

研究題目 PDI family 酵素によるガレクチン 1 の酸化還元制御機構の解明

研究組織

研究代表者：金村 進吾（関西学院大学理学部）

共同研究者：齋尾 智英（徳島大学先端酵素学研究所）

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）

：倉持 円来（関西学院大学理工学研究科）

：山本 菜月（関西学院大学理工学研究科）

：住本 龍哉（関西学院大学理工学研究科）

：石井 琴音（東北大学学際科学フロンティア研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

ヒトガレクチン 1 (hGal-1) は、分子量 14.5 kDa の球状タンパク質であり、細胞質で合成された後、細胞外に分泌され機能を発現する。hGal-1 の特徴として分子内の 6 つのシステイン残基の酸化還元状態に応じた大きな構造変化に伴う機能変調が示唆されている。システイン残基全てが-SH 状態にある還元型 hGal-1 は、糖結合能を持つことで細胞接着等に関与する(Jung, et al., *J. Neurosurg.*, 2008)。一方、6 つのシステイン残基が分子内で 3 本のジスルフィド結合を形成した酸化型 hGal-1 は、糖結合能を失い、神経軸索の再生など全く異なる生理機能に関与する(Horie, et al., *J. Neurosci.*, 2004)。申請者は hGal-1 の酸化還元制御機構を明らかにするために、各システイン残基の酸化還元反応性、酸化還元依存的な構造変化、酸化還元状態の生理学的意義、生体内での調節因子を探索した。その結果、hGal-1 の 1 つのシステインペア(Cys16-Cys88)が酸化還元依存的な構造変化および機能調節に必須であることがわかった。さらに、このシステインペアの酸化還元制御因子として、小胞体内酸化還元酵素群である Protein Disulfide Isomerase (PDI) family 酵素が機能していることが示唆された。このように、hGal-1 の酸化還元制御機構に関して、分子レベルで明らかにしつつあるが、未だ hGal-1 の酸化還元制御機構の詳細は明らかではない。その一因として、酸化型 hGal-1 の立体構造が決定されていないことが挙

げられる。そこで本研究では、溶液 NMR 法を用いた酸化型 hGal-1 の溶液構造決定及び酸化還元依存的な構造変化機構の解明、さらに hGal-1 と PDI family 酵素との相互作用解析、複合体構造解析を行い、hGal-1 の酸化還元制御機構を原子レベルで理解することを目的とした。

[1-2] 研究の方法・経過

還元型 hGal-1 の結晶構造が決定されているのに対し、酸化型 hGal-1 は未だ決定されていない。その背景に、酸化型 hGal-1 は還元型 hGal-1 に比べて、一部二次構造が崩れた構造を取っており結晶化が困難であることが挙げられる。本研究では純度の高い酸化型 hGal-1(野生型)の取得が困難であることから、hGal-1 の酸化還元調節に必須の Cys16-Cys88 以外のシステイン残基をセリン残基に置換した変異体(Cys16-Cys88)を用いた。溶液 NMR 測定には、同位体標識した ^{15}N ラベル化および ^{15}N , ^{13}C ラベル化酸化型 hGal-1 変異体を用いて、二次元、三次元スペクトルを取得し、NMR 信号帰属を行い、酸化型 hGal-1 の立体構造決定を目指した。

また、還元型 hGal-1 について、酸化型と同様にスペクトル取得、立体構造決定を行い、酸化型と比較することで、酸化還元依存的な構造変化機構の解明を目指した。立体構造決定に必要な NMR スペクトル取得には数日間の測定が必要であり、空気酸化などによる影響を無くすため、6 つのシステイン残基をすべてセリン残基に置換した還元型様変異体を用いた。

さらに、PDI family 酵素との相互作用解析、複合体構造解析のため、PDI の NMR スペクトル取得を行った。溶液 NMR 装置は、齋尾教授が所有する 500 MHz の NMR 装置や、齋尾教授の共同研究先である北海道大学の 800 MHz の NMR 装置を使用し、測定解析を行った。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

hGal-1 の酸化還元依存的な構造変化をアミノ酸レベルで明らかにするため、変異体(Cys16-Cys88)の酸化型、還元型 hGal-1 の溶液 NMR 測定を行った。その結果、良好な HN-TROSY-HSQC スペクトルの取得に成功し、酸化還元依存的な hGal-1 の構造変化が示唆された(図 1、左)。また、詳細なスペクトル解析の結果、還元型の信号は全体的に分散しており、高次構造を保持していることがわかった。一方で、酸化型の信号は中央部に密集している信号も観察されたことから、一部の構造が崩壊していることが示唆された。さらに、酸化型の信号数はアミノ酸残基数よりも非常に多く、分散信号の強度が還元型よりも弱いことから、酸化型は、少なくとも 2 状態間の平衡であることが示唆された。

また、酸化型から還元型への可逆性を調べるため、酸化型に還元剤である DTT を添加し、NMR 測定を行った。その結果、信号数が多く、中央に密集していた酸化型の信号とは異なり、還元型の信号に一致したスペクトルが得られ、hGal-1 の酸化還元には可逆性があることがわかった(図 1、右)。

PDI のどの部位に hGal-1 が結合するのかを明らかにするため、同位体標識した PDI の NMR スペクトル取得に挑戦した。一般的に NMR 測定は 20 kDa 程度が測定限界であるが、齋尾教授が持つ NMR 技術により約 58 kDa である PDI の良好な NMR スペクトルの取得に成功した。

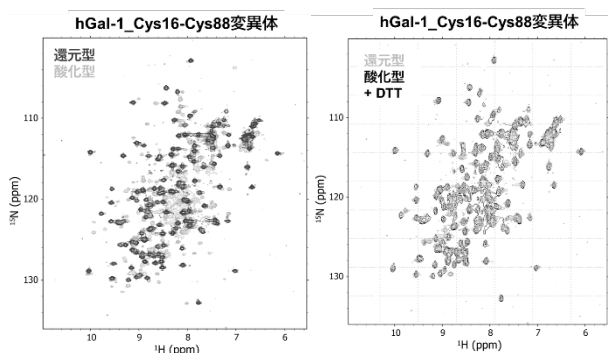


図 1. 酸化型、還元型 hGal-1 の HN-TROSY-HSQC スペクトル(左)、還元型、酸化型 hGal-1+還元剤の HN-TROSY-HSQC スペクトル(右)

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

現在までに、hGal-1 の酸化還元調節、PDI による触媒に関して分子、細胞レベルで明らかにしてきたが、詳細な機構には至っておらず原子レベルでの機構解明が必要である。そこで、齋尾教授が持ち合わせる独自の NMR 構造解析技術(メチル基選択的安定同位体標識、メチル TROSY 測定法、常磁性ランタノイドプローブ技術など; Saio, et al., *Science* 2014)を取り入れることで構造生物学的手法を大幅に強化可能である。これによって、原子・分子から細胞レベルまでの多階層アプローチによる詳細な機構解明が可能となる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

Saio T., Ishii K., Matsusaki M., Kumeta H., Kanemura S., and Okumura M. “Client recognition differences between PDI and ERp46 to guide oxidative folding”, *bioRxiv*, 03.04.583432, 2024

[3-2] 学会発表

なし

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

酸化型 hGal-1 の立体構造決定のために、 ^{15}N , ^{13}C ラベル化酸化型 hGal-1 変異体のスペクトルを取得したが、良好なスペクトルではなかった。その一因として、酸化型は、少なくとも 2 状態間の平衡であることが挙げられる。今後、単離精製など良好なスペクトル取得に向けたサンプル調製及び測定条件検討を行う必要がある。

PDI family 酵素との相互作用解析、複合体構造解析に関して、PDI の良好な NMR スペクトルの取得に成功しているため、今後、信号帰属を進め、hGal-1 滴定前後のスペクトルを比較することで、PDI のどの部位に hGal-1 が結合するのかを明らかにする。

このように引き続き、溶液 NMR を用いた解析により、PDI family 酵素による hGal-1 の酸化還元制御機構の原子・分子レベルでの解明に取り組む。