

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15098

研究課題名(和文) フォールディング中間体の分子認識から紐解くタンパク質品質管理の分子基盤

研究課題名(英文) Understanding the folding intermediate recognition mechanism by PDI

研究代表者

奥村 正樹 (OKUMURA, MASAKI)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：50635810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：PDIは、小胞体内で構造未成熟の様々なタンパク質に働きかけ、ジスルフィド結合の導入および修復を行っている。これまでPDIがどのように基質の様々なフォールディング状態を認識しているか不明であったが、高速AFMによる1分子観察により、BPTI、RNaseA等、形や大きさ、ジスルフィド結合の数が異なる様々な基質の様々なフォールディング状態で検証した際、PDIは変性基質依存的に二量体へ会合し、その中央に形成される空間を観察することに世界で初めて成功し、PDIの全く新しい触媒機構を提唱した(Okumura* & Noi, et al., Nat Chem Biol 2019)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病やアルツハイマー病など種々の神経変性疾患は体内で構造異常たんぱく質が過剰に蓄積することで引き起こされることが知られる。これまでにPDIの変異や機能欠損を引き起こす化学修飾が、さまざまな神経変性疾患の患者から見つかった。今回新たにPDIの動的性質や二量体形成が、サイズやジスルフィド結合の数が異なるさまざまな基質のフォールディング状態を認識する上で、重要な役割を果たすことを明らかにした。本基礎的知見の獲得は、生体内における高効率・高精度なフォールディング促進機構の新たな解明につながり、神経変性疾患や2型糖尿病などのフォールディング病に関する有用な情報を提供するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We directly observed the action of protein disulfide isomerase (PDI), the most versatile disulfide-introducing enzyme in the endoplasmic reticulum, during the catalysis of oxidative protein folding. High-speed AFM revealed that oxidized PDI is in rapid equilibrium between open and closed conformations, whereas reduced PDI is maintained in the closed state. In the presence of unfolded substrates, oxidized PDI, but not reduced PDI, assembles to form a face-to-face dimer, creating a central hydrophobic cavity with multiple redox-active sites. Such PDI dimers are diverse in shape and have different lifetimes depending on substrates. We thus revealed the molecular mechanism by which PDI guides oxidative protein folding of various substrates.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：小胞体 フォールディング中間体 高速AFM NMR PDI ジスルフィド結合

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞において小胞体は、新規に合成されたタンパク質にジスルフィド結合の形成を伴った立体構造(以後、酸化的フォールディングという)を獲得する場である。ジスルフィド結合を有するタンパク質には、生物学的、医学的にも重要な免疫グロブリンさらにはインスリンやウログアニリンなどのホルモンが知られる。小胞体には 20 種類以上もの Protein Disulfide Isomerase (PDI)ファミリータンパク質が酸化的フォールディングを触媒する。特にその中でも PDI のみが最も優れたジスルフィドイソメラーゼであることがわかっているが、基質のフォールディング中間体の認識における作用機序は明らかでない。そこで「プロウログアニリンや BPTI、インスリン等複数の基質フォールディング中間体構造を用い、構造や機能が異なる複数のターゲット分子(基質)のフォールディング中間体を認識する PDI の機能発現機構」に関する研究の展開を目指した。

2. 研究の目的

構造生物学、生化学、生物物理学的手法を駆使し、下記の 2 点の解明を目指した。

- ①基質プロウログアニリン、BPTI およびインスリンの酸化的フォールディング経路の同定及び過渡的に集積するフォールディング中間体構造決定
- ②酵素 PDI による各種フォールディング中間状態の認識

3. 研究の方法

- ①RP-HPLC 及び質量分析を用いた、基質プロウログアニリン、BPTI およびインスリンの酸化的フォールディング経路の決定
- ②プロウログアニリンの最終構造の結晶構造解析、および NMR によるプロウログアニリンのフォールディング中間体構造決定
- ③RP-HPLC 及び質量分析を用いた、PDI による基質プロウログアニリン、BPTI およびインスリンの酸化的フォールディング触媒の解析
- ④NMR の滴定解析による PDI による基質の各種フォールディング中間状態の認識解析
- ⑤高速 AFM を用い、PDI による基質触媒の様子の観察

4. 研究成果

高速 AFM により、PDI が酸化還元状態依存的に 4 つのドメインで構成される U 字構造の開閉を制御し、この構造制御がさまざまな基質の効率的な酸化的フォールディングの触媒に重要な役割をもつことを明らかにした。さらに、BPTI、RNaseA、ラミニン、プラスミノージェンといった形や大きさ、ジスルフィド結合の数が異なるさまざまな基質を還元変性させた状態で添加すると、基質フォールディング初期において、酸化型の PDI のみが二量体化することを発見した。立体構造形成前の基質は PDI 二量体の中央に形成される空洞(キャビティ)に取り込まれ、そこで迅速なジスルフィド結合の導入と構造形成を受けることを明らかにした。この現象は、大きさやジスルフィド結合の数が異なる複数種類の基質に対しても同様に観察されることがわかった。また、変性状態にある基質依存的に形成された PDI 二量体は基質のフォールディング状態やフォールディング速度に応じて寿命や形状を変えることを突き止めた。このように、二量体を形成することで生じる中央の空洞中に変性基質を捕獲し、効率的な酸化的フォールディングを促すという PDI の全く新しい触媒機構を提唱した(Okumura* & Noi, et al., *Nature Chemical Biology* 2019)。

しかしながら、依然として構造や機能が異なる複数のターゲット分子(基質)のフォールディング中間体を認識する PDI の機能発現機構は不明である。そこで酸化的フォールディングの基質としてプロウログアニリン(Okumura*, et al., 原稿作成中)、インスリン(Arai & Okumura, et al., *Angewandte Chemie* 2018)を選定し、フォールディング経路の同定を行った。また、プロウログアニリンに関して、最終構造の決定に成功し、現在過渡的に集積されるフォールディング中間体の構造決定を目指し、NMR によって各種スペクトルを収集中である。フォールディング中間体の構造決定は難航しており、今後 MD などを利用した解析アプローチを取り入れる予定である。また、過渡的に集積される幾つかの中間状態のうち、PDI によるジスルフィド結合の交換反応性が高い種があることを見出したため、今後酸化的フォールディング触媒に重要な他の PDI ファミリー(Matsusaki,and Okumura* *Biochim Biophys Acta-general subjects* 2019)との相互作用解析により、基質認識に関する普遍的原理を探索する必要がある。さらに、PDI 分子を模倣した新規レドックス分子の創製にも着手しており、新規レドックス分子のデザイン法に重要な指針を得ることが出来、今後の展開が期待できる(Okada, ... Okumura*, and Muraoka* *Chem. Commun.* 2019: 特願 2018-109769 奥村 正樹、村岡 貴博、岡田 隼輔、稲葉 謙次、松崎 元紀)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. M. Okumura*#, K. Noi#, (#同等貢献) S. Kanemura, M. Kinoshita, T. Saio, Y. Inoue, T. Hikima, S. Akiyama, T. Ogura*, and K. Inaba*. "Dynamic assembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative folding" *Nature Chemical Biology* 15 499-509 (2019) 【査読有】 DOI:

10.1038/s41589-019-0268-8. ★Faculty of 1000 に選出

2. M. Matsusaki#, S. Kanemura#, M. Kinoshita#, Y.H. Lee, K. Inaba*, and **M. Okumura*** “Protein Disulfide Isomerase family: from Proteostasis to Pathogenesis” *Biochim Biophys Acta-general subjects* **4165** 30080-30087 (2019) 【査読有】 DOI:10.1016/j.bbagen.2019.04.003.

3. S. Okada#, M. Matsusaki#, (#同等貢献) K. Arai, Y. Hidaka, K. Inaba, **M. Okumura***, and T. Muraoka*. “Coupling effects of thiol and urea-type groups for promotion of oxidative protein folding” *Chem. Commun.*, **55** 759-762 (2019) 【査読有】 DOI: 10.1039/c8cc08657e. ★雑誌のバックカバーを飾る

4. K. Arai, T. Takei, R. Shinozaki, M. Noguchi, S. Fujisawa, H. Katayama, L. Moroder, S. Ando, **M. Okumura**, K. Inaba, H. Hojo*, M. Iwaoka*. “Characterization and optimization of two-chain folding pathways of insulin via native chain assembly” *Communications Chemistry* **1** 26 (2018) 【査読有】 DOI: <https://doi.org/10.1038/s42004-018-0024-0>

5. K. Arai#, T. Takei#, **M. Okumura#**, S. Watanabe#, (#同等貢献) Y. Amagai, Y. Asahina, H. Hojo*, K. Inaba*, M. Iwaoka*. “Preparation of selenoinsulin as a long-lasting insulin analogue.” *Angewandte Chemie* **56** 5522-5526 (2017) 【査読有】 DOI: 10.1002/anie.201701654.

6. K. Maegawa, S. Watanabe#, K. Noi#, **M. Okumura#**, Y. Amagai#, (#同等貢献) M. Inoue, R. Ushioda, K. Nagata, T. Ogura, and K. Inaba*. “The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation.” *Structure* **25** 846-857 (2017) 【査読有】 DOI: 10.1016/j.str.2017.04.001.

他 3 件

〔学会発表〕 (計 49 件)

1. **奥村 正樹** (invited) “小胞体内局在酵素 Protein Disulfide Isomerase family によるタンパク質品質管理機構の理解” 北海道大学薬学部、2018 年 12 月 3 日 北海道

2. **M. Okumura** (invited) “Understanding the proteostasis mechanism in the Endoplasmic Reticulum” KBSI seminar、2018 年 9 月 10 日 Korea

3. **奥村 正樹** (invited) “酵素の構造ダイナミクスから紐解く基質認識の理解—Protein Disulfide Isomerase を事例として” 第 18 回日本蛋白質科学会年会、ランチョンセミナー、2018 年 6 月 27 日 新潟

4. **奥村 正樹** (invited) “Dynamic assembly and disassembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative protein folding” 第 333 回 IMEG セミナー、熊本大学発酵研 2018 年 3 月 19 日 熊本

5. **奥村 正樹** “酵素基質相互作用を決定する動的構造制御” 新学術領域「動的構造生命 第 3 回班会議」2017 年 6 月 5 日 福岡

他 44 件

〔図書〕 (計 4 件)

1. **奥村 正樹**、稲葉 謙次 “細胞のタンパク質の立体構造を頑強にする仕組み” *放射光利用の手引き* 8-12 (2019) 出版社 アグネ技術センター

2. **M. Okumura**, S. Watanabe, K. Inaba. “Structural insights into disulfide bond formation and protein quality control in the mammalian endoplasmic reticulum” *Oxidative Folding of Proteins 2nd Edition* Chapter 3.3, 224-248 (2018) Publisher; Royal Society of Chemistry

3. **奥村 正樹**、稲葉 謙次 “PDI ファミリー酵素による小胞体のタンパク質品質管理機構” *アルツハイマー病—発症メカニズムと新規診断法・創薬・治療開発* 133-143 (2018) 出版社 NTS

4. 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 α の構造ダイナミクスと機能” *分子研レターズ* **76**, 34-36 (2017) 出版社 分子研

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：タンパク質のリフォールディング剤、タンパク質のリフォールディング方法及びタンパク質の再生方法

発明者：奥村 正樹、村岡 貴博、岡田 隼輔、稲葉 謙次、松崎 元紀

権利者：同上

種類：

番号：特願 2018-109769

出願年：2018

国内外の別： 国内

○取得状況（計 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：稲葉 謙次

ローマ字氏名：Inaba Kenji

※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。