

【目的】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面受容体、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。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。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。

【方法】ヒト由来 PDI を大腸菌により発現し、種々のクロマトグラフィーを用いて精製した。精製した PDI について、酸化処理、還元処理を施し、マイカ基板上に固定化し、高速原子間力顕微鏡による一分子観測を行った。さらに、PDI を固定化した基板上に還元変性させた BPTI および RNase A を基質として加え、基質に働きかける PDI 分子の高速原子間力顕微鏡による一分子観測を行った。

【結果】酸化型および還元型の PDI について高速原子間力顕微鏡を用いて一分子観察することにより、PDI が酸化還元状態依存的に 4 つのドメインで構成される U 字構造の開閉を制御し、こ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、BPTI、RNase A、Plasminogen といった形や大きさ、ジスルフィド結合の数が異なる様々な基質を添加することにより、PDI が二量体化することを発見した。興味深いことに、還元変性基質は PDI 二量体の中央に形成される空洞に取り込まれ、そこで迅速なジスルフィド結合の導入と立体構造形成を受けることを明らかにした。この現象は、大きさやジスルフィド結合の数が異なる複数種類の基質に対しても同様に観察された。また、アンフォールド基質依存的に形成された PDI 二量体は、基質のフォールディング状態やフォールディング速度に応じて形状や寿命を変えることを突き止めた。このように、二量体を形成することで生じる中央の空洞中にアンフォールド基質を捕獲し、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た (図参照)。

PDI による新たな酸化的フォールディングの触媒機構

