

18 酸化ストレスにตอบสนองする小胞体内液液相分離形成の理解	奥村 正樹
--	--------------

【目的】 我々は小胞体内に存在する酵素・シャペロン群である Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリーによるタンパク質品質管理機構の解明に取り組み、小胞体内における複雑かつ精巧なタンパク質品質管理ネットワークを提示した。さらに、20種類以上もの PDI ファミリーの中から相分離する酸化還元酵素・シャペロン P5 を発見し、小胞体内タンパク質品質管理顆粒であることを突き止めた。さらに、準備研究から過酸化水素依存的に P5 の相分離が惹起された。そこで本研究では、これまで我々が発見した小胞体内顆粒研究において、小胞体内顆粒形成に関わる活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) の特定に取り組み、酸化還元依存的相分離の理解に繋げることを目的とした。さらに、酸化ストレスによる顆粒への影響を見積るだけでなく、顆粒形成因子である P5 の酵素機能回復や活性亢進を目的とした低分子化合物の開発を進めることも目的とした。

【方法】 酸化還元による P5 の相分離の機序の理解について、屈折率および蛍光を装備するホログラフィック顕微鏡による相分離内部の分子 packing 評価、またラマン分光による相分離内部の評価、NMR による相分離内部の分子構造解析を行った。さらに、各種 ROS/RNS による相分離への影響も調べた。小胞体内相分離因子 P5 の機能評価は、基質としてプロインスリンの酸化的フォールディング触媒能を逆相 HPLC および MALDI-TOF/MS で評価した。さらに、細胞を用い、カルシウムポンプの阻害剤である thapsigargin (TG) によるカルシウム枯渇からの回復時、内在性 P5 の foci 形成を顕微鏡下で可視化した。また試験管内検索に基づき特定した ROS/RNS を小胞体内で過剰に発生させることで、小胞体内顆粒形成を位相差顕微鏡で検証した。さらに、ストレス顆粒形成による P5 の酵素機能回復や活性亢進剤の薬剤開発として、その触媒活性部位であるチオール官能基の反応性を上昇させる新規酸化還元低分子 N-メチル化ピリジニルメタンチオール (pMePySH) を用いた。pMePySH 存在下で、P5 による酸化的フォールディング触媒能を逆相 HPLC および MALDI-TOF/MS で評価した。基質として牛膝臓トリプシン阻害酵素とプロインスリンを採用した。

【結果】 P5 は酸化還元状態に応じて、内部の packing 状態が違い、酸化型の方がより密に packing されることがわかった。それにより、酸化型の方が還元型よりも流動性が低いことがわかった。NMR による構造解析の結果、P5 相分離における酸化還元状態における構造変化を捉えることに成功し、相分離駆動に不可欠な領域の特定にも至った。P5 顆粒の機能の理解に関して、試験管内の実験において本顆粒が酸化的フォールディングを触媒するスーパーエンハンサーとしての化学触媒反応場であることを突き止めた。細胞内検証において、U2OS 細胞を用いて、細胞内 foci を可視化することが出来、現在論文投稿中である。また、試験管内実験の結果から、過酸化水素と一酸化窒素は液滴内部の packing 状態を密に上昇させることがわかり、化学修飾部位を特定し、その構造変化を追うことが出来た。過酸化により生じた顆粒は、基質取込量が減った。これは基質取込量の capacity の低下を意味しており、酸化ストレスによってタンパク質品質管理顆粒から機能破綻したストレス顆粒へと変化することを示唆した。さらに、P5 酵素の酸化還元触媒モチーフを介した活性亢進調節に成功した。今後の P5 のストレス顆粒に関わる疾患に対峙する創薬への応用が考えられる。

小胞体局在因子による相分離が酸化還元によって制御されている

