

小胞体品質管理に関わる蛋白質ジスルフィド結合形成・開裂因子の構造的基盤

Structural basis of protein disulfide bond formation/cleavage factors
involved in ER quality control

(日本生物物理学会推薦)

代表研究者：九州大学 稲葉 謙次 Kyushu University Kenji Inaba

協同研究者：大阪大学 鈴木 守 Osaka University Mamoru Suzuki

Endoplasmic reticulum (ER) is the organelle where membrane and secretory proteins are newly synthesized. The Ero1-PDI system catalyzes protein disulfide bond formation in this organelle, thereby sustaining oxidative protein folding. In some cases, however, proteins are terminally misfolded due to aberrantly formed disulfide bonds and eliminated by the mechanism called ER-associated degradation (ERAD). In this process, incorrect disulfide bonds of misfolded proteins are reduced by ERdj5, a member of the PDI-family, resulting in the acceleration of their ERAD. Recently, we have succeeded in solving crystal structures of mammalian Ero1 and ERdj5 at atomic resolution. Crystal structure of Ero1 revealed how this enzyme generates protein disulfide bonds *de novo* in conjunction with a FAD cofactor and transfers them to PDI specifically and effectively. Detailed structural and biochemical analyses of ERdj5 elucidated how this reductase facilitates the ERAD process in concert with EDEM1, an ERAD-enhancing lectin that recognizes misfolded glycoproteins, and BiP, an ER-resident molecular chaperone that transports reduced substrates to a retrotranslocation channel. These results provide structural and mechanistic basis of ER quality control ensured by Ero1 and ERdj5 in mammalian cells.

研究目的と背景

近年、細胞の中で合成される蛋白質は必ずしも自発的に正しい立体構造を形成するわけではなく、幾つかの補助因子の助けを借りて正しくフォールドし独自の機能を発揮するという概念が確立されつつある。それら補助因子の代表的なものが分子シャペロンと呼ばれる蛋白質群であり、その中には、ジスルフィド

結合の形成・異性化・開裂を触媒する酵素も含まれる。ジスルフィド結合は二つのシステインのチオール基が二電子酸化を受けることにより形成される硫黄原子間の共有結合であり、蛋白質の立体構造形成ならびにその安定化に深く寄与する。さらに最近の研究では、このジスルフィド結合の形成・開裂が様々な転写因子やシグナル伝達因子の活性制御にも

関与しており、細胞の恒常性維持において重要な役割を担うことが分かりつつある。

小胞体は、細胞内で産生される全蛋白質の約30%を占める分泌蛋白質や膜蛋白質が合成される重要な小器官である。小胞体内では、新生ポリペプチド鎖に糖鎖を付加する酵素に加え、ジスルフィド結合を効率よく導入することで蛋白質の高次構造形成を促す因子や誤ったジスルフィド結合の形成により誘起されたミスフォールド蛋白質を還元することで分解除去を促す因子が存在する。これら一連の酵素が正常に機能することにより、小胞体中の蛋白質の品質が管理される。一方でこれらシステムの破綻はミスフォールド蛋白質の過剰な蓄積につながり、アルツハイマー病などの神経変性疾患を誘起することが報告されている。我々は最近、小胞体における蛋白質の高次構造形成とミスフォールド蛋白質の分解に関わる主要因子Ero1とERdj5の結晶構造を解くことに成功した。そして、構造情報に基づく系統的な*in vitro*および*in vivo*解析により、小胞体品質管理を支えるジスルフィド結合形成・開裂因子の分子基盤を確立したので、以下報告する。

研究経過

1. 小胞体におけるジスルフィド結合形成因子Ero1の分子基盤

小胞体における蛋白質ジスルフィド結合の導入は、主としてEro1-PDI酸化経路に沿って行われる。Ero1は補酵素であるFADと共役してジスルフィド結合を創りだし（正確には酸素分子の酸化力をジスルフィド結合という

形に変換し）、ここで創りだされたジスルフィド結合はPDI (Protein Disulfide Isomerase)に受け渡され、PDIがフォールディング途上の多くの蛋白質にジスルフィド結合を導入する。これと類似した酸化システムは広く生物界に見られ、特に大腸菌におけるDsbB-DsbA酸化システムは、細胞生物学的にも構造生化学的にも深く研究されている。

我々は本研究期間中、ヒト細胞内での蛋白質ジスルフィド結合形成において中心的役割を担うフラビン酵素Ero1の結晶構造解析に成功した。これにより、同酵素が α ヘリックスに富んだ球状構造をもち、FAD分子と共役してジスルフィド結合を創り出すための反応中心の構造と化学スキームを原子レベルで明らかにした (Fig. 1)。

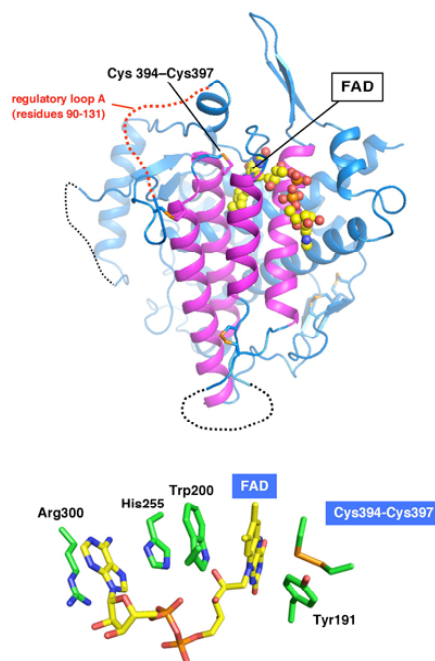


Fig. 1 Crystal structure of human Ero1 (top) and the close-up view of its FAD-containing reaction center (bottom)

興味深いことに、Ero1 はジスルフィド結合を創るに伴い活性酸素種の源である過酸化水素を産出し、その量が細胞の許容範囲を超えた場合に酸化ストレスを誘起することが知られている。したがって Ero1 は、小胞体内のレドックス環境を鋭敏にセンスし、自身の活性を制御する巧妙な機構を有する。このフィードバック制御はEro1中に存在する四つのシステイン (Cys94, Cys99, Cys104, Cys131) の間のジスルフィド結合形成パターンに依存する。すなわち、高活性状態では Cys94-Cys99 間で、不活性状態では Cys94-Cys131 間 (おそらく Cys99-Cys104 間も) それぞれジスルフィド結合は形成される。しかしながら、このジスルフィド結合の組換えによる活性制御の分子機構の詳細は不明であった。そこで我々はEro1の高活性状態および不活性状態両方の結晶構造を解き、比較検討を行った。その結果、機能制御に関わる四つのシステインは全て一つのループ領域に集中して存在し、Ero1の全体構造はこれら二つの状態で大きな差異はなかった。しかしながら、二つの状態間の決定的な差はこれらシステインを含むループの flexibility の違いにあった。一次構造上近接する Cys94-Cys99 間でジスルフィド結合が架かる高活性状態の場合、このループ領域の電子密度は全く観察されず、可動性が極めて高いことが示唆された。これに対し、Cys94-Cys131 間の long range のジスルフィド結合が架かる不活性状態の場合、このループ領域の電子密度がはっきりと現れ、高活性状態に比べ、より rigid になっていることが示唆された。実はこのループ領域は、Ero1 の活性

制御に関わるだけでなく、PDI から直接電子を受け取り、FAD を含む活性中心へ電子を伝達する機能も兼ねている。したがって上述のジスルフィド結合の組換えによるループ領域の可動性の制御はEro1分子内の電子移動反応の制御に直結し、これにより Ero1 の酸化活性が厳密にコントロールされていることが明らかとなった。

2. 小胞体関連分解を促進するジスルフィド結合開裂因子 ERdj5 の分子基盤

小胞体は蛋白質ジスルフィド結合の形成に適した比較的酸化的な環境であるが、最近永田教授 (京都産業大学) らのグループは、小胞体中で生じたミスフォールド蛋白質のジスルフィド結合を特異的に還元する酵素 ERdj5 を発見した。小胞体中で生じたミスフォールド蛋白質は、小胞体関連分解 (ER associated degradation : ERAD) と呼ばれる機構によりサイトゾルへ逆輸送され、ユビキチンプロテアソームによる分解を受ける。この過程において、ERdj5 はミスフォールド蛋白質中の誤ったジスルフィド結合を還元し高次構造を解きほぐすことで膜透過しやすい形に変換し、小胞体関連分解を促進すると考えられている。ERdj5 は、PDI ファミリーの因子の中で最も大きい (~90 kDa) マルチドメイン蛋白質であり、一次配列情報から小胞体の代表的な分子シャペロン BiP との結合能を有する DnaJ ドメインと、レドックス活性部位 (Cys-X-X-Cys motif) を有する四つのチオレドキシンドメインからなると予想さ

れた。また ERAD 経路において、ミスフォールド蛋白質の糖鎖を認識する因子 EDEM1 と結合能を有することも知られていた。

そこで我々は、ERdj5 が促進する ERAD 経路の作用機序を解明するため、ERdj5 全長の結晶構造解析と系統的な生化学実験および細胞生物学実験に取り組んだ。ERdj5 は、大腸菌中での発現効率が低く、また高い凝集性をもつため、結晶化には多くの困難を伴ったが、徹底したサンプル調整条件および結晶化条件の検討の結果、2.4 Å 分解能でその構造を解くに至った (Fig. 2)。構造解析の結果、ERdj5 は予測された四つのチオレドキシンドメイン (Trx1-Trx4) に加え、Trx1 と Trx2 の間に二つのチオレドキシンドメイン様ドメイン (ただし Cys-X-X-Cys モチーフをもたない) を含み、計6つのタンデムに並んだチオレドキシンドメインから成ることが分かった。しかもこれら6つのチオレドキシンドメインは全て一つの平面上にきれいに並び、4つのレドックス活性部位が全て DnaJ ドメイン側に位置するというユニークな構造をとっていた。さらに、ERdj5 の全体構造が Trx2 と Trx3 を境に N 末端側クラスターと C 末端側クラスターの二つに分断されることも明らかとなった。

これら構造情報を基に ERdj5 に関する系統的な機能解析を進め、以下の重要な知見が得られた。

i) ミスフォールド蛋白質をリクルートした EDEM1 は ERdj5 の C 末端側クラスター

と結合する。

- ii) ERAD を促進するのに必須な ERdj5 の主な還元活性ドメインは C 末端側クラスター中の Trx3 と Trx4 であり、これら二つの活性部位は非常に高い還元力を有する。
- iii) ERdj5 により還元された基質は ATP 依存的に DnaJ ドメインに結合した BiP に受け渡され、BiP が還元された基質を逆輸送チャンネルに運ぶ。

これら知見を統合し、EDEM1 によりリクルートされた基質は ERdj5 の C 末端側クラスターにより還元され、次に ATP 依存的に BiP へ受け渡され、最終的に逆輸送チャンネルに運ばれるという一連の小胞体関連分解経路の分子機構を解明するに至った。

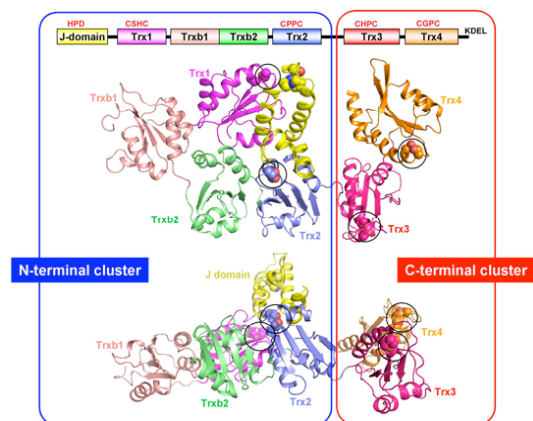


Fig. 2 Crystal structure of mouse ERdj5

考察

以上解説した二つの研究成果は、小胞体中の蛋白質品質管理に関わる二つの重要な経路 (高次構造形成の促進とミスフォールドタンパク質の分解) の作用機序を分子構造レベルで解明するものであり、国内外で活発に研究が進められている小胞体品質管理の学問分野において大きく貢献するものと期待してい

る。さらに本研究で得られた知見は、細胞内の蛋白質恒常性維持機構の破綻に起因する種々の疾病の分子レベルでの成因解明さらには治療戦略の開発にも将来的にはつながり得るものであろう。

現在、ほ乳類細胞の小胞体中には、PDIファミリーの因子が 20 種類近く同定されているが、その多くについて具体的な機能は依然未解明である。また何故これほど多くの PDI ファミリー因子が存在する必要があるのか、その理由も全く不明である。今後、これら因子の具体的な生理的機能、機能発現制御メカニズム、さらには因子間の相互作用ネットワークを深く究明することにより、細胞が長い進化の過程で確立した蛋白質品質管理の仕組みをさらに深く理解していきたい。

研究発表

口頭発表

1. Inaba, K. Crystal structures of mammalian human Ero1a and ERdj5, the enzymes involved in ER quality control. Gordon Research Conference on thiol-based redox regulation & signaling, Lucca, Italy, 2010
2. Inaba, K. Structural basis of regulated protein disulfide bond formation in human cells. The 3rd international symposium on protein community, Nara, Japan, 2010
3. Inaba, K. Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. The 10th conference of the

Asian Crystallographic Association, Busan, Korea, 2010

誌上発表

1. Inaba, K.*, Murakami, S., Nakagawa, A., Iida, H., Kinjo, H., Ito, K. and Suzuki, M. Dynamic nature of disulfide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB. *EMBO J* 28, 779-791, 2009
2. Inaba, K.* Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 146, 591-597, 2009
3. Inaba, K.*, Masui, S., Iida, H., Vavassori, S., Sitia, R. and Suzuki, M. Crystal structures of human Ero1a reveal the mechanisms of regulated and targeted oxidation of PDI. *EMBO J* 29, 3330-3343, 2010
4. Inaba, K.* Structural basis of protein disulfide bond generation in the cell. *Genes to Cells*, 15, 935-943, 2010
5. Hagiwara, M., Maegawa, K., Suzuki, M., Ushioda, R., Araki, K., Matsimoto, Y., Hoseki, J., Nagata, K.* and Inaba, K.* Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident disulfide reductase ERdj5. *Mol. Cell* 41, 432-444, 2011