

有用タンパク質の生産に必要な PDI ファミリータンパク質の同定

門倉 広

東北大学 多元物質科学研究所

研究の目的

ジスルフィド結合は、2つのシステインが酸化されて形成される共有結合であり、分泌タンパク質や膜タンパク質の立体構造形成に重要である¹⁾。ヒトホルモンなど有用なタンパク質の多くは分子内にジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質である。このような有用タンパク質を微生物で生産する際には、正確なジスルフィド結合形成が上手く行えないことが、障害の一つになっている。これは微生物のジスルフィド結合形成システムと哺乳動物のシステムの何らかの違いに起因していると考えられる。哺乳動物細胞の小胞体にはジスルフィド結合の形成反応を触媒すると予想される PDI ファミリータンパク質が 20 種類も存在する。このように多くの酵素が存在するのは、基質タンパク質がもつ多様な構造に対応するためだと考えられる。しかし、個々の酵素の役割の違いは殆ど分っていない。インスリンは膵臓β細胞から分泌されるホルモンであり、血糖値の制御に重要な役割をはたす。インスリンの活性発現にはインスリンの持つ3本のジスルフィド結合が正しい組み合わせで形成されることが必要である。しかし、この過程に関わる酵素は同定されていなかった。本研究では、インスリンの生産に関与する PDI ファミリータンパク質を同定することを目的に、膵臓で特異的に発現する PDI ファミリータンパク質 PDIp の基質を同定するとともに、プロインスリンと相互作用する PDI ファミリータンパク質を網羅的に同定した。

方法

PDI ファミリータンパク質が基質である分泌タンパク質にジスルフィド結合を導入する際には、酵素（PDI ファミリータンパク質）と基質が分子間のジスルフィド結合で連結した共有結合中間体を一過的に形成する¹⁾。我々は、細胞中あるいは哺乳動物の組織中で生成するこのような中間体をトリクロロ酢酸と *N*-エチルマレイミドを利用して安定化し、生体試料から精製する技術を確立している²⁾。本研究では、このような酵素・基質複合体の解析から、特定の PDI ファミリータンパク質と相互作用する基質や特定の基質と相互作用する酵素を同定した。

結果

1. 膵臓で特異的に発現する PDI ファミリータンパク質 PDIp の機能の解明

PDIp は、インスリンや消化酵素を生産する膵臓で特異的に発現している。本研究

では PDIp の生理機能やインスリンの生合成への PDIp の関与の有無を調べるために、まず、PDIp の生理的な基質を同定した。先述したように、ジスルフィド結合形成の反応過程では、基質と酵素が分子間ジスルフィド結合で連結した、共有結合中間体が形成される。膵臓中で生成するこのような中間体を安定化し、PDIp に対する抗体で精製した後、その中に含まれるタンパク質を質量分析で解析することで、PDIp と結合するタンパク質を網羅的に同定した。その結果、PDIp は、膵臓中でエラスターゼ、キモトリプシン、 α -アミラーゼなどの消化酵素と分子間ジスルフィド結合を介して相互作用することが判明した。しかし、インスリンやグルカゴンなどの膵臓ホルモンは検出できなかった。膵臓は主にインスリンなどのホルモンを生産する内分泌細胞 (β 細胞はこのなかに含まれる) と消化酵素を生産する外分泌細胞からなる。膵臓からそれぞれの細胞を分取し、PDIp の発現を抗体で調べたところ、PDIp は膵臓の外分泌細胞中でのみ発現していた。このことから、内分泌細胞中で進行するインスリンの折りたたみ反応には PDIp は関与しないことが判明した。興味深いことに、同定されたタンパク質のうちプロエラスターゼ (エラスターゼのプロエンザイム) を、HeLa 細胞中で発現させるとプロエラスターゼは分子間のジスルフィド結合でタンパク質同士が連結した凝集体を形成した。一方、PDIp をプロエラスターゼと共発現させると、このような凝集体の形成は抑制され、プロエラスターゼの単量体の細胞内蓄積量と培地中への分泌量が有意に増大した。よって PDIp にはプロエラスターゼの凝集体形成を抑制しその分泌を促進する作用があることが判明した。一方、他の PDI ファミリータンパク質をプロエラスターゼと共発現させても、PDIp のような作用は認められなかった。従って、PDIp は消化酵素の立体構造形成を促進するために進化した PDI ファミリータンパク質であると予想される³⁾。本研究から得られた知見は、膵臓に関連する病気の原因の解明やヒト由来の消化酵素を微生物によって生産させる際に役立つと期待される。

2. プロインスリンと相互作用する PDI ファミリータンパク質の同定

インスリンはシグナル配列を持つプレプロインスリンとして翻訳された後、小胞体内腔に送られプロインスリンになる。インスリンのもつ3本のジスルフィド結合は小胞体内でプロインスリンに導入される。小胞体内で正しく折り畳まれたプロインスリンだけが小胞体からゴルジ体を経て分泌顆粒に送られる。その過程でプロ配列が切断され成熟型のインスリンになる。プロインスリンにジスルフィド結合を導入する PDI ファミリータンパク質を同定するためには、先述したように、これらの酵素が基質に作用する際には、酵素と基質が分子間ジスルフィド結合で連結した中間体が一過的に形成されることを利用した。このような中間体を解析するためには大量の膵 β 細胞が必要であるが、マウス個体からは少量しか取れない。そこで、本実験ではマウス膵 β 細胞由来の培養細胞株 MIN6 を利用した⁴⁾。また、ジスルフィド結合形成の際に細胞中で形成する上記の酵素・基質複合体を安定化させるため、

MIN6 細胞をトリクロロ酢酸と *N*-エチルマレイミドで処理した。上記の酵素・基質複合体を抗プロインスリン抗体を利用して精製後、質量分析法によって解析したところ、その中には4種類のPDIファミリータンパク質が検出された。更に、これらの酵素は、実際に分子間のジスルフィド結合を介してプロインスリンと複合体を形成していた。よって、これらの酵素は小胞体中でインスリンとシステインを介して直接相互作用することが判明した。更に、siRNAを利用して各酵素の発現を抑制した場合の影響を調べたところ、興味深いことに、調べた酵素のうち2種類は、インスリンの生合成の過程のそれぞれ異なるステップで働くことを示唆する知見を得た。

結論

本研究の成果により、PDIpはインスリンの生産には関与しないが、消化酵素の立体構造形成を促進することが判明した。PDIpは脊椎動物の間で進化的に保存されてきたが、なぜ、膵臓で特異的に発現しているのかこれまで不明であった。本研究によって、その理由の一端を解明することに成功した³⁾。また、本研究によってヒト由来の消化酵素を微生物によって生産させる際に有用な知見を得た。

更に、膵β細胞由来の培養細胞株を利用した解析からプロインスリンとジスルフィド結合を介して結合するPDIファミリーを4種類同定することに成功した。そのうちの2種類の酵素については、興味深いことに、それぞれインスリンの生合成過程の異なるステップで機能していることを示唆する結果を得た。本研究によって、今後のさらなる解析のための基礎となる極めて有益な知見を得た。

文献

- 1) Kadokura, H., Katzen, F., Beckwith, J. (2003) Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* **72**: 111-135.
- 2) Fujimoto, T., Inaba, K., and Kadokura, H. (2019) Methods to identify the substrates of thiol-disulfide oxidoreductases. *Protein Sci.* **28**: 30-40.
- 3) Fujimoto, T. *et al.* (2018) Identification of the physiological substrates of PDIp, a pancreas-specific protein disulfide isomerase family member. *J. Biol. Chem.* **293**: 18421-18433.
- 4) Tsuchiya Y. *et al.* (2018) IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic β cells. *J. Cell Biol.* **217**: 1287-1301.