

氏名	KHAN MOHAMMAD GOLAM MAOLA		
博士の専攻分野の名称	博士（学術）		
学位記号番号	博理工甲第 843 号		
学位授与年月日	平成 23 年 9 月 16 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Functional analyses of protein disulfide isomerase (PDI) in mammalian cells (動物細胞におけるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼの機能解析)		
論文審査委員	委員長	連携教授	長田 裕之
	委員	教授	大西 純一
	委員	准教授	仲本 準
	委員	連携准教授	堂前 直

## 論文の内容の要旨

Protein disulfide isomerase (PDI) is an ER-localized protein with oxidoreductase functions. However, PDI is also expressed on the cell surface, endosomes and mitochondria. Through disulfide exchange reactions, PDI forms disulfide bonds in the nascent proteins by oxidation, breakdown of disulfide bonds by reduction and shuffle of disulfide bonds by isomerization reactions. Functions of PDI depend on the localization and redox environment. For instance, in the ER where the redox environment is more oxidizing than the cytosol or cell surface, PDI performs oxidation. On the contrary, on the cell surface PDI performs the reduction function. PDI-mediated reduction function is of immense importance since a number of therapeutically important events occur after reduction. For example, entry of toxins, such as cholera, diphtheria and virus like HIV-1 depends on the reduction of disulfide bonds by PDI. Therefore, the first goal was to discover specific inhibitor for PDI activity. The therapeutic role of PDI and the rationale behind targeting PDI is described in Chapter 1.

To identify PDI inhibitor, the compounds of RIKEN natural product depository (NPDepo) compounds were screened in a high-throughput manner. Through high-throughput screening of ~10,000 compounds from NPDepo a novel small molecule inhibitor, juniferdin, was discovered. Using juniferdin as a lead compound, several derivatives were synthesized and tested for potency and specificity against PDI. It was found that among the synthesized compounds, compound **13** showed similar inhibitory activity as juniferdin. Interestingly, both inhibitors specifically block the reductase activity of PDI. This has therapeutic value in situations where reduction-dependent protein conformational changes occur on the cell surface. An important example is highlighted in Chapter 2 of the thesis, where we show that PDI catalyzed reduction of disulfide bonds in gp120 is a prerequisite for HIV-1 entry into host cells. In this chapter, we report that juniferdin and compound **13** inhibit the PDI-catalyzed reduction of the disulfide bonds in gp120. These results provide solid *in vitro* evidence of the therapeutic value of juniferdin and compound **13**. Due to these promising results, it is of interest to confirm the antiviral properties *in vivo* of these compounds for clinical application.

As PDI is a promiscuous protein on the cell surface, it is likely to be a good therapeutic target for a wide range of diseases. Reduction of disulfide bonds by surface-associated PDI is important for the entry of virus and toxins into the cells. Therefore, functionally specific PDI inhibitors such as juniferdin and compound **13**, may largely prevent the maturation of toxins which are dependent on disulfide bond cleavage. Thus, selective inhibitors of PDI are likely to find use in a broad range of therapeutic applications.

In Chapter 3 of this thesis, it has been shown that PDI regulates the activation and secretion of MMP-9. MMP-9 regulates many physiological and pathological processes by degrading ECM and non-ECM proteins. To avoid pathogenesis, MMP-9 is regulated precisely during its synthesis, secretion and activation. Following secretion, the activity of MMP-9 is regulated predominantly by the cysteine switch; a linkage between cysteine at position 99 and Zn<sup>2+</sup> in the catalytic domain. In Chapter 3 we present our observations that the secretion and activation of MMP-9 depend on not only the cysteine switch but also post-translational modifications, such as disulfide bond formation in the fibronectin repeats. PDI was found to be an upstream regulator of MMP-9 secretion. Based on our results, PDI regulates MMP-9 secretion through its oxidase activity.

To confirm the post-translational modification of MMP-9, MALDI-TOF MS analysis was employed on purified MMP-9. Using this method, 6 disulfide bonds in the catalytic domain were identified. Our results show that the disulfide bonds in MMP-9 are important not only for its gelatinolytic activity but also for its intracellular trafficking and secretion. It was found that cysteine switch mutants are not secreted into the culture medium, suggesting the necessity of an intact cysteine switch for MMP-9 secretion. More importantly, it has been found that the disulfide bonds of the catalytic domain also regulate the gelatinolytic activity of MMP-9, whereas the disulfide bond of the hemopexin domain or other cysteines have no significant effect on MMP-9 secretion and gelatinolytic activity.

In conclusion, PDI-mediated disulfide bonds govern MMP-9 levels; this regulation is dependent on the oxidase activity of PDI. Thus, inhibition of the oxidative function of PDI may be therapeutically relevant against cancer. Furthermore, the reductive function of PDI is involved in reduction of the disulfide bonds in gp120. Reduction of gp120 disulfide bonds mediate HIV-1 entry into the cell. Many other virus and toxins are dependent on disulfide bond reduction upon entry into the cell, and therefore PDI is also imperative to cellular entry of these elements. Juniferdin, which has been identified as a specific and potent inhibitor of PDI reduction activities, is therefore an interesting compound that has potential in both basic research and clinical applications.

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成 23 年 7 月 27 日（水）に埼玉大学理学部 3 号館第 3 会議室で Khan 氏の学位論文発表会を開催した。

Khan 氏の学位論文のタイトルは、「Functional analyses of protein disulfide isomerase (PDI) in mammalian cells」(動物細胞におけるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼの機能解析) で、(1) PDI 阻害剤の発見、(2) マトリックスメタロプロテアーゼ -9 (MMP-9) の活性化および分泌における PDI の役割解明、という主に 2 つの大きな研究成果で構成されている。以下に研究成果の概要を記述する。

第 1 章では、まず PDI の研究背景について述べている。PDI は細胞表層および小胞体に存在し、タンパク質の酸化還元、特にシステイン残基間に起こるジスルフィド結合を調節するタンパク質である。一般に、PDI は酸素が十分存在する細胞表層では基質タンパク質の還元、逆に小胞体内腔では基質タンパク質の酸化とジスルフィドの架けかえに機能するといわれる重要な酵素である。また、PDI はある種の癌細胞で過剰発現していることや、HIV-1、コレラ菌、ジフテリア菌といったウイルスや毒素の感染過程に関わっていることが知られている。このことから、PDI の機能を特異的に阻害する低分子化合物は、PDI の複雑な機能を解析するバイオプローブとしてだけでなく、上記疾患に対する治療薬の開発につながることで期待される。しかしながら、現在までに強力かつ特異的な PDI 阻害剤は開発されていない。バシトラシン、*P*-chloromercuriphenylsulfonate (PCMBs)、phenylarsine (PAO) などのいくつかの低分子化合物が PDI 活性を阻害することが報告されているが、いずれも阻害活性が弱く (mM オーダー) かつ特異性が低い。Khan 氏はこのような現状を踏まえ、新たな PDI 阻害剤を探索する研究に取り組んだ。

第 2 章では、PDI 阻害剤の探索と発見について述べている。Khan 氏はまず、PDI 阻害剤を探索する目的で、PDI が誘導するインスリンの還元変性凝集を指標とした *in vitro* ハイスクリーン系を構築した。そして、理研化合物バンク (NPDepo) の化合物ライブラリーを用いておよそ 9,000 化合物スクリーニングし、4 種のヒット化合物を得た。その中で、植物由来天然化合物 juniferdin が最も強い活性を示し ( $IC_{50} = 0.156 \mu\text{M}$ )、その阻害能はこれまでに報告されている PDI 阻害剤と比べ 100 以上強いものであった。共同研究者の協力で各種 juniferdin 誘導体を合成し、juniferdin と同等の活性を有する compound 13 ( $IC_{50} = 0.167 \mu\text{M}$ ) の創製にも成功した。Juniferdin および compound 13 は PDI の酸化活性は阻害せず、また他の PDI ファミリーメンバーである ERp57 や ERp72 の還元活性を阻害しなかった。このことは、本化合物が PDI の還元活性を特異的に阻害することを示唆する。さらに、HIV-1 gp120 タンパク質の還元作用への影響を調べ、本化合物が HIV の細胞融合を抑制する初めての特異的 PDI 阻害剤であることを明らかにした。第 2 章の結論を以下にまとめる。

1. PDI 阻害剤のハイスクリーン系を構築し、juniferdin を見出した。
2. Juniferdin および compound 13 は PDI の還元活性を特異的に阻害する。
3. Juniferdin および compound 13 は PDI が介する HIV-1 gp120 タンパク質の還元作用を阻害する。

第 3 章では、マトリックスメタロプロテアーゼ -9 (MMP-9) の活性化および分泌における PDI の役割解明について述べている。Khan 氏は、PDI の機能を解析していく過程で、癌細胞の遊走や浸潤に深く関わ

る MMP-9 の活性化や細胞外分泌に PDI が関与していることを見出した。詳細な質量分析と部位特異的変異体の解析から、MMP-9 のジスルフィド形成に関わるすべてのシステイン残基を同定し、その細胞内輸送における役割を解明した。さらに興味深いことに、細胞外に分泌できない変異型 MMP-9 の過剰発現癌細胞は、野生型 MMP-9 の過剰発現癌細胞よりも細胞遊走能や細胞浸潤能が有意に上昇していることを発見した。その原因として、細胞内に蓄積した変異型 MMP-9 が、遊走や浸潤に関わる thrombospondin-1 や EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein-1 (EFEMP-1) などの発現を調節しているためであることが示唆された。第 3 章の結論を以下にまとめる。

1. PDI は MMP-9 の活性化や細胞外分泌を調節する。
2. MMP-9 は、触媒ドメイン中に 6 つとヘモペキシンドメイン中に 1 つのジスルフィド結合を形成する。
3. MMP-9 構造中のシステインスイッチ形成と触媒ドメイン中の 6 つのジスルフィド形成は、自身の細胞外分泌や局在化に重要な役割を担っている。
4. 細胞外分泌ができない変異型 MMP-9 は、細胞の遊走や浸潤を促進させる。

第 4 章では、本研究成果を総括している。

以上のことから、本学位論文審査委員会は、Khan 氏の研究成果は学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格とした。