

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02881

研究課題名(和文) ヒト由来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) Mechanism of protein disulfide bond formation in the ER of human 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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ジスルフィド結合の形成は、細胞表層タンパク質の立体構造形成に極めて重要である。しかし、ヒト細胞の小胞体内に送り込まれてくる翻訳合成途上のタンパク質に、いつ、どのようにしてジスルフィド結合が導入されるのかについてはほとんど不明だった。本研究では、LDL受容体をモデルタンパク質として用いて、その過程をこれまでにない詳細なレベルで観察することに成功した。その結果、予想外の様々な新知見を得ることに成功した。更に、小胞体内に存在する2種類の酵素GPx7とGPx8の機能を試験管内と細胞内で比較することによって、前者の酵素の方が、PDIファミリー酵素を酸化型に維持する能力が高いことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質中に形成されたジスルフィド結合を組み換える反応は、複数のドメインから構成されるタイプの細胞表層タンパク質の折り畳みにおいて鍵となる反応ステップで、従来はタンパク質の翻訳合成が終わった後、数十分の時間をかけてゆっくりと進行すると考えられてきました。しかし今回の研究から、この反応はこれまでに考えられていたよりも遥かに早い段階に於いて、精緻な制御のもと、進行することが初めて明らかになりました。今回の結果は、細胞表層タンパク質の折り畳みの不具合によって発症する病気の機序を理解したり、微生物などを利用して、有用なタンパク質を生産したりする上で、基盤となる情報を与えると期待されます。

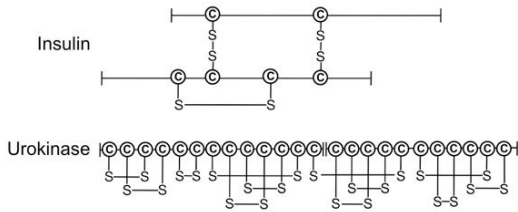
研究成果の概要(英文)：Formation of disulfide bonds is a crucial step in the folding of a huge number of secretory and membrane proteins. Disulfide bonds are thought to be introduced into the chains entering the ER lumen. However, when and how disulfide bonds are introduced into the elongating chains remained largely elusive. Here, we have developed a system to observe disulfide bond formation in the elongating chain of LDLR to find that disulfide rearrangement in LDLR occurs at a specific timing during synthesis in a manner depending on a downstream region of the polypeptide. Thus, folding of a multidomain protein in the ER of mammalian cells appears to be more coordinated and elaborated than previously thought. Furthermore, we have compared the abilities of two ER resident enzymes, GPx7 and GPx8, in oxidizing PDI family members to find that GPx7, but not GPx8, functions as an H₂O₂-dependent PDI oxidase in cells.

研究分野：応用生物化学

キーワード：ジスルフィド結合 哺乳動物 分泌タンパク質 小胞体 物質生産

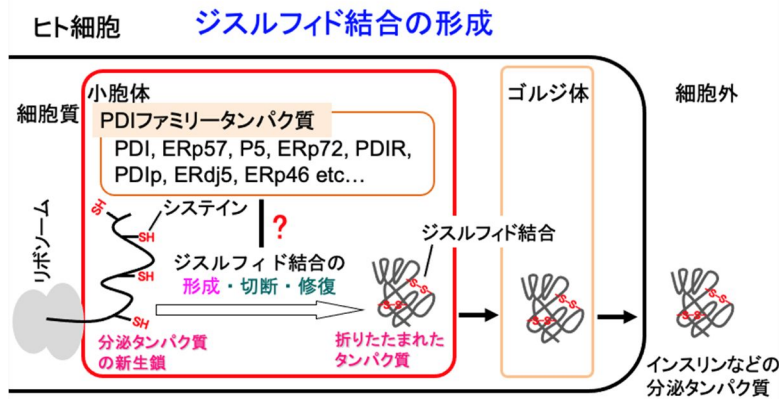
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景



ジスルフィド結合は、2つのシステインが酸化されて形成される共有結合であり(左図) 細胞表層タンパク質(分泌タンパク質や膜タンパク質)の立体構造形成に重要である。インスリンや抗体などのヒト由来の有用タンパク質の多くは分子内にジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質である。微生物を利用してこれらのタンパク質を生

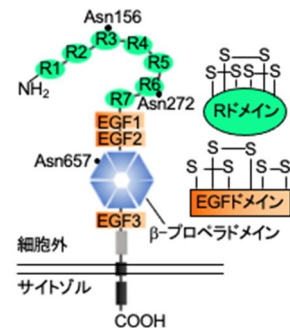
産する際には、ジスルフィド結合が上手く形成されないことが問題になる。また、ヒト細胞中で効率よくジスルフィド結合が形成されないと糖尿病や心筋梗塞などの疾患の原因になる。よって、ジスルフィド結合が形成される仕組みを知ることは重要である。ヒトの小胞体内にはジスル



フィド結合形成に働くと予想される PDI ファミリー酵素が 20 種類も存在するが、各酵素の役割分担は不明である。また、小胞体内に送り込まれてくる翻訳途上のタンパク質の新生鎖に(左図)ジスルフィド結合が導入されるが、翻訳合成のどのタイミングで、どのような機序のもと、正しいジスルフィド結合が導入されるのかも不明である。

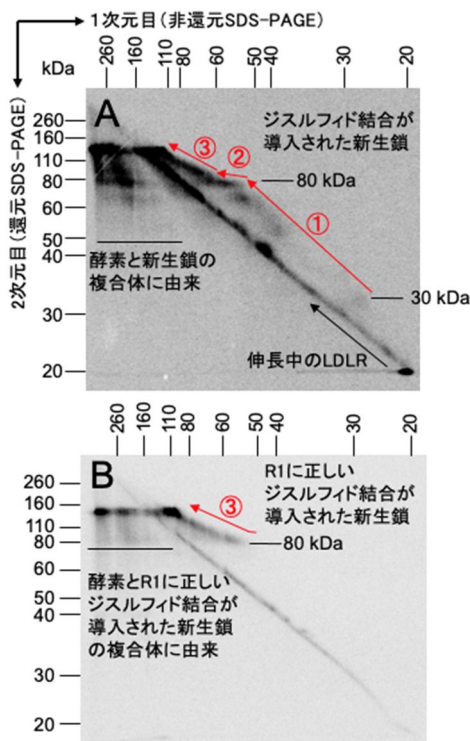
2. 研究の目的

ヒト細胞中では小胞体内に送り込まれてくる翻訳途上の新生鎖にジスルフィド結合が導入されると考えられる。しかし、翻訳合成のどのタイミングで、どのような機序のもと、正しいジスルフィド結合が新生鎖に導入されるのかは不明である。更に、この過程で働く各 PDI ファミリー酵素の役割の違いも不明である。本研究では、この未解明の問題に取り組み、ヒト細胞の小胞体内で進行するタンパク質の立体構造形成反応の特質を理解する。



3. 研究の方法

LDL 受容体 (LDLR)は、血液中の LDL コレステロールを細胞内に取り込む、タンパク質であり、その機能不全は高コレステロール血症や脳梗塞などの原因になる。ジスルフィド結合は7個の R ドメインと3個の EGF ドメインに3本ずつ計30本存在する(右図)。申請者らは、LDLR をモデルとして、ヒト由来細胞株である HeLa 細胞の小胞体内に送り込まれてくる翻訳途上の新生鎖にジスルフィド結合が形成される様子を観察するためのジスルフィド結合形成モニタリング系を作成した(後述)。本研究ではこの系を駆使して、翻訳途上のタンパク質にジスルフィド結合が形成される仕組みの詳細を解析した。

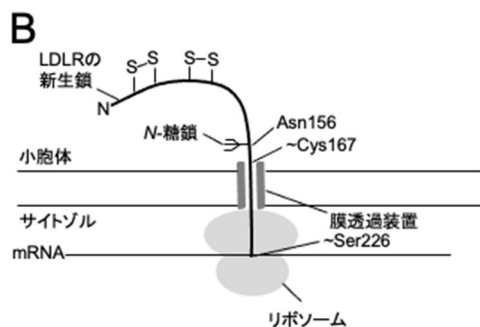
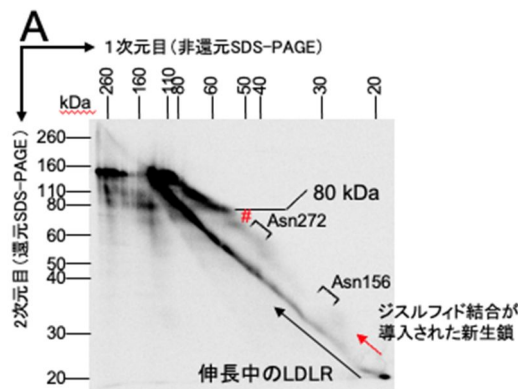


4. 研究成果

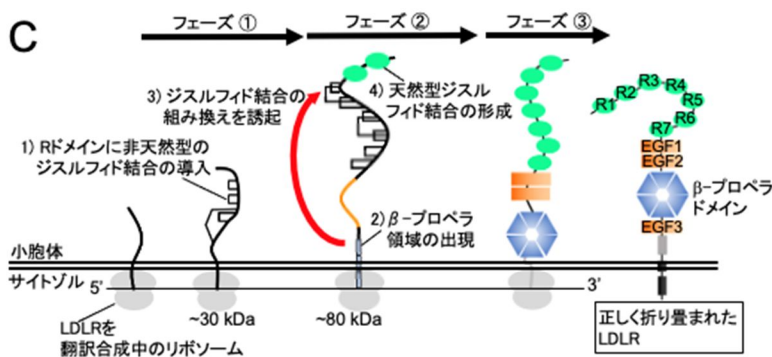
(1) ジスルフィド結合形成のタイミング

LDLR の新生鎖にジスルフィド結合が導入される過程を調べるためには、放射性アミノ酸で標識した LDLR の新生鎖を、シグナル配列の直後に挿入した FLAG タグ(右上図)を利用して、ヒト由来培養細胞株である HeLa 細胞中から精製し、2次元電気泳動で分離した(左図A)。

このゲルでは、1次元目を非還元条件下で泳動し、2次元目を還元条件下で泳動している。ジスルフィド結合が形成すると、通常、ポリペプチド鎖の泳動度が大きくなるため、1次元目と2次元目の泳動度の違いからジスルフィド結合の形成を検出できる。具体的には、ジスルフィド結合が導入されたポリペプチド鎖は、赤矢印に沿っ



図B: 翻訳伸長、N糖鎖付加、ジスルフィド結合の導入



図C: 翻訳伸長、N糖鎖付加、ジスルフィド結合の導入

たシグナル上に検出された。しかし、この解析では、ジスルフィド結合が本来の正しいシステイン間に形成されたかどうかは、不明である。そこで、立体構造特異的な C7 抗体で正しく折り畳まれたポリペプチド鎖を精製後、2次元電気泳動で観察した。C7 抗体は、LDLR の N 末端に存在する R1 ドメインに正しいジスルフィド結合が形成されるとこれを認識する。この結果から、新生鎖が 80 kDa の大きさに伸長すると R1 ドメインに正しい組み合わせのジスルフィド結合が形成されることが判明した (前頁左下図 B)。

(2) N糖鎖付加とジスルフィド結合形成

LDLR 上には 3 箇所に N 糖鎖付加部位が存在する。N 糖鎖の付加がジスルフィド結合に及ぼす影響を調べるために、LDLR 上の N 糖鎖付加部位を変異させた変異体を作成した。ジスルフィド結合形成モニタリング系で調べたところ、N 糖鎖の有無は、ジスルフィド結合形成に影響を及ぼさないことが判明した。しかし、このような解析から、LDLR の Asn156 と Asn272 の位置に N 糖鎖が付加されるタイミングを 2 次元ゲル上で明らかにすることに成功した (左図 A)。

その結果、各事象 (翻訳伸長、N 糖鎖付加、ジスルフィド結合の導入) の起こるタイミングをより正確に把握することが可能になった (左図 B)。このような解析と様々な変異体を利用した解析から、新生鎖が 226 アミノ酸ほど翻訳合成され約 30 kDa の大きさにまで伸長すると LDLR の R ドメインに非天然型のジスルフィド結合が導入され始めるが、更に翻訳伸長が進み、β-プロペラドメインの約半分が翻訳されると、ジスルフィド結合の組み換え反応が誘起され、それまでに R ドメイン

に導入された非天然型のジスルフィド結合が天然型の (正しい組み合わせの) 結合に組み換えられることが分かった (左図 C)。更に、LDLR から、β-プロペラドメインを欠失させると、R1 ドメインの折り畳みが阻害されることが分かった。即ち、β-プロペラドメイン内には、上流の R1 ドメインの折り畳みを促進する配列が隠されていることが示唆された。

ジスルフィド結合の組み換え反応は、複数のドメインから構成されるタイプの、様々な細胞表面タンパク質の折り畳みにおいて鍵となる反応ステップで、従来はタンパク質の翻訳合成が終わった後、数十分の時間をかけて進行すると考えられてきた。しかし今回の研究から、この反応はこれまでに考えられていたよりも遥かに早い段階に於いて、精緻な制御のもと、進行することが初めて明らかになった。多くの細胞表面タンパク質は多数のドメインと多数のジスルフィド結合を持つ。今回の結果は、そのようなタンパク質の折り畳み不全によって発症する疾患の機序を理解したり、そのようなタンパク質を生産したりする上で、基盤となる情報を与えると期待される。以上の内容をまとめて、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 誌に報告した。

一般に、マルチドメインタンパク質は、各ドメインがリボソームあるいは膜透過装置から出現するごとに、N 末端から C 末端へと、ドメイン単位で折り畳まれる。これは、折り畳まれる前の配列間の相互作用によって、タンパク質が間違った構造に折り畳まれることを防ぐためであると考えられる。一方、これに反して、LDLR の R ドメインの場合には、その遥か下流に存在する β プロペラ領域までリボソームによる翻訳伸長が進行して初めて、正しい立体構造に折り畳まれる (上図 C)。それでは、なぜ、このような「手の込んだ仕組み」を用いて R ドメインは折り畳まれるのであろうか? 幾つかモデルは考えられるものの、その理由は不明であり、今後解決すべき重要な課題である。

(3) 各種点変異が LDLR の折り畳みに及ぼす影響の解析

LDLR の N 末端に存在する R1 ドメインの折り畳みは、その遥か下流に存在する β-プロペラドメインの中央部分をリボソームが翻訳中に開始する。本研究では、β-プロペラドメインのサブドメインの 1 と 2 上に上流ドメインの折り畳みに必要なアミノ酸残基が存在するとの推測のもと、この領域内の 14 のアミノ酸残基 (その中には変異により高コレステロール血症を発症する

5つの残基を含む)についてAla置換体を作成し、R1ドメインの折り畳みを解析した。その結果、当初の予想とは異なり、R1の折り畳みに重要な残基はβ-プロペラドメイン上の別の位置に存在する可能性が示唆された。R1の折り畳みに必要なβ-プロペラドメイン上の残基を特定することは、折り畳み促進のメカニズムを理解する上で極めて重要であり、今後、解明すべき課題である。

(4) LDLRの新生鎖の折り畳みにおけるPDIファミリー酵素の役割

PDIファミリー酵素は小胞体内に20種類も存在するが、その役割の違いはよく分かっていない。その手がかりを得る目的で、本研究では、PDIファミリー酵素がどのようなタイミングでLDLRの新生鎖と結合するのかを2重免疫沈降によって調べた。その結果、興味深いことに、LDLRの折り畳みの3つのフェーズのいずれに於いても、調べた4種類の酵素すべてが翻訳途上の新生鎖に結合することを見出した。また、上記4種類のPDIファミリー酵素について各酵素のノックダウンが、LDLRの細胞内蓄積量に及ぼす影響を調べた結果、調べた4種類の酵素は、LDLRへの作用から、2つのグループに分けることができることが示唆された。これらは、各酵素の機能の違いを考える上で極めて示唆に富む知見であるが、各酵素の具体的な働きについては不明であり、今後、更なる解析が必要である。

(5) その他

小胞体内に存在する2種類の酵素GPx7とGPx8の機能を試験管内および細胞内で比較することによって、前者の酵素の方が、PDIファミリー酵素を酸化型に維持する能力が高いことを示す結果を得て、*J. Biol. Chem.*誌に発表した。

更に、PDIファミリー酵素の基質を同定するために研究代表者らが開発した独自の手法についてまとめて、和文誌「化学と生物」に発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 門倉 広	4. 巻 58
2. 論文標題 哺乳動物細胞PDIファミリー酵素の生理的な基質の同定: ヒト由来分泌タンパク質の効率良い生産系の開発にむけて	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 441-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.58.441	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 -

1. 著者名 Kadokura Hiroshi, Dazai Yui, Fukuda Yo, Hirai Naoya, Nakamura Oriie, Inaba Kenji	4. 巻 117
2. 論文標題 Observing the nonvectorial yet cotranslational folding of a multidomain protein, LDL receptor, in the ER of mammalian cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences, USA	6. 最初と最後の頁 16401 ~ 16408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2004606117	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi Kadokura
2. 発表標題 Observing the cotranslational disulfide rearrangement in a cell surface multidomain protein, LDL receptor, in the ER of mammalian cells
3. 学会等名 Functional Disulfides in Health & Disease 2021, Weizmann Institute of Science, Israel, Web開催 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuyin Du, Rong Liu, 小和田 俊行, 松井 敏高, 門倉 広, 稲葉 謙次, 水上 進
2. 発表標題 Visualization and quantification of labile Zn ²⁺ in the acidic subcellular compartments using a small-molecule fluorescent probe
3. 学会等名 第32回万有仙台シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門倉 広, 平井直也, 福田 洋, 太宰 結, 稲葉謙次
2. 発表標題 細胞内で翻訳合成途上のLDL受容体にジスルフィド結合が形成される仕組み
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shingo Kanemura, Elza Firdiani Sofia, Naoya Hirai, Masaki Okumura, Hiroshi Kadokura and Kenji Inaba
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 門倉 広
2. 発表標題 ジスルフィド結合が形成される仕組み：独自のアプローチで迫る、ヒト分泌タンパク質の生細胞内における立体構造形成機構
3. 学会等名 第5回 有機・生命・計測科学研究交流セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八巻聡、河野憲二、稲葉謙次、門倉 広
2. 発表標題 ヒト細胞小胞体機能の低下を鋭敏に検出するレポーターの開発と応用
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Elza Firdiani Sofia, Shingo Kanemura, Hiroshi Kadokura, Masaki Okumura, Kenji Inaba.
2. 発表標題 Mechanistic basis and physiological functions of GPx7 and GPx8, newly identified PDI oxidases in the mammalian endoplasmic reticulum
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 奥村 正樹, 金村 進吾, 松崎 元紀, 木下 岬, 荒井 堅太, 平山 千尋, 天貝 佑太, 門倉 広, 秋山 修志, 稲葉 謙次
2. 発表標題 PDIファミリーメンバーP5の新規構造と機能
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八巻 聡、河野憲二、稲葉謙次、門倉 広
2. 発表標題 ヒト細胞小胞体機能の低下を鋭敏に検出するレポーターの開発と応用
3. 学会等名 東北大学大学院 理学・生命科学 2 研究科合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

門倉 広 | 東北大学 大学院 生命科学研究科
<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/teacher/detail---id-19734.html>
ヒトLDL受容体が立体構造を形成する新たな機構を解明 家族性高コレステロール血症の理解に一步前進
http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/news_press/20200701/
ヒトLDL受容体が立体構造を形成する新たな機構を解明 家族性高コレステロール血症の理解に一步前進
<https://www.sci.tohoku.ac.jp/news/20200701-11147.html>
ヒトLDL受容体が立体構造を形成する新たな機構を解明 家族性高コレステロール血症の理解に一步前進
<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/results/detail---id-49455.html>

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
---------	---------