

## 27. 小胞体品質管理を支える PDI と分子シャペロンの連携

稲葉 謙次

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 : 小胞体品質管理, 高速原子間力顕微鏡, ジスルフィド結合, PDI

### 緒言

細胞は、新規に合成されたタンパク質の品質を管理するため厳正かつ巧妙なシステムを備えている。タンパク質品質管理システムの破綻は、細胞に種々のストレスを引き起こすにとどまらず、個体レベルにおいてアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患や糖尿病を引き起こすことが報告されており、同システムの作用機序を理解することは細胞生物学的にも医学的にも極めて重要である。中でも、二つのシステインが二電子酸化を受けることにより形成されるジスルフィド結合はタンパク質の立体構造形成において重要な役割をもち、細胞におけるタンパク質の恒常性維持とも密接に関わる。細胞内で合成される全タンパク質の約 30%はジスルフィド結合を有しており、その中には我々の健康維持に不可欠かつ創薬のターゲットとなる細胞表層受容体、免疫グロブリン、インスリン、血液凝固因子などが知られる [1]。実際、細胞内にはジスルフィド結合形成反応を促進するための複雑かつ巧妙な触媒システムが存在しており、このシステムを中心的に司るのは 20 種類以上も存在する PDI ファミリータンパク質である [2]。PDI ファミリーの生理的機能の重要性が明らかになる一方、これら酵素が基質にどう働きかけるのか、その作用機序は依然未解明であった。そこで本研究では、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）を用いた一分子観測や種々の生化学・生物物理学的解析により、PDI が基質の酸化的フォールディングを触媒する分子機構の解明を目指した。

その結果、PDI が酸化還元状態依存的に全体のドメイン配置を制御し、その動的構造の制御が還元変性基質の効率的な酸化的フォールディングの触媒に重要な役割をもつことを明らかにした。さらに、還元変性基質依存的に PDI が二量体を形成し、その中央に形成される空洞に基質が取り込まれ、そこで効率的な酸化的フォールディングが進行することを明らかにした。以上の結果から、PDI の全く新しい触媒機構を提唱するに至った [3]。

これまでに、PDI の変異や機能欠損を引き起こす化学修飾が、様々な神経変性疾患の患者から見つかった。今回新たに PDI の作用機序を分子構造レベルで解明したことは、生体内における高効率かつ高精度なタンパク質の高次構造形成機構の解明につながるのみならず、神経変性疾患や糖尿病などのフォールディング病発症に関する有用な情報の提供、さらには研究発展につながる。

### 方法

#### 1. PDI の発現・精製

ヒト由来 PDI を大腸菌中で過剰発現した。PDI の N 末端には His<sub>6</sub>-tag を付加し、NiNTA カラムによる粗精製を行った後、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った。酸化型および還元型の PDI の調製のため、1 mM diamide、1 mM DTT をそれぞれ加えた。

#### 2. PDI 分子のマイカ基板への固定

PDI の N 末端に付加した His<sub>6</sub>-tag とマイカ基板上に撒いたコバルトイオン間の相互作用を利用し、精製 PDI 分子をマイカ基板上に固定化した。His<sub>6</sub>-tag を除去した PDI についても同様にマイカ基板への固定化を試みたところ、His<sub>6</sub>-tag を有する PDI と比べ、固定化効率は 80%程度減少し、PDI 分子の基板への固定が主として His<sub>6</sub>-tag とコバルトイオン間の相互作用によることを確認した。さらに、基板上での PDI 分子間の *artificial* な会合を防ぐため、5,000 Å × 5,000 Å のエリアの中で平均 15 個の PDI 分子を固定化した。

### 3. 高速AFMによる観測およびデータ解析

まずは基質非存在下で酸化型および還元型のPDIを基板に固定化し、高速AFMによりPDI分子を観察した。次に、基質として還元変性BPTI、RNAaseA、プラスミノゲン、ラミニンをそれぞれ加えた条件で、マイカ基板上に固定化したPDI分子を高速AFMによりタッピングモードで観測した。spring constantは $0.1 \text{ Nm}^{-1}$ 、resonance frequencyは $0.8\sim 1.0 \text{ MHz}$ に設定した。データの解析は、金沢大学の安藤敏夫研究室で開発されたKodec4.4.7.39を用いて行った。

## 結果および考察

### 1. 高速原子間力顕微鏡による酸化型および還元型PDIの一分子観察

還元型および酸化型に調製したPDIを高速AFMにより観察したところ、還元型ではコンパクトなU字構造の1成分のみが観察されたのに対し、酸化型ではU字構造が開いた構造と閉じた構造の二成分存在することが判明した。その比率は、開いた構造が68.5%、閉じた構造が31.5%であった。実際、還元型および酸化型PDIの長軸方向について経時変化を観察したところ、還元型では $\sim 85 \text{ \AA}$ でほぼ一定であったのに対し、酸化型では長軸の長さが $\sim 110 \text{ \AA}$ と $\sim 80 \text{ \AA}$ の2つの異なるコンフォメーション間の平衡が観測された。このように酸化還元活性部位にジスルフィド結合が形成されることで、PDIがよりダイナミクスに富んだ構造をとることが判明した。

過去のPDIの結晶構造の報告から、還元型のPDIがコンパクトかつ動きの少ない構造をとる要因として、活性部位近傍に位置するTrp396と別のドメインに位置するArg300との間でカチオン- $\pi$ 相互作用を形成することが挙げられる。そこで、これらアミノ酸に変異を加えることで上記の相互作用が形成できないようにしたところ、還元型のPDIでもダイナミクスに富んだ2成分の構造に変化することが明らかとなった。興味深いことに、この変異体は還元変性RNaseAを正しくフォールドさせる活性が野生型に比べ有意に低下しており、このことは酸化還元状態に依存したPDIの動的構造の制御が、同酵素の触媒活性において重要な役割をもつことを示唆している。

### 2. 還元基質存在下におけるPDIの1分子観察

次に基質存在下におけるPDI分子の動的構造を高速AFMにより観測した。興味深いことに、還元変性状態のBPTIをマイカ基板上のPDIに加えたところ、互いにU字構造が向き合った二量体を形成することが明らかとなった(図1)。高速AFM観測中、マイカ基板上の溶液にフリーのPDI分子は存在しており、還元変性基質依存的にフリーのPDIが基板に固定化したPDIと結合し、二量体化したと考えられる。二量体を形成するPDI分子の割合はBPTI濃度依存的に上昇し、 $30 \text{ nM}$  BPTIを加えた時点で60%ものPDI分子が二量体を形成することが観測された。還元変性基質依存的なPDIの二量体化は、多角度光散乱検出器を組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー(SEC-MALS)を用いた解析でも確認した。そこで、基質がPDI分子のどこに結合しているかを調べるため、金コロイド粒子を付加した還元変性BPTIを加えた条件で高速AFM観測を行ったところ、二量体PDIが形成する中央の空洞(キャビティ)に基質が結合することが明らかとなった。PDI単体の結晶構造から、この中央の空洞は疎水的環境であり、4つの酸化還元部位を有すると考えられる。したがって、基質依存的なPDIの二量体形成は、基質の捕獲および基質への効率的なジスルフィド結合導入いずれにおいても重要な意味をもつと考察される。そこで、液体クロマトグラフィーを用いてPDIが触媒するBPTIの酸化的フォールディングについて速度論的解析を行ったところ、還元変性BPTIへのジスルフィド結合導入は、二量体PDIの生成割合が高くなる高濃度条件において指数関数的に速くなることを確認した。このように、PDIの二量体形成が基質の酸化的フォールディングを加速するという実験結果を得た。

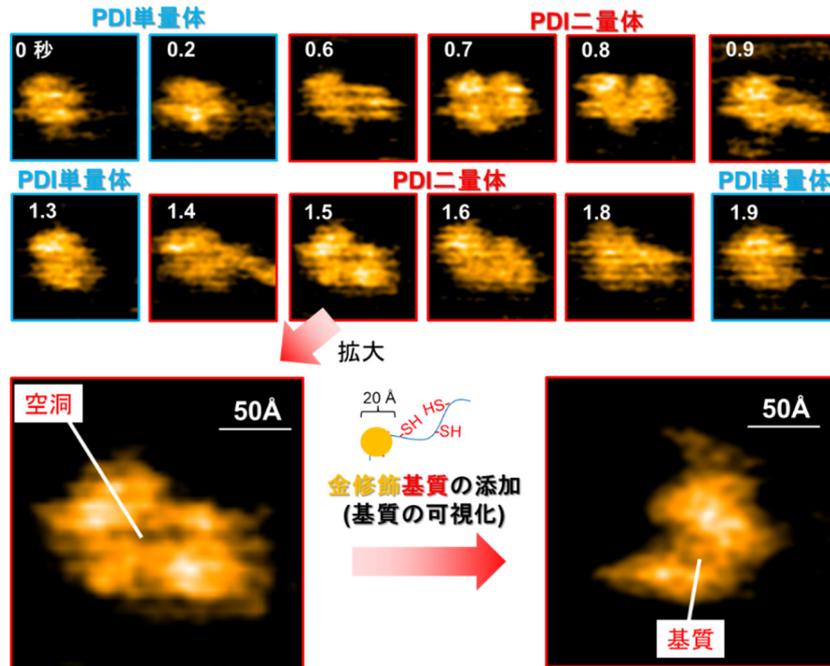


図 1. 還元変性基質依存的な PDI の二量体形成

(上図) 構造未成熟な基質を添加すると PDI は二量体を形成し、基質の立体構造形成に応じて単量体へと解離する。PDI 二量体を拡大すると、その中央に空洞が生じていることがわかる。

(下図) PDI 二量体の中央の空洞に基質が取り込まれる様子。この中央の空洞が、基質の酸化的フォールディングの触媒に重要な役割を果たす。

### 3. PDI 二量体化の基質の種類および基質のフォールディング状態依存性

基質依存的な PDI の二量体形成が普遍的な現象であるかを調べるため、異なる基質を用いて高速 AFM 観測を行った。その結果、還元変性 RNase A でも同じ現象が観測された。興味深いことに、RNase A では二量体 PDI の寿命が BPTI の時と比べ明らかに長く、還元変性 BPTI が誘起する PDI 二量体の寿命が 0.5 秒程度であったのに対し、還元変性 RNase A が誘起する PDI 二量体は 5 秒程度持続した。RNase A の酸化的フォールディングの速度は BPTI のそれより低いことは過去に報告されており、基質のフォールディング速度に応じて PDI 二量体の安定性が変化することが示唆された。さらに PDI 二量体の形状・大きさを詳細に解析すると、PDI 二分子がよりタイトに結合したフォームと、互いに少し離れた伸びたフォームの 2 種類に大分され、しかも伸びたフォームは形状に多様性がみられた。このことから、還元変性基質の構造に合わせ PDI 二量体も形状を変え、そのことが基質の効率的な酸化的フォールディングにつながると考察した。このことと関連し、還元変性した BPTI、フォールディング中間状態の BPTI、さらには天然構造を保持した BPTI をマイカ基板上的 PDI に加えたところ、フォールディングの進行につれ、二量体を形成した PDI 分子の割合は顕著に減少した (図 2)。このように PDI は基質のフォールディング状態を厳密に認識し、それに応じて会合状態や形状状態を変化させ、基質の酸化的フォールディングを触媒することが示唆された。

一方、PDI 二量体の中央の空洞に収まらない大きな基質の場合に PDI がどう振舞うかを調べるため、還元変性状態のプラスミノーゲン (分子量: 約 9 万、ジスルフィド結合の数: 24 本) とラミニン複合体 (分子量: 約 14 万、ジスルフィド結合の数: 4 本) を基質として使い、PDI の高速 AFM 観測を行った。その結果、一つの基質分子の異なる部位に複数の PDI 二量体が同時に作用する様子が観測された。このように、大きな基質の場合は、分子全体を PDI 二量体の中央の空洞内に収めることはできないが、PDI 二量体が基質を領域ごとに認識し、中央の空洞の中でジスルフィド結合を効率よく導入することが示唆された。

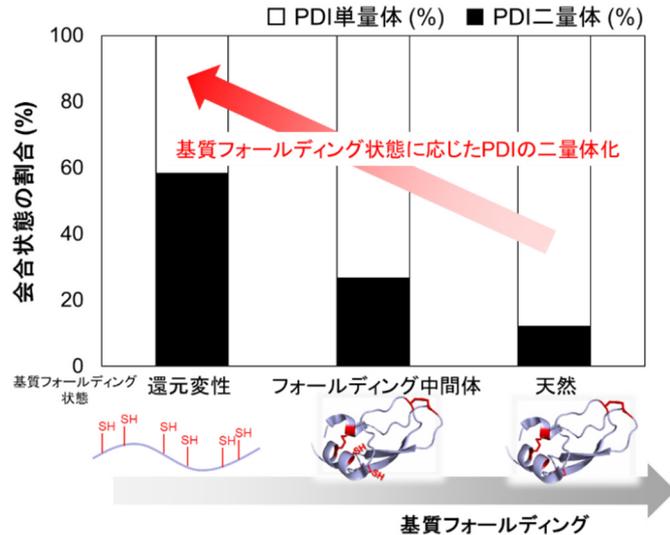


図2. 基質のフォールディング状態に応じた PDI の二量体形成

還元変性した基質を添加すると PDI は約 60%まで二量体を形成するが、基質のフォールディング反応が進行すると PDI は単量体となる。二量体化した PDI が還元変性した基質に迅速にジスルフィド結合を導入することも、本研究により示された。

#### 4. まとめ

以上のように、PDIは酸化還元状態依存的にU字構造の開閉の制御を行うばかりか、基質依存的に二量体を形成し、その中央に生じる疎水的な空洞中で変性基質を捕獲し効率的な酸化的フォールディングを促すという、PDIの全く新しい触媒機構を提唱しました。パーキンソン病やアルツハイマー病など種々の神経変性疾患は体内で構造異常タンパク質が過剰に蓄積することで引き起こされることが知られています。さらに、PDIの変異や機能不全を引き起こす化学修飾が、さまざまな神経変性疾患の患者から見つかっています。今回高速AFM観察と系統的な生化学解析により新たに得られたPDIの作用機序に関する基礎的知見は、生体内における高効率・高精度なたんぱく質の構造形成促進の触媒機構の新たな解明につながるのみならず、小胞体中に過剰に蓄積した構造異常タンパク質が引き起こす神経変性疾患や糖尿病などの疾患に関する有用な情報を提供するものである。

#### 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学学際科学フロンティア研究所の奥村正樹助教、熊本大学発生医学研究所の小椋光教授と野井健太郎研究員（現大阪大学ナノサイエンスデザイン教育研究センター特任助教）、である。ここに深く感謝する。

#### 文献

- 1) Fass, D. and Thorpe, C. Chemistry and enzymology of disulfide cross-linking in proteins. *Chem. Rev.* 2018 Feb.14; 118(3):1169-1198. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00123
- 2) Okumura, M., Kadokura, K. and Inaba, K.\* The structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum." *Free Rad. Biol. Med.* 2015 Jun; 83:314-22. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.010.
- 3) Okumura, M.#\*, Noi, K.#, Kanemura, M., Kinoshita, M., Saio, T., Inoue, Y., Hikima, T., Akiyama, S., Ogura, T.\* and Inaba, K.\* (#equal contribution) Dynamic assembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative folding *Nature Chemical Biol.* 2019 May;15(5):499-509. doi: 10.1038/s41589-019-0268-8.