

PDI ファミリータンパク質 TMX2 の ビスフェノール A 結合性と相互作用因子探索

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 今岡研究室 志波 徹朗

Transmembrane thioredoxin-like protein(TM_X)は、Protein disulfide isomerase(PDI)ファミリーに属するタンパク質で TM_X1~4 の 4 種類が報告されている。PDI は、新生タンパク質や変性したタンパク質のチオール結合を酸化、還元するイソメラーゼ活性やシャペロン活性を持つ酵素である。PDI には a、b、b'、a' のドメイン構造があり、a、a'ドメインには活性中心(CXXC)があり、b、b'ドメインには基質結合部位が含まれる。TM_X1,2,4 の 3 種類が a ドメインのみを含むのに対し、TM_X3 は a、b、b' ドメインを含むタンパク質であり、酸化活性を持つことが報告されているが、詳しい機能や相互作用因子などはまだ分かっていない。一方、先行研究において、内分泌かく乱物質であるビスフェノール A(BPA)と結合するタンパク質として PDI が同定され、BPA が b'ドメインに結合することによって、PDI の活性が阻害されることが明らかにされた。そこで、本研究において、TM_X の機能解析および BPA との結合性と活性阻害を検討した。ヒト神経芽腫細胞である SHSY5Y 細胞の RNA を用いて、TM_X1~4cDNA をクローニングし、作製したコンストラクトで大腸菌を形質転換し、タンパク質を発現・精製した。TM_X1~3 に関して、還元型 RNase を用いてイソメラーゼ活性を測定し、表面プラズモン共鳴法(Biacore)によって BPA 結合性を検討した。TM_X 1、3 は活性中心を持つことから予想したように、還元型 RNase を酸化型 RNase にする反応を触媒することが明らかになった。BPA 結合性では、PDI と比較した結果、PDI よりかなり低い結合性が、TM_X1、TM_X3 で検出された。また、TM_X2 は、PDI より高い結合性を示すことを明らかにした。

TM_X2 の相互作用因子を探索する目的で、HEK 細胞に FLAG タグを結合させた TM_X2 を過剰発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降したところ、TM_X2 を過剰発現させていない Mock 細胞と比べて差のあるバンドが検出でき、LC/MS を用いて解析したところ、三つのタンパク質が相互作用因子として同定された。ここでは、因子 A、B、C としておく。TM_X2 と相互作用因子 B を HEK 細胞において、共発現したところ、TM_X2 を免疫沈降することで、因子 B を検出でき、因子 B を免疫沈降することで、TM_X2 を検出することができた。因子 B と TM_X2 の相互作用の特異性を検討するために、因子 B を TM_X3 と共発現させた場合、共沈殿は起こらず、細胞内において、小胞体膜貫通タンパク質である TM_X2 の新規相互作用因子として、因子 B を見出した。

HEK 細胞に FLAG タグを結合した TM_X3 を過剰発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降したところ、TM_X3 を過剰発現させていない Mock 細胞と比べて差のあるバンドが検出でき、LC/MS を用いて解析したところ、二つのタンパク質が相互作用因子として同定された。ここでは、因子 D、E としておく。