

## 高速原子間力顕微鏡により明らかにされた プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の構造ダイナミクス

奥村 正樹<sup>1</sup>, 稲葉 謙次<sup>2</sup>

### 1. はじめに

細胞は、新規に合成されたタンパク質の品質を管理するため厳正かつ巧妙なシステムを備えている<sup>1)</sup>。タンパク質品質管理システムの破綻は、細胞に種々のストレスを引き起こすにとどまらず、個体レベルにおいてアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患や糖尿病を引き起こすことが報告されており、同システムの作用機序を理解することは細胞生物学的にも医学的にもきわめて重要である<sup>2)</sup>。中でも、二つのシステインが二電子酸化を受けることにより形成されるジスルフィド結合はタンパク質の立体構造形成において重要な役割を持ち、細胞におけるタンパク質の恒常性維持とも密接に関わる。細胞内で合成される全タンパク質の約30%はジスルフィド結合を有しており、その中には我々の健康維持に不可欠かつ創薬のターゲットとなる細胞表面受容体、免疫グロブリン、インスリン、血液凝固因子などが知られる<sup>3)</sup>。実際、細胞内にはジスルフィド結合形成反応を促進するための複雑かつ巧妙な触媒システムが存在しており、このシステムを中心的につかさどるのは20種類以上も存在するプロテインジスルフィドイソメラーゼ (protein disulfide isomerase: PDI) ファミリータンパク質である<sup>4,5)</sup>。

PDIファミリーの生理的機能の重要性が明らかになる一方、これら酵素が基質をどう認識し、働きかけるのか、その作用機序は依然未解明であった。そこで我々は、高速

原子間力顕微鏡 (高速AFM)\*を用いた一分子観測や種々の生化学・生物物理学の解析により、PDIが基質の酸化的フォールディングを触媒する分子機構の解明を目指した。その結果、PDIは酸化還元状態依存的に全体のドメイン配置を変化させ、その動的構造の制御が還元変性基質の効率的な酸化的フォールディングの触媒に重要な役割を持つことを明らかにした。さらに、還元変性基質依存的にPDIが二量体を形成し、その中央に形成される空洞に基質が取り込まれ、そこで効率的な酸化的フォールディングが進行することを明らかにした。以上の結果から、PDIのまったく新しい触媒機構を提唱するに至った<sup>6)</sup>。本稿では、我々が最近明らかにした酸化還元状態や基質結合に依存したPDIの構造ダイナミクスの制御と酸化的フォールディングの触媒機構について紹介する。

### 2. 高速AFMによるPDIの観測およびデータ解析

高速AFMのデータを測定、解釈する上で、観測対象分子を基板上にどのように固定するかは、非常に重要な問題である。本測定では、PDIのN末端に付加した6×His-tagとマイカ基板上にまいたコバルトイオン間の相互作用を利用し、酸化型および還元型PDI分子をマイカ基板上に固定化した。6×His-tagを除去した酸化型および還元型PDI分子についても同様にマイカ基板への固定化を試みたところ、His-tagを有するPDIと比べ、固定化効率は80%程度減少し、PDI分子の基板への固定が主として6×His-tagとコバルトイオン間の相互作用によることを確認した。さらに、基板上でのPDI分子間どうしのartificialな会合を防ぐため、5,000 Å×5,000 Åのエリアの中で平均15個のPDI分子を固定化した。以上の条件のもと、基質非存在下で酸化型および還元型のPDIを基板に固定化し、高速AFMによりPDI分子を観察した。次に、基質として還元変性状態のbovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI)、RNase A、プラスミノーゲン、ラミニンをそれぞれ加えた条件で、マイカ

<sup>1</sup> 東北大学学際科学フロンティア研究所 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区片平二丁目-1-1)

<sup>2</sup> 東北大学多元物質科学研究所 (〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目-1-1)

**Direct observation of actions of Protein Disulfide Isomerase in catalysis of oxidative protein folding by high-speed atomic force microscopy**

Masaki Okumura<sup>1</sup> and Kenji Inaba<sup>2</sup> (<sup>1</sup> Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University, Aramaki-2 Aoba 6-3, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan, <sup>2</sup> Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, Katahira 2-1-1, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920107

投稿受付日: 2019年8月14日

© 2020 公益社団法人日本生化学会

\* 高速原子間力顕微鏡 (高速AFM): 基板に固定した分子を先がきわめて細い針で触れながら高速に走査することで、分子の形状と動きを一分子レベルでリアルタイムに観測するナノテクノロジー。

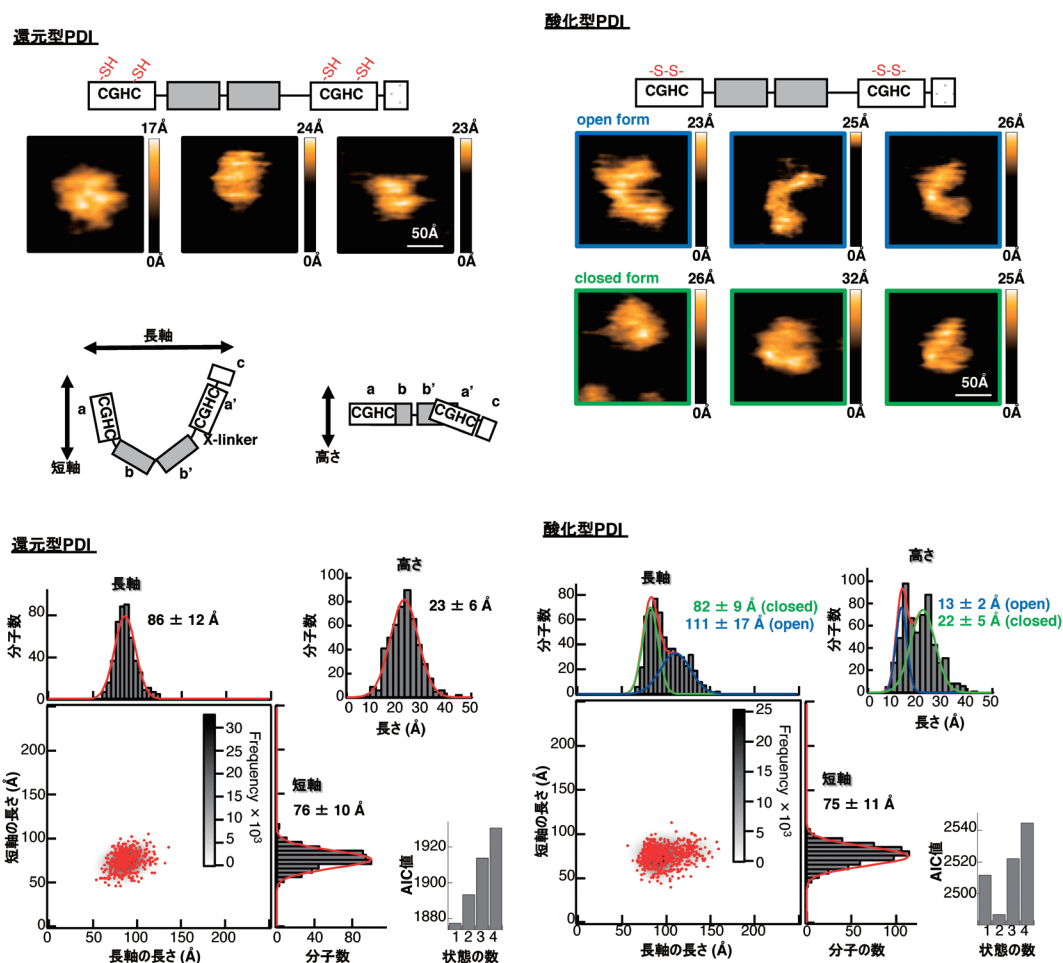


図1 酸化還元依存的なPDIの構造変化

(上图) 還元型PDI(左)および酸化型PDI(右)の高速AFM画像を示す。還元型PDIはコンパクトな構造を有し、酸化型PDIはより開いた構造と閉じた構造の両方をとる。(下图) 還元型PDI(左)および酸化型PDI(右)の長軸方向の長さ、短軸方向の長さ、高さの存在量分布を示す。赤池情報量規準(AIC)値の解析により、還元型は1状態、酸化型は2状態の構造をとることが示された。

基板上に固定化したPDI分子を高速AFMによりタッピングモードで観測した。spring constantは $0.1 \text{ Nm}^{-1}$ 、resonance frequencyは $0.8 \sim 1.0 \text{ MHz}$ に設定した。データの解析は、金沢大学の安藤敏夫研究室で開発されたKodec4.4.7.39を用いて行った<sup>7,8)</sup>。得られたPDI分子の高速AFM画像を統計学的に解析するため、数百分子のPDIについて長軸方向の長さ、短軸方向の長さ、高さをそれぞれ測定し、ヒストグラムを作成した。そのヒストグラムを多重ガウシアン関数でフィッティングすることにより、異なるコンホメーション成分の数と存在比を算出した。フィッティングにおける成分の数の妥当性を客観的に評価するため、観測されたPDI分子の長軸方向と短軸方向の長さの存在分布を基に赤池情報量規準値(AIC値)を計算し、その値が最も低くなったとき、仮定した成分の数が最適と解釈した。

### 3. 高速原子間力顕微鏡による酸化型および還元型PDIの一分子観察

還元型および酸化型に調製したPDIを高速AFMにより観察したところ、還元型ではコンパクトなU字構造の1成分のみが観察されたのに対し、酸化型ではU字構造が開いた構造と閉じた構造の2成分存在することが判明した(図1)。このことは、先述のAIC値の解析によっても強く支持された。その存在比率は、開いた構造が68.5%、閉じた構造が31.5%であった。実際、還元型および酸化型PDIの長軸方向について0.1秒間隔で経時変化を観察したところ、還元型では $\sim 85 \text{ Å}$ ではほぼ一定であったのに対し、酸化型では長軸の長さが $\sim 110 \text{ Å}$ と $\sim 80 \text{ Å}$ の二つの異なるコンホメーション間の平衡にあることが示された。このように酸化還元活性部位にジスルフィド結合が形成されることで、PDIがよりダイナミクスに富んだ構造をとることが判

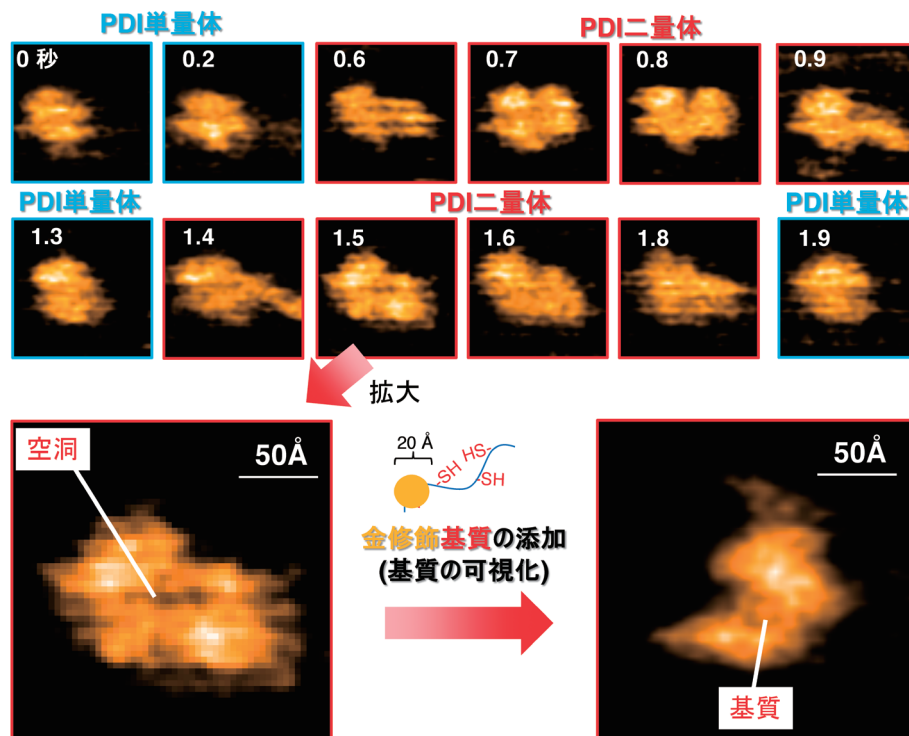


図2 還元変性基質依存的なPDIの二量体形成  
(上図) 構造未成熟な基質を添加すると酸化型PDIは二量体を形成し、基質の立体構造形成に応じて単量体へと解離する。PDI二量体を拡大すると、その中央に空洞が生じていることがわかる。(下図) PDI二量体の中央の空洞に基質が取り込まれるようす。金ナノ粒子(径: 20nm)で修飾した基質を、高速AFM観測により可視化した。

明した。

過去に報告されたPDIの結晶構造を基に考察すれば、還元型のPDIがコンパクトかつ動きの少ない構造をとる要因として、a'ドメイン内の活性部位近傍に位置するTrp396と基質結合サイトであるb'ドメインに位置するArg300との間でカチオン- $\pi$ 相互作用を形成することがあげられる。そこで、これらアミノ酸に変異を加えることで上記の相互作用が形成できないようにしたところ、還元型のPDIもダイナミクスに富んだ2成分の構造に変化することが明らかとなった。興味深いことに、この変異体は還元変性RNase Aに天然型のジスルフィド結合を導入する活性が野生型に比べ有意に低下していた。このことは酸化還元状態に依存したPDIの動的構造の制御が、同酵素の触媒活性において重要な役割を持つことを示唆している。

#### 4. 還元変性基質存在下におけるPDIの一分子観察

次に、基質存在下におけるPDI分子の動的構造を高速AFMにより観測した。興味深いことに、還元変性状態のBPTIをマイカ基板上の酸化型および還元型PDIに加えたところ、酸化型PDIのみ互いにU字構造が向き合った二量体を形成することが明らかとなった(図2)。高速AFM観測中、マイカ基板上の溶液にフリーのPDI分子は存在して

おり、還元変性基質依存的にフリーのPDIが基板に固定化したPDIと結合し、二量体化したと考えられる。二量体を形成する酸化型PDI分子の割合はBPTI濃度依存的に上昇し、30nM BPTIを加えた時点で60%もの酸化型PDI分子が二量体を形成することが観測された。還元変性基質依存的な酸化型PDIの二量体化は、北大・斉尾智英博士の協力のもと、多角度光散乱検出器を組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー(SEC-MALS)を用いた解析でも確認した。そこで、還元変性基質がPDI分子のどこに結合しているかを調べるため、2nmサイズのコロイド粒子を付加した還元変性BPTIを加えた条件で高速AFM観測を行ったところ、二量体PDIが形成する中央の空洞(キャビティ)に基質が結合することが明らかとなった(図2右下)。PDI単体の結晶構造から、この中央の空洞は疎水的環境であり、四つの酸化還元部位を有すると考えられる。したがって、基質依存的な酸化型PDIの二量体形成は、基質の捕獲および基質への効率的なジスルフィド結合の導入いずれにおいても重要な意味を持つと考察される。そこで、液体クロマトグラフィーを用いてPDIが触媒するBPTIの酸化的フォールディングについて速度論的解析を行ったところ、還元変性BPTIへのジスルフィド結合導入は、二量体PDIの生成割合が高くなる高濃度条件において指数関数的に速くなることを確認した。このように、PDIの二量体形成が



基質の酸化的フォールディングの初期のステップ（還元変性状態にジスルフィド結合を導入する過程）を加速するという実験結果が得られた。

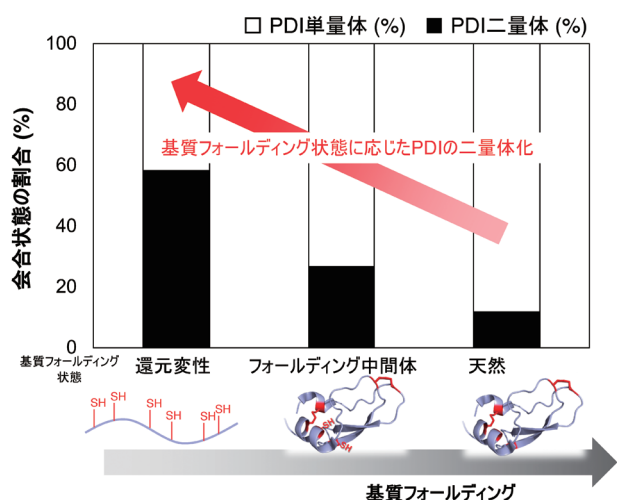


図3 基質のフォールディング状態に応じたPDIの二量体形成  
還元変性した基質を添加すると酸化型PDIは約60%まで二量体を形成するが、基質のフォールディング反応が進行するに伴い、酸化型PDIは単量体となる。二量体化したPDIが還元変性した基質に迅速にジスルフィド結合を導入することも、本研究により示された。

## 5. PDI二量体化の基質の種類および基質のフォールディング状態依存性

還元変性基質依存的な酸化型PDIの二量体形成が普遍的な現象であるかを調べるため、異なる基質を用いて高速AFM観測を行った。その結果、還元変性RNase Aでも同じ現象が観測された。興味深いことに、RNase Aでは二量体PDIの寿命がBPTIのとときと比べ明らかに長く、還元変性BPTIが誘起するPDI二量体の寿命が0.5秒程度であったのに対し、還元変性RNase Aが誘起するPDI二量体は5秒程度持続した。RNase Aの酸化的フォールディングの速度はBPTIのそれより低いことは過去に報告されており<sup>9)</sup>、基質のフォールディング速度に応じてPDI二量体の安定性が変化することが示唆された。さらにPDI二量体の形状・大きさを詳細に解析すると、PDI 2分子がよりタイトに結合したフォームと、互いに少し離れた伸びたフォームの2種類に大分され、しかも伸びたフォームは形状に多様性がみられた。このことから、還元変性基質の構造に合わせPDI二量体も形状を変え、そのことが基質の効率的な酸化的フォールディングにつながると考察した。このことと関連し、還元変性状態、フォールディング中間状態、さらには天然状態のBPTIをマイカ基板上のPDIに加えたところ、フォールディングの進行につれ、二量体を形成したPDI分子の割合は顕著に減少した（図3）。このようにPDIは基質のフォールディング状態を厳密に認識し、それに応じて会合状態や形状状態を変化させ、基質の酸化的フォールディ

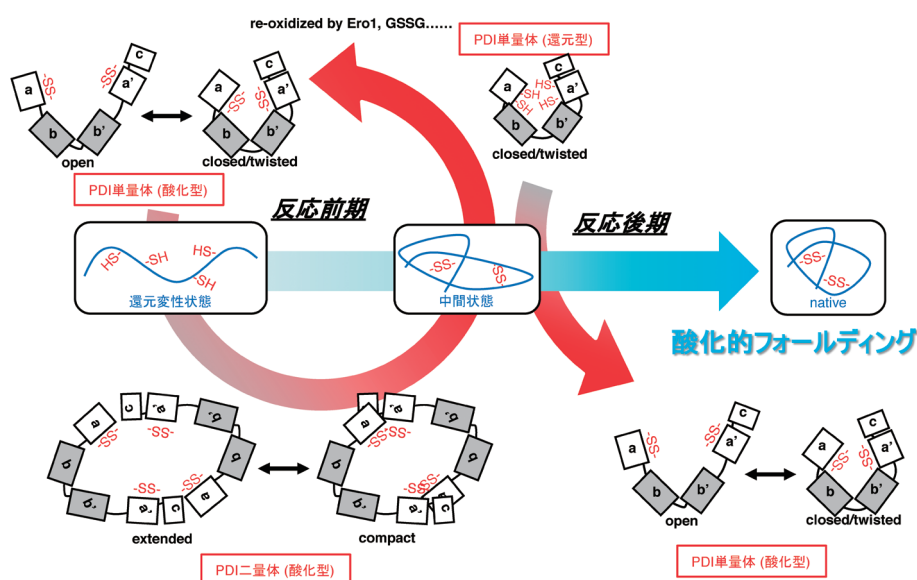


図4 PDIによる酸化的フォールディングの触媒機構

還元変性基質は酸化型PDI二量体の中央に形成される空洞に取り込まれ、そこで迅速なジスルフィド結合の導入と立体構造形成を受ける。還元変性基質依存的に形成されたPDI二量体は、基質のフォールディング状態やフォールディング速度に応じて形状や寿命を変える。基質に依存したPDIの構造ダイナミクスが明らかとなり、同酵素のまったく新しい触媒機構が示された。

ングを触媒することが示唆された。

一方、PDI二量体の中央の空洞に収まらない大きな基質に対してPDIがどう働きかけるかを調べるため、還元変性状態のプラスミノゲン（分子量：約9万、ジスルフィド結合の数：24本）とラミニン複合体（分子量：約14万、ジスルフィド結合の数：4本）を基質として用い、PDIの高速AFM観測を行った。その結果、一つの還元変性基質分子の異なる部位に複数のPDI二量体が同時に作用するようすが観測された。このように、大きな基質の場合は、分子全体をPDI二量体の中央の空洞内に収めることはできないが、PDI二量体が基質を領域ごとに認識し、中央の空洞の中でジスルフィド結合を効率よく導入することが示された。

## 6. おわりに

以上のように、我々は、PDIが酸化還元状態依存的にU字構造の開閉の制御を行うばかりか、還元変性基質依存的に酸化型PDIが二量体を形成し、その中央に生じる疎水的な空洞中に変性基質を収容し、効率的な酸化的フォールディングを促すという、同酵素のまったく新しい触媒機構を提唱した（図4）。これまでにPDIの変異や機能欠損を引き起こす化学修飾が、さまざまな神経変性疾患の患者から見つかっており<sup>2,5)</sup>、その中にはPDIの構造ダイナミクス制御に重要なArg300の変異体も含まれる。これはPDIのloss of functionと動的構造の制御が密接に関係することを意味する。我々は、他のPDIファミリー酵素ERp46<sup>10)</sup>やERdj5<sup>11)</sup>についても、機能発現制御と動的構造が密接に関係することを報告しており、PDIファミリー間の機能の違いを説明する上で構造ダイナミクスという視点はきわめて重要であると考えている。PDIファミリー酵素は非常に多くの基質をターゲットとし、さらにさまざまなフォールディング状態（ミスフォールド状態も含む）に対応する必要がある。動的構造なくして、同酵素の多様な基質認識と生理機能は生じえないであろう。本研究で我々が行った高速AFM測定と構造情報に基づく系統的な生化学的・生物物理学的解析は、PDIファミリー酵素のみならず、他の多くの酵素の基質認識機構、さらには機能発現制御機構を解明する上できわめて有効な手段になるものと確信している。

## 謝辞

本稿で紹介した高速AFMに関する共同研究者は、熊本大学発生医学研究所の小椋光教授と野井健太郎研究員（現、大阪大学ナノサイエンスデザイン教育研究センター特任助教）であり、ここに深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Balchin, D., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F.U. (2016) *In vivo* aspects of protein folding and quality control. *Science*, **353**, aac4354.
- 2) Woehlbier, U., Colombo, A., Saaranen, M.J., Pérez, V., Ojeda, J., Bustos, F.J., Andreu, C.I., Torres, M., Valenzuela, V., Medinas, D.B., et al. (2016) ALS-linked protein disulfide isomerase variants cause motor dysfunction. *EMBO J.*, **35**, 845–865.
- 3) Fass, D. & Thorpe, C. (2018) Chemistry and enzymology of disulfide cross-linking in proteins. *Chem. Rev.*, **118**, 1169–1198.
- 4) Okumura, M., Kadokura, H., & Inaba, K. (2016) Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. *Free Radic. Biol. Med.*, **83**, 314–322.
- 5) Matsusaki, M., Kanemura, S., Kinoshita, M., Lee, Y.H., Inaba, K., & Okumura, M. (2019) The protein disulfide isomerase family: from proteostasis to pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **1864**, S0304–S4165.
- 6) Okumura, M., Noi, K., Kanemura, S., Kinoshita, M., Saio, T., Inoue, Y., Hikima, T., Akiyama, S., Ogura, T., & Inaba, K. (2019) Dynamic assembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative folding. *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 499–509.
- 7) Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R., & Ando, T. (2010) Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature*, **468**, 72–76.
- 8) Noi, K., Yamamoto, D., Nishikori, S., Arita-Morioka, K., Kato, T., Ando, T., & Ogura, T. (2013) High-speed atomic force microscopic observation of ATP-dependent rotation of the AAA<sup>+</sup> chaperone p97. *Structure*, **21**, 1992–2002.
- 9) Weissman, J.S. & Kim, P.S. (1993) Efficient catalysis of disulfide bond rearrangements by protein disulphide isomerase. *Nature*, **365**, 185–188.
- 10) Kojima, R., Okumura, M., Masui, S., Kanemura, S., Inoue, M., Saiki, M., Yamaguchi, H., Hikima, T., Suzuki, M., Akiyama, S., et al. (2014) Radically different thioredoxin domain arrangement of ERp46, an efficient disulfide bond introducer of the mammalian PDI family. *Structure*, **22**, 431–443.
- 11) Maegawa, K.I., Watanabe, S., Noi, K., Okumura, M., Amagai, Y., Inoue, M., Ushioda, R., Nagata, K., Ogura, T., & Inaba, K. (2017) The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation. *Structure*, **25**, 846–857.

## 著者寸描

## ●奥村 正樹（おくむら まさき）



東北大学学際科学フロンティア研究所助教。博士（理学）。

■略歴 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にて博士学位を取得, 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年日本学術振興会特別研究員PD, 16年東北大学多元物質科学研究所助教, 17年より現

職。

■研究テーマ タンパク質フォールディングにおけるジスルフィド結合の役割, またそれを支える生体内システムの理解。

## ●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。博士（工学）。

■略歴 1998年京都大学大学院工学研究科博士課程修了, 同年英国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, 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。

■研究テーマ 構造生物学と細胞生物学の融合。特に, 細胞のタンパク質品質管理機構の分子構造基盤について。

■ウェブサイト <http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/inaba/html/>