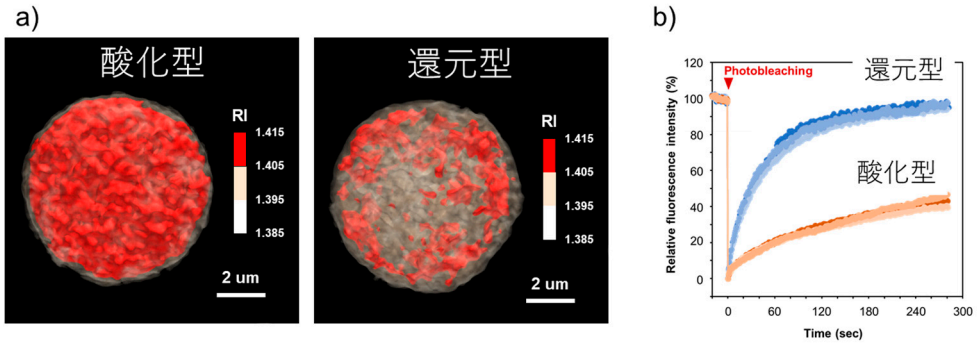
18　酸化ストレスに応答する小胞体内液液相分離形成の理解	奥村　正樹

【目的】我々は小胞体内に存在する酵素・シャペロン群である Protein Disulfide Isomerase（PDI）ファミリーによるタンパク質品質管理機構の解明に取り組み、小胞体内における複雑かつ精巧なタンパク質品質管理ネットワークを提示した。さらに、20 種類以上もの PDI ファミリーの中から相分離する酸化還元酵素・シャペロン P5 を発見し、小胞体内タンパク質品質管理顆粒であることを突き止めた。さらに、準備研究から過酸化水素依存的に P5 の相分離が惹起された。そこで本研究では、これまで我々が発見した小胞体内顆粒研究において、小胞体内顆粒形成に関わる活性酸素種（ROS）や活性窒素種（RNS）の特定に取り組み、酸化還元依存的相分離の理解に繋げることを目的とした。さらに、酸化ストレスによる顆粒への影響を見積るだけでなく、顆粒形成因子である P5 の酵素機能回復や活性亢進を目的とした低分子化合物の開発を進めることも目的とした。

【方法】酸化還元による P5 の相分離の機序の理解について、屈折率および蛍光を装備するホログラフィック顕微鏡による相分離内部の分子 packing 評価、またラマン分光による相分離内部の評価、NMR による相分離内部の分子構造解析を行った。さらに、各種 ROS/RNS による相分離への影響も調べた。小胞体内相分離因子 P5 の機能評価は、基質としてプロインスリンの酸化的フォールディング触媒能を逆相 HPLC および MALDI-TOF/MS で評価した。さらに、細胞を用い、カルシウムポンプの阻害剤である thapsigargin（TG）によるカルシウム枯渇からの回復時、内在性 P5 の foci 形成を顕微鏡下で可視化した。また試験管内検索に基づき特定した ROS/RNS を小胞体内で過剰に発生させることで、小胞体内顆粒形成を位相差顕微鏡で検証した。さらに、ストレス顆粒形成による P5 の酵素機能回復や活性亢進剤の薬剤開発として、その触媒活性部位であるチオール官能基の反応性を上昇させる新規酸化還元低分子 N-メチル化ピリジニルメタンチオール（pMePySH）を用いた。pMePySH 存在下で、P5 による酸化的フォールディング触媒能を逆相 HPLC および MALDI-TOF/MS で評価した。基質として牛膵臓トリプシン阻害酵素とプロインスリンを採用した。

【結果】P5 は酸化還元状態に応じて、内部の packing 状態が違い、酸化型の方がより密に packing されることがわかった。それにより、酸化型の方が還元型よりも流動性が低いことがわかった。NMR による構造解析の結果、P5 相分離における酸化還元状態における構造変化を捉えることに成功し、相分離駆動に不可欠な領域の特定にも至った。P5 顆粒の機能の理解に関して、試験管内の実験において本顆粒が酸化的フォールディングを触媒するスーパーエンハンサーとしての化学触媒反応場であることを突き止めた。細胞内検証において、U2OS 細胞を用いて、細胞内 foci を可視化することが出来、現在論文投稿中である。また、試験管内実験の結果から、過酸化水素と一酸化窒素は液滴内部の packing 状態を密に上昇させることがわかり、化学修飾部位を特定し、その構造変化を追うことが出来た。過酸化により生じた顆粒は、基質取込量が減った。これは基質取込量の capacity の低下を意味しており、酸化ストレスによってタンパク質品質管理顆粒から機能破綻したストレス顆粒へと変化することを示唆した。さらに、P5 酵素の酸化還元触媒モチーフを介した活性亢進調節に成功した。今後の P5 のストレス顆粒に関わる疾患に対峙する創薬への応用が考えられる。

小胞体局在因子による相分離が酸化還元によって制御されている



18. 酸化ストレスに応答する小胞体内液液相分離形成の理解

奥村　正樹

東北大学 学際科学フロンティア研究所 新領域創成研究部

Key words：小胞体，タンパク質品質管理，活性酸素種，相分離

緒　言

タンパク質は天然構造を獲得してはじめて機能を発揮する。不良タンパク質の蓄積を防ぐため、生命の生存戦略として、小胞体ストレス応答、シャペロンによる補助、オートファジー、分解等タンパク質品質管理機構が生物種を超えて高く保存されてきた。特に我々は小胞体内に存在する酵素・シャペロン群である Protein Disulfide Isomerase（PDI）ファミリーによるタンパク質品質管理機構の解明に取り組み、小胞体内における複雑かつ精巧なタンパク質品質管理ネットワークを提示した。これまでに、高速原子間力顕微鏡によって PDI 酵素による基質触媒の可視化に世界で初めて成功し、0.5 秒くらいの間隔で PDI が変性基質依存的に、会合・解離を繰り返し、内部に触媒空間を形成することを見出し、PDI が動的な反応場を一過的に形成することを発見した［1］。

PDI の可逆的な会合に基づいた動的反応場は、RNA とタンパク質からなる P 顆粒の生物学的相分離による可逆的な会合と機能に共有する概念であり［2］、細胞内夾雑環境下での多段階反応場として非常に重要な概念となりつつある。この 10 年で天然変性タンパク質を中心に進んできた生物学的相分離に着想し、未だ報告例がない酵素・シャペロン単独による相分離因子を探索した。その結果、小胞体内に存在する 20 種類以上もの PDI ファミリーの中から新たに相分離する酸化還元酵素・シャペロン P5 を発見した。P5 が、カルシウム枯渇による小胞体ストレスからの回復時カルシウム再流入に伴ってカルシウム依存的に液-液相分離し、その内部で基質の凝集を抑えることで、定常状態への回復を促す小胞体内タンパク質品質管理顆粒であることを突き止めた（論文投稿中）。小胞体内相分離因子である P5 は天然変性タンパク質でないこと、セカンドメッセンジャーであるカルシウムが生物学的相分離のトリガーとなっていること、を示す世界初の発見である。P5 の構造情報に関し、これまで我々が相分離前の P5 の新規構造を決定し、P5 が溶液中で二量体を形成し、機能発現に重要であることを示している［3］。

液-液相分離時、還元型に比べ酸化型 P5 の方がカルシウムと P5 の臨界濃度が低く、相分離し易く、P5 の酸化還元状態が重要であることもわかりつつある。P5 を含む PDI ファミリーの上流酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ（Gpx7/8）、ペルオキシレドキシン（Prx4）、ER オキシドレダクチン 1（Ero1）は小体内過酸化水素の生産・除去によって小胞体内レドックス恒常性を維持することが知られており、準備研究から過酸化水素依存的に P5 の相分離が惹起された。酸化ストレスによる酸化型 P5 の形成と顆粒形成に関わる酸化源を特定することは小胞体内酸化ストレス応答の理解に不可欠である。そこで本研究では、これまで我々が発見した小胞体内顆粒研究において、小胞体内顆粒形成に関わる活性酸素種（ROS）や活性窒素種（RNS）の特定に取り組み、酸化還元依存的相分離の理解に繋げることを目的とした。さらに、酸化ストレスによる顆粒への影響を見積るだけでなく、顆粒形成因子である P5 の酵素機能回復や活性亢進を目的とした薬剤開発として、その触媒活性部位であるチオール官能基の反応性を上昇させる pMePySH に着目し［4］、試験管内における P5 の活性亢進も実証した［5］。これによりストレス顆粒に対する新たな薬剤開発の指針を得ることが出来た。サイトゾルやミトコンドリアにおける活性酸素種によるストレス顆粒形成はここ数年で報告されつつあるが、小胞体内 ROS/RNS による顆粒形成を介したストレス応答は未踏の学問である。本課題で果敢に挑戦する内容は、自ら発見した小胞体内相分離の発見に基づき、小胞体内レドックスの均衡が織成す恒常性やその破綻に対し新たな発見を追求する点で、

生物学的相分離の概念変革の seed となり得る課題であり、「小胞体内における活性酸素種によるストレス顆粒形成」の理解を切り開く。

方　法

1. 活性酸素種や活性窒素種が相分離に与える影響

これまでに小胞体内相分離因子 P5 について、①物性評価系：屈折率および蛍光を装備するホログラフィック顕微鏡による相分離内部の分子 packing 評価、またラマン分光による相分離内部の評価、②構造評価系：NMR による相分離内部の分子構造解析が可能となった。よって、スーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルのような ROS や一酸化窒素、二酸化窒素のような RNS による相分離への影響を迅速に調べる必要がある。一次検索においては、確立した物性評価系を指標に、相分離に影響する化合物を検索した。

2. 細胞内活性酸素・活性窒素に応答した小胞体内顆粒形成の評価

U2OS 細胞を用い、小胞体内カルシウムポンプの阻害剤である thapsigargin（TG）によるカルシウム枯渇からの回復時に、内在性の P5 の foci 形成を顕微鏡下で可視化した。さらに試験管内検索に基づき特定した ROS/RNS を小胞体内で過剰に発生させることで、小胞体内顆粒形成を位相差顕微鏡で検証している。細胞内の ROS および RNS の検出は DCF-DA を用い、キサンチンオキシダーゼとキサンチン、SIN-1、過酸化水素と鉄のフェントン反応により発生させることが出来る。さらに、現在 FIB-SEM とクライオ電顕トモグラフィー解析を併用した小胞体内顆粒の可視化形成の高分解能の可視化も進めている。

3. 相分離内の機能評価

小胞体内相分離因子 P5 の機能評価は、①屈折率および蛍光を装備するホログラフィック顕微鏡による蛍光標識したターゲット分子（牛膵臓トリプシン阻害酵素とプロインスリンを採用）の取込の評価、②基質としてプロインスリンの酸化的フォールディング触媒能を逆相 HPLC および MALDI-TOF/MS で評価した。

4. P5 の触媒活性部位を利用した活性促進剤

ストレス顆粒形成による P5 の酵素機能回復や活性亢進剤の薬剤開発として、その触媒活性部位であるチオール官能基の反応性を上昇させる新規レドックス分子 N-メチル化ピリジニルメタンチオール（pMePySH）を用いた。汎用的に使用されるグルタチオン内のチオール官能基は pKa＝9.17、E°'＝－256 mV である一方で、pMePySH のチオール官能基は pKa＝7.34、E°'＝－211 mV という化学特性があり、酸性度が高く酸化し易い特徴を有している［4］。そこで、pMePySH 存在下で、P5 による酸化的フォールディング触媒能を逆相 HPLC および MALDI-TOF/MS で評価した。ここで、基質として牛膵臓トリプシン阻害酵素とプロインスリンを採用した。

結果および考察

1. 酸化還元による相分離制御

P5 の酸化還元状態における相分離への影響を位相差顕微鏡で見積もった。その結果、還元型に比べ、酸化型は歪な液滴の形状を形成していることがわかった。そこで、液滴内部をホロトモグラフィー顕微鏡を用いて観察した結果、内部の packing 状態が違い、酸化型の方がより密に packing されている屈折率を示した。そこで、蛍光退色法による内部の流動性を検証した結果、酸化型の方が還元型よりも流動性が低いことがわかり、これは屈折率実験と一致する結果であった（図 1）。さらに、ラマン分光により液滴内部を測定した結果、還元型が 6.5 mM、酸化型が 7.5 mM であることがわかり、酸化型の方がより濃縮されていることがわかった。また酸化還元それぞれの液滴内部の水由来の OH 伸縮バンドにおいて、スペクトル形状に差異がないことから、液滴内部の水構造に

違いがないことがわかった。次に、NMR 測定による立体構造解析を行った結果、P5 相分離における酸化還元状態における構造変化を捉えることに成功し、相分離駆動に不可欠な領域の特定にも至った。

P5 顆粒の機能の理解に関して、試験管内の実験において本顆粒が酸化的フォールディングを触媒するスーパーエンハンサーとしての化学触媒反応場であることを突き止めた。さらに、本顆粒に濃縮される因子の機能の理解に関して、因子を濃縮することで、スーパーエンハンサーとしてのさらに酸化的フォールディングを亢進させることがわかった。細胞内検証において、U2OS 細胞を用いて、細胞内 foci を可視化することが出来た。現在活性酸素種および活性窒素種による foci 形成において、超解像顕微鏡法および現在 FIB-SEM とクライオ電顕トモグラフィー解析を併用した小胞体内顆粒の可視化形成の高分解能の可視化も進めている。

以上、酸化還元による相分離制御の機序と、タンパク質品質管理顆粒としての機能解釈に達し、さらに酸化による物性変化を捉えることが出来、現在論文投稿中である。

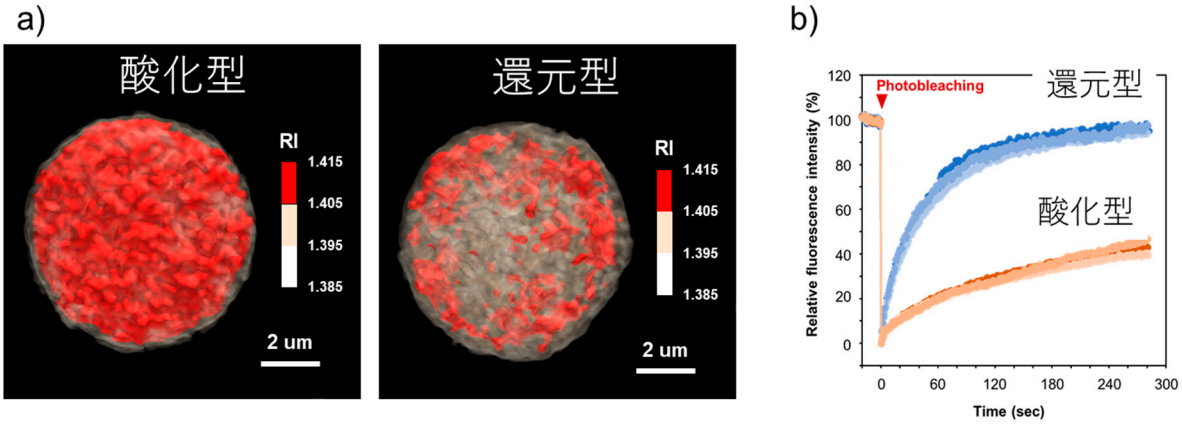


図 1. 酸化還元による相分離制御

小胞体局在因子 P5 はその酸化還元状態によって相分離内部の状態を変える。

a) ホログラフィック顕微鏡による液滴内部の屈折率表示（スケールバー：2 μ m）。左は酸化型、右は還元型を示し、酸化還元状態によって内部の状態が変化することを示している。

b) 酸化型、還元型液滴の蛍光退色実験結果を示す。酸化型に比べ、還元型の方が蛍光退色からの回復率が高い。

2. 活性窒素種および活性酸素種によるストレス顆粒への変化と機能破綻

試験管内で、活性酸素種であるスーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、活性窒素種である一酸化窒素、二酸化窒素による相分離への影響を調べた結果、過酸化水素と一酸化窒素は、液滴内部の packing 状態を密に上昇させることがわかった。さらに、P5 に対する化学修飾部位を質量分析で特定した結果、相分離駆動に不可欠な領域の近傍であることがわかった。現在 NMR による化学修飾が誘導する構造変化も測定し終えている。

P5 顆粒は 1.で明らかにしたように、定常状態においてタンパク質品質管理顆粒であるが、酸化修飾されることによる機能評価を検証するため、ホロトモグラフィー顕微鏡を用い、基質である牛膵臓トリプシン阻害酵素の取込実験を行った結果、酸化ストレスによって状態変化した顆粒は基質取込量が減った。これは基質取込量の capacity の低下を意味しており、酸化ストレスによってタンパク質品質管理顆粒から機能破綻したストレス顆粒へと変化することを示唆した。現在、細胞内検証において、U2OS 細胞を用いて、過酸化水素と一酸化窒素による細胞内 foci への影響を見積もっている。さらに、今後過酸化水素と一酸化窒素による foci 形成において、超解像顕微鏡法および現在 FIB-SEM とクライオ電顕トモグラフィー解析を併用した小胞体内顆粒の可視化形成の高分解能の可視化も行う予定である。

3. 相分離する P5 酵素の活性促進剤

P5 酵素の酸化還元触媒モチーフを介した活性調節を検証するため、新規酸化還元低分子化合物である pMePySH による P5 の酸化還元平衡定数を求めた。その結果、グルタチオンによる酸化還元条件下の P5 の酸化還元平衡定数よりも、pMePySH の P5 の酸化還元平衡定数が高くなったことから、グルタチオンよりも pMePySH の方が、P5 の酸化還元活性 CxxC 部位に対する反応性が高いことがわかった。

酸化的フォールディングの触媒活性を評価するために、牛膵臓トリプシン阻害酵素とプロインスリンを使用した結果グルタチオンによる系と比較したところ、P5 の活性値が約 2.5 倍高いことがわった（図 2)。さらに、今回開発した pMePySH による酸化還元条件下であれば、プロインスリンの酸化的フォールディングに対する収量の増加にも成功した。以上の結果は、新たな酸化還元低分子化合物が P5 の活性亢進に繋がることを実証しただけでなく、最小量で酵素活性を増加させることも意味しており、今後の P5 のストレス顆粒に関わる疾患に対峙する創薬への応用が考えられる。

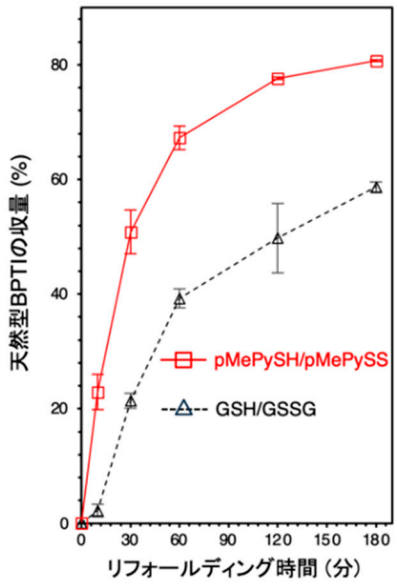


図 2. 新規チオール化合物による P5 の活性亢進
グルタチオンと比較して pMePySH による P5 酵素の活性亢進を調べた結果、基質の 1 つである BPTI の天然型の生産量が増大した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学先端酵素研究所分子生命科学分野の齋尾智英教授、東北大学大学院薬学研究科生物構造化学分野の中林孝和教授、Korea Basic Science Institute の Prof. Lee Young-Ho、東京農工大学工学研究院の村岡貴博教授である。

文　献

1） Okumura M, Noi K, Kanemura S, Kinoshita M, Saio T, Inoue Y, Hikima T, Akiyama S, Ogura T, Inaba K. Dynamic assembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative folding. Nat Chem Biol. 2019 May;15(5):499-509. Epub 2019 Apr 15. PMID: 30992562 DOI: 10.1038/s41589-019-0268-8.

2) Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoege C, Gharakhani J, Jülicher F, Hyman AA. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. Science. 2009 Jun 26;324(5935):1729-32. Epub 2009 May 21. PMID: 19460965 DOI: 10.1126/science.1172046.
3) Okumura M, Kanemura S, Matsusaki M, Kinoshita M, Saio T, Ito D, Hirayama C, Kumeta H, Watabe M, Amagai Y, Lee YH, Akiyama S, Inaba K. A unique leucine-valine adhesive motif supports structure and function of protein disulfide isomerase P5 via dimerization. Structure. 2021 Dec 2;29(12):1357-1370.e6. Epub 2021 Apr 14. PMID: 33857433 DOI: 10.1016/j.str.2021.03.016.
4) Okada S, Matsumoto Y, Takahashi R, Arai K, Kanemura S, Okumura M, Muraoka T. Semi-enzymatic acceleration of oxidative protein folding by N-methylated heteroaromatic thiols. Chem Sci. 2023 Jun 16;14(28):7630-7636. eCollection 2023 Jul 19. PMID: 37476727 DOI: 10.1039/d3sc01540h.
5) Kuramochi T, Yamashita Y, Arai K, Kanemura S, Muraoka T, Okumura M. Boosting the enzymatic activity of CxxC motif-containing PDI family members. Chem Commun (Camb). 2024 Jun 11;60(48):6134-6137. PMID: 38829522 DOI: 10.1039/d4cc01712a.