

令和3年4月21日

報道機関 各位

東北大学
関西学院大学
徳島大学
韓国基礎科学支援研究院
分子科学研究所

**細胞のタンパク質品質管理機構に関する新たな知見
～ジスルフィド結合の形成・開裂に関わる酵素の
新たな二量体形成モチーフの発見と機能制御機構の解明～**

【発表のポイント】

- X線結晶構造解析^{注1}およびX線小角散乱 (SAXS)^{注2}を組み合わせることで、ジスルフィド結合の形成・開裂に関わる酵素 P5 の、動きに富む二量体構造を決定した。
- P5 の二量体形成モチーフは、これまで見つかったロイシンジッパーなどのモチーフと似ているものの、相互作用様式は根本的に異なることを明らかにした。
- P5 の二量体構造が、小胞体ストレスセンサーの構造機能制御に重要であることを明らかにした。
- P5 のタンパク質凝集抑制機能はカルシウムによって制御されることを明らかにした。
- P5 の二量体モチーフの欠損は小胞体ストレスを惹起するため、P5 が関わる疾病の原因解明につながると期待される。

【概要】

細胞内の小胞体^{注3}には、新しく作られたタンパク質に、構造を安定化するためにジスルフィド結合を導入する仕組みがあります。これを担っているのが PDI ファミリー酵素^{注4}です。PDI ファミリー酵素の一つである P5 は、癌などの疾患や小胞体ストレス応答^{注5}、血液凝固といった様々な生理機能と関わることで報告されてきましたが、全体構造が不明なため、詳しいメカニズムは十分に理解されていませんでした。

東北大学 学際科学フロンティア研究所の奥村正樹助教、金村進吾研究員（現 関西学院大学 理工学部 助教）、松崎元紀研究員（現 徳島大学 先端酵素学研究所 助教）、東北大学 多元物質科学研究所の稲葉謙次教授（生命科学研究所、大学院理学研究科化学専攻 兼任）、徳島大学 先端酵素学研究所の齋尾智英教授、韓国基礎科学支援研究院の李映昊教授、自然科学研究機構 分子科学研究所の秋山修志教授らの研究グループは、X線結晶構造解析およびX線小角散乱 (SAXS) を組み合わせることにより P5 がユニークな構造モチーフを介して二量体構造をとることを発見しました。

構造情報から二量体を形成できない変異型 P5 を作製したところ、P5 自体の立体構造が不安定化し小胞体ストレスセンサーの制御能が低下しました。加えて、カルシウムによる P5 のタンパク質凝集抑制機能（分子シャペロン^{注6} 活性）の制御が低下することも明らか

となりました。これらの結果から、P5 が十分に機能を発揮するには二量体構造が重要であることが解明され、本成果は医学的にも重要な知見をもたらします。

本研究成果は、2021年4月14日16時（米国時間）に「Structure」誌のオンライン速報版で公開されました。

【研究の背景】

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質が合成される細胞内小器官であり、そこには翻訳合成中あるいは翻訳合成後のタンパク質に構造安定化のためにジスルフィド結合を導入する仕組みがあります。特に、立体構造未形成のタンパク質は、それ同士が集まって凝集しやすい性質があり、小胞体の中には凝集を防ぐ分子シャペロン¹⁾が多数存在します。プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) ファミリーは、ジスルフィド結合導入酵素としての機能と、分子シャペロンとしての機能の両方を有すると考えられています。P5は高等動物で広く保存されており、特に哺乳動物では癌などの疾患や小胞体ストレス応答、血液凝固といった様々な生理機能に関わることが報告されています。しかしながら、P5の全体構造や活性調節の分子メカニズムの解明は、重要な課題として残されていました。

【研究の内容と成果】

P5は三つの球状のドメイン（チオレドキシシン様ドメイン²⁾⁷⁾が可動性に富んだペプチド鎖（リンカー）でつながった構造を持つと予測されていました。今回、当研究グループは、チオレドキシシン様ドメインについてはX線結晶構造解析法で、また全体構造についてはX線小角散乱（SAXS）法を用いて解析しました。その結果、P5は、三つのチオレドキシシン様ドメインが様々な配置をとり、非常に動きに富んだ全体構造を有していることが明らかになりました。さらに、N末端側のチオレドキシシン様ドメイン（a0ドメイン）に新規の二量体形成モチーフ（接着モチーフ）が存在し、P5が二量体構造をとることが明らかになりました（図1）。

構造情報から二量体を形成できない変異型P5を作製したところ、天然型と異なる不安定な構造を形成することで、細胞ストレスを引き起こすことがわかりました。これまでにP5は小胞体ストレスセンサーであるIRE1の活性制御因子として報告されてきましたが、この二量体化モチーフ欠損体は、IRE1の活性制御能が低下することも明らかにしました。また、小胞体中に~1 mMと豊富に存在するカルシウムイオンは神経伝達などセカンドメッセンジャーとして様々な生理機能を発揮しますが、今回新たにP5のカルシウム結合部位を同定するとともに、P5のタンパク質凝集を防ぐシャペロン活性がカルシウムイオンの結合によって制御されること、さらにこの制御にP5の二量体構造が深く関わることを発見しました。これらの結果から、P5が機能を発揮する分子メカニズムが明らかとなりました。このことから本研究では、二量体化やカルシウム結合による同酵素の機能制御という新たな概念を提唱しました。

【今後の展開】

P5は小胞体だけでなく細胞外にも存在し、様々な生理機能や疾患との関わりが知られ

ています。本研究で得られた同酵素の全体構造や機能発現制御の詳細な分子メカニズムに関する発見が、将来的には創薬さらには疾患治療法の開発に繋がることが期待されます。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

科学技術振興機構（JST） 科学技術人材育成のコンソーシアムの構築事業
「連携型博士研究人材総合育成システム（次世代研究者育成プログラム）」
支援対象者：奥村 正樹（東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教）
支援期間：平成29年5月～平成31年3月

文部科学省 新学術領域研究
研究領域：「ネオ・セルフの生成・機能・構造」
（研究総括：松本 満 徳島大学 先端酵素学研究所 教授）
研究課題名：「小胞体内 MHC の立体構造構築の理解」
研究代表者：奥村 正樹（東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教）
研究期間：平成31年4月～令和3年3月

文部科学省 新学術領域研究
研究領域：「分子夾雑の生命化学」
（研究総括：浜地 格 京都大学 工学研究科 教授）
研究課題名：「分子夾雑環境における酸化的フォールディングのモニタリング法の開発」
研究代表者：奥村 正樹（東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教）
研究期間：令和2年4月～令和4年3月

日本学術振興会 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化（B））
研究課題名：「小胞体シャペロンによるフォールディング中間体の過渡的認識と制御の構造基盤」
研究代表者：齋尾 智英（徳島大学 先端酵素学研究所 教授）
研究分担者：奥村 正樹（東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教）
研究分担者：金村 進吾（関西学院大学 理工学部 助教）
研究期間：令和2年10月～令和5年3月

東北大学附置研究所若手アンサンブルグラント
研究課題名：「小胞体ストレス応答を制御する IRE1 活性型ジスルフィドオリゴマーの形成と解離の分子機構解明」
研究代表者：松崎 元紀（令和2年当初：東北大学 学際科学フロンティア研究所 学術研究員）
研究分担者：奥村 正樹（東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教）
研究期間：令和2年10月～令和3年3月

文部科学省 ナノテクノロジープラットフォーム
研究課題名：「X 線小角散乱法による PDI ファミリー酵素とそのパートナー酵素との複合体の構造解析」
研究代表者：奥村 正樹（東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教）
研究期間：平成28年4月～平成29年3月

日本学術振興会 科研費 研究活動スタート支援 代表：金村 進吾（平成29年度～平成3

0年度)、若手研究 代表：金村 進吾 (平成31年度～令和3年度)、特別研究員奨励費 代表：松崎 元紀 (平成31年度～令和2年度)、若手研究 代表：松崎 元紀 (令和2年度～令和3年度)、基盤研究(C) 代表：奥村 正樹 (平成31年度～令和3年度)、基盤研究(A) 代表：稲葉謙次 (平成30年度～令和2年度)。

韓国研究財団 (NRF-2018K1A3A1A39088040、NRF-2019R1A2C1004954) 代表：李 映昊、韓国国家科学技術研究会 (MSIP; CAP-17- 05-KIGAM) 代表：李 映昊、韓国基礎科学支援研究院 グラント (C070410) 代表：李 映昊。

公益財団法人 武田科学振興財団、公益財団法人 持田記念医学薬学振興財団、一般財団法人 天野エンザイム科学技術振興財団、研究代表者：奥村 正樹 (東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教)、および公益財団法人 武田科学振興財団 研究代表者：稲葉 謙次 (東北大学 多元物質科学研究所 教授)の研究の一環として行われました。

<参考図>

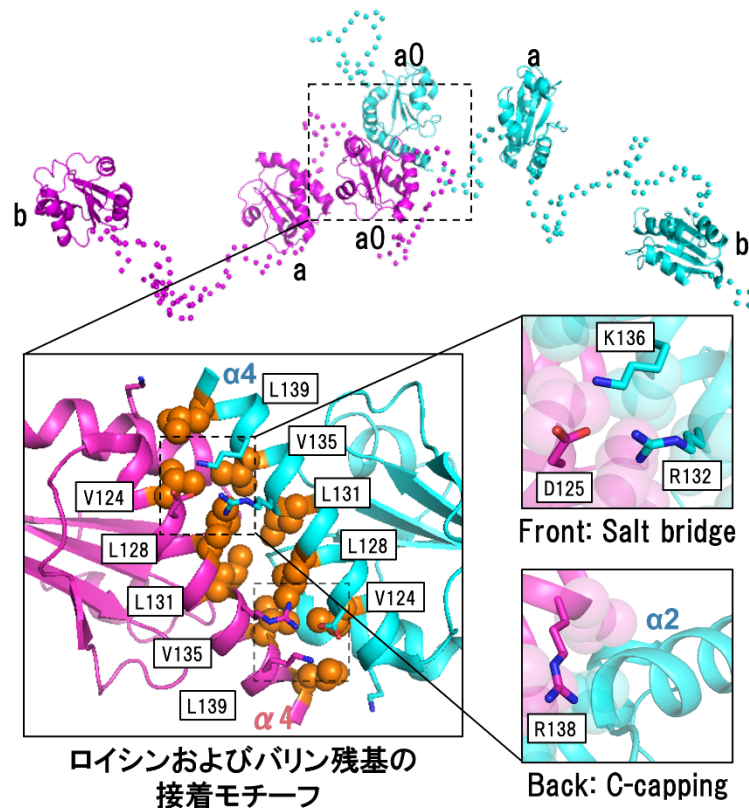


図1 P5 二量体の全長構造と新規の接着モチーフ

(上図) 三つのチオレドキシシン様ドメイン(a0、a、b)から構成されるP5は、a0ドメイン中に存在する接着モチーフを介して二量体構造をとることがわかった。また、これら三つのドメインが可動性に富んだリンカーにより連結され、様々な配置をとることがわかった。

(下図)a0ドメイン中の接着モチーフは、五つのロイシンおよびバリン残基から構成され、これらの残基は脊椎動物を通じて非常に広く保存されていた。また、その近傍でもイオン結合などの相互作用により、二量体構造が安定化していることが示された。この接着モチーフの相互作用様式は、これまで見つかったロイシンジッパーなどの二量体化モチーフとは大きく異なっていた。

【用語解説】

注1) X線結晶構造解析

高濃度・高純度のタンパク質を結晶化させ、強いX線を照射することで分子構造を決める方法。原子レベルで分子構造を決定することができるが、対象のタンパク質によっては結晶の作製が困難な場合もある。

注2) X線小角散乱 (SAXS)

溶液中の物質に強いX線を照射した際、ナノ粒子の構造に応じてX線の散乱が変わることを利用して、観察対象粒子の慣性半径、形状、体積などの情報を得る手法。

注3) 小胞体

細胞内小器官の1つ。膜タンパク質や分泌タンパク質が合成され、立体構造形成が進行する。このとき、タンパク質は糖鎖修飾やジスルフィド結合形成を受ける。

注4) PDI ファミリー酵素

小胞体に存在し、ジスルフィド結合の形成、組み換え、開裂を触媒する酵素群の総称。酵素によっては、タンパク質凝集を防ぐ分子シャペロン活性を有する。哺乳細胞の小胞体には20種類以上のPDIファミリー酵素が存在するが、個々のタンパク質の生理機能や、なぜこれほど多くの酵素が必要なのかは未解明である。

注5) 小胞体ストレス

小胞体内で何らかの原因により構造異常な変性タンパク質が蓄積すると、小胞体ストレスが引き起こされます。小胞体ストレスを感知するストレスセンサーとしてIRE1、PERK、ATF6が存在し、小胞体ストレス応答(UPR: unfolded protein response)と呼ばれるいくつかのシグナル伝達経路が活性化されることにより、変性タンパク質の蓄積が低減されます。

注6) 分子シャペロン

タンパク質の立体構造形成を助け、凝集を防ぐ分子の総称。「シャペロン」とはフランス語で若い女性が社交界にデビューする際の介添人を意味する。

注7) チオレドキシシン様ドメイン

チオレドキシシンは約100残基から構成される比較的小さなタンパク質であり、全ての生物において保存される酸化還元タンパク質である。哺乳動物の発生過程、活性酸素種の除去、細胞内酸化還元反応、植物における光合成など、様々な生命反応に関わる。

<論文情報>

タイトル : A unique leucine-valine adhesive motif supports structure and function of protein disulfide isomerase P5 via dimerization

(プロテインジスルフィドイソメラーゼ P5 が持つユニークなロイシン-バリン接着モチーフは、二量体化を介して P5 の構造と機能を支えている)

著者名 : Masaki Okumura, Shingo Kanemura, Motonori Matsusaki, Misaki Kinoshita, Tomohide Saio, Dai Ito, Chihiro Hirayama, Hiroyuki Kumeta, Mai Watabe, Yuta Amagai, Young-Ho Lee, Shuji Akiyama, and Kenji Inaba

掲載誌 : Structure, USA

DOI : 10.1016/j.str.2021.03.016

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

奥村 正樹 (オクムラ マサキ)

東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教

〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6-3

Tel : 022-795-5764

E-mail : okmasaki@tohoku.ac.jp

稲葉 謙次 (イナバ ケンジ)

東北大学 多元物質科学研究所 教授

〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2丁目1-1

Tel : 022-217-5604

E-mail : kenji.inaba.a1@tohoku.ac.jp

金村 進吾 (カネムラ シンゴ)

関西学院大学 理学部 助教

〒669-1337 兵庫県三田市学園2丁目1番地

Tel : 079-565-8590

E-mail : shingo.kanemura@kwansei.ac.jp

齋尾 智英 (サイオ トモヒデ)

徳島大学 先端酵素学研究所 教授

〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

Tel : 088-634-6421

E-mail : saio@tokushima-u.ac.jp

李 映昊 (LEE Young-Ho)

韓国基礎科学支援研究院 Principal Researcher

Research Center for Bioconvergence Analysis, Korea Basic Science Institute (KBSI), Chungcheongbuk-do 28119, South Korea

Tel: +82-043-240-5071 FAX: +82-043-240-5029
E-mail : mr0505@kbsi.re.kr

秋山 修志 (アキヤマ シュウジ)
分子科学研究所 協奏分子システム研究センター 教授
生命・錯体分子科学研究領域 (併任)
〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38 番地
Tel : 0564-55-7363
E-mail : akiyamas@ims.ac.jp

<報道担当>

鈴木 一行 (スズキ カズユキ)
東北大学 学際科学フロンティア研究所 企画部
〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3
Tel: 022-795-4353
E-mail: suzukik@fris.tohoku.ac.jp

伊藤 智恵 (イトウ トモエ)
東北大学 多元物質科学研究所 広報情報室
〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2 丁目 1 - 1
Tel: 022-217-5198
E-mail: press.tagen@grp.tohoku.ac.jp

横川 修 (ヨコガワ オサム)
関西学院 広報室
〒662-8501 兵庫県西宮市上ヶ原一番町 1-155
Tel: 0798-54-6017
E-mail: kg-koho@kwansei.ac.jp

河野 博子 (カワノ ヒロコ)
徳島大学 研究・産学連携部
蔵本研究・産学支援課 専門職員 (先端酵素学研究所事務室担当)
〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3 丁目 18-15
Tel: 088-633-9420
E-mail: kousojimc@tokushima-u.ac.jp

片柳 英樹 (カタヤナギ ヒデキ)
自然科学研究機構 分子科学研究所 研究力強化戦略室 広報担当
〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38 番地
Tel : 0564-55-7209 FAX : 0564-55-7374
E-mail : press@ims.ac.jp