

共同利用研究ハイライト

X線小角散乱解析が明らかにしたPDIファミリータンパク質ERp46及びPDI酸化酵素Ero1 α の構造ダイナミクスと機能

金村 進吾 東北大学学際科学フロンティア研究所 教育研究支援者
 奥村 正樹 東北大学学際科学フロンティア研究所 助教
 稲葉 謙次 東北大学多元物質科学研究所 教授

1. はじめに

細胞小器官の一つである小胞体において、全タンパク質の約3分の1を占める分泌タンパク質は、二つのシステインのチオール基間の共有結合すなわちジスルフィド結合の形成を伴う立体構造形成（以下、酸化的フォールディングという）を受ける。一方で、非天然型のジスルフィド結合の形成は誤った立体構造形成を誘起するため、小胞体内には誤ったジスルフィド結合を修復あるいは分解除去するシステムも存在する。小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積すると神経変性疾患や糖尿病などの疾病の原因となることが知られる。そこで、哺乳動物細胞の小胞体にはタンパク質の品質を厳密に管理するため、ジスルフィド結合の形成・異性化・開裂を触媒する酵素群として20種類以上ものProtein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリータンパク質及び数種類のPDI酸化酵素が存在する^[1]。本稿では、X線小角散乱法 (SAXS) によって明らかとなったPDIファミリータンパク質の一つERp46及びPDI酸化酵素Ero1 α の新たな構造情報を基に、小胞体におけるジスルフィド結合形成経路の最新の知見について概説する。

2. PDIファミリータンパク質ERp46の構造と機能

PDIファミリータンパク質の一つERp46は、三つのチオレドキシン様ドメイン (Trx1, Trx2, Trx3) で構成され

ており、いずれのドメインも酸化還元活性を示すCys-Gly-His-Cys配列を持つ。各ドメインの構造は、X線結晶構造解析により決定されているが、ERp46の全長構造における各ドメインの空間的配置や分子全体の形状は明らかではなかった。そこで、全長ERp46の構造情報を得るために、酸化型と還元型ERp46のSAXS実験を行った。その結果、酸化型と還元型ERp46のゼロ濃度外挿後の散乱プロファイルは非常によく一致し、酸化還元による大きな構造変化はなかった。ギニエ解析より、酸化型ERp46の慣性半径 (R_g) は41.7 Å、還元型は41.6 Åと見積もられた。ERp46の理論分子量が47 kDaに対し、酸化型は52 kDa、還元型は51 kDaで

あり、いずれの状態においてもERp46は溶液中で単量体をとることがわかった。さらに、酸化型と還元型ERp46の全体構造を解析するため、距離分布関数 $P(r)$ を算出し最大分子長 (D_{max}) を決定した。その結果、酸化型ERp46の D_{max} は141 Å、還元型は137 Åであり、酸化型ERp46が還元型ERp46に比べ、わずかに大きい分子形状であることが示された。次に、各ドメインの結晶構造とSAXSデータを基に、酸化型と還元型ERp46の全長構造のダミーアトムモデルを構築した。その結果、ERp46は酸化還元状態によらず三つのチオレドキシン様ドメインは互いに相互作用することなく長いループによって繋がっており、他のPDIファミ

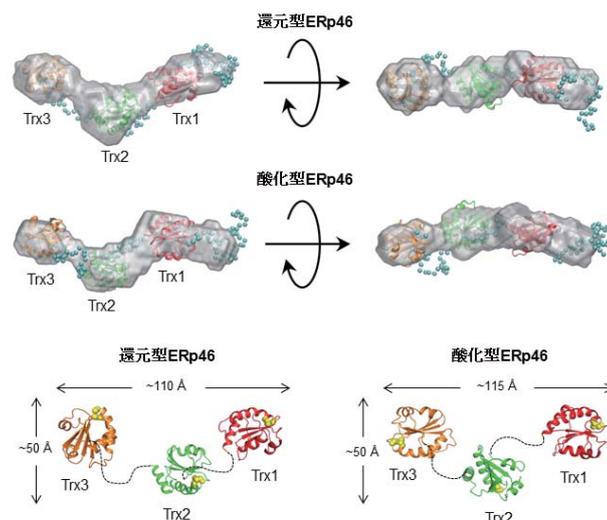


図1 全長の酸化型ERp46と還元型ERp46の溶液構造。上図は、ダミーアトムモデル (灰色) に重ね合わせた代表的なリジッドボディモデルを表す。各チオレドキシン様ドメイン (Trx1, Trx2, Trx3) はX線結晶構造解析により決定している。水色のスフィアはループを示す。下図の黒点線はチオレドキシン様ドメインをつなぐループ領域を示し、黄色のスフィアは酸化還元活性部位を示す (参考文献2の図を改変)。

リータンパク質には見られない新規な「開いたV字構造」をとることが明らかとなった(図1)。さらに逆相HPLCを用いた還元変性BPTIの酸化的フォールディングの解析により、ERp46の三つのチオレドキシ様ドメインはBPTIのフォールディング初期過程において独立してランダムかつ迅速にジスルフィド結合を導入することが示された。一方、BPTIのフォールディング後期において、PDIはU字構造内部の疎水性ポケットにフォールディング中間体を取り込み、互いに向き合った二つの活性部位が協調的に働くことで効率よくジスルフィド結合の組換えを行うことも示された。基質のフォールディングステージに応じたERp46とPDIによる基質認識およびジスルフィド結合形成機構の違いが、効率的な基質の酸化的フォールディングにつながることを提唱した^[2]。

3. PDI酸化酵素Ero1 α の新規活性制御機構

哺乳動物細胞においてPDIの主たる酸化酵素であるEro1 α は、小胞体内の酸化還元環境に応じて四つのregulatoryシステイン(Cys94, Cys99, Cys104, Cys131)間でジスルフィド結合の架橋様式を変えることで、自身の活性を厳

密に制御する。最近、我々のグループは、新たに高等動物細胞のEro1ファミリーに高度に保存されているCys208とCys241もEro1 α の酸化活性制御に関わることを明らかにした^[3]。実際、Cys208とCys241をSerに置換したEro1 α 変異体のPDIに対する酸化活性を測定したところ、野生型よりも高活性を示した^[3]。そこで、この高活性型Ero1 α の構造情報を取得するため、野生型と高活性型Ero1 α のSAXS実験を行った。その結果、 R_g が野生型では26.6 Å、高活性型では26.2 Åと、ほとんど同じ値を示した。ゼロ濃度外挿後のそれぞれの散乱プロファイルもほぼ一致しており、SAXS解析から野生型と高活性型は同じ溶液構造をとることが強く示唆された。このことは、示差走査熱量計による熱力学的な構造安定性の評価において、野生型と高活性型のEro1 α がほぼ同じ変性温度を示すことも矛盾しない。以上のことから、Ero1 α のCys208-Cys241ジスルフィド結合は構造安定性ではなく機能調節に関与するジスルフィド結合であると結論付けた。

当研究室で決定したEro1 α の結晶構造を眺めると^[4]、Ero1 α には明確な電子密度を示さない二つの長いループ領域が存在する。一つは四つのregulatory

システインを含むループI、もう一つはCys208とCys241を含むループIIである。そこで我々は、Cys208とCys241がループIIの動的性質を制御することで、Ero1 α の活性を制御すると予測した。これら二つのループを含むEro1 α 全長の構造情報を取得するため、SAXSによる観測データと結晶構造を基に、分子研の秋山教授の主導のもとEnsemble Optimization Method (EOM)解析を行った。その結果、ある一つのリジッドボディモデルから計算した散乱プロファイルと、実測の散乱プロファイルとは一致しなかったが、異なるループ構造をもつ複数の状態の集合であると仮定すると、実測の散乱プロファイルとよく一致した(図3)。さらに、これら二つのループ構造の動きを定量的に調べるため、EOM解析によって推定されたモデル構造の R_g と D_{max} をプロットした結果、一つの値には収束せず、試行ごとに異なる値を示した(図4)。このことは、溶液中でEro1 α の二つのループ領域は一つの決まった構造をとるのではなく、非常に高いフレキシビリティを有することを示唆する。さらにここでは詳細を割愛するが、系統的な生化学解析により、PDIがEro1 α のループIIを足場としてCys208-Cys241ジスルフィド結合を還元することで、

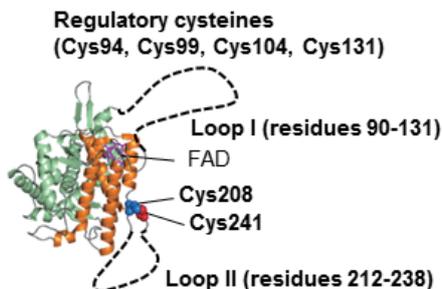


図2 Ero1 α の結晶構造(PDB: 3AHQ)。二つの黒点線は、結晶構造解析において電子密度を示さない仮定のループ構造を表す。

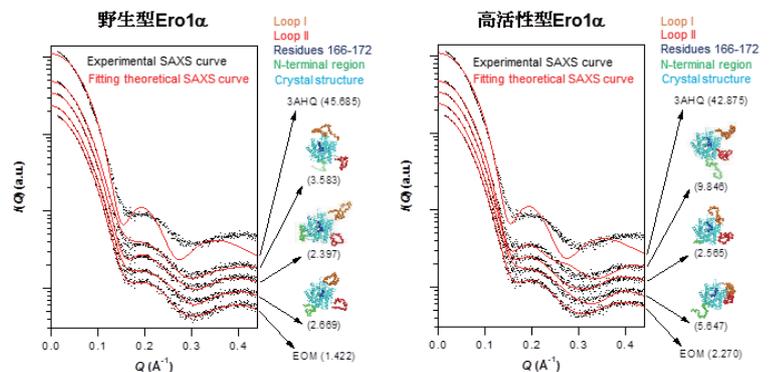


図3 SAXS解析によって得られた野生型Ero1 α (左図)と高活性型Ero1 α (右図)の散乱プロファイル。各モデル構造の下のカッコ内の値はフィッティングの指標である χ^2 値を示す(参考文献5の図を改変)。

Ero1 α のさらなる高活性化につながることを突き止めた^[5]。

4. おわりに

本稿で紹介したSAXS解析によるERp46の全長構造のモデル構築及びEro1 α のEOM解析は、分子科学研究所・秋山修志教授と共同で行ったものであり、ここに感謝申し上げます。

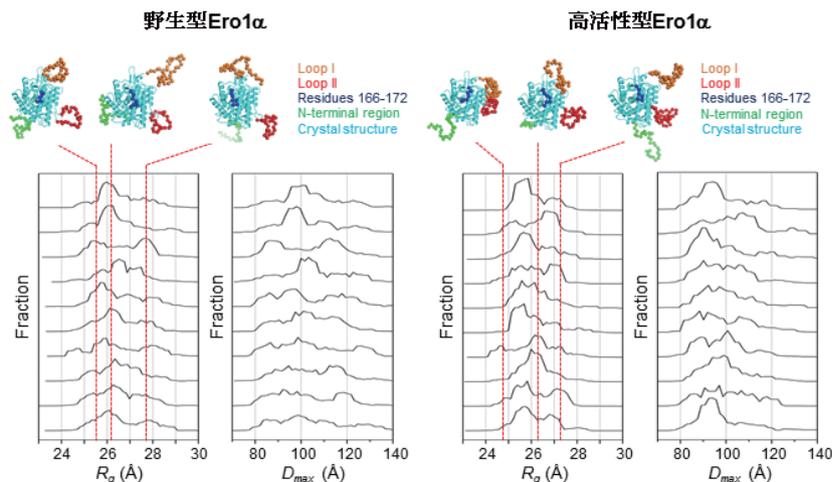


図4 EOM解析によって得られた野生型Ero1 α (左図)と高活性型Ero1 α (右図)の R_g と D_{max} の分布 (参考文献5の図を改変)。



金村 進吾 (かねむら しんご)
2012年関西学院大学理工学部化学科卒業、2014年関西学院大学大学院理工学研究科化学専攻博士前期課程修了、2015年日本学術振興会特別研究員DC-2、2017年東北大学大学院生命科学研究所博士後期課程修了、同年より現職。
研究内容：哺乳動物細胞の小胞体におけるジスルフィド結合形成ネットワークの構造基盤。



奥村 正樹 (おくむら まさき)
2010年日本学術振興会特別研究員DC-2、2011年関西学院大学大学院理工学研究科化学専攻博士後期課程修了、同年より日本学術振興会特別研究員PD、2012年九州大学生体防御医学研究所学術研究員、2013年日本学術振興会特別研究員PD、2016年東北大学多元物質科学研究所助教、2017年より現職。第16回日本蛋白質科学会若手奨励賞を受賞。
研究内容：タンパク質のおりたたみにおけるジスルフィド結合の役割、酵素によるフォールディング中間体の認識。



稲葉 謙次 (いなば けんじ)
1998年京都大学工学研究科博士課程修了、1998年英国MRC博士研究員、2000年京都大学ウイルス研究所博士研究員、2001年JST さきがけ21研究員、2005年JST CREST研究員、2006年九州大学生体防御医学研究所准教授、2013年より現職。第8回日本学術振興会賞、文部科学大臣表彰若手科学者賞、第7回日本分子生物学会三菱化学奨励賞を受賞。
研究内容：細胞のタンパク質品質管理機構の分子基盤。

参考文献

- [1] Okumura, M., Kadokura, H., and Inaba, K. Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. *Free Radic. Biol. Med.* **83**, 314–322 (2015).
- [2] Kojima, R., Okumura, M., Masui, S., Kanemura, S., Inoue, M., Saiki, M., Yamaguchi, H., Hikima, T., Suzuki, M., Akiyama, S., and Inaba, K. Radically different thioredoxin domain arrangement of ERp46, an efficient disulfide bond introducer of the mammalian PDI family. *Structure* **22**, 431–443 (2014).
- [3] Ramming, T., Okumura, M., Kanemura, S., Baday, S., Birk, J., Moes, S., Spiess, M., Jenö, P., Bernèche, S., Inaba, K., and Appenzeller-Herzog, C. A PDI-catalyzed thiol-disulfide switch regulates the production of hydrogen peroxide by human Ero1. *Free Radic. Biol. Med.* **83**, 361–372 (2015).
- [4] Inaba, K., Masui, S., Iida, H., Vavassori, S., Sitia, R., and Suzuki, M. Crystal structures of human Ero1 α reveal the mechanisms of regulated and targeted oxidation of PDI. *EMBO J.* **29**, 3330–3343 (2010).
- [5] Kanemura, S., Okumura, M., Yutani, K., Ramming, T., Hikima, T., Appenzeller-Herzog, C., Akiyama, S., and Inaba, K. Human ER oxidoreductin-1 α (Ero1 α) undergoes dual regulation through complementary redox interactions with protein-disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* **291**, 23952–23964 (2016).