

令和元年5月21日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07381

研究課題名(和文) 哺乳動物細胞小胞体におけるタンパク質のジスルフィド結合形成機構

研究課題名(英文) Mechanisms of protein disulfide bond formation in the ER of mammalian cells

研究代表者

門倉 広 (Kadokura, Hiroshi)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：70224558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ジスルフィド結合の形成は、分泌タンパク質の立体構造形成に極めて重要である。哺乳動物細胞の小胞体内には、ジスルフィド結合形成に関わると予想されるPDIファミリータンパク質が20種類存在している。本研究では、これらの酵素のうち、膵臓で特異的に発現しているが機能は不明だった、PDIpの基質候補タンパク質をマウス組織から網羅的に同定した。また、PDIpには消化酵素エラスターゼの前駆体の凝集体形成を抑制する働きがあることを発見した。更に、小胞体ストレスセンサーIRE1は、膵細胞でPDIファミリータンパク質の発現量維持に働いており、その機能はインスリンの効率良い立体構造形成に必要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、私達は、膵臓で作られる消化酵素のうちのエラスターゼと呼ばれるタンパク質分解酵素が正しい立体構造に折り畳まれる過程に必要な新規の因子PDIpを発見しました。マウスの膵臓を調べたところ、PDIpは、エラスターゼ以外にも、トリプシン、キモトリプシン、 α -アミラーゼなど膵臓で作られる様々な消化酵素に作用することが分かりました。よって、これらの消化酵素が正しい立体構造に折り畳まれる過程でもPDIpは働いている可能性があります。本研究から得られる知見は、将来的には、膵臓に関連する病気の原因の解明やヒト由来の消化酵素を微生物や動物細胞の培養によって生産させる際に役立つと期待されます。

研究成果の概要(英文)：Formation of disulfide bonds is a crucial step in the folding of a huge number of secretory proteins. The ER of mammalian cells houses twenty PDI family members, which are supposed to catalyze disulfide bond formation in secretory proteins. PDIp is a PDI family member predominantly expressed in the pancreas. Here, we show that PDIp interacts directly with a number of digestive enzymes in vivo and assists in the folding of one of these enzymes, leading to our proposal that PDIp is a PDI family member dedicated to the folding of pancreatic digestive enzymes. Furthermore, we show that IRE1, an ER stress sensor, plays a crucial role in the production of insulin by upregulating the biosynthesis of some PDI family members. These findings provide new insights into the disulfide bond formation system of mammalian cells.

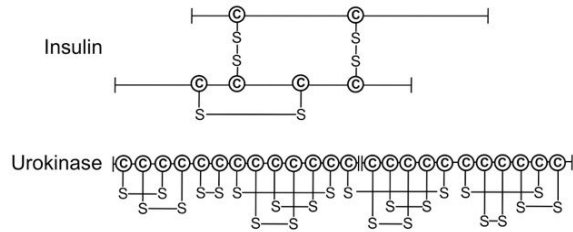
研究分野：応用生物化学

キーワード：ジスルフィド結合 哺乳動物 膵臓 分泌タンパク質 小胞体 PDI 物質生産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ジスルフィド結合は、2つのシステインが酸化されて形成される共有結合であり(左図)、分泌タンパク質や膜タンパク質の立体構造形成に重要である。



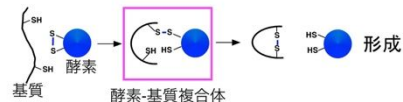
ヒトホルモンや抗体など有用なタンパク質の多くは分子内にジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質である。このような有用タンパク質を微生物で生産する際には、正確なジスルフィド結合形成が上手く行えないことが、障害の一つになっている。

これは微生物のジスルフィド結合形成システムと哺乳動物のシステムの何らかの違いに起因していると考えられる。更に、哺乳動物では分泌タンパク質にジスルフィド結合がうまく形成されないことが糖尿病などの様々な遺伝疾患の原因になる。よって、哺乳動物の分泌タンパク質にジスルフィド結合を形成する仕組みの解明は基礎的に重要であるばかりでなく応用の面からも重要である。

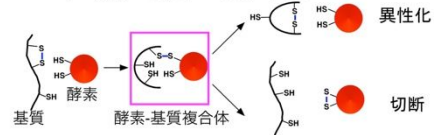
真核生物では分泌タンパク質へのジスルフィド結合の導入はPDIファミリータンパク質と呼ばれる一群の酵素によって触媒されている。PDIファミリータンパク質は、基質上の2つのシステインを酸化する、あるいは基質上のジスルフィド結合を切断・異性化することによって、基質への正しいジスルフィド結合の導入を促進すると考えられる(右図)。後者の反応は間違ったシステイン間に導入されたジスルフィド結合を修復するために必要である。

哺乳動物の小胞体には、このようなジスルフィド結合の形成・異性化・切断反応を触媒すると予想されるPDIファミリータンパク質が20種類も存在する。このように多くの酵素が存在するのは、基質タンパク質がもつ多様な構造に対応するためだと考えられる。しかし、個々の酵素の役割の違いは殆ど分っていない。その大きな要因としては各酵素の生体内における基質が不明であることが挙げられる。

I. ジスルフィド結合の形成(酸化)



II. ジスルフィド結合の異性化・切断(還元)



2. 研究の目的

本研究では次の2つのアプローチによって、哺乳動物細胞の小胞体内に存在するジスルフィド形成システムの特質を理解することを目的とした。

(1) 小胞体内に存在するPDIファミリータンパク質のうち、分泌タンパク質を大量に生産する膵臓で特異的に発現している酵素PDIpの生理的な基質を同定する。更に、この情報を利用してPDIpの具体的な機能を解明する。

(2) 低酸素条件下、ジスルフィド結合形成に働くシステムを理解するために、低酸素条件下に誘導合成される血管内皮細胞増殖因子(VEGF)にジスルフィド結合を導入する酵素を同定する。

以上のような解析から得られる知見は微生物を利用して哺乳動物由来の有用タンパク質を生産するための基盤となると期待される。

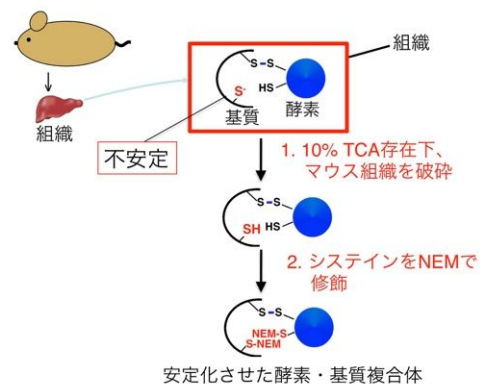
3. 研究の方法

PDIファミリータンパク質が基質である分泌タンパク質に作用する際には、酵素(PDIファミリータンパク質)と基質が分子間のジスルフィド結合で連結した酵素・基質複合体を一過的に形成する(右上図)。

このような中間体は一般的には極めて不安定であるが、申請者らは、哺乳動物の組織中で生成するこのような中間体をトリクロロ酢酸(TCA)とN-エチルマレイミド(NEM)を利用して安定化し(右図)、生体試料から精製する技術を世界に先駆けて確立している。

本研究では、このように精製した酵素・基質複合体を質量分析法で解析することによって、特定のPDIファミリータンパク質(ここではPDIp)と相互作用する基質および特定の基質(ここではVEGF)と相互作用する酵素の同定を目指した。

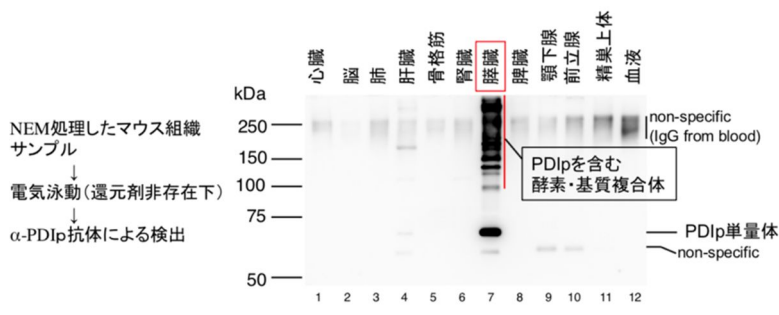
更に、特定のPDIファミリータンパク質の具体的な働きを明らかにするためには、このようにして同定した基質候補タンパク質の生合成に、当該酵素の有無がどのような影響を及ぼすのかを解析した。



4. 研究成果

(1) 膵臓で特異的に発現しているPDIファミリータンパク質PDIpの生理機能の解明

複数のPDIファミリータンパク質についてマウス個体における臓器分布を調べたところ、PDIp、



P5、ERp46は、膵臓で高発現していることがわかった。特に、PDIpは膵臓で特異的に発現していた(左図)。そこで、本研究では重要臓器である膵臓で特異的に発現しているという興味深い性質をもつPDIpの機能を明らかにすることにした。そのためには、

まず、次のような方法によって、PDIpの生理的な基質を同定した。

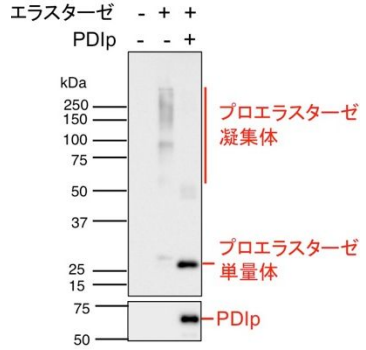
PDIpと複合体を形成するタンパク質

分類	名前	Coverage(%)
消化酵素群	α -Amylase	68
	Chymotrypsinogen B	44
	Trypsin-1	36
	Chymopsin	32
	Elastase-1	31
	Pancreatic triacylglycerol lipase	31
	Elastase-2	29
	Trypsin-4	29
	Inactive pancreatic lipase-related protein 1	13
消化酵素前駆体分泌補助酵素	Syncollin	26
PDIファミリータンパク質酸化酵素	Prx4	61
	ERO1 β	41
PDIファミリータンパク質	P5	45
	ERp46	25

シン、エラスターゼなどの消化酵素の元となるタンパク質(活性型の消化酵素になる前のタンパク質)と結合することが分かった。

膵臓には、主にインスリンなどの血中ホルモンを生産する内分泌細胞と、消化酵素を生産する外分泌細胞が存在する。マウスの膵臓から内分泌細胞と外分泌細胞を分取し、PDIpの分布を調べた。その結果、PDIpは膵臓の内分泌細胞ではなく、外分泌細胞に存在すること、即ち、PDIpは消化酵素を作る膵臓の外分泌細胞で働いていることが分かった。この結果はPDIpが消化酵素の元となるタンパク質と結合するという上記の知見と合致する。

興味深いことに、同定されたタンパク質の一つであるエラスターゼをヒト由来培養細胞株中で発現させると、エラスターゼの前駆体であるプロエラスターゼが細胞内で凝集体を形成した。一方、エラスターゼと一緒にPDIpを発現させると、プロエラスターゼの凝集体の形成が抑制され、正しい立体構造をもつプロエラスターゼが細胞中に作られ(右図)、更に細胞外に放出された。また、PDIp存在下生成されたプロエラスターゼを微量のトリプシンで処理すると活性型のエラスターゼを得ることができた。このような実験から、消化酵素の一つであるエラスターゼの正しい折り畳み過程に、PDIpが必要になることが判明した。



更に、PDIp以外の代表的なPDIファミリー酵素を、ヒト由来培養細胞株中でエラスターゼと一緒に発現させても、PDIp以外の酵素は、PDIpの機能を代替することができなかった。よって、PDIpは、進化の過程で、消化酵素の一つであるエラスターゼの折り畳み過程を促進するための機能を獲得したと考えられる。本研究から得られた知見は、膵臓に関連する病気の原因の解明やヒト由来の消化酵素を微生物によって生産させる際に役立つと期待される。平成30(2018)年度に、本研究成果をJ. Biol. Chem.誌に発表した。

(2) 低酸素条件下誘導合成される血管内皮細胞増殖因子(VEGF)のジスルフィド結合形成に働く酵素の探索

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は、低酸素条件下に線維芽細胞やガン組織から分泌される増殖因子で血管の新生を促進する。VEGFは医療用の薬剤として人類に貢献する一方、VEGFの発現を抑制すると固形ガンの生育が阻害される。よって、本増殖因子の生合成過程の理解は応用的観点からも重要である。VEGFはホモダイマーを形成し、モノマー内およびモノマー間に計8個のジスルフィド結合を持つ。しかし、VEGFの生合成に関わるPDIファミリータンパク質は不明だった。以上のような理由から本研究では、低酸素条件下VEGFのジスルフィド結合形成に働く因子を同定することを目的とした。そのためには、まず、嫌氣的な条件下HeLa細胞中でプラスミドから発現させたVEGFが活性型(2量体構造)になりうるかを調べた。プラスミドから発現させたVEGFは、嫌氣的条件下において、二量体を形成できなかった。一方、マウス個体中では、VEGFは嫌氣条件下においても正しく折りたたまれて機能を発揮する。よって、嫌氣的条件下VEGFが正しく折りたたまれるためには、おそらくは、特定のジスルフィド結合導入酵素が

必要だと予想される。そこで、様々な PDI ファミリー遺伝子を VEGF とともに共発現させその影響を調べたが、VEGF の二量体化を促進する酵素は見いだせなかった。よって、VEGF を生産する細胞に特異的な因子が、VEGF の嫌気的条件下におけるジスルフィド結合形成に必要な可能性がある。今後は以上の情報を、VEGF の嫌気的条件下における立体構造形成に必要な因子の探索に役立てたい。

(3) 小胞体ストレスセンサーIRE1 α の膵 β 細胞における機能の解析

小胞体ストレスセンサーの 1 つである IRE1 α は膵ランゲルハンス島 β 細胞中で PDI ファミリータンパク質の発現量の維持に働いており、その機能はプロインスリンの効率良い折りたたみに必要であることを見出した。平成 29(2017)年度には、その成果を J. Cell Biol.誌に発表した。

更に、PDI ファミリータンパク質を含む thiol-disulfide oxidoreductase の基質を同定するために利用されてきた方法についてまとめ Protein Sci.誌に総説として発表した[平成 30(2018)年度]。申請者が独自に開発した手法(「研究の方法」参照)についても、その中で詳しく解説した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Fujimoto T, Inaba K, Kadokura H. (2019) Methods to identify the substrates of thiol-disulfide oxidoreductases. Protein Sci. 28: 30-40. (doi: 10.1002/pro.3530)(査読あり)

Fujimoto T, Nakamura O, Saito M, Tsuru A, Matsumoto M, Kohno K, Inaba K, Kadokura H. (2018) Identification of the physiological substrates of PDIP, a pancreas-specific protein disulfide isomerase family member. J Biol Chem 293, 18421-18433. (doi: 10.1074/jbc.RA118.003694)(査読あり)

Tsuchiya Y, Saito M, Kadokura H., Miyazaki J-I, Tashiro F, Imagawa Y, Iwawaki T, Kohno K. (2018) IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic β cells. J Cell Biol 217, 1287-1301. (doi: 10.1083/jcb.201707143.)(査読あり)

[学会発表](計 23 件)

(うち、招待講演 5 件、国際発表 12 件)

Takushi Fujimoto, Ori Nakamura, Michiko Saito, Akio Tsuru, Masaki Matsumoto, Kenji Kohno, Kenji Inaba, Hiroshi Kadokura 「Elucidation of physiological function of PDIP, a pancreas-specific protein disulfide isomerase family member protein」 International Symposium on “ Proteins; from the Cradle to the Grave ” (2018 年)(国際シンポジウムポスター発表)

Takushi Fujimoto, Ori Nakamura, Michiko Saito, Akio Tsuru, Masaki Matsumoto, Kenji Kohno, Kenji Inaba, Hiroshi Kadokura 「Physiological function of PDIP, a pancreas-specific protein disulfide isomerase family member protein」 5th CWRU-Tohoku Joint Workshop (2018 年) (国際ワークショップポスター発表)

Takushi Fujimoto, Ori Nakamura, Michiko Saito, Akio Tsuru, Masaki Matsumoto, Kenji Kohno, Kenji Inaba, Hiroshi Kadokura 「Physiological substrates of PDIP, a pancreas-specific protein disulfide isomerase family member protein」 FASEB conference Protein Folding in the Cell (2018 年) (国際会議ポスター発表)

Yo Fukuda, Yui Dazai, Naoya Hirai, Ori Nakamura, Kenji Inaba, Hiroshi Kadokura 「Observing co-translational oxidative folding of a cell surface protein in the ER of mammalian cells」 CLS, Tokyo Tech. International Forum 2018 “ Redox regulation of protein functions, transcription, translation and folding” (2018 年) (国際フォーラムポスター発表)

福田 洋, 太宰 結, 中村織江, 稲葉謙次, 門倉 広 「LDL 受容体の新生ポリペプチド鎖におけるジスルフィド結合形成機構の解析」 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017 年) (ポスター発表)

Yui Dazai, Ori Nakamura, Yo Fukuda, Kenji Inaba, Hiroshi Kadokura 「Cotranslational oxidative folding of a cell surface membrane protein in mammalian cells」 International Symposium on Protein Quality Control (2017 年) (国際会議ポスター発表)

Hiroshi Kadokura 「Observing cotranslational oxidative folding of a cell surface membrane protein」 Microbial Genetics and Genomics VII (2017 年)(国際会議招待講演)

太宰 結、中村織江、稲葉謙次、門倉 広 「哺乳動物細胞小胞体内における LDL 受容体新生ポリペプチド鎖の酸化のフォールディング機構の解析」 2017 年度日本農芸化学会大会 (2017 年) (口頭発表)

太宰 結、稲葉謙次、門倉 広 「哺乳動物細胞小胞体における LDL レセプター新生ポリペプチド鎖の酸化のフォールディング機構」 第 39 回 日本分子生物学会年会 (2016 年) (ポスター発表) (優秀ポスター賞)

土屋 雄一、斎藤 美知子、門倉 広、芝 陽子、宮崎 純一、岩脇 隆夫、河野 憲二 「膵臓細胞における IRE1 経路の生理的活性化はプロインスリンの酸化の折りたたみ酵素の発現維持に働く」 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年) (ポスター発表)

藤本拓志、斎藤美知子、都留秋雄、松本雅記、河野憲二、稲葉謙次、門倉 広 「膵特異的に発現している PDI ファミリータンパク質(PDIp)の生理的な機能の解析」 第 89 回日本生化学会大会 (2016 年) (口頭発表)

Hiroshi Kadokura 「Observing disulfide bond formation in a cell surface protein as the polypeptide chain elongates from the ribosome in mammalian cells」 Nascent chain biology meeting (2016 年) (国際シンポジウム招待講演)

Takushi Fujimoto, Michiko Saito, Akio Tsuru, Masaki Matsumoto, Kenji Kohno, Kenji Inaba, Hiroshi Kadokura 「Physiological function of pancreas-specific PDI family protein (PDIp)」 Nascent chain biology meeting (2016 年) (国際会議ポスター発表)

Yui Dazai, Kenji Inaba, Hiroshi Kadokura 「Mechanisms of oxidative folding of newly-synthesized LDL receptor in the ER of mammalian cells」 Nascent chain biology meeting, (2016 年) (国際会議ポスター発表)

Takushi Fujimoto, Michiko Saito, Akio Tsuru, Masaki Matsumoto, Kenji Kohno, Kenji Inaba, Hiroshi Kadokura 「Physiological function of pancreas-specific PDI family protein (PDIp)」 The 9th Tohoku University Campus Asia Chemistry Summer School (2016 年) (国際シンポジウム招待講演)

Yui Dazai, Kenji Inaba, Hiroshi Kadokura 「Mechanisms of disulfide bond formation in a newly-synthesized cell surface protein」 The 9th Tohoku University Campus Asia Chemistry Summer School (2016 年) (国際会議ポスター発表)

門倉 広、稲葉謙次 「哺乳動物分泌蛋白質の新生鎖上にジスルフィド結合を形成する仕組み」 第 16 回 日本蛋白質科学会年会 (2016 年) (シンポジウム招待講演)

藤本拓志、斎藤美知子、都留秋雄、松本雅記、河野憲二、稲葉謙次、門倉 広 「膵特異的に発現している PDI ファミリータンパク質(PDIp)の生理的な基質の同定」 第 16 回日本蛋白質科学会年会 (2016 年) (ポスター発表)

藤本拓志、斎藤美知子、都留秋雄、松本雅記、河野憲二、稲葉謙次、門倉 広 「膵臓特異的に発現している PDI ファミリータンパク質(PDIp)の生理的な機能の解析」 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (2015 年) (ポスター発表)

Hiroshi Kadokura 「Mechanisms of disulfide bond formation in nascent polypeptide chains in the ER of mammalian cells」 From cytosol to ER: Translation, translocation and modification (2015 年) (国際シンポジウム招待講演)

ファミリートンパク質の同定」第 67 回日本細胞生物学会大会 (2015 年) (ポスター発表)

- ⑳ 藤本拓志、斎藤美知子、都留秋雄、河野憲二、稲葉謙次、門倉 広「腓特異的に発現する PDI ファミリートンパク質(PDIp)の生理的機能の解析」第 67 回日本細胞生物学会大会 (2015 年) (ポスター発表)
- ㉑ 藤本拓志、斎藤美知子、都留秋雄、河野憲二、稲葉謙次、門倉 広「腓特異的に発現する PDI ファミリートンパク質(PDIp)の生理的な基質の同定」日本生化学会東北支部第 81 回例会 (2015 年) (ポスター発表)

〔図書〕

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院生命科学研究所 協力講座

<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/teacher/detail---id-19734.html>

プレスリリース (ヒト消化酵素が作られる仕組み-消化酵素が正しい構造に折り畳まれる過程に必要な因子を発見-)

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2018/11/press-20181128-enzyme.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

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、研究者個人に帰属されます。