

研究題目 小胞体局在酵素によるヒトガレクチン 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（東北大学学際科学フロンティア研究所）
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）
：渡部 マイ（東北大学学際科学フロンティア研究所）
：倉持 円来（東北大学学際科学フロンティア研究所）
：石井 琴音（東北大学学際科学フロンティア研究所）
：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）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

ガレクチンは、細胞質で生合成され、細胞外において細胞シグナル伝達、神経保護、血管新生、免疫、細胞分化、細胞増殖、アポトーシスなど様々な生命現象に関与する糖結合性タンパク質であり、哺乳類では 15 種類が同定されている。これらガレクチンは、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患、癌、炎症、糖尿病などの疾病との関連が報告されており、生物学、医学的にも重要な因子として知られる。ヒトガレクチン(hGal-1)の唯一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)。我々は 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、hGal-1 の酸化還元制御因子として、小胞体局在酸化還元酵素群である Protein Disulfide Isomerase (PDI) family 酵素を見出した。そこで本研究では、溶液 NMR 法を用いて 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

溶液 NMR 法による hGal-1 と PDI family 酵素との相互作用解析を行うため、同位体標識 ^{15}N ラベル化および ^{15}N , ^{13}C ラベルした酸化型・還元型 hGal-1、PDI を用いた。NMR スペクトルの取得には長時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、還元型 hGal-1 は 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。酸化型 hGal-1 は、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 hGal-1 変異体(Cys16-Cys88)を用いた。測定には、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

溶液 NMR 測定により還元型 hGal-1 変異体および酸化型 hGal-1 変異体(Cys16-Cys88)の 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 の構造変化を明らかにした。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いる一方で、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された。また、酸化型に還元剤を添加し、NMR 測定を行った結果、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。

我々は生化学実験により hGal-1 の酸化還元制御因子の一つとして約 58 kDa の PDI を同定した。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 技術により良好な NMR スペクトルの取得に成功した。現在、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、帰属中である。

[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)を用いた構造解析により、hGal-1 の酸化還元機構や PDI による hGal-1 の酸化還元制御機構の全容解明の期待がもてる。さらにこの機構の解明は hGal-1 や PDI が関与する神経変性疾患や癌、炎症疾患に対する治療法の新たなアプローチを提供できる可能性がある。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

1. Suzuki K, Nojiri R, Matsusaki M, Mabuchi T, Kanemura S, Ishii K, Kumeta H, Okumura M, Saio T, and Muraoka T. “Redox-active chemical chaperones exhibiting promiscuous binding

promote oxidative protein folding under condensed sub-millimolar conditions” *Chem. Sci.* 29 12676-12685 (2024)

2. Lee Y -H, Saio T, Watabe M, Matsusaki M, Kanemura S, Lin Y, Mannen T, Kuramochi T, Iuchi K, Tajiri M, Suzuki K, Li Y, Heo Y, Kamada Y, Arai K, Hashimoto M, Ninagawa S, Hattori H, Kumeta H, Takeuchi A, Abe H, Mori E, Muraoka T, Okiyonedo T, Akashi S, Vendruscolo M, Inaba K, and Okumura M, “Ca²⁺-driven PDIA6 phase separation to ensure proinsulin quality control” *bioRxiv* 605722 (2024)
3. Kawamukai H, Matsusaki M, Tanimoto T, Watabe M, Morishima K, Tomita S, Shinkai Y, Niwa T, Mannen T, Kumeta H, Nanaura H, Kato K, Mabuchi T, Aiba Y, Uehara T, Isozumi N, Hara Y, Kanemura S, Matsumura H, Sugie K, Ishimori K, Muraoka T, Sugiyama M, Okumura M, Mori E, Yoshizawa T, and Saio T, “Conserved loop of a phase modifier endows protein condensates with fluidity” *bioRxiv* 601791 (2024)

[3-2] 学会発表

1. Kanemura S, Kuroi K, Okada R, Matsusaki M, Yamaguchi H, Kumeta H, Lee Y -H, Saio T, Nakabayashi T, and Okumura M, “Understanding the redox-dependent conformational and functional control of human galectin-1”, FRIS-KKU Joint Symposium 2024, July 24th, 2024, Sendai, Japan, Oral.

[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

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 の立体構造は未だ決定されていない。立体構造決定のために、¹⁵N, ¹³C ラベルした酸化型 hGal-1 のスペクトルを取得したが、酸化型は少なくとも 2 状態間の平衡であり、重複した信号が多く、帰属が困難である。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。