

タンパク質の新機能性開発に関する多面的基盤研究



京都大学大学院農学研究科 裏出 令子

1. はじめに

真核細胞で合成される全タンパク質の約3分の1を占める膜タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体で合成される。また、人類の食糧タンパク質源として最も重要な主要穀類の種子貯蔵タンパク質も小胞体で合成され、蓄積される。これらのタンパク質が細胞内で輸送され、分泌、局在化あるいは蓄積されて生理的役割を果たすためには小胞体での立体構造形成（フォールディング）が必須であり、フォールディングに失敗したタンパク質は細胞に害作用をもつためタンパク質品質管理機構により分解される。

私は、植物細胞および動物細胞の小胞体でのタンパク質のフォールディング機構のさらなる理解とそれに基づいたタンパク質の高度利用を見据えて基盤的研究を行うとともに、食品タンパク質の凝集体構造と機能との関係を追求してきた。本講演では、それらの概略を紹介させていただきたい。

2. 動物細胞小胞体の酸化的フォールディング酵素ER-60の多面的機能

非常に還元的な環境でフォールディングする細胞質のタンパク質とは異なり、真核細胞の小胞体で合成される新生タンパク質は酸化的环境でその90%以上が分子内ジスルフィド結合の形成を伴ってフォールディング（酸化的フォールディング）する。そのため、小胞体には高度に発達した酸化的フォールディングシステムが備わっている。

1992年、私は小胞体を中心となって営まれるリン脂質代謝を研究していたが、その過程でprotein disulfide isomerase (PDI) に次ぐ量で存在するPDIファミリーER-60/ERp57（以下ER-60）を偶然見いだした。当時は、小胞体における酸化的フォールディングを担う酵素としてPDIが既に知られていたが、その反応機構や他のタンパク質との機能的な相互作用などは不明であり、PDI以外のファミリータンパク質はほとんど知られていなかった。私はER-60の発見を契機に小胞体タンパク質の研究を開始し、ER-60が小胞体で複数の小胞体分子シャペロン（BiP, calnexin, calreticulin, RAP）およびPDIと複合体を形成し、糖タンパク質の酸化的フォールディングに重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた（図1）。さらに、血清中性脂肪値の決定因子であるVLDL構成タンパク質apolipoprotein B100の肝細胞内での調節的分解にER-60が作用していることを見いだした。現在ではゲノム塩基配列情報からヒトにはチオレドキシシンモチーフを有する約20種類のPDIファミリーが存在することが明らかとなっており、これらのPDIファミリーが織りなす酸化的フォールディングの分子機構の詳細や役割分担を明らかにする研究が盛んに行われている。その中でもER-60は哺乳動物細胞にとって重要且つ普遍的なPDIファミリーと認知され、酸化的フォールディングのみならず抗原提示やアルツハイマー病などの神経変性疾患の発症・進

展にも関わるタンパク質として注目されている。

3. 植物小胞体における酸化的フォールディングの分子機構

穀類の種子は発芽の際に必要なとされるエネルギー源とアミノ酸を賄うために種子貯蔵タンパク質を蓄積するが、とくにダイズ種子は際だって高いタンパク質蓄積能を有する。そのため、医薬用タンパク質などの有用タンパク質の生産への利用が期待されている。私は、ダイズ種子を有用タンパク質生産に利用するためには小胞体における酸化的フォールディングの分子機構の解明が最重要課題であると考えて、研究に着手した。

シロイヌナズナのゲノム塩基配列情報から、植物には8種類のPDIファミリーが存在すると予想されていたが、これらのうち酸化的フォールディング機能を有すると推定された7種類のダイズオーソログを同定し、生化学的な解析により少なくとも5種類が主要なダイズ種子貯蔵タンパク質（グリシニンおよび β -コングリシニン）の構造形成に関わっていることを明らかにした（図2）。

PDIファミリーは活性中心のジスルフィド結合と基質タンパク質のチオール基との間で交換反応を行うことで酸化的フォー

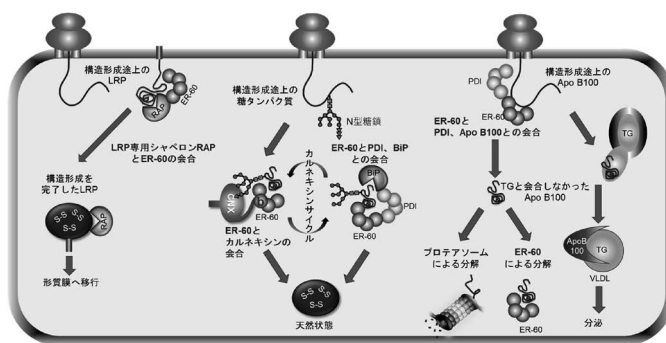


図1 動物細胞小胞体におけるER-60の多機能性

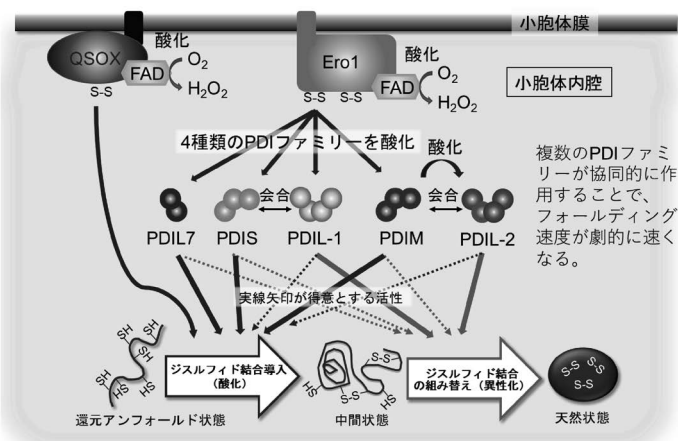


図2 植物小胞体における酸化的フォールディングの分子機構

ルディング反応を実行する酵素であるが、酸化当量を自ら生み出すことはできない。この役目を担うダイズの小胞体膜酵素ER oxidoreductin 1 (Ero1) を同定し、植物で初めてダイズ Ero1 が補酵素FAD を介して酸素分子から酸化力を得て4種類のPDIファミリーの活性中心を酸化することで、酸化的フォールディング反応に酸化当量を供給することを明らかにした。ダイズ Ero1 に酸化されるPDIファミリーのうち3種類は活性中心を2個有しており、各PDIファミリーの活性中心に部位特異的変異を導入する方法でダイズ Ero1 の酸化反応には活性中心に対して特異性があることも明らかにした。また、常態のダイズ Ero1 は活性中心システイン残基が分子内の他の調節性システイン残基とジスルフィド結合を形成することで不活性化されているが、基質である還元型PDIファミリーによって不活性化の原因となっているジスルフィド結合が還元されることで必要に応じて活性化されることを明らかにしている。

従来、複数種類のPDIファミリーが存在する意義は、基質との親和性の違いによってさまざまなタンパク質の酸化的フォールディングに対応することであると考えられてきた。私は、植物のPDIファミリーにはジスルフィド結合の導入(酸化)が得意なグループと組み替え(異性化)が得意なグループがあり、これらが小胞体内で複数の組み合わせで会合していることを見いだした。さらに、会合したPDIファミリー、たとえば酸化が得意なGmPDIMと異性化が得意なGmPDIL-2が分子間および分子内の活性中心間で電子リレーを行うことで協同的かつ効率的に酸化的フォールディングを成し遂げていることを明らかにした。これにより複数種類のPDIが存在する意義は、多様な基質への対応に加え、酸化的フォールディング速度を速めることにあるという新規な説を提案した。

また、PDIファミリーと同様にチオレドキシシンモチーフを有し、且つEro1と同様に酸素から酸化力を得てPDIファミリーを介さずに基質タンパク質に直接ジスルフィド結合を導入する膜タンパク質Quiescin sulphydryl oxidase (QSOX) を植物で初めて同定した。QSOXはアンフォールドしたタンパク質に特異的にジスルフィド結合を導入するが、ジスルフィド結合を組み替えてフォールディングする能力を欠いている。しかし、異性化が得意なPDIファミリーとの共存下でジスルフィド結合導入をアシストすることで、酸化的フォールディングに寄与していることを明らかにした。

小胞体でフォールディング能力を超えた大量のタンパク質が合成されたり、立体構造形成に障害のある変異タンパク質が合成されると小胞体内にアンフォールドしたタンパク質が蓄積する。これを小胞体ストレスとよび、これにより小胞体のホメオスタシスを維持するためのunfolded protein response (UPR) が惹起される。私は、植物におけるUPR遺伝子のリストを完成させ、5種類のPDIファミリー、Ero1およびQSOXの発現もUPRにより制御されていることを明らかにした。

以上のように、植物小胞体における酸化的フォールディング反応の全容を明らかにするとともに、真核細胞において小胞体に複数のPDIファミリーが存在する生理的意義について新しい概念を提唱した。

4. 種子貯蔵タンパク質の構造と食品機能特性

食品タンパク質は、食品加工のほとんどの場面で分子間相互作用のもとで形成された凝集体として食品機能特性を発揮する。

たとえば、人類が摂取している食料エネルギーの約20%を賄うコムギ種子の胚乳は小麦粉生地としてさまざまな食品に加工され消費されているが、その優れた物性に主に寄与しているのはタンパク質凝集体グルテンである。グルテンは270年前にボローニャ大学のJ. Beccariによって最初に発見されたタンパク質で、グルテンの主要成分の1つであるグリアジンは200年前にG. Taddeiによりアルコール水に溶解するタンパク質として同定された。以来、グリアジンは水には溶解しないと考えられてきたが、私は小麦粉生地から天然構造を維持したまま純水で抽出する方法を開発し純水に高濃度で溶解することを証明した。これにより、水中で変性していないグリアジンの解析が可能となった。そして、X線や中性子を用いた量子ビーム小角散乱解析を食品タンパク質凝集体の実験手法として取り入れ、グリアジンが桿状の比較的大きく広がった分子であり、濃度に依存して分子集合することを明らかにした。また、グルテンのような濃厚な状態では十数ナノメートルの基本凝集体を形成し、これらが集合してメゾスケールの二次凝集体を形成すること、凝集体間の距離は塩などによって大きく変化し、この距離と物性との間に相関関係があることを明らかにした。

ジスルフィド結合と小麦粉生地の加工特性との関係の研究では、コムギの5種類のPDIファミリーを同定し、酵素学的性質を解析し、これらが登熟種子の胚乳でグリアジンの生合成時期と連動して発現し完熟後も残存して小麦粉に持ち込まれ、生地作製時のグルテニンの脱重合化反応を抑制することで生地の抗張力に寄与していることを示した。

また、ダイズ子葉細胞内での β -コングリシニンとグリシニンのタンパク質貯蔵液胞への効率的な輸送に重要な役割を果たすジスルフィド結合依存性の新たな分子会合を見だし、工業的なダイズタンパク質の良好な分離に還元剤の添加が必要とされる理由を解明した。

以上のように、動物および植物の小胞体におけるタンパク質の酸化的フォールディングの分子機構、および小胞体で合成される主要な植物性食品タンパク質の構造と食品機能特性との関係に関する研究を一貫して行ってきた。小胞体におけるタンパク質の酸化的フォールディングは真核細胞に共通の基本的な生命現象であり、さまざまな疾病発症にも関わるため創薬の方向性を示す基盤となることが期待される。また、植物性食品タンパク質の品質管理や高度利用に重要な基盤の研究としても位置付けられ、生化学的手法と分子細胞生物学的手法を食品科学研究と組み合わせて展開させた本成果は農芸化学領域の研究の発展に少なからず貢献するものと考えている。

謝 辞 大阪府立大学大学院での学生時代には、故北岡正三郎先生に研究の基礎をご指導いただきました。北岡正三郎先生に心より感謝いたします。京都大学名誉教授 鬼頭誠先生には京都大学食糧科学研究所の文部技官として採用して頂き、その後研究者へと教え導いていただくとともに、研究以外でも数え切れない事柄でお世話になりました。鬼頭誠先生のご指導ご鞭撻なくして今日の私はあり得ません。ここに鬼頭誠先生に深く感謝申し上げます。また、共同研究者である多数の国内外の先生方、院生、企業研究者に助けられて研究を続けることができました。これらの方々に深謝いたします。