

ブタ PDI-P5 の Ca<sup>2+</sup>結合による構造安定化The structure of porcine PDI-P5 is stabilized by binding to Ca<sup>2+</sup>

太田賢志, 浅井奈穂, 織田美咲, 佐藤しのり, 米澤直人\*

千葉大学大学院理学研究科, 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33

Satoshi Ohta\*, Naho Asai, Misaki Orita, Shinori Sato, Naoto Yonezawa

Graduate School of Science, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

## 1. 緒言

PDI (protein disulfide isomerase)-family はジスルフィド結合の形成・切断並びに異性化を通じてタンパク質の構造の安定化や品質管理、機能調節を担う酵素のグループであり、現在 20 種類以上のメンバーが同定されている。P5 はそのうちの一つであり、酵素活性を担う a, a' ドメインと不活性の b ドメインからなる(図 1) [1]。

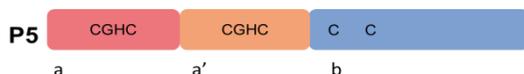


図 1 P5 のドメイン構造、CGHC 配列が活性中心だが b ドメインにも C 残基が存在する。

P5 はこれまでにゼブラフィッシュの非対称的臓器形成[2]やガン細胞の免疫回避・浸潤[3~5]、コメにおけるタンパク質の貯蔵[6]への関与が報告されており、その機能は非常に重要視されている。一方、P5 の a ドメインや a' ドメインはチオレドキシンの球状構造を持つと報告されているが、P5 全体の構造及びその反応機構についてはまだ良くわかっていない。そのため本研究では P5 の反応機構を構造の面から明らかにすべく、小角 X 線散乱(SAXS)を用いた実験を行った。P5 は小胞体内で Ca<sup>2+</sup>濃度の恒常性維持に関与しているとの報告があり、b ドメインに酸性アミノ酸残基を多く持つことか

らも P5 自身の Ca<sup>2+</sup>結合能が示唆されてきた[7,8]。

本研究では EDTA 添加によって P5 から Ca<sup>2+</sup>を除去したときの構造情報を得るべく実験を行った。

## 2. 実験方法

pET30a(+ )および BL21(DE3)を用いたブタ P5 の大腸菌発現系によって作製した His タグ融合 P5 全長を硫酸アンモニウムによる塩析と疎水性クロマトグラフィー、Ni-NTA 樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーを経て精製した[1]。精製標品を更に Superdex 200 で精製し、Vivaspin 20 を用いて濃縮した。ゲルろ過分離液には 20 mM HEPES, 100 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5% glycerol, pH7.5 を用いた。また、EDTA 添加の場合は濃縮後の試料溶液へ 1M EDTA 溶液を終濃度 10mM となるよう添加した。SAXS 測定は 25°Cで行い、タンパク質濃度 0.67 mg/mL~2.07 mg/mL の範囲でそれぞれ 3 点ずつ測定した。

## 3. 結果と考察

Scattering pattern から、3 点の濃度についてそれぞれ解析を行った。Kratzky-plot で、EDTA 無添加時に観察された特有のパターンが EDTA 添加時にはほぼ消失した。このことから P5 は Ca<sup>2+</sup>非存在条件下では unfolded となることが示唆された。

Ca<sup>2+</sup>に対する結合能については以前から報告があったが、EDTA で Ca<sup>2+</sup>を除去すると構造が不安定化し folding が崩れる可能性があることは新たな発見であった。しかし、濃度が 3 点しか取れなかったため今後は buffer 組成の検討をはじめ実験条件の改良を行い、信ぴょう性の向上に努める必要がある。また、Ca<sup>2+</sup>結合による P5 の構造安定化に及ぼす各ドメインの寄与を調べるため、a ドメイン欠損体や、a, a'ドメイン欠損体を用いて同様の実験を行う必要がある。

#### 4. 謝辞

測定に際しまして、ご協力くださいました清水先生、西條先生、森先生をはじめ PF スタッフの皆さまにこの場をお借りして感謝致します。

#### 5. 参考文献

- [1] Miyakawa M., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1854, 485-491 (2015)
- [2] Hoshijima K., *et al.* *Genes Dev.* 16, 2518-2529 (2002)
- [3] Kaiser B., *et al.*, *Nature* 447, 482-486 (2007)
- [4] Gumireddy K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 104, 6696-6701 (2007)
- [5] Gao H., *et al.*, *Oncotarget.* 7 (33), 53289-53298 (2016)
- [6] Onda Y., *et al.*, *The Plant Cell* 23, 210-223 (2011)
- [7] Groenendyk J., *et al.*, *Science Signaling* 7 (329), 54-67 (2014)
- [8] Galligan J. J., *et al.*, *Hum. Genomics* 6 (1), 6. (2012)

\*nyoneza@faculty.chiba-u.jp