

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770102

研究課題名(和文)好熱性真核生物のゲノム情報を基盤とした小胞体関連分解装置の構造生物学研究

研究課題名(英文)Structural biology study of the ER-associated degradation machinery based on eukaryotic thermophile genomic information

研究代表者

佐藤 匡史 (Sato, Tadashi)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80532100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、小胞体において糖タンパク質の運命決定を下す小胞体品質管理マシーナリー(フォールディング装置、選別輸送装置、小胞体関連分解装置)の分子認識および作動機構の解明を目的とした。また、特徴となるアプローチは、真核生物の中で高い生育温度(約60°C)を持つ好熱カビのゲノム情報を活用することにある。本研究では、X線結晶構造解析によって、ジスルフィド結合の形成と異性化を触媒するプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)と糖タンパク質のプロセッシングに関わるグルコシダーゼIIの触媒ドメインの立体構造決定に初めて成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand the molecular recognition and operating mechanisms of quality control machineries responsible for the glycoprotein fate determination (folding, transport, and degradation) in the endoplasmic reticulum. Our distinctive approach includes application of the genome information of eukaryotic thermophiles that can grow at high temperature (about 60 degrees Celsius). Using X-ray crystallography, we successfully determined the first crystal structures of protein disulfide isomerase (PDI) catalyzing disulfide bond formation and isomerization, and the catalytic domain of glycoprotein processing enzyme glucosidase II.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：好熱性真核生物 立体構造解析 PDI グルコシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

小胞体で誕生したタンパク質は、分子シャペロンや酵素の助けを借りて高次構造形成が行われる。細胞内に異常なタンパク質が蓄積・分泌すると生体にとって有害となるので、分泌経路の入り口である小胞体には、高次構造形成に失敗したタンパク質を選別し、再生・破壊するための品質管理機構が備わっている。ミスフォールドしたタンパク質は最終的には小胞体から細胞質に逆行輸送され、そこでユビキチン・プロテアソーム系により分解を受ける。この機構は小胞体関連分解と呼ばれている。小胞体で合成されるタンパク質の多くはN型糖鎖を持っており、糖鎖をシグナルとして様々な糖加水分解酵素、糖転移酵素、細胞内レクチンにより品質管理機構は制御されている。糖タンパク質の品質管理システムは主に3タイプの分子装置から構成されていると想定されている。糖タンパク質の適切な立体構造形成を支援する糖タンパク質フォールディング装置、立体構造形成に失敗した糖タンパク質を不良品として分解へと導く装置、正しい立体構造を獲得した糖タンパク質を完成品として選別輸送する装置、の3つである。

この小胞体品質管理マシーナリーの中でも、糖タンパク質選別輸送装置の糖鎖とタンパク質の相互作用系についてはある程度理解が進んできた [Satoh et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 42, 782; Zheng et al. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 20499; Satoh et al. (2014) *PLoS ONE* 9, e87963]。しかしながら一方、の糖タンパク質フォールディング装置およびの小胞体関連分解装置の分子認識の理解に関しては、ほとんど進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

今回私は、糖タンパク質フォールディング装置と小胞体関連分解装置のシステムにおいて最上流で機能する、2つの糖加水分解酵素、グルコシダーゼ II とマンノシダーゼ (EDEM/Htm1) に着目した。グルコシダーゼ II は、N型糖鎖のD1アームの2つのグルコース残基を取り除くことにより、基質糖タンパク質を糖タンパク質フォールディング装置へ受け渡す役割と脱離させる役割を担っている。一方、EDEM/Htm1はD3アームの非還元末端のマンノース残基を取り除くことで、基質糖タンパク質の小胞体関連分解を促進させる。また、EDEM/Htm1は、プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) と複合体を形成することによって、その機能を発現している [Sakoh-Nakatogawa et al. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 11815; Gauss et al. (2011) *Mol. Cell* 42, 782]。

本研究では、X線結晶構造解析を軸とした構造生物学的アプローチを駆使することで、グルコシダーゼ II と EDEM/Htm1・PDI 複合

体の分子認識と作動メカニズムの構造基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

構造生物学研究において、安定性が高いタンパク質である程、一般に結晶化の確率が上がり溶解度などの物性が向上するため、高度好熱菌由来の耐熱性タンパク質はモデル分子として広く用いられている。そこで本研究では、最近、全ゲノム配列が明らかにされた真核生物の中で極めて高い生育温度 (約 60 °C) を持つ好熱カビ *Chaetomium thermophilum* に着目した。また、PDI については既に遺伝子を取得しているなど、我々の研究室において既に先行研究データがある、同じ好熱カビに属する *Humicola insolens* 由来の PDI も研究対象とした。

4. 研究成果

(1) 糖タンパク質の細胞内プロセッシングに関わるグルコシダーゼ II の立体構造解析
好熱カビ *C. thermophilum* からグルコシダーゼ II 遺伝子の cDNA クローニングを行い、大腸菌での大量発現系を構築した。大腸菌を用いて、GST 融合体として発現させ、種々のカラムクロマトグラフィーによる精製を行った後、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行った。その結果、十分な大きさの良質の結晶が得られ (図1)、フォトンファクトリーにて X 線回折実験を行った。その結果、1.6 Å の X 線回折強度データを収集することに成功した。位相決定は、セレノメチオニン置換体結晶を用いた単波長異常分散法により行い、2.40 Å での分解能のデータを収集した。構造解析の結果、良好な電子密度マップを得ることが出来た (図1)。これにより、全立体構造決定に向けて、モデル構築と構造精密化を進めることが可能になった。

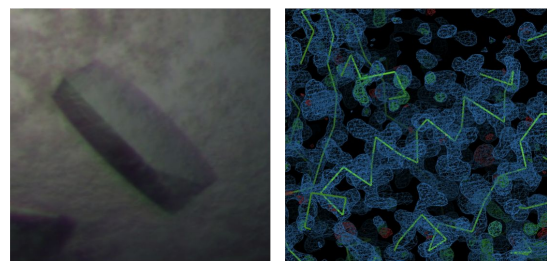


図1: グルコシダーゼ II 触媒ドメインの結晶の写真 (左)、本酵素の電子密度マップ (右)

(2) プロテインジスルフィドイソメラーゼの立体構造解析

本研究では、EDEM/Htm1・PDI 複合体による分子認識機構を明らかにすることを目的として、まずは各々の酵素の立体構造解析を行った。種々の検討を行った結果、*H. insolens* 由来の PDI の基質認識ドメインである *b'a'* ドメインの酸化型および還元型の結晶化に成功した。位相決定は、*b'* および *a'* ドメイン単独の NMR 構造を用いた分子置換法によ

り行い、最終的に還元型で 1.85 Å、酸化型で 3.30 Å の立体構造を決定することに成功した(図2)。しかしながら、酸化型と還元型の a' ドメイン内の立体構造を比較したところ、予想に反して酸化還元に依存した顕著な a' ドメイン内の構造変化は見出されなかった。すなわち、PDI の機能発現メカニズムを理解するためには、結晶構造解析のみでは十分でなく、相補的に溶液中での解析を行う必要がでてきた。

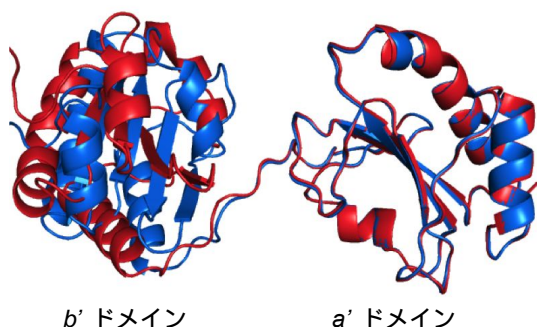


図2：酸化型（青）および還元型（赤）のPDIの立体構造。

そこで、X線結晶構造解析によって得られた構造情報を初期構造として、PDI-a'ドメインの還元型、酸化型それぞれについて150 nsのMD計算を実施した。計算には、自然科学研究機構・分子科学研究所・計算科学研究センターの奥村久士准教授が開発した独自プログラムを利用した。得られた計算結果に基づいて、立体構造の揺らぎの指標である root mean square fluctuation の解析を行った。その結果、酸化型 PDI-a' ドメインでは、還元型において安定していた一部のループ領域の構造の揺らぎが顕著に増大することがわかった。また、活性部位の酸化還元状態に依存した影響は、活性部位のシステイン残基周辺のみならずドメイン間相互作用に関与しているアミノ酸残基に伝播することが明らかとなった。こうした PDI-a' ドメインの構造揺らぎの変化が、ドメインの相対配置の制御において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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)

1. T. Satoh, Y. Saeki, T. Hiromoto, Y.-H. Wang, Y. Uekusa, H. Yagi, H. Yoshihara, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima, K. Tanaka, and K. Kato
Structural basis for proteasome formation controlled by an assembly chaperone Nas2
Structure, in press (2014). 査読有
DOI: 10.1016/j.str.2014.02.014
2. S. Yamamoto, GP. Subedi, S. Hanashima, T.

- Satoh, M. Otaka, H. Wakui, K. Sawada, S. Yokota, Y. Yamaguchi, H. Kubota, H. Itoh
ATPase activity and ATP-dependent conformational change in the co-chaperone HSP70/HSP90-organizing protein (HOP)
J. Biol. Chem., in press (2014). 査読有
3. T. Satoh, K. Suzuki, T. Yamaguchi, K. Kato
Structural basis for disparate sugar-binding specificities in the homologous cargo receptors ERGIC-53 and VIP36
PLoS ONE, 9, e87963 (2014). 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0087963
4. M. Nagae, K. Yamanaka, S. Hanashima, A. Ikeda, K. Morita-Matsumoto, T. Satoh, N. Matsumoto, K. Yamamoto, Y. Yamaguchi
Recognition of bisecting *N*-acetylglucosamine: structural basis for asymmetric interaction with the mouse lectin dendritic cell inhibitory receptor 2
J. Biol. Chem., 288, 33598-33610 (2013). 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.513572
5. K. Kumoi, T. Satoh, K. Murata, T. Hiromoto, T. Mizushima, Y. Kamiya, M. Noda, S. Uchiyama, H. Yagi, and K. Kato
An archaeal homolog of proteasome assembly factor functions as a proteasome activator
PLoS ONE, 8, e60294 (2013). 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0060294

[学会発表](計12件)

1. K. Inagaki, Y. Uekusa, Y. Kamiya, T. Satoh, and K. Kato
Molecular mechanism of redox-dependent domain rearrangement of the substrate-binding region of protein disulfide isomerase
第50回生物物理学会年会、2012年9月22日(名古屋)
2. K. Inagaki, Y. Uekusa, Y. Kamiya, T. Satoh, and K. Kato
Redox-dependent conformational dynamics of protein disulfide isomerase coupled with exposure of its substrate binding region
The 6th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", 2012年12月6日(京都)
3. K. Inagaki, Y. Uekusa, Y. Kamiya, T. Satoh, and K. Kato
Structural basis underlying the redox-dependent domain rearrangement of the substrate-binding region of protein disulfide isomerase
7th International Conference on Structural Genomics (ICSG2013-SLS), 2013年7月30日(札幌)
4. T. Zhu, K. Murata, T. Toshimori, M. Yagi-Utsumi, T. Satoh, and K. Kato

- Bacterial expression and EM analysis of UDP-glucose glycosyltransferase from a thermophilic fungus
糖鎖科学中部拠点第 11 回若手のカフォーラム、2013 年 9 月 9 日 (名古屋)
5. T. Zhu, K. Murata, T. Toshimori, T. Yamaguchi, M. Yagi-Utsumi, T. Satoh, and K. Kato
EM tomography analysis of ER folding sensor enzyme UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase
平成 25 年度 生理学研究所研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」, 2013 年 11 月 13 日 (岡崎)
6. K. Inagaki, Y. Uekusa, Y. Kamiya, S. Itoh, H. Okumura, T. Satoh, and K. Kato
Redox-dependent conformational changes of the substrate-binding region of protein disulfide isomerase
山田研究会・統合バイオサイエンスシンポジウム、2013 年 11 月 20 日 (伊良湖)
7. T. Zhu, K. Murata, T. Toshimori, T. Yamaguchi, M. Yagi-Utsumi, T. Satoh, and K. Kato
Overall structure of ER folding sensor UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase revealed by EM tomography
山田研究会・統合バイオサイエンスシンポジウム、2013 年 11 月 20 日 (伊良湖)
8. T. Zhu, K. Murata, T. Toshimori, T. Yamaguchi, M. Yagi-Utsumi, T. Satoh, and K. Kato
The structural biology study on ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT)
Yonsei-IMS Seminars on Biomolecular Sciences : Protein Structure and Diseases、2013 年 12 月 16 日 (Busan, Korea)
9. T. Zhu, T. Satoh, K. Murata, H. Kamikubo, T. Toshimori, T. Yamaguchi, M. Yagi-Utsumi, and K. Kato
Structural-architecture of the ER glycoprotein folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT)
2013 年度 生物物理中部支部会、2014 年 3 月 6 日 (岡崎)
10. 年森隆泰, 佐藤匡史, Tong Zhu, 加藤晃一
小胞体品質管理に関わるグルコシダーゼ II の基質認識機構の構造基盤
2013 年度 生物物理中部支部会、2014 年 3 月 6 日 (岡崎)
11. 稲垣宏弥, 植草義徳, 神谷由紀子, 伊藤暁, 奥村久士, 佐藤匡史, 加藤晃一
プロテインジスルフィドイソメラーゼの機能発現におけるミクロマクロ相関の探査

- 2013 年度 生物物理中部支部会、2014 年 3 月 6 日 (岡崎)
12. 佐藤匡史, 年森隆泰, Tong Zhu, 村田和義, 山口拓実, 矢木真穂, 加藤晃一
小胞体糖タンパク質フォールディング装置を構成するタンパク質群の構造生物学研究
日本薬学会 134 年会 2014 年 3 月 28 日 (熊本)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
佐藤 匡史 (SATOH, Tadashi)
名古屋市立大学
薬学研究科(研究院)・准教授
研究者番号: 80532100