

# プロテインジスルフィドイソメラーゼの活性部位の酸化・還元状態の変化に伴う立体構造変化

前野亜弥<sup>1,2</sup>、中野路子<sup>1,2</sup>、岡 俊彦<sup>3</sup>、山口芳樹<sup>1</sup>、笹川拓明<sup>1,2</sup>、栗本英治<sup>1</sup>、  
浅見 修<sup>4</sup>、梶野 勉<sup>4</sup>、菊地 淳<sup>5</sup>、中迫雅由<sup>3</sup>、加藤晃一<sup>1,2</sup>

(名古屋市立大学大学院薬学研究科<sup>1</sup>、分子科学研究所<sup>2</sup>、慶應義塾大学理工学部<sup>3</sup>、  
豊田中央研究所<sup>4</sup>、理化学研究所植物科学研究センター<sup>5</sup>)

E-mail address            p012551@phar.nagoya-cu.ac.jp

【序論】プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)は、小胞体に豊富に存在するタンパク質であり、ジスルフィド結合形成反応を触媒する作用を通じてタンパク質のフォールディングを補助する働きをしている。マルチドメインタンパク質である PDI は、*a-b-b'-a'* という4つのドメインと酸性アミノ酸残基が豊富に存在している *c* 末端領域から構成されており、*a* および *a'* ドメインに Cys-Gly-His-Cys 配列からなる活性部位を有している(Fig.1)。私たちは既に、PDI の *a'* ドメインの活性部位に存在するジスルフィド結合の切断に伴い、分子表面疎水性領域が増大し、基質となる変性タンパク質との結合性が高まることを示している。PDI の結晶構造が報告されたが、酸化・還元状態の変化に伴う分子構造の変化については未だ明らかにされていない。そこで私たちは PDI の酸化・還元の状態での分子の形状および分子表面の物理化学的性状を核磁気共鳴法(NMR)および X 線小角散乱法(SAXS)を用いて解明し、活性部位の酸化・還元状態の変化に伴う分子の立体構造の変化を定量的に明らかにすることを通じて基質結合を制御するメカニズムを理解することを目的とした。

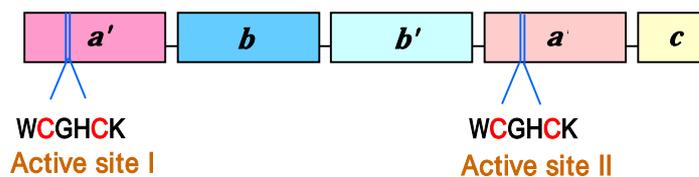


Fig.1 PDI のドメイン構成

【方法】大腸菌による発現系を構築して、野生型 PDI および欠損変異体である PDI の2ドメインが連結した *a-b* ドメイン、*b'-a'* ドメインを GST 結合タンパク質として発現させ、精製を行った。

<sup>15</sup>N で均一に安定同位体標識した PDI の *b'-a'* ドメインに対して酸化・還元の状態において <sup>15</sup>N 核 T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub> に基づく緩和異方性解析を行った。また、配向媒体として bicelle および pf1-phage を用いて <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N の残余双極子カップリング(RDC)値の解析を行った。そしてこれらの分子運動の異方性に基づいた NMR データの解析により、ドメイン間の相対配置を絞り込んだ。

PDI の *a-b* および *b'-a'* ドメインの SAXS 測定を行い、得られた散乱パターンから

原点散乱強度および慣性半径を求めた。

【結果・考察】NMR データに基づいてもとめた還元型 PDI-*b'a'* の構造(Fig.2)において、基質結合に重要な疎水的なアミノ酸残基は2つのドメイン間のインターフェイスに存在していた。酸化型ではこの領域を露出するようなドメイン間の相対配置の変化が誘起されていると推定される。

SAXS のプロファイルから PDI-*b'a'* は活性部位の酸化・還元状態に伴ってドメインの干渉領域に有意な変化が見られた(Fig.3)。さらに、Guinier 近似から得られた慣性半径と分子の最大長はいずれも酸化型のほうが大きいことが明らかになった。これらの結果は PDI の活性部位のジスルフィド結合が切断された影響が隣接ドメインの相互作用様式を変化させていることを示唆している。このような酸化・還元状態の変化に伴うドメイン間の相互作用の変化は *b'-a'* ドメインに限って起こるものであり、N 末端側の触媒ドメインを含む *a-b* ドメインでは変化が観測されないことも明らかとなった。Fujisawa 法を用いてドメインの慣性半径およびドメイン間の重心距離を求めたところ、PDI-*b'a'* の還元・酸化型ともにドメインの慣性半径には変化が見られなかったが、ドメイン間の重心距離は還元型よりも酸化型が約 6 Å 増大していることが明らかとなった。これらのことから、PDI は酸化・還元状態で各ドメインの立体構造に大きな変化は誘起されないものの、ドメイン間の距離を大きく変化させるようなドメインの相対配置の変化が起きていることが示された。

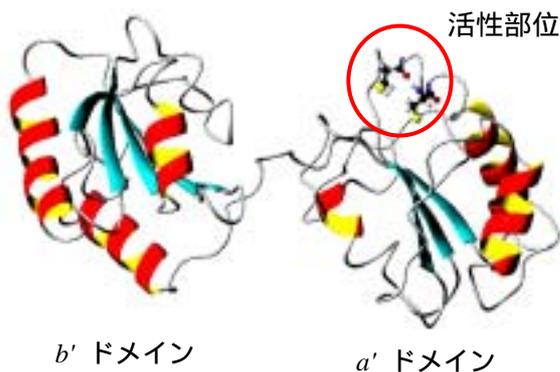


Fig.2 PDI-*b'a'* の還元型構造

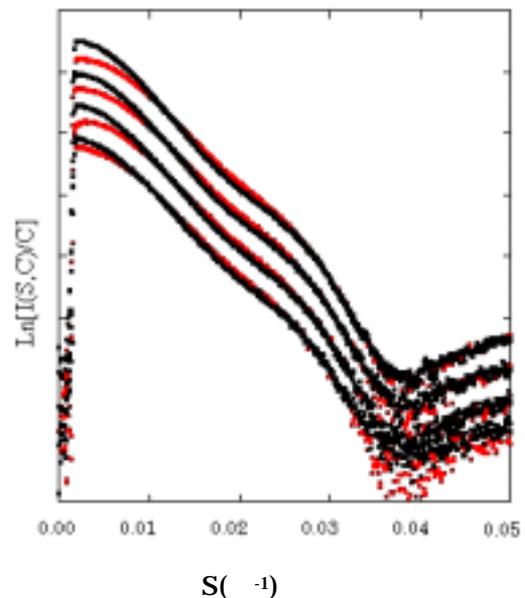


Fig.3 PDI-*b'a'* の SAXS プロファイル  
黒：酸化型 赤：還元型