

## タンパク質ポリスルフィド化メカニズムの解明

著者	Jung Minkyung
号	86
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3637号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00123318">http://hdl.handle.net/10097/00123318</a>

氏名	ジョン ミン キョン JUNG MINKYUNG
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	2017年3月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	タンパク質ポリスルフィド化メカニズムの解明
論文審査委員	主査 教授 赤池 孝章 教授 本橋 ほづみ 教授 中澤 徹

## 論文内容要旨

最近、システインパーズルフィド(CysSSH)をはじめとしたチオール基に過剰なイオウ原子が付加した活性イオウ分子種が生体内で多量に生成されており、そのポリスルフィド構造に由来する高い求核性、抗酸化活性を示すことが明らかになってきた。また、活性イオウ分子種は低分子だけでなく、タンパク質のシステイン残基にも存在すること(タンパク質ポリスルフィド化)が近年報告されている。しかし、ポリスルフィド化タンパク質の生成メカニズムとその生理機能については不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、活性イオウ分子種のユニークな化学特性に基づいた新規解析法を確立し、精製組換えタンパク質や培養細胞内発現タンパク質、新生鎖ポリペプチドなどの翻訳の様々な段階を解析することでポリスルフィド化タンパク質の生成メカニズムの解析を行った。また、ethylmalonic encephalopathy 1 (ETHE1) や glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) タンパク質を用いて酵素活性とタンパク質ポリスルフィドの関連性を調べることでタンパク質ポリスルフィドの生理機能について検討した。

まず、ポリスルフィド化タンパク質の特異的かつ高感度な検出・スクリーニング法(PMSA法)を開発し、各種タンパク質のポリスルフィド化を解析した。大腸菌で発現した組換えタンパク質や哺乳動物細胞内のタンパク質では、ほぼ全てにおいてポリスルフィド化が認められた。質量分析装置を用いた定量的ポリスルフィド解析により、精製組換えGAPDHタンパク質中のシステインのうち68.8%がポリスルフィド化されていることが示された。また、リボゾーム上のGAPDH新生鎖ポリペプチドの解析においても、システイン残基の70.7%がポリスルフィド化されていることが明らかになった。これらの結果から、タンパク質ポリスルフィド化は翻訳後修飾ではなく、翻訳時に生じる修飾であることが示唆された。さらに、翻訳のマスター酵素の一つであるシステイン-tRNA合成酵素をノックダウン・ノックアウトした細胞では、細胞内のCysSSH生成レベルの低下とタンパク質ポリスルフィド化レベルの減少が観察され、同酵素がタンパク質ポリスルフィド化に関与することが示された。

次に、ETHE1とGAPDHタンパク質の野生型およびシステイン変異体を用いて酵素活性とタンパク質ポリスルフィド化レベルの相関を検討した。ヒトETHE1では、活性中心の近傍に位置するCys247が酵素活性の発現に重要な役割を果たしており、酵素反応過程で基質であるグルタチオンポリスルフィドからイオウ原子を受け取り、タンパク質中のポリスルフィドが維持されているこ

(書式12)

とが示唆された。ヒトGAPDHでは、3つのシステイン残基のうち、Cys156およびCys247がポリスルフィド化されており、活性中心のCys152の還元状態を維持することにより酵素活性の発現・維持に寄与していることが示唆された。

以上より、タンパク質ポリスルフィドは翻訳の段階で CysSSH が新生鎖ポリペプチドに取り込まれることにより生成され、酵素活性発現をはじめとしたタンパク質機能の維持と制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。タンパク質ポリスルフィド化の生理機能についてさらに詳細な解析を進めることにより、酸化ストレスやレッドックスシグナルの関与する様々な疾病に対する新たな予防・治療方法の開発に大いに役立つことが期待される。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 ..... タンパク質ポリスルフィド化メカニズムの解明 .....

所属専攻・分野名 ..... 医科学専攻 ..... 環境保健医学分野 .....

学籍番号 ..... B3MD5070 ..... 氏名 ..... ジョン ミンキョン .....

最近、システインパースルフィド(CysSSH)をはじめとしたチオール基に過剰なイオウ原子が付加した活性イオウ分子種が生体内で多量に生成されており、高い抗酸化活性を示すことが明らかになってきた。

○ また、活性イオウ分子種はタンパク質のシステイン残基にも存在すること(タンパク質ポリスルフィド化)が近年報告されている。しかし、ポリスルフィド化タンパク質の生成メカニズムとその生理機能については不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、活性イオウ分子種の新規解析法を確立しタンパク質ポリスルフィド化のメカニズムを詳細に解析するとともに、ポリスルフィド化によるタンパク質機能制御について検討した。まず、ポリスルフィド化タンパク質の特異的かつ高感度な検出・スクリーニング法(PMSA法)を開発し、大腸菌で発現した組換えタンパク質や哺乳動物細胞内の多くのタンパク質がポリスルフィド化されていることを明らかにした。質量分析装置による定量的ポリスルフィド解析から、精製組換え glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) タンパク質中およびリボゾーム上の GAPDH 新生鎖ポリペプチド中のシステイン残基の約 70%がポリスルフィド化されていることが示され、タンパク質ポリスルフィド化は翻訳後修飾ではなく、翻訳時に生じる修飾であることが示唆された。さらに、翻訳のマスター酵素の一つであるシステイン-tRNA 合成酵素をノックダウン・ノックアウトした細胞の解析から、同酵素がタンパク質ポリスルフィド化に関与することが示された。また、GAPDH および ethylmalonic encephalopathy 1 (ETHE1) タンパク質の野生型およびシステイン変異体を用いて酵素活性とタンパク質ポリスルフィド化レベルの相関を解析した結果、ポリスルフィド化が酵素活性の発現・維持に寄与していることが示された。以上より、タンパク質ポリスルフィドは翻訳の段階で CysSSH が新生鎖ポリペプチドに取り込まれることにより生成され、酵素活性発現をはじめとしたタンパク質機能の維持と制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究は、タンパク質ポリスルフィド化の解析系を確立し、その生成メカニズムとタンパク質機能制御における意義を解明した生命科学の進展に大きく貢献する内容である。特に酸化ストレス領域の基盤研究・臨床研究に幅広く影響を及ぼすと予想される新たな知見が得られており、高い独自性と新規性を有する。よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。