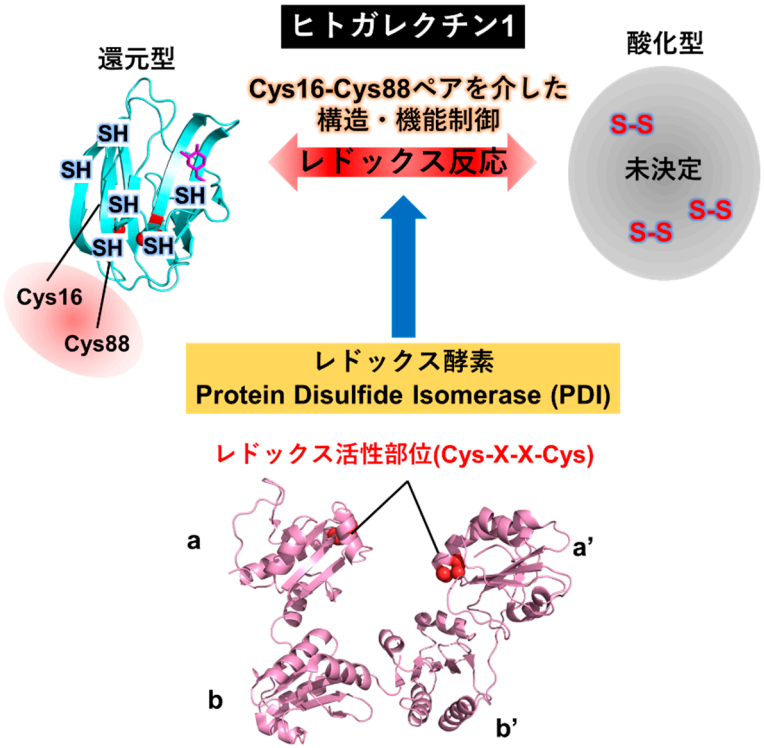
108　細胞外におけるレドックス制御メカニズムの解明	金村　進吾

【目的】ガレクチンは、細胞質で生合成され、細胞外において細胞シグナル伝達、神経保護、血管新生、免疫、細胞分化、細胞増殖、アポトーシスなど様々な生命現象に関与する糖結合性タンパク質であり、哺乳類では 15 種類が同定されている。ヒトガレクチン 1（hGal-1）はガレクチンファミリーの中で唯一、分子内の 6 つのシステイン残基のレドックス状態に応じた機能変調が示唆されている。システイン残基全てが-SH 状態にある還元型 hGal-1 は、糖結合能を持つことで細胞接着、血管新生などに関与する。一方、6 つのシステイン残基が分子内で 3 本のジスルフィド結合を形成した酸化型 hGal-1 は、糖結合能を失い、神経軸索の再生など全く異なる生理機能に関与する。このように、適切なレドックス制御による hGal-1 の機能変調が生命維持に重要であると考えられるが、hGal-1 のレドックス依存的な分子メカニズムや生体内でどのようにして hGal-1 のレドックスが制御されているのか詳細は不明である。そこで本研究では、hGal-1 のレドックス依存的な分子メカニズム及び、hGal-1 のレドックス制御メカニズムの解明を目的とした。

【方法】チオール基の選択的ラベル化を利用した非還元 SDS-PAGE 解析による hGal-1 のレドックス反応性評価、赤血球凝集実験による hGal-1 のレドックス依存的な機能評価、溶液 NMR による hGal-1 のレドックス依存的な構造評価、ゲルシフトアッセイによる hGal-1 のレドックス反応触媒評価を行った。

【結果】hGal-1 のレドックス依存的な分子メカニズムを明らかにするため、各システイン残基のレドックス反応性を検証した結果、Cys16-Cys88 ペアが最も効率良く酸化された。また、このシステインペアは赤血球凝集実験、溶液 NMR によってレドックス依存的な構造及び機能変化に重要であることがわかった。さらに、レドックス酵素である protein disulfide isomerase（PDI）が hGal-1 のレドックス制御因子の一つであることが示唆された。本研究を通じて、細胞外に存在する hGal-1 及び PDI のレドックスを介した作用機序の理解は、細胞外レドックスが関与する生命現象及び疾患の解明のカギとなる知見が期待できる。

レドックス酵素 PDI によるヒトガレクチン 1 のレドックス制御機構



108. 細胞外におけるレドックス制御メカニズムの解明

金村　進吾

*関西学院大学 理学部 化学科

Key words：ガレクチン，細胞外プロテインジスルフィドイソメラーゼ，酸化還元（レドックス）

緒　言

ガレクチンは、細胞質で生合成され、細胞外において細胞シグナル伝達、神経保護、血管新生、免疫、細胞分化、細胞増殖、アポトーシスなど様々な生命現象に関与する糖結合性タンパク質であり、哺乳類では 15 種類が同定されている。これらガレクチンは、筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患、癌、炎症、糖尿病など、あらゆる疾病との関連が報告されており、医学、薬学的にも重要な因子である［1］。ヒトガレクチン 1（hGal-1）はガレクチンファミリーの中で唯一、分子内の 6 つのシステイン残基のレドックス状態に応じた機能変調が示唆されている。システイン残基全てが-SH 状態にある還元型 hGal-1 は、糖結合能を持つことで細胞接着、血管新生などに関与する［2］。一方、6 つのシステイン残基が分子内で 3 本のジスルフィド結合を形成した酸化型 hGal-1 は、糖結合能を失い、神経軸索の再生など全く異なる生理機能に関与する［3］。このように、適切なレドックス制御による hGal-1 の機能変調が生命維持に重要であると考えられるが、hGal-1 のレドックス依存的な分子メカニズムや生体内でどのようにして hGal-1 のレドックスが制御されているのか詳細は不明であり、疾患との関連が深いことからその解明が急務となっている。

そこで本研究では、hGal-1 のレドックス依存的な分子メカニズム及び、hGal-1 のレドックス制御メカニズムの解明を目的とした。

方　法

1. ゲルシフトアッセイによる hGal-1 のレドックス反応性評価

過酸化水素を用いた hGal-1 のレドックス反応性は、マレイミド化合物の添加によるチオール基の選択的ラベル化を利用した非還元 SDS-PAGE を行い、定量解析することで評価した。

2. 赤血球凝集実験による hGal-1 のレドックス依存的な機能評価

糖結合能を有した還元型 hGal-1 は、細胞表面の糖鎖を認識して細胞接着を行うことが知られている。実際、血液細胞の一つである赤血球に還元型 hGal-1 を添加すると、赤血球表面の糖鎖を認識して赤血球の凝集を起こす一方で、糖結合能を失った酸化型 hGal-1 は赤血球凝集活性を示さない。このように、赤血球凝集の有無を検証することで、hGal-1 のレドックス依存的な機能を評価した。

3. 溶液 NMR による hGal-1 のレドックス依存的な構造評価

同位体標識 ^{15}N ラベル化した還元型及び酸化型 hGal-1 の溶液 NMR スペクトルを取得し、比較検討することで hGal-1 のレドックス依存的な構造を評価した。

4. ゲルシフトアッセイによる hGal-1 のレドックス反応触媒評価

レドックス酵素 PDI による hGal-1 のレドックス反応触媒は、マレイミド化合物の添加によるチオール基の

*現在の所属：東北大学 学際科学フロンティア研究所

選択的ラベル化を利用した非還元 SDS-PAGE を行い、定量解析することで評価した。

結果および考察

1. hGal-1 のレドックス反応性

hGal-1 のレドックス依存的な分子メカニズムを明らかにするため、各システイン残基のレドックス反応性を検証した。hGal-1 の 3 つのシステインペア（Cys2-Cys130、Cys16-Cys88、Cys42-Cys60）、それぞれだけを残し、他 4 つのシステイン残基をセリン残基に置換した変異体を 3 種作製した。過酸化水素による hGal-1 の各種変異体の酸化反応を追跡した結果、Cys16-Cys88 だけを残した変異体（Cys16-Cys88 変異体）が最も効率良く酸化され、Cys42-Cys60 変異体はほとんど酸化されなかった（図 1）。これらの結果から、Cys16-Cys88 は立体構造上、比較的溶媒に露出している一方で、Cys42-Cys60 は分子内部に埋もれていることが示唆された。実際、既知の還元型 hGal-1 の結晶構造から算出された溶媒露出表面積の結果とも一致した。

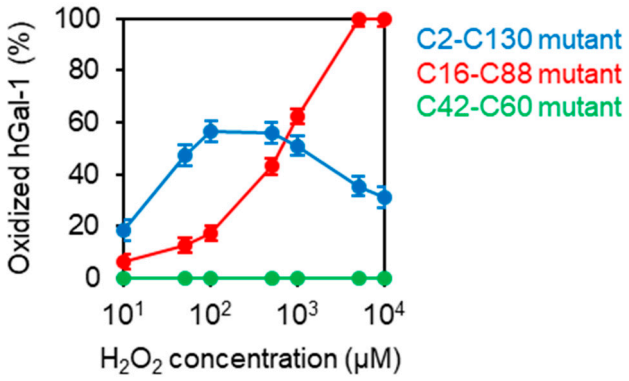


図 1. 過酸化水素による hGal-1 変異体の酸化反応
マレイミド化合物の添加によるチオール基の選択的ラベル化を利用した非還元 SDS-PAGE を行い、過酸化水素濃度に対して酸化型 hGal-1 のフラクションを定量した。

2. hGal-1 のレドックス依存的な機能変化

hGal-1 変異体のレドックス依存的な機能を評価するため、赤血球凝集実験を行った。赤血球に還元型 hGal-1 を添加すると、赤血球表面の糖鎖を認識して赤血球の凝集を起こす一方で、糖結合能を失った酸化型 hGal-1 は赤血球凝集活性を示さないことが知られている。実験の結果、Cys2-Cys130 変異体、Cys42-Cys60 変異体は酸化型、還元型ともに赤血球凝集を示したが、Cys16-Cys88 変異体は野生型 hGal-1 と同様、還元型で赤血球を凝集させ、酸化型で赤血球凝集を示さなかった（図 2）。これらの結果から、Cys16-Cys88 ペアが hGal-1 の機能変調に重要であることが明らかとなった。

3. hGal-1 のレドックス依存的な構造変化

機能変調に重要なシステインペアをもつ Cys16-Cys88 変異体のレドックス依存的な構造を評価するために、変異体の酸化型、還元型 hGal-1 の溶液 NMR 測定を行った。その結果、良好な HN-TROSY-HSQC スペクトルの取得に成功し、レドックス依存的な hGal-1 の構造変化が示唆された（図 3a）。また、詳細なスペクトル解析の結果、還元型の信号は全体的に分散しており、高次構造を保持していることがわかった。一方で、酸化型の信号は中央部に密集している信号も観察されたことから、一部の構造が崩壊していることが示唆された。さらに、酸化型の信号数はアミノ酸残基数よりも非常に多く、分散信号の強度が還元型よりも弱いことから、酸化型は、少なくても 2 状態間の平衡であることが示唆された。

酸化型から還元型への可逆性を調べるため、酸化型に還元剤である DTT を添加し、NMR 測定を行った。その

結果、信号数が多く、中央に密集していた酸化型の信号とは異なり、還元型の信号に一致したスペクトルが得られ、hGal-1 の酸化還元には可逆性があることがわかった（図 3b）。

以上の結果、hGal-1 の 1 つのシステインペア（Cys16-Cys88）がレドックス依存的な構造変化及び機能変調に必須であることがわかった。

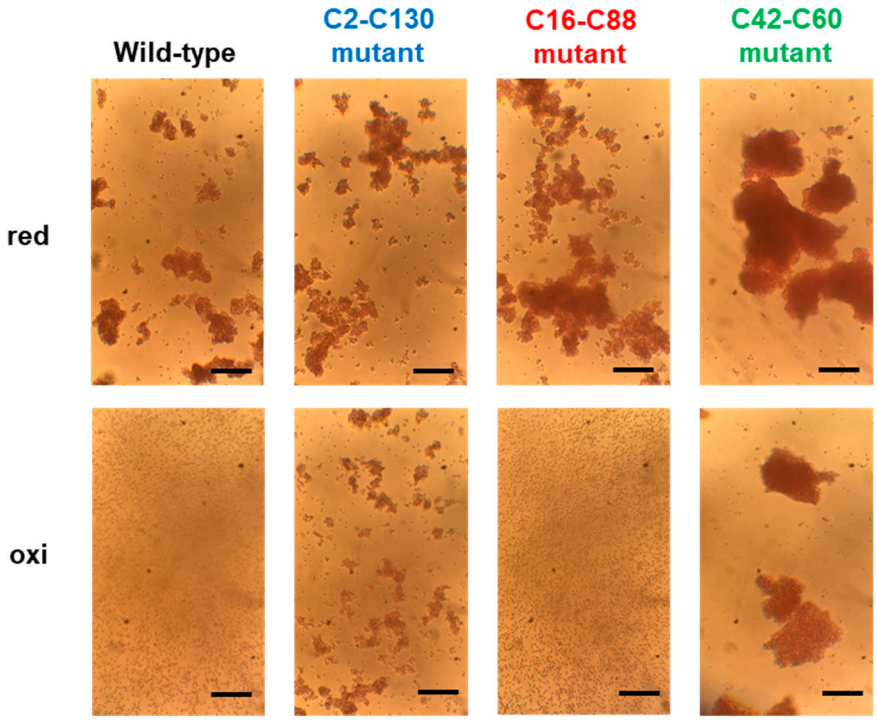


図 2. hGal-1 変異体のレドックス依存的な機能変化

hGal-1 変異体の酸化型及び還元型存在下における赤血球の様子を示した。

スケールバーは 100 μ m を示す。

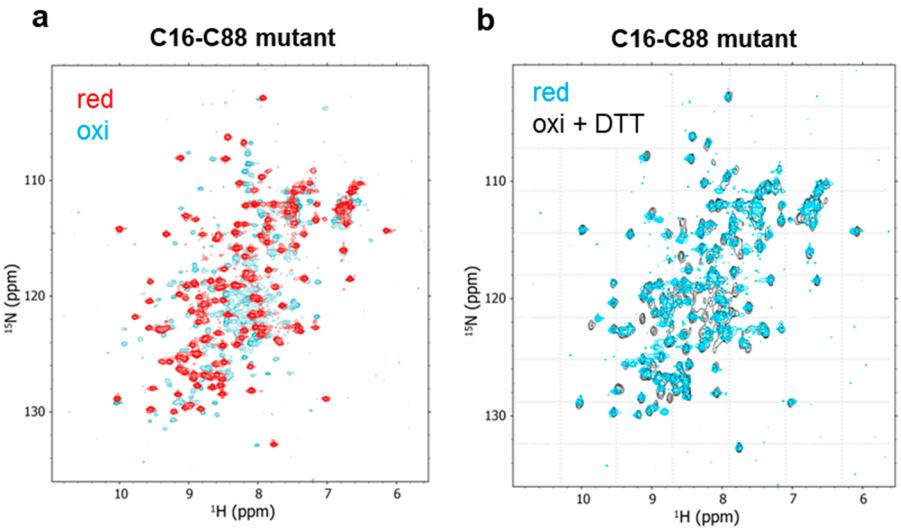


図 3. hGal-1 変異体のレドックス依存的な構造変化

a） 酸化型、還元型 hGal-1 変異体の HN-TROSY-HSQC スペクトル。

b） 還元型、酸化型 hGal-1 変異体+還元剤の HN-TROSY-HSQC スペクトル。

4. レドックス酵素 PDI による hGal-1 のレドックス制御

生命維持に hGal-1 のレドックス制御が重要であると考えられるが、生体内でどのようにして hGal-1 のレドックスが制御されているのか、詳細は長らく不明であった。そこで我々は、hGal-1 のレドックス制御因子の一つとしてレドックス酵素群である protein disulfide isomerase（PDI）ファミリーに着目した。PDI ファミリーは、レドックス機能により小胞体で生合成された新生タンパク質の酸化的フォールディング（ジスルフィド結合形成を伴った折りたたみ）を触媒する酵素として知られ 20 種類以上存在する［4］。一方、一部の PDI ファミリー酵素は細胞外に存在しており、細胞外での多様な生命現象及び疾患への関与が報告されているが［5, 6］、小胞体内局在 PDI ファミリーに比べて細胞外 PDI ファミリーの作用機序の多くは不明である。

PDI による hGal-1 の Cys16-Cys88 変異体の酸化反応を追跡した結果、PDI によって Cys16-Cys88 ペアのジスルフィド結合形成が促進されることがわかった（図 4）。この結果から、PDI が hGal-1 のレドックス制御因子であることが示唆された。今後、細胞外に存在する hGal-1 及び PDI ファミリーのレドックスを介した作用機序の理解は、細胞外レドックスが関与する生命現象及び疾患の解明のカギとなる知見が期待できる。

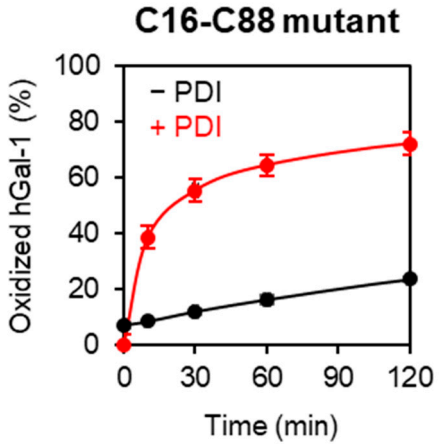


図 4. PDI による hGal-1 変異体の酸化反応
マレイミド化合物の添加によるチオール基の選択的ラベル化を利用した非還元 SDS-PAGE を行い、反応時間に対して酸化型 hGal-1 のフラクションを定量した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、神戸学院大学薬学部の黒井邦巧助教、北海道大学先端生命科学研究院の久米田博之博士、韓国基礎科学支援研究院の李映昊教授、徳島大学先端酵素学研究所の齋尾智英教授、松﨑元紀助教、東北大学薬学部の中林孝和教授、東北大学学際科学フロンティア研究所の奥村正樹准教授である。本研究にご支援賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より御礼を申し上げます。

文　献

1） Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. Nat Rev Nephrol. 2019 Jun;15(6):346-366. doi: 10.1038/s41581-019-0129-4. PMID: 30858582; PMCID: PMC6590709.

2） Jung TY, Jung S, Ryu HH, Jeong YI, Jin YH, Jin SG, Kim IY, Kang SS, Kim HS. Role of galectin-1 in migration and invasion of human glioblastoma multiforme cell lines. J Neurosurg. 2008 Aug;109(2):273-84. doi: 10.3171/JNS/2008/109/8/0273. PMID: 18671640.

3) Horie H, Kadoya T, Hikawa N, Sango K, Inoue H, Takeshita K, Asawa R, Hiroi T, Sato M, Yoshioka T, Ishikawa Y. Oxidized galectin-1 stimulates macrophages to promote axonal regeneration in peripheral nerves after axotomy. J Neurosci. 2004 Feb 25;24(8):1873-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4483-03.2004. PMID: 14985427; PMCID: PMC6730408.
4) Kanemura S, Matsusaki M, Inaba K, Okumura M. PDI Family Members as Guides for Client Folding and Assembly. Int J Mol Sci. 2020 Dec 8;21(24):9351. doi: 10.3390/ijms21249351. PMID: 33302492; PMCID: PMC7763558.
5) Kaiser BK, Yim D, Chow IT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH, Strong RK, Groh V, Spies T. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. Nature. 2007 May 24;447(7143):482-6. doi: 10.1038/nature05768. Epub 2007 May 9. PMID: 17495932.
6) Xu X, Chiu J, Chen S, Fang C. Pathophysiological roles of cell surface and extracellular protein disulfide isomerase and their molecular mechanisms. Br J Pharmacol. 2021 Aug;178(15):2911-2930. doi: 10.1111/bph.15493. Epub 2021 May 29. PMID: 33837960.