

氏名	たか はし よう へい 高 橋 洋 平
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 3150 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Biochemical analyses of the quinone - coupled enzyme, DsbB, of <i>Escherichia coli</i> involved in disulfide bond generation (大腸菌におけるジスルフィド結合の創生に関わるキノン共役酵素 DsbB の生化学的解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 維 昭 教 授 三 木 邦 夫 教 授 杉 山 弘

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質におけるジスルフィド結合は主に分泌タンパク質や細胞表層タンパク質に見られ、それらのタンパク質の構造形成や安定性において重要な役割を果たしている。近年、細胞にはタンパク質構造形成の一過程であるジスルフィド架橋の導入を支えるための機構が備わっていることが明らかとなってきた。大腸菌のペリプラズム領域にはジスルフィド結合をタンパク質に導入する酵素として DsbA が存在し、自身のジスルフィド結合により基質タンパク質のシステインペアを酸化する。細胞質膜には DsbA を酸化して活性型に保つ働きをもつ膜タンパク質 DsbB が存在する。DsbB は呼吸鎖成分であるキノンと共同して機能し、キノンの酸化力をジスルフィド結合に変換してジスルフィド結合を創生する酵素でもある。大腸菌は好气的条件下ではユビキノン (UQ) を、嫌气的条件下ではメナキノン (MK) を主要なキノンとして有することが知られるが、嫌気条件下でのジスルフィド結合導入機構は不明の点が多い。従来、DsbB は UQ が結合した形で精製され、研究に用いられてきた。申請者は本研究において、UQ および MK 生合成酵素が欠損した 2 重変異株を用いることによりキノン非結合型 DsbB を、UQ 生合成酵素のみが欠損した変異株を用いることにより MK 結合型 DsbB を、それぞれ精製することに成功し、各種キノンの DsbB との反応性や機能的役割を調べる道を切り開いた。MK は UQ と同一の酵素部位に結合し、UQ と同様 DsbB の Cys41-Cys44 ペアを選択的に酸化すること、そして MK が実際に DsbA 酸化反応を駆動する能力をもつことを明らかにした。MK に依存する反応は *in vitro* において非常にゆっくり進行することがわかり、このことを利用して DsbB による DsbA 酸化反応の経路について詳しい解析を行った。その結果、UQ 依存性ジスルフィド結合形成反応の解析で示唆されたように反応は DsbA と DsbB 間の直接的なチオール・ジスルフィド交換反応による速い経路、DsbA と DsbB 間に形成されるジスルフィド結合を介する中間体を経る遅い経路の二つの経路のいずれかによって進行することをより明確に示した。また、速遅両反応経路に於いてそれぞれ MK が電子状態の遷移を起こし 550 nm における吸収を一過的に生じることを明確に示した。UQ 結合 DsbB においてある種の条件下で 500nm に吸収を生じることが観察されていたが、キノン非結合型 DsbB を用いることによりこの吸収がキノンに由来することを確証した。また、この現象が、DsbB の Cys44 残基が還元され脱プロトン化されることによって引き起こされるとの UQ 結合 DsbB で並行して明らかにされた機構が MK にも当てはまることを確証した。以上、MK は UQ と同様の分子機構で DsbB による DsbA 酸化反応を支える能力を持つことを示すと同時に、MK による反応が緩慢に進行することを利用して反応経路をより詳細に解明した。申請者はまた、DsbB の第 2 膜貫通領域と第 3 膜貫通領域を結ぶ細胞質領域の変異によって、DsbB 機能低下がおこることを見いだした。変異体に於いては、本来 DsbA との反応中間状態として一過的に生じるような、ジスルフィドの再編成とキノンの発色を伴う DsbB の分子状態が恒常的に (基質 DsbA の関与無しに) 生じていることを発見した。これらの結果から、DsbB における細胞質ループ領域がペリプラズム側のシステイン残基の適正な配置とその動的変化を支える役割を持つことを示唆した。

論文審査の結果の要旨

ジスルフィド結合の形成は2つのシステイン残基間の単純な酸化反応であるにもかかわらず、細胞に於いて効率よく起こるためには、膜に存在する特異的酸化酵素（大腸菌の場合 DsbB）と可溶性の一般的酸化酵素（同じく DsbA）の連携プレートを必要とする。タンパク質の安定性や活性制御に深く関わるジスルフィド結合の形成メカニズムを解明することは現代細胞生物学の重要問題である。最近あらゆる生物でこの問題に関わる共通な反応スキームが存在することが示唆されつつあり、モデル生物大腸菌を用いた詳細な研究には高い意義を見いだすことができる。DsbB はキノンの酸化力を変換してジスルフィドを新たに創り出す、そしてそのジスルフィドを DsbA に受け渡すという二つの重要な機能をもつが、申請者の研究はこの両面において幾つかの新たな知識をもたらしたのもとして高く評価できる。DsbB は通常細胞内で内在性のユビキノン 8 と高い親和性で結合しており、キノンの役割解明のために必要とされるキノン成分の除去や置き換えは、化学的操作によっていくつか試みられたものの、有効な成功例がなかった。申請者は、大腸菌のキノン生合成経路における酵素の欠損変異を巧みに組み合わせることにより、キノン非結合型 DsbB およびメナキノン結合型 DsbB を得ることに初めて成功した。このことにより、共同研究による DsbB アポ酵素の反応性の詳しい解析と DsbA 酸化ステップのキノンに依存しないステップとキノンによって駆動されるステップへの分類を可能にした。同時に、反応が早い経路と遅い経路の二つの経路をたどることが示唆され、申請者はメナキノン依存の緩慢な反応を利用してこのことをより明確に示すことに成功した。また、これらの二つの DsbA 酸化反応経路のいずれに於いても、Cys44 の還元に伴うキノン分子との電荷移動錯体の形成が起こることを示した。さらに DsbB 中央部の細胞質領域の変異解析によって、キノンの電子状態遷移を引き起こすシステインの再編成が DsbA と相互作用することなく恒常的に起こることにより機能低下をもたらされること、このような非生産的な過程を防止するために DsbB 中央部の短い細胞質領域が何らかの役割を担っていることを発見した。従来、DsbB はそのペリプラズム領域の解析が進んでいたものの細胞質領域や膜貫通領域に関する情報はほとんどなかった。申請者は、最近当研究室で解明された DsbB-DsbA 複合体の立体構造において示された DsbA によって誘起される DsbB システイン残基の再配置を支える要素として細胞質領域とそれにつながる膜貫通領域の役割を提唱した。DsbA はシステイン酸化還元酵素の中で最も酸化力が強いことが知られており、DsbB が如何にして一見酸化還元ポテンシャルの差に逆らうかのように DsbA を酸化できるのかが大きな疑問であるが、申請者による一連の成果はこの問題への理解に貢献するところが大きい。

以上のように本論文はタンパク質のジスルフィド結合形成装置の分子機構解明に有益な情報を多くもたらしたものであり、博士（理学）の学位論文として価値あるものとして認める。また論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。