

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。本研究において、2021 年度には、実際に SNO-GPx7 を調製し、光刺激で分子内ジスルフィド結合を形成させることに成功した。さらに、光誘起赤外差スペクトル測定が可能な測定系の構築を行った。

これを踏まえて、2022 年度では、以下の (1) (2) を目的に定めて研究を進めた。

(1) GPx7 の酸化的構造変化の赤外スペクトルを用いた解明

NO を付加した SNO-GPx7 は、光刺激で分子内ジスルフィド結合形成を実際に起こすことを確認している。これを用いて、光照射前後での赤外差スペクトルの取得・解析を行うことで、GPx7 の分子内ジスルフィド結合形成で起こる構造変化を明らかにする。

(2) GPx7 の酸化的構造変化ダイナミクスの解明

SNO-GPx7 を用いて、(1) では光照射前後の赤外差スペクトルの定常測定を行うが、ここでは更に光照射直後からの赤外差スペクトルを時々刻々と追跡することで、GPx7 が分子内ジスルフィド結合を形成した後に起こす構造変化のダイナミクスを明らかにする。

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する。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) の研究計画を述べる。

SNO-GPx7 の試料溶液について、乾燥させてフィルム状にしていた物をフッ化カルシウム製の窓材に貼り付けて測定を行った。試料励起光として、紫外光スポット光源からの紫外光 (約 140 mW) または、本年度予算で購入を行った半導体レーザー (波長 375 nm) を用いた。両者の光源で検討を行ったところ、紫外光スポット光源の方が効率よく試料励起できていることが分かり、以降これを光源として用いた。(なお、レーザー励起の場合、光学系を改良して集光傾

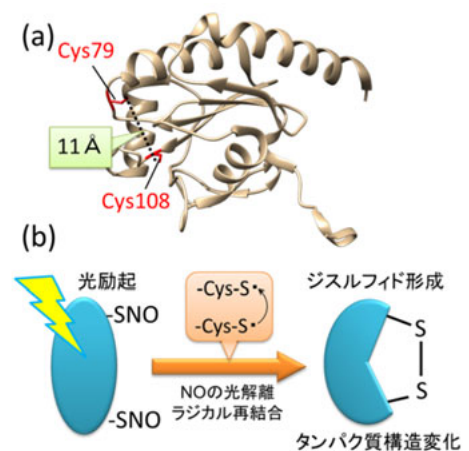


図 1 (a) GPx8 の立体構造、分子内システイン残基の位置と距離も示す。(b) NO の光解離を用いたジスルフィド結合の形成。

域を可能な限り小さくするなどの改良の余地は残されている。) (1)の赤外差スペクトル測定では、10 分間の紫外光照射をして、十分な時間経過の後に赤外スペクトル測定を行う。(2)の時間分解測定では、30 秒間の光照射後、4 秒時点から 10 秒間隔で赤外スペクトル測定を行った。

3. 研究の成果

(1) SNO-GPx7 の光誘起赤外差スペクトル

紫外線照射光源を用いて、SNO-GPx7 の光誘起赤外差スペクトルの測定を行った。まず、図 2 に SNO-GPx7 の赤外吸収スペクトルを示す。図中の 1649 cm^{-1} と 1543 cm^{-1} のバンドは amide I, amide II バンドと呼ばれるタンパク質分子に特徴的なバンドであり、このうち amide I バンドは 2 次構造を反映したピーク位置を示す。1649 cm^{-1} は α -helix 構造を反映したピーク位置であり、図 1(a) に示すように、GPx7 が主に α -helix から構成されることと符合している。

図 3 は、SNO-GPx7 の光照射後から光照射前の状態を引いた赤外差スペクトルである。負に出ているピークは構造変化によって失われた構造、正に出ているピークは構造変化の結果生じた構造に由来する。この結果は分子内ジスルフィド結合形成により生じる GPx7 の構造変化を反映している。図中の amide I 領域 (1700–1600 cm^{-1}) の信号から、 α -helix (1653 cm^{-1} (-)), β -sheet (1626, 1637 cm^{-1} (-)) が部分的に崩壊して turn 構 (1674 cm^{-1} (+)) に変わるような 2 次構造変化の可能性が示唆される。また、1705(+), 1408(-) cm^{-1} のシグナルから酸性アミノ酸残基のプロトン化も示唆された。

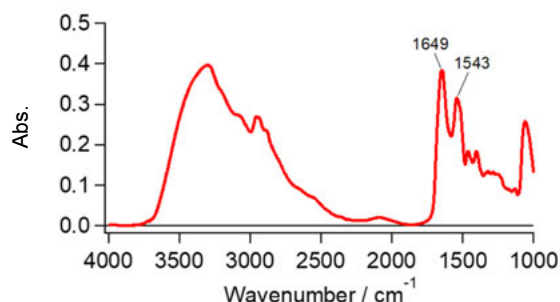


図 2 SNO-GPx7 の定常赤外スペクトル。

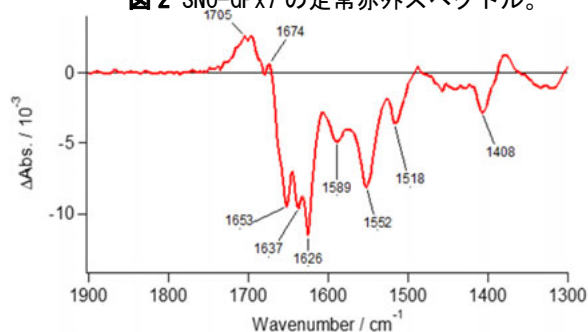


図 3 SNO-GPx7 の光誘起赤外差スペクトル。

(2) 時間分解赤外差スペクトル取得

図 4 に SNO-GPx7 の時間分解赤外差スペクトルを示す。光励起には 1. で示した結果と同様に紫外線照射光源を用いた。30 秒の光照射後、各時間での赤外差スペクトルを示している。光照射後、3.94 秒の赤外差スペクトル形状と比較すると、1600–1700 cm^{-1} の amide I 領域において、1676 cm^{-1} の強度は減少し、逆に 1633, 1626 cm^{-1} の負のバンド強度が時間とともに増大していることが分かる。Amide I 領域における変化は、GPx7 の 2 次構造変化を反映しており、図中に示した時間領域での GPx7 の骨格構造変化のダイナミクスが観測できたとと言える。

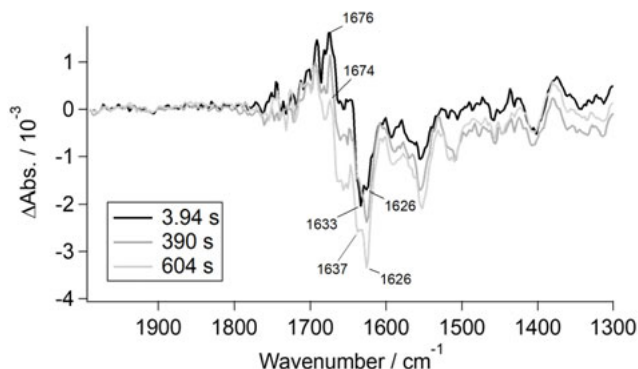


図 4 SNO-GPx7 の時間分解赤外差スペクトル。30 秒間の紫外光照射後からの経過時間を示す。

4. 研究の反省・考察

(考察)

GPx7/8 の酸化的構造変化についての知見は、申請者の知る限り殆どない。図 3 の赤外差スペクトルは、GPx7 が起こす酸化的構造変化の情報を与える有益な情報である。図 1 で示したように、GPx7/8 の持つシステイン残基の対は離れており、ジスルフィド結合形成には分子構造変化を伴う必要があると推察された。ここで見えた 2 次構造変化 (α -helix, β -sheet の崩壊および turn 構造の増大) により、システイン残基間の距離が近づきジスルフィド結合が形成されたと考えられる。ここで、興味深いのは図 1(a) に示したように、GPx7 は全体として β -sheet よりも α -helix が多く含まれるのにもかかわらず、図 3 の赤外差スペクトルでは β -sheet 構造の消失 (1626, 1637 cm^{-1} (-)) が、 α -helix の消失 (1653 cm^{-1} (-)) よりも優位に起きている点である。GPx7 のシステイン残基 (Cys79, Cys108) の対は、ともに β -strand に直結したループ

上に位置しており、ジスルフィド結合形成に誘起されて、これらの β -strandが崩壊してシステイン残基間距離を10Åよりも近い位置に保持するのかもしれない。

図4の時間分解赤外差スペクトルについても、GPx7の酸化的構造変化が起こる時間領域について初めて示す物である。本研究の分担者である金村氏の報告では、酸化剤と反応させた際の酸化型GPx7の生成は、分スケールで起こっており、これは酸化剤濃度に依存する物ではあるが、本研究の結果と矛盾しない。また、申請者は、以前に糖結合タンパク質ガレクチンにおいて、ジスルフィド結合生成に伴う構造変化の時間分解計測を行っており、その結果によれば構造変化は分から時間スケールの遅いダイナミクスであった。タンパク質分子のフォールディングはミリ秒単位で進行する物も珍しくないが、ジスルフィド結合形成に伴うタンパク質構造変化は比較的遅い現象なのかもしれない。

(反省)

本研究ではGPx7について検討を行ったが、GPx8における検討までは至らなかった。GPx7と8は性質の類似した分子であり、本研究で示した方法論でGPx7と同様に酸化的構造変化を明らかにできると期待される。また、GPx7/8とPDIとの結合についても検討には至らなかった。こちらの方も、今後の課題としたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表

①金村 進吾, 黒井 邦巧, 岡田 莉奈, 松崎 元紀, 山口 宏, 伊藤 大, 李 映昊, 稲葉 謙次, 齋尾 智英, 中林 孝和, 奥村 正樹 「ヒトガレクチン1の酸化還元依存的な機能制御における分子構造基盤」日本生化学大会(名古屋 2022年11月11日)

(3) 出版物
なし