

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580141

研究課題名(和文)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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ジスルフィド結合形成は、分泌タンパク質(産業上有用なタンパク質の多くが含まれる)にとって立体構造形成上、重要な反応ステップである。哺乳動物細胞の小胞体内には、ジスルフィド結合の形成に関わると予想されるチオレドキシンの酵素が20種存在している。しかし、各酵素の生理的な基質が不明であるため、各酵素の役割の違いはほとんど分かっていない。本研究では、これらの酵素のうちの一つであるJPDIの基質候補タンパク質をマウス組織中から同定した。更に、インシュリンの前駆体と直接相互作用するチオレドキシンの酵素を4種類同定した。これらの発見から分泌タンパク質の立体構造形成過程を理解する上で重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Formation of disulfide bonds is a crucial step in the folding of a number of proteins that go through the secretory pathway. They include proteins with industrial importance such as insulin. The ER of mammalian cells harbors twenty enzymes that belong to thioredoxin-superfamily members (they are also called thioredoxin-like proteins). These enzymes are implicated in the formation of protein disulfide bonds. However, the physiological function of each enzyme is unclear, due to the lack of information on its substrates. To gain insights into the role of JPDI, one of the enzymes, we successfully identified the potential substrates of this enzyme from a mouse tissue. Furthermore, we were able to identify four of thioredoxin-superfamily members that interacted with proinsulin (a precursor of insulin) via formation of an intermolecular disulfide bond. These findings provide insights into the mechanisms of folding of secretory proteins in mammalian cells.

研究分野：農学

キーワード：物質生産 ジスルフィド結合 立体構造形成 分泌タンパク質 小胞体 哺乳動物

1. 研究開始当初の背景

ジスルフィド結合は分泌タンパク質や膜タンパク質の細胞質外ドメインの構造中に見いだされ、これらタンパク質の立体構造形成や、生物機能の発現に重要な役割をはたしている(図1)。

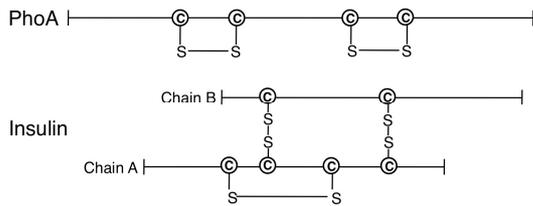
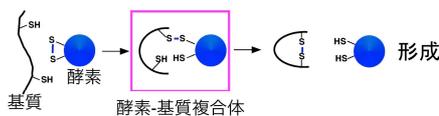


図1. 分泌タンパク質のジスルフィド結合

医療に重要なインシュリンに代表される、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。ジスルフィド結合をもつ有用タンパク質を微生物で大量生産する際には、しばしば、ジスルフィド結合形成がうまくおこなえず、このことが工業生産上のネックになっていることが知られている。更に、哺乳類では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疾病の発症の原因になることが知られている。よって、生体内で分泌タンパク質にジスルフィド結合が形成される仕組みの理解は基礎的に重要であるばかりでなく産業や医療の面からも重要である。

分泌タンパク質へのジスルフィド結合の導入は細菌のペリプラズムや真核生物の小胞体で行われる。いずれの場合にも、分泌タンパク質のジスルフィド結合の形成、異性化、切断反応はチオレドキシンの酵素が促進する(図2)(異性化や切断は間違ったジスルフィド結合の修復等に必要)。

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)

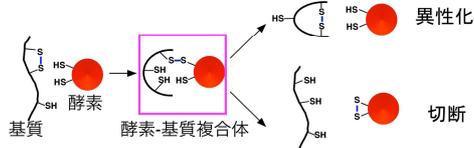


図2 チオレドキシンの酵素によるジスルフィド結合の形成、異性化、切断

哺乳動物細胞の小胞体にはチオレドキシンの酵素が20種知られている。これらの酵素は分泌タンパク質のジスルフィド結合の形成、異性化あるいは切断に関わると予想される。しかし、個々の酵素の具体的な役割はほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

主として次のようなアプローチによって哺乳動物細胞小胞体におけるジスルフィド結合形成システムを理解することを目的とした。

(1) JPDI(ERdj5)の生理的な基質の同定

先述したように哺乳動物細胞の小胞体にはチオレドキシンの構造を分子内に持つ酵素が20種知られている。これらの酵素は分泌タンパク質のジスルフィド結合の形成、異性化、切断等に関わると予想される。しかし、個々の酵素の具体的な役割はほとんど分かっていない。その原因の一つとしては、それぞれの酵素の生理的な基質が不明であることがあげられる。そこで本研究では、哺乳動物細胞の小胞体内に局在するチオレドキシンの酵素(20種類存在する)の各々の働きを理解するための第一歩として、そのうちの一つであるJPDIの生理的な基質を同定することにした。

(2) インシュリンへのジスルフィド結合の導入に關与する酵素の同定

一方、インシュリンは膵細胞から分泌されるペプチドホルモンであり、血液中のグルコース濃度の制御に重要な役割を果たす。インシュリンは分子内に3つのジスルフィド結合を持つ。これらのジスルフィド結合が正しい組み合わせで形成されることがインシュリンの生物活性の発現に重要であり、その形成不全は糖尿病の原因となりうる。したがって、インシュリンのジスルフィド結合形成の仕組みを解明することは重要である。しかし、インシュリンにジスルフィド結合が形成される順番や、この形成反応を促進する酵素はわかっていない。そこで、本研究ではインシュリンにジスルフィド結合を導入する酵素の同定も目指した。

3. 研究の方法

(1) JPDIの生理的な基質の同定

JPDIの生理的な基質を同定するためには、チオレドキシンの酵素が働く際に、酵素と基質が分子間のジスルフィド結合で連結した中間体を形成することを利用した(図2)。また、このようにして同定した基質候補タンパク質の生合成過程を、JPDIを欠損する細胞中で調べることにより、本酵素の生理機能を解明することにした。

(2) インシュリンへのジスルフィド結合導入に關与する酵素の同定

インシュリンにジスルフィド結合を導入する酵素を同定するためにも、チオレドキシンの酵素が基質に作用する際には酵素と基質が分子間のジスルフィド結合で連結した複合体を形成することを利用した(図2)。更に、このようにして同定した酵素の発現の抑制がインシュリンの生合成に及ぼす影響を調べることによって当該酵素がインシュリンの生合成に果たす役割を解析することにした。

#### 4. 研究成果

##### (1) JPDI の基質候補タンパク質の同定

先述したように、チオレドキシン様の酵素が、基質に作用し、ジスルフィド結合の形成、還元、異性化を行う際には、酵素と基質が分子間のジスルフィド結合で連結した反応中間体が形成される。JPDI の基質を同定するためにはチオレドキシン様の酵素がもつこの特質を利用した。しかし、このような酵素・基質複合体は一過的に形成される。よって、酵素・基質複合体を精製し基質を同定するためには、いかにこの複合体を安定化させるかが鍵になる。本研究では、トリクロロ酢酸と N-エチルマレイミドを利用してマウスの組織中で生成するこのような複合体を安定化することに世界で初めて成功した(図3)。

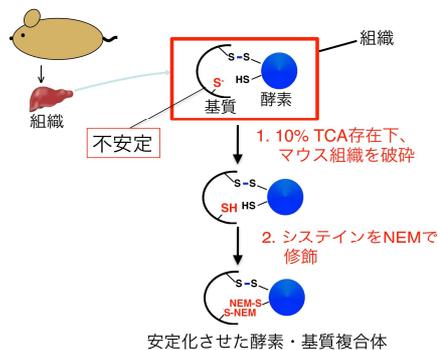


図3 マウス組織中で生成する酵素・基質複合体の安定化

更に、JPDI に対する抗体を利用して調べたところ、JPDI は精巣上体や前立腺などの生殖組織で強く発現しており、これらの組織中で、上述の複合体が多数検出された(図4)。

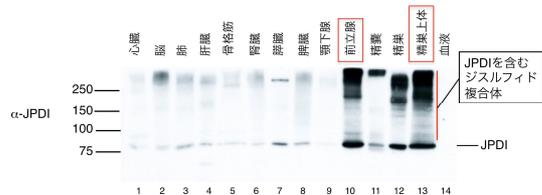


図4 JPDI のマウス組織における分布

これらの複合体を、JPDI に対する抗体を利用して精製後、質量分析法によって解析した。その結果、JPDI の基質の候補となるタンパク質を多数同定することに成功した(表1)。

Partners of JPDI identified from Epididymis			
Names	Length (a.a.)	Coverage (%)	Location
JPDI	761	60.2	ER
ERp57 (PDIA3)	481	49.1	ER
P5 (PDIA6)	421	38.4	ER
ADAM7	766	38.1	PM
PDIA1 (PDIA1)	490	27.5	ER
ERp72 (PDIA4)	618	27.3	ER
Epididymal secretory glutathione peroxidase	200	23.1	Secreted
ERp44	377	16.5	ERGIC
Ovochymase-2	587	12.6	Secreted
Adam28	773	12.1	PM
Mia3 (TANGO1)	1906	6.7	ER exit sites
Endoplasmic (Grp94)	781	4.6	ER
Ces5a	547	4.5	Secreted

表1 JPDI の基質候補タンパク質

更に、これらのタンパク質の幾つかは、実際に分子間のジスルフィド結合を介して JPDI と実際に相互作用をしていることも判明した。これらの成果を論文にまとめ、BBRC 誌に発表した。

##### (2) インシュリンと相互作用するチオレドキシン様酵素の同定

インシュリンは分子内に3本のジスルフィド結合をもつ。インシュリンへのジスルフィド結合の導入に働く因子を同定するためにも、先述したように、チオレドキシン様の酵素が基質に作用する際には、分子間のジスルフィド結合を介して酵素と基質が連結した反応中間体を一過的に形成することを利用した。このような中間体を解析するためには大量の膵細胞が必要であるが、マウス個体からは膵細胞少量しか取れない。そこで、本研究ではマウス膵細胞由来の培養細胞株 MIN6 を利用した。さらに、ジスルフィド結合形成の際に細胞中で形成する酵素・基質複合体を安定化させるため、MIN6 細胞をトリクロロ酢酸と N-エチルマレイミドで処理した。次に、インシュリンに対する抗体でウェスタンブロッティングをおこなったところ、上記のように調製した MIN6 の細胞ライセート中ではプロインシュリン(小胞体に局在するインシュリンの前駆体タンパク質)を含む複合体が多数検出された。そこでこれら複合体を、抗インシュリン抗体を利用して精製後、質量分析法によって解析したところ、その中には4種類のチオレドキシン様酵素が検出された。さらに、そのうちの3種類は、実際に分子間のジスルフィド結合を介してプロインシュリンと複合体を形成していた。よって、これら酵素は小胞体中でインシュリンとシステインを介して直接相互作用することが判明した。今後は、当該因子がインシュリンの生合成に果たす役割を解明するために、当該因子の発現を siRNA 法等で抑制した場合の影響をパルスチェイス実験により調べる必要がある。

##### (3) ジスルフィド結合形成の場である小胞体の恒常性維持に必要なシステム

Ero1αは PDI(小胞体内に存在するチオレドキシン様酵素の一つ)を再酸化することによって、ジスルフィド結合に必要な酸化力を小胞体に供給する。このように小胞体内におけるジスルフィド結合形成において極めて重要な役割を果たす Ero1αと PDI の相互作用を特異的に阻害する低分子化合物を発見し J. Biol. Chem. 誌 に発表した。本阻害剤は、PDI の機能を特異的に抑制するため、インシュリンの生合成機構の解明にも、役立つはずである。

一方、DNAJB14 と Ire1 はともに哺乳動物小胞体の膜タンパク質である。それぞれの機能が、ジスルフィド結合形成の場である小胞

体の恒常性維持に重要な働きをすることを見出した。その内容の一部を、Cell Struct. Funct. 誌およびPNAS 誌に報告した。

更に、哺乳動物細胞小胞体におけるジスルフィド結合形成システムについてFree Radic. Biol. Med. 誌に総説を発表した。本研究課題の成果の一部もその中で詳しく解説した。

#### 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5件)

Okumura, M., Kadokura, H., Inaba, K. Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. Free Radic Biol Med. in press, (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.010) (査読あり)

Okumura, M., Kadokura, H., Hashimoto, S., Yutani, K., Kanemura, S., Hikima, T., Hidaka, Y., Ito, L., Shiba, K., Masui, S., Imai, D., Imaoka, S., Yamaguchi, H., Inaba, K. Inhibition of the functional interplay between ER oxidoreductin-1 (Ero1) and protein disulfide isomerase (PDI) by the endocrine disruptor bisphenol A. J. Biol. Chem. 289, 27004-27018 (2014). (doi: 10.1074/jbc.M114.564104) (査読あり)

Kadokura, H., Saito, M., Tsuru, A., Hosoda, A., Iwawaki, T., Inaba, K., Kohno, K. Identification of the redox partners of ERdj5 /JPD1, a PDI family member, from an animal tissue. Biochem. Biophys. Res. Commun. 440, 245-250 (2013) (doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.063) (査読あり)

Tsuru, A., Fujimoto, N., Takahashi, S., Saito, M., Nakamura, D., Iwano, M., Iwawaki, T., Kadokura, H., Ron, D., Kohno, K. Negative feedback by IRE1 optimizes mucin production in goblet cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110, 2864-2869 (2013). (doi: 10.1073/pnas.1212484110) (査読あり)

Sopha, P., Kadokura, H., Yamamoto, Y.H., Takeuchi, M., Saito, M., Tsuru, A., Kohno, K. A novel mammalian ER-located J-protein, DNAJB14, can accelerate ERAD of misfolded membrane proteins. Cell Struct. Funct. 37, 177-187 (2012) ([https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/37/2/37\\_12017/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/37/2/37_12017/_pdf)) (査読あり)

[学会発表](計8件;うち招待講演2件)  
門倉広、稲葉謙次「分泌タンパク質新生ポリペプチド鎖にジスルフィド結合を形成する仕組み」第87回日本生化学会大会(2014年10月17日、京都国際会議場;シンポジウム招待講演)

門倉広、稲葉謙次「分泌タンパク質新生ポリペプチド鎖の酸化的フォールディングの解析」第14回日本蛋白質学会大会(2014年6月27日、ワークピア横浜;ワークショップ招待講演)

奥村正樹、橋本翔子、油谷克英、金村進吾、引間孝明、門倉広、今岡進、山口宏、稲葉謙次「内分泌攪乱物質によるEro1-PDI経路の阻害機構」第14回日本蛋白質学会(2014年6月27日、ワークピア横浜;ポスター発表)

門倉広、斉藤美知子、都留秋雄、稲葉謙次、河野憲二「ERdj5(JPD1)基質候補タンパク質のマウス個体組織からの網羅的同定」第66回日本細胞生物学会(2014年6月11日、奈良県新公会堂;選抜一般講演)

佐藤仁美、井上道雄、保田裕貴、山本洋平、門倉広、稲葉謙次、河野憲二「小胞体膜タンパク質DNAJB12の活性制御におけるジスルフィド結合の影響」第66回日本細胞生物学会(2014年6月11日、奈良県新公会堂;ポスター発表)

Hiroshi Kadokura「Towards the understanding of thiol-dependent redox networks in the ER of mammalian cells」Microbial Genetics and Genomics VI (2014年4月18日、フランス・パリ・パスツール研究所;国際学会一般講演)

門倉広、斉藤美知子、都留秋雄、稲葉謙次、河野憲二「哺乳動物細胞小胞体に局在するERdj5(JPD1)の生理的基質候補タンパク質の網羅的解析」日本農芸化学会(2014年3月29日明治大学生田キャンパス(東京);一般講演)

門倉広、河野憲二「哺乳動物細胞小胞体内におけるジスルフィド結合形成能力の低下を検出する為の鋭敏なアッセイ系の構築」第85回日本生化学会(2012年12月16日、福岡国際会議場;一般講演)

[その他]

ホームページ等  
東北大学研究者紹介  
<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/0e7d0c63988511d969d32c13b37c77cd.html>  
東北大学大学院生命科学研究所 協力講座

## 紹介

[http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/h\\_kadokura/](http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/h_kadokura/)

### 6. 研究組織

#### (1) 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

#### (2) 研究分担者

該当なし

#### (3) 連携研究者

斉藤 美知子 (SAITO, Michiko)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・助教  
研究者番号：40379558

河野 憲二 (KOHNO, Kenji)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・教授  
研究者番号：50142005