トピックス

新規PDIファミリータンパク質ERp46の構造と機能

奥村正樹, 金村進吾, 稲葉謙次 東北大学多元物質科学研究所

1. はじめに

2つのシステイン残基間で形成されるタンパク質ジスルフィド結合は、分泌タンパク質や膜タンパク質が立体構造を形成するうえで重要な役割を持つ。タンパク質に複数のジスルフィド結合を導入する際、迅速かつ選択的に天然型のジスルフィド結合を形成することは、タンパク質の不活性化やミスフォールド体の蓄積を抑えるうえで重要である¹⁾。小胞体は他のオルガネラに比べ酸化環境にあり、ジスルフィド結合の導入を伴ったフォールディング反応が起こる場である。小胞体内でジスルフィド結合を触媒する反応は、従来 Protein Disulfide Isomerase (PDI) と PDI を再酸化する酵素 ER oxidoreductin-1 (Ero1) により行われると考えられてきた。しかしながら、哺乳動物細胞の小胞体には 20 種類以上の PDI ファミリータンパク質とその上流に位置する複数の PDI 酸化酵素がジスルフィド結合形成のための複雑かつ巧妙なネットワークを構成することが明らかになりつつある²⁾⁻⁵⁾。最近我々は、PDI ファミリータンパク質の 1 つ ERp46 が他の PDI ファミリーにはみられない新規の構造と酸化的フォールディングにおける独自の機能を有することを明らかにしたので、本編において紹介する。

2. ERp46 の各ドメインの結晶構造

ERp46 は、3つのチオレドキシン様ドメイン (Trx1, Trx2, Trx3) により構成されており、いずれのドメインも酸化還元活性を示す CGHC 配列を持つ。各ドメインの結晶構造解析により、これらチオレドキシン様ドメインの主鎖構造は非常によく重なることがわかった。しかしながら、Trx3 と比べて Trx1 と Trx2 の酸化還元活性部位の近傍は正電荷を帯びていることが明らかとなった⁶⁾。これに関連して、ERp46 を特異的に酸化する酵素の 1 つ Peroxiredoxin-4 (Prx4) との反応性は、Trx3 よりも Trx1 や Trx2 の方が高いことも明らかとなっ

た。そこで、Trx2 と Prx4 の ERp46 相互作用領域 (具体的には Prx4 C 末端領域の His244-Pro263 フラグメント) との複合体の結晶構造解析を行った結果、Trx2 の活性部位近傍の正電荷アミノ酸を構成する Arg281 の側鎖のグアニジノ基と Prx4 の Glu246 の主鎖のカルボニル基とが水素結合を形成していることがわかった⁶⁾。この相互作用様式は、以前に我々が報告した他の PDI ファミリーの 1 つ P5 の a⁰ ドメインと Prx4 C 末端フラグメントとの複合体の結晶構造においてもみられ³⁾、Prx4 によるチオレドキシン様ドメインの共通の分子認識機構と考えられる。

3. ERp46 の全長構造

全長 ERp46 の構造情報を得るために、X 線小角散乱 (Small Angle X-ray Scattering; SAXS) 解析を行った。これまでに PDI は活性部位の酸化還元状態変化によりチオレドキシン様ドメインの有意な配置変換を示すことが知られているが⁷⁾、ERp46 においても同様の現象がみられるか調べた。酸化型 ERp46 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起こっていないことが示された。またギニエプロットより、慣性半径が酸化型では 41.7 Å、還元型では 41.6 Å と見積もられた。分子量については、理論値が 47 kDa に対し、酸化型では 52 kDa、還元型では 51 kDa と見積もられ、いずれの状態においても溶液中でほぼ単量体をとることがわかった。さらに酸化型 ERp46 と還元型 ERp46 の分子形状を詳細に調べるため、原子間距離分布関数 $P(r)$ 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 ERp46 の D_{max} は 137 Å であり、酸化型 ERp46 が還元型 ERp46 に比べ、僅かに大きい分子形状であることが示された。次に、X 線結晶構造解析により決定した各チオレドキシン様ドメイン (Trx1, Trx2, Trx3) の構造と SAXS による解析データから算出された低分解能像を基に、酸化

A Radically Different Thioredoxin Domain Arrangement Explains the Efficient Catalysis of Disulfide-bond Introduction by the PDI Family Member, ERp46

Masaki OKUMURA, Shingo KANEMURA and Kenji INABA

Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University

図 1 酸化型 ERp46 と還元型 ERp46 の全長構造は共に、3つのチオレドキシ様ドメインが長いループによってつながっており、開いたV字形の構造をとる。各ドメインの酸化還元活性部位は黄色の球充填で示す。図1の下図は、今回決定した各チオレドキシ様ドメインの結晶構造を用いて、各チオレドキシ様ドメインの配置を最適化したリジッドボディを表す。水色のビーズ（1つの球が1つのアミノ酸に対応）はチオレドキシドメイン間を結ぶループ領域およびN末端ループ領域を表す。（文献6の図を改変）

型 ERp46 と還元型 ERp46 の全長構造モデル（正確にはダミーアトムモデル）を構築した（図1の灰色表示）。いずれの構造においても、3つのチオレドキシ様ドメイン間は互いに接触することなく長いループによってつながっており、他の PDI ファミリータンパク質にはみられない新規な「開いたV字構造」をとることが明らかとなった（図1）。また、各ドメインの活性部位は分子表面に露出しているものの互いに離れて位置しており、このことから、3つのチオレドキシ様ドメインは独立して基質にはたらきかけると推測される。

4. | PDI ファミリータンパク質 ERp46 の機能

ERp46 の基質として *Bovine Pancreas Trypsin Inhibitor* (BPTI) を用い、HPLC による酸化的フォールディング解析を行った結果、ERp46 は BPTI に正確ではないが迅速にジスルフィド結合を導入することがわかった。実際、ERp46 が触媒する酸化的フォールディング反応において、非天然型のジスルフィド結合を有する多くのフォールディング中間体が過渡的に蓄積することを観測した。ERp46 は開いたV字構造上で各ドメインの活性部位を溶媒に露出させ、アンフォールドした基質にランダムかつ迅速にジスルフィド結合を導入するものと推測される（図2）。これに対し、PDI が触媒する反応では、ジスルフィド結合の導入に時間は

図 2 本研究において提案された小胞体における酸化的フォールディング反応触媒システムの作用機構モデル。主として、ERp46 はフォールディング初期に還元変性状態の基質に迅速にジスルフィド結合を導入する。一方 PDI は、フォールディング後期に中間状態の誤ったジスルフィド結合を組換え、天然構造へ導く。（文献6の図を改変）

かかるものの、天然型のジスルフィド結合を有する中間体のみが観測された。PDI は、そのU字構造の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、互いに向き合った活性部位が協調的にはたらくことで、効率よく選択的に天然型のジスルフィド結合を導入すると考えている（図2）⁶⁾。

興味深いことに、ERp46 と高いジスルフィド結合異性化活性を有する PDI とが協同的にはたらくことにより、天然型への正しい酸化的フォールディング反応が相乗的に加速されることを発見した^{3), 6)}。この反応において、ERp46 は迅速にジスルフィド結合を導入する酸化酵素としてはたらき、一方 PDI は ERp46 によって導入されたジスルフィド結合を効率よく組換える酵素として機能していることを明らかにした。このことから、哺乳動物細胞の小胞体では、複数の酸化還元経路が機能分担しながら精巧なネットワークシステムを構成し、そのことがジスルフィド結合を有する多くの分泌タンパク質・膜タンパク質の効率的な産生につながると考えている。細胞内における ERp46 の基質特異性や酸化還元パートナータンパク質の同定など、今後さらなる本酵素の生理的機能の解明が待たれる。

5. | おわりに

現在では、バクテリアからヒトまでほとんどすべての生物において精巧なジスルフィド触媒システムが存在することが知られているが、高等生物であればあるほど関与する因子の数は増え、より複雑なシステムになっていると思われる。このことは、あるジスルフィド結合形成経路が破綻しても他の経路がバックアップする可能性を示唆しており、長い進化の過程で生物は

そのような複雑かつ巧妙なシステムを確立してきたものと考えられる。今後、さらなる構造生物学・細胞生物学的アプローチにより、小胞体が備えるタンパク質品質管理機構の理解が深まることを期待したい。

謝 辞

本稿で紹介したX線小角散乱法によるERp46の全長構造のモデル構築は、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。

文 献

- 1) Okumura, M. *et al.* (2012) FEBS J. **279**, 2283-2295. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08596.x.
- 2) Sato, Y., Inaba, K. (2012) FEBS J. **279**, 2262-2271. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08593.x.
- 3) Sato, Y. *et al.* (2013) Sci. Rep. **3**, 2456. DOI: 10.1038/srep02456.
- 4) Okumura, M. *et al.* (2014) J. Biol. Chem. **289**, 27004-27018. DOI: 10.1074/jbc.M114.564104.
- 5) Tavender, T. J. *et al.* (2010) EMBO J. **29**, 4185-4197. DOI: 10.1038/emboj.2010.273.
- 6) Kojima, R. *et al.* (2014) Structure **22**, 431-443. DOI: 10.1016/j.str.2013.12.013.
- 7) Wang, L. *et al.* (2013) Antioxid. Redox Signal. **19**, 36-45. DOI: 10.1089/ars.2012.4630.

奥村正樹

奥村正樹 (おくむら まさき)

日本学術振興会特別研究員 PD (東北大学多元物質科学研究所)

2010 年日本学術振興会特別研究員 DC-2, 11 年関西学院大学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, 12 年九州大学生体防御医学研究所学術研究員, 13 年より現職.

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

連絡先: 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1

E-mail: okmasaki@mail.tagen.tohoku.ac.jp

金村進吾

金村進吾 (かねむら しんご)

東北大学大学院生命科学研究科博士後期課程

2012 年関西学院大学理工学部化学科卒, 14 年関西学院大学理工学研究科化学専攻博士前期課程修了, 14 年より東北大学大学院生命科学研究科博士後期課程に在籍.

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

連絡先: 同上

E-mail: shingok@mail.tagen.tohoku.ac.jp

稲葉謙次

稲葉謙次 (いなば けんじ)

東北大学多元物質科学研究所生体分子構造研究分野教授

1998 年京都大学工学研究科博士課程修了, 98 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, 01 年 JST さきがけ 21 研究員, 05 年 JST CREST 研究員, 06 年九州大学生体防御医学研究所准教授, 13 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

連絡先: 同上

E-mail: kinaba@tagen.tohoku.ac.jp

URL: <http://www.tagen.tohoku.ac.jp/modules/laboratory/index.php?laboid=87>