

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：34504
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23655162
研究課題名（和文） 新規タンパク質発現抑制法ドメイン干渉によるヒト PDI 及び sEH の機能解析
研究課題名（英文） Protein interference in mammalian cells and analysis of biological functions of PDI and sEH
研究代表者 今岡 進（IMAOKA SUSUMU） 関西学院大学・理工学部・教授 研究者番号：60145795

研究成果の概要（和文）：ドメイン干渉は大腸菌で見いだされた現象で、あるドメインを過剰発現すると発現中の内在性のタンパク質と相互作用することで不安定化しそのタンパク質の発現を抑制できる技術である。この現象を哺乳動物細胞に適用して新たなタンパク質発現方法に発展させる試みが本研究である。まず、この技術を適応するタンパク質として PDI を選び、そのドメインの相互作用について明らかにした。PDI は a, b, b', a', c のドメインからなるが、b' と a' ドメインが相互作用していることが明らかとなった。そこで HEK393 細胞に b' ドメインを発現させたところ内在性の PDI の発現が低下した。哺乳動物におけるドメイン干渉応用への可能性が開けた。

研究成果の概要（英文）：Protein interference was found in *E. coli*. by prof. fujiwara. Protein interference is that suppression of protein by domain-domain interaction which destabilizes whole protein. In this study, protein interference was applied for suppression of protein in mammalian cells. We found first that b' domain of PDI constituted of a, b, b', a' and c domains interacted with a'. Overexpression of b' but not b domain significantly reduced the native PDI in HEK 293 cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ドメイン干渉、タンパク質発現制御法、プロテインジスルヒドイソメラーゼ、可溶性エポキシドヒドロラーゼ、ほ乳細胞

1. 研究開始当初の背景

ドメイン干渉はシクロデキストリン合成酵素が、そのドメインを大腸菌の中で過剰発現させると大腸菌中の同酵素の発現が抑制されることから本研究の連携研究者である藤原教授が発見した現象である。この酵素は A, B, C, D の4つのドメインからなるが、ドメイン A, B, D を過剰発現したときにこの酵素の発現抑制が見られた。精製したこの酵素に、これらのドメインを添加しても活性の抑制はみられなかった。各ドメイン発現による分子機構を検討したところ、ドメイン B にお

いては静電相互作用が、ドメイン A, D においては疎水性相互作用によって、大腸菌で翻訳中のシクロデキストリン合成酵素とフォールディング段階で、相互作用している可能性が示唆された。当該研究は、藤原教授が大腸菌の発現系で開発したドメイン干渉を哺乳動物に応用する試みである。ドメイン干渉が哺乳動物で成功すれば新しいタンパク質発現抑制機構として利用できる。

2. 研究の目的

まず、哺乳動物細胞でのドメイン干渉のタ

ターゲット因子として、現在それぞれについて相互作用ドメインとその生理機能を解析中である PDI と sEH を選んだ。PDI は新生タンパク質や変性タンパク質のシステイン残基のチオール結合を形成したり、掛け替えをする（イソメラーゼ）酵素であり、代表者らは内分泌かく乱化学物質の一つと考えられるビスフェノール A (BPA) の結合因子として単離してきた。現在、PDI はファミリーを形成し、17種類の酵素が報告されている。しかし、この中には機能や相互作用因子（基質）が未知なものも多く、代表者はその機能解析を行っている。sEH は N-末端にホスファターゼ活性ドメイン、C-末端にエポキシドヒドロラーゼ活性ドメインを持ちそれぞれ相互作用して二量体を形成して、活性を持つとされる。本研究ではこれらのタンパク質の機能解析を行い、さらにドメイン干渉について検討した。

3. 研究の方法

各タンパク質因子の cDNA の単離と大腸菌での発現精製、抗体の作成と培養細胞での過剰発現

ヒト sEH の cDNA はヒト肝癌細胞 Hep3B RNA から RT-PCR によって単離した。ラット PDI, Ref-1, TR の cDNA はラット肝臓 RNA から RT-PCR で単離した。そして、培養ヒト細胞での過剰発現のために、pcDNA、大腸菌での発現精製のために pQE または pET に導入した。大腸菌による発現は IPTG 誘導により行った。発現したタンパク質は Ni-NTA アガロースで精製した。精製したタンパク質を用いてウサギで抗体を作製した。ヒト培養細胞での過剰発現は G418 で選択を行った。

RNase を用いたイソメラーゼ活性の測定法

PDI のイソメラーゼ活性は RNase を用いて測定した。まず、RNase を DTT とグアニジン存在下に変性した。変性 RNase と PDI を反応させ、リフォールディングされた RNase の活性を基質である cCMP から CMP への変換で測定した。

sEH 酵素活性の測定

エポキシドヒドロラーゼ活性については大腸菌で発現・精製した sEH を、合成基質である (3-phenyl-oxiranyl)-acetic acid cyano-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-methyl ester (PHOME) と反応させ、その代謝産物である 6-methoxy-2-naphthaldehyde の蛍光を励起 330nm 蛍光 465nm で測定した。精製 sEH を 11, 12-EET または 14, 15-EET と 37°C で反応後、酢酸エチルにより抽出を行った。これを蒸発乾固した後、EtOH に再溶解し、UPLC-MS を用いて EET 及びその代謝産物である DHET を検出した。

sEH の脱リン酸化活性については、精製 sEH を LPA と反応させ、その脱リン酸化反応で生じる遊離リン酸をマラカイトグリーンアッセイによって検出した。合成基質である 4-methylumbelliferyl phosphate については sEH と反応させ、その脱リン酸化体である 4-methylumbelliferone の蛍光を励起 330nm、蛍光 465nm で検出した。

細胞増殖の測定

Hep3B 細胞に、WT、EH mutant、phosphatase mutant、N 末端ドメイン、C 末端ドメインを過剰発現させ、細胞を一定数撒いた後、2日後、4日後の細胞数をコールターカウンターによって測定した。Wound healing assay はチップの先で細胞を引っ掻き、その5日後に細胞移動による修復を観察した。

4. 研究成果

BPA の PDI ドメインの相互作用部位の決定とドメイン間の相互作用

BPA が PDI に結合して、イソメラーゼ活性を阻害することは既に述べた通りであるが、当該研究では PDI のどの部位に結合し、どのような機構で活性を阻害するのかを検討した。PDI は a, b, b', a', c の 5 個のドメインからなり、a と a' ドメインに CGHC の配列を持つイソメラーゼ活性中心が存在する。まずこれらを ab, b'a'c, a, b, b', a'c フラグメントに分けて大腸菌で発現精製して BPA との結合性を Biacore で検討した。その結果、ab, b'a'c, a, b' のフラグメントに BPA 結合性が見られた。このことから結合には a と b' が重要であると考えられた。次に ab, b'a'c, a, b, b', a', abb'a', abb', b'a', Δb', a'c (Δはそのドメインがないことを示す) フラグメントを発現精製して BPA によるイソメラーゼ活性阻害を調べた。このうち a と a' ドメインを含んでいるものに活性が見られたが、b' ドメインを含むものに

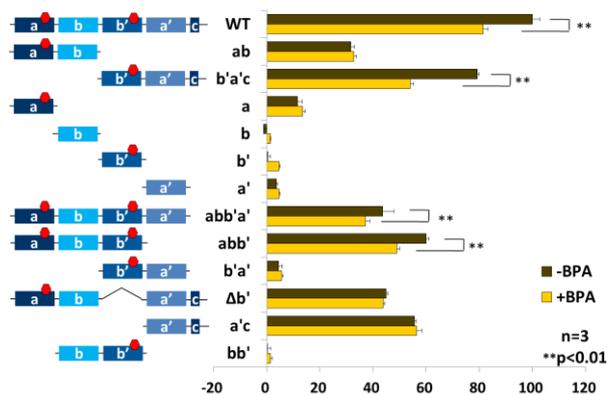


図1. BPAによるPDI阻害ドメイン

のみ、BPA による活性阻害が見られた(図1)。このことから、BPA が PDI の b' ドメインに結

合することで、そのイソメラーゼ活性を阻害していることが明らかになった。さらに、a'c フラグメントに b' を添加すると活性の増強が見られ、この効果は b' ドメインでは見られないことから、b' ドメインは a' ドメインと相互作用して、その三次構造に影響を及ぼしていることが推測された。そこで、a' ドメインに含まれるトリプトファン残基の蛍光を利用して b' と a' ドメインの相互作用解析を行った。その結果、通常 b' と a' は可変領域 x を介して相互作用しているが、b' に BPA が結合することで、この動きが制限されることを解明した(図2)。

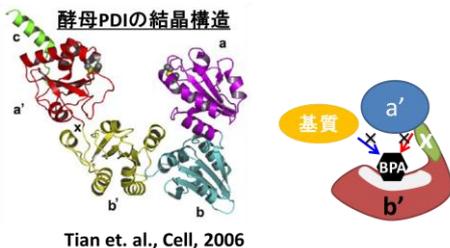


図2. BPAの結合から明らかになったPDIドメインの相互作用

PDI ドメイン過剰発現またはノックダウンによる新規機能解析

PDI の機能解析はラット脳下垂体由来細胞 GH3 を用いて行った。この細胞は甲状腺ホルモン T3 に応答して成長ホルモン GH を分泌する細胞として知られる。ところで、PDI を過剰発現すると T3 応答が低下することは以前から知られ、これは T3 が PDI にトラップされて、甲状腺ホルモン受容体に結合できなくなることによる PDI 甲状腺ホルモンリザーバー説が報告されている。代表者らの本研究によって T3 及び BPA の PDI への結合部位が明らかになったことで、上記のメカニズムを検討した。まず、GH3 細胞に様々な PDI 変異体を発現して、甲状腺ホルモンの応答を GH の発現で調べた。変異体としてはイソメラーゼ活性中心の変異体である C/A Mt, 及び BPA が結合するそれぞれのドメイン欠損体 Δa , $\Delta b'$ である。その結果、 $\Delta b'$ の過剰発現では GH3 細胞の T3 応答に顕著な低下がみられた。一方で Δa , C/A Mt では低下が軽微であった。このことから、これまで、PDI を過剰発現すると甲状腺ホルモン応答が低下する原因は PDI に T3 が結合してその細胞内の濃度が低下するためと考えられてきたが T3 の結合部位を除去した $\Delta b'$ でも T3 応答に影響があることから、上記の説は否定された。一方、PDI のイソメラーゼ活性中心を除去した C/A Mt の過剰発現では影響が軽微であることから、甲状腺ホルモン受容体の活性には PDI のイソメラーゼ活性が必要であることが証明された。本研究では、このメカニズムについて検討した。

まず、PDI が関わっていることから、細胞の酸化還元状態を調べた。まずチオール基の酸化剤である diamide や過酸化水素を添加して T3 応答を検討したところ、低下がみられ、チオールの酸化は T3 応答を低下させることが明らかになった。それに対して還元剤である DTT の添加は影響を与えなかった。そこで核内因子を酸化還元している因子を検索したところ、Ref-1 の可能性が示唆された。PDI と Ref-1 を大腸菌で発現、精製して *in vitro* で酸化還元を検討した。その結果 PDI は Ref-1 を酸化することが明らかとなった(図3)。

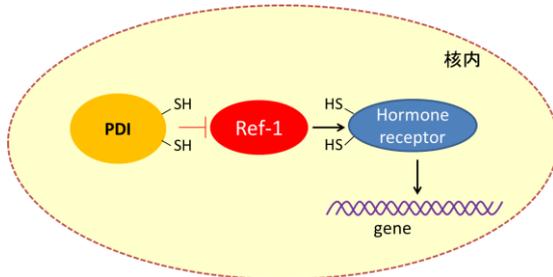


図3. PDIを介した甲状腺ホルモン受容体制御

このことから GH3 細胞において PDI を過剰発現すると Ref-1 の酸化が亢進して Ref-1 による TR の還元が抑制されるためであると推測された。一方で PDI のノックダウンを試みた。RNAi 法で行ったが、通常の条件では十分な低下が見られず、siRNA を何度か投与してやっと低下が見られた。しかし、予想に反して TR の応答は低下した。

sEH ドメインの機能解析及び新規基質の探索

sEH は N-末端側のホスファターゼ (PT) ドメインと C-末端側のエポキシドヒドロラーゼ (EH) ドメインからなる。EH ドメインの活性についての内在性の基質はアラキドン酸のエポキシ体 (EET) であることは古くから知られているが、PT ドメインの活性に対する内在性の基質は未知であった。本研究において、4-methylumbelliferyl phosphate を基質に用い、細胞から抽出した脂質による阻害実験さらには阻害画分の質量分析により、新規内在性の基質として LPA を発見した。既にそれぞれのドメインの機能として、細胞増殖や血管内皮増殖因子 VEGF の発現に関わることを明らかにしている。さらに sEH は一方の N-末ともう一方の C-末が結合してダイマーを形成していることが明らかになっている(図4)。

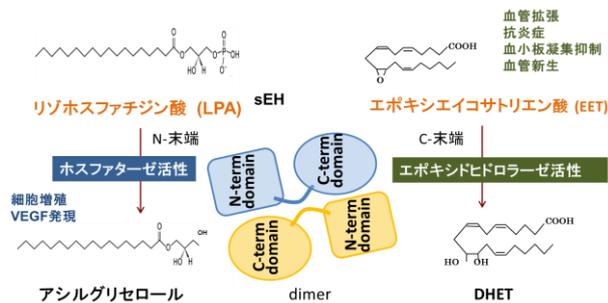


図4. 可溶性エポキシヒドロラーゼの機能

大腸菌を用いたヒトタンパク質のドメイン干渉系の開発

カナマイシン耐性の pET26 と通常のアンピシリン耐性の pQE ベクターを用いて、大腸菌で 2 つのタンパク質を同時に発現する系を作成した。すなわち、まず 1 個目のタンパク質を発現するために、pET ベクターに cDNA 例えば本研究の場合 PDI cDNA を導入しコンストラクトを作製し、大腸菌に導入し、カナマイシンで選択をした。さらに導入された大腸菌を用いてコンピテントセルを作製した。そこに第二の因子である PDI の b または b' ドメインの cDNA を導入した、アンピシリンで選択した。その結果、PDI と b または b' の同時発現には成功したが、b, b' の発現による PDI の発現量への影響は観察されなかった。ヒトのタンパク質では大腸菌でドメイン干渉は起こらないのかもしれない。そこで次にヒト培養細胞を用いて検討した。

PDI 及び sEH ドメイン過剰発現によるヒト培養細胞でのドメイン干渉

ヒト HEK293 細胞を用いて PDI の a' ドメインと相互作用することが明らかになった b' と相互作用しない b をそれぞれ発現して、内在性の PDI の発現を調べた。b の発現では PDI の発現量に変化がなかったが、b' の発現では顕著な低下が見られ、哺乳細胞でもドメイン干渉が起こる可能性が示唆された。さらに sEH において N-末端ドメイン、C-末端ドメインをそれぞれ発現したが、内在性の sEH の発現量に変化は見られなかった。

まとめ

本研究において、ドメイン間の相互作用が見られた PDI をターゲットにすることにより、哺乳動物でもドメイン干渉が起こることが証明できた。しかし、低下率は不十分なので、さらなる条件検討が必要と考えられる。

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 6 件)

1. Hashimoto S and Imaoka S. Protein disulfide isomerase regulates the thyroid hormone receptor-mediated gene expression via redox factor-1 through thiol reduction-oxidation. *J. Biol. Chem.* 288, 1706–1716, 2013. 査読有り
10.1074/jbc.M112.365239
2. Hashimoto S, Ito L, Okumura M, Shibano T, Nawata M, Kumasaka T, Yamaguchi H, and Imaoka S. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the complex between triiodothyronine and the bb' fragment of rat protein disulfide isomerase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 68 (Pt 4):476–478, 2012. 査読有り
10.1107/S1744309112007439
3. Hou H.H, Hammock B.D, Su K.H, Morisseau C, Kou Y.R, Imaoka S, Oguro A, Shyue S.K, Zhao J.F. Lee. TSN-terminal domain of soluble epoxide hydrolase negatively regulates the VEGF-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res.* 93(1): 120–129, 2012. 査読有り
10.1074/jbc.M112.365239
4. Hashimoto S, Yoshimura H, Okada K, Uramura N, Sugihara K, Kitamura S, and Imaoka S. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their derivatives on protein disulfide isomerase activity and growth hormone release of GH3 cells. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 656–663, 2012. 査読有り
10.1021/tx200374s
5. Oguro A and Imaoka S. Lysophosphatidic acids are new substrates for the phosphatase domain of soluble epoxide hydrolase. *J. Lipid. Res.*, 53, 505–512, 2012. 査読あり
10.1194/jlr.M022319

6. Imaoka S. Chemical stress on protein disulfide isomerases and inhibition of their functions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 290, 121-166, 2011.
査読有り
10.1016/B978-0-12-386037-8

[学会発表] (計 11 件)

1. 今岡進、「低酸素応答から酸化ストレス応答まで因子のクロストークについて」第 85 回日本生化学会大会 (招待講演)、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場
2. 大黒亜美、今岡進、「可溶性エポキシドヒドロラーゼの脱リン酸化ドメインの新規基質、リゾホスファチジン酸について」2012 年 12 月 15 日、第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場
3. 種田祥子、大黒亜美、今岡進、「酸化ストレスにおける可溶性エポキシド加水分解酵素発現抑制機構の解明」2012 年 12 月 15 日、第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場
4. Endang R. Purba, Oguro A, Imaoka S. “Identification and Comparison of EPHX2 (sEH) and EPHX4 (EH4) in *Xenopus laevis*” 2012 年 12 月 15 日、第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場
5. Elsa, A. Leuhery, Endang, R. Purba, Oguro A, Imaoka S. “Evaluation of Catalytic activities of soluble epoxide hydrolase (sEH) toward endogenous substrates, EETs and LPAs, in six genetic variants of polymorphism” 2012 年 12 月 15 日、第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場
6. 今岡進、「プロテインジスルヒドイソメラーゼ (PDI) への環境化学物質の結合とその作用機序について」第 39 回日本毒理学学会学術年会、2012 年 7 月 19 日、仙台国際センター
7. 志波徹朗、橋本翔子、今岡進、「Transmembrane thioredoxin-like protein (TMX) のビスフェノール A 結合性とイソメラーゼ活性の検討」第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日～2011 年 9 月 24 日、京都国際会館

8. 大黒亜美、川ノ上梨花、今岡進、「可溶性エポキシドヒドロラーゼ (sEH) の酸化ストレス下における Sp1 を介した発現調節」第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都国際会館

9. Hashimoto S, Shiomoto K, Okada K, and Imaoka S. “Structural changes of protein disulfide isomerase by the binding of bisphenol A”. ESF-EMBO Symposium: Glutathione and Related Thiols in Living Cells. September 6, 2011. Santa Feliu de Guixols, Spain

10. Oguro A, Sakamoto K, and Imaoka S. “Proliferation of cancer cells is mediated by EET production” 52nd International Conference on the Bioscience of Lipids. August 30, 2011, Warsaw, Poland

11. Imaoka S., Oguro A, and Suzuki S. “Contribution of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) to hypoxic response of cells”. 52nd International Conference on the Bioscience of Lipids. August 30, 2011, Warsaw, Poland

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ビスフェノール A 吸着剤及びその利用
発明者: 藤原伸介・今岡進
権利者: 学校法人関西学院
種類: 特許
番号: 特願 2013-042324
出願年月日: 2013 年 3 月 4 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

関西学院大学工学部今岡研究室

<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~imaoka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今岡 進 (IMAOKA SUSUMU)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号: 60145795

(2) 連携研究者

藤原 伸介 (FUJIWARA SHINSUKE)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号: 90263219