

oxidative protein folding に関わる 細胞因子の構造機能解明とその工学的利用

研究者 稲葉 謙次

(JST 専任研究員)

京都大学ウイルス研究所

概要

ジスルフィド結合の形成は、多くの分泌蛋白質や細胞表層蛋白質が安定な立体構造をとり、機能を発現する上で極めて重要です。細胞内には蛋白質ジスルフィド結合を効率よく導入するためのシステムが備わっており、大腸菌の場合、そのシステムは DsbA (可溶性酵素)、DsbB (膜蛋白質)、そして呼吸鎖成分であるユビキノン分子によって構成されています。蛋白質がジスルフィド結合を形成することで生じた2つの電子はまず DsbA が受け取り、その後 DsbB を介してユビキノン分子に渡されます。私はこの一連の電子の流れにおいて、途中 (DsbA-DsbB の間で) 酸化還元電位が逆転していることを発見しました。また、DsbA 再酸化反応中にユビキノンが活性化し (淡黄色から強い赤紫色へ変色する)、これが反応を駆動する上で重要な意味をもつことを明らかにしました。さらに、DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の X 線結晶構造解析にも取り組み、现阶段で最大分解能:4.2 Å、空間群:C2221、格子定数: a=69.6 Å, b=105.0 Å, c=238.2 Å をもつ結晶が得られるに至っています。

研究内容

目的

大腸菌のペリプラズムには、蛋白質ジスルフィド結合形成に関わる細胞因子として、複数の Dsb 因子と呼ばれる蛋白質が見つっている。図1に示されるように、可溶性蛋白質 DsbA が内膜を越えて分泌された蛋白質に対し非特異的にジスルフィド結合を導入する。基質を酸化し還元型となった DsbA は内膜蛋白質 DsbB と膜内在性化合物ユビキノンにより再酸化される。一方、DsbA により導入されたジスルフィド結合の組合せが誤っている場合、可溶性蛋白質 DsbC が正しいジスルフィド結合への異性化反応を触媒する。DsbC が異性化酵素として機能するためには、自身還元型に保たれていなければなら

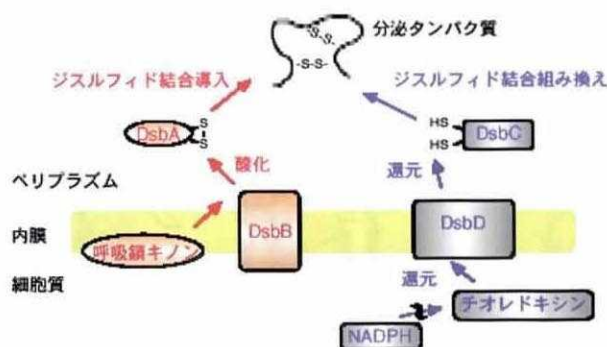


図1 大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合形成に関わる因子

ないが、その還元力は細胞質に存在するチオレドキシシンから内膜蛋白質 DsbD を通して受け取っている。本研究では、DsbA-DsbB-ユビキノンにより構成されるジスルフィド導入システムを中心に、その分子機構について、生化学・分光学・遺伝学さらには構造生物学的手法により詳細に検討した。

成果

ジスルフィド結合の形成は二電子の移動を伴う電子移動反応であり、活性部位間の酸化還元電位の差により反応が駆動されていると考えられる。そこでまず、蛋白質ジスルフィド結合の酸化還元電位を普遍的に測定するための独自の手法を開発し、それにより DsbA および DsbB の活性部位の酸化還元電位を決定した。その結果、予想に反し DsbB の酸化力は DsbA に比べ著しく低く、DsbA から DsbB への電子移動反応は約 0.13 V もの電位に逆らったものであることを発見した（図 2）。つまり DsbA 再酸化因子であるはずの DsbB そのものには DsbA を酸化する能力はなく、補酵素であるユビキノン分子（UQ）の強い酸化力がこの反応をドライブする源になっていると考えられる。以上の成果は EMBO J に掲載され、また Science 誌の Editor's Choice 上でも、大腸菌のジスルフィド導入システムのパラドックスとして注目を浴びた。

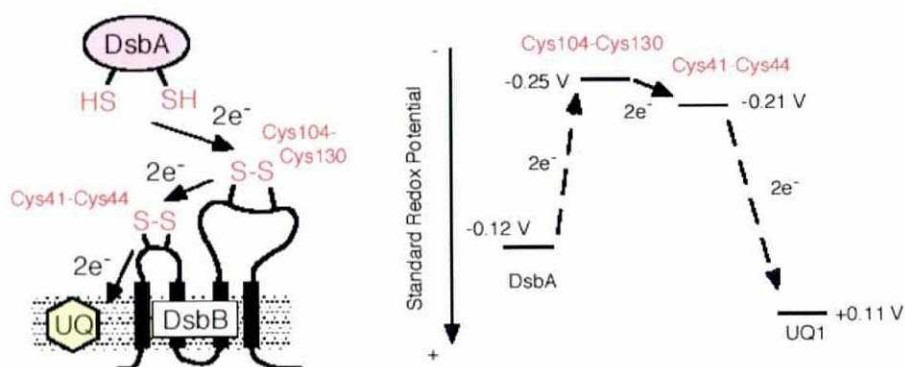


図 2 DsbA-DsbB-ユビキノン間の電子の流れ

そこで本研究者は、この酸化還元電位の逆転にもかかわらず DsbB が DsbA を効率よく再酸化する分子メカニズムについて、さらに深く追求した。最も興味深い発見は、DsbA 再酸化反応中に DsbB に結合したユビキノン分子が、本来の 400 nm の吸収（弱い黄色）から 500 nm に強い吸収をもつ電子状態（強いピンク色）へと変化することである。この電子状態の変化は、DsbA-DsbB 間のコンプレックス形成によりフリーになった Cys44 によって誘起されることを解明し、図 3 に示す新たな反応モデルを

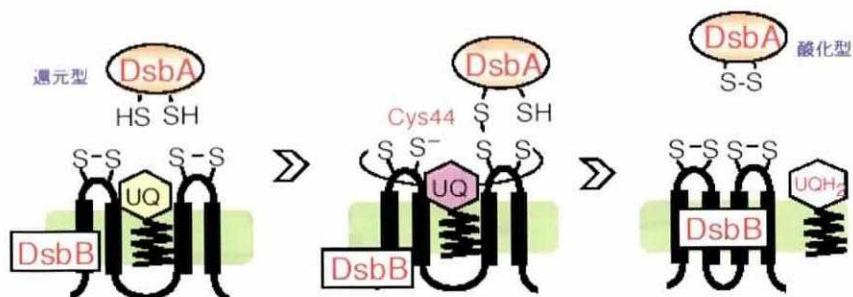


図 3 DsbB-ユビキノンによる DsbA 再酸化反応の新たなモデル

提唱するに至っている (J. Biol. Chem. に掲載)。この反応モデルは、エネルギー的には好ましい DsbB から DsbA への逆電子移動反応が DsbB 分子内のジスルフィド形成 (Cys41-Cys130) および Cys44-ユビキノン間の共鳴構造の形成により妨げられ、図 3 中の中間状態が一連の酵素反応を円滑に進める上で非常に重要な意味をもつことを示している。以上の研究成果は変異体作製・分光学的測定・速度論的解析を駆使した結果成し得たものであり、DsbB の分子メカニズムを解明する決定的な仕事と言える。

さらに嫌気条件下では、ユビキノンではなくメナキノンが呼吸鎖電子伝達系の電子キャリアとして機能することが知られている。実際 DsbA-DsbB システムも、ユビキノン欠損条件下ではメナキノンを電子アクセプターとして利用し、DsbA 再酸化反応中に 550 nm に強い吸収 (すみれ色) をもつ DsbA-DsbB-メナキノン三者複合体が形成することを明らかにした (図 4 参照; J. Biol. Chem. に掲載)。

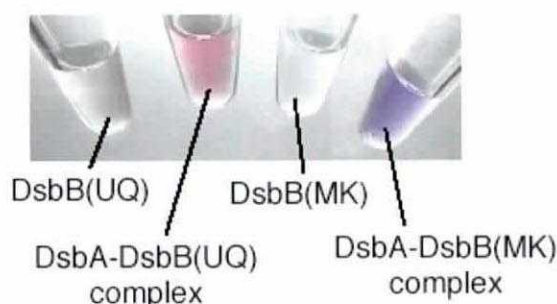


図 4 DsbA-DsbB-キノン複合体でみられる発色

以上、DsbA-DsbB-キノンシステムの反応メカニズムについて重要な発見をしたものの、上に示したモデルの正当性を構造生物学的にも検証することが肝心である。本研究者はさきがけ研究が始まって以来、DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の X 線結晶構造解析に最も力を注いできた。異なる 20 種類近くの界面活性剤を用い、結晶化条件の網羅的探索さらには結晶化の妨げと予想されるフレキシブルな領域の切除等を行うことにより、図 5 に示す棒状タイプの結晶が再現性良く得られた。この結晶について Spring-8 ビームライン BL44XU にてデータ収集を行ったところ、最大分解能 4.5 Å を示した。さらにデータセットを収集し、データ処理を行ったところ、この結晶が空間群: P42212、格子定数 $a=b=167.5 \text{ \AA}$, $c=65.1 \text{ \AA}$ をもつことが判明した。さらに 7Å まで統計処理を行い、R-factor=7.4% (14.4%)、Completeness = 90.5% (72.6%)、 $I/\sigma(I) = 18.3 (2.5)$ 、Multiplicity = 3.1 の統計値が得られた。

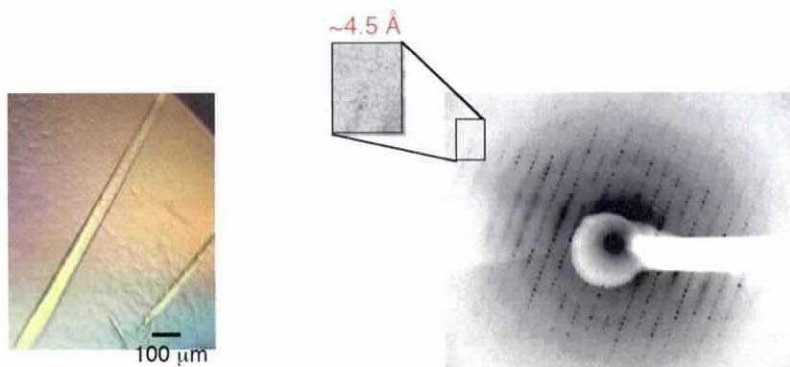


図 5 DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の結晶とその回折データ (その 1)

さらに結晶化条件の最適化を行い、ノニルチオマルトシドを界面活性剤として用いた条件にて、図6に示す200-300 μm のサイズをもつ結晶が再現性良く得られた。この結晶についてもSpring-8ビームラインBL44XUにてデータ収集を行ったところ、これまででベストの最大分解能4.2 \AA が得られた。データセットを収集し解析したところ、この結晶が空間群:C2221, 格子定数:a=69.6 \AA , b=105.0 \AA , c=238.2 \AA をもつことが判明した。さらに6.2 \AA まで統計処理を行い、R-factor=5.5% (29.0%), Completeness = 85.5% (90.1%)の統計値が得られるに至っている。

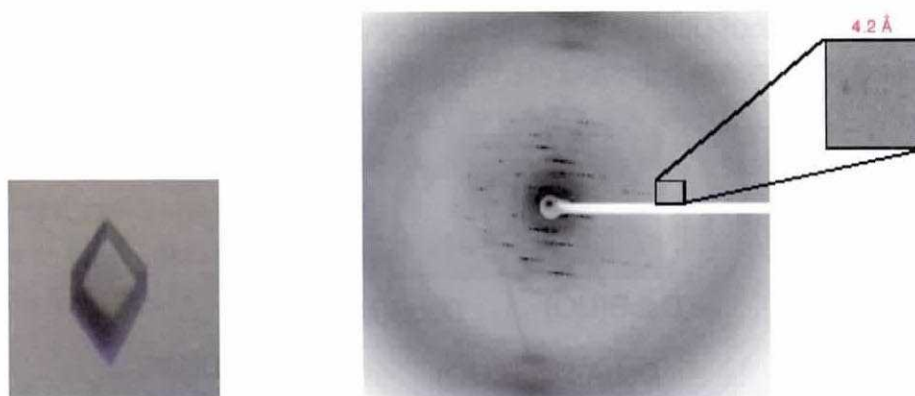


図6 DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の結晶とその回折データ(その2)

結論

生化学・分光学・遺伝学さらには構造生物学を駆使することにより、大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合導入システムの分子機構に関する以下の事項を発見・解明した。

- i) DsbA-DsbB 活性部位間の顕著な酸化還元電位の逆転
- ii) その酸化還元電位の逆転を克服するための新たな「DsbB による DsbA 再酸化反応機構」の提唱
- iii) DsbA 再酸化反応中に起こるキノン分子の特殊な電子状態遷移とその要因

さらに DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の X 線結晶構造解析も遂行し、高分解能構造解析の成功まであと一步の段階まで到達した(現在進行中)。