

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05095

研究課題名（和文）細胞における遅延制御反応場の形成機構と機能発現の探求

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of kinetically controlled reaction fields in cells

研究代表者

奥村 正樹 (Okumura, Masaki)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・准教授

研究者番号：50635810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 31,500,000円

研究成果の概要（和文）：領域内の生化学、構造生物学、細胞生物学、計算科学、有機合成化学の学際融合共同研究によって、新たな細胞内化学的触媒反応場を発見し、その機能の理解として、フォールディング触媒のための遅延制御であることを突き止めた。さらに、酵素の活性亢進を制御出来る酸化還元化合物の開発にも成功し、今後反応遅延制御の反応場の化学制御が可能になると期待できる。以上、従来の酵素反応の「酵素-基質 1対1反応」の概念を「酵素反応場-基質の“多分子-対-多分子”反応」へと変革した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題ではオルガネラ内での液滴形成と、その内部での酵素反応遅延の発見に至った。遅延反応場としての液滴の新たな生命機能を示す革新的な研究と位置づけられ、シグナル伝達に限らず、様々な細胞内化学反応を制御するメソスケール反応場として、液滴の概念を飛躍的に拡張する可能性を秘める。その学術的意義は遅延反応場としての液滴が「酵素-基質 1対1反応」という従来酵素反応の常識を変革する、新たな「酵素反応場-基質の“多分子-対多分子”反応」と明示される上位概念を創出することが期待できる。本酵素が神経変性疾患や 2 型糖尿病と関わることが指摘されていることから、新たな治療戦略に繋がる可能性があり、その社会的意義は高い。

研究成果の概要（英文）：Based on interdisciplinary collaborative research involving biochemistry, structural biology, cell biology, computational science, and organic synthetic chemistry, we discovered a new catalytic reaction field for the kinetic-controlled folding catalysis. Furthermore, we developed de novo redox compounds that control enzyme activity, enabling chemical control of the reaction field to kinetically control protein folding. Taken together, this result paves the way to understanding the paradigm "multi-molecule-to-multi-molecule reaction of enzyme reaction field-substrate".

研究分野：生体関連化学

キーワード：反応遅延制御 LLPS 酸化的フォールディング 活性亢進剤

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の四次構造形成は、生体における究極の非対称分子集合化反応である。複数本のポリペプチド鎖が折り畳まり、精緻に集積される工程は、造形とも呼べる。この生体における造形プロセスの反応機構は、生物学においても未解明である。試験管内における基質ポリペプチド鎖と酵素の反応では、四次構造形成効率は大幅に低下する。つまりこの過程は、従来の「酵素-基質 1 対 1 反応」の概念では理解することができず、その解明には酵素反応の概念を変革する必要がある。四次構造形成の起点は、複数種のポリペプチド鎖の局所濃縮である。この点について研究代表者は、細胞内で形成される液液相分離 **droplet** が、四次構造基質ポリペプチド鎖を選択的に濃縮することを発見し、四次構造形成過程の一端を明らかにした。さらにその内部のレドックス環境により四次構造形成 **folding** が遅延制御されていることが示唆され、濃縮から **assembly, folding** の一連の四次構造形成過程の完全解明に近づきつつある。本研究における四次構造形成過程の詳細な機構解明は、人工環境での四次構造形成、さらには非天然高分子鎖の四次構造形成を可能にする人工造形場構築の道を切り拓く。

### 2. 研究の目的

本研究では、「酵素による液液相分離 **droplet**」という細胞内の動的反応場に注目し、生体内の四次構造 **folding** の制御メカニズムを解明する。特に、**droplet** 内にポリペプチド鎖が濃縮され、遅延制御によって四次構造形成が制御されるメカニズムを分子レベルで明らかにする。具体的には、濃縮から **folding, assembly** に至る一連の蛋白質の四次構造形成プロセスを解明し、そこに含まれる重要な物理的、化学的制御因子を特定することを目的とする。特に、研究代表者東北大学奥村が最近発見した四次構造形成過程におけるレドックス遅延制御が、**folding** と **assembly** を効率的に進める鍵反応であると考えられ、その分子レベルでの理解を目指す。本研究の核となる「細胞内酵素による **droplet** 反応場形成」や「**Droplet** 反応場における分子集積と **folding** 遅延」は、本研究代表者の研究を通して見出された新概念である。このように、本研究代表者のこれまでの研究基盤に立脚し「**droplet** 反応場における蛋白質四次構造形成過程の完全解明」を目指す点に、本研究の独自性がある。さらに、酵素による **droplet** は、酵素学における概念を変革し得るものである。近年、細胞内に形成される **droplet** は、シグナル伝達などの細胞内機能を合理的に説明する、相分離で駆動する分子濃縮場として注目され、様々な蛋白質から成る **droplet** が報告されている。これに対し、本研究代表者による酵素 **droplet** の発見は、酵素が形成する初めての **droplet** であり、「酵素反応場」としての **droplet** の新機能を示唆する。このように、従来の酵素反応の「酵素-基質 1 対 1 反応」の概念を「酵素反応場-基質の“多分子-対-多分子”反応」へ変革する点に、本研究の創造性と発展性がある。

### 3. 研究の方法

本研究は、研究領域において、非対称分子集合体のボトムアップ構築を可能にする「メソスケール反応場での生体遅延制御システムの解明」を目指す研究として位置づけられる。その解明は、非対称ヘテロ分子集合体の人工構築をはじめ可能にする人工材料開発の基盤学を提供する。研究代表者によって初めて見出された「酵素 **droplet**」を具体的研究対象とし、反応を遅延する酵素の新たな反応形態「酵素反応場-基質の“多分子-対-多分子”反応」の新概念を創出する。その機序と機能を分子レベルで解明し、蛋白質の濃縮から **folding, assembly** に至る未解明の細胞内蛋白質四次構造形成過程を探求する。未だ現象論にとどまっている問いに対し、酵素 **droplet** を分子生物学的手法により要素分解し、個々の要素の効果・機能を定量的に調べ、解き明かす。2021 年度は、小胞体内化学的触媒反応場の形成メカニズムを明らかにするため、分子生物学的手法により構成成分やトリガーとなる因子を抽出した。既に、細胞内化学的触媒反応場の形成因子を見出しており、2021 年度は細胞内化学的触媒反応場の形成および消失メカニズムを明らかにするため、A01 班齋尾と協力し、NMR 測定による立体構造・ダイナミクス解析を行った。その結果、細胞内化学的触媒反応場の形成因子の構造変化を捉えることに成功した。また、2021 年度は、細胞内化学的触媒反応場の可視化を目指し、屈折率を活かしたホロトモグラフィ顕微鏡を設置し、*in vitro* での化学的触媒反応場の形成と消失の可視化に成功した。さらに、本化学的触媒反応場に取り込まれる因子を幾種か同定し、本反応場内の屈折率の変化を追うことが可能となった。この結果は本化学的触媒反応場に蛍光標識した各因子を取込む結果と **consistent** であり、本化学的触媒反応場の内部の **packing** 状態の評価を可能とした。2022 年度は、細胞内化学的触媒反応場の形成メカニズムを明らかにするため、分子生物学的手法により構成成分やトリガーとなる因子を抽出した。2021 年度から細胞内化学的触媒反応場の形成因子を見出しており、2021 年度から引き続き 2022 年度は、細胞内化学的触媒反応場の形成および消失メカニズムを明らかにするため、A01 班齋尾と協力し、NMR 測定による立体構造・ダイナミクス解析を行った。その結果、細胞内化学的触媒反応場の形成因子のアミノ酸アサイメントを終えただけでなく、構造変化を捉えることに成功した。さらに、化学的触媒反応場に不可欠な領域の特定に至った。さらに、前年度から引き続き、細胞内化学的触媒反応場の可視化を目

指し、屈折率を活かしたホロトモグラフィ顕微鏡を設置した(Park ら *Nat. Photonics* 2018)。その結果、幾種かのシャペロン、酵素、基質、低分子化合物の濃縮の可視化に成功し、濃縮における選択性を示すことが出来た。さらに前年度の課題であった細胞内検証において、U2OS 細胞を用いて、免疫沈降法を用いて検証した結果、細胞内 foci を確認することが出来た。また、C01 班村岡と協力し、反応遅延制御の反応場の化学制御が可能になると考えられる、幾種かの酸化還元化合物を開発し論文として発表した。

2023 年度は、細胞内化学的触媒反応場の形成メカニズムを明らかにするため、構造生物学、生化学、分子生物学的手法の融合により、その構成成分やトリガーとなる因子を抽出することを目指した。2021 年度細胞内化学的触媒反応場の形成因子を見出し、2022 年度 A01 班齋尾と協力し、NMR 測定による細胞内化学的触媒反応場の形成時の立体構造・ダイナミクス解析を行い、化学的触媒反応場に不可欠な領域の特定に至った。さらに、細胞内化学的触媒反応場の内部の可視化を目指し、屈折率を活かしたホロトモグラフィ顕微鏡を設置した結果、幾種かのシャペロン、基質の濃縮を特定することが出来た。最終年度である 2023 年度は、特定した因子の生理学的機能の理解と、細胞内化学的触媒反応場の可視化を行った。細胞内化学的触媒反応場の機能の理解に関して、試験管内の実験において本化学的触媒反応場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。次に、細胞内化学的触媒反応場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化学触媒反応場の触媒活性がさらに亢進されることがわかった。細胞内化学的触媒反応場の可視化において、細胞内触媒反応場の因子を安定に発現させた U2OS 細胞を作成し、foci の形成の有無を確認し終えた。現在、論文投稿を目指している。また、C01 班村岡と協力し、反応遅延制御の反応場の化学制御が可能になると考えられる、幾種かの酸化還元化合物を開発し論文として発表した。さらにこの化合物は、小胞体内の幾つかの酵素の活性亢進にも役立っていることを示した。

#### 4. 研究成果

2021 年度は、小胞体内化学的触媒ネットワークに関し、生化学的、構造生物学手法により構成成分やトリガーとなる因子の構造機能相関研究の成果として、Matsusaki...and **Okumura\*** *Biology* 10(11) 1112 2021; Tanikawa...and **Okumura\*** *molecules* 26 2853 2021; **Okumura\*** et al., *Structure* 29 1357-1370 2021; Hirayama et al., *iScience* 4 102296 2021 に発表した。また、小胞体内化学的触媒ネットワークの総説として、**Okumura** et al., *Current Opinion in Structural Biology* 66 49-57 2021 にまとめた。C01 班村岡と協力し、新たな酸化還元分子を創製し、Okada...**Okumura\*** and Muraoka\* *molecules* 26(4) 879-879 2021 に発表した。

2022 年度は、インスリンの品質管理に関して、Kuramochi...and **Okumura\*** *Peptide Science* 83-84 2023; **Okumura\*** et al., *bioRxiv* 2023.04.08.536135 2023 に発表した。C01 班村岡と協力し、新たな酸化還元分子を創製し、Okada, et al., *Chem.Lett.* (52) 202-205 2023; Nishino, et al., *RSC adv* 12 26658-26664 2022 に発表した。また、日本語総説として、月刊細胞 特集「LC (Low-Complexity) ドメインの生物学」と日本結晶学会誌にまとめた。A01 班齋尾、C01 班村岡と、*Biophysics and Physicobiology* に、遅延制御の概念を発表した。

2023 年度は、C01 班村岡と協力し、反応遅延制御の反応場の化学制御が可能になり、Okada...**Okumura\*** and Muraoka\* *Chem. Sci.* 14 7630-7636 2023 に発表し、さらに小胞体内の幾つかの酵素の活性亢進にも役立っていることを示し、Kuramochi...Muraoka\* and **Okumura\*** *Chem Comm* in press に発表した。インスリンの品質管理に関して、Arai,# **Okumura,#** et al., *Communications Chemistry*6(1) 2023 に発表した。A01 班齋尾と協力し、シャペロンによる基質認識について、Saio\*...and **Okumura\*** *bioRxiv* 2024.03.04.583432 2024 に発表した。以上、反応遅延制御の反応場の化学制御について、A01 班齋尾、C01 班村岡と Muraoka,\* **Okumura,\*** and Saio.\* *Chem. Sci.* 15 2282-2299 2024 に総説としてまとめた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Muraoka, T*, Saio, T, and Okumura, M	4. 巻 19
2. 論文標題 Biophysical elucidation of neural network and chemical regeneration of neural tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e190024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v19.0024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishino, H., Kitamura, M., Okada, S., Miyake, R., Okumura, M., and Muraoka, T.*	4. 巻 12
2. 論文標題 Cysteine-based protein folding modulators for trapping intermediates and misfolded forms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 26658-26664
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okada, S., Matsumoto, Y., Okumura, M., and Muraoka, T.*	4. 巻 52
2. 論文標題 Oxidative Protein Folding Promotion by Imidazolyl-conjugated Thiol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chem.Lett.	6. 最初と最後の頁 202-205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 *Okumura M, Kanemura S, Matsusaki M, Kinoshita M, Saio T, Ito D, Hirayama C, Kumeta H, Watabe M, Amagai Y, Lee YH, Akiyama S, and *Inaba K.	4. 巻 29
2. 論文標題 A unique leucine-valine adhesive motif supports structure and function of protein disulfide isomerase P5 via dimerization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.str.2021.03.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsusaki M, Okada R, Tanikawa Y, Kanemura S, Ito D, Lin Y, Watabe M, Yamaguchi H, Saio T, Lee YH, Inaba K, and *Okumura M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional Interplay between P5 and PDI/ERp72 to Drive Protein Folding.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10111112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanikawa Y,# Kanemura S,# Ito D, Lin Y, Matsusaki M, Kuroki K, Yamaguchi H, Maenaka K, Lee YH, Inaba K, and *Okumura M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Ca <sup>2+</sup> Regulates ERp57-Calnexin Complex Formation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26102853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okumura M, Noi K, and *Inaba K.	4. 巻 66
2. 論文標題 Visualization of structural dynamics of protein disulfide isomerase enzymes in catalysis of oxidative folding and reductive unfolding.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr Opin Struct Biol.	6. 最初と最後の頁 49-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbi.2020.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okada S, Matsusaki M, *Okumura M, and *Muraoka T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Conjugate of Thiol and Guanidyl Units with Oligoethylene Glycol Linkage for Manipulation of Oxidative Protein Folding.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26040879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirayama C, Machida K, Noi K, Murakawa T, Okumura M, Ogura T, Imataka H, and *Inaba K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Distinct roles and actions of protein disulfide isomerase family enzymes in catalysis of nascent-chain disulfide bond formation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 14件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 奥村正樹
2. 発表標題 各階層における酸化的フォールディング触媒システムの理解
3. 学会等名 第22回 日本蛋白質科学会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Okumura
2. 発表標題 Structural insights into the protein control system mechanism by PDI family, the endoplasmic reticulum-resident chaperone/enzyme
3. 学会等名 Protein Folding, Aggregation, Misfolding Disease, and Disease Crosstalk(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Okumura
2. 発表標題 Protein Disulfide Isomerase family; their molecular actions and functions
3. 学会等名 Redox Week in Sendai 2022(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村正樹
2. 発表標題 小胞体内における酸化的フォールディング触媒ネットワークの理解
3. 学会等名 第95回 日本生化学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村正樹
2. 発表標題 PDIファミリーのシャペロン機能の理解：プロテオスタスと神経変性疾患
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村正樹
2. 発表標題 ホログラフィック顕微鏡を用いた相分離観察例の紹介
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村正樹
2. 発表標題 各生物学的階層におけるタンパク質品質管理の理解
3. 学会等名 神戸学院大学セミナー 知の創造セミナー 4回目（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Okumura
2. 発表標題 Understanding the mechanism by which Protein Disulfide Isomerase (PDI) family guide proper oxidative folding
3. 学会等名 Zoominar "Amyloid Symposium" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥村正樹
2. 発表標題 基質触媒におけるPDI酵素群の動的会合体形成の理解
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Okumura
2. 発表標題 Understanding the proteostasis network in the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 Korea-Japan Joint Workshop on Biofunctional Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村正樹
2. 発表標題 PDI familyの動的な会合による小胞体内タンパク質品質管理の理解
3. 学会等名 分子生物学会 WS (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村正樹
2. 発表標題 小胞体内で液滴を形成する因子の生理学的機能の理解
3. 学会等名 第5回LLPS研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村正樹
2. 発表標題 小胞体内酸化的フォールディングの触媒システムの理解
3. 学会等名 第21回 日本蛋白質科学会 年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村正樹
2. 発表標題 プロテインジスルフィドイソメラーゼ群による基質触媒機構の解明
3. 学会等名 天野財団第22回酵素応用シンポジウム研究奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 金村進吾, 稲葉謙次, 奥村正樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本結晶学会誌 64, 209-210	5. 総ページ数 2
3. 書名 小胞体ジスルフィド結合触媒ネットワークを支える酵素群の構造基盤	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ラボホームページ  
<https://web.tohoku.ac.jp/okumura/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------