

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650040

研究課題名(和文) セレノシステイン導入によるレドックス制御関連酵素の反応性の向上と応用

研究課題名(英文) Application of selenocysteine for enhancement of the reactivity of the enzymes related on redox regulation system

研究代表者

金森 審子 (Kanamori, Akiko)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：00261173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では、レドックス制御に関連する酵素が活性酸素種による酸化ストレスから細胞を守っている。特にタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのシャペロン活性は重要であり、同活性の低下・消失が原因の変性タンパク質の蓄積がアルツハイマー病の一因として報告されている。

本研究では、PDIの活性発現に必須な低分子、グルタチオン中のシステインを21番目のアミノ酸であるセレノシステインに変換したセレノグルタチオンを用い、PDIの活性促進および変性タンパク質を直接修正する効果の向上を示す結果を得た。得られた成果は、不溶性タンパクの蓄積が原因の疾患の予防・治療に応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The enzymes related on redox regulatory system work on the maintenance of the intracellular environment from reactive oxygen species (ROS) providing oxidative stress. Especially, it was reported that inactivation or decrease in chaperone activity of protein disulfide isomerase (PDI) cause accumulation of misfolded proteins resulting incidence of Alzheimer's disease. In this study, we pay attention to selenocysteine, the 21th amino acid, to introduce it into the active sites of glutathione or PDI. The difference in reactivity of cysteine and selenocysteine bring on the difference of reactivity to the molecules. We compared the effects on folding of misfolded proteins between glutathione (GSSG) and selenogluthathione (GSeSeG) by detecting the rate of recovered activity of misfolded RNase. The enhancement effect derived from GSeSeG was superior to that from GSSG on both chaperone activity of PDI and refolding of misfolded enzymes.

研究分野：生化学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：セレノシステイン、グルタチオン、フォールディング、品質管理機構、シャペロン、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、酸化ストレス、酸化還元酵素

## 1. 開始当初の背景

細胞には、生合成されたタンパク質が生理的機能を発揮できるような正しい立体構造（折り畳まれ方：フォールド状態）を獲得できるように制御する「品質管理機構」が存在する。小胞体では、酸化還元酵素が関与するレドックス制御システムにより、ジスルフィド結合を介してタンパク質のフォールディングが行われている。したがって、酸化還元酵素の活性部位と基質タンパク質に存在するシステイン残基間の反応性が制御の効率に大きく影響する。

上記の品質管理機構に寄与する主な酵素として、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (protein disulfide isomerase, PDI) 及び UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) が挙げられる。PDIは、タンパク質（糖タンパク質を含む）のフォールディング状態を識別して修正するシャペロン活性を有する。一方、UGGTは、糖タンパク質のフォールディング状態を識別して、ミスフォールドな場合にグルコースを転移した後にシャペロン分子に渡す、フォールディングセンサーとして機能している。

研究代表者らは先に、Sep15というセレノタンパク質が、ミスフォールドな状態の糖タンパク質に対するUGGT1のグルコース転移活性をグルタチオン ( $\gamma$ -L-グルタミル-L-システイニル-グリシン) 共存下で顕著に促進することを見いだした。セレノタンパク質とは、セレノシステインを含むタンパク質であり、活性部位にあるセレノシステインをシステインに変えると酵素活性が著減する例が多数報告されている。Sep15上のセレノシステインをシステインに変換したところ、同様にUGGT1の活性を促進する効果が低下した。セレノシステインはシステインの硫黄がセレンに置換されたアミノ酸であり、硫黄とセレンの求核性の違いか

らシステインよりも反応性に富むためと考えられる。そこで、タンパク質の品質管理に関与する酵素や小分子の活性部位のシステイン残基をセレノシステインに変換して各分子の反応性、すなわち、活性を増進させ、生理的機能の向上に活用することを発案した。

## 2. 研究の目的

グルタチオンはシステインを含むトリペプチドであり、生体内では還元型 (GSH) とシステイン残基がジスルフィド結合して二量体となった酸化型 (GSSG) が一定の平衡状態を保って存在している。PDI を含む多くの酸化還元酵素の活性発現に必須であり、酵素と基質の反応中間体の形成に寄与して、酵素の反応性をコントロールしている。他方、酸化ストレスによる PDI の活性の低下・消失により生じる変性タンパク質の蓄積がアルツハイマー病の一因として報告されており、PDI の活性促進・変性タンパク質の減少は、同疾患の予防・治療に応用できると期待される。本研究では、グルタチオン及び PDI の活性部位のシステインをセレノシステインに変換して反応性を向上させ、酸化ストレスによって細胞が受けるダメージの軽減・予防に応用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) GSSG 上のシステインをセレノシステインに変換したセレノグルタチオン (GSeSeG) と GSSG の反応性を比較した。当初はグルタチオンの生合成に携わる 4 種類の酵素をリコンビナントタンパク質として調製し、セレノシステインを出発物質として GSeSeG を合成することを計画・施行していたが、共同研究者から化学合成品の供与が可能となり、研究の効率化を考慮した結果、化学合成した GSeSeG を使用した。グルタチオンの活性について、①PDI のシャペロン活性を

促進する効果及び②ミスフォールドな状態の不活性型酵素タンパクに直接作用して活性型に戻す効果、の2点を検討した。すなわち、① PDI 存在下と② 非存在下で、不活性型リボヌクレアーゼ (RNase) のフォールド状態を修正して活性型へ戻す比率を検出して評価した。(2) PDI の活性部位中に存在するシステインをセレノシステインに変換することにより、PDI の反応性・活性の上昇が期待できると考えた。まず、PCR 法を利用してヒト PDI の発現プラスミドを構築した。次に、cDNA 配列に変異を導入することにより、1 分子中に2箇所存在する活性部位中のシステイン4残基を種々の組み合わせでセレノシステインに変換した変異体を調製した。各変異が PDI 活性に及ぼす影響の解析を進めている。

#### 4. 研究成果

(1) GSeSeG 共存下と GSSG 共存下を比較すると、PDI のシャペロン活性は、GSeSeG 共存下の方が有意に高かった。また、PDI 非存在下でも GSeSeG 共存下の方が不活性型酵素の活性回復が高く検出され、ミスフォールドな状態のタンパク質の立体構造を直接修正する活性においても優位性が認められた。したがって、① PDI の活性促進と ② 不活性型タンパク質に直接作用して立体構造を修正する活性のどちらも、セレノグルタチオンはグルタチオンよりも高いことが示された。その際、基質となったミスフォールドな不活性型酵素上のジスルフィド結合がスクランブルに架けられている状態でも、システインが還元されている状態でも同様な傾向が観察された。現在、グルタチオンを要する他の酵素タンパクの活性への影響の解析を計画・施行中であり、できるだけ早く学術論文として発表したいと考えている。これらの成果は、*in vitro* な実験結果

であるが、酸化ストレスを受けた細胞のダメージの軽減に活用できると期待される。また、酸化ストレスの原因である活性酸素種の解毒・減少への効果も検討中である。並行して、GSeSeG を用いた際に生じるセレノグルタチオン由来の分子種について HPLC による組成分析を進めた結果、中間体のピークの出現が観察され、反応機構の解析を詳細に進めている。

(2) PDI の活性部位中に存在するシステインをセレノシステインに変換した種々の変異体は、順次、分泌型リコンビナントタンパク質として単離・精製中である。シャペロン活性を測定するために十分な量が得られた時点で、セレノグルタチオンとの相乗効果も検討する予定である。

#### 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 1 件)

- ① Dedola S, Izumi M, Makimura Y, Seko A, Kanamori A, Sakono M, Ito Y, Kajihara Y, Folding of synthetic homogeneous glycoproteins in the presence of a glycoprotein folding sensor enzyme, *Angewandte Chemie International Edition*, 53, 2014, 2883-2887, DOI:10.1002/anie.201309665 (査読有) .

[学会発表] (計 6 件)

- ① 発表者 : Akiko Kanamori, Yoichi Takeda, Akira Seko, Yukishige Ito, Accelerating Effects of Sep15 on Glucosyltransferase Activity of the Folding Sensor Protein UGGT1, 第3回 比較発生糖鎖生物学とその工学的応用に関する日本・オーストリア2国間セミナー (The 3rd Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology)、2013年7月1日-3日、理化学研究所(埼玉県和光市)

- ② 発表者：藤田正一、和泉雅之、牧村 裕、瀬古 玲、金森審子、迫野昌文、伊藤幸成、梶原康宏、ハイマンノース型糖鎖を有するタンパク質MCP-1の化学合成及びUDP-グルコース：糖タンパク質グルコース転移酵素(UGGT)の基質認識の解明、第32回日本糖質学会年会、2013年8月5日-7日、大阪国際交流センター（大阪府大阪市）
- ③ 発表者：木内達人、牧村 裕、岡本 亮、和泉雅之、瀬古 玲、迫野昌文、金森審子、伊藤幸成、梶原康宏、均一な構造のハイマンノース型糖鎖を持つエリスロポエチンの合成、第32回日本糖質学会年会、2013年8月5-7日、大阪国際交流センター（大阪府大阪市）
- ④ 発表者：金森審子、武田陽一、瀬古 玲、伊藤幸成、セレノタンパク質Sep15によるフォールディングセンサータンパク質UGGT1の活性促進メカニズムの解析、第86回日本生化学会大会、2013年9月11-13日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ⑤ 発表者：金森審子、武田陽一、瀬古 玲、伊藤幸成、セレノタンパク質 Sep15によるフォールディングセンサータンパク質UGGT1の活性促進メカニズムの解析、東海大学マイクロ・ナノ啓発会[Tune]第3回学術講演会、2014年7月24日 東海大学（神奈川県平塚市）
- ⑥ 発表者：澁谷朋子、下平伸吾、荒井堅太、岩岡道夫、金森審子、セレノグルタチオンによるシャペロンタンパクPDIの活性促進メカニズムの解析、東海大学マイクロ・ナノ啓発会[Tune]第4回学術講演会、2015年2月26日、東海大学（神奈川県平塚市）

[その他]

東海大学生命化学科ホームページ  
[http://www.u-tokai.ac.jp/academics/undergraduate/engineering/applied\\_biochemistry/](http://www.u-tokai.ac.jp/academics/undergraduate/engineering/applied_biochemistry/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金森 審子 (KANAMORI AKIKO)  
東海大学・工学部・生命化学科・教授  
研究者番号：00261173

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

伊藤 幸成 (ITO YUKISHIGE)  
理化学研究所・伊藤細胞制御化学研究室・主任研究員  
研究者番号：80168385