

ヒト PDI ファミリー酵素によって触媒されるタンパク質のジスルフィド結合形成機構

東北大学 多元物質科学研究所 門倉 広

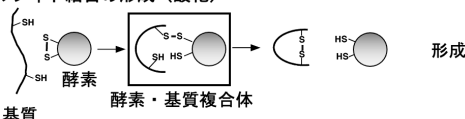


【略歴】

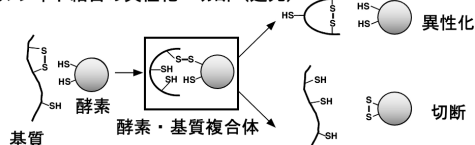
1990 年 東京大学大学院農学系研究科博士課程修了、博士（農学）
1990 年 東京大学農学部 助手
1996 年 東京大学大学院農学生命科学研究科 助手
2000 年 ハーバード大学医学部微生物分子遺伝学科 Visiting Assistant Professor/Instructor
2008 年 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 国際リサーチフェロー/研究員
2013 年 東北大学多元物質科学研究所 准教授

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、分泌タンパク質や膜タンパク質（以後、両者を分泌タンパク質と呼ぶ）の立体構造形成に重要である^{1,2)}。ヒトホルモン、消化酵素、抗体など有用な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。このようなタンパク質を微生物で生産する際には、正確なジスルフィド結合形成が上手く行えないことが、障害の一つになっている。これは哺乳動物細胞のジスルフィド結合形成システムと微生物のシステムの違いに起因していると考えられる^{1,2)}。更に、ジスルフィド結合の形成不全は、糖尿病や高脂血症などの疾患の原因になる。よって、哺乳動物細胞のジスルフィド結合形成システムを理解することは基礎と応用の両面から重要である。真核生物では分泌タンパク質へのジスルフィド結合の導入は、小胞体でおこなわれ、**protein disulfide isomerase (PDI)** ファミリーと呼ばれる一群の酵素によって触媒される^{1, 3-6)}。PDI ファミリー酵素は、基質上の2つのシステインを酸化する、あるいは

I. ジスルフィド結合の形成（酸化）



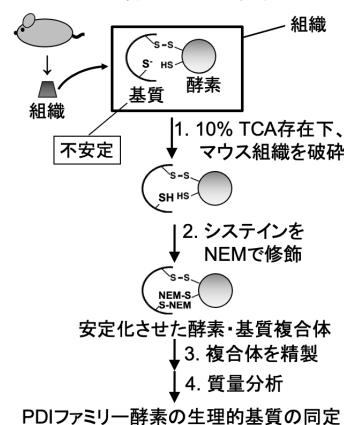
II. ジスルフィド結合の異性化・切断（還元）



PDIファミリー酵素によるジスルフィド結合の形成、異性化、切断
哺乳動物由来の有用タンパク質を効率よく生産する上で基盤となる知見を得ることを目的としている。

切断・異性化することによって、基質への正しいジスルフィド結合の導入を促進すると考えられている（左図）。ヒトを含む哺乳動物細胞の小胞体には、PDI ファミリー酵素が20種類も存在する。多くの種類の酵素が存在するのは、基質タンパク質のもつ多様な構造に対応するためだと考えられる。しかし、各酵素の機能の違いは未だよく分かっていない³⁻⁵⁾。本研究では、ヒト小胞体内に存在するPDI ファミリー酵素の役割の違いや、その活性制御の仕組みを解明することによって、

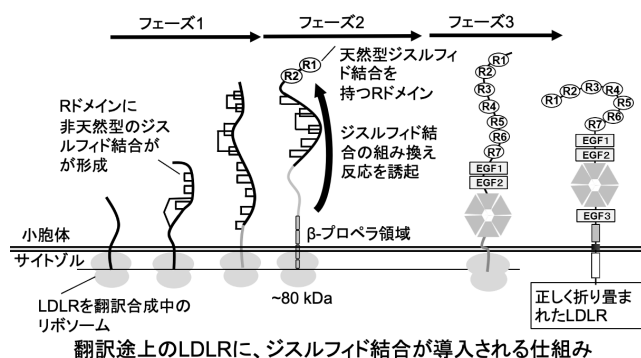
マウス組織中から特定の PDI ファミリー酵素の生理的な基質を網羅的に同定する手法の構築



ヒト小胞体に存在する20種類のPDI ファミリー酵素の役割分担を解明するための手がかりを得る目的で、マウス組織から特定のPDI ファミリー酵素の基質を網羅的に同定する手法を開発した^{3-4, 6)}。そのためには、ジスルフィド結合形成過程で、酵素と基質が分子間のジスルフィド結合で連結した、中間体が形成されることを利用した（左上図・左図）^{3, 7-9)}。この方法を用いた解析から、例えば、膵臓で特異的に発現しているPDI ファミリー酵素 PDIp は、膵外分泌細胞の作る細胞外プロテアーゼの折り畳みに必要であることを発見した³⁻⁴⁾。よって、ヒト細胞には、特定のタンパク質群の折り畳みに特化したPDI ファミリー酵素が存在する場合があります、当該タンパク質の立体構造形成には、その酵素が必要になることが分かった。従って、各PDI ファミリー酵素の特質を理解することは物質生産において極めて重要であることが判明した。

細胞中で翻訳途上のタンパク質にジスルフィド結合が導入される過程を調べるための系の構築

各 PDI ファミリー酵素の具体的な役割を解明するためには、それぞれの酵素が、ジスルフィド結合形成をとまなうタンパク質の折り畳み反応の、どのステップに関わるのかを明らかにする必要がある。そのための第一歩として、翻訳合成されつつ、小胞体内に送り込まれてくる LDL 受容体 (LDLR) にジスルフィド結合が形成される過程を調べるための、ジスルフィド結合形成モニタリング系^{7, 10)}を作成した。LDLR



は、血液中の悪玉コレステロールの代謝に必要な、マルチドメインタンパク質であり (左図)、ジスルフィド結合は、7 個の R ドメインと 3 個の EGF ドメインの各々に 3 本ずつ存在する。この系を用いた解析から、新生鎖が 80 kDa の大きさに伸長し、β-プロペラ領域の約半分が翻訳合成されると、R ドメインに導入されていた非天然型の結合が天然型の (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)。即ち、上流ドメインにおける

ジスルフィド結合形成反応が下流のドメイン内の配列によって制御されうることが、初めて分かった。この発見は、マルチドメインタンパク質の折り畳みを理解する上で極めて重要である¹⁰⁾。各ステップの反応を促進する PDI ファミリー酵素の同定やその具体的な仕組みの解明は、今後の重要な課題である。

今後の展望

ジスルフィド結合の形成は一見極めて単純な反応だが、以上、議論したこと以外にも、多くのことが不明である。例えば、個々の PDI ファミリー酵素が効率よく機能するためには酵素への酸化力や還元力の供給が必要であるがその実態についてもまだ不明瞭である¹⁰⁻¹¹⁾。特に、還元力は、間違った組み合わせのシステイン間に導入されたジスルフィド結合を切断するために必要だが、これを PDI ファミリー酵素に供給する経路についても、よく分かっていない。今後は、上記の手法を含む様々な方法を駆使することによって、ヒト小胞体におけるタンパク質の立体構造形成の一般原理や PDI ファミリー酵素の役割分担、更には PDI ファミリー酵素の活性制御機構の解明を推し進めていきたい。以上の解析から得られる知見は、ヒト由来の有用タンパク質を効率よく生産できるよう、微生物や動物細胞を育種する上での基盤となる情報をもたらすことから、産業界にも大きな波及効果をもつと期待している。

参考文献

1. 門倉 広 化学と生物 58: 441-443 (2020)
2. Kadokura & Beckwith *Antioxid Redox Signal* 13: 1231-1246 (2010)
3. Fujimoto *et al. Protein Sci* 28: 30-40 (2019)
4. Fujimoto *et al. J Biol Chem* 293: 18421-18433 (2018)
5. Tsuchiya *et al. J Cell Biol.* 217: 1287-1301 (2018)
6. Kadokura *et al. Biochem Biophys Res Commun* 440: 245-250 (2013)
7. Kadokura & Beckwith *Cell* 138: 1164-1173 (2009)
8. Kadokura *et al. Science* 303: 534-537 (2004)
9. Kadokura & Beckwith, *EMBO J* 21: 2354-2363 (2002)
10. Kadokura *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 117: 16401-16408 (2020)
11. Kanemura *et al. J Biol Chem* 295: 12772-12785 (2020)