

研究課題別評価

1 研究課題名: 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

2 研究者氏名: 稲葉 謙次

3 研究の狙い:

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高次構造を保ち、機能を発現する上で非常に重要である。真核細胞・原核細胞を問わず、細胞内には効率よくジスルフィド結合を導入するシステムが備わっている。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る。本研究では、生化学的および構造生物学的手法を駆使することにより、DsbA-DsbB-ユビキノンから成るジスルフィド結合導入システムの分子機構の完全理解を目指した。

4 研究成果:

1) ジスルフィド結合導入経路における酸化還元電位の逆転の発見

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勾配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アッセイ法を開発し、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世界に先駆けて発見した(図1)。つまり DsbA 再酸化因子であるはずの DsbB そのものには DsbA を酸化する能力はほとんどなく、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。

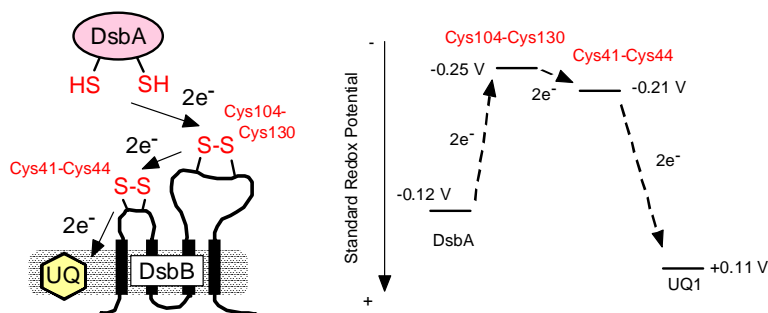


図1 DsbA-DsbB-ユビキノン間の電子の流れ(左)と各活性部位の酸化還元電位(右)

2) DsbA 再酸化反応中のユビキノン分子の電子状態遷移を発見

本研究者は、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 がユビキノン分子と電荷移動錯体を形成することによって誘起されることを解明し、図2に示す新たな反応モデルを提唱するに至っている。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2中の中間状態が一連の酵素反応を正方向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 (J. Biol. Chem. に掲載)。

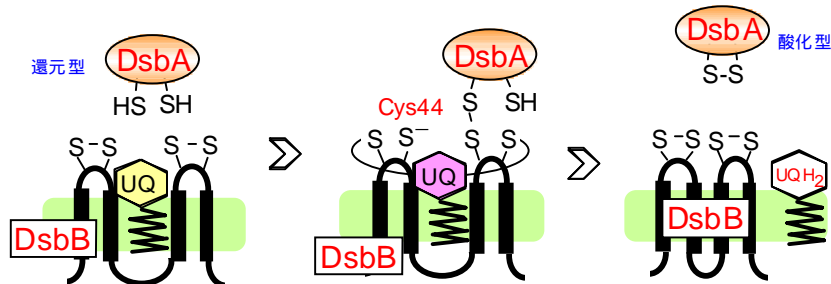


図2 DsbB-ユビキノンによる DsbA 再酸化反応の新たなモデル

3) 嫌気条件下での DsbA 再酸化反応機構の解明

本来大腸菌は半嫌気条件下で生育している原核細胞であり、嫌気条件下で酸化的なジスルフィド結合形成がどのように進行しているか興味をもたれる。嫌気条件下では、メナキノン分子の生合成量が上昇し、メナキノンがユビキノンに代わって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。そこで DsbB による DsbA 再酸化反応がメナキノンによっても駆動されるかを検討したところ、確かにメナキノンが DsbA-DsbB システムの電子アクセプターとして機能することを生化学的に示した。またメナキノンのみを合成するユビキノン合成欠損株中で DsbA は酸化型で蓄積していることから、細胞中でもメナキノンが DsbA 再酸化に関わることを示した。さらに DsbA-DsbB-メナキノン電子伝達経路について詳細な生化学解析を行ったところ、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発見した(図3)。以上の研究により、メナキノンにより駆動される反応は、ユビキノンの場合とおよそ同一のメカニズムで進行することを明らかにした (J. Biol. Chem. に掲載)。



図3 DsbA-DsbB-キノン複合体でみられる発色

4) DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の X 線結晶構造解析

上に示した DsbB とユビキノンによる DsbA 再酸化反応のメカニズムを検証する意味でも、構造生物学的な裏付けが極めて重要である。そこで本研究者は、さきがけ研究期間中、反応中間状態である 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4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 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 4.2 Å の回折データが得られた。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: C22₁, 格子定数: a= 69.6 Å, b= 105.0 Å, c=238.2 Å をもつことが判明した。さらに 6.2 Å 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。

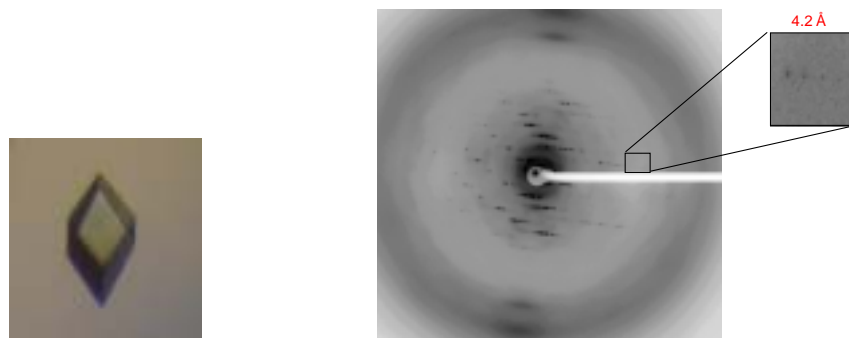


図4 DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の結晶(左)とその回折データ(右)

さらにこの3ヶ月ほどの間に、さらなる結晶化条件およびコンストラクトの検討を引き続き行った。その結果大きな進展が得られ、図5に示す柱状の結晶が再現性良く得られた。この結晶について実験室系の装置 R-Axis によるデータ収集を行ったところ、最大分解能 3.5 Å の回折点が観測された。現在 Spring8 が停止中であるが、この結晶を放射光を用いてデータ収集すれば、これ以上の分解能が期待される。3 近いフルデータセットが収集できれば、構造決定も十分可能である。現在位相決定のための重原子置換体さらにはセレノメチオニン導入体も検討しており、次の Spring8 での放射光実験に向け、準備を整えている。

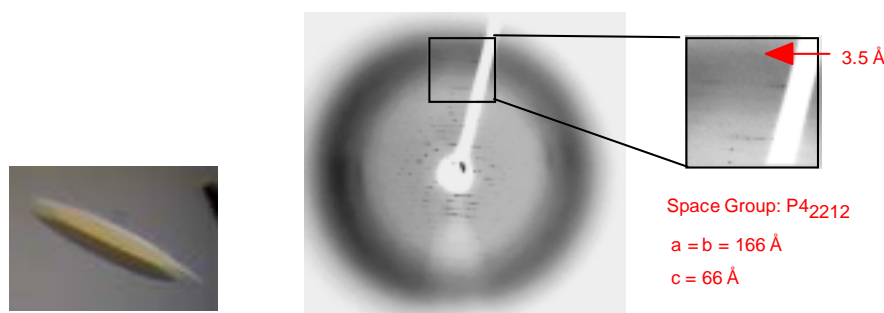


図5 最近得られた DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の結晶(左)とその回折データ(右)

5 自己評価:

大腸菌さらには真核細胞の蛋白質ジスルフィド結合導入システムの反応機構の解明と、それら因子の高分解能構造解析を主要な目的として研究を遂行した。大腸菌のシステムの反応機構については緻密な生化学・分光学・遺伝学的解析を行うことにより、大きな進展が得られ、この分野では世界に先駆けて多くの事項を発見し論文に掲載した。また大腸菌ジスルフィド導入因子の複合体(うち1つは膜蛋白質)の構造解析についても、良質の結晶が再現性良く得られるに至り、構造解析を成就するまであと一步の段階まできている。残念ながらこのさきがけ期間中には構造を解く段階にまでは至らなかったが、来年度中には達成できる手応えをつかんでいる。一方、真核細胞のジスルフィド結合導入システムについては、海外のグループが相次いで構造や反応機構について報告し先を越された感がある。ただしこのシステムに関わる FAD 分子の機能的役割や、Protein Disulfide Isomerase の構造については未解明であり、今後も追求する価値のある仕事である。

6 研究総括の見解:

大腸菌の蛋白質ジスルフィド結合導入システムの反応機構解明に関しては良い成果を挙げ、論文は science 誌の記事で取り上げられる等の注目を浴びた。しかし、さきがけ研究での主目的はこの研究者にとっては未知の挑戦である構造解析であった。非常にまともにまっ正面からこの

課題に取り組んできたが、やはり結晶化が難しかった。しかし、最近良質の結晶が得られるようになったということなので、もう一息がんばって欲しい。構造解析というのはこのような分野なのであり、今のところ結果に結びついていないが、良い研究を達成しつつあると思う。評価側は、この段階で軽率な評価を下すべきでないと考えている。

7 主な論文等:

論文

1. Kenji Inaba and Koreaki Ito

"Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade"

EMBO J, **21**, 2646-2654, (2002)

* Science 誌 Editor's Choice に掲載される (Vol. 296, p1767 (2002))

2. Kenji Inaba, Yoh-hei Takahashi and Koreaki Ito

"DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation"

Journal of Biological Chemistry, **279**, 6761-6768, (2004)

3. Yoh-hei Takahashi, Kenji Inaba and Koreaki Ito

"Characterization of Menaquinone-Dependent Disulfide Bond Formation Pathway of *Escherichia coli*

" *J. Biol. Chem.* **279**, 47057-47065, (2004)

出版物

1. 稲葉 謙次、伊藤維昭

「Oxidative Protein Folding に関わる細胞因子」医学の歩み 印刷中

2. 稲葉 謙次

「Redox status の検出 / SH 基修飾剤」医学の歩み 印刷中

招待講演

1. 稲葉謙次、伊藤維昭

シンポジウム「蛋白質分子のレベルでみるレドックス反応の生体内カスケード」

「大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合導入システムにおける生物物理化学」

第 75 回 日本生化学会年会 (於 京都国際会議場) 2002 年 10/14-17

2. 稲葉謙次、高橋洋平、伊藤維昭

ワークショップ「タンパク質機能化の細胞内インフラストラクチャー」

「大腸菌の蛋白質ジスルフィド結合導入メカニズム: パラドックスとソリューション」

第 27 回日本分子生物学会年会 (於 神戸ポートアイランド) 2004 年 12/8-11

3. Inaba K., Takahashi, Y. and Ito, K.

"DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation."

Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones and the Heat Shock Responses", New York USA, 2004

学会発表等

1. 稲葉謙次、高橋洋平、伊藤維昭

公募型シンポジウム

「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」

第 3 回 日本蛋白質科学会年会 (於 札幌コンベンションセンター) 2003 年 6/23-25

2. Inaba K. and Ito, K.

"Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction

cascade.”

Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces, New Hampshire USA, 2002

3. Inaba K. and Ito, K.

“Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade.”

FASEB Summer Research Conference “Protein Folding in the Cell”, Vermont USA, 2002