

2016 年度 修士論文要旨

フォールディング中間体の構造解析から紐解く

蛋白質の品質管理機構

関西学院大学大学院理工学研究科
化学専攻 山口研究室 牧野 晃大

タンパク質は、ジスルフィド結合形成を伴った立体構造形成(以後酸化的フォールディングという)を受け、天然型の立体構造を構築することで、個々の機能を発現する。小胞体は他の細胞内小器官に比べ酸化的な環境にあり、酸化的フォールディングを触媒する等タンパク質の品質管理が行われている(Okumura *et al.*, (2015) *Free. Radic. Biol. Med.* **83**, 361-372)。例えばオートファジーがタンパク質の一生の終焉を迎えるイベントと考えれば、小胞体とはタンパク質の生い立ちの部分を支えるオルガネラの 1 つである。小胞体は全タンパク質の約 1/3 が成熟化を受ける重要な区画であり、こういったタンパク質には生物学的にも医学的にも重要な免疫グロブリンや、インスリン、血液凝固因子などが知られている。例えば免疫グロブリンが成熟化に際し約 100 本ものジスルフィド結合が導入されなければいけなく、抗体産生細胞中では 1 つの細胞あたり 1 秒間に 1,000 分子もの成熟型が凝集することなく合成される。またインスリンはフォールディングの際 3 つの天然型ジスルフィド結合様式を形成するが、たった 3 つで構成されるインスリンでさえ未だジスルフィド結合形成経路やその触媒機構は不明である。つまり、細胞内において基質へのジスルフィド結合を導入する触媒機構の存在は我々の生命活動を支えているといっても過言ではないが、上述のように多くの未解決の問題がある。そこで本研究課題ではタンパク質におけるジスルフィド結合の導入と立体構造構築の根底にある基本的原理を明らかにすることを目指し、さらに小胞体におけるタンパク質品質管理機構の一旦の理解をも目指した。

タンパク質におけるジスルフィド結合導入と立体構築における各論的あるいは普遍的知見を得るために、酸化的フォールディング経路が明らかでないプロウログアニリンを研究対象とした。プロウログアニリンとは、腸や消化管、腎採尿管などの様々な臓器に局在しており、16 残基からなる成熟体領域(ウログアニリン)と 70 残基からなるプロ領域を持つペプチドホルモン前駆体タンパク質である。生理学的な機能としては、各臓器の水分調節や塩化物イオン濃度調節に関わっている。プロ領域が成熟体領域の立体構造形成を制御していることは明らかにされてきたが(Hidaka *et al.*, (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 25155-25162)、未だプロ領域による天然型ジスルフィド結合の形成の制御、立体構造の構築の作用機序は明らかでない。

プロウログアニリンは大腸菌を用いて発現させ、既に確立された精製手法により(Okumura *et al.*, (2010) *FEBS J.* **278**, 1137-1144)、還元変性状態として調製した。RP-HPLC や MALDI-TOF/MS を用いフォールディング解析を行った結果、フォールディング反応中間体であるジスルフィド異性体 1, 2 を経由して天然構造へと移行する詳細な速度論解析を行った。特に

反応中間体であるジスルフィド異性体 1, 2 から天然構造へ移行することがわかった。ジスルフィド異性体 1 から天然構造への速度定数が $0.13 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ に対し、ジスルフィド異性体 2 から天然構造への速度定数が $3.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ と約 24 倍の速度の上昇がわかった。これは、主にジスルフィド異性体 2 を経由して天然構造へとジスルフィド結合の交換反応を伴ってフォールディングする経路が主であることを意味する。天然構造、ジスルフィド異性体 1, 2 の還元的アンフォールディング解析の結果、すべてジスルフィド異性体 2 を経て還元、アンフォールディングされていることがわかり、フォールディングとアンフォールディング反応どちらにおいてもジスルフィド異性体 2 を経由し、プロ領域による天然型ジスルフィド結合の形成の制御における重要な反応中間体であると考えられる。次に、天然型プロウログアニリン及び反応中間体の二次構造を調べるため、遠紫外円偏光二色性スペクトル測定を行った。その結果、ジスルフィド異性体 1 はランダムコイル構造、ジスルフィド異性体 2 は天然構造と似たスペクトル形状をもつ一方、天然構造よりヘリカルな二次構造を持つことが明らかになった。そこで、ジスルフィド異性体 2 の構造決定のため、安定同位体標識(^{13}C , ^{15}N)による NMR 解析を行った。 ^1H - ^{15}N HSQC, HNCACB, CBCA(CO)NH スペクトルを測定し、連鎖帰属法を用いて ^1H - ^{15}N HSQC の主鎖の炭素鎖を帰属した。その結果、天然構造とジスルフィド異性体 2 の各アミノ酸のスペクトルの移動度を求めたところ、プロ領域の N 末端と成熟体領域が大きく移動していることから、プロ領域の N 末端と成熟体領域が相互作用によって、フォールディングを制御していると考えられる。

フォールディング中間体のジスルフィド結合の組み換えについて、小胞体内では主に酵素 Protein Disulfide Isomerase (PDI) が働いておりタンパク質の品質を管理している(Okumura *et al.*, (2014) *J. Biol. Chem.* **289**, 27004-27018)。PDI が標的とする基質はインスリン等ペプチドホルモンや多くの分泌タンパク質であり多種多様な形、大きさ、ジスルフィド結合数を持つが、PDI によるフォールディング中間状態の基質認識における普遍的原理は未だ不明である。その理由として安定化した基質フォールディング中間体の単離精製が困難であり種々の生化学的アッセイや複合体の構造解析が進んでいないことが挙げられる。そこで、プロウログアニリンのフォールディング中間体を用い、PDI による基質認識の評価を見積もった。その結果、PDI によるジスルフィド結合の交換能はジスルフィド異性体 1 に比べジスルフィド異性体 2 の方が高く、これは PDI がジスルフィド異性体 1 のようなランダムコイル構造を持つ中間体を認識する能力は低く、ジスルフィド異性体 2 のような高度に折りたたんだ反応中間体の特異的に認識することを示唆している。

以上の知見は、過渡的に集積される反応中間体の物理化学的性質を明らかにしただけでなく、酵素基質反応における酵素と基質反応中間体の構造機能関連の評価から実際に細胞の中で起こっている生理的な反応制御反応をも理解しようとするものであり、本研究によってタンパク質品質管理における幾つもの概念を提唱する。