

機関番号：17102

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19687005

研究課題名（和文） 蛋白質ジスルフィド結合の創生に関わる細胞マシーナリの構造生物化学

研究課題名（英文） Structural studies on the cellular machineries involved in protein disulfide bond generation

研究代表者

稲葉 謙次（INABA KENJI）

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：10423039

研究成果の概要（和文）：

ジスルフィド結合の形成・開裂は、タンパク質の高次構造形成およびミスフォールドタンパク質の分解除去において極めて重要な酸化還元反応である。本研究代表者は、大腸菌およびヒト細胞の小胞体におけるタンパク質ジスルフィド結合において中心的役割を担う膜酸化酵素 DsbB とフラビン酵素 Ero1 α の構造生物化学的研究を主たる研究テーマとして進め、それらの結晶構造解析に成功した。この成果に加え、ミスフォールドタンパク質の分解除去に関わるジスルフィド結合還元酵素 ERdj5 全長の結晶構造解析にも成功し、同酵素が促進する一連の小胞体関連分解経路の分子機構を解明するに至った。

研究成果の概要（英文）：

The formation and cleavage of disulfide bonds play a critical role in the folding into native protein structure and the elimination of misfolded proteins. Receiving the support by a Grant-in-Aid for Young Scientists (A) from MEXT, I have accomplished structural and biochemical analyses of DsbB, an *E. coli* membrane protein, and Ero1 α , a human flavoenzyme, both of which are responsible for protein disulfide bond generation in cells. I also succeeded in the crystal structure analysis of ERdj5, a protein disulfide reductase that accelerates degradation of misfolded proteins and thereby clarified its mechanism of operation to drive the ER-associated degradation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：ジスルフィド結合、レドックス、細胞品質管理、DsbB、Ero1

1. 研究開始当初の背景

二つのシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合は、蛋白質の高次構造形成のみならず機能発現制御に大きく寄与し、細胞品質管理において極めて重要な化学結合である。本研究課題では、細胞における蛋白質

ジスルフィド結合形成システムの構造生物学的研究を展開し、その機能発現メカニズムを分子構造レベルで解明する。特に大腸菌における DsbB-DsbA システム、およびヒト細胞の小胞体に存在する Ero1 α -PDI システムを対象とし、両システムの機能発現メカニズムに

関する知見を照合することにより、細胞内でのジスルフィド結合形成に関する普遍的原理を見だし、独創的学問分野を確立する。

2. 研究の目的

大腸菌における DsbB-DsbA システム、およびヒト細胞の小胞体に存在する Ero1 α -PDI システムを主たる研究対象とし、両システムの機能発現メカニズムの解明を目指した構造生化学的研究を展開する。さらに小胞体中に生じたミスフォールドタンパク質の分解除去を促進するジスルフィド結合還元酵素 ERdj5 の構造解析にも着手し、ERdj5 が駆動する蛋白分解経路の一連の作用機序を分子構造レベルで詳細に解明する。

3. 研究の方法

研究対象とするジスルフィド結合形成・開裂因子について、X 線結晶構造解析を主たる手段として構造決定を行った。また構造情報に基づく機能解析について、細胞を用いた *in vivo* 解析と精製系を用いた *in vitro* 解析の両方を遂行した。

4. 研究成果

2006 年に発表した DsbB-DsbA-ユビキノン反応中間複合体の結晶構造に加え(Inaba* et al., *Cell*, 2006)、DsbA が結合する前の反応始状態の DsbB 膜酸化酵素の結晶構造をモノクローナル抗体 Fab フラグメントとの共結晶化により成功するに至った (Inaba* et al., *EMBO J.*, 2009)。これら二つの状態の結晶構造と 2009 年にアメリカのグループにより報告された DsbA 酸化後の DsbB の NMR 構造(Zhou et al., *Mol Cell*, 2008)を詳細に比較することにより、DsbB が DsbA にジスルフィド結合を受け渡す過程における DsbB の巧妙な構造ダイナミクスが明らかとなった (Inaba* *J. Biochem.* 2009; Inaba* *Genes Cells*, 2010)。以上得られた構造生物学的知見は、本研究代表者がそれまでに提唱した DsbB による DsbA 酸化反応機構モデルおよび DsbB とユビキノンによるジスルフィド結合新規創生の化学スキームを強くサポートし、まさに「大腸菌におけるタンパク質ジスルフィド結合形成システムの分子基盤」を確立するに至った。

さらに、高等生物細胞のタンパク質品質管理に関わるジスルフィド形成・開裂因子の構造生物学および生化学的研究を新たに開始し、幾つかの成果をあげるに至った。その成果の一つとして、ヒト細胞内での蛋白質ジスルフィド結合形成において中心的役割を担うフラビン酵素 Ero1 α 全長の結晶構造解析を成功するに至った (Inaba* et al., *EMBO J.*, 2010)。これにより、同酵素が FAD 分子と共役してジスルフィド結合を創りだすための反応中心の構造と化学スキームを原子レベ

ルで明らかにした。興味深いことに、Ero1 α はジスルフィド結合を創りだすに伴い活性酸素種の源である過酸化水素を産出し酸化ストレスを誘発することが知られている。本研究において Ero1 α の高活性状態および不活性状態両方の結晶構造を解き、さらに並行して進めた系統的な生化学実験により、Ero1 が小胞体内のレッドックス環境を鋭敏にセンスし、その活性を制御する巧妙な分子機構も解明した。

ヒト細胞の小胞体の中には Protein Disulfide Isomerase (PDI)ファミリーの蛋白質が 20 種類以上も同定されているが、Ero1 α はその中でも PDI のみを特異的に酸化する。その結果、Ero1 α -PDI 酸化システムは効率的に蛋白質ジスルフィド結合を導入すると考えられている。本研究代表者が解いた Ero1 の結晶構造と以前報告されている PDI の構造データを基にドッキングシミュレーション及び系統的な変異体解析を行い、Ero1 α による PDI の特異的な認識機構において、Ero1 α 中の突出した β ヘアピンと PDI b'-domain に存在する疎水性ポケット間の特異的な相互作用が重要な役割を担うことを解明するに至った (Masui et al., *J. Biol. Chem.* 2011)。

さらにもう一つの成果として、本来酸化的な環境である小胞体においてミスフォールドした蛋白質のジスルフィド結合を還元し、その分解 (小胞体関連分解: ERAD) を促進する酵素 "ERdj5" 全長の結晶構造解析にも成功した (Hagiwara et al., *Mol. Cell* 2011)。ERdj5 は、PDI ファミリーの因子の中で最も大きい (~90 kDa) マルチドメイン蛋白質であり、その低い発現効率および高い凝集性のため結晶化には多くの困難を伴ったが、徹底したサンプル調整条件および結晶化条件の検討の結果、2.4 Å 分解能でその構造を解くに至った。また、得られた ERdj5 全長の構造情報を基に機能解析を進め、ERdj5 が促進する小胞体関連分解経路の分子機構モデルを提唱するに至った。以上の研究成果は、ヒト細胞小胞体中のタンパク質品質管理に関わる二つの重要な経路 (高次構造形成の促進とミスフォールドタンパク質の分解) の作用機序の解明につながり、国内外で活発に研究が進められている小胞体品質管理の学問分野において大きく貢献した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件; 英文 12 件、和文 8 件)

(査読付き英文論文)

Masui, S., Vavassori, S., Fagioli, C., Sitia, R. and Inaba, K.* "Molecular basis of cyclic and specific

disulfide interchange between human Ero1 α and PDI” *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 16261-16271

Hagiwara, M., Maegawa, K., Suzuki, M., Ushioda, R., Araki, K., Matsumoto, Y., Hoseki, J., Nagata, K.* and Inaba, K.* “Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident disulfide reductase ERdj5” *Mol. Cell* 41 (2011) 432-444
★雑誌の表紙を飾る

Ishitani, S., Inaba, K., Matsumoto, K. and Ishitani, T. “Homo-dimerization of Nemo-like kinase is essential for activation and nuclear localization” *Mol. Biol. Cell* 22 (2011) 266-277

Inaba, K.*, Masui, S., Iida, H., Vavassori, S., Sitia, R. and Suzuki, M. “Crystal structures of human Ero1 α reveal the mechanisms of regulated and targeted oxidation of PDI” *EMBO J.* 29 (2010) 3330-3343

Inaba, K.* “Structural basis of protein disulfide bond generation in the cell” *Genes to Cells*, 15 (2010) 935-943

Serve, O., Kamiya, Y., Maeno, A., Nakano, M., Murakami, C., Sasakawa, H., Yamaguchi, Y., Harada, T., Kurimoto, E., Yagi-Utsumi, M., Iguchi, T., Inaba, K., Kikuchi, J., Asami, O., Kajino, T., Oka, T., Nakasako, M. and Kato, K. “Redox-dependent intramolecular domain rearrangement of protein disulfide isomerase coupled with exposure of its substrate-binding hydrophobic surface.” *J. Mol. Biol.* 396 (2010) 361-374

Inaba, K.*, Murakami, S., Nakagawa, A., Iida, H., Kinjo, M., Ito, K. and Suzuki, M. “Dynamic nature of disulfide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB” *EMBO J* 28 (2009) 779-791

Inaba, K.* “Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*” *J. Biochem.* 146 (2009) 591-597

Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K., Akiyama, S., Ito, K. and Akiyama, Y. “A pair of circularly permuted PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*” *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 35042-35052

Ito, K. and Inaba, K. “The disulfide bond formation (Dsb) system” *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2008) 450-458

Inaba, K.* “Protein disulfide bond generation in *Escherichia coli* DsbB-DsbA” *J. Synchr. Rad.* 15 (2008) 199-201 ★雑誌の表紙を飾る

Inaba, K. and Ito, K. “Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine” *Biochem. Biophys. Acta. Molecular Cell Research* 1783 (2008) 520-529

(和文総説)

萩原 誠智、永田 和宏、稲葉 謙次 「小胞体に内在するジスルフィド還元酵素 ERdj5 により促進される小胞体関連分解経路の構造的な基盤」新着論文ニューズレター (URL: <http://first.lifesciencedb.jp/archives/2403#more-2403>)

稲葉 謙次 「小胞体品質管理を支えるジスルフィド結合形成・開裂因子の構造基盤」生体機能関連化学ニューズレター Vol. 25 (2011) p3-6

稲葉 謙次 「DsbB の結晶構造が解かれるまで一臥薪嘗胆、初志貫徹」実験医学 (羊土社) Vol.26 (2009) p945-948

稲葉 謙次 「大腸菌における DsbB-DsbA タンパク質ジスルフィド結合形成システムの構造と機能発現メカニズム」日本結晶学会誌 第 51 巻 (2009) p100-103

稲葉 謙次、伊藤 維昭 「構造が明らかにしたジスルフィド結合の形成機構」蛋白質核酸酵素、共立出版、Vol. 52 (2007) p853-861

稲葉 謙次 「タンパク質ジスルフィド結合の形成に関わる酵素群—構造が明らかにしたそのメカニズム」酵素工学ニュース、日本酵素工学会、Vol. 57 (2007) p17-23

伊藤 維昭、稲葉 謙次 「ジスルフィド結合の形成メカニズム」Medical Bio、オーム社、Vol. 4 (2007) p58-65

稲葉 謙次、伊藤 維昭 「細胞内に張り巡らされた蛋白質ジスルフィドネットワーク」蛋白質の一生 集中マスター、羊土社 (2007) p77-85

[学会発表] (計 29 件 ; 国際学会 12 件、国内学会 17 件)

(国際学会)

Inaba, K. (invited)

“Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5” The 10th conference of the Asian Crystallographic Association, Busan, Korea, Oct. 31-Nov. 3, 2010

Inaba, K. (invited)

“Structural basis of regulated protein disulfide bond formation in human cells” The 3rd international symposium on protein community, Nara, Japan, Sept. 13-16, 2010

Inaba, K. (invited)

“Structures of mammalian Ero1a and ERdj5” Gordon Reserch Conference on thiol-based redox regulation & signaling, Lucca, Italy, May 9-14, 2010

Inaba, K. (invited)

“Structure and mechanism of the DsbB-DsbA protein disulfide generation system in E. coli” XXI Congress and General Assembly of the International union of Crystallography, Osaka, Japan, Aug 23-30, 2008

Inaba, K. (invited)

“Structural basis for protein disulfide generation in the cell” Gordon conference on thiol-based redox regulation & signaling, Lucca, Italy, May 25-30, 2008

Inaba, K. (invited)

“Structural basis of the DsbA-DsbB-UQ oxidative system in E. coli.” Boden Conference on disulfide bonds and their role in protein folding and function, Queensland, Australia July 29 – August 2, 2007

他 6 件

(国内学会)

稲葉 謙次 (招待講演)

“Convergent evolution of the protein disulfide bond formation systems in the biological kingdoms” BMB2010、神戸 Dec. 7-10, 2010

稲葉 謙次 (招待講演)

「細胞品質管理に関わるタンパク質ジスルフィド結合形成・開裂因子の構造的基盤の確立」第 3 2 回日本分子生物学会年会 第 7 回日本分子生物学会三菱化学奨励賞受賞記念講演会、横浜、Dec. 11, 2009

他 1 5 件

[図書] (計 4 件)

稲葉 謙次 「ジスルフィド結合、チオレドキシシンフォールド、Dsb 蛋白質」キーワード：蛋白質の一生、共立出版、Vol. 53, p940, 969, 1043 (2008)

稲葉 謙次、伊藤 維昭「細胞内に張り巡らされた蛋白質ジスルフィドネットワーク」蛋白質の一生 集中マスター、羊土社、p77-85

(2007)

Inaba, K. and Ito, K. “Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation.”

Spring 8 Research Frontier 2006 p16-17 (2007)

Inaba, K. “The Structural and Chemical Basis of Protein Disulfide Bond Formation in E. coli” *KEK Highlight 2006* p42-43 (2007)

[その他]

受賞

2009 年 12 月 第 7 回日本分子生物学会三菱化学奨励賞

研究題目：細胞品質管理に関わるタンパク質ジスルフィド結合形成・開裂因子の構造的基盤の確立

2009 年 4 月 文部科学大臣表彰若手科学者賞
研究題目：細胞における蛋白質ジスルフィド結合形成の分子機構の研究

研究室ホームページ

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/pgpc/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲葉 謙次 (INABA KENJI)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：10423039