

令和元年6月4日現在

機関番号：34504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06521

研究課題名(和文) 新生鎖の翻訳伸長反応に伴うジスルフィド結合形成機構の解明

研究課題名(英文) Understanding the molecular mechanism of co-translational oxidative folding in the ER

研究代表者

金村 進吾 (Kanemura, Shingo)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：50803178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「新生鎖の翻訳伸長反応に伴うジスルフィド結合形成機構」に関する新たな概念を提唱するため、「新生鎖のジスルフィド結合形成過程のモニタリングシステム」を開発し、新生鎖のジスルフィド結合形成機構の解明に着手した。その結果、2m新生鎖の場合、翻訳伸長反応中に小胞体内腔においてジスルフィド結合形成するが、プロラクチン、インスリン、BPTI新生鎖の場合、翻訳伸長反応中ではなく、翻訳後にリボソームから解離することでジスルフィド結合が導入されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、新生鎖のジスルフィド結合形成過程の観察に成功した。本成果は今後、インスリンや免疫グロブリンなどの生物学的、医学的にも重要なタンパク質の立体構造を構築する(フォールディング)機序の解明に繋がると期待できる。フォールディング機序の解明は、ミスフォールディングに起因する神経変性疾患などの予防や発症機構の解明にも繋がりに、医学分野への貢献も大いに期待でき非常に意義深い。

研究成果の概要(英文)：In order to provide structural insight into "the mechanism of how oxidative folding occurs co-translationally in the ER", I developed "a monitoring system regarding the reaction of disulfide bond formation of nascent polypeptides". The results indicated that a disulfide bond of the 2m nascent chain is formed in the lumen of the ER during the translation elongation, and disulfide bonds of prolactin, insulin, and BPTI nascent chain are post-translationally formed.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：無細胞タンパク質合成系 セミンタクト細胞 PDIファミリー ジスルフィド結合 新生鎖

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

1. 研究開始当初の背景

全タンパク質の約3分の1は、細胞小器官の一つ小胞体内において、二つのシステインのチオール基間の共有結合(ジスルフィド結合)形成を受け、天然型の立体構造を構築することで生理機能を獲得する。一方、時として非天然型のジスルフィド結合が形成された場合、通常修復や分解除去されるシステムが存在するが、これら異常タンパク質が蓄積するとアルツハイマー病などの神経変性疾患や糖尿病などの疾病の原因となる。このため、生物の生命活動においてタンパク質のジスルフィド結合の形成過程は特に重要であり、生物学的、医学的にも意義深い研究対象である。哺乳動物細胞の小胞体では、タンパク質のジスルフィド結合形成を触媒する酵素として、約20種類ものProtein Disulfide Isomerase (PDI)ファミリー及び幾種かのPDI酸化酵素が同定されており、複雑かつ巧妙なジスルフィド結合形成ネットワークを形成している。これまでに我々は、このネットワークの分子構造基盤の解明に着手し、PDIファミリーの一つErp46の新規構造をX線結晶構造解析とX線溶液散乱法を駆使することにより決定すると共に、その作用機序を明らかにした(*Structure* 2014)。また、PDIファミリーの上流に位置する酵素Ero1の新規活性制御機構及びEro1-PDI、Ero1-ERp44の新たな相互作用様式を提唱し、同ネットワークの分子構造基盤の確立に大きく貢献した(*J. Biol. Chem.* 2014; *Free Radic. Biol. Med.* 2015; *Redox Biol.* 2016; *J. Biol. Chem.* 2016; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017)。すなわち、我々は小胞体におけるジスルフィド結合形成の触媒ネットワークを構成するPDIファミリーやPDI酸化酵素の構造と機能、そしてそれら酵素間の作用機序について幾つもの概念を提供してきた。

しかしながら、上述の知見は、大腸菌から精製した全長の還元変性基質を用いた際の結果に基づいており、新生鎖がリボソームにおける翻訳伸長反応に伴って小胞体内腔へと移行する実際の過程で、どのようにして新生鎖のジスルフィド結合が形成されるのか、その実態は未だ不明である。特に近年、新生鎖に関する論文は国際一流雑誌に数多く報告されつつあるが(Shen et al. *Science* 2015; Goldman et al. *Science* 2015)、新生鎖のジスルフィド結合形成の仕組みについての報告例は殆どない。また、複数のジスルフィド結合を含むタンパク質において、迅速に天然型のジスルフィド結合を導入することは、ミスフォールド体の蓄積や凝集を抑え、天然構造を構築する上で重要な化学反応であるが、未解決問題として残されている。

2. 研究の目的

本研究では新生鎖のジスルフィド結合の形成過程をモニタリングするシステムの開発を目指し、さらに生体における「新生鎖の翻訳伸長反応に伴うジスルフィド結合形成機構」に関する新たな概念を提唱する。

3. 研究の方法

(1) 「新生鎖のジスルフィド結合形成過程のモニタリングシステムの開発」

本システムは、無細胞タンパク質合成系と、界面活性剤処理によって小胞体などの細胞小器官は無傷で細胞膜のみ透過性にしたセミインタクト細胞を組み合わせたものである。

無細胞タンパク質合成系は、翻訳合成に必要な因子(リボソーム、翻訳開始因子、伸長因子、翻訳終結因子、tRNA、アミノ酸)が入ったライセートにmRNAを添加することにより、試験管内で簡単にタンパク質を合成できる。そこにセミインタクト細胞を混合することにより、試験管内ではなく実際の細胞の小胞体内に目的の新生鎖を発現させる革新的な手法である。この手法は目的タンパク質を1アミノ酸残基レベルで調節した新生鎖を意図的に発現させることができ、生細胞では不可能な「新生鎖の停滞状況」を模倣することができる。これにより、1アミノ酸残基レベルでの詳細な解析が達成可能となる。

(2) 「上記システムを利用した新生鎖のジスルフィド結合形成機構の解明」

基質の普遍性：新生鎖として、ジスルフィド結合の形成経路が試験管内の実験により同定されている酸化的フォールディングのモデル基質Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI)や、2-microglobulin (2m)、プロラクチン、インスリンなど、大きさやジスルフィド結合の数が異なる基質を比較対象として選定する。

新生鎖の翻訳停滞：リボソーム内のトンネルの全長は約63アミノ酸残基であることが知られており、これを基にしてmRNAを作成する。その際、ストップコドンを含まないmRNAを作成することで、リボソームとカップルした新生鎖の複合体の調製ができ、翻訳合成の停止を模倣することができる。

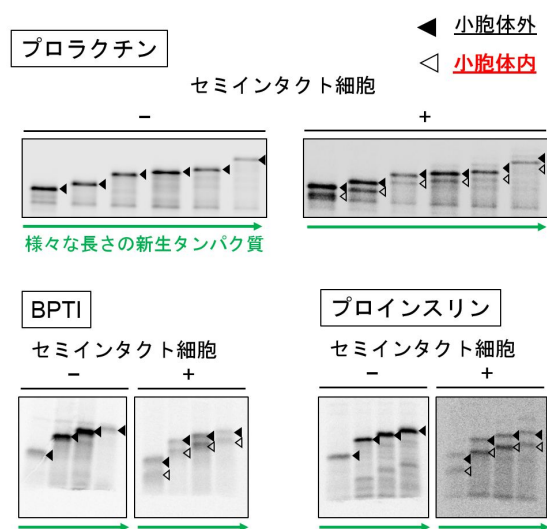
新生鎖の長さやジスルフィド結合の数：mRNAは、様々な目的の長さ(主にシステインの数を考慮)になるように目的タンパク質のプラスミドDNA、各種プライマー、RNA合成酵素を用い試験管内で作成する。そのように調整したmRNAを用いることで、1アミノ酸残基レベルで小胞体に露出させ、翻訳合成途中の新生鎖の解析が可能であり、ジスルフィド結合形成が翻訳合成途中のどのタイミングで、どの順番で、どのPDIファミリーによって触媒されるのかを明らかにできる。

4. 研究成果

(1) 新生鎖のジスルフィド結合形成過程のモニタリングシステムを開発するため、新生鎖と

して α -ヘリックスリッチで比較的単純な構造をとり三つのジスルフィド結合を持つプロラクチン (PPL)を選定した。様々な長さの PPL の mRNA を作製し、無細胞タンパク質合成系とセミンタクト細胞を混合した溶液に加え、反応させた。反応溶液を SDS-PAGE 解析した結果、PPL 新生鎖の小胞体膜通過に伴うシグナルペプチドの切断や小胞体内腔での糖鎖付加反応を検出することができた。すなわち、新生鎖の小胞体内腔への挿入に成功した(図)。

(2) 上記システムを用いて新生鎖のジスルフィド結合形成機構の解明を目指した。基質として、PPL 以外に *in vitro* 酸化的フォールディングのモデル基質である BPTI や、糖尿病に関わるインスリン、透析アミロイドーシスに関わる α 2m を選定した。それぞれの基質の様々な長さの mRNA を作製し、セミンタクト細胞の小胞体内に発現させ、翻訳合成途上の新生鎖の解析を SDS-PAGE により行った。その結果、すべての新生鎖において小胞体膜通過に伴うシグナルペプチドの切断や小胞体内腔での糖鎖付加反応を検出することができ、新生鎖の小胞体内腔への挿入に成功した(図)。次に、PPL 新生鎖内のジスルフィド結合形成の有無を還元および非還元 SDS-PAGE により調べたが、バンドの変化はなく、PPL 新生鎖内のジスルフィド結合形成は観測



されなかった。さらに、PPL 新生鎖の立体構造の安定性を評価するためサーモリシン耐性を調べたが、いずれの長さの新生鎖も速やかな分解を受けたことから、PPL 新生鎖は高次の立体構造を形成していないと考えられる。一方で、RNase A によってリボソームから PPL を解離させると、PPL 内にジスルフィド結合が形成することがわかった。その他、基質に対しても同様の解析を行った。その結果、 α 2m 新生鎖の全長が小胞体内腔に露出した時にジスルフィド結合形成することがわかった。しかしながら、BPTI やインスリンの両新生鎖のジスルフィド結合形成は PPL 新生鎖と同様に観測されなかった。一方、BPTI やインスリン新生鎖も RNase A によってリボソームから新生鎖を解離させると、ジスルフィド結合形成が観測された。これらの結果から、 α 2m の場合、小胞体内腔において翻訳伸長反応中にジスルフィド結合形成することが考えられるが、プロラクチン、BPTI、インスリンの場合、翻訳伸長反応中ではなく、翻訳後にリボソームから解離することでジスルフィド結合が導入されることがわかった。

以上より、新生鎖のジスルフィド結合は従来定説であった翻訳後だけでなく、リボソームによる翻訳伸長反応中にも形成し得ることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

Matsusaki M.#, Kanemura S.#, Kinoshita M.#, Lee Y. H., Inaba K. and Okumura M. (#These authors contributed equally to this work.) "The protein disulfide isomerase family: from proteostasis to pathogenesis" *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.*, 査読有、in press, 10.1016/j.bbagen.2019.04.003

Okumura M.#, Noi K.#, Kanemura S., Kinoshita M., Saio T., Inoue Y., Hikima T., Akiyama S., Ogura T. and Inaba K. (#These authors contributed equally to this work.) "Dynamic assembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative protein" *Nat. Chem. Biol.*, 査読有、15, 499-509 (2019), 10.1038/s41589-019-0268-8

O'Brien H., Kanemura S., Okumura M., Baskin R. P., Bandyopadhyay P. K., Olivera B. M., Ellgaard L., Inaba K. and Safavi-Hemami H. "Ero1-mediated reoxidation of PDI accelerates the folding of cone snail toxins", *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有、19, E3418 (2018), 10.3390/ijms19113418

[学会発表](計 3件)

金村進吾、奥村正樹、Neil Bulleid、稲葉謙次 "小胞体内における新生鎖のジスルフィド結合形成機構の解明" 第19回日本蛋白質科学会年会、2019年

金村進吾、奥村正樹、Neil Bulleid、稲葉謙次 "小胞体内腔における新生鎖のジスルフィド結合形成反応の解析" 第18回日本蛋白質科学会年会、2018年

金村進吾、奥村正樹、Neil Bulleid、稲葉謙次 "小胞体内腔における新生ポリペプチド鎖のジスルフィド結合形成をモニタリングするシステムの開発" 2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年

〔図書〕(計 1 件)

金村進吾、奥村正樹、稲葉謙次 “ X 線小角散乱解析が明らかにした PDI ファミリータンパク質 ERp46 及び PDI 酸化酵素 Ero1 の構造ダイナミクスと機能 ”、分子研レターズ、76, 34-36, (2017)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。