

PDI 酸化酵素 GPx7/8 の酸化還元依存的な構造変化の解明 —時間分解赤外分光法に立脚した GPx7/8 の動的構造解析—

1. 研究の目的

タンパク質分子は細胞内で新生された後、翻訳後修飾として分子内ジスルフィド結合の導入により正しい立体構造を形成する。ジスルフィドは、PDI (protein disulfide isomerase) と PDI 酸化酵素の連携によって正しく導入されることで、タンパク質分子の品質管理が行われている。図 1(a) に示す GPx7/8 は比較的近年に発見された PDI 酸化酵素であり、触媒機能に関わるジスルフィド結合が分子内の離れた位置 (11 Å 離れたシステイン残基間) で架橋されるため、GPx7/8 ではジスルフィドが起こす大きな構造変化が予見されている。

これまでに代表者は光刺激を用いて、分子内でジスルフィド結合形成させることによって、タンパク質分子構造変化を誘起させる手法を報告している (Kuroi (3rd) et. al, *Chem. Commun.*, **53**, 10014–10017 (2017), Kuroi et. al, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**, 1137–1144 (2020))。この方法では、図 1(b) に示すように、タンパク質分子のシステイン残基のチオール (SH) 基に一酸化窒素 (NO) を付加することで、ニトロシル (SNO) 基とする前修飾を用いる。SNO 基は波長 340 nm 付近の紫外光によって、NO が光解離を起こして、その結果、残された硫黄ラジカル同士が近傍でジスルフィド結合を形成する。したがって、光励起によって分子内ジスルフィド結合形成を誘起できることになる。光刺激の利点から、ジスルフィド結合形成に伴う分子構造変化の精緻な分光学的解析や構造変化の時間分解測定が可能になる。

本研究では、光でジスルフィド結合を形成させる上記の技術を GPx7/8 に適用し、GPx7/8 のジスルフィド結合に誘起される構造変化ダイナミクスを赤外分光法から明らかにする。本研究では、2021 年度は、以下の (1) (2) を目的に定めて研究を進めた。

(1) GPx7/8 の構造変化を光誘起で起こす系の構築

GPx7/8 のシステイン残基に一酸化窒素 NO を付加させ、実際に紫外光励起でジスルフィド結合形成が起こる実験系を確立する。

(2) 赤外分光計測系の構築

光誘起赤外差スペクトルが取得可能な測定系を構築する。そのために、まずは以前に代表者が報告した糖結合タンパク質ガレクチンにおける、光誘起ジスルフィド結合形成による構造変化の結果を再現することで、測定系の評価を行う。

2. 研究の計画

本研究は、共同研究者である関西学院大学理学部の金村氏の協力を得ながら遂行を行う。GPx7/8 の試料作成は金村氏が関西学院大学で行い、その他の SNO 基の導入・分光測定などは代表者が神戸学院大学にて行った。以下、目的で述べた (1)、(2) について研究計画を述べる。

(1) GPx7/8 の構造変化を光誘起で起こす系の構築

GPx7/8 への SNO 基の導入・光誘起ジスルフィド結合形成の実験系の確立を行う。GPx7/8 への NO 付加においては、先行研究に倣い、小タンパク質であるメタロチオネイン (metallothionein; MT) を用いた NO 転移反応を用いた。亜硝酸ナトリウムにより NO 付加の前処理をした MT (SNO-MT) を GPx7/8 と混合することで、NO 基が SNO-MT より転移して、GPx7/8 に SNO 基が導入される。GPx7/8 が実際に SNO 化されたかは、紫外可視吸収スペクトルにおいて、SNO 基に由来する波長約 334 nm を中心とするブロードな吸収バンドの出現によって確認を行う。

SNO 基を導入した GPx7/8 が実際に光励起により、実際にジスルフィド結合形成が行われていることの確認も行う。光励起には、光源として波長 365 nm に強い光強度を持つ水銀キセノンランプスポット光源 (LC8 (浜松フォトニクス)) を用いる。光照射後に SNO 基由来の吸収帯が消失することで、NO の光解離が起こっていることを確認可能である。また、SH 検出試薬であるエルマ

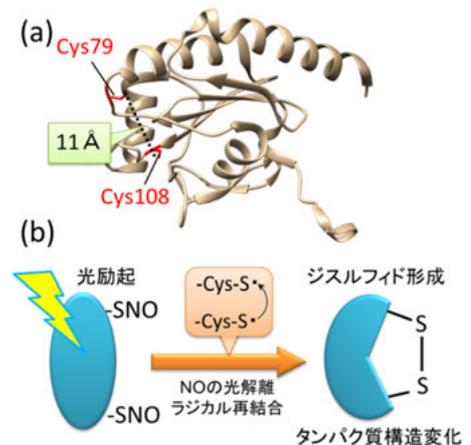


図 1 (a) GPx8 の立体構造、分子内システイン残基の位置と距離も示す。(b) NO の光解離を用いたジスルフィド結合の形成。

ン試薬を用いて、光励起後に SH 基の消失を見ることでジスルフィド結合の形成を間接的に確認可能である。

(2) 赤外分光計測系の構築

赤外分光器 Nicolet6700 を用いて、測定系の構築を行う。赤外吸収測定は透過型で行う。前述のように、測定系の評価のために、測定試料として SNO 化されたガレクチンを用いる。タンパク質試料溶液を乾燥させて、乾燥フィルム状にしてフッ化カルシウム製の窓材に貼り付けた物を測定試料とする。GPx7/8 でも同様な手法で赤外吸収測定を行っていく。(1) で述べた紫外光スポット光源からの紫外光 (約 140 mW) をレンズによって試料フィルム上に集光させて、光励起前後の赤外吸収差スペクトル測定を行う。得られる赤外吸収差スペクトルが、ジスルフィド結合形成で誘起される構造変化の情報を反映する。なお、安定した水蒸気レベル下での測定が必要であったため、乾燥空気発生機を購入して、乾燥空気下で測定を行う。

3. 研究の成果

(1) GPx7/8 の構造変化を光誘起で起こす系の構築

・ SNO 化 GPx7 (SNO-GPx7) の調製

共同研究者の金村氏が精製した還元型 GPx7 について SNO 化修飾を試みた。その結果、図 2 (およびインセット内) の実線に示すように、SNO 基由来の吸収帯が 334 nm 付近に確認された。GPx7 単体の吸収スペクトルは図中の破線 (GPx7) である。334 nm における SNO 基の吸光度と GPx7 由来の吸光度 (280 nm) の比から、それぞれの吸収係数を用いて、GPx7 に付加された SNO 基の当量を求めると 2.4 等量となった。すなわち、GPx7 の 2 つの SH 基の完全な SNO 化が確認された。

・ SNO-GPx7 への光照射

SNO-GPx7 へ紫外光照射を行うことで、期待通りに NO が光解離を起こして分子内ジスルフィド結合が組まれるのか検討を行った。光照射後の SNO-GPx7 の吸収スペクトルを図 2 の点線 (+UV) で示す。SNO 基由来の吸収帯 (334 nm) がほぼ消失したことから、NO が光解離したことが分かった。また、照射後は 250 nm 付近の吸光度が増大していた。この領域では、ジスルフィド結合が吸収を持つため、吸光度の増大は光照射後のジスルフィド結合の生成を示唆していた。

次に、エルマン試薬を用いて光照射後の SNO-GPx7 の持つ SH 基の検出試験を行った。エルマン試験では、SH 基の量に比例して、410 nm に吸収ピークが出現する。図 3(a) にその結果について示す。図中で -UV と記した結果 (黒線) は、GPx7 単体で測定した結果であり、分子中の 2 個の SH 基が 410 nm における吸収ピークとして検出されている。+UV と記した結果 (灰線) は、SNO-GPx7 に光照射後における結果であり、SH 基はほぼ無いことが分かる。図 2 で示したように、光照射によって SNO 基は消失するため、光照射後に SH 基が検出されなかったことは、ジスルフィド結合が形成されていることを示唆している。

しかしながら、ジスルフィド結合は GPx7 分子間で組まれる可能性も否定できない。そこで、期待通りにジスルフィド結合が分子内で組まれることを確認するために、SNO-GPx7 について光照射前後で非還元 SDS-PAGE を行った (図 3(b))。非還元 SDS-PAGE ではジスルフィド結合で会合した多量体も検出される。図 3(b) の結果は、光照射前後でいずれも 15-20 kDa に単一のバンドを示しており、光照射によってジスルフィド結合を介した分子間会合体は検出されていないこ

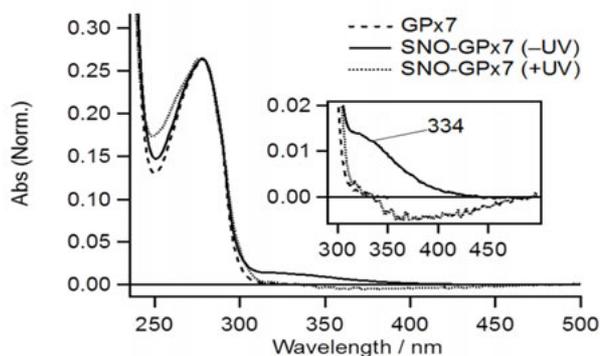


図 2 GPx7, 紫外光照射前後 (±UV) の SNO-GPx7 の吸収スペクトル。280 nm の吸光度で規格化してある。インセットには SNO の吸収帯付近の拡大図を示す。破線にて SNO 化前の GPx7 の結果も示す。

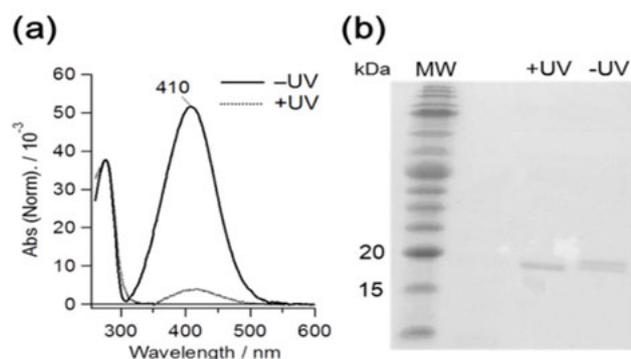


図 3 (a) エルマン試薬と GPx7 と混合させた後の吸収スペクトル。410 nm の吸光度から SH 基量を定量可能。-UV が GPx7 の結果、+UV が SNO-GPx7 に光照射した物の結果。(b) SNO-GPx7 の非還元 SDS-PAGE の結果。

とを示している。従って、ジスルフィド結合は分子内で組み立てられていることが示唆された。

以上の結果から、SNO-GPx7 への光照射によって、期待通り分子内ジスルフィド結合が組み立てられていることが強く示唆された。

(2) 赤外分光計測系の構築

赤外分光器 Nicolet6700 を用いて、GPx7/8 の分子内ジスルフィド結合による構造変化を、赤外差スペクトルとして検出するための測定系の構築を行った。紫外線スポット光源からの紫外光をレンズによって、赤外分光器の試料室内部の試料部に集光させて、SNO 化したヒトガレクチン 1 (SNO-hGal-1) 試料の光照射を行った。光照射前後での差スペクトル (「光照射後」 - 「光照射前」) を取ることにより、SNO-hGal-1 の光誘起赤外差スペクトルを得た。その結果、図 4 左のような差吸収スペクトルを得た。この結果を、既報の結果 (図 4 右) と比較すると、2 次構造変化を示すピークが同じ位置に出ており (1695(-), 1666(+), 1647(-), 1626(-))、その他にカルボキシ基の出現 (1728(+))、SNO 基の消失 (1508(-)) などのピークも再現されている。したがって、構築した測定系によって、光誘起ジスルフィド結合形成による赤外差スペクトルを取得できることが確認できた。

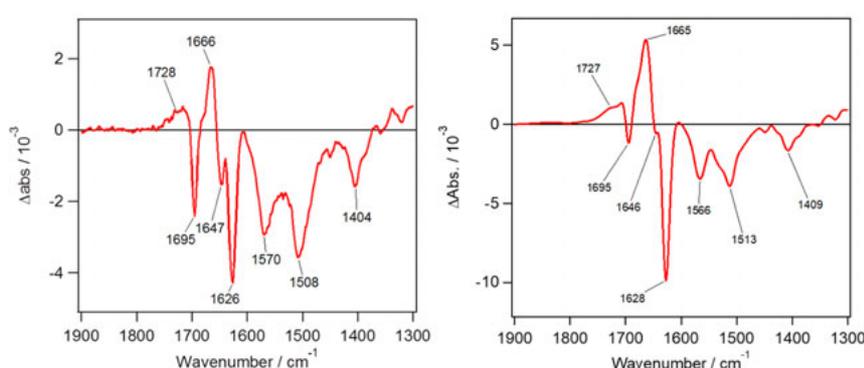


図 4 SNO-hGal1 の光誘起赤外差スペクトル。左が今回の測定結果であり、右は既報 (Kuroi. et. al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**, 1137-1144 (2020)) の結果。

4. 研究の反省・考察

本研究では、GPx7/8 について分子内ジスルフィド結合形成によって起こる構造変化の検出、更には、その時間分解検出を目的としている。そのために NO の光解離を利用した、光刺激ジスルフィド結合形成を用いた手法を適用する。研究計画(1)では、実際に GPx7 の SNO 化、および期待通りに紫外光による光照射で分子内ジスルフィド結合が形成されることを示すことが出来た。しかしながら、GPx7 の試料溶液に対して光照射を行う中で、GPx7 溶液が白濁する様子も見られた。GPx7 が分子内ジスルフィド結合を形成すると安定性が低下するのかもしれない。または、近年では、タンパク質分子が起こす相分離現象 (liquid-liquid phase separation; LLPS) が盛んに議論されているが、溶液の白濁も分子内ジスルフィド結合を形成した GPx7 が LLPS を起こしていることに起因する可能性もある。SNO 化した GPx7 (SNO-GPx7) の光照射条件等について、上記の LLPS の可能性も含め、更に今後検討していく必要がある。また、GPx8 についての SNO 化の達成には至っておらず、GPx8 についても検討が必要である。

研究計画(2)では、光照射赤外誘起赤外差スペクトルを取得するために測定系の構築と、既報の SNO 化ガレクチン試料を用いた測定系の評価を行った。構築した測定系で得られた SNO 化ガレクチン試料の光誘起赤外差スペクトルは、既報の結果を再現することを確認できた。GPx7/8 でも、ガレクチンと同様な赤外差スペクトルが得られることが期待される。その結果をもとに、ジスルフィド結合形成によって起こる GPx7/8 の構造変化について、詳細に議論していくことが可能となる。しかしながら、今後、更に光照射後の時間分解赤外測定を行うにあたって、光照射条件が不十分であることも露呈した。現状の水銀キセノンランプ光源 LC-8 では 100 ミリ秒程度の光の導入では十分な信号強度が得られず、集光が十分ではない課題が見出された。時間分解測定を行うにあたっては、タンパク質構造変化の速度に比べて十分に短時間の光照射が必要になる。そのために、今後は試料の光励起用の光源として、指向性・集光性に優れる高出力の紫外レーザー光源を用いる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 岡田莉奈、金村進吾、黒井邦巧、松崎元紀、山口宏、齋尾智英、齋尾智英、中林孝和、稲葉謙次、奥村正樹、「ガレクチンの酸化還元機能制御の分子構造基盤」日本蛋白質科学会年会（2021）

② 岡田莉奈、金村進吾、黒井邦巧、松崎元紀、齋尾智英、山口宏、中林孝和、稲葉謙次、奥村正樹、「酸化還元制御によるヒトガレクチン 1 の構造機能調節の理解」日本分子生物学会年会（2021）

(3) 出版物

なし