

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16092

研究課題名（和文）PDIファミリー酵素が触媒する新生鎖の酸化的フォールディング機構の解明

研究課題名（英文）Understanding the molecular mechanism by which PDI family catalyze oxidative protein folding of nascent chains

研究代表者

金村 進吾（Kanemura, Shingo）

関西学院大学・理学部・助教

研究者番号：50803178

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の機能発現に必須の酸化的フォールディングは、PDIファミリー酵素によって触媒される。本研究によって、タンパク質の二次構造がフォールディングにおける天然型のジスルフィド結合形成を促進させていることを明らかにした。さらに、PDIファミリー酵素ERp57、P5、PDI酸化酵素GPx7/8の構造機能相関を明らかにした。このように、PDIファミリー酵素が関与する小胞体内タンパク質品質管理ネットワークの一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化的フォールディングの制御破綻は、アルツハイマー症、筋萎縮性側索硬化症をはじめとした神経変性疾患、糖尿病などの原因として知られている。本研究において、新生鎖の酸化的フォールディング機構及びPDIファミリー酵素による触媒機構を明らかにした。本研究結果は、タンパク質品質管理機構だけでなく神経変性疾患などの発症機構の解明にも繋がり、医学分野への貢献も大いに期待できる。

研究成果の概要（英文）：Oxidative protein folding, which is essential for protein function, is catalyzed by PDI family enzymes. This study revealed that the secondary structure of proteins promotes the formation of native disulfide bonds in the folding. Furthermore, the structural and functional correlations of the PDI family enzymes ERp57, P5 and PDI oxidase GPx7/8 were clarified. Thus, we elucidated a part of the protein quality control network in the endoplasmic reticulum.

研究分野：生化学、構造生物学、生物物理学、タンパク質科学

キーワード：小胞体 ジスルフィド結合 酸化的フォールディング 新生鎖 PDIファミリー

## 1. 研究開始当初の背景

全タンパク質の約3分の1は、細胞小器官の一つである小胞体内において、2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)形成を伴った酸化的フォールディングを受け、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の形成はミスフォールド体の蓄積や凝集を促し、これら異常タンパク質の蓄積が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、タンパク質のジスルフィド結合形成過程、つまり、酸化的フォールディングの制御はタンパク質の品質を管理する上で特に重要である。近年、哺乳動物細胞の小胞体に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とが明らかになりつつある。我々はこのネットワークの分子構造基盤の解明に大きく貢献してきた。しかしながら、これまで我々が得てきた知見は、大腸菌等から精製した全長の還元変性基質タンパク質を使用した結果である。実際、タンパク質は、生体内においてリボソーム上での翻訳合成と同時に新生鎖として小胞体内腔へと挿入され、小胞体内腔でPDIファミリー等の酵素によって酸化的フォールディングを受ける。それゆえ、生体内でのPDIファミリー酵素によるタンパク質の酸化的フォールディング触媒機構を真の意味で理解するためには、新生鎖に対するPDIファミリーの触媒過程の理解が必要不可欠である。しかしながら、現状では新生鎖の酸化的フォールディングを触媒するPDIファミリーを観察した例は殆どなく、どのようにして新生鎖のジスルフィド結合が形成され、天然型の立体構造を獲得するのか、その実態は未だ不明である。特に、リボソーム上で新生鎖が翻訳合成され小胞体内腔へと挿入される過程において、どのタイミングでどのように新生鎖の酸化的フォールディングが進行するか、またどのPDIファミリー酵素が触媒するか、本質的かつ核心的な「問い」が未だ残されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、革新的技術「新生鎖のジスルフィド結合形成過程モニタリングシステム」を開発し、「PDIファミリー酵素が触媒する新生鎖の酸化的フォールディング機構」に関する新たな概念を提唱することを目的とした。

- (1) 「新生鎖の酸化的フォールディング機構の解明」
- (2) 「精製タンパク質を用いたジスルフィド結合形成機構の解明」
- (3) 「PDIファミリーの構造解析」

## 3. 研究の方法

- (1) 「新生鎖の酸化的フォールディング機構の解明」

無細胞タンパク質合成系とセミインタクト細胞を組み合わせた新規システムにより、新生鎖を1アミノ酸残基レベルで小胞体に露出させ、翻訳合成途上の新生鎖の解析を行った。

- (2) 「精製タンパク質を用いたジスルフィド結合形成機構の解明」

精製した全長の還元変性基質のジスルフィド結合の形成機構及びPDIファミリー、PDI酸化酵素の機能を電気泳動法、分光法により解析した。

- (3) 「PDIファミリーの構造解析」

X線溶液散乱実験により溶液中の構造情報を取得し、各結晶構造に基づいた構造モデリングを行った。

## 4. 研究成果

- (1) 「新生鎖の酸化的フォールディング機構の解明」

新生鎖として大きさやジスルフィド結合の数が異なる3つの基質(2マイクログロブリン、プロラクチン、ADAMメタロペプチダーゼドメイン10)を選定した。新規システムを使用した実験の結果、二次構造を持たないADAMメタロペプチダーゼドメイン10は、まず最初に非天然型のジスルフィド結合が形成された。その後、異性化により天然型のジスルフィド結合が形成されコンフォメーションフォールディングが行われることがわかった。一方で、二次構造を有する2マイクログロブリンやプロラクチンでは、部分的な二次構造形成の後に天然型のジスルフィド結合が形成され、最終的に天然型の立体構造が形成されることがわかった。これらの結果から、タンパク質の二次構造が、フォールディングにおける天然型のジスルフィド結合形成を促進していることがわかった(Robinson, Kanemura, et al., *J. Biol. Chem.* 2020)。

- (2) 「精製タンパク質を用いたジスルフィド結合形成機構の解明」

PDIファミリー酵素 ERp57は、フォールディング補助因子(シャペロン)であるカルネキシン(CNX)やカルレチキュリンとの協調的な酸化的フォールディング触媒機構が提唱されていたが、

どのようにこれら相互作用が制御されているのか不明であった。Clear-native PAGE 解析と等温滴定型熱量計解析により、カルシウム存在下に比べて非存在下で、ERp57 と CNX の相互作用が増大することを明らかにした。さらに、この複合体は、免疫システムに重要なヒト白血球抗原重鎖の酸化的フォールディングを促進させ、凝集を抑制した。これらの結果から、カルシウム枯渇のような異常な環境においてタンパク質の品質を管理するため、ERp57-CNX 複合体が効率よく酸化的フォールディング触媒やシャペロン能を発揮すると考えられる(Tanikawa#, Kanemura#, et al., *Molecules* 2021 #equal contribution)。

PDI ファミリー酵素 P5 の溶液中での二量体形成が基質認識において重要であることを示したが(Okumura, Kanemura, et al., *Structure* 2021)、P5 による基質認識機序は不明であった。Far-western blot 法により P5 と他の PDI ファミリー間との相互作用を調べた結果、P5 は PDI と ERp72 と相互作用することがわかった。P5 と PDI の複合体は酸化的フォールディング触媒を亢進する一方で、P5 と ERp72 の複合体はほとんど触媒効果が見られなかった。また、P5 と PDI の複合体は凝集抑制能(シャペロン能)の向上は見られなかった一方で、P5 と ERp72 の複合体はシャペロン能が亢進した。以上の結果は、基質のフォールディングステージに応じた P5 と PDI および ERp72 との複合体形成が効率的な分泌タンパク質の生産に重要であることを示している。このように、PDI ファミリー酵素間の新たな小胞体内品質管理ネットワークの一端を明らかにした(Matsusaki, Okada, Tanikawa, Kanemura, et al., *Biology* 2021)。

PDI ファミリーの酸化的フォールディング触媒機能を恒常的に維持するため、上流に PDI 酸化酵素が存在する。小胞体内で活性酸素種である過酸化水素を酸化力の源とする PDI 酸化酵素 Glutathione Peroxidase 7/8 (GPx7/8)の詳細な活性化メカニズムを生化学的手法により明らかにした。さらに in vitro、in vivo での GPx7/8 の下流因子の同定に成功し、小胞体内レドックスネットワークにおける新たな経路を提唱した(Kanemura, et al., *J. Biol. Chem.* 2020)。

### (3) 「PDI ファミリーの構造解析」

PDI ファミリー酵素 P5 は、ジスルフィド結合形成触媒以外に、小胞体ストレス応答などの生理機能を発揮することが明らかになっているが、立体構造が未決定であったため、その作用機序は不明であった。X 線結晶構造解析と X 線小角散乱法により、P5 の全長構造を決定した。3 つのチオレドキシシン様ドメインで構成された P5 は N 末端側のドメインを介した二量体であり、さらにその相互作用界面は新規なロイシン-バリン接着モチーフであることを発見した。この P5 の二量体モチーフの欠損は、構造不安定化を誘起し、小胞体ストレスセンサーの制御能を低下させることから、P5 の二量体構造が機能に重要であることを明らかにした。以上のように、新生鎖を触媒する PDI ファミリー酵素の立体構造やその機能を明らかにした(Okumura, Kanemura, et al., *Structure* 2021)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Matsusaki Motonori, Okada Rina, Tanikawa Yuya, Kanemura Shingo, Ito Dai, Lin Yuxi, Watabe Mai, Yamaguchi Hiroshi, Saio Tomohide, Lee Young-Ho, Inaba Kenji, Okumura Masaki	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 -
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 Yuya, Kanemura Shingo, Ito Dai, Lin Yuxi, Matsusaki Motonori, Kuroki Kimiko, Yamaguchi Hiroshi, Maenaka Katsumi, Lee Young-Ho, Inaba Kenji, Okumura Masaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Ca2+ Regulates ERp57-Calnexin Complex Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 -
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 Masaki, Kanemura Shingo, Matsusaki Motonori, Kinoshita Misaki, Saio Tomohide, Ito Dai, Hirayama Chihiro, Kumeta Hiroyuki, Watabe Mai, Amagai Yuta, Lee Young-Ho, Akiyama Shuji, Inaba Kenji	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 -
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ninagawa Satoshi, Tada Seiichiro, Okumura Masaki, Inoguchi Kenta, Kinoshita Misaki, Kanemura Shingo, Imami Koshi, Umezawa Hajime, Ishikawa Tokiro, Mackin Robert B, Torii Seiji, Ishihama Yasushi, Inaba Kenji, Anazawa Takayuki, Nagamine Takahiko, Mori Kazutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Antipsychotic olanzapine-induced misfolding of proinsulin in the endoplasmic reticulum accounts for atypical development of diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.60970	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 Kanemura Shingo, Sofia Elza Firdiani, Hirai Naoya, Okumura Masaki, Kadokura Hiroshi, Inaba Kenji	4. 巻 295
2. 論文標題 Characterization of the endoplasmic reticulum resident peroxidases GPx7 and GPx8 shows the higher oxidative activity of GPx7 and its linkage to oxidative protein folding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12772 ~ 12785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013607	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 Kanemura Shingo, Matsusaki Motonori, Inaba Kenji, Okumura Masaki	4. 巻 21
2. 論文標題 PDI Family Members as Guides for Client Folding and Assembly	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21249351	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 金村進吾, 松崎元紀, 前仲勝実, 稲葉謙次, 奥村正樹	4. 巻 74
2. 論文標題 小胞体内におけるMHCの品質管理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 419-426
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 無
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 Robinson Philip J., Kanemura Shingo, Cao Xiaofei, Bulleid Neil J.	4. 巻 295
2. 論文標題 Protein secondary structure determines the temporal relationship between folding and disulfide formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 2438 ~ 2448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011983	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 Motonori、Kanemura Shingo、Kinoshita Misaki、Lee Young-Ho、Inaba Kenji、Okumura Masaki	4. 巻 1864
2. 論文標題 The Protein Disulfide Isomerase Family: from proteostasis to pathogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.04.003	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

[学会発表] 計14件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 松崎元紀、横山武司、次田篤史、金村進吾、田尻道子、明石知子、齋尾智英、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーの会合状態分布を介した応答制御機構の研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金村進吾、谷川雄哉、伊藤大、林雨曦、松崎元紀、黒木喜美子、山口宏、前仲勝実、李映昊、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 Ca <sup>2+</sup> によるERp57-CNX複合体の構造機能調節メカニズムの解明
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新納翔悟、金村進吾、山口宏、日高雄二、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 PDIファミリー酵素による前駆体タンパク質の酸化的フォールディング触媒機構の解明
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川蘭、金村進吾、山口宏、李映昊、奥村正樹
2. 発表標題 インスリン分解酵素による基質分解メカニズムの解明
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関凧沙、金村進吾、荒井堅太、山口宏、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 プロインスリンのフォールディング中間体の理解
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田莉奈、金村進吾、黒井邦巧、松崎元紀、齋尾智英、山口宏、伊藤大、李映昊、中林孝和、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 酸化還元制御によるヒトガレクチン1の構造機能調節の理解
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金村進吾、奥村正樹、稲葉謙次
2. 発表標題 Elucidating the in vivo oxidative folding mechanism
3. 学会等名 第21回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田莉奈、金村進吾、黒井邦巧、松崎元紀、山口宏、中林孝和、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 Structural basis for redox-regulated galectin1 function
3. 学会等名 第21回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川蘭、金村進吾、山口宏、Lee Young-Ho、奥村正樹
2. 発表標題 Elucidating the degradation mechanism of substrates by IDE
3. 学会等名 第21回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関凧沙、金村進吾、荒井堅太、山口宏、Lee Young-Ho、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 Understanding the folding pathways of proinsulin
3. 学会等名 第21回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川雄哉、金村進吾、伊藤大、Lin Yuxi、松崎元紀、山口宏、黒木喜美子、前仲勝実、Lee Young-Ho、稲葉謙次、奥村正樹
2. 発表標題 Impact of Ca <sup>2+</sup> on the function interplay between ERp57 and Calnexin
3. 学会等名 第21回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kanemura S., Sofia E. F., Hirai N., Okumura M., Kadokura H. and Inaba K.
2. 発表標題 Biochemical characterizations of ER-resident peroxidases, GPx7 and GPx8, reveal their distinct oxidative activities
3. 学会等名 第20回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金村進吾、奥村正樹、Neil Bulleid、稲葉謙次
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第19回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanemura S., Okumura M., Robinson P. J., Bulleid N. J. and Inaba K.
2. 発表標題 Mechanisms of disulfide bond formation of newly synthesized polypeptide chains in the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 International Symposium on Disordered Proteins, Protein Folding, and Disease-causing Aggregation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 液滴及びその製造方法	発明者 奥村正樹、松崎元紀、金村進吾、齋尾智英、稲葉謙次	権利者 学校法人関西学院
産業財産権の種類、番号 特許、2020-100517	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 液滴及びその製造方法	発明者 奥村正樹、松崎元紀、金村進吾、齋尾智英、稲葉謙次	権利者 学校法人関西学院
産業財産権の種類、番号 特許、2021-21437	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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			
韓国	Korea Basic Science Institute			
英国	University of Glasgow			