

## 112. 酸素を起点としたジスルフィド形成ネットワークの解明

奥村 正樹

\*東北大学 多元物質科学研究所 生体分子構造研究分野

Key words : タンパク質品質管理, ジスルフィド結合, 酸化的フォールディング, 酸素, 過酸化水素

### 緒言

ジスルフィド結合を有するタンパク質には、免疫システムの根幹を担う免疫グロブリン・ディフェンシンやインスリン・成長因子などのホルモンが存在し、ジスルフィド結合の形成は生物学や医学的に重要な研究課題である。そこで、本計画課題の意義は、「酸素」、「過酸化水素」と「フォールディング」というタンパク質科学の3つの重要な問題を対象とし、分子レベルで細胞が備えるフォールディング補助システムを明らかにしようとする独創的かつ生物学的に意義深い研究課題である。哺乳動物細胞におけるジスルフィド結合の形成システムは小胞体において非常に複雑な経路を構築していると想定されるが未だその一端を解明したにすぎない。特にここ数年で新規酸化酵素が相次いで発見されている一方で、各酸化経路を構成する因子同士がどのような認識機構のもと特異的なカスケードを形成し、フォールディング途上の基質タンパク質に選択的にはたらきかけるのか、重要な問題として残されている。またこれら酵素群がどのように酸素や過酸化水素を利用し最終的に基質にジスルフィド結合を導入しているのか酸素を起点とした酸化経路はほとんど解明されていない。そこで、本研究では、小胞体内で唯一酸素を消費する Ero1 の新たな活性制御機構を明らかにしたので報告する。また、基質の一例としてインスリンのフォールディングにおけるジスルフィド結合の形成機構に関する新たな知見を報告する。

### 方法、結果および考察

#### 1. 酸素や過酸化水素量を調節する Ero1 の新たな活性制御機構の解明

哺乳動物細胞の小胞体には、酸素を起点としたジスルフィド結合形成ネットワークが存在する。Ero1 は酸素を消費し過酸化水素を産出する。その際酸化された Ero1 は Protein Disulfide Isomerase (PDI) を再酸化し、酸化された PDI は免疫グロブリンやインスリンなど医学的・生物学的に重要な様々な基質に対してジスルフィド結合を導入する。したがって、我々生体におけるジスルフィド結合導入の起点となる Ero1 は、小胞体内の酸化還元環境に応じて4つのステイン間でジスルフィド結合の架橋様式を変えることで自身の活性を厳密に制御する必要がある<sup>1)</sup>。近年我々は、PDI 酸化酵素 Ero1 の Cys208-Cys241 ジスルフィド結合を開裂させた変異体が野生型よりも高い PDI 酸化活性を示すことを明らかにしたが<sup>2)</sup>、その作用機序は不明であった。実際、Cys208 と Cys241 をセリンに置換した Ero1 変異体の PDI 酸化の際、酸素の消費速度が増大し、副生成物として過酸化水素の産出量が増大した (図 1)。

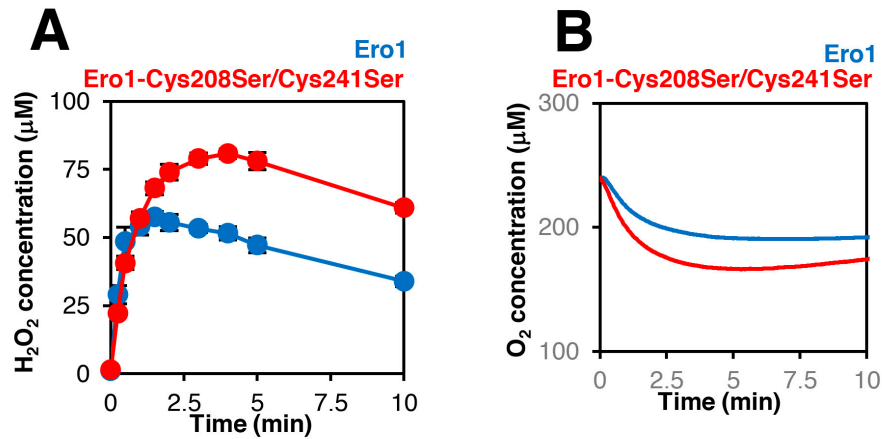


図1. Ero1 が消費する酸素量と産出する過酸化水素量

Ero1 と Ero1-Cys208Ser/Cys241Ser による酸素消費量 (A) と過酸化水素放出量 (B)。Ero1 は酸素を消費して、過酸化水素を副生成物として産出する。Ero1 に比べ、Ero1-Cys208Ser/Cys241Ser の方が酸素をより多く消費し、過酸化水素を多く放出する。つまり、Ero1-Cys208Ser/Cys241Ser は Ero1 よりも高い活性を示す。

これら高活性型変異体を細胞に発現させた場合、野生型と比べ多くの過酸化水素を産出することによって生存率が低下することを見出した。次に、構造情報取得のため、Ero1 と Ero1-Cys208Ser/Cys241Ser の X 線小角散乱測定を SPring8 BL45XU において行った結果、両者のゼロ濃度外挿後の散乱プロファイル、慣性半径、最大分子長はほぼ一致しており、ほぼ同じ溶液構造であることがわかった (図2)。つまり、Ero1 の Cys208-Cys241 ジスルフィド結合は、構造安定でなく機能調節に関与するジスルフィド結合であると結論付けた。

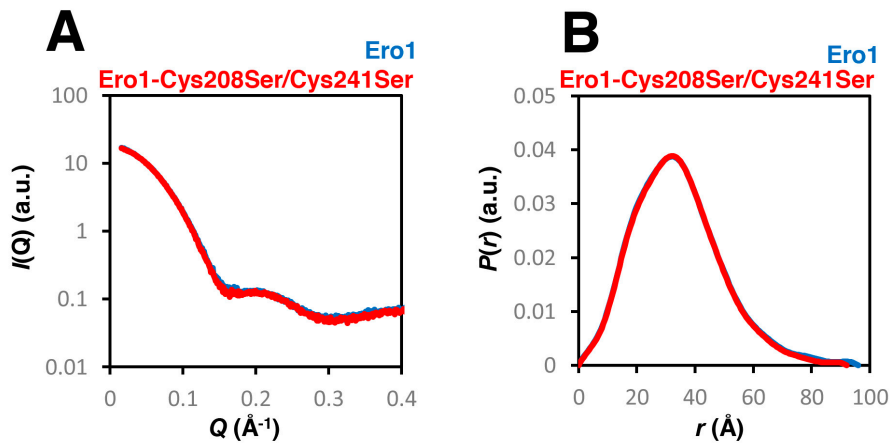


図2. Ero1 と Ero1Cys208Ser/Cys241Ser の X 線小角散乱プロファイル

(A) Ero1 と Ero1Cys208Ser/Cys241Ser のゼロ濃度外挿後の X 線小角散乱プロファイル。X 線小角散乱測定から得られた各濃度系列の散乱プロファイルを濃度ゼロへの外挿を行うことにより、タンパク質干渉効果を排除した散乱プロファイルを示す。(B) (A) より求めた距離分布関数  $P(r)$ 。散乱プロファイルと  $P(r)$  関数はほぼ一致しており、この結果は溶液中でほぼ同じ構造をとることを意味する。

さらに詳細な構造情報を得るために、X線小角散乱データと結晶構造を用いて、Ensemble Optimization Method (EOM) 解析を行ったところ、Ero1 が有する二つのループ領域は非常にフレキシブルであることがわかった。生化学的データと合わせ、このループ領域のフレキシビリティは、Ero1 が特異的に酸化する PDI との相互作用に重要であることを明らかにした。したがって、小胞体内の酸素、過酸化水素量を調節し、インスリンなどの多くの基質にジスルフィド結合を導入する Ero1 の新たな活性制御機構を提唱し、Redox Biology 誌と J. Biol Chem 誌に採択された<sup>3,4)</sup>。

## 2. インスリンにおけるジスルフィド結合形成経路とインスリン分解酵素によるインスリン誘導体の耐性

インスリンは二本のポリペプチド鎖、A鎖およびB鎖が、2本のジスルフィド結合によって安定化されている。しかしながら、インスリンのジスルフィド結合の形成機構は未だ不明である。そこで、我々は硫黄原子よりもさらに反応性に富んだセレン原子に着目し、選択的に鎖間でジセレニド結合を形成させることで、鎖間の会合反応を効率的に行えるのではないかと仮説を立てた。さらに、ジセレニド結合はジスルフィド結合よりも安定しており、インスリン分子に対して立体構造の硬さと、それに起因するインスリン分解酵素 (IDE) による分解耐性を同時に付与できるものと予想した。

実際に、セレノシステイン含有のインスリン A鎖およびB鎖のペプチド合成に成功し、各ペプチド鎖を最適な条件下で混合し反応させることで、目的の「セレノインスリン」を最大 27% の単離収率で得ることに成功した (図 3)。

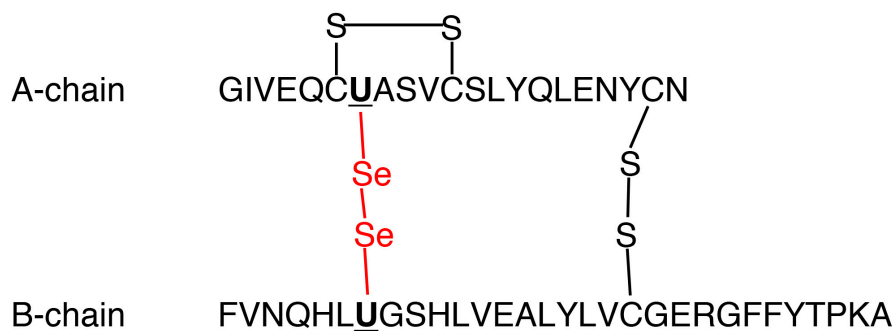


図 3. セレノインスリンの1次配列とジスルフィド結合もしくはジセレニド結合の架橋様式  
A鎖およびB鎖の Cys7SeCys 変異体は高い収率 (27%) で生理活性構造を形成する。

次に、X線結晶構造解析によって、「セレノインスリン」の三次元立体構造を解析した結果、人工の「セレノインスリン」は天然インスリンと同様の立体構造を有していることを明らかにした。これは「セレノインスリン」が天然インスリンと同等の生理活性をもつことを示唆する (図 4)。

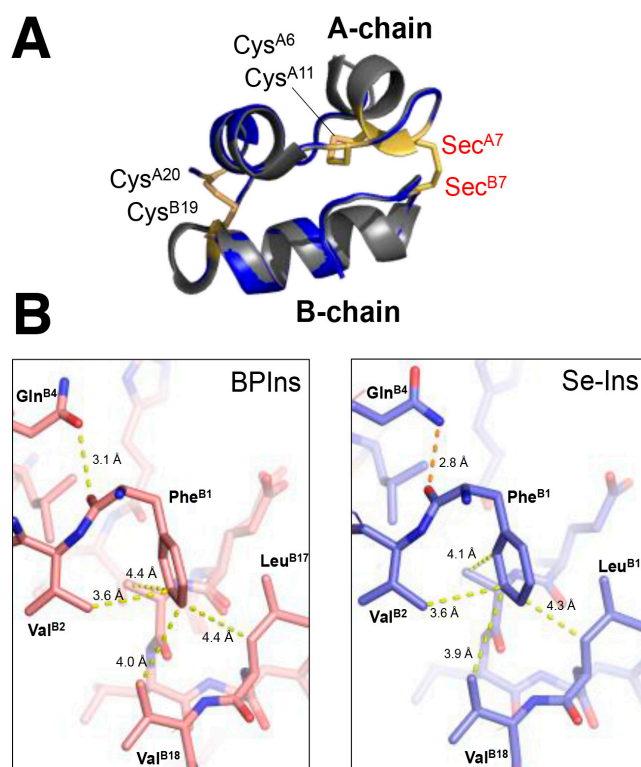


図 4. セレノインスリンの結晶構造

(A) インスリンの天然構造とセレノインスリンの構造の重ね合わせ、主鎖は殆ど一致する。(B) IDE による認識領域の構造変化、左がインスリンを示し、右がセレノインスリンを示す。B 鎖の Phe1 の側鎖が構造変化している。

そこで、「セレノインスリン」による細胞刺激応答を観測し、その生理活性を評価した結果、「セレノインスリン」はインスリンとしての生理機能を保持した。さらにインスリン分解酵素 (IDE) を用い、天然インスリンおよび「セレノインスリン」の分解実験を行った結果、「セレノインスリン」は天然インスリンよりも分解速度が著しく遅いことがわかった (図 5)。

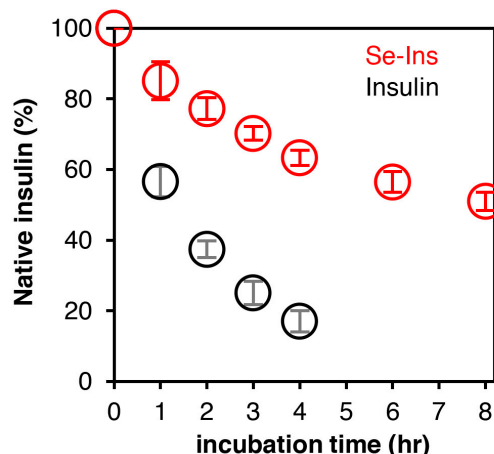


図5. インスリン分解酵素 IDE によるインスリン分解

IDE によるインスリンとセレノインスリン分解の結果を示す。セレノインスリンはインスリンに比べ分解速度が著しく遅く、分解耐性が高いことがわかる。

これは、ジスルフィド結合に比べジセレニド結合自身の安定性が高いことに加え、IDE が認識しているインスリンの局所構造が「セレノインスリン」ではごくわずかに変形していることに起因しているものと考察した。以上の成果は、*Angew Chem Int Ed Engl.*に採択された<sup>5)</sup>。

投与後に血流によって体内を循環したインスリンは、最終的に腎臓内で IDE によって分解され尿として排出されることが知られる。したがって、この IDE に対して高い分解耐性を示すインスリンを人工的に作製することができれば、長時間体内を循環する新しいタイプの持効型インスリン製剤の開発に繋がる。本成果は、上述の結果から、「セレノインスリン」が体内での薬効が長時間持続すると考えられ、新規持効型インスリン製剤としての応用も期待できる。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学多元物質科学研究所の稲葉謙次、金村進吾、渡部聡、東海大学の岩岡道夫、荒井堅太である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただいた上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Inaba K, Masui S, Iida H, Vavassori S, Sitia R, Suzuki M. Crystal structures of human Erol  $\alpha$  reveal the mechanisms of regulated and targeted oxidation of PDI. *EMBO J.* 2010 Oct 6;29(19):3330-43. PubMed PMID: 20834232
- 2) Ramming T, Okumura M, Kanemura S, Baday S, Birk J, Moes S, Spiess M, Jenö P, Bernèche S, Inaba K, Appenzeller-Herzog C. A PDI-catalyzed thiol-disulfide switch regulates the production of hydrogen peroxide by human Erol. *Free Radic Biol Med.* 2015 Jun;83:361-72. PubMed PMID: 25697776
- 3) Ramming T, Kanemura S, Okumura M, Inaba K, Appenzeller-Herzog C. Cysteines 208 and 241 in Erol  $\alpha$  are required for maximal catalytic turnover. *Redox Biology* 2016;(7):14-20. PubMed PMID: 26609561
- 4) Kanemura S, Okumura M, Yutani K, Ramming T, Hikima T, Appenzeller-Herzog C, Akiyama S, Inaba K. Human Erol  $\alpha$  undergoes dual regulation through complementary redox interactions with PDI. *J Biol Chem.* 2016;291(46):23952-23964. PubMed PMID: 27703014
- 5) Arai K, Takei T, Okumura M, Watanabe S, Amagai Y, Asahina Y, Moroder L, Hojo H, Inaba K, Iwaoka M. Preparation of Selenoinsulin as a Long-Lasting Insulin Analogue. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2017 May 8;56(20):5522-5526. doi: 10.1002/anie.201701654. Epub 2017 Apr 10. PubMed PMID: 28394477.