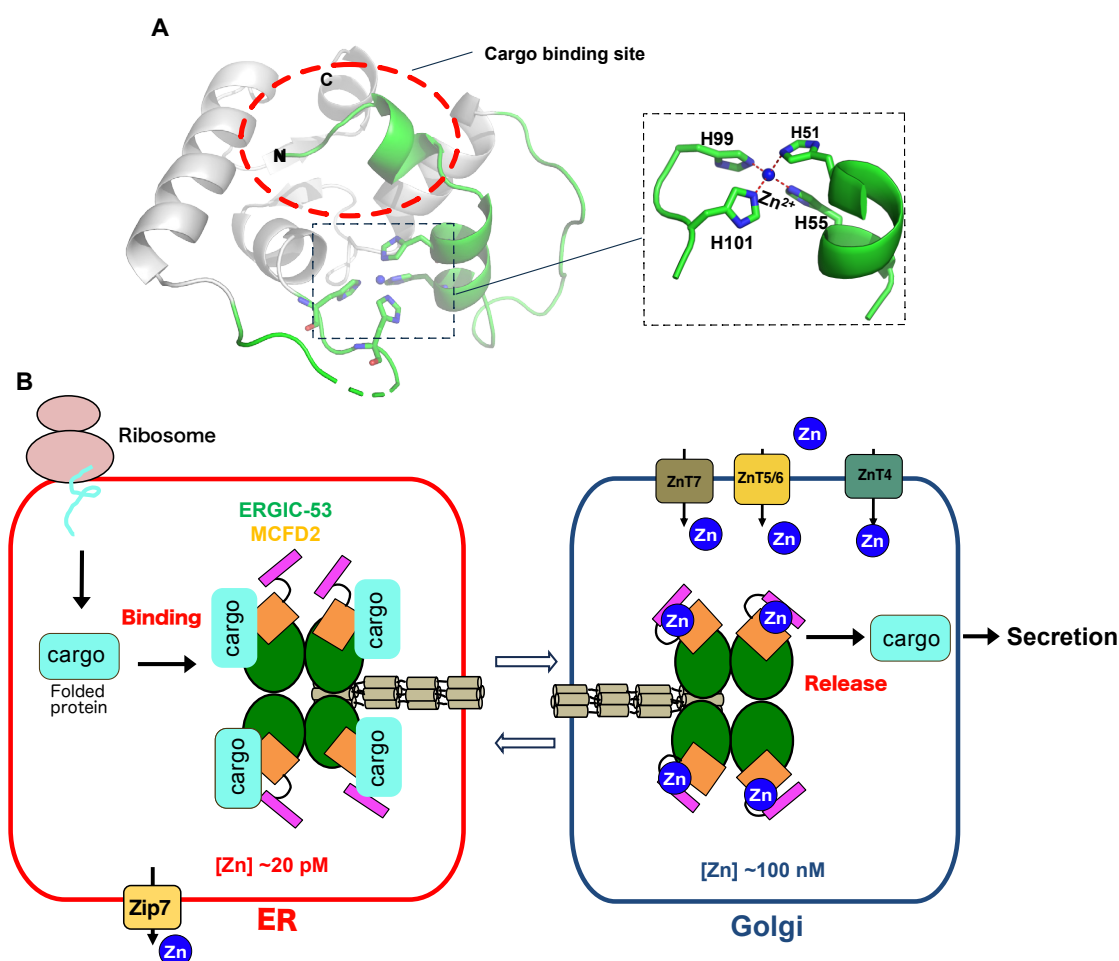


Figure 6 **A:** The updated structure of MCFD2 complexed with ERGIC-53 based on the present cryo-EM map. The newly built N-terminal segment and loops are colored in green. The proposed cargo binding site in MCFD2 is indicated by a red broken circle. The inset shows a close-up view of a zinc binding site formed by the four His residues of MCFD2. **B:** A working model of zinc-dependent cargo binding and release by ERGIC-53 and MCFD2 in the secretory pathway.

領域において、4つの保存されたヒスチジン残基が集まり、亜鉛結合部位を形成していることが明らかになった。興味深いことに、このN末端領域の α ヘリックスはMCDF2の積荷結合部位を覆っており、亜鉛結合型のMCDF2では積荷の結合が妨げられている、別の言い方をすれば亜鉛結合によって積荷の解離が促進されることが示唆された。

以上の結果から、亜鉛を利用したカーゴの結合・解離機構を提唱した (Fig. 6B)。小胞体では、遊離亜鉛濃度が数pMレベルに保たれており、ERGIC-53は、小胞体において積荷を捕獲する。一方、最近我々は、ゴルジ体では亜鉛トランスポーターによって亜鉛が取り込まれ、遊離亜鉛濃度が高く保たれていることを明らかにしている [5]。そのためゴルジ体において、亜鉛がMCDF2に結合することで、ERGIC-53から積荷の解離が促進されることが示唆され、分泌経路における亜鉛の新たな生理機能を提唱するに至った。

3. まとめ

本研究において、ヒト由来ERGIC-53の柔軟な全長構造を高分解能で初めて明らかにし、分泌タンパク質の輸送機構の一端が明らかになった。現在、血液凝固因子などの対象カーゴとERGIC-53との複合体のクライオ電顕構造解析に取り組んでおり、構造解析によってカーゴ認識の分子基盤を明らかにしたいと考えている。またカーゴ輸送過程のリアルタイム観察に取り組むことで、積荷認識から輸送までの詳細な分子機構の解明を目指したい。一方、本研究によって、亜鉛イオンの新たな生理機能が明らかになり、亜鉛の恒常性維持の破綻と分泌異常との関係性や、様々な疾病との因果関係の解明がさらに進むことが期待される。

謝辞

本研究は、筆者らが東北大学在籍時に実施した研究であり、SEC-MALSおよびSEC-SAXS実験 (BL-15A2, 課題番号2020RP-11) では、高エネルギー加速器研究機構の米澤健人博士 (現: 奈良先端科学技術大学院大学)、清水伸隆教授 (現: 理化学研究所)、クライオ電子顕微鏡実験では東京大学の木瀬孔明博士、濡木理教授にご協力いただき達成できた成果である。改めて深く感謝申し上げます。また本研究は、科研費 (JP18K06075, JP23K18193, JP21H0525), AMED-CREST (JP21gm1410006), AMED-BINDS (JP21am0101115, JP21am0101071, JP23ama121012, JP21am0101095, JP23ama121038), 持田記念医学薬学振興財団、内藤記念科学奨励金の支援のもと行われた。

引用文献

- [1] Y. Zhang, V. Srivastava and B. Zhang, *Biochem. Soc. Trans.* **51**, 971 (2023).
- [2] YC. Zhang, Y. Zhou, CZ. Yang and DS. Xiong, *Histol Histopathol.* **24(9)**, 1193 (2009).
- [3] S. Watanabe, Y. Kise, K. Yonezawa, M. Inoue, N. Shimizu, O. Nureki and K. Inaba, *Nat Commun.* **15(1)**, 2404 (2024).
- [4] Bepler, T. *et al.* *Nat. Methods* **16**, 1153 (2019).

- [5] Y. Amagai, M. Yamada, T. Kowada, T. Watanabe, Y. Du, R. Liu, S. Naramoto, S. Watanabe, J. Kyojuka, T. Anelli, T. Tempio, R. Sitia, S. Mizukami and K. Inaba, *Nat Commun.* **14(1)**, 2683 (2023).

(原稿受付日: 2024年12月13日)

著者紹介

渡部 聡 Satoshi WATANABE



九州大学生体防御医学研究所 准教授

〒812-8582 福岡県福岡市馬出

e-mail: satoshi.watanabe.979@m.kyushu-u.ac.jp

略歴: 2006年京都大学大学院理学研究科博士課程研究指導認定退学。博士 (理学)。

2007年京都大学博士研究員, 2013年東北大学多元物質科学研究所助教を経て2024年より現職。

最近の研究: カーゴ輸送機構とタンパク質品質管理機構の構造生物学的研究。

稲葉謙次 Kenji INABA



九州大学生体防御医学研究所 教授

〒812-8582 福岡県福岡市馬出

e-mail: kenji.inaba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

略歴: 1998年京都大学大学院工学研究科博士課程修了。博士 (工学)。1998年 Medical Research Council 博士研究員, 2000

年京都大学ウイルス研究所博士研究員, 2002年さきがけ21研究員, 2006年九州大学生体防御医学研究所 特任准教授, 2013年東北大学多元物質科学研究所教授を経て2024年より現職。

最近の研究: 細胞内の化学環境恒常性維持とタンパク質恒常性維持の分子構造基盤。