



京都大学 奥田 綾

小胞体における酸化的フォールディング酵素の機能・構造相関解析

はじめに

真核細胞の膜タンパク質や分泌タンパク質は小胞体で生合成され、小胞体内腔で折りたたまれて立体構造が形成される(フォールディング)。その大部分は、立体構造を安定化する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、全ての真核生物の小胞体には酸化的フォールディングを担う酵素群Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリーに属するタンパク質が存在し、ヒトでは20種類、高等植物では10種類のPDIファミリータンパク質が存在している。PDIファミリータンパク質による酸化的フォールディングでは、基質タンパク質に一過的なジスルフィド結合を形成する酸化反応の後、正しいジスルフィド結合へ架け替える異性化反応が進行する。本研究では複数のPDIファミリータンパク質による酸化的フォールディングの作用機構の解明を目指した。

1. ダイズ小胞体における新規PDIファミリータンパク質の同定と機能解析

1-1. ダイズPDIファミリーの酵素学的性質

高等植物ダイズが持つPDIファミリータンパク質のうち、未同定であった2種類(GmPDIL7[1], GmPDIL6[2])のcDNAをクローニングするとともに、これらと他のダイズPDIファミリータンパク質に対して、酵素学的性質の解析を進めた。その結果、8種類のダイズPDIファミリータンパク質(図1)のうち、活性中心システインペアを持つものは、酸化活性のみを持つグループ、酸化と異性化の両活性を持つが酸化速度に比較して異性化速度が速いグループと遅いグループに分類できることを見出した[3]。このことから、ダイズPDIファミリータンパク質はその酵素学的性質によって酸化的フォールディングにおいて役割分担を行っていると考えられた。

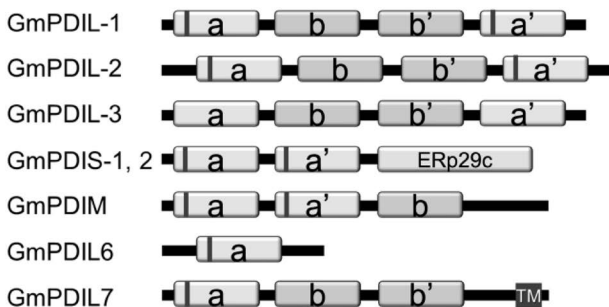


図1. ダイズPDIファミリータンパク質ドメイン中の縦線は活性中心システインペアを、TMは膜貫通領域を示す。

1-2. 酸化酵素ERO1/PDI間のジスルフィド供給システム

酸化的フォールディング反応の一段階目では、酸化酵素ERO1がPDIファミリータンパク質にジスルフィド結合を供給する。ダイズのPDIファミリータンパク質酸化酵素ERO1に対しても酵素反応実験を行うことで、ダイズERO1が様々なPDIファミリータンパク質にジスルフィド結合を供給することを明らかにした[4]。加えて、ERO1は通常は不活性型として存在し、その活性化が還元型PDIファミリータンパク質によるジスルフィド結合の還元によって引き起こされることを見いだした(図2)[3]。更に、ERO1活性化能はPDIファミリータンパク質によって異なり、ERO1とPDIファミリータンパク質の間には合理的で精緻なフィードバック制御システムが存在することも明らかにした。

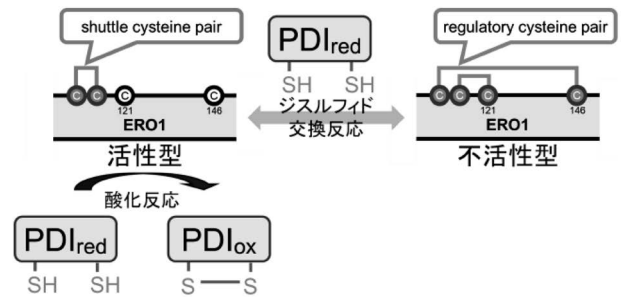


図2. ダイズPDIファミリータンパク質によるダイズERO1の活性化

2. ダイズ小胞体における複数の酵素による協働的なフォールディング機構の解明

小胞体内でのタンパク質酸化的フォールディングにおいて、PDIファミリータンパク質が持つ酵素学的特性にしたがって役割分担を行っているとの仮説を立てた。この仮説の立証のため、共免疫沈降実験により小胞体内でのPDIファミリータンパク質の会合状態を明らかにし、会合状態にあるものの共存下で酸化的フォールディング実験を行った。その結果、基質である種子貯蔵タンパク質と複数種類のPDIファミリータンパク質が一過的に会合していること、また特定のPDIファミリータンパク質同士も会合していることを明らかにした[1-4]。更にこれらの結果は「小胞体では複数のPDIファミリータンパク質が協働的に一つの基質の酸化的フォールディングを行っている」ことを強く示唆していた。そこで、小胞体内で会合しているPDIファミリータンパク質を組み合わせると、酸化的フォールディング速度が相乗的に高まることが明らかとなった(図3A)。即ち、生体内では複数のPDIファミリータンパク質が互いの機能を補完しあって酸化的フォールディングを効率的に行うことが示唆された。一方、生体内の存在量比から逸脱した比率でPDI

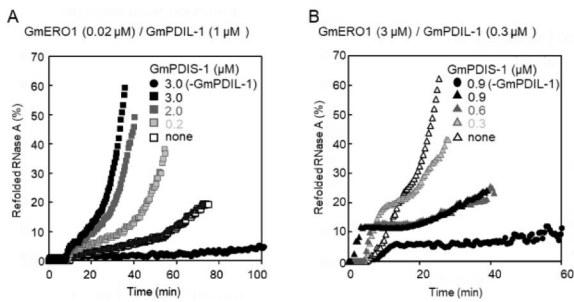


図3. 会合体を形成するダイズPDIファミリータンパク質共存下の酸化フォールディング  
生体内で会合しているPDIL-1とPDIS-1共存下でERO1を作用させると酸化フォールディングが進行し(A)、生体内の存在日から逸脱した濃度比率でERO1を作用させるとフォールディングが阻害された(B)。

ファミリータンパク質とERO1を作用させると酸化フォールディングが阻害される場合ことも明らかとなった(図3B)。このことから、生体内は効率的な酸化フォールディングが行われる酵素濃度と酸化還元バランスに維持していることが示唆された。以上により、PDIファミリータンパク質とERO1の量的バランスが小胞体におけるタンパク質フォールディングを制御するという新たな概念を提唱した。

### 3. ヒト酸化フォールディング酵素ER-60の機能・構造相関解析

小胞体内は酸化フォールディングに適した環境に制御されていることから、PDIファミリータンパク質による酸化フォールディング等の生命機能の理解には生理的条件下、つまり溶液中での構造観察が非常に重要である。そこで溶液中の構造観察が可能な溶液散乱法を用いて、機能に相関した構造の観察を行うこととした。酸化フォールディング反応を担うヒトのPDIファミリータンパク質ER-60に着目し、高純度試料を用いて高精度なX線小角散乱(SAXS)測定を行った。それにより、ER-60は活性中心システインペアの状態が酸化型と還元型で慣性半径( $R_g$ )およびコンフォメーションが異なることを世界で初めて観測した(図4)[5]。

ER-60は活性中心システインペアを持つドメインaとa'、シャペロン会合ドメインbとb'がa-b-b'-a'の順に並んだ構造を持つが、分子動力学計算によりコンフォメーションの相違が主にa'ドメインの配置の違いに由来することを明らかにした[5]。以上の結果は、酸化フォールディングにおける酵素の機能と構造の関係性を強く示唆している。

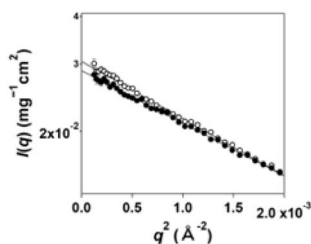


図4. ER-60のSAXSプロファイルから得られたGuinierプロット  
酸化型(○)と還元型(●)の傾きから得られた慣性半径( $R_g$ )は酸化型は $32.1 \pm 0.2 \text{ \AA}$ 、還元型は $30.8 \pm 0.2 \text{ \AA}$ であった。

### おわりに

未同定であったダイズPDIファミリータンパク質を同定し、複数種類のダイズPDIファミリータンパク質について酵素学的解析を行うことで、それらの詳細な酵素学的性質を明らかにするとともに、性質によっていくつかのグループに分類できることを明らかにした。

さらに、酸化酵素ERO1とPDIファミリータンパク質の間の精緻なフィードバックシステムの存在と、会合体を形成するPDIファミリータンパク質間の相乗的なフォールディング反応を見出した。さらには、PDIファミリータンパク質とERO1の量的バランスが小胞体におけるタンパク質フォールディングを制御するという新たな概念を提唱するに至った。

また、高度に精製した試料を用いた高精度のSAXS測定により、ER-60には活性中心が酸化型と還元型のものに確かな構造上の違いが存在することを見出した。現時点のSAXSによる全体構造の観察のみでは機能と構造の相関に十分迫ることはできていない。そこで、今後の展望として、中性子小角散乱(SANS)法を用いた詳細な構造解析を予定している。中性子では軽水素と重水素の散乱長が大きく異なるため、コントラスト同調により特定ドメインに着目した構造解析が可能である。現在、本法に必要なタンパク質重水素化技術とタンパク質ライゲーシオン技術の開発を進めている。さらに、ヒトER-60に留まらず、他のヒトPDIファミリーやダイズPDIファミリー、それらの会合体についても構造と機能の相関解析を視野に入れている。

### (引用文献)

- 1) Okuda A, Matsusaki M, Masuda T, Urade R. Identification and characterization of GmPDIL7, a soybean ER membrane-bound protein disulfide isomerase family protein. *FEBS J.* **284**, 414–428 (2017)
- 2) Okuda A, Matsusaki M, Masuda T, Morishima K, Sato N, Inoue R, Sugiyama M, Urade R. A novel soybean protein disulfide isomerase family protein possesses dithiol oxidation activity: Identification and characterization of GmPDIL6. *J Biochem.* **168**, 393–405 (2020)
- 3) Matsusaki M, Okuda A, Matsuo K, Gekko K, Masuda T, Naruo Y, Hirose A, Kono K, Tsuchi Y, Urade R. Regulation of Plant ER Oxidoreductin 1 (ERO1) Activity for Efficient Oxidative Protein Folding. *J Biol Chem.* **294**, 18820–18835 (2019)
- 4) Matsusaki M, Okuda A, Masuda T, Koishihara K, Mita R, Iwasaki K, Hara K, Naruo Y, Hirose A, Tsuchi Y, Urade R. Cooperative protein folding by two protein thiol disulfide oxidoreductases and ERO1 in soybean. *Plant Physiol.* **170**, 774–789 (2016)
- 5) Okuda A, Shimizu M, Morishima K, Inoue R, Sato N, Urade R, Sugiyama M. Solution structure of multi-domain protein ER-60 studied by aggregation-free SAXS and coarse-grained-MD simulation. *Scientific Reports.* **11**, 5655 (2021)

謝辞 本研究には京都大学農学研究科農学専攻 品質設計開発学分野および京都大学複合原子力科学研究所 粒子線基礎物性研究部門 杉山研究室の皆様から多大なるご支援とご協力をいただきました。ここに深く感謝と御礼を申し上げます。