
学位申請論文

小林 妙子

タンパク質にジスルフィド結合を導入 するDsbシステムと呼吸鎖の共役

化学専攻 細胞生物化学分科
小林 妙子

要旨

分泌タンパク質等に見られるジスルフィド結合は、大腸菌ではペリプラズム領域において、ジスルフィド結合導入因子DsbAによって導入される。DsbAは活性部位のジスルフィド結合(Cys30-Cys33)を用いて、分泌タンパク質のシステインを直接酸化する。その結果、DsbAのCys30とCys33は還元される。膜タンパク質DsbBはDsbAのCys30とCys33を再酸化し、活性型（酸化型）に維持する。DsbBは活性に必要なシステインを2つのペリプラズムドメインに各2個ずつ持っており、第二ペリプラズム領域のCys104-Cys130ジスルフィドがDsbAのシステインを直接酸化する。では、DsbBは何によって再酸化されるのであろうか。言い換えると、この系から放出される電子は最終的にどこにたどりつくのだろうか。本研究で、呼吸鎖電子伝達系が、DsbA/DsbBジスルフィド結合形成システムに酸化力を与えことを明らかにした。呼吸鎖電子伝達系が、DsbBに働きタンパク質の酸化的フォールディングに関わるとの全く新しい役割を持つことを示した。

まず第一に、呼吸鎖構成成分のヘムおよびキノンが、DsbAを酸化型に維持するために必要であることを示した。DsbAの酸化型と還元型を明確に見分ける方法(AMS法)を開発し、ヘムあるいはキノンの合成欠損変異株を用いて、これらの呼吸鎖成分を枯渇させた時のDsbAの状態を調べた。*hemA*あるいは*ubiA menA*変異株をプロトヘムまたはキノン欠乏状態で生育させると、細胞内のDsbAは還元型となって蓄積した。DsbBはDsbA-DsbBジスルフィド複合体を形成したまま、機能を停止した。これらのことから、DsbBがDsbAの効率的な再酸化を行うには、呼吸鎖の機能が必要であることが明らかとなった。

第二に、DsbBのCys41-Cys44が呼吸鎖成分による強力な酸化を受けていることを示した。DsbBの酸化還元状態を調べ、DsbBが2つジスルフィド結合(Cys41-Cys44, Cys104-Cys130)を持つこと、Cys104-Cys130の形成はCys41, Cys44の存在に依存していることを示した。次に、第一ペリプラズムドメインのCys41-Cys44が呼吸鎖によって強く酸化されており、還元剤DTTを加えても見かけ上還元されない性質（DTT抵抗性）を持つことを見いだした。この性質は、細胞においても、単離した標品においても見られたが、界面活性剤で膜を可溶化した時には失われた。呼吸鎖成分を欠いた膜でも、このような性質は見られなかった。また、酸素を除去した時にも、DTT抵抗性は失われた。これらのことから、DsbBのCys41-Cys44は呼吸鎖によって強く酸化されていることを明らかにした。

最後に、呼吸鎖からCys41-Cys44への酸化力の伝達機構を調べるために、DsbBの第一ペリプラズムドメインの変異株を多数作成し、それらの機能の変化を解析した。DsbBのCXXCモチーフ(Cys41XXCys44)のXXの部分を用いた他のoxidoreductaseのそれに変えたCXXCモチーフ変異体を作成したところ、DsbA酸化活性の低下とDsbA-DsbB複合体の蓄積が見られるものがあつたが、DTT抵抗性は保持していた。次に、CXXCモチーフ近辺に挿入を持つDsbB変異体を作成した。CXXCのN末端側にアミノ酸挿入を持つ変異体では野生型並に活性を示したが、CXXCモチーフのC末端側の挿入変異体では、活性が喪失し、DsbB自身も還元型となった。この領域、即ちCXXCモチーフのC末端側と膜貫通部分に挟まれた領域(Ile45-Tyr46-Glu47-Arg48)への1アミノ酸以上の挿入変異や1アミノ酸削った変異も、活性の低下とDTT抵抗性の低下を引き起こした。Ile45-Arg48のアミノ酸をそれぞれアラニンに置換してもDTT抵抗性は保持されていた。これらの結果から、呼吸鎖とのカップリングには、CXXCモチーフのC末端側と膜貫通領域との間の領域の長さが重要であるという、興味深い可能性が示唆された。

目次

第1章 序論	1
1-1. タンパク質の構造形成を補助する細胞因子	1
1-2. 細胞内のジスルフィド結合形成システム	1
1-3. 大腸菌のジスルフィド結合形成システムの発見	4
1-4. ジスルフィド結合導入因子DsbA	7
1-5. DsbA の細胞内での酸化還元状態	8
1-6. DsbB: DsbAリサイクル因子	9
1-7. 本研究で取り上げた問題点・Dsbシステムと呼吸鎖	12
第2章 結果	14
2-1. Dsbシステムと呼吸鎖	14
1. DsbAの酸化還元状態の解析方法	14
2. ヘム欠乏状態でのDsbAの酸化還元状態	16
3. ヘム欠乏状態での分泌タンパク質のSS結合形成不全	19
4. キノン欠乏状態でも DsbA は還元型で蓄積する	20
5. キノン欠損状態でも分泌タンパク質のSS結合形成不全が起こる	23
6. 呼吸鎖は、DsbAの効率的な酸化に必要である	23
7. キノン欠損状態で DsbB は機能を失う	25
8. まとめ	29
2-2. DsbBと呼吸鎖	30
1. DsbBの細胞内での状態	30
2. DsbBのどのシステインが、呼吸鎖欠損状態でDsbAとジスルフィド複合体を作るのか	32
3. DsbBのCys41-Cys44ジスルフィドはDTT抵抗性を示す	34
4. DsbBのCys41-Cys44のDTT抵抗性は呼吸鎖機能に依存している	34
5. Cys41-Cys44のDTT抵抗性には酸素が必要である	37
6. DsbBはDTTを酸化できる	38
7. まとめ	40

2-3.DsbBの変異解析	41
1. DsbBのCXXCモチーフ変異体.....	41
2. DsbBの31コドン挿入変異体.....	44
3. DsbBのCXXCモチーフC末端側領域の挿入、欠失変異.....	48
4. DsbBのCXXCモチーフのC末端側の領域のアラニン置換変異.....	51
5. まとめ.....	53
第3章 考察	55
3-1. タンパク質のレドックス状態を見る方法 AMS法	55
3-2. 呼吸鎖とDsbシステムのカップリング	55
3-3. 呼吸鎖によるDsbBの酸化.....	59
3-4. DsbB活性の生化学的解析.....	61
3-5. 呼吸鎖とのカップリングに欠損を持つDsbB変異株.....	63
3-6. 真核生物と原核生物のジスルフィド結合形成システムの比較	69
第4章 材料と方法	72
4-1. 大腸菌株	72
4-2. プラスミド	72
4-3. プライマー	74
4-4. 培地と培養条件	75
4-5. 膜の調製	76
4-6. タンパク質の酸化還元状態の決定	76
4-7. DsbB 抗体の作製と精製.....	77
4-8. DTT抵抗性のアッセイ	78
4-9. DTTを含む培地を用いたviabilityの観察.....	78
4-10. 残存チオール定量方法	78
参考文献	79
謝辞	84

第1章 序論

1-1. タンパク質の構造形成を補助する細胞因子

新しく合成されたタンパク質の立体構造を決める情報は、全てアミノ酸配列に含まれている。さらに、細胞内には、新たに合成されたタンパク質の折りたたみを補助する因子の存在が知られている。このような細胞因子は、大きく分けて、分子シャペロンと、構造変換因子に分類される(1)(2)。

分子シャペロンは、タンパク質の折りたたみ中間体に一時的に結合して、新生ポリペプチド鎖が凝集やミスフォールディング等の誤った経路へ進むことを抑え、正しい折りたたみ経路へ進みやすくする。一方、構造変換因子は、ジスルフィド結合の形成(3)(4)(5)(6)や、ペプチジル・プロリル結合の異性化(7)といった、化学結合の変化を促進することによって、タンパク質のフォールディングを促進する。

1-2. 細胞内のジスルフィド結合形成システム

タンパク質の分子内あるいは分子間の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、細胞外等の過酷な環境下でタンパク構造を保つのに重要である。ジスルフィド結合の形成と開裂は、2つのシステイン残基間の単純な酸化あるいは還元反応であり、試験管内でも適当な条件下で容易に反応を起こすことができる。古典的には、1961年にC. B. Anfinsen らによるウシ膵臓 Ribonuclease A (RNase A) の変性再生実験によって、試験管内で他のタンパク質因子の補助なしに、ジスルフィド結合の形成を伴ったタンパク質のフォールディングが起こりうることが示された(8)。つまり、ジスルフィド結合の形成は、適当な酸化還元条件下で「ひとりで」起こりうる。ところが、1963年に、同じく Anfinsen らは、試験管内では RNase A の正しいジスルフィド結合形成の効率が低いことを問題として取り上げ (RNase A はジスルフィド結合を4個含む)、細胞内にジスルフィド結合形成を補助する酵素を探したところ、動物細胞の抽出液中にジスルフィド結

合の異性化によって正しいジスルフィド結合の形成を促進する酵素 protein disulfide isomerase (PDI) の存在を見いだした(9)。その後、試験管内で精製PDIがジスルフィド結合異性化活性やシャペロン活性を有していることが示されたが、細胞内での働きについては近年まで不確かなままであった。一方、大腸菌では、近年、細胞内におけるジスルフィド結合形成に関わる因子の研究が急速に進み、複数のdisulfide bond formation factor (Dsb因子) が働いて、タンパク質内に効率よくジスルフィド結合が導入されることが明らかになった。その後、酵母等の真核細胞内でも大腸菌のDsbシステムにきわめてよく似たジスルフィド結合形成システムが備わっていることが明らかになりつつある(10)(11)。

細胞質内では？：ジスルフィド結合は、原核細胞ではペリプラズム空間で(12)、真核細胞では小胞体内腔で形成され、一般的に細胞質内では形成されない(13)。真核細胞、原核細胞を問わず、細胞質内は還元的な環境に保たれている。具体的には、チオレドキシン還元酵素とチオレドキシンからなる「チオレドキシンシステム」や、グルタチオン還元酵素、グルタレドキシンからなる「グルタレドキシンシステム」等のチオール・ジスルフィド結合交換反応モチーフ Cys-X-X-Cys を持つ酵素群の働きで、細胞質内でのタンパク質のジスルフィド結合形成は阻止されている(14)(15)(16)(17)。このような細胞質における還元力はNADPHに由来する物であり、言い換えれば細胞のエネルギー代謝によって供給されている。だが例外的に、細胞質内にもジスルフィド結合を持つタンパク質は存在する。但しそれらは構成的ではなく一時的にジスルフィド結合を形成し、ジスルフィド結合の形成、開裂で自身の酵素活性を調節している。つまり、これらのタンパク質のジスルフィド結合形成は、タンパク構造を安定化するためのものではない。例えば酸化ストレス下で働く転写因子OxyR(18)や細胞質シャペロンHsp33(19)は、通常ジスルフィド結合を持たないが、酸化ストレス下では、ジスルフィド結合を形成して活性化し、機能を発揮する(20)。しかし、ストレスが去れば、これらの因子のジスルフィド結合はチオレドキシン等により再び還元され、酵素活性は不活化する。

大腸菌のジスルフィド結合形成システム：まず、大腸菌でのジスルフィド結合形成について説明する。大腸菌では、新たに合成されたタンパク質は、ペリプラズム空間へ分泌され、ジスルフィド結合を獲得する。正しいジスルフィド結合の形成には、ペリプラズム及び細胞膜に存在する複数の Dsb 因子(3)(5)が働くことが知られている。ジスルフィド結合導入因子である DsbA (21)(22)は、ペリプラズム空間に存在する可溶性タンパク質であり、活性部位に存在するチオレドキシン様モチーフ (Cys30-X-X-Cys33) 内のジスルフィド結合を用いて、基質タンパク質のシステインを直接酸化し、ジスルフィド結合を導入する。その結果、DsbA内のジスルフィド結合は還元されDsbA自身は不活化するが、膜タンパク質であるDsbB(23)によって、再酸化・リサイクルされる。また、分泌タンパク質に誤った組み合わせのジスルフィド結合が導入された場合、DsbC(24)が働いてジスルフィド結合の掛け替えが行われ、最終的に分泌タンパク質は正しい組み合わせのジスルフィド結合を形成することができる。

真核細胞のジスルフィド結合形成システム：真核細胞では、タンパク質のジスルフィド結合形成は、小胞体内腔で起こる。小胞体(ER)内は細胞質に比べて、酸化環境であることが知られている。例えば、細胞内の主要な低分子チオール ジスルフィド化合物であるグルタチオンの還元型に対する酸化型の比 (GSSG/GSH) を細胞質とER内で比較すると、細胞質内が1/30 - 1/100 であるのに対し、ER内では 1/1 1/3 と高い(25)。そこで、これらの低分子酸化化合物が酸化力の源となって新生分泌タンパク質にジスルフィド結合を導入し、その後PDIが異性化酵素として働き、誤ったジスルフィド結合を掛け替えるのだらうと以前は考えられていた。しかし、近年、酵母でジスルフィド結合導入に必須なタンパク質性の因子Ero1p(Endoplasmic Reticulum oxidation) (26)(27)が遺伝学的解析によって発見され、真核細胞でもタンパク質性の因子がジスルフィド結合の形成に働くことが示された。その後の解析から、Ero1pは膜結合型のERタンパク質であり、PDIの活性部位のシステインを酸化してPDIを酸化型に維持していることが示された。酸化型のPDIは、基質タンパク質のジスルフィド結合の「掛け替え」ではなく、「形成」に働くと考えられる。このよ

うに、真核生物においても大腸菌で我々などによって明らかにされた機構と類似のシステムが示唆されるに至った。これについては「考察」の項で詳しく論じる。

1-3. 大腸菌のジスルフィド結合形成システムの発見

Dsb 因子の中では、まず最初にDsbAが発見された。DsbAは、2つのグループの異なる遺伝学的手法によって同時期に見いだされた。

我々のグループの神谷ら(22)は、ペリプラズムタンパク質であるアルカリ性フォスファターゼ(PhoA)の構造形成に必要な因子の分離を目的として、PhoAの酵素活性を低下させる変異(*ppfA/dsbA*)を同定した。PhoAは、ペリプラズム空間で2組のジスルフィド結合を形成し、プロテアーゼに耐性な活性構造を獲得する。しかし*dsbA*変異株中では、PhoAはジスルフィド結合を形成できず、酵素活性を発揮できない(22)(28)。この様にDsbAは*in vivo*でジスルフィド結合導入因子として機能することが示された。精製DsbAが*in vitro*でPhoAのジスルフィド結合形成を促進することも示された(29)。

同時期にBeckwithグループのBardwellらも、DsbAを発見した(21)。彼らは、膜タンパク質の膜への組み込みを補助する因子の分離を目的とし、細胞質タンパク質である β -ガラクトシダーゼを膜タンパク質MalFのペリプラズムドメインに融合したハイブリッドタンパク質を用い、 β -ガラクトシダーゼ活性を上昇させる変異として*dsbA*遺伝子を同定した。その理由は少し複雑だが、次のように考えられている。野生株中では、融合タンパク質の β -ガラクトシダーゼ部分がペリプラズム領域側に移行し、DsbAによってN末端部分のシステイン残基間にジスルフィド結合が導入され、その結果、 β -ガラクトシダーゼのN末端部分のペリプラズム局在が安定化される。膜に組み込まれている状態の β -ガラクトシダーゼは活性のある四量体構造をとることができない。しかし、*dsbA*遺伝子が欠損していると、ジスルフィド結合によるペリプラズム側での構造の安定化がないために、細胞質内で β -ガラクトシダーゼ部分のフォールディングが進行し、最終的に、細胞質側に局在して酵素活性を発揮するものと考えられる。

以上のようにして見いだされたDsbAは、PhoA以外にも、その後様々な細胞表層

タンパク質のジスルフィド結合形成に関与していることが明らかにされた。DsbAは、大腸菌の分泌タンパク質一般のジスルフィド結合形成に関わっているものと考えられる。また、*dsbA* 遺伝子は2つのプロモータを持っており、片方は細胞表層のストレス応答系である CpxA-CpxR two component system の制御下にあることが明らかになっている(30)。

Beckwith らのグループは、*dsbA* 遺伝子を発見した同様の方法で、*dsbB* 遺伝子を発見した(23)。彼らはDsbB が還元型 DsbAを再酸化してリサイクルする役割を持つことを示唆した。次に、当研究室の岸上ら、およびBeckwith研のGuilhot らによって、DsbBが自らの分子内のジスルフィド結合を用いて、直接、還元型DsbAを再酸化することが示された(31)(32)。詳しくは、後述する。

一方、Raina らのグループは、上記とは異なる遺伝学的手法からDsb 因子を同定した。彼らは、還元剤 ジチオスレイトール (DTT) を含む培地中で生育できなくなる変異株を探索し、*dsbA*、*dsbB*両遺伝子を同定した(33)。また、*dsbA* 欠損変異株、*dsbB*欠損変異株を用いて、DTTを含む培地中での生育欠損を補うマルチコピーサブレッサー遺伝子を探索し、*dsbC* 遺伝子(34)、*dsbG*遺伝子(35)を発見した。一方、*dsbA* 欠損変異株のDTT 感受性を抑制する欠損型変異の探索を行い、*dsbD* 遺伝子内に変異を見だし、*dsbD* 遺伝子を同定した(36)。このDsbDは、チトクロームCの合成に必要な因子として同定されていたDipZと同一であった(37)。

DsbA/DsbBシステムについては後に詳しく記述するので、まず、DsbC,DsbDの機能について概説する。

ジスルフィド結合異性化酵素DsbC: *dsbC* 遺伝子産物であるペリプラズムタンパク質DsbCは、Creightonらによる生化学的解析により、*in vitro* で高いジスルフィド結合異性化（掛け替え）活性を持つことが示された(38)。また、当研究室の曾根らは、*in vivo*でDsbCの役割を解明した。彼らはPhoA の変異体を用いて、DsbAによって導入されたジスルフィド結合が間違っている場合、DsbCがジスルフィド結合を掛け替え、誤りを正すことを明らかにした(24)。また最近、DsbCの結晶構造が発表された。DsbCはホモダイマーで機能するが、結晶構造よりその2量体は活性部位を両端に持

つV字型の構造を取っていた。そのヒンジ部分はbroad uncharged cleftを形成しており、基質との結合やフォールディング促進に関与するようだ(39)。DsbCホモログであるDsbG(28%のidentity, 56%のsimilarity)も同様に*in vitro*でのジスルフィド結合の異性化活性を持ち(40)、ホモダイマーで機能する。また、DsbC(41), DsbG(42) 共に*in vitro*でシャペロン活性を有していることも報告されている。

DsbC, DsbG, チトクロームC等のジスルフィド結合を還元する酵素DsbD:

DsbDは、細胞質からペリプラズム空間へ還元力を提供する膜タンパク質である。DsbD(DipZ) はペリプラズムタンパク質チトクロームCの成熟に必須であり、チトクロームCのヘム結合部位のシステインをヘムと結合できるよう還元状態に保っている。また、DsbDは、DsbC(43)(44)、DsbGも基質としており、これらの酵素の活性部位を還元状態に保っている(40)。ジスルフィド異性化酵素が異性化活性をもつためには、活性部位のシステインが還元されていなければならない、DsbDの還元作用はDsbC, DsbGのジスルフィド異性化活性に必須である。DsbDの持つ還元力は、細胞質内のレドックス環境を調節している機構の1つであるチオレドキシンシステムに依存しており細胞質内のNADPHから供給される(45)(44)。この還元力は8回膜貫通領域を持つDsbDによって、細胞質内からペリプラズムへと膜を横切って供給される。還元力の伝達機構については議論があったが、近年、DsbD全域にわたって存在する保存された6つのシステインによって受け渡されるとの説がいくつかのグループから提唱されていた(46)(47)(48)。最近、BeckwithらおよびMissiakasらの2つのグループによって、その説は実証された(49)(50)。DsbDは機能に必要なシステインを、N末端ペリプラズムドメインに2つ(Cys103, Cys109)、第一膜貫通部位に一つ(Cys163)、第四膜貫通部位に一つ(Cys285)、C末端ペリプラズムドメインに2つ(Cys461, Cys464)持っている。BeckwithらはNおよびC末端ドメイン、膜貫通ドメインをそれぞれ分割して共発現させてもDsbD活性が見られることに気づき、これらのシステイン間のジスルフィド結合の授受反応を調べた。一方、Missiakasらは、DsbDの基質であるチオレドキシン (TrxA in 細胞質)、DsbC (in ペリプラズム) のCys→Ser置換変異体と、DsbDのCys→Ser置換変異体を組み合わせて、DsbDのCys285とTrxA、DsbDのCys103とDsbCがジスルフィド中間体を形成することを示した。即ち、これら二つの

グループの結果から、電子は細胞質のチオレドキシンから、TrxA→DsbD[Cys163-Cys285]→DsbD[Cys461-Cys464]→DsbD[Cys103-Cys109]→DsbCと、ペリプラズム領域のDsbCまで伝達されることが明らかにされた(図1)。

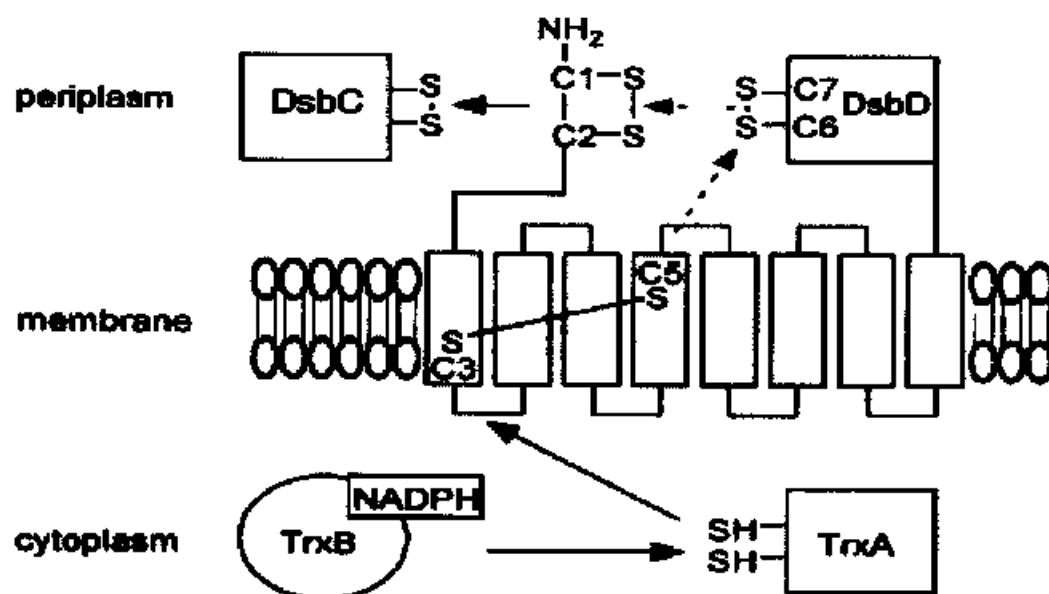


図1 DsbDによって触媒される膜を横切った電子授受

矢印は電子の流れを示している。

チオレドキシン還元酵素(TrxB)によって還元されたチオレドキシン(TrxA)はDsbDのCys163(C3)-Cys285(C5)を還元し、与えられた電子はDsbDのCys461(C6)-Cys464(C7)を経由して、DsbDのCys103(C1)-Cys109(C2)へ受け取られる。その後、DsbCのジスルフィド結合を還元する。

Krupp, R. et al.(2000) J. Biol. Chem (in press)より抜粋(50)

1-4. ジスルフィド結合導入因子DsbA

DsbAは、21kDaの可溶性ペリプラズムタンパク質であり、チオレドキシン等多くの酸化還元酵素に共通に存在するモチーフCys-X-X-Cys(Cys30-Pro-His-Cys33)を活性部位にもつ。DsbAのX線結晶解析は1993年に発表されており、DsbAはチオレドキシンと一次配列上は相同性が低いにもかかわらず、立体構造ではチオレドキシンに類似していることが明らかとなった(51)。DsbAはチオレドキシンに似たチオレドキシンドメインと、数本の α ヘリックスからなるキャップドメインから成っており、活性部位は二つのドメイン間に形成されるhydrophobic grooveの中に位置している。

DsbAはこの疎水性のポケットで新生分泌タンパク質と相互作用し、ジスルフィド結合の導入を行っていると考えられる。DsbAは、生化学研究者の格好の研究対象となり、*in vitro*で詳細な研究が行われた。まず、精製DsbAが試験管内で様々な基質(PhoA(29)、hirudin(52)、RNase A(29)(52)、Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor(53)、mutant lysozyme (54))のジスルフィド結合形成を促進することが示された。DsbAの活性部位に形成されるジスルフィド結合は、通常のタンパク質のジスルフィド結合に比べて 10^3 倍高い反応性を持つことが明らかにされた(55)。また、DsbAの活性部位のシステイン残基の反応性を示すpKaと、酸化還元電位、そしてDsbAの熱力学安定性が調べられた(56)(57)(58)(59)。DsbAの活性部位のCys30のpKaは、約3.5と(通常のタンパク質分子中の平均値8.6に比べて)極端に低く、反応性の高いチオレートアニオンになりやすい(56)。また、DsbAの酸化還元電位は-124mVであり、PDI(-175mV)、チオレドキシン(-270mV)、グルタチオン(Glu-Cys-Gly; -240mV)(60)、システイン(-220mV)、DTT(-330mV)(58)に比べて非常に高く、DsbAの強い酸化力を示している(57)。さらに、熱力学的安定性では、DsbAは還元型の方が酸化型よりも22.7 kJ/mol安定であった(58)。つまり、DsbAは、自身が還元されやすく、基質を酸化しやすい性質、即ち、基質から電子を奪いやすい性質を持つ。このようなDsbAの強い酸化力には、活性部位CXXCモチーフの内部のXX配列、すなわちPro-His配列が寄与していることが明らかとなっている(59)。

1-5. DsbAの細胞内での酸化還元状態

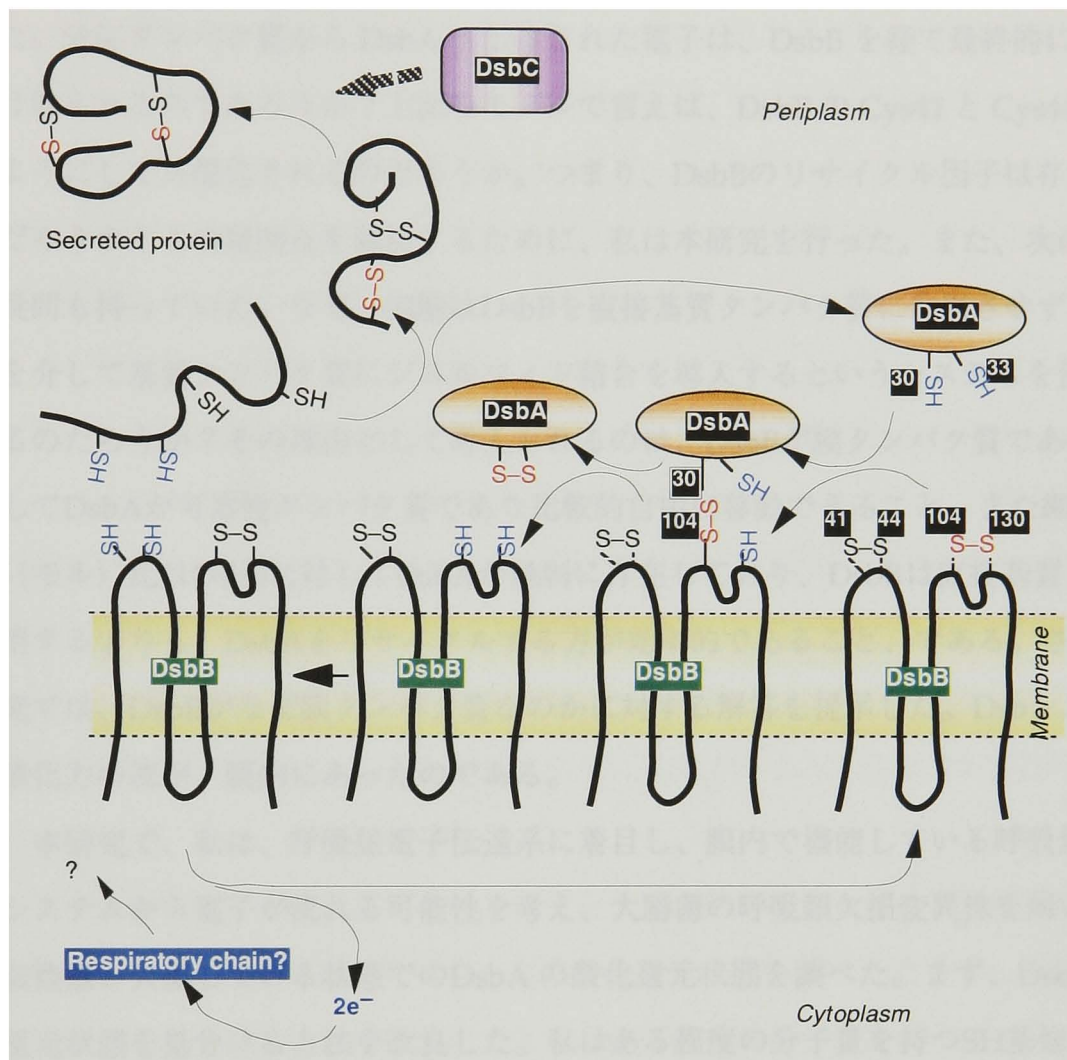
DsbA自身は還元型の方が安定であるという性質をもつが、細胞内ではどのような状態をとっているのだろうか。以前、細胞内のDsbAは、還元型と酸化型が混在した状態にあるとの報告があったが、当研究室の岸上らは、この結果は細胞破碎後に人工的な還元反応が起こったために生じた誤りであることを示し、DsbAが野生株細胞内でほぼ全て酸化型に保たれていることを明らかにした(61)。岸上らは、トリクロロ酢酸(TCA)で細胞の全タンパク質を変性状態にした後、SDS溶液に溶解すると同時にSH基修飾試薬(ヨードアセトアミド; IAA)でフリーのシステインのSH基をブロックして実験操作中の人工的な酸化を防ぎ、その後、非還元状態でのSDS-

PAGE, ウェスタンブロッティングで見分ける方法を用いた。この方法では、TCA処理によって全てのタンパク質を変性するため、様々な他の因子（例えばDsbAが*in vivo*では出会うことのない細胞質酵素など）も全て失活しているので、他の因子によるアーティファクトが起こりようがない。また、TCAは強酸であるためTCA処理下でSH基は安定であり人工的な酸化還元は受けない。非還元状態でSDS-PAGEを行うと、分子内ジスルフィド結合を持つタンパク質は、分子の形状による効果で移動度が大きくなる。以上の手法を用いてDsbAのレドックス状態を調べ、DsbA自体の単独の性質としては還元型の方が安定なのにもかかわらず、細胞内ではほとんど全てのDsbAが酸化型に保持されていることが明らかにされた。つまり、DsbAは分泌タンパク質に作用し還元されるが、細胞内では効率的に再酸化されていると考えられる。*dsbB*欠損変異株中ではDsbAが全て還元型として存在することから、DsbAの酸化は膜タンパク質であるDsbBの働きによることが示された。

1-6. DsbB: DsbAリサイクル因子

次にDsbBの機能解析が行われた。野生株中でDsbAは全て酸化型に保たれているが、*dsbB*欠損変異株中でDsbAの全てが還元型で蓄積することが示され(23)(61)、DsbBがDsbAの再酸化・リサイクル因子であることが示唆された。次いで、DsbBはDsbAと直接システインを介して相互作用することが示された(31)(32)。DsbBは、膜を4回貫通している20 kDaの膜タンパク質であり、その機能に必要なシステインを4つ(Cys41, Cys44, Cys104, Cys130)もっている。それらはいずれもペリプラズム側に配置しており(62)、前者の2つはチオレドキシン様モチーフ(Cys41-Val-Leu-Cys44)を形成している。岸上らは、DsbAの活性部位(Cys30-Cys33)のCys33をセリンに変換した変異体DsbA[C33S]を細胞内で発現させると、DsbAとDsbBがジスルフィド結合を介した複合体を形成すること、また、DsbA[C30S]ではこのような複合体を形成しないことから、DsbAはCys30を使ってDsbBとジスルフィド結合を作ることを示した。DsbA[C33S]-DsbBジスルフィド複合体は、DsbAのCys33が存在しないためにDsbA-DsbB間のジスルフィド結合が開裂できず、蓄積した結果、検出されたのだろう。この複合体は野生型DsbAにおいてもDsbBによる酸化反応の中間体として

形成されと考えられる。しかし、分子間ジスルフィド結合はすみやかに開裂し、DsbAはジスルフィド結合を獲得する。次に、岸上らはDsbBのどのシステインとDsbAのCys30が結合するのかわかるとするために、DsbBの活性部位の各システイン残基をセリンに変換した変異体DsbB (DsbB[C41S]、DsbB[C44S]、DsbB[C104]、DsbB[C130S])を作成し、DsbA[C33S]との複合体形成能を調べた。すると、DsbB[C104S]のみが細胞内で複合体を形成しなかった。このことから、DsbAのCys30は、DsbBのCys104と直接結合することが示された。また岸上らは、DsbBおよびその変異体を用いてDsbBの細胞内での酸化還元状態を調べ、DsbBが野生株細胞内でも*dsbA*欠損株細胞内でも酸化型として存在し、少なくとも一組のジスルフィド結合を持っていることを示した(63)。従って、DsbBの活性部位のジスルフィド結合は、一般のタンパク質とは異なり、DsbA以外の何者かが働いて導入されていることが予測された。(むしろDsbAが多いと、DsbBは還元されており、DsbAはDsbBの酸化基質であると考えられた。) また、変異体DsbB[C44S]内では、残存しているCys41とCys104またはCys130との間で異常なジスルフィドをつくることが示された。以上の結果から、DsbBの分子内では、バケツリレーのようにCys41, Cys44から、Cys104, Cys130へとジスルフィド結合の転移(分子内酸化還元反応)が起こっている可能性が示唆された。以上のような実験結果に基づき、我々の研究室では、次のモデルを提案した。DsbBはC末端側のCys104-Cys130を使って、DsbAを直接酸化する。その結果還元されたCys104、Cys130を、N末端側のCys41-Cys44が再酸化する。つまり、電子は次のように流れると考えられる。分泌タンパク質→DsbA→DsbB(Cys104-Cys130)→DsbB(Cys41-Cys44)(図2)。



A model for the disulfide bond formation cascade in *E. coli*

図 2 DsbA/DsbBジスルフィド結合形成システムとDsbCによる異性化

1-7. 本研究で取り上げた問題点：Dsbシステムと呼吸鎖

しかし何がこの系に全体的な酸化力を与えるのかは、全く明らかになっていなかった。分泌タンパク質から DsbA へ伝達された電子は、DsbB を経て最終的に何に受け取られるのであろうか？上記のモデルで言えば、DsbB の Cys41 と Cys44 はどのようにして再酸化されるのだろうか。つまり、DsbB のリサイクル因子は存在するのだろうか？この疑問点を解決するために、私は本研究を行った。また、次のような疑問も持っていた。なぜ、細胞は DsbB を直接基質タンパク質に作用させず、DsbA を介して基質タンパク質にジスルフィド結合を導入するというシステムを使っているのだろうか？その理由として考えられるのは、DsbB が膜タンパク質であるのに対して DsbA が可溶性タンパク質であり比較的自由に移動できること、また細胞内の量（モル）比は DsbB に対して DsbA が過剰に存在しており、DsbB は直接基質と相互作用するよりも、DsbA をリサイクルする方が効率的であること、である。さらに本研究では、DsbB がなぜ膜タンパク質なのかに対する解答を提示した。Dsb システムの酸化力の源が、膜内にあったのである。

本研究で、私は、呼吸鎖電子伝達系に着目し、膜内で機能している呼吸鎖に Dsb システムから電子が流れる可能性を考え、大腸菌の呼吸鎖欠損変異株を用いて呼吸鎖機能が欠損している状態での DsbA の酸化還元状態を調べた。まず、DsbA の酸化還元状態を見分ける方法を改良した。私はある程度の分子量を持つ SH 基修飾試薬 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonate (AMS) を用い、還元型の分子量を増加させることによって、SDS-PAGE により酸化型と還元型を明確に見分ける方法を開発した。そして、この方法を用いて、呼吸鎖機能欠損状態の細胞では、本来酸化型に維持されている DsbA が還元型で蓄積すること、分泌タンパク質のジスルフィド結合形成不全が起こること、また、DsbB は、DsbA とジスルフィド複合体を形成して機能を失うことを示した。この結果により、私は、呼吸鎖電子伝達系の機能が、分泌タンパク質のジスルフィド結合形成に関与しているという事実を初めて明らかにした(64)。その後、DsbB の酸化還元状態を AMS 法を用いて詳しく調べ、DsbB が通常 2 つジスルフィド結合を形成していること、第二ペリプラズムドメインの

Cys104-Cys130のジスルフィド結合形成は、第一ペリプラズムドメインにある Cys41-Cys44の存在に依存していることをみいだした。最終的に、Cys41-Cys44は呼吸鎖によって強く酸化されていることを明らかにした(65)。DsbBのCys41-Cys44は見かけ上還元剤DTTによる還元を受けないが、この性質は呼吸鎖機能と酸素の存在に依存していることから、呼吸鎖はDsbBのCys41-Cys44を強く酸化していることを示した。以上の我々の発表の後、Bardwell グループの Bader らは、DsbBによる DsbAの酸化反応を*in vitro*でアッセイし(66)、*in vitro*で呼吸鎖キノン、精製DsbBによって精製DsbAが酸化されること(67)、この系に基質タンパク質が共存すると、基質タンパク質のジスルフィド結合形成が進行することを示した(68)。このように、Dsbシステムへの呼吸鎖の関与が我々のグループによって初めて明らかにされ、次いで Bardwell グループによりキノンの直接関与が示された。次に我々は、呼吸鎖キノンがどのようにしてDsbBを酸化するか、その作用機構の解明を目指し、DsbBの変異体を多数作成、呼吸鎖とのカップリングが上手くいかないために還元型として蓄積するDsbB変異体を初めて分離した。そしてCXXCモチーフのC末端側と膜貫通領域との間の距離が呼吸鎖キノンとの相互作用に重要であるというモデルを提唱した(69)。

以上の結果より、私は本研究で、ジスルフィド結合形成システムに呼吸鎖が関与していることを初めて明らかにし、酸素からの酸化力は呼吸鎖を介し、呼吸鎖キノン→DsbB(Cys41-Cys44)→DsbB(Cys104-Cys130)→DsbA→分泌タンパク質へと伝達されることを見いだした。また、変異体解析でDsbBが呼吸鎖キノンから酸化力を受け取るために重要な領域を同定した。本研究は、タンパク質フォールディングの1反応に細胞の基本的メタボリズムが直接カップルしているという興味深い事実を初めて明らかにしたものである。

第2章 結果

2-1. Dsbシステムと呼吸鎖

DsbA/DsbBジスルフィド結合形成システムが恒常的に機能するために、この系に全体的な酸化力を与え、この系から放出される電子を受け取る機構が存在するはずである。私は、この機構に呼吸鎖が関与する可能性を調べるため、呼吸鎖の変異株を用い、呼吸鎖機能が欠損した状態でDsbA/DsbBシステムが正常に働くかどうかを調べた。

1.DsbAの酸化還元状態の解析方法

まず最初に、私はDsbAの酸化還元状態を見る方法を改良した。以前はDsbAの酸化型、還元型を見分けるために、主に次の二つの方法が用いられていた。一つはシステインのSH基をヨード酢酸で修飾し、電気泳動を行ってヨード酢酸に由来する電荷の変化で、修飾された分子（還元型）とされなかった分子（酸化型）を見分ける方法(55)、もう一つは、ジスルフィド結合によるポリペプチド鎖の拘束に由来するSDS-PAGEの移動度の違いで見分けるものである。後者の方法の場合、SH基修飾試薬ヨードアセトアミド(LAA)でフリーのシステインをブロックして人工的な酸化を防ぎ、還元剤を加えない非還元状態でSDS-PAGEを行う(70)。これらの方法は精製DsbAの酸化型、還元型を見分ける方法として有効であるが、細胞内のDsbAの状態を調べるには、もう一工夫必要である。Bardwellらは、細胞からペリプラズム分画を調製後、上記のヨード酢酸を用いたアッセイを行い、DsbAは細胞内で酸化型と還元型が混在していると発表した。一方、当研究室の岸上らは、彼らの方法ではペリプラズム分画調製時にDsbAが人工的な還元を受けてしまうため、DsbAの酸化還元状態を正確に調べるには、細胞を直接TCA(トリクロロ酢酸)で処理し、全タンパク質を変性・沈殿させる必要があることを示した(61)。この方法のポイントは、すべてのタンパク質を細胞内の酸化還元状態のまま変性させることと、TCA（強酸性）中

ではシステインのSH基は安定であり、人工的な酸化還元は起こらないことである。岸上らは、TCA 沈殿後、全タンパク質をIAAを含む SDS 溶液に溶かし非還元状態の SDS-PAGEを行う方法で、DsbAが細胞内では全て酸化型に保たれていることを明らかにした(61)。しかし、この方法にもDsbAの酸化型・還元型の移動度の差は微妙であるという欠点があったため、より明確に両者を区別する方法の開発が望まれた。

私は、森博幸博士(当時東京薬大、現在本研究室助手)のセミナー講演の中に、SH 基修飾試薬である 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonate (AMS(71)) によるシステインのSH基の修飾が、SDS-PAGEにおけるタンパク質の移動度を大幅に遅らせることを示すデータが含まれているのに気づき(72)、この方法を、DsbA の酸化型・還元型の分離に適用した。AMSは536Daの分子量を持つため、フリーのシステインを2つ持つDsbAの還元型は約1kDa分の移動度の遅れが見られるだろうと予想された。結果をFig.1に示す。まず、精製DsbA (酸化型)を用いて、未処理のもの(lane 1)、還元剤DTTでジスルフィド結合を還元しTCA沈殿でDTTを除去した後、AMSを含むSDS溶液に溶かしたもの(lane2)、またDTT処理後IAAを含むSDS溶液に溶かしたもの(lane3)を、非還元状態のSDS-PAGEにかけた。その結果、AMS処理をするとDsbAの移動度は確実に遅くなっており、IAAよりも明確に、未処理の物(酸化型, lane1)と区別できた。次に、AMSを用いた方法で、*in vivo*でのDsbAの酸化還元状態を調べた。まず、野生株、*dsbB*欠損変異株をlog-phaseまで培養し、培養液に氷冷TCAを加えて全タンパク質を変性・沈殿させ、アセトン洗浄後、AMSを含むSDS溶液に溶かし、非還元状態のSDS-PAGEを行った。すると、野生株中、DsbAは、全てが酸化型として存在している(lane 4)のに対し、*dsbB*欠損変異株中、全てが還元型として蓄積している(lane 5)ことがクリアーに示され、以前の岸上らの結果に一致した。以上のように、私は、AMSをSH 基修飾試薬に用いることで、*in vivo*でのDsbAの酸化還元状態を、より明確に区別する方法を確立した。以後、このAMSを用いた方法で実験を行った。

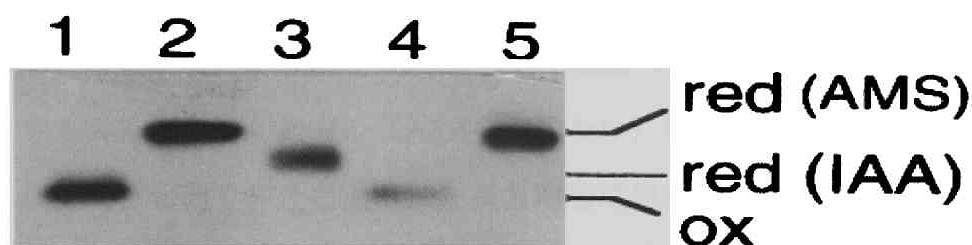


Fig. 1. DsbA の酸化型と還元型の分離

lanes 1-3 は、精製したDsbA（酸化型）を用い、何も処理をしなかったもの（lane 1）と、17 mM の DTT で 37 ℃、10 min 処理をした後、TCA 沈殿、アセトン洗浄を行い、SH 基修飾試薬を含む SDS 溶液に溶かし（lanes 2, 3）、非還元状態での SDS-PAGE を行った。SH 基修飾試薬として、lane 2 は AMS (15 mM) を、lane 3 は IAA (35mM) を用いた。1-3 の各 lane におよそ 500ng の DsbA を使用した。lane 4, 5 は、培養液を直接 TCA で処理し、アセトン洗浄を行った後、AMS (15 mM) を含む SDS 溶液に溶かし、非還元状態の SDS-PAGE を行った。lane 4 は、野生株 (CU141)、lane 5 は *dsbB* 欠損変異株 (SS141; CU141 *dsbB::kan5*) における DsbA を表す。バンドは DsbA 抗体を用いたウエスタンブロットティングにより検出した。

2. ヘム欠乏状態でのDsbAの酸化還元状態

次に、呼吸鎖欠損変異株中でのDsbAの酸化還元状態を見ようと試みた。呼吸鎖に欠損を持つ変異株として、呼吸鎖構成成分のヘムを欠損している*hemA* 変異株を選び、細胞内のDsbAの酸化還元状態を調べた。ヘムの生合成経路に欠損を持つ*hemA* 変異株 (*hemA::kan*) (73) は、ヘム生合成の初期過程に働く*hemA* 遺伝子産物 glutamyl-tRNA reductase を欠損しており、生合成経路の中間体 5-aminolevulinic acid (ALA) を合成できない(74)(75)。しかし、その欠損は培地に ALA を添加すると補われる。

私は、ヘムを枯渇させたときの細胞内のDsbAの状態を見ようと試みた。まず ALA, グルコースを含む L-培地中で *hemA* 変異株を培養し、遠心にて集菌後、ALA を含まない培地に懸濁する操作 (wash) を 2 回行い ALA を取り除いた後、ALA を含まない培地中で培養した。呼吸鎖が機能しないときでも、大腸菌は解糖系の代謝機能によりグルコースをエネルギー源として生育できる。*hemA* 変異株は、ALA を取

り除いたL培地中でもグルコースを添加していれば生育できるはずであるが、wash操作後、増殖を停止した。この濁度はstationally phase（静止期）には程遠かった。増殖を停止した大腸菌を同じ組成の（ALAを含まない）新しい培地に植え直すと、再び増殖し、先ほどと同じ程度の濁度になると増殖は停止した。DsbAの状態は、回目の増殖時にはすべて酸化型であったが、二回目の増殖時には大部分が還元型で蓄積し(Fig.2 パネルA, lane 1 (AMS), lane 3(IAA))、生育が停止すると再び酸化型となった(パネルA, lane 2 (AMS))。増殖停止時の培養液のpHを調べると、pHは5以下にまで低下しており、最初の増殖停止は予想されたヘムの欠損のためではなく、グルコースの発酵で生じた酸による培地の酸性化のためはないかと考えられた。そこで、培地にリン酸緩衝液(pH 7.5)、またはHEPES緩衝液(pH 7.5)を加え培地の酸性化を防ぐと、ALA除去後でも細胞はゆっくりと増殖を続け、静止期の濁度にまで達した。これらの細胞内のDsbAの状態をモニターしたところ、ALA除去後、DsbAは全て酸化型であったが、約7時間後頃から次第に還元型が蓄積してゆき、8時間後頃には90%以上が還元型となった(パネルA, lanes 5-7)。そのまま培養を続け、静止期に入ると、DsbAは再び酸化型となった。

DsbAの還元型が蓄積してる状態の細胞に、ALAを添加すると、DsbAは酸化状態に移行していった(Fig.2 パネルB, 上部)。DsbAの還元型から酸化型への移行は、ALAを加えてから10-20分の間に完了した(パネルB, 上部, lanes 1-5)。lane 6は、ALAの代わりに水を加えたコントロールである。また、ALAを加えるとゆっくりだった細胞の生育速度が速くなった。ALAがヘムの生合成に使われ、呼吸鎖機能が回復したと考えられる。

ところで、ALAから合成される最終産物にはprotohemeとsirohemeがあり、呼吸鎖末端酵素であるチトクローム類には、protohemeが使用されている。(sirohemeは嫌気状態で働く酵素sulfite reductaseの補欠分子族である。)そこで、protoheme(hemin chloride)を添加しその効果を調べた。この実験のため、ヘムの透過性を増加させる変異*hemP*を持つ二重変異株(*hemA hemP*)を用いた(Fig.2 パネルB, 下部, lanes 1-6)。lane 6は、コントロールである。すると、hemin chlorideの添加後、還元型で蓄積していたDsbAは、速やかに酸化型に移行した(Fig.2 パネルB,

下部, lanes 1-5)。添加後の酸化型への移行速度は、ALA を添加したときよりもいくぶん速かった。この結果より、DsbA を酸化型に変換するには、protoheme が必要であることが示された。

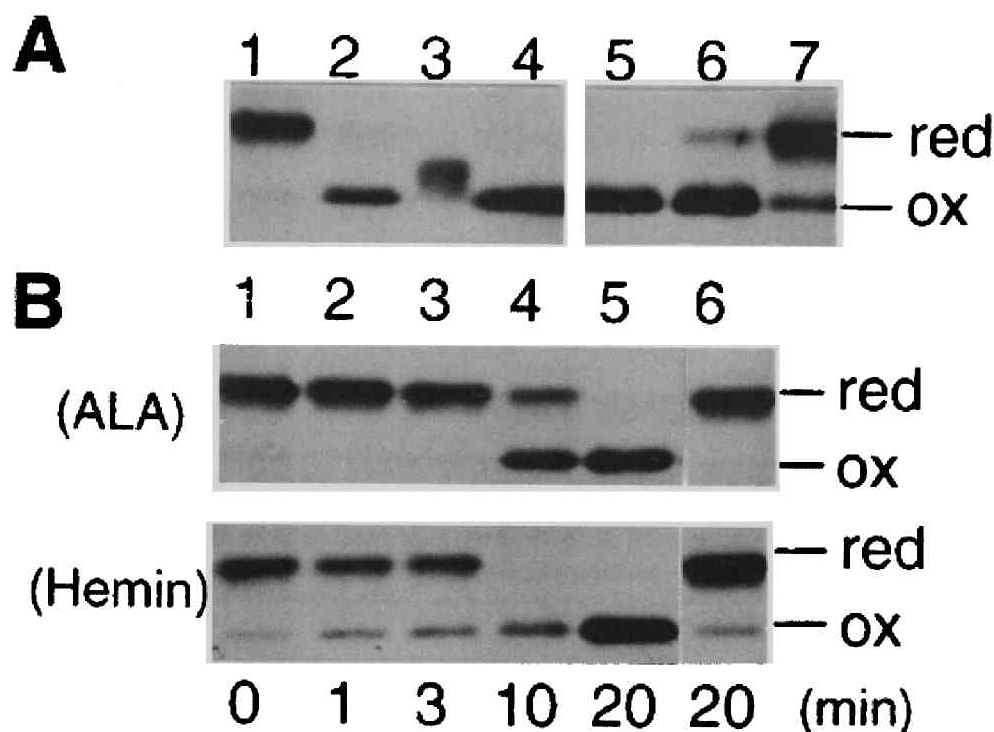


Fig. 2. プロトヘム欠損状態で生育している細胞内のDsbAの酸化還元状態

(パネルA) ヘム欠損変異株中でのDsbA の還元型の蓄積

hemA 欠損変異株である H500 (LE392 *hemA::kan*; lanes 1-3) と野生株 (LE392; lane 4) を用い、ALA を含まない L-グルコース培地で一回植えついで後、2 回目の増殖中 (lanes 1, 3, 4) あるいは増殖停止後 (lane 2) の細胞内のDsbA を示す。lane 3 では、SH 基修飾試薬に IAA を用い、それ以外には AMS を用いている。また、lanes 5-7 は H500 株をリン酸緩衝液 (pH 7.5) を添加したALA を含まないL-グルコース培地で培養したものであり、wash 後、370min (lane 5)、420min (lane 6)、490min (lane 7) 経過した細胞をTCA 沈澱し、AMS 処理を行った。

(パネルB) ALA, hemin を添加すると還元型 DsbA は酸化型へ移行する

上部のパネルでは H500 株を、下部のパネルでは hemin 透過性のH500 株 (H500 *hemP*) を用い、ALAを含まない培地で生育させた培養液に ALA (上部パネル lanes 1-5)、もしくは hemin (下部パネル lanes 1-5) を添加した。添加後、0min (lane 1)、1min (lane 2)、3min (lane 3)、10min (lane 4)、20min (lane 5) にサンプリングを行った。また、lane 6 は水を添加したコントロールであり、20min 後にサンプリングを行った。これらの全てのサンプルには、AMS処理を行っている。

3. ヘム欠乏状態での分泌タンパク質のSS結合形成不全

プロトヘム欠損状態で DsbA は、還元型つまり不活性状態で蓄積した。すると、ヘム欠損状態では DsbA による分泌タンパク質のジスルフィド結合形成が起こらないと予想される。そこで、分泌タンパク質であり ジスルフィド結合を1つもつ β -ラクタマーゼのジスルフィド結合形成を調べた。 β -ラクタマーゼはジスルフィド結合がなくても安定な構造を維持できることが知られており、分泌タンパク質内のジスルフィド結合形成を調べるのに適している(76)。*hemA* 変異株に、*bla* 遺伝子を持つプラスミドを導入し、プラスミドから β -ラクタマーゼを発現させた。ALA 除去後、12時間後には β -ラクタマーゼの約50%が還元型で存在し (Fig. 3, lane 4)、24時間後ではほぼ全ての β -ラクタマーゼが還元型で蓄積していた (lane 5)。つまり、ヘム欠損状態で長時間細胞を増殖させると、 β -ラクタマーゼのジスルフィド結合形成不全が起こることが明らかとなった (lane 2-5)。一方、野生株中では、通常通りにジスルフィド結合が形成されていた (lane 1)。このように、ヘムが欠損していると分泌タンパク質のジスルフィド結合形成が不全になる。つまり、ヘムは、DsbA による分泌タンパク質のジスルフィド結合形成に必須であることが明らかになった。



Fig. 3. ヘム欠損状態では β -ラクタマーゼのジスルフィド結合形成不全が起こる

野生株 (LE392; lane 1)、*hemA* 欠損変異株 (H500; lanes 2-5) に β -ラクタマーゼを発現するプラスミド (pSS1) を導入し、リン酸緩衝液 (pH 7.5) を添加したALA を含まない L-グルコース培地中で、wash 後、8時間 (lane 1)、0時間 (lane 2)、6時間 (lane 3)、12時間 (lane 4)、24時間 (lane 5) 生育させた。この間、適宜 dilution を行っている。各サンプルは、IAA で処理した後、非還元状態の SDS-PAGE を行い、ウエスタンブロッティングにより検出した。

4. キノン欠乏状態でも DsbA は還元型で蓄積する

次に、他の呼吸鎖欠損変異株でも同様の現象が見られるのかを調べるため、私は呼吸鎖キノンの変異株を用いた。大腸菌呼吸鎖の末端酸化酵素は、キノール酸化酵素であり、好気的狀態で生育している大腸菌内では、最終的にキノールから酸素に電子が受け渡される。その結果生じるキノンは、クエン酸回路から生成するNADHやコハク酸から、膜表在性 内在性の脱水素酵素を介して電子を受け取り、キノールとなる。このように、呼吸鎖キノンは呼吸鎖の脱水素酵素と末端酸化還元酵素の間の電子伝達を媒介している。また、大腸菌の呼吸鎖キノンにはユビキノンとメナキノンが存在し、好氣的に生育している状態ではユビキノンが、嫌氣的に生育している状態や、静止状態では、メナキノンが優先的に使用される(77)。

まず、ユビキノンの生合成に欠損を持つ*ubiA*変異株を用いて、好氣的に生育している大腸菌内のDsbAの状態を調べたが、DsbAの還元型の蓄積はわずかであり (data not shown)、また、*menA* 変異株 (*ubi*⁺) では、DsbAの還元型は全く見られなかった (data not shown)。そこで両キノンは相補的に働くのかもしれないと考え、ユビキノン・メナキノンの両方を欠損している二重変異株を用いることにした。

ユビキノン、メナキノンの生合成系に欠損を持つ *ubiA420 menA* 二重変異株(77)を用いた。*ubiA 420* 変異は、*ubiA* 遺伝子産物 (PHB octaprenyltransferase) の基質 p-hydroxybenzoate (PHB) に対する *K_m* 変異であり、基質との親和性を減少させる(78)。その結果、通常細胞内に存在する程度の濃度の PHB からは、ユビキノンを合成できない。しかし、PHB が過剰に存在すると活性を発揮できるため、培地に PHB を添加することによってユビキノン合成欠損を補うことができる(78)。

キノンを枯渇させたときの状態を調べたいので、PHBを取り除く操作を行って、その後のDsbAの状態を調べた。まず、PHBを添加した培地中で培養後、wash 操作によってPHBを取り除き、PHBを含まない培地中で培養を行った。また、培地中には、エネルギー源としてグルコースを、そして培養液を中性付近に保つためリン酸緩衝液を加えた。すると、wash 後2時間は野生株と同様の速度で増殖したが、さらに生育させると、おそらくキノンの欠乏に伴って、生育速度が遅くなった (Fig. 4パ

ネルA)。この第二の生育速度に入る頃(約3時間後)から DsbA の還元型が現れ始め (Fig. 4 パネルB, lane 3)、PHB 除去から 1 2 時間後には、全ての DsbA は還元型として蓄積した (Fig. 4 パネルB, lane 6)。isogenic な *ubi⁺ men⁺* 株中では DsbA は常に酸化型に保たれていた (Fig. 4 パネルB, lanes a, b)。

DsbA が還元型で蓄積している状態の *ubiA menA* 変異株に、PHB を加えユビキノン合成を再開させたところ、蓄積していた還元型DsbA が再び酸化型へと変換した (Fig.4 パネルC, lanes 1-5)。lane 6 は、PHB を溶かしている溶媒 (EtOH) を加えたコントロールである。このように、両キノンを欠乏させるとDsbAは還元型で蓄積した。ヘムばかりでなく、キノンも、細胞内でDsbAを酸化型に維持するために必要であることが明らかとなった。

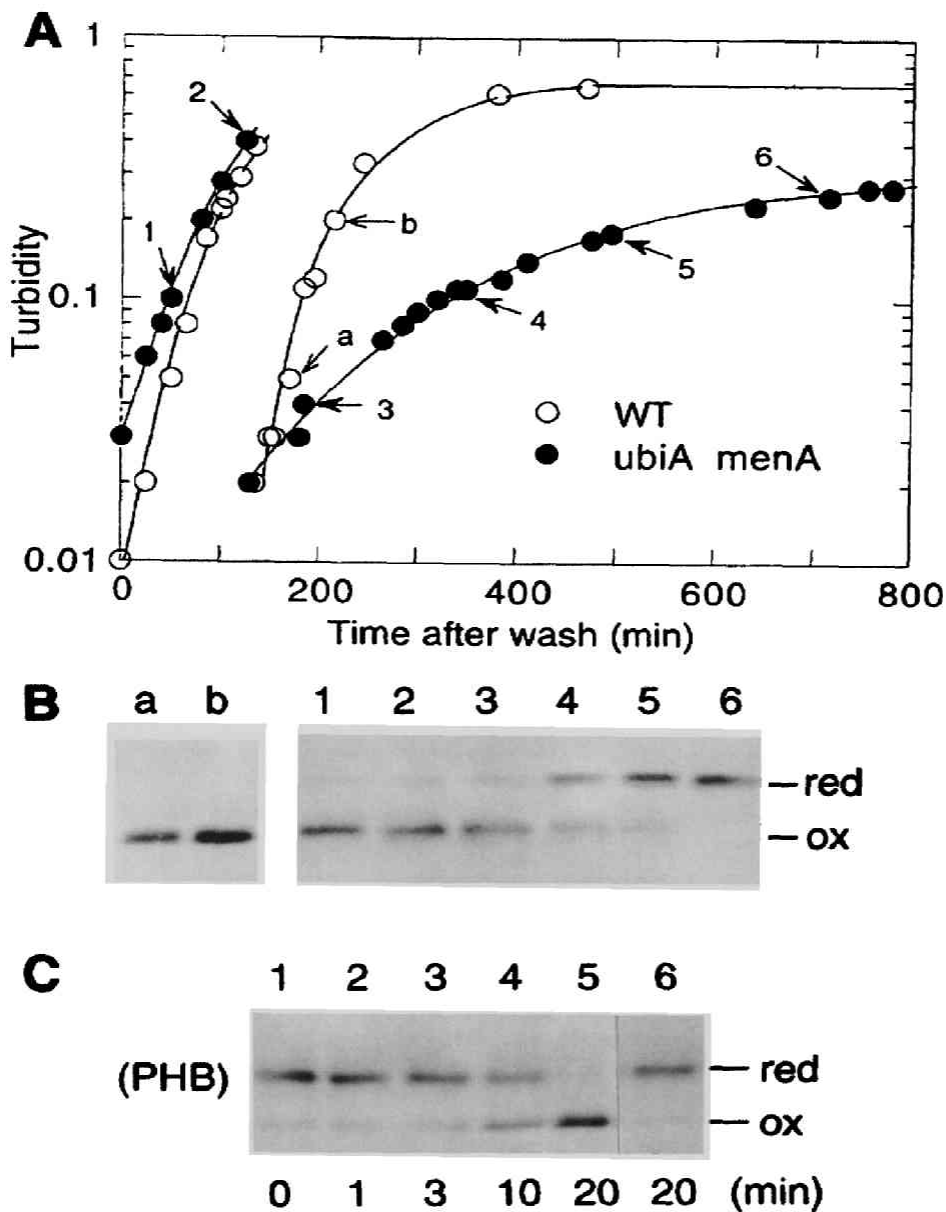


Fig. 4. DsbA はユビキノン、メナキノン欠損状態でも還元型で蓄積する

(パネルA) 野生株 (AN387)、*ubiA menA* 変異株 (AN384; AN387 *ubiA420 menA401*) の増殖曲線。PHBを含むリン酸緩衝液を添加したL-グルコース培地であらかじめ生育させたAN387株(○)、AN384株(●)を、wash操作の後、PHBを含まない培地中で増殖させた増殖曲線である。縦軸は培養液の濁度を、横軸はwash操作後の経過時間を表している。約2時間でdilutionを行った。

(パネルB) DsbAの還元型の蓄積 各サンプルの番号は、(A)のパネルの矢印の番号と一致しており、各矢印の示す時点でサンプリングを行った。lanes a, bはAN387株、lanes 1-6はAN384株を示す。全てのサンプルは、TCA処理後、AMSで処理し非還元状態でSDS-PAGEを行った。

(パネルC) PHBを添加すると、蓄積していた還元型DsbAは再び酸化される パネル(A)の矢印4の状態のAN384株の培養液に、PHBを添加した。添加後、0min (

lane 1)、1min (lane 2)、3min (lane 3)、10min (lane 4)、20min (lane 5) でサンプリングを行った。また、lane 6 は、今回使用した PHB 溶液の溶媒 EtOH を添加したコントロールであり、添加後 20min (lane 6) でサンプリングを行った。全てのサンプルは、AMS で処理している。

5. キノン欠損状態でも分泌タンパク質のSS結合形成不全が起こる

次に *ubiA menA* 変異株内での分泌タンパク質のジスルフィド結合形成を見た。*hemA* 変異株の時と同様、プラスミドより β -ラクタマーゼを発現させ、PHB を取り除いた培地中で生育を続けた。すると、PHB を除去後、12 時間で β -ラクタマーゼの還元型が蓄積し始めた (data not shown)。従って、ユビキノン・メナキノンも、ヘムと同様に、分泌タンパク質のジスルフィド結合形成に必要であることが明らかとなった。

6. 呼吸鎖は、DsbA の効率的な酸化に必要である

これらの結果より、ヘム、キノンなどの呼吸鎖構成成分は、細胞内の DsbA を酸化して活性状態に保つために必須であり、また分泌タンパク質のジスルフィド結合形成に必要であることが明らかとなった。

ところで、細胞の増殖が停止すると、呼吸鎖欠損状態でも還元型 DsbA は酸化型に移行していった。増殖が停止する頃には、新生タンパク質の合成量が低下する。即ち DsbA が働いて還元される機会が減少すると予想される。そこで、増殖中の細胞を含む培養液にタンパク質合成阻害剤クロラムフェニコールを添加して、タンパク質合成が停止した状態を人工的に作り出し、DsbA の状態を調べた。

hemA 変異株で DsbA の還元型が蓄積している状態の細胞に、クロラムフェニコール (Cm) を加えると、ゆっくりとだが還元型 DsbA が酸化型へと移行した (Fig. 5 パネル B, lanes 1-4)。40 分後、DsbA はほとんど全て酸化型となった (パネル B, lane 4)。Cm の代わりに水を加えたコントロールでは、DsbA の酸化型への移行は見られなかった (パネル A, lanes 1-4)。同様に、*dsbB* 変異株でも、Cm を加えると還元型 DsbA は部分的ながら、明らかに酸化型に移行した (パネル C, lanes 1-4)。

これらの結果から、タンパク質合成量が減少すると、還元型DsbAは非効率的にだが、酸化されることがわかった。DsbBや呼吸鎖とは独立に、おそらく空気酸化や培地中の低分子酸化剤等によってDsbAはゆっくりと酸化されるようだ。しかし、この酸化は非効率的であり、タンパク質合成が停止しているときにしか効果が見られない。逆に、増殖中、盛んにタンパク質合成が行われ、基質が過剰に存在すると酸化型のDsbAは基質と相互作用してすぐに還元されてしまう。よって、それに打ち勝つ効率的な酸化機構が必要とされるのだろう。この効率的な酸化には、呼吸鎖機能とDsbBが必須だと考えられる。

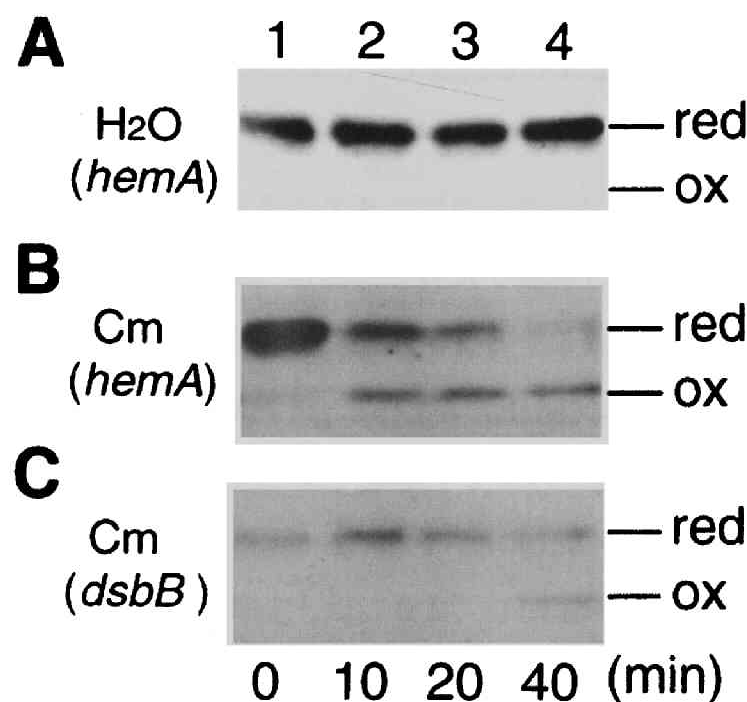


Fig. 5. タンパク質合成阻害後の DsbA の再酸化

(パネルA, B) *hemA* 欠損変異株 (H500; パネル A, B) を用い、ALA を含まない L-グルコース培地で生育させた状態の培養液に、H₂O (パネル A)、クロラムフェニコール (パネル B) を添加した後、0min (lane 1)、10min (lane 2)、20min (lane 3)、40min (lane 4) でサンプリングを行った。

(パネルC) *dsbB* 欠損変異株 (SS141; パネル C) を用い、L-グルコース培地で生育させた状態の培養液にクロラムフェニコールを添加した後、パネル (A), (B) と同様にサンプリングを行った。

7. キノン欠損状態で DsbB は機能を失う

以上の結果で、呼吸鎖欠損状態でかつ増殖している細胞内ではDsbAが還元型で蓄積することが示された。次に、DsbBに対する影響を調べた。DsbAを直接酸化するのはDsbBであることから、呼吸鎖欠損の影響は先にDsbBに現れると予想される。まず、DsbBに対する抗体を作成した。従来、DsbBは遺伝子としては同定されていたが、タンパク質自体は、エピトープタグ配列を付けた融合タンパク質DsbB-His6-Mycとしてしか検出されていなかった(31)。(なお、DsbB-His6-MycはDsbB活性を保持している。)私は、DsbBのC末端アミノ酸配列に相当する合成ペプチド(14残基)を作成し、それに対する兔ポリクローナル抗体を作った。抗血清は、抗原ペプチドをセファロースビーズにカップリングしたカラムを用いてアフィニティー精製を行った。

この精製DsbB抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行い、菌体内のDsbBを検出した。結果をFig. 6に示す。培養液をTCAで処理した後、SH基修飾試薬AMSによる修飾、非還元状態でのSDS-PAGEを行った。すると、約23 kDaの分子量のバンドが、DsbB抗体で検出された(Fig. 6 パネルA, lane3)。dsbB遺伝子をもつプラスミドを導入した細胞では、このバンドは濃くなり(パネルA, lane2)、dsbB遺伝子欠損変異株では消失していた(パネルA, lane1)。以上より、この約23 kDaのバンドがDsbBタンパク質であると同定した。なお、SH基修飾試薬としてIAAを用いると、相当するバンドは約21 kDaの位置に(パネルC, lane3)現れたので、AMS処理サンプルでみられた移動度の減少は、DsbBの6つのシステインのうちジスルフィド結合を形成していないものがAMSによって修飾されたためであると考えられる。

次に、ubiA menA 変異株を用い、呼吸鎖欠損状態の細胞内でのDsbBの酸化還元状態を調べた。結果をFig. 6 lane4-8 (各パネル共通)に示す。ubiA menA 変異株をPHBを含む培地中で生育させ、wash後、PHBを含まない培地中で培養1時間後(lane4)、2時間後(lane5)、3時間後(lane6)、4時間後(lane7)、5時間後(lane8)のサンプルを、TCA, AMSで処理した後、SDS-PAGEを行いDsbB抗体で検出した(パネルA)。すると、PHBを取り除いてから2時間後、移動度の遅い、還元型と思われるバンド(約25 kDa)が現れ(Fig. 6 パネルA, lane 5; red)、3時間後、高分子量(分子量約43

kDa) のバンドが現れはじめ(パネルA, lane 6; DsbA-DsbB)、4時間後には通常の移動度のバンドは消えた(パネルA, lanes 7, 8)。

AMSの代わりにIAAを用いてSH基を修飾した場合にも、正常な位置(約21kDa)のバンドの消失に伴い、約41 kDaの位置にバンドが現れた(date not shown)。このサンプルに還元剤β-メルカプトエタノールを加えてジスルフィド結合を還元し、還元状態でのSDS-PAGEを行うと、この高分子量のバンドは消失し、DsbBは21 kDaのバンドとして現れた(Fig. 6 パネルC)。

この結果より、Fig. 6で見られた高分子量のバンド(DsbA-DsbB)はDsbBを含むジスルフィド複合体であると考えられる。このように、細胞内のDsbBはキノンの欠損に伴って一旦還元され、次いでジスルフィド結合を介した複合体を形成することがわかった。

次に、同じサンプルをDsbA抗体でウエスタンブロッティングを行い、DsbAを検出した(Fig. 6 パネルB)。すると、PHBを取り除いてから3時間後(lane 6)で、DsbAは一部が高分子量のバンドとして検出され(パネルB, lanes 6-8)、DsbB抗体で見られたバンドの位置と一致した。この高分子量のバンドが出現してから、還元型DsbAの蓄積が始まっていた(パネルB, lanes 7, 8)。これらのことから、この複合体はDsbA-DsbBジスルフィド複合体であると予想された。

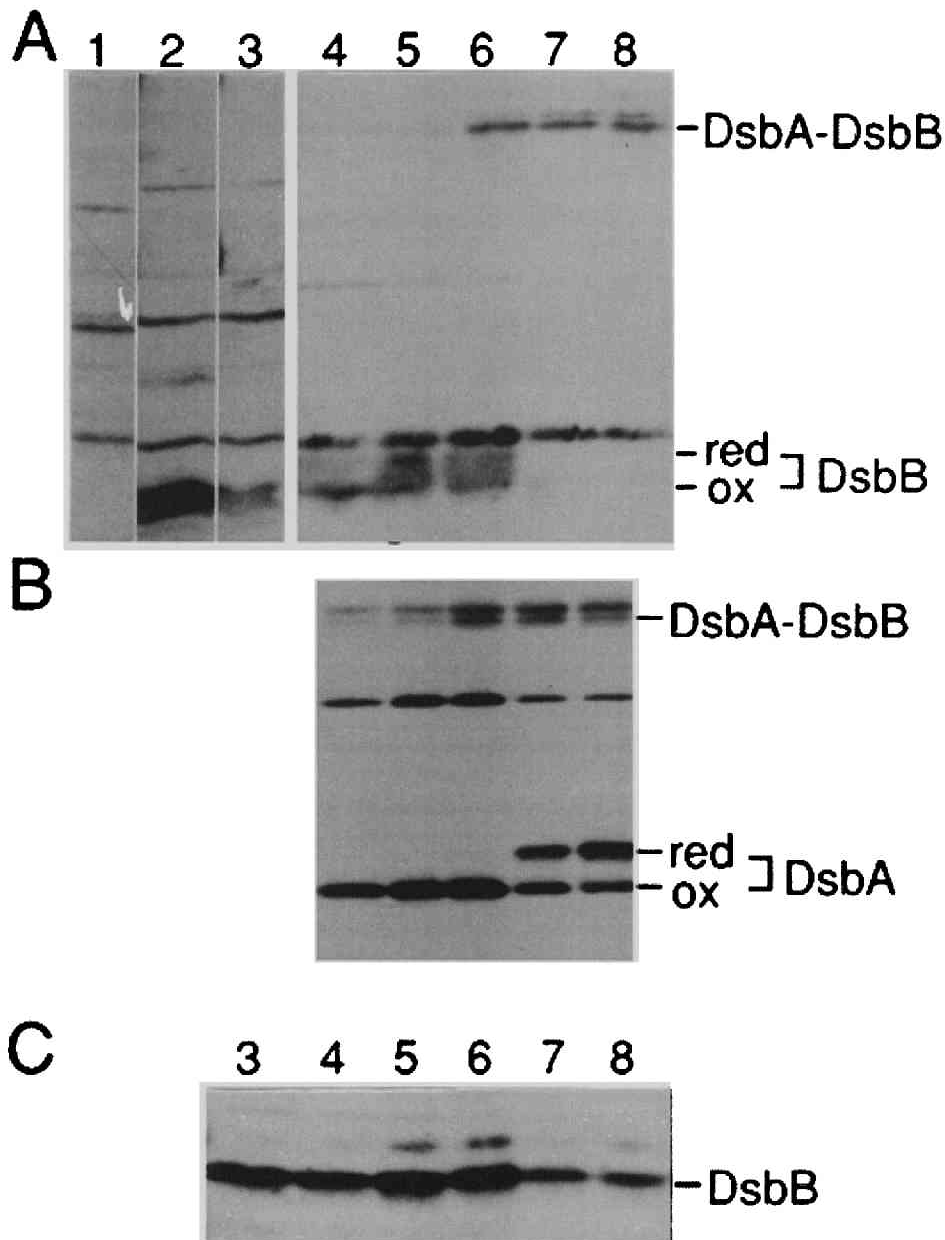


Fig. 6. キノン欠損状態の DsbB への影響

パネル(A),(B),(C)のサンプル番号は、共通である。

dsbB 欠損変異株(TA58 Δ *dsbB::cat*; lane 1) と、DsbB を発現するプラスミド (pSS39) を導入した野生株 (CU141/pSS39; lane 2)、*ubiA menA*変異株(AN384;lanes 4-8)とその野生株 (AN387; lane 3)を用いて、PHBとリン酸緩衝液を含むL-グルコース培地で生育させた。CU141/pSS39株の培養液には、IPTGを添加し、*lac*プロモーター下の*dsbB* 遺伝子から、DsbBを過剰に発現させた(lane2)。AN384株は、wash操作の後、PHBを含まない、リン酸緩衝液を添加したL-グルコース培地で1時間(lane 4)、2時間(lane 5)、3時間(lane 6)、4時間(lane 7)、5時間(lane 8)生育させた。

(パネルA)でlane 1-3 はDsbB タンパク質の検出を、lane 4-6はキノン欠損状態での DsbBを示す。(パネルB) でキノン欠損状態での DsbAの検出を示す。

(A),(B) の各サンプルは、TCA 沈殿後、AMS 処理を行い、非還元状態で SDS-PAGEの後、

DsbB 抗体(パネル(A))で、また、DsbA抗体(パネル(B))で、ウエスタンブロッティングを行った。パネル(A)のDsbBの還元型(red)のすぐ上部に存在するバンド、パネル(A)に見られる高分子量のバンド(DsbA-DsbB;約43kDa)のすぐ上部に存在するバンド、およびパネル(B)に見られる高分子量のバンド(DsbA-DsbB; 約 43 kDa)のすぐ上部に存在するバンドはいずれもバックグラウンドである。

(パネルC) DsbBの発現量は正常である TCA沈殿後、IAA処理を行ったサンプルを β -メルカプトエタノールで処理し、還元状態でSDS-PAGEを行った後、DsbB抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。DsbBのバンド(DsbB; 約 21 kDa)の上部に存在するバンドはバックグラウンドである。

上記で検出された複合体がDsbA-DsbB複合体であることを確かめるために、*ubiA menA*変異株をPHBを含まない培地中で10時間培養させ、複合体を形成している状態の細胞から、TCA沈殿後IAA処理を行ったサンプルを調製し、二次元のSDS-PAGEを行った。まず、一次元目を非還元状態で、次に二次元目を還元状態で泳動した(Fig. 7)。すると、対角線からはずれた、複合体由来であると思われるスポットが、DsbA抗体を用いたウエスタンブロッティング(Fig. 7, パネル2)、DsbB抗体を用いたウエスタンブロッティング(Fig. 7, パネル4)で検出された。これらのスポットの二次元目の移動度は、それぞれDsbA、DsbBの移動度と一致しており、複合体が、DsbAとDsbBから構成されていることが確認できた。一方、野生株では、このようなスポットは現れなかった(Fig. 7, パネル1, 3)。この結果より、キノンの欠損状態では、DsbBはDsbAとジスルフィド結合を介した複合体を形成することが明らかとなった。ヘムの欠損状態でも、同様であった(data not shown)。

以上の結果から、キノンの欠乏に伴って次の現象が起きると考えられる。キノンの欠乏に伴いDsbBは還元され、DsbAと複合体を形成して、その状態で機能を停止してしまう。そして、細胞内の全てのDsbBはDsbAと複合体を形成した状態で機能を失う。その後、DsbBに比べて過剰に存在するDsbAは、再酸化されず、還元状態で蓄積する。これらの実験結果より、呼吸鎖の欠損の影響はまずDsbBに現れること、また、呼吸鎖が欠損していると、DsbBが再酸化されずにDsbA/DsbBシステムは機能を失うことが明らかとなった。

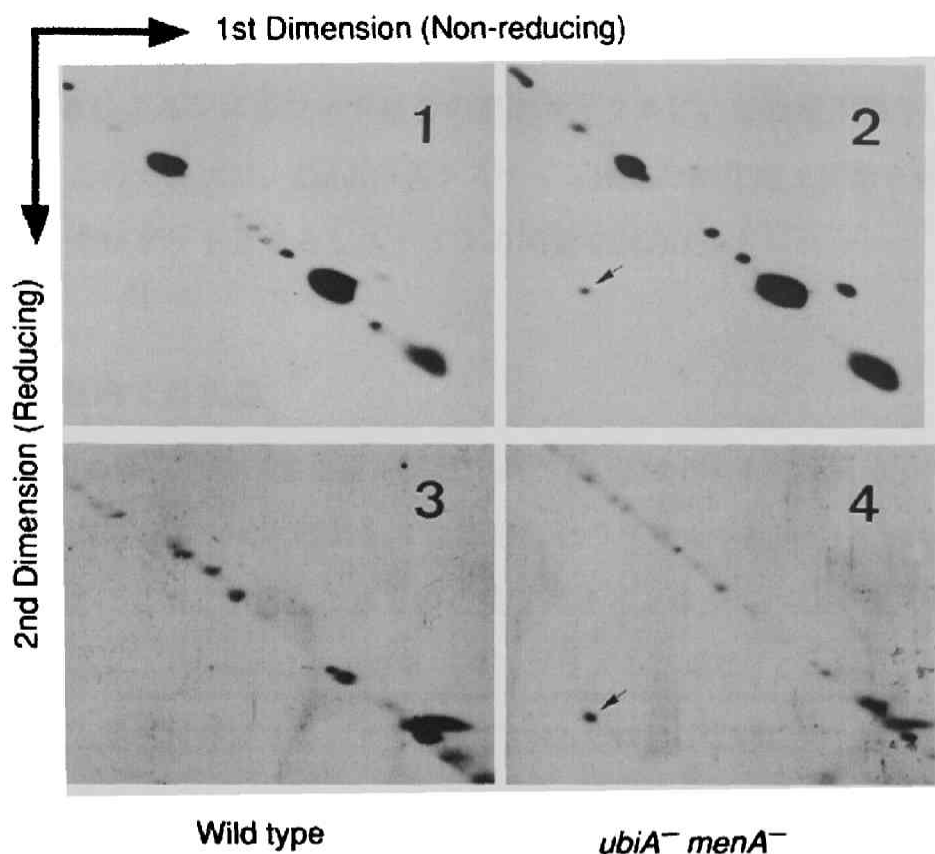


Fig. 7. 高分子量の複合体は DsbA と DsbB の分子間ジスルフィド結合によるものである

野生株 (AN387; パネル 1, 3) と *ubiA menA* 変異株 (AN384; パネル 2, 4) を用い、PHB を含まない、リン酸緩衝液を含む L-グルコース培地で 10 時間培養した培養液を、TCA 処理後、IAA で処理して非還元状態で一次元目の SDS-PAGE (1st Dimension) を行った後、泳動ゲルのレーンをきりだして β -メルカプトエタノール (0.14 M) を含む SDS 溶液中、室温で 30min 間還元剤処理を行い、2 次元目の SDS-PAGE (2nd Dimension) を行った。泳動後、DsbA 抗体 (パネル 1, 2)、DsbB 抗体 (パネル 3, 4) でウエスタンブローディングを行った。矢印は、DsbA (パネル 2)、DsbB (パネル 4) のスポットを表している。

8. まとめ

以上の結果より、Dsb システムが呼吸鎖から酸化力を得ていることが、世界で初めて明らかになった。これらの結果は Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A (1997) 97 11857-11862 に掲載された。

2-2. DsbBと呼吸鎖

DsbA/DsbBによるジスルフィド結合の形成サイクルに、呼吸鎖が関与することが明らかとなったので、次に、DsbBの各システイン残基の酸化還元状態を詳細に解析し、呼吸鎖のターゲットとなるシステインの同定を試みた。

1. DsbBの細胞内での状態

まず、DsbBの細胞内での酸化還元状態を調べた。DsbBは4回膜貫通型の膜タンパク質で、分子内にシステイン残基を6つ持ち、そのうち4つ(Cys41, Cys44, Cys104, Cys130)が機能に必須である。これらの必須システインは全てペリプラズム側に配置しており、Cys41, Cys44はDsbBの第一ペリプラズム領域に、Cys104, Cys130は第二ペリプラズム領域に存在する。そのうちCys41, Cys44はCXXCモチーフ(Cys41-Val-Leu-Cys44)を形成している。DsbBの酸化還元状態については、以前岸上らによって、DsbBは細胞内で少なくとも一つジスルフィド結合を持つことのみ示されていた。私は、AMSを用いたSDS-PAGEで、細胞内DsbBの酸化還元状態を詳しく調べた。

まず、DsbBのフリーの(ジスルフィド結合を形成していない)システインの数をAMS修飾後のSDS-PAGEの移動度で見分けることによって、各システインペアの酸化還元状態を調べようと試みた。そのために、DsbBの各Cys残基をいろいろな組み合わせでSerに置換した一連の変異体DsbBを作成した。どのシステインがセリンに置換されたかは、カッコ内に4つの必須システインCys41, Cys44, Cys104, Cys130を順番に並べて示す。例えば、野生型はDsbB[CCCC]、Cys41をSerに置換した変異体はDsbB[SCCC]と示す。*dsbB*欠損変異株に、野生型もしくはSer置換変異体のDsbB-His-Mycをコードしたプラスミドを導入し発現させた。

様々な数のシステインを持つDsbBの全てのジスルフィド結合を還元し、AMS修飾後の移動度を調べた。全てのジスルフィド結合を還元するために各種DsbB、DsbB[CCCC], DsbB[SCCC], DsbB[SSCC], DsbB[CCSS], DsbB[CSSS]を発現している細胞の全タンパク質をTCA処理で完全に変性させ、変性状態のまま、100mM DTTを含むTris buffer(pH8.0)でインキュベートした。その後、再びTCA沈殿を行ってDTTを取り除き、AMSを含むSDS溶液に溶かしてAMS修飾を行い、非還元状態のSDS-

PAGEにかけた。結果をFig.8に示す。すると、DsbB[CCCC] (Fig.8 lane2; red4), DsbB[SCCC](lane3; red3), DsbB[SSCC] (lane4; red2), DsbB[CCSS](lane5, red2), DsbB[CSSS](lane6; red1) はそれぞれ、保有しているシステイン残基の数に対応したラダー状の泳動パターンを示した。Fig.8のパネル端に記載したred N (Nは数字) は、DsbBの活性に必須な4つのシステイン残基の内、N個のシステイン残基がAMSによって修飾されたことを示す。DsbBの6つのシステインの内、機能に必須ではない2つのシステインは一つは第二膜貫通領域、もう一つは細胞質領域に存在するため、おそらく常に還元状態にあると考えられる。従って、実際の修飾残基の数は上記の数字(N)に2を足したものとなる。以上、Fig. 8のlane2-6で示したように、DsbBの活性に必須な4つのシステインの内、フリーのシステインの数 (N) が、移動度で見分けられることが明らかとなった。

次に、この移動度の違いを利用して、細胞内でDsbBがどのような状態を取っているのかを調べた。log-phaseまで培養した野生型DsbB-His6-Mycを発現している細胞の培養液を直接TCAで処理し、AMS修飾の後、非還元状態のSDS-PAGEを行った。Fig 8, lane2-6のバンドを移動度のマーカーとして、野生型DsbBの酸化還元状態を調べた。すると、red1よりも低い位置にバンドが現れた(Fig.8, lane1, 7)。つまり、Nは0個と考えられる。この結果から、正常な細胞において、DsbBは2つジスルフィド結合（即ちCys41-Cys44, Cys104-Cys130）を形成していることが明らかになった。また、DsbB[CCSS], DsbB[SSCC]変異体についても同様に細胞内の酸化還元状態を調べたところ、DsbB[SSCC]はred2に相当する位置に現れ、DsbB[CCSS]はoxに相当する位置に現れた。即ちDsbB[SSCC]は細胞内でジスルフィド結合を形成していないこと(Fig.8, lane8)、一方、DsbB[CCSS]はジスルフィド結合を形成していること(lane9)が示された。つまり、DsbBのCys104, Cys130間のジスルフィド結合形成はCys41, Cys44の存在に依存しているが、DsbBのCys41, Cys44間のジスルフィド結合形成はCys104, Cys130がなくても起こる。このことは、DsbBのCys41-Cys44ジスルフィドがCys104, Cys130を酸化するとの岸上らのモデルに合致している。

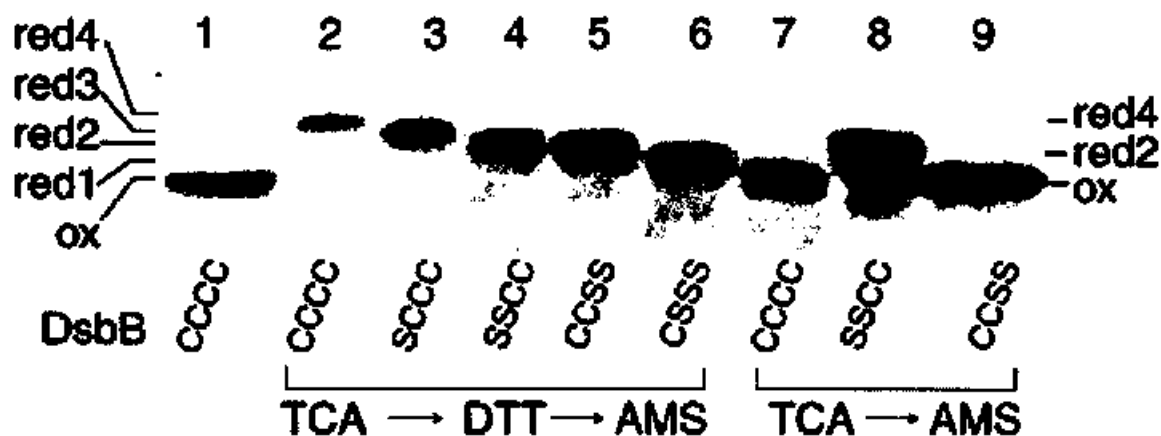


Fig. 8 AMS付加後のDsbBとそのCys/Ser変異体の電気泳動パターン

DsbB欠損変異株TA164(*dsbB::kan*)に野生株DsbB-His6-Myc、またはCys41, Cys44, Cys104, Cys130のどれかをSerに置換したCys/Ser変異体DsbB-His6-Mycをコードするプラスミドを導入した。どのシステインをセリンに置換したかは、パネル下部にDsbBのCys41, Cys44, Cys104, Cys130をカッコ内に順番に並べ、CysをC, SerをSとして記した。DsbB[CCCC] (lanes 1, 2 and 7; pSS51)、DsbB[SCCC] (lane 3; pSS53)、DsbB[SSCC] (lanes 4, 8; pTAK8)、DsbB[CCSS] (lanes 5, 9; pTAK10)、DsbB[CCSS] (lane 6; pTAK18)を発現する細胞を、L-glucose培地中で37度で培養しlog-phaseまで生育させ、TCAで処理し(終濃度5%)全タンパク質を沈殿させ、アセトンで洗浄後、lane 1, 7, 8, 9についてはSDS-Tris-HCl-AMS溶液に溶かした(TCA→AMS)、lane 2-6については、アセトン洗浄後、100mM DTTを含むTris buffer中に懸濁してインキュベートしてから、再びTCA沈殿を行い、SDS-Tris-HCl-AMS溶液に溶かした(TCA→DTT→AMS)。各サンプルは非還元状態のSDS-PAGEの後、Myc抗体でウエスタンブロッティングを行った。パネル横のoxは還元処理を行っていないDsbBを、red1, red2, red3, red4は活性に必要なシステインの内、数字の数だけフリーのCysが存在するDsbBを示す。

2. DsbBのどのシステインが、呼吸鎖欠損状態でDsbAとジスルフィド複合体を作るのか

*ubiAmenA*変異株、*hemA*変異株で呼吸鎖欠損状態で生育している細胞中で観察されたDsbA-DsbB複合体はDsbBのどのシステインを使っていたのだろうか。DsbBの活性に必須なシステインをセリンに換えた一連のDsbB変異体を用い、複合体形成への影響を調べた。各変異体DsbBをコードするプラスミドを導入した*ubiAmenA*変異株を用い、PHBを取り除いた倍地中で6時間培養してキノンを欠乏させ、DsbA-DsbB複合体の形成を調べた。結果をFig.9に示す。まず、DsbB[CCCC]では複合体の

蓄積が見られたが(lane 2)、変異体DsbB[CCSS]では、複合体の蓄積は全く見られなかった(lane 3, 4)。DsbB[SSCC]では複合体と思われるバンドが少量ながら検出できた(特にlong exposureによって, lane6)。次に、DsbB[CCCS]では複合体のバンドが見られた(lane 10)のに対し、DsbB[CCSC]では複合体は全く検出できなかった(lane10)。また、DsbB[SCCC], DsbB[CSCC]についても調べたが、共に複合体が検出された(data not shown)。以上の結果から、DsbB[CCSS], DsbB[CCSC]では、DsbA-DsbBジスルフィド複合体が全く検出できなかったのも、DsbBのCys104はDsbA-DsbB複合体形成に必須であることがわかった。つまり、DsbBのCys104はDsbA-DsbB間ジスルフィド結合のDsbB側のシステインであると考えられる。このように、呼吸鎖欠損状態で形成されるジスルフィド複合体は、変異体DsbA[C33S]を用いた時に検出されたDsbA酸化反応中間体と同様、DsbBのCys104を使用していることが明らかとなった。

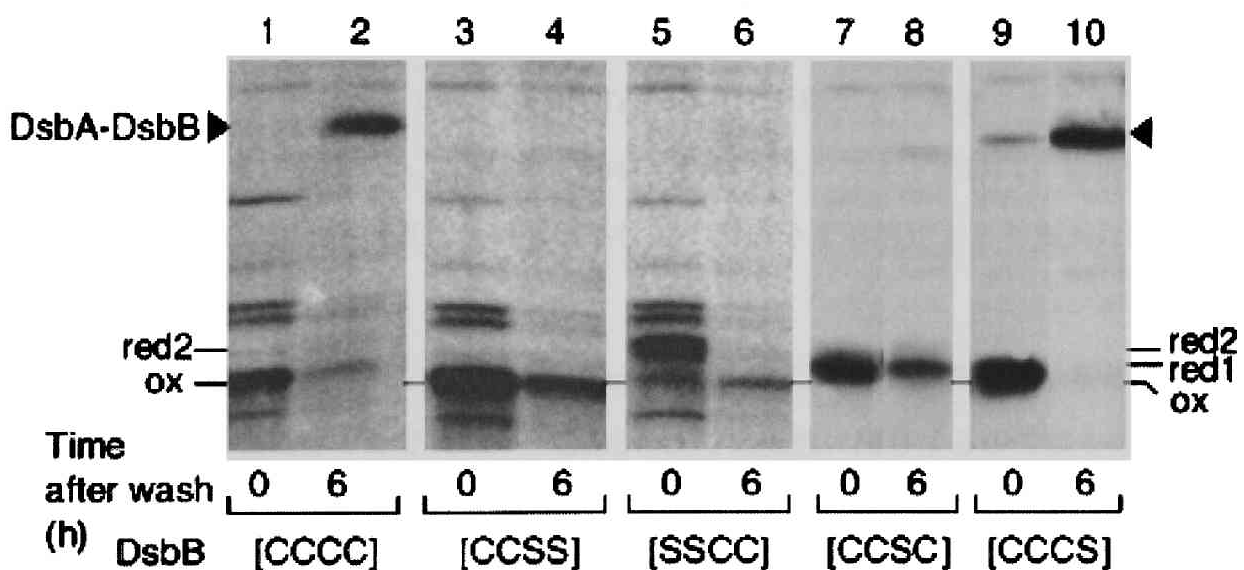


Fig. 9 DsbBのCys104はキノン欠乏状態でのDsbA-DsbB複合体の形成に重要である

*ubiA menA dsbB*三重変異株 TA162 (*ubiA420 menA401 dsbB::kan*)にHis6-MycタグのついたDsbB[CCCC] (lane 1,2), DsbB[CCSS] (lane 3,4), DsbB[SSCC] (lane5,6), DsbB[CCSC] (lane7,8), DsbB[CCCS] (lane 9,10)をコードするプラスミドpSS51, pTAK10, pTAK8, pSS55, pSS56をトランスフォームした。それぞれの細胞はリン酸緩衝液を加えたPHBを含むL-glucose培地中でlog-phaseまで培養し (lane 1, 3, 5, 7, 9)、wash後、PHBを含まない培地中で6時間培養した(lane 2, 4, 6, 8, 10)。全てのサンプルはTCA, AMS処理を行っ

ている。その後、anti-Myc抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。矢印はDsbA-DsbB複合体のバンドを示す。

3. DsbBのCys41-Cys44ジスルフィドはDTT抵抗性を示す

次に、膜に組み込まれたNativeな状態では、DsbBの持つ2つのジスルフィド結合が、還元剤を加えても完全に還元されないことを見いだした。つまり、DsbB[CCCC]を発現した細胞、あるいはその膜分画に還元剤DTTを加えても、完全還元型であるred4にはならず、DsbBはred2の位置に現れた(Fig. 10, パネルA, lane3)。しかし、このようなDTTによって完全に還元されない性質(DTT抵抗性)は、膜標品を界面活性剤TritonX-100で可溶化すると失われ、DsbBは完全に還元されてred4の位置に現れた(パネルA, lane 4)。

次に、DsbB[CCSS]を用いて同様にDTT処理の実験を行ってDTT抵抗性を調べた(Fig. 10, パネルB)。すると、DsbB[CCSS]におけるCys41-Cys44はDTTを加えても全く還元されなかったが(パネルB, lane3)、TritonX-100を加えると還元された(パネルB, lane4)。これらの結果から、DsbBのCys41-Cys44ジスルフィドがDTTに抵抗性を示すこと、また、このDTT抵抗性は界面活性剤で膜成分を可溶化すると失われることが明らかとなった。

DTTは膜透過性の還元剤なので、膜がDsbBのCys41-Cys44を保護しているとは考えにくい。私は膜成分中の呼吸鎖が、DsbBのDTT抵抗性に関与するのではないかと考え、呼吸鎖欠損変異株におけるDsbBのDTT抵抗性を調べた。

4. DsbBのCys41-Cys44のDTT抵抗性は呼吸鎖機能に依存している

*ubiAmenA*変異株にさらにDsbB欠損変異*dsbB::kan*を導入して三重変異体を作成した。この菌株にDsbB[CCCC]もしくはDsbB[CCSS]をコードするプラスミドを導入し、呼吸鎖欠損状態の細胞内のDsbBがDTT抵抗性を保持しているかどうかを調べた。まず、これらの大腸菌をPHBを含まない倍地中で12時間培養した後、菌体を直接DTT処理した。すると、DsbB[CCCC]はred4, DsbB[CCSS]はred2の位置に現れ、

DTTによって完全に還元されることがわかった(data not shown)。次に、同様に呼吸鎖欠損状態で生育させた細胞から膜を調製し、DTT抵抗性を調べた。この時、DsbB[CCCC]を発現している細胞から膜を調製しても、予想されたDsbA-DsbB複合体は検出されなかった。細胞を直接TCA処理すると複合体は見られることから、細胞破碎によって、おそらく細胞質などに存在する還元的な因子が、DsbA-DsbB複合体に働けるようになり、複合体は解離したのだろうと考えられる。さて、呼吸鎖欠損状態の細胞から調製した膜にDTTを加えたところ、DsbB[CCCC]は完全に還元され、TritonX-100を加えたときのバンドの位置と同じく、red4 (Fig. 10, パネルA, lane7, 8) の位置に泳動された。次にDsbA-DsbB複合体を形成しないため、より単純にCys41-Cys44のDTT耐性を調べることができるDsbB[CCSS]を発現している呼吸鎖欠損状態の細胞から同様に膜を調製して、DTT抵抗性を調べた。すると、DsbB[CCSS]はDTTによって完全に還元されred2の位置に現れた (Fig. 10, パネルB, lane7)。これはTritonX-100で処理したときの位置red2と同じであった(パネルB, lane8)。即ち、DsbBのCys41-Cys44は呼吸鎖キノン欠乏状態ではDTT抵抗性を失っており、DTTによって完全に還元されることが明らかとなった。

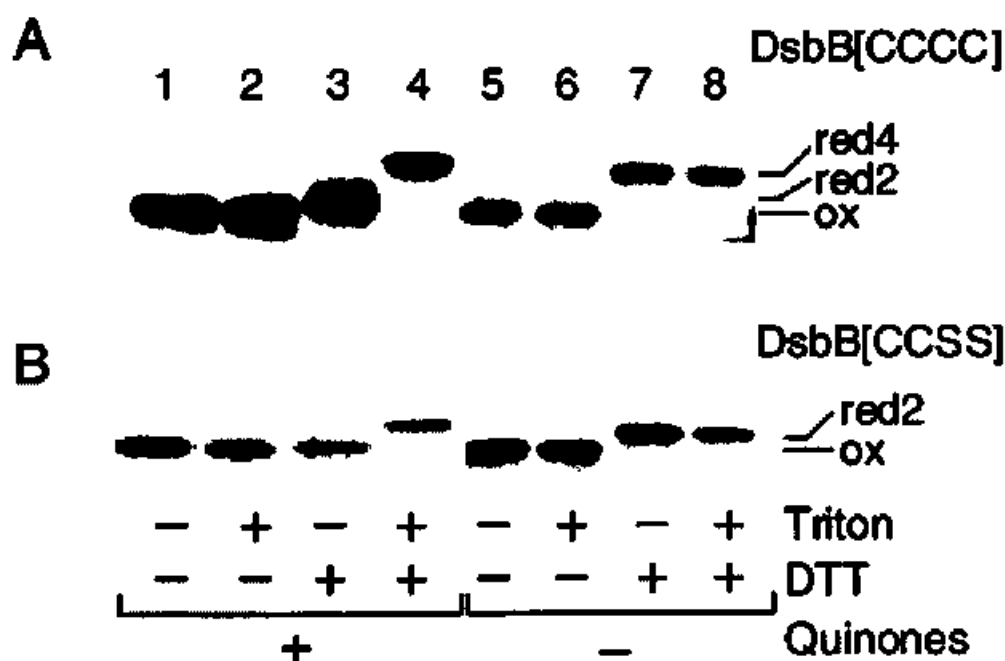


Fig.10 DsbBのCys41-Cys44は呼吸鎖機能に依存してDTT抵抗性を示す

野生株TA164 (*dsbB::kan*, lane1-4), *ubiAmenA*変異株TA162 (*ubiA420 menA401 dsbB::kan*, lane5-8)にDsbB[CCCC]をコードするプラスミドpSS51 (パネルA)、もしくは

DsbB[CCSS]をコードするpTAK10 (パネルB) を導入した。TA164はリン酸バッファーを加えたL-glucose 培地中でlog-phaseまで、キノン欠損変異株TA162は、リン酸バッファーを加えたL-glucose 培地中でPHBのwash操作後、12時間培養した。培養液は氷上で冷却し、遠心分離機で集菌した。その後、sonicationでcellを破碎し、debrisを遠心操作で除いた後、超遠心機にかけ、膜面分を単離した。膜サンプルは、界面活性剤 TritonX-100存在下 (lane 2,4,6,8)、もしくは非存在下 (lane 1,3,5,7) で、5分間インキュベートした後、20mM DTT存在下 (lane 3,4,7,8)、もしくは非存在下 (lane 1,2,5,6) で、さらに10分間氷上でインキュベートした。その後、全てのサンプルはTCA、AMS処理の後、非還元状態のSDS-PAGEを行った。DsbBはanti-Myc 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、検出した。

次に*hemA*変異株でも同様の現象が見られるかを調べた。DsbB[CCSS]を用い、ALAのない培地中で12時間培養した細胞にDTTを添加した。すると、野生株中でDsbBのCys41-Cys44は還元されない (Fig. 11, lane2) が、ヘム欠損状態の細胞中では還元されred2の位置に現れた (lane4)。この結果より、*hemA*変異株でも、*ubiAmenA*変異株と同様、DsbBはDTT抵抗性を失うことが明らかとなった。

このように、呼吸鎖成分を欠損していると、DsbBのCys41-Cys44のDTT抵抗性は失われた。これらの結果から、DsbBのDTT抵抗性は、呼吸鎖機能に依存した性質であることが明らかとなった。



Fig. 11 ヘムの欠乏はCys41-Cys44のジスルフィド結合をDTT感受性にする

野生株LE392 (lane 1,2) と*hemA*変異株 (LE392, *hemA::Km*; lane 3,4) にDsbB[CCSS]を発現するプラスミドpTAK10を導入し、リン酸バッファーを加えたL-glucose培地で培養した。*hemA*変異株については、ALAを含む同培地で培養後、ALAをwashで取り除き、ALAを

含まない培地中で12時間培養した。それぞれの培養液は氷上で冷やし、遠心分離で集菌後、10mM Tris-HCl バッファー(pH 8.1)に懸濁し、20mM DTTの存在下、または非存在下で氷上10分間インキュベートした。その後、TCA沈殿、AMS処理を行い、非還元状態のSDS-PAGEを行った。DsbBはanti-Myc抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した。

5. Cys41-Cys44のDTT抵抗性には酸素が必要である

DsbBのCys41-Cys44のDTT抵抗性が呼吸鎖機能に依存していることが示されたが、それは物理的にDTTから隔離されているためかもしれない。例えば、DsbBのCys41-Cys44領域が、呼吸鎖依存的にマスクされている可能性も考えられる。それとも、より機能的な要因が重要なものかもしれない。例えば、Cys41-Cys44は呼吸鎖とカップルした機構で強く酸化されており、たとえDTTによって一瞬還元されてもすぐさま再酸化されるのかもしれない。後者の場合、DTT抵抗性の保持には、酸化力供給のための酸素を必要すると考えられる。そこで、正常な呼吸鎖をもつ膜を用い、酸素の無い状態で、DsbBのDTT抵抗性を調べた。

DsbB[CCCC]を発現しており、好気的状态で生育している野生株細胞から膜を調製し、DTT存在下で、N₂を試料中にバブリングさせて試料中の酸素を除いた。すると、DsbBは完全に還元されred4の位置に現れた (Fig. 12, lane1)。N₂置換を行わなかった試料では、DsbBは完全に還元されず、red2の位置に現れた (lane3)。これらの結果から、酸素がDsbBのDTT抵抗性の維持に必要であることがわかった。

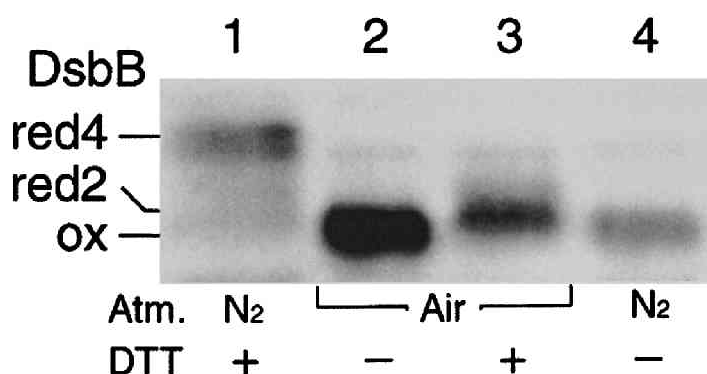


Fig. 12 DsbBのDTT抵抗性には酸素が必要である

TA164(*dsbB::kan*)/pSS51(*dsbB-his6-myc*) をL-glucose培地中でlog-phaseまで培養させ、

differential centrifugation で膜画分を調製した。膜は1mM phenylmethylsulfonyl fluorideを含む10mM Tris-HCl (pH8.1)バッファーに懸濁した。パネル下部にN₂と表示したlaneのサンプルは、20mM DTTの存在下 (lane1)、非存在下 (lane4)で、シールをしたプラスチック容器中、窒素ガスを氷上30分間バブリングして、溶液中の空気を窒素に置換した。その後、完全にシールをして、さらに30分間氷上に放置した。一方、パネル下部にAirと表示されたlaneのサンプルは、20mM DTTの存在下 (lane3)、非存在下 (lane2)で、氷上に60分間放置した。その後、TCA沈殿、AMS修飾を行って、非還元状態のSDS-PAGEを行った後、anti-Myc抗体を用いたウェスタンブロッティングでDsbBを検出した。

6. DsbBはDTTを酸化できる

DsbBのCys41-Cys44が呼吸鎖とカップルした機構で強く酸化されており、たとえDTTによって還元されてもすぐさま再酸化されるため、DTTに抵抗性を示したと考ええると、DsbBは結果としてDTTを酸化していることになる。すなわちDsbBは呼吸鎖を利用して、酸素によりDTTを酸化する酵素であるとも言える。そこで、実際にDsbBがDTTを酸化するかどうかについて検討した。まず、*in vivo*でDTTを含むプレート培地上での細胞のviabilityを調べた。*dsbA::Km, dsbB::Cm*二重変異株に*lac*プロモーター下にDsbB[CCCC]をコードするプラスミドもしくはコントロールベクターを導入し、DTTを含むプレート上での生育を調べた。L-glucose培地にDsbBの発現を誘導するためにIsopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG), c-AMPを添加して、さらにDTTを加えたプレートを作成し、シリアルダイリューションを行って生育を調べた。すると、Fig. 13のパネルAで見られるように、DTT 0mMでは全ての菌株が同程度の生育を示したが、DTTを添加した培地での生育は、野生型DsbB[CCCC]を持つ菌株の方が明らかに耐性を示し、特に30-40mMのDTTを含む培地で顕著であった(Fig. 13, パネルA DTT30mM, DTT40mM)。即ち、DsbBはその本来の基質であるDsbAが存在しなくても細胞にDTT耐性を与えることが示された。この結果はDsbBのCys41-Cys44がDTTを酸化しているという考えに合致している。過剰のDTTは大腸菌の生育を阻害するが、DsbBがDTTを酸化することでその生育阻害が弱められたのだろう。

次にDsbB欠損変異株、もしくはDsbBを過剰発現させた株から、膜を調製し、DTTに対する*in vitro*での酸化能をみた。10mM DTTで60分間氷上で膜をインキュベート

した後、超遠心にかけて膜画分を除き、上澄み中の残存チオール量をチオール定量試薬DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) で定量した。DTNBはチオール基と反応して412nmの吸収を示すので、残存チオールの量は412nmの吸収で定量できる。すると、DsbBに依存して吸収の減少、つまりチオール量の減少が起こった。また、37度でインキュベートすると氷上の場合よりも、DsbBの有無に依存した明らかな吸収の減少がみられた。以上のことから、DsbBはそれ自身がDTTのような低分子チオールを酸化できることが予備的にではあるが示された。

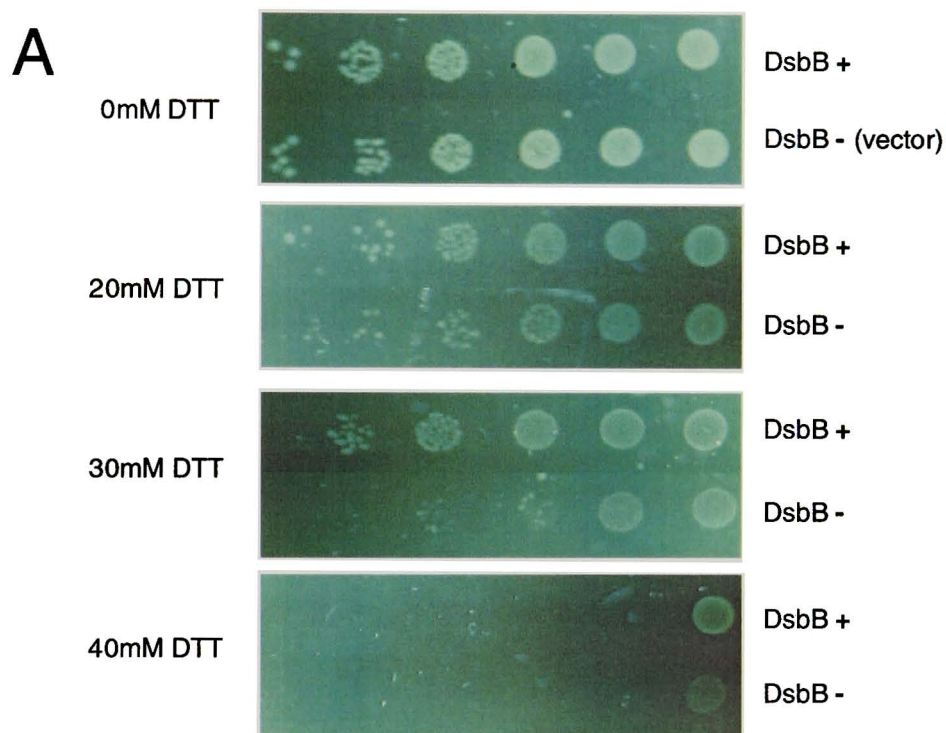
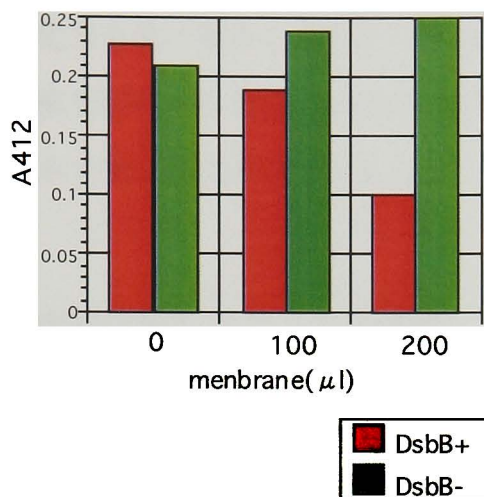


Fig. 13 a DsbBはDTTを酸化することが出来る

(パネルA) L-glucose, IPTG, cAMP, 各濃度のDTTを含むプレート上での生育を示す。*dsbA**dsbB*二重欠損変異株TA228にpUC119ベクターの*lac*プロモーター下にDsbBをコードするプラスミドpTAK3(DsbB[CCCC]; DsbB+), コントロールベクターpUC119 (DsbB-) を導入した。L-glucose培地中でKU=40まで増やした培養液を10倍ごと希釈を行って、各希釈液から2 μ lを各濃度のDTTを含むL-glucose, IPTG, c-AMPプレート上にスポットし、37度で20時間培養した。

B



C

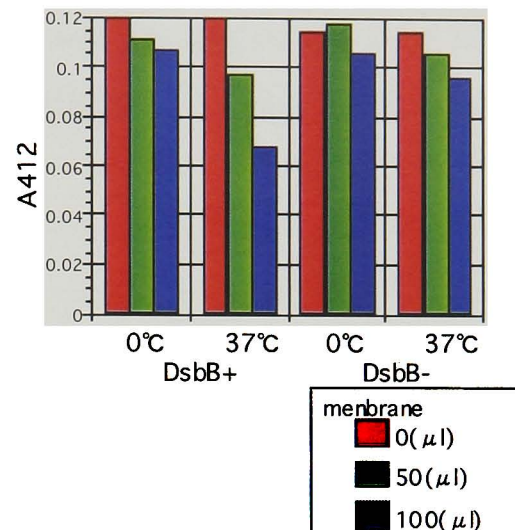


Fig. 13 b DsbBはDTTを酸化することが出来る

(パネルB、C) *in vitro*でのDTTの酸化を調べた。*dsbB*欠損変異株にpUC119 vector (DsbB-), またはDsbB過剰発現プラスミドpTAK3(DsbB+)を導入した大腸菌から膜を調製し(各membraneの蛋白濃度DsbB-:8mg/ml, DsbB+:6mg/ml)、グラフに記述した量の膜を含むサンプルを10mM DTTで60分間氷上, もしくは37度でインキュベートした。その後、超遠心で膜画分を分離後、上澄みを取りチオール定量試薬DTNB(final conc. 0.1mM) (79)を用いて残存チオールの量を412nmの吸収で測定した。

7. まとめ

以上の結果より、DsbBのCys41-Cys44はDTT抵抗性を有しており、それは呼吸鎖機能と、酸素に依存していることが明らかとなった。そして、呼吸鎖成分はDsbBのCys41, Cys44を酸化することが示唆された。

これらの結果はEMBO J. (1999)18 1192-1198に掲載された。

2-3.DsbBの変異解析

我々は*in vivo*でDsbシステムと呼吸鎖がカップリングしていることを示したが、その後、Bardwellグループによって、*in vitro*でもDsbシステムは呼吸鎖キノンから直接酸化力を受け取ることが示された。我々はDsbBの呼吸鎖成分（キノン）による酸化機構を解明するため、DsbBの変異株を多数作成し、呼吸鎖とのカップリングに欠損を示す変異体の同定を試みた。

1. DsbBのCXXCモチーフ変異体

チオール/ジスルフィド酸化還元酵素に特徴的に見られるCys-X-X-Cysモチーフ内部のXX配列は酵素自身の酸化還元能力、つまりレドックスポテンシャルに大きく影響することが知られている(80)(60)。前章でDsbBのCXXCモチーフ(Cys41-Cys44)は呼吸鎖によって強く酸化されていることが示された。そこで、呼吸鎖とのカップリングにおけるCXXCモチーフの重要性を調べるために、DsbBのCXXCモチーフ内部(Val-Leu)を他の酸化還元酵素のXX配列、Gly-His (PDI), Gly-Pro (チオレドキシン), Pro-His (DsbA), Gly-Tyr (DsbC), Val-Ala (DsbD), Pro-Thr (DsbE), Pro-Tyr (DsbG とグルタレドキシン)に変えた変異体をsite direct mutagenesis で作成し、各変異体DsbBの活性を、DsbAの酸化還元状態で調べた(Fig.14 パネルA)。また、変異体DsbB自身の酸化還元状態(Fig.14 パネルB)とDTT抵抗性(Fig.15)を調べた。実験はこれらの変異体DsbBをコードするプラスミドを*dsbB*欠損変異株に導入して行った。結果をFig.14, 15に示す。

まず、各DsbB変異体を発現している細胞内のDsbAの酸化還元状態を調べた。Fig. 14のパネルAに見られるように、チオレドキシン(Trx)型のDsbBでは、DsbAの還元型の蓄積が見られた(Fig. 14, パネルA, lane3)。しかし、その他の変異体では、DsbAはPDI型、DsbA型でわずかに還元されていた程度で(lanes 2,4)、残りは野生型(lane1)と同様、全て酸化型であった(lanes5-7, DsbG(Grx)型はdata not shown)。DsbC型以外のDsbB変異体では、DsbA-DsbB複合体のバンドが見られた(パネルA, B, lanes 2-4, 6, 7)。

次にDsbB変異体自身の酸化還元状態を調べた (Fig. 14, パネルB)。TCA沈殿の後、

AMS処理、非還元状態のSDS-PAGEを行った。いくつかのDsbB変異体では、単独のDsbB分子のバンドは野生型に比べて減少していた(Fig.14, パネルB; DsbB ox)。しかし、AMS修飾を行わずに還元状態でSDS-PAGEを行ったところ、全てのDsbB変異体は安定に存在し、発現量も野生株と同じであった(data not shown)。単独のDsbB分子の減少しているTrx型、DsbA型、DsbD型、DsbE型のDsbB変異体では、DsbBの一部、もしくは大部分がDsbA-DsbB複合体へと移行していた(Fig.14, パネルB, lanes3, 4, 6, 7; DsbA-DsbB)。PDI型でも少量だがDsbA-DsbB複合体のバンドが見られた(lane2)。しかし、いずれの変異体でも、単独で存在するDsbBは全て酸化型であった(パネルB; DsbB ox)。

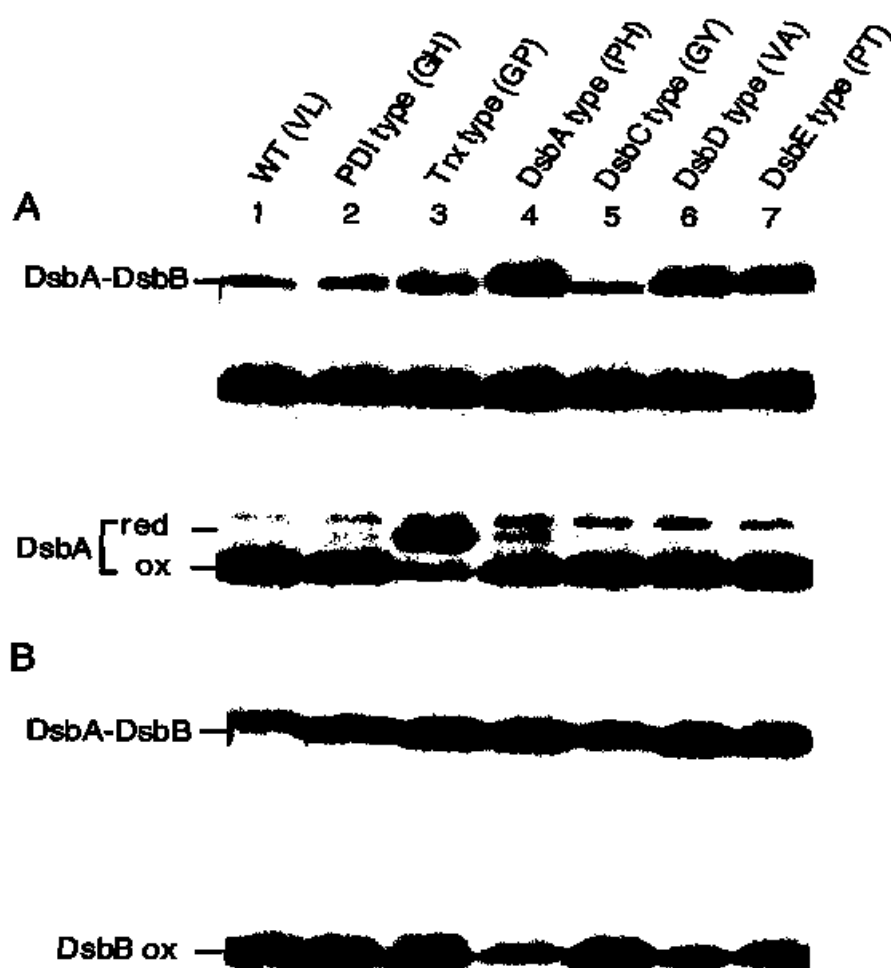


Fig. 14 DsbBのCXXCモチーフ変異体の機能と酸化還元状態

SS141(*dsbB::kan5*)に、DsbBのCXXCモチーフ内部の配列(Val42Leu43)を他の酸化還元酵素のXXに変えたDsbB-His6-Mycをコードするプラスミド(pTAK30, pTAK31, pTAK32,

pTAK33, pTAK34, pTAK35)を導入した。lane1は野生型(Val42Leu43; pSS51), lane2はPDI型(Gly-His; pTAK30), lane3はTrx型(Gly-Pro; pTAK31), lane4はDsbA型(Pro-His; pTAK32), lane5はDsbC型(Gly-Tyr; pTAK33), lane6はDsbD型(Val-Ala; pTAK34), lane7はDsbE型(Pro-Thr; pTAK35)のCXXCモチーフを持つDsbB変異体を示す。パネル上部にCXXCモチーフ内部の配列をカッコ内に示した。log-phaseまで培養させた培養液を直接TCAで処理した後、AMS修飾をおこない、非還元状態のSDS-PAGEの後、抗DsbA抗体(パネルA)、抗Myc抗体(パネルB)を用いて検出した。

次に各変異体DsbBのDTT抵抗性を調べた。DTT抵抗性は、呼吸鎖との相互作用の指標であり、呼吸鎖とのカップリングが上手く行かない場合には失われる。そこで、各変異体を発現している細胞から膜を調製し、DsbB変異体のDTT抵抗性を調べた。結果をFig.15に示す。先ほどの酸化還元状態を調べたアッセイでは、TCA沈殿で細胞内タンパク質の状態をフリーズしたのを見ていたが、このDTT抵抗性のアッセイでは、細胞を破碎して膜を調製するので、先ほど見られたDsbA-DsbB複合体は、既に述べたように細胞質の因子によって還元され、開裂する。さて、DTT抵抗性を調べたところ、Fig.15に見られるように、全てのDsbB変異体はDTTを加えても完全に還元されず、DTT抵抗性を示した(Fig. 15, lanes 2, 5, 8, 11, 14, 17)。一方、膜を界面活性剤TritonX-100で処理すると、DTTによって完全に還元された(lanes 3, 6, 9, 12, 15, 18)。つまり、これらのCXXCモチーフ変異体は、野生型DsbBと同様にDTT抵抗性を保持しており、CXXCモチーフ内部の配列が変化していても、呼吸鎖から酸化力を受け取る能力には支障がないことが明らかとなった。

ほとんどのCXXCモチーフ変異体でDsbA-DsbB複合体がみられたが、これらの変異体で蓄積するDsbA-DsbB複合体はクロラムフェニコール(Cm)を加えてタンパク質合成(DsbA基質の供給)を止めると速やかに消失する(data not shown)ので、複合体はDsbBによるDsbA酸化反応の中間体であると考えられる。これらの変異体では、中間体が検出される程にDsbA酸化反応速度が低下したのだろう。DsbBの本来持っているXX配列は、呼吸鎖から酸化力を受け取るには必須ではないが、DsbBのDsbA酸化活性を最大にするためには必要であると考えられる。Trx型で最もDsbA酸化活性が低かったという結果は、チオレドキシンはこれらのチオールジスルフィド酸

化還元酵素の中で最も低いレドックスポテンシャルを持ち、還元的な性質が強いことと合致している。

以上の結果より、DsbBの本来持っているCXXCモチーフのXX配列(Val-Leu)は、呼吸鎖とのカップリングに必須ではないことがわかった。

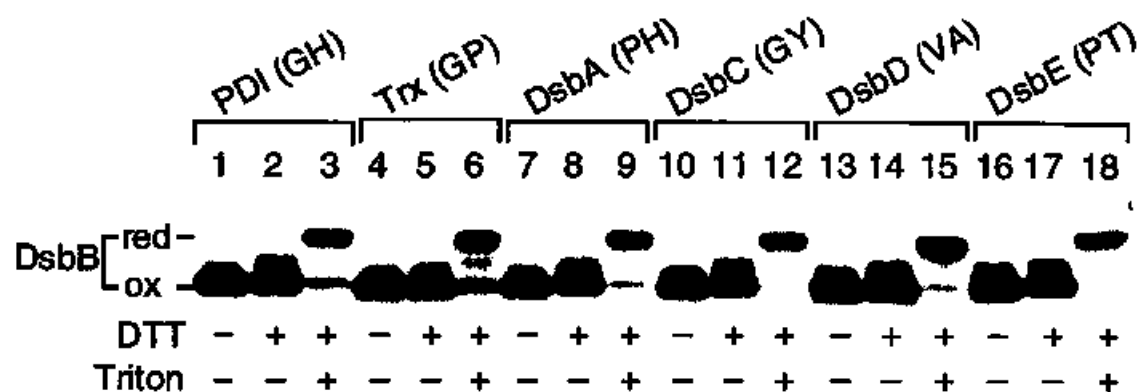


Fig. 15 DsbBのCXXCモチーフ変異体のDTT抵抗性

Fig.13に示すCXXCモチーフ変異体 (PDI-type; lane1-3, Trx-type; lane4-6, DsbA-type; lane7-9, DsbC-type; lane10-12, DsbD-type; lane13-15, DsbE-type; lane16-18) を発現する細胞から、細胞破碎、それに続くdifferential centrifugationで膜面分を調製した。膜は1mM phenylmethylsulfonyl fluorideを含む10mM Tris-HCl (pH8.1)バッファーに懸濁し、TritonX-100存在下(lane3, 6, 9, 12, 15, 18)、非存在下(lane2, 5, 8, 11, 14, 17)で、20mM DTTを添加し氷上で10分間インキュベートした。lane1, 4, 7, 10, 13, 16は何も処理を施さないコントロールである。その後、TCA沈殿、AMS修飾を行って、非還元状態のSDS-PAGEを行った後、anti-Myc抗体を用いたウエスタンブロッティングでDsbBを検出した。

2. DsbBの31コドン挿入変異体

次にDsbB機能に必須の領域を探すために、トランスポゾンTn*lacZ*inを用いた31コドン挿入変異体の作成(81)をCREST研究員の高橋さんが行った。その経緯と結果を記しておく。このトランスポゾンはちょうど挿入配列がcoding領域にin-frameで入ったときのみ*lacZ*活性を示すので、発色基質X-Galを含むプレート上のコロニーの色でin-frameで挿入が入ったかどうかを見分けることが出来る。また、*lacZ*部分を含むトランスポゾンの大部分は制限酵素*Bam*HIで切り出して除くことができ、最終的に31コドンの挿入変異を得ることができる。DsbB-His6-Mycをコードするプラスミドを

持つ大腸菌にTnlacZin（内部に薬剤(Cm)耐性遺伝子(*cat*遺伝子)を含む)を持つラムダファージを感染させ、プラスミドを回収、大腸菌にトランスフォームして、Cm, X-Galを含むプレート上で青色になるコロニーを選択、*dsbB*遺伝子内にトランスポゾンが移ったかどうかをシーケンス、制限酵素処理等で確認後、*Bam*HI処理を行ってトランスポゾンの大部分を除き、最終的にシーケンスで31コドンの挿入部位を決定した。その結果、15個の異なる挿入変異が同定された(Fig. 16)。LacZ酵素は細胞質で活性を持つためTnlacZinは原理的には細胞質領域への挿入変異をスクリーニングするためのものであるが、実際に得られた変異の内、6個はペリプラズム領域への挿入であった。8個は膜貫通部位の内部か近傍に挿入しており、これらの挿入を持つDsbBタンパク質自身は著しく不安定化していた。

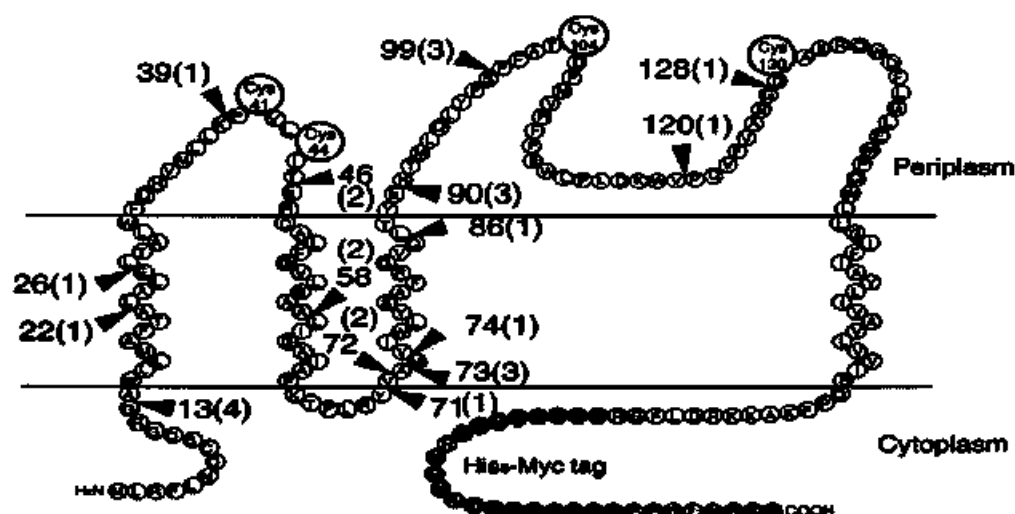


Fig. 16 DsbBの31コドン 挿入変異体

得られたDsbBの31コドン挿入変異体を示す。挿入部位は矢印と挿入部位の直前のアミノ酸の番号で示した。カッコ内の数字は独立して取ってきた同じ変異の数である。挿入されたアミノ酸配列は一般的に次のように示される。(S, P, T, or A)-

DSYTQVASWTEPFPSIQGDPRSDQET-(V, A, D, E, or G)-XX(81)。最初の一つと最後の三つのアミノ酸は以下の通りであった。13ではA-GRG, 22ではP-VTA, 26ではP-ALE, 39ではP-VLK, 46ではA-GIY, 58ではP-GAA, 71ではA-GYV, 72ではA-GYV, 73ではT-DVA, 74ではA-VAM, 86ではS-GVQ, 90ではP-AYE, 99ではP-DPS, 120ではP-EWV, 128ではT-DVAである。

次にこれらのDsbB変異体のDsbA酸化活性、DsbB自身の酸化還元状態、DsbBの

DTT抵抗性を調べた。結果をFig. 17に示す。各変異体はDsbB n::31と示す。nは数字でDsbBのn番目の残基の後ろに31コドンの挿入が入ったことを示す。DsbBの13, 39, 99, 128番目の残基の後ろに挿入を持つ変異体DsbB(DsbB13::31, DsbB39::31, DsbB99::31, DsbB128::31)は、DsbA酸化活性を十分有しており(Fig.17, パネルA, lanes 2, 3, 6, 8)、DsbB変異体自身も酸化型であった(パネルB, lanes 2, 3, 6, 8)。一方、90, 120番目の残基の後ろに挿入を持つDsbB変異体(DsbB90::31, DsbB120::31)では、DsbAの還元型が部分的に蓄積した(パネルA, lanes 5, 7)。特にDsbB90::31ではDsbA-DsbB複合体の蓄積が見られた(パネルA,B, lane5, 矢印)。しかし、DsbB120::31も、DsbB90::31でさえ、DTT抵抗性を保持していた(パネルC, lane2, DsbB120::31はdata not shown)。この結果から、これらの位置に31アミノ酸の挿入が起こっても、呼吸鎖とのカップリングは損なわれないことが明らかとなった。

一方、DsbB46::31では激しい欠損が見られた。DsbAは完全に還元型で蓄積し、DsbBも還元型となっていた(Fig. 17, パネルA, B, lane 4)。DsbBが還元型となっているのはこのDsbB46::31のみであった。この挿入はFig. 16からもわかるようにCXXCモチーフのC末端側近傍に存在していた。N末端側近傍に入ったDsbB39::31では、全く欠損は見られなかった(パネルA, B, lane3)。これらのことから、CXXCモチーフのC末端側の領域が呼吸鎖とのカップリングに重要であることが示唆された。そこで、高橋さんからこの変異株DsbB46::31を分与していただいて、更に解析を行った。

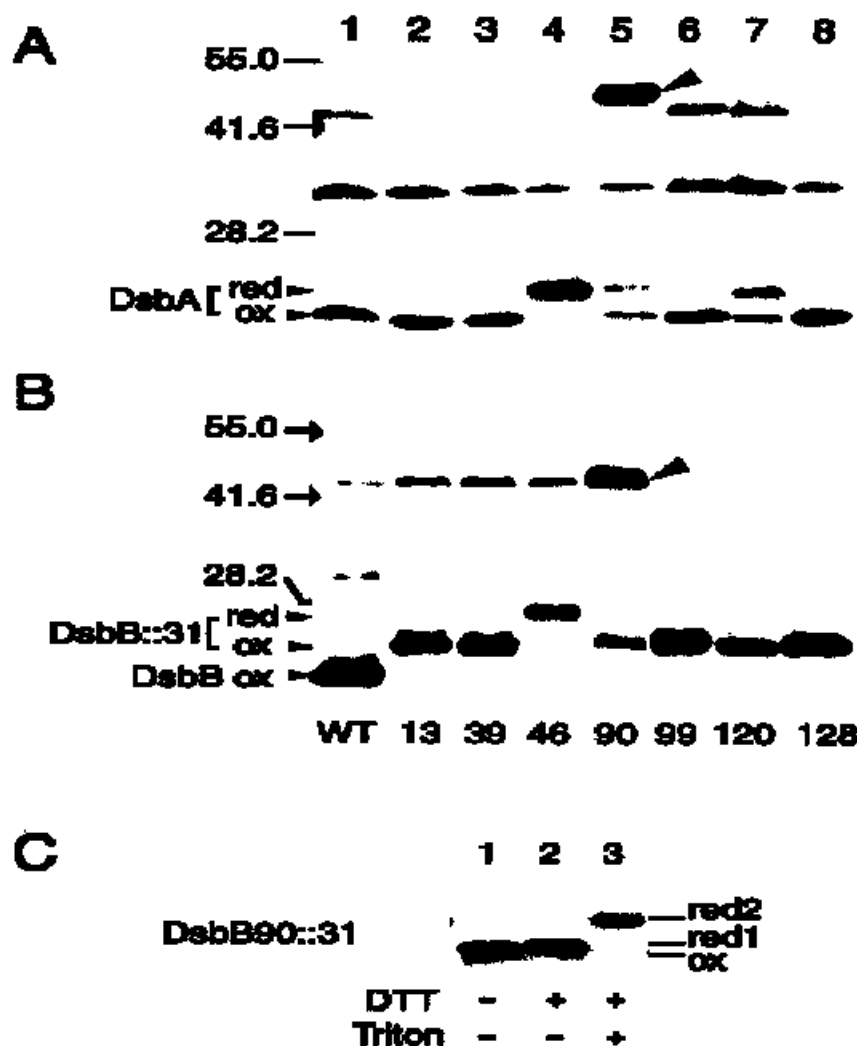


Fig. 17 DsbBの31 codon 挿入変異の活性とDTT抵抗性

SS141(*dsbB::kan5*)にDsbB-His6-Mycの31コドン挿入変異体をコードするプラスミドを導入し、L-glucose培地中でlog-phaseまで培養させTCA沈殿後、AMS処理、非還元状態のSDS-PAGEを行った後、抗DsbA抗体を用いて（パネルA）または抗Myc抗体を用いて（パネルB）ウエスタンブロッティングを行った。lane1は野生株、lane2はDsbBの13番目の残基の直後に挿入を持つ変異体であるDsbB13::31, lane3はDsbB39::31, lane4はDsbB46::31, lane5はDsbB90::31, lane6はDsbB99::31, lane7はDsbB120::31, lane8はDsbB128::31を示す。矢印はDsbA-DsbB複合体を示す。パネルCはDsbB80::31のDTT抵抗性を示す。DsbB80::31をコードするプラスミドを導入したSS141細胞から膜画分を調製した。膜は1mM phenylmethylsulfonyl fluorideを含む10mM Tris-HCl (pH8.1)バッファーに懸濁し、DTTの存在下(lane2, 3)、非存在下(lane1)で氷上で10分間インキュベートした。lane3には前もって、1% TritonX-100を添加しておいた。その後、DsbBの酸化還元状態を決定した。

3. DsbBのCXXCモチーフC末端側領域の挿入、欠失変異

31アミノ酸挿入変異体DsbB46::31の挿入部分を短くした変異体を作成し、挿入部分をどの程度短くすると機能が回復するかを調べた。挿入部分を削り込んだ各変異体DsbBをコードするプラスミドを、*dsbB*欠損変異株に導入して、DsbA酸化活性とDsbB自身の酸化還元状態(Fig. 18)、DTT抵抗性(Fig.19)を調べた。DTT抵抗性を調べる時には、Cys41-Cys44の挙動に焦点をあてた解析を行うために、DsbBのCys104, Cys130をSerに変えた変異体DsbB[CCSS]に各変異を移して実験を行った。

DsbB46::31はCys41XXCys44モチーフのC末端側のTyr46とGlu47の間に31アミノ酸の挿入を持つ。31アミノ酸(31a.a.)の配列はN末端側から、ADSYTQVASWTEPFPSIQGDPRSDQETGIYである。そこで、C末端側から8a.a., 16a.a., 24a.a. 削ったDsbB46::23, DsbB46::15, DsbB46::7を作成したが、これらは全てDsbB46::31と同じ性質を示した。つまりDsbA酸化活性を失い、DsbB自身も還元されていた(data not shown)。そこで、DsbB46::7の挿入配列7アミノ酸をさらに削り込んだ変異体、DsbB46::1(Ala), DsbB46::2(Ala Asp), DsbB46::3(Ala Asp Ser), DsbB46::5(Ala Asp Ser Tyr Thr)を作成し、同様に調べた。1アミノ酸以上の挿入を持つ場合、変異体DsbBはDsbA酸化活性を失った。2アミノ酸以上の挿入を持つ場合、変異体DsbB自身が還元型として蓄積した。アミノ酸の種類による特異性があるかもしれないと考え、挿入配列を全てアラニンにした変異体も作成した。しかし、挿入アミノ酸の「数」が同じだと、同じ表現型を示した。つまり、Tyr46とGlu47の間に一つ以上Alaが挿入している場合、変異体DsbBはDsbA酸化活性を失い(Fig. 18, パネルA, lanes 2-4)、2つ以上のAlaが挿入している場合、変異体DsbB自身は還元型として蓄積した(Fig.18, パネルB, lanes3,4)。一つAlaが挿入している変異体DsbBは、自身は酸化型であったが(Fig.18, パネルB, lanes2)、DTT抵抗性を調べるとDTTによる還元を受けたバンドが見られ、部分的にDTT抵抗性を失っていることがわかった(Fig. 19, lane 20)。

では次に、上記のTyr46Glu47間以外の部分へのアラニン挿入でも同様の欠損が見られるかどうかを調べた。CXXCモチーフのC末端側と膜貫通領域を挟む各領域に、一つアラニンを挿入した変異体、つまりCys44とIle45, Ile45とTyr46, Glu47とArg48,

Arg48とCys49の間に一つAlaを挿入した変異体DsbBを作成した。すると、Cys44, Ile45, Glu47の後ろにAlaを挿入した場合、変異体DsbBはDsbA酸化活性を欠損し(Fig. 18, パネルA, lanes 5, 6, 7)、変異体DsbB自身は酸化型だが(Fig. 18, パネルB, lanes 5, 6, 7)、DTT抵抗性を部分的に失う(Fig. 19, lanes 15, 17, 23)という、Tyr46の後にAlaを挿入した変異DsbB46::1と同様の表現型を示した。一方、Arg48の後ろに挿入を持つ場合は野生型並の活性を示し、DTT抵抗性も保持していた(Fig. 18, パネルA, B, lanes 8)。このように、Ile45-Arg48の領域内にアミノ酸が挿入すると、DsbBの呼吸鎖とのカップリング機能が、完全に、もしくは部分的に損なわれた。

では、逆にIle45-Arg48の領域にアミノ酸の欠失を持つ場合、つまり長さが短くなった場合を調べた。Tyr46(Fig. 18, lane 9)の欠失変異や、Ile45(data not shown)欠失変異を調べたところ、どちらもDsbB自身は還元型で蓄積した。つまり、長くなっても短くなっても、DsbBは呼吸鎖から十分に酸化力を受け取れなくなり、DsbA酸化活性を失うことが分かった。

これらの結果よりCXXCモチーフの後ろIle45からR48の領域への挿入変異や欠失変異は、共に呼吸鎖とのカップリングを損なうこと、その結果DsbBを不活化することが明らかとなった。



Fig. 18 DsbBのIle45-Arg48の長さがDsbBの酸化に重要である

SS141(*dsbB::kan5*)にDsbB-His6-MycのIle45-Arg48間のアラニン挿入変異体、欠失変異体をコードするプラスミドを導入し、L-glucose培地中でlog-phaseまで培養させTCA沈殿後、AMS処理、非還元状態のSDS-PAGEを行って、細胞内のDsbA (パネルA)、DsbB変異体自身 (パネルB) の酸化還元状態を調べた。lane1は野生型(pTAK1)、lane2はTyr46の直後にアラニンを挿入した変異体(pTAK67)、lane3, 4は同じくTyr46の直後に2つ(lane3; pTAK155)、もしくは3つ(lane4; pTAK157)アラニンを挿入した変異体を示す。また、lane5-8はパネル上部に示す残基の直後にアラニンを一つ挿入した変異体である。lane5が²Cys44の、lane6が⁴Ile45の、lane7が⁴Glu47の、lane8が⁴Arg48の直後にアラニンを挿入した変異体を示す。lane9はTyr46を欠損させた変異体である(pTAK49)。

*はバックグラウンドである

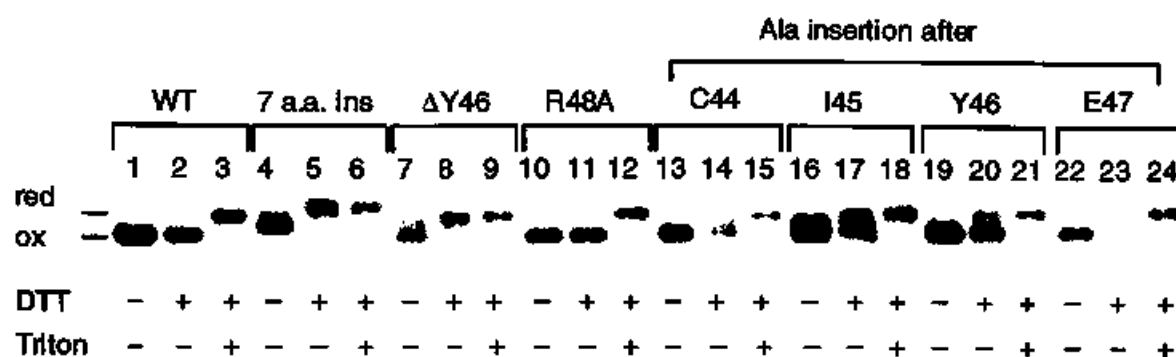


Fig. 19 DsbB変異体のDTT抵抗性

各変異体DsbB-His6-MycのCys104, Cys130をSerに変えたプラスミドDsbB[CCSS]-His6-Mycを、SS141 (*dsbB::kan5*)に導入して、各変異体のCys41-Cys44のDTT抵抗性を調べた。各変異体を発現している細胞から膜を調製、20mM DTTの存在下 (lane2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24)もしくは非存在下 (lane 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22)で氷上10分間インキュベートした。lane 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24では界面活性剤TritonX-100を最終濃度1%であらかじめ加えておいた。その後、TCA沈殿、AMS処理、非還元状態のSDS-PAGEの後、抗Myc抗体でウエスタンブロッティングを行った。Lane1-3はDsbB[CCSS]-His6-Myc (pTAK10), lane4-6はTyr46の直後に7アミノ酸(Ala-Asp-Ser-Tyr-Thr-Gln-Val)挿入したDsbB[CCSS](pTAK115), lane7-9はTyr46の欠損変異を持つDsbB[CCSS] (pTAK116), lane10-12はArg48Ala置換変異を持つDsbB[CCSS] (pTAK117), lane13-15はCys44の直後にAla挿入を持つDsbB[CCSS](pTAK115), lane16-18はIle45の直後(pTAK120), lane19-21はTyr46の直後(pTAK121), lane22-24はGlu47の直後(pTAK122)にAla挿入を持つDsbB[CCSS]を示している。

4. DsbBのCXXCモチーフのC末端側の領域のアラニン置換変異

DsbBのCXXCモチーフのC末端側のIle45-Tyr-Glu-Arg48領域に挿入、もしくは欠失を持つと変異体DsbBは呼吸鎖による酸化に欠損を示した。つまり、この領域は、CXXCモチーフが呼吸鎖キノンから酸化力を受け取るために重要な役割をもつことが明らかとなった。では、この領域内の4つのアミノ酸の中に特に重要なアミノ酸残基があるのではないかと考えた。そのアミノ酸残基を同定するために、この領域内のアラニンスキニングを行った。各アミノ酸のアラニン置換体 (Ile45Ala, Tyr46Ala, Glu47Ala, Arg48Ala) をそれぞれ作成し、その活性と性質を調べた。結果をFig. 20に示す。Arg48Ala置換変異体ではDsbA酸化活性が低下していたが(Fig. 20,

パネルA, lane5)、DsbB変異体自身は酸化型であり(Fig. 20, パネルB, lane5)、DTT抵抗性も保持していた(Fig. 19, lane11)。その他、Ile45Ala, Glu47Ala変異体でDsbA-DsbB複合体が見られたが(Fig. 20, lanes 2, 4)、DsbA酸化活性は十分に有しており(Fig. 20/パネルA, lane 2-4)、DsbB自身も酸化型で(Fig. 20/パネルB, lane 2-4)、DTT抵抗性も有していた(data not shown)。これらの結果より、この領域内のアミノ酸の性質自体は呼吸鎖とのカップリングには重要ではないことが明らかとなった。また、Arg48Ala置換変異体でDsbA酸化活性の欠損が見られたが、DTT抵抗性は保持していたことから、Arg48はDsbBのDsbA酸化や、DsbB分子内酸化反応に重要なものかもしれない。

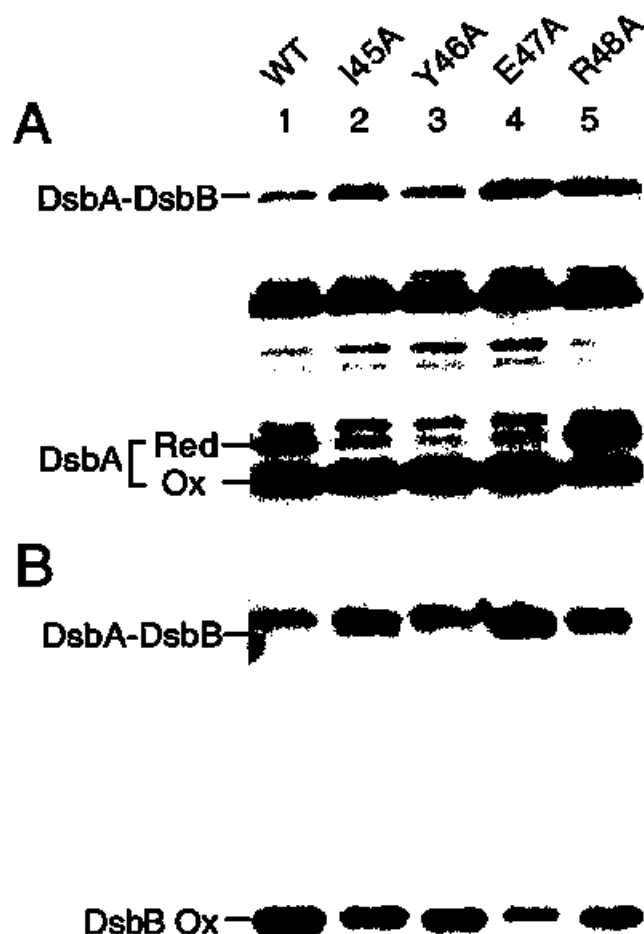


Fig. 20 DsbB Ile45-Arg48の残基のアラニン置換変異体

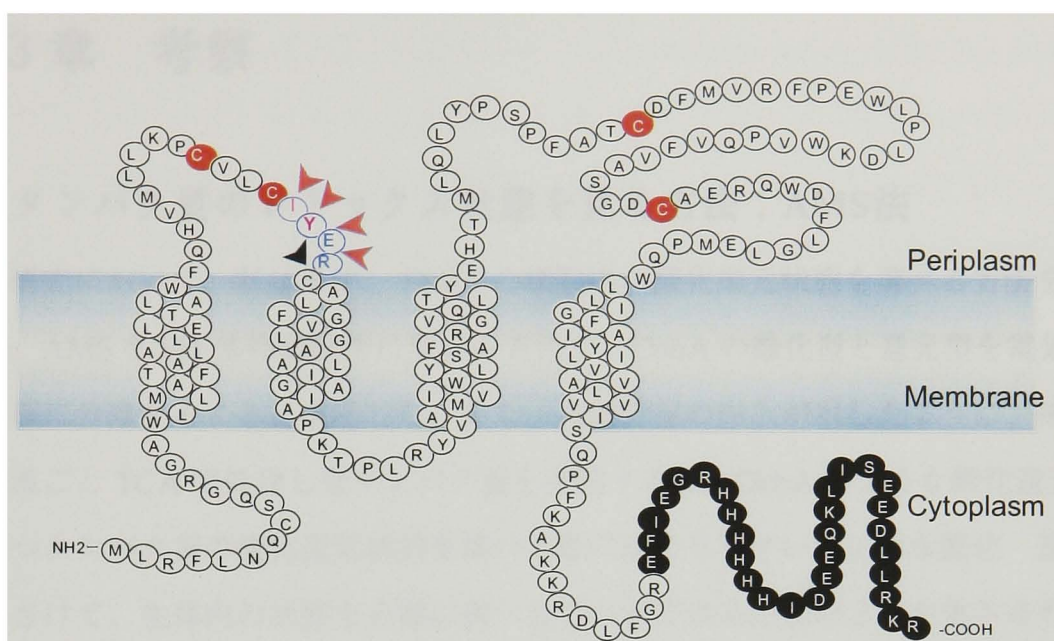
DsbB-His6-MycのIle45, Tyr46, Glu47, Arg48の各残基をアラニンに変えた置換変異体をコードするプラスミドを、SS141 (*dsbB::kan5*)に導入して、各変異体の活性と酸化還元状態を調べた。lane1は野生型(pTAK10)、lane2はIle45Ala変異体(pTAK56)、lane3はTyr46Ala変異体(pTAK58)、lane4はGlu47Ala変異体(pTAK60)、lane5はArg48Ala変異体(pTAK62)

を示す。各細胞はlog-phaseまで培養した後、TCA 沈殿、AMS処理、非還元状態のSDS-PAGEを行って、抗DsbA抗体（パネルA）、抗Myc抗体（パネルB）でウエスタンブロッティングを行った。

5. まとめ

以上の結果より、呼吸鎖とのカップリングには、DsbBのCXXCモチーフのC末端側の領域Ile45-Arg48間が重要な役割をしており、各アミノ酸の性質と言うよりは、この領域の長さが重要らしいという興味ある事実が明らかとなった。

これらの結果はMolecular Microbiologyにアクセプトされた。



DsbB mutants of the C-terminal segment of the CXXC motif in the first periplasmic domain

DsbB mutants	DsbA redox state	DsbB redox state	DsbB DTT resistance
WT	Ox	Ox	R
insertion after Y46			
7a.a. and more	Red	Red	
5a.a.	Red	Red	
3a.a.	Red	Red	
2a.a.	Red	Red	
1a.a.	Red	Ox	R/S
Ala insertion after the following residue			
C44	Red	Ox	R/S
I45	Red	Ox	R/S
Y46(=1a.a.insertion)	Red	Ox	R/S
E47	Red/Ox	Ox	R/S
R48	Ox	Ox	R
deletion			
ΔI45	Red	Red	
ΔY46	Red	Red	
Ala replacement			
I45A	Ox	Ox	R (A-B comp)
Y46A	Ox	Ox	R
E47A	Ox	Ox	R (A-B comp)
R48A,E	Red/Ox	Ox	R (A-B comp)

図 3 DsbBのCXXCモチーフのC末端側領域の変異体のまとめ

第3章 考察

3-1. タンパク質のレドックス状態を見る方法：AMS法

本研究において、私はまず、DsbAの細胞内の酸化還元状態を調べる方法を改良した。AMSをSH基修飾試薬に用いる方法で、DsbAの酸化型と還元型を電気泳動で明確に分離することに成功した。また、当研究室の岸上が示したように、細胞を培養液ごとTCAで処理し全タンパク質を変性すると、DsbAのような酸化還元活性をもつタンパク質の酸化還元状態を調べる際に起こりやすい人工的な酸化・還元反応をさけて、生体内の状態を正確に調べることができる。この2つを組み合わせた方法は、他のチオール-ジスルフィド酸化還元モチーフを持つタンパク質一般の酸化還元状態を調べるためにも有用であろう。実際、私の開発したAMS法は、その後、この分野の研究者に広く使われるようになった。他のDsb因子はもちろん、ジスルフィド結合の有無によって活性を調節する転写因子OxyRの酸化還元状態や、真核生物においてもカルボキシペプチダーゼ(CPY)等の分泌タンパク質や、後述するER内ジスルフィド結合形成システムに属するEro1pやPDI等の酸化還元状態を調べるために使われており、世界標準方法となっている(20)。

3-2. 呼吸鎖とDsbシステムのカップリング

本研究で私は、DsbA/DsbBによるジスルフィド結合形成システムに酸化力を与える機構の解明をめざし、呼吸鎖電子伝達系が関与する可能性を調べた。そして、呼吸鎖が、DsbAを酸化型つまり活性状態に保つために必要であることを突き止めた。DsbAは野生株中ではほぼ全て酸化型で存在するが、呼吸鎖が機能しない状態で生育している細胞内では還元型で蓄積し、その結果ジスルフィド結合形成が不全になることを明らかにした。

ヘムを生合成できない*hemA*変異株をもちいて、ヘムが欠乏している細胞では、DsbAの還元型が蓄積し、分泌タンパク質のジスルフィド結合形成が欠損すること

を示した。しかし、hemin chloride (protoheme) を添加すると、還元型で蓄積していた DsbA は速やかに酸化型へと移行した。即ち protoheme の欠損が DsbA 機能の欠失を生み出す原因であった。protoheme は、チトクロームの補欠分子族である hemeB そのものであり、hemeB の誘導体、hemeC、hemeD、hemeO もチトクロームの補欠分子族である。本研究で得られた実験結果は、DsbA の酸化に呼吸鎖を構成しているチトクロームの機能が必須であることを強く示唆した。

呼吸鎖の関与をさらに明確に示すため、呼吸鎖の他の成分を欠損させたときにも、同様の現象がおこるかどうかを調べた。呼吸鎖の基質特異的脱水素酵素類と末端酸化還元酵素の間の電子伝達を媒介する分子である呼吸鎖キノンの生合成に欠損を持つ変異株、*ubiA menA* 変異株を用いた。キノン欠乏状態の細胞内では、DsbA の還元型の蓄積が観察されたが、ユビキノンの生合成を回復させると、DsbA の還元型は酸化型へと変換した。つまり、DsbA の再酸化には、呼吸鎖キノンが必要であった。ユビキノンは好气的状態で働くことが知られているが、ユビキノン単独欠損変異株 (TA36 ; *ubiA::Cm*) を好气的状態で培養しても DsbA の還元型は少量しか見られなかった。メナキノンは低酸素濃度下で働くとされているが、ユビキノンが欠損していると酸素が十分にある環境下でも、メナキノンは相補的に働くことができるのかもしれない。

以上の結果で、protoheme あるいは、呼吸鎖キノンを欠乏していると、DsbA が効率的に酸化されず、還元型で蓄積することが明らかにされた。即ち、DsbA/DsbB システムには、正常に機能している呼吸鎖が必須であるということがわかった。

上記実験で観察された還元型 DsbA の蓄積は、呼吸鎖の構成成分を欠損している状態で、かつ 増殖している細胞内でのみ見られた。私は、呼吸鎖変異株では、培地の酸性化のために呼吸鎖欠損を示す以前に増殖を停止してしまうことに気づき、pH 緩衝液を加えることによって酸性化による生育の停止を防ぎ、あるいは繰り返し植え次ぐことによって、呼吸鎖欠損状態で増殖している細胞内を調べることが成功した。一方、静止期に入ると還元型 DsbA も再び酸化型に変換された。増殖時でも、クロラムフェニコール (Cm) を加えてタンパク質合成を阻害すると、DsbA の酸化が引き起こされた。同様に、*dsbB* 欠損変異株中で蓄積している DsbA も、Cm を加えるとゆっ

くりと酸化された。これらの結果が示すように、おそらく培地中には、DsbB とは異なる非効率的なDsbA 酸化経路が存在する。例えば酸素による直接の酸化、培地中のシスチンなどの低分子酸化化合物による酸化によって、DsbAはゆっくりと酸化されるのだろう。静止期では増殖期に比べタンパク質合成量が減少し、DsbAの基質となる新生分泌タンパク質の供給が減少する。つまり、DsbAが還元される機会が減少する。その結果、非効率的な酸化でも、細胞内のDsbAは酸化状態に保たれるのだろうと考えられる。活発にタンパク質が合成されている増殖期には、DsbAはフル回転で働き、常に還元されている。このようなDsbA を酸化状態に保つためには、効率的にDsbAを酸化する機構が必要であり、呼吸鎖機能が必須となるわけである。

以上の研究より私は、呼吸鎖がDsbAを酸化状態に保つために必要であること、呼吸鎖はDsbB機能に必須であることを明らかにした。呼吸鎖を構成するヘム、もしくはキノンを欠乏させると、DsbB は、まず一旦還元され、その後、DsbA と分子間ジスルフィド結合を介した複合体となった。最終的に細胞内のDsbB は全てが複合体を形成したが、DsbA は全体のほんの一部しか複合体を形成しなかった。つまり、DsbA はDsbB よりも過剰量存在し、本来、細胞内ではDsbBが効率よくDsbAを酸化していると考えられる。DsbB は、呼吸鎖成分を欠乏させるといった還元型となり、最終的に全てのDsbB がDsbAと複合体を形成した状態で機能を失う。その結果、過剰に存在するDsbA は、還元型として蓄積する。

なぜ、呼吸鎖の欠損状態でDsbB はDsbA と複合体を形成するのだろうか。以前に、DsbA のCys33をSerに変換した変異体DsbA[C33S]を用いて、DsbA とDsbB が直接SS結合を介して相互作用することが示されたが、DsbA[C33S]が作るDsbA-DsbB複合体は、DsbBによるDsbA酸化反応の中間状態を表していると解釈された。このジスルフィド複合体は、DsbA[C33S]を用いた時のみ安定に蓄積するが、野生型のDsbAでは開裂してしまい、検出されない。分子間ジスルフィド結合は、DsbAのCys30とDsbBのCys104間に形成される。さて、呼吸鎖欠損状態で現れたDsbA-DsbB複合体は、通常の反応が中間体の状態でストップしたものなのか、それとも本来現れないはずのデッドエンドの産物なのだろうか。まず、DsbBのCys/Ser置換変異体を用いて、DsbBのどのシステイン残基とDsbAがジスルフィド結合を形成して

いるかを調べ、呼吸鎖欠損状態では、Cys104を欠くDsbBのみ複合体を形成出来ないことを示した。このCys104は、正常なジスルフィド反応中間体のDsbB側のシステイン残基と同じであり、どちらの場合でも、DsbAと複合体を作るときに、DsbBはCys 104を使用していることがわかった。DsbBはCys104付近にDsbAとアフィニティの強い領域を持っているのかもしれない。呼吸鎖欠損状態で形成される複合体は、野生型のDsbAによって形成されるにも関わらず、なぜ、開裂しないのだろうか。次のような解釈が可能かもしれない。呼吸鎖による酸化力の提供と、DsbA-DsbB複合体からのDsbAの解離がカップルした反応であり、呼吸鎖機能が欠損して酸化力が提供されないと、DsbBはDsbAを解離出来ない。または、呼吸鎖欠損状態初期でDsbBがいったん還元されていたことから、還元型のDsbBと酸化型のDsbAが逆反応を起こしてしまったのかもしれない。この可能性を検討するときに言及しておかなければならないのは、私が行ったアッセイでは呼吸鎖欠損状態として、元々あった呼吸鎖構成成分を取り除いた状態を調べていたことである。最初は呼吸鎖もDsbA/DsbBシステムも正常に機能しており、DsbAは酸化型に維持されていた。しかし、呼吸鎖欠損に伴い、次第に呼吸鎖から酸化力のインプットが行われなくなると、DsbA-DsbB複合体が形成され、DsbAの還元型の蓄積を生んだ。この時、呼吸鎖からのインプットが弱くなった時点でも、DsbAの酸化型は過剰に存在していると予想され、逆方向の反応が起こりうるし、もちろん、正方向の反応が途中で停止した可能性もある。最初から呼吸鎖が働いていない状態を調べた場合、DsbA, DsbBは共に還元型で蓄積し、DsbA-DsbB複合体は形成することが出来ないと考察される。

本研究で、私は呼吸鎖欠損変異株を用いることによって、呼吸鎖欠損状態で生育している細胞内ではDsbA/DsbBシステムが正常に働かないことを証明した。先にも述べたが、呼吸鎖変異株を呼吸鎖欠損状態で培養すると、培地が酸性化しやすいことに気づき、緩衝液を混ぜることで、生育の停止を防いだ。その結果、呼吸鎖欠損状態で生育している細胞内でDsbAが還元型で蓄積することを見いだした。このように、DsbAの還元型の蓄積は、生育中の細胞内でのみ見られる現象であったため、培地の酸性化を防いだことが発見につながったものと考えられる。同様に呼吸鎖の変異株を用いた解析は他研究室でも行われていたようだが、おそらく、培地の酸性化

等に気を配らなかったために、増殖が停止している状態を呼吸鎖が欠損している状態であると考えてアッセイを行い、DsbAの還元型の蓄積を捕まえることが出来なかったであろう。

呼吸鎖がDsbシステムに關与する可能性は以前にも指摘されたことがある。Dsbシステムの欠損変異株では鞭毛が形成されず、大腸菌は運動性を失う。呼吸鎖欠損変異株でも運動性の欠失が報告されていた。我々の研究室の岸上は、野生型DsbBを含む膜が還元型DsbAを再酸化出来ること、また、再酸化反応を調べるうち、膜をアンカプラー（脱共役剤）であるCCCP（カルボニルアニドm-クロロフェニルヒドラゾン）で処理した方が、DsbA酸化速度が速いという結果を得ていた。このような背景の下で私の発見が可能になった。

3-3. 呼吸鎖によるDsbBの酸化

呼吸鎖欠損状態ではDsbBは機能を失うことが示され、呼吸鎖がDsbA/DsbBシステムに酸化力を与えることが示唆されたが、次に、DsbBの酸化還元状態を詳しく調べ、呼吸鎖はDsbBのどのシステインをターゲットにして酸化しているのかをつきとめた。

まず、AMSを用いて、DsbBのフリーのシステイン数がSDS-PAGEで見分けうることを示し、DsbBは通常2つジスルフィド結合を持っていること、そのジスルフィドの組み合わせはCys41-Cys44, Cys104-Cys130であることを示した。また、Cys104-Cys130ジスルフィド結合の形成は、Cys41, Cys44の存在に依存していた。これは岸上らが提唱したモデル、Cys41-Cys44がCys104-Cys130を酸化するとの、分子内酸化モデルを支持している。

DsbBの酸化還元状態を調べる過程で、DsbBのジスルフィド結合Cys41-Cys44が特異な性質を持っていることを発見した。細胞にDTTを加えても、膜画分を調製してDTTを加えても、DsbBの2つのジスルフィド結合のうち少なくとも1つは全く還元されなかった。一方、TCAで完全に変性させた状態では還元された。DsbB[CCSS]を用い、還元されなかったジスルフィド結合はCys41-Cys44ジスルフィドであることを明らかにした。このような性質、即ちDTT抵抗性は、膜画分を界面活性剤で可溶化

すると失われることから、DsbBが膜に埋め込まれている状態でのみ見られることがわかった。また、膜内に埋め込まれている状態でも、キノン、ヘムなどの呼吸鎖成分を欠いているとDTTによって完全に還元された。次に、野生株の膜でも酸素を取り除いた状態では、DTT抵抗性を失うことがわかった。即ち、DTT抵抗性は、酸素、呼吸鎖に依存した性質であることが明らかになった。なぜ、DsbBのCys41-Cys44はDTTによって還元されないのだろうか？この理由はいくつか考えられる。DsbBのCys41-Cys44が膜に埋め込まれており、還元剤から保護されているため、DTTがアクセスできない可能性。しかしこの可能性は、DTTは膜透過性の還元剤であることから否定できる。次に、Cys41-Cys44が膜ではなく他の何かの因子によって、呼吸鎖機能依存的に物理的に保護されているという可能性も考えられる。もしくは、物理的保護を想定しなくても、呼吸鎖がCys41-Cys44を強力かつ素早く酸化していたために、いったんDTTによって還元されてもすぐ再酸化され、見かけ上DTTに抵抗性を示すという可能性も考えられる。後者の場合だと、DTTを含む溶液中でDsbBは、DTTを酸化する「DTT酸化酵素」として機能しているとも言える。そこで、実際にDsbBがDTTを酸化する活性をもつかどうかを調べた。*in vivo*では、*dsbB*欠損変異株に比べDsbB過剰発現株は、より高濃度のDTTを含む培地でも生育することができた。*in vitro*では、調製した膜サンプルにDTTを添加し一定時間おいた後の残存チオール量を測定すると、*dsbB*欠損変異株の膜に比べて、DsbB過剰発現株から調製した膜の方が、有意にチオール量が減少していた。この結果は、DsbBがDTTを酸化したことを示唆している。このようにDsbBは、DTTの様な低分子チオールを酸化する能力を持つようだ。以上の結果より、DsbBがDTTに抵抗性を示すのは、何かによってCys41-Cys44がカバーされているためではなく、呼吸鎖によって、強く酸化されているためであると考えられる。また、酸素からの酸化力が呼吸鎖を通して、DsbBに絶えず供給されると考えると、酸素を除いたときに、DsbBがDTT抵抗性を失うことと見事に一致する。

上記のDsbBをもつ、もしくは持たない菌の生育を、DTTを含む培地上で見た実験では、*dsbA dsbB*二重欠損変異株を用いている。*in vitro*でDTTの酸化を見た実験でも、DsbAは可溶性のタンパク質なので、用いた膜画分には含まれていない。これらのこ

とから、DsbBは、基質として知られているDsbA以外にも、低分子のチオールを酸化できる能力を持つことを示した。最近、Rainaらのグループは、外膜タンパク質であるOmpLが欠損すると、*dsbA*欠損を治すが*dsbB*欠損を治さないという報告をしている(100)。外膜タンパク質OmpLの機能は十分に確定されてはいないが、おそらく低分子チオール ジスルフィドのペリプラズムからの拡散を許すポーリンとして機能しており、*dsbA ompL*変異株では蓄積したチオールをDsbBが酸化するため、DsbAが存在しなくてもタンパク質のCysペアーを酸化できるのではないかと考えられている。この報告は、我々の結果を支持するものである。以上、ペリプラズムは酸化的環境にあるとよく言われるが、これは呼吸鎖とカップルしたDsbBの働きによって実現されていることが明らかにされたと言えよう。

さて、DTT抵抗性を調べるにあたって、膜を調製して行う実験では、呼吸鎖欠損変異株で形成されるDsbA-DsbBジスルフィド複合体が見られなかった。培養液を直接TCA処理したときにはジスルフィド複合体は見られたことから、細胞を破碎し膜を調製する操作中に複合体は開裂したと考えられる。細胞を破碎すると細胞質に含まれる還元的な成分と出会うようになるため、DsbA/DsbB分子間のジスルフィド結合は還元されたのだろう。還元成分による還元を受けたとすると、DsbBのジスルフィドは一つ還元されるはずであるが、調製した膜に存在するDsbBは酸化型であった。空気等によって直接酸化されたのかもしれないし、もしくは同様に酸化されたDsbAが通常は起こらない逆反応を起こし、DsbBを酸化したのかもしれない。私はこれらの複雑さを除くために、DsbB[CCSS]を用いてDTT抵抗性を調べることも行った。

以上の結果から、DsbBのCys41-Cys44のDTT抵抗性は呼吸鎖機能に依存しており、呼吸鎖がDsbBのCys41-Cys44を強く酸化していることを示した。

3-4. DsbB活性の生化学的解析

BardwellグループのBaderらは、DsbAのCXXCモチーフ近傍に存在するトリプトファンに由来する蛍光が酸化型よりも還元型で三倍強いこと(55)に着目し、ストップフローを用いてDsbB酵素活性を測定するシステム、即ちDsbAの酸化反応を蛍光強度の減少で追う*in vitro*システムを構築した。彼らはストップフローを用い、密

閉系で反応速度を測定した。DsbB過剰発現膜から調製した膜小胞と還元型DsbAとを混合し、DsbAの酸化がDsbBに依存して起こることを示した。また、酸素を消費する酵素protocatechuic acid dioxygenaseでストップフローの装置内から酸素を取り除き、サンプル中の溶存酸素もアルゴンガスでバブリングして除いてからアッセイを行うと、膜小胞によるDsbA酸化は起こらなかった。これらの結果から、彼らは酸素がDsbBを直接酸化するのではないかと提案した(66)。

彼らは次いで精製DsbBを用いたDsbA酸化反応を追求した。精製DsbBを用いて上記のアッセイを行い、当初、精製標品のみで反応が起こることを観察したが、彼らはこの精製DsbB中に何らかの混在成分の関与を疑い（これには我々の呼吸鎖成分の必要性を示す*in vivo*の結果がヒントになっていたのではないかと考えている）、さらに純度をあげた精製DsbBは、単独ではDsbA酸化活性を持たないことを示した。*dsbB*欠損変異株から調製した膜の界面活性剤（n-dodecyl β -D-maltoside）可溶化物の中に、DsbBを活性化する因子の存在を見だし、精製したところ、呼吸鎖末端酸化酵素であるチトクロームbd複合体を得た。チトクロームbd複合体はチトクロームbo複合体と同様、末端酸化酵素、即ちキノールオキシダーゼとして働く。（bdが環境の酸素濃度が低いとき、boが酸素濃度が高いときに優先的に働く。）次いで、精製bo複合体もDsbB活性化能があることを示した(67)(82)。

大腸菌の呼吸鎖では、キノンが呼吸鎖の脱水素酵素と末端酸化還元酵素の間の電子伝達を直接媒介している。末端酸化酵素であるチトクロームbo, bd両複合体は、呼吸鎖基質（クエン酸回路から生成するNADHやコハク酸）を酸化する脱水素酵素により還元されたキノン即ちキノールを酸化する酵素であり、キノールを共通の基質としている。つまり、bd複合体, bo複合体は共にキノールを酸化してキノンを産出する。Bardwellらは、キノンのDsbBへの直接の関与を調べた。水溶性のユビキノンアナログを用いて、上記のアッセイでキノンによるDsbB活性化能を調べたところ、他の呼吸鎖成分が存在しなくてもキノンが存在するとDsbBを活性化できた。（上記で精製したチトクロームbo, bd内にはキノンが埋没していたと考えられる。）DsbBは（還元型DsbA依存的に）呼吸鎖キノンを還元する活性を持つこと、また、*in vitro*でキノン, 精製DsbB, 精製DsbAが存在すると、分泌タンパク質のジスルフィド結合

形成が進行することが示された(68)。

以上、呼吸鎖キノンが直接DsbBに働いてDsbシステムに酸化力を与えることが *in vitro* で示された(67)(68)。

私は、*in vivo* で呼吸鎖がDsbシステムに関与すること、呼吸鎖はDsbBのCys41-Cys44を酸化することを示した。一方、Baderらは、*in vitro* で呼吸鎖キノンが直接Dsbシステムに酸化力を供給することを明らかにした。このように、私が1997年に呼吸鎖の関与を示してから約2年のうちに、DsbA / DsbBシステムに呼吸鎖（キノン）が酸化力を供給していることが証明され、ジスルフィド結合形成というタンパク質の構造形成に関わる機構が呼吸鎖という細胞のエネルギー代謝系にまでつながっていること、タンパク質の酸化的フォールディング（ジスルフィド結合形成を伴うフォールディング）に細胞は呼吸鎖までを利用しているという驚くべき事実が明らかになった。

しかし、まだ解明されていない問題点は多数存在する。DsbBは呼吸鎖キノンからどのように酸化力を受け取るのだろうか。DsbBは金属、ヘム 金属配位モチーフを持っておらず、新しいキノンとの反応機構の存在を示唆している。DsbBのキノン結合部位の解明、電子の授受機構の解析も行わなければならないし、数種類存在する呼吸鎖キノンとのDsbBの相互作用の特異性に関する疑問も未解決である。

Beckwith グループのKadokuraらは、遺伝学的解析を行い、呼吸鎖キノンとの反応にDsbBのArg48が重要であると報告している(83)。Arg48がHis, Cysに置き換わったDsbB変異体ではDsbA酸化活性が低下し、DsbA-DsbBジスルフィド複合体が形成される。酸素濃度の低い状態では欠損はより激しくなり、DsbA、DsbBの還元型が蓄積する。Arg48がHis, Cysに置き換わった変異体はユビキノンに比べて、酸素濃度の低い条件下で働くメナキノンとの相互作用が落ちている可能性を彼らは指摘している。

3-5. 呼吸鎖とのカップリングに欠損を持つDsbB変異株

我々は呼吸鎖（キノン）とDsbBとの反応機構について調べるために、DsbBの各種変異体を作成し、活性やその酸化還元状態、DTT抵抗性などを調べた(69)。

第一ペリプラズム領域に存在するCys41-Val-Leu-Cys44モチーフ内部のXX配列を変えたCXXCモチーフ変異体を作成した。CXXCモチーフ内部のXX配列は、CXXCモチーフを持つ酵素のレドックスポテンシャルを変え、酵素の持つ酸化力を左右することが知られている。そこで、DsbBのVal42-Leu43を他の酸化還元酵素のXX配列に置き換えた。その結果、最も還元的と思われるチオレドキシン還元酵素のXX配列を持つDsbBでは、DsbA酸化活性が低下していた。しかし、DTT抵抗性は保持していた。この結果は、呼吸鎖とのカップリングはチオレドキシン型のCXXCモチーフでも可能だが、DsbAを酸化状態に維持するには不十分であることを示している。また、他のCXXCモチーフを持つ変異株でも、野生型では検出されないDsbA-DsbBジスルフィド複合体が見られたことから、これらの変異体でも、DsbA酸化活性がいくぶん減少していると考えられる。DsbBが本来持っているCXXCモチーフのレドックスポテンシャルは、DsbA酸化活性を最大にするために重要なようだ。また、CXXCモチーフの酸化力は、DsbA(Cys30)-DsbB(Cys104)ジスルフィド中間体の解離のプロセスに関与するかもしれない。例えば、DsbBのCXXCモチーフによるCys104, Cys130の分子内酸化反応と、DsbAの解離がカップルしていると考ええると、その一連のプロセスを効率良く行うためにCXXCモチーフのもつ酸化力が重要になるだろう。一方、これらのCXXCモチーフ変異株はいずれも呼吸鎖とのカップリングに大きな欠損は見られなかった。ユビキノンのレドックスポテンシャル(+70mV)はCXXCモチーフ内のシステインのレドックスポテンシャル(-270~-124mV(60))よりも遙かに高く、より酸化的である。そのため、CXXCモチーフは自身のレドックスポテンシャルが変化しても、相対的に高いレドックスポテンシャルを持つキノンから酸化力を受け取るのには、十分であるのかもしれない。

これらのCXXCモチーフDsbB変異体は、一部、野生型のDsbAとジスルフィド複合体を形成する。しかし、いずれの変異体も酸化型で存在し、DTT抵抗性を保持していることから、呼吸鎖から酸化力を受け取る能力は維持している。呼吸鎖欠損変異株で複合体が現れたとき、過剰にあるDsbAは還元型で蓄積したが、CXXC変異体ではチオレドキシン型を除いてDsbAは酸化型に維持されていた。DsbA酸化反応自体は進行しているが、おそらく反応速度が遅くなった結果、複合体つまり反応中間体

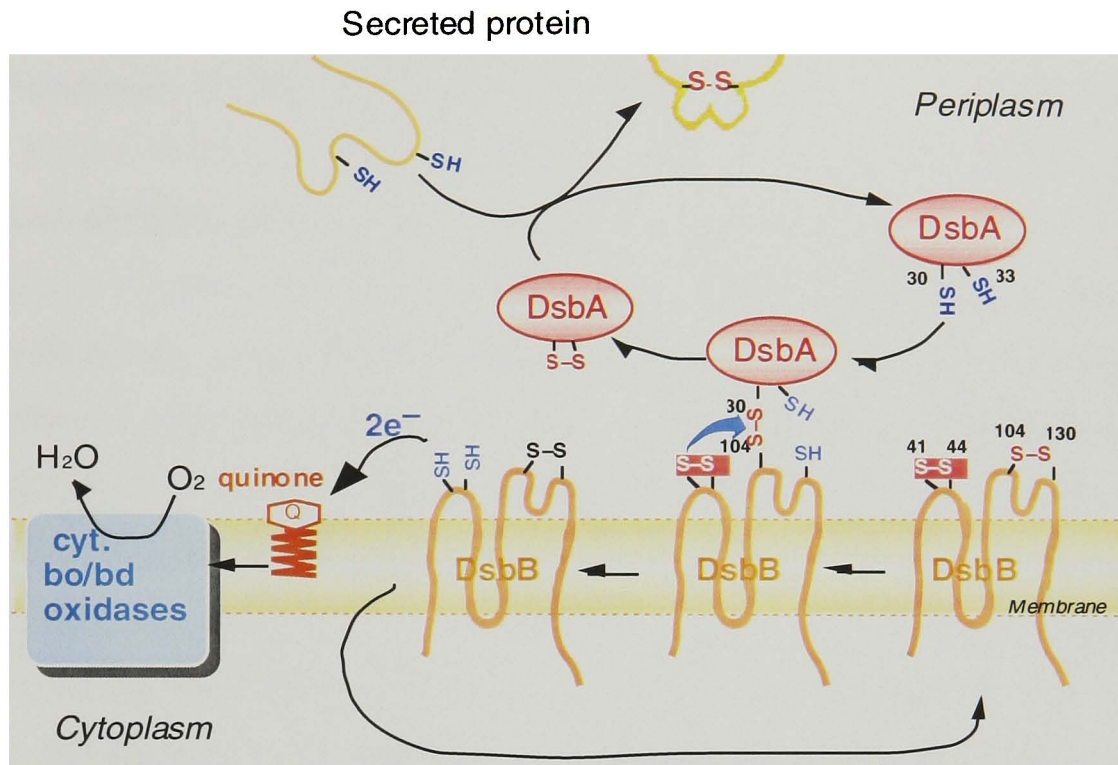
が検出されたのだらうと考えられる。複合体を形成している状態の細胞をCmで処理して新たなDsbA基質の合成を抑えると、この複合体は速やかに開裂し、酸化型のDsbA、酸化型のDsbBとなった。この結果も、複合体が反応中間体であることを支持している。

31コドン挿入DsbB変異株の中で、呼吸鎖とのカップリングに欠損を持つ、第一ペリプラズム領域に落ちた変異DsbB46::31の解析を行った。面白いことに、CXXCモチーフとそのC末端側の膜貫通領域の間(Ile45-Arg48)に、1アミノ酸以上の挿入もしくは欠損を持つ場合、DsbBは呼吸鎖から酸化力を十分に受け取ることが出来ないことが分かった。しかし、この領域(Ile45-Arg48)のアミノ酸をそれぞれアラニンに変えても、また、この領域のアミノ酸を全てアラニンに変えた場合でも、DsbBのCys41-Cys44はDTT抵抗性を保持していた。即ち、この領域のアミノ酸の性質は呼吸鎖から酸化力を受け取るためにそれほど重要ではないこと、それよりもこの領域のアミノ酸の数(長さ)が重要であることが示唆された。この領域の長さは、なぜ重要なのだらう? 私は次の可能性を考えている。ユビキノンはイソプレニル尾部とキノン環から構成されているが、イソプレニル尾部は膜内部にアンカーしており、キノン環の部分は膜表面に露出していると考えられる。単純にこのようなキノン分子の配置のため、CXXCモチーフのシステインが呼吸鎖キノンによって酸化されるためには、CXXCモチーフが膜から一定の距離にあることが必須なのかもしれない。CXXCモチーフのC末端側と膜との間の領域は、CXXCモチーフとキノン環の位置関係を決めるのに重要な役割を果たすのではないかと考えている。

さて、上記であげたアラニン挿入変異体の内、Cys44, Ile45, Tyr46, Glu47, Arg48の直後にアラニンを挿入した場合、前の4つについてはDsbB活性の低下と、DTT抵抗性の低下が見られたが、Arg48の直後にアラニンを挿入した変異体は、野生型並の活性を有していた。そこで、私は、Arg48の直後から膜貫通領域となっているのではないかと考えた。それを確かめるために、野生型DsbBでArg48の直後に存在するCys49が膜内に埋め込まれているかを、SH基修飾試薬AMSを用いて調べた。AMSは膜非透過性の試薬であり、膜内部にアクセスする事が出来ない。細胞をAMSで処理し、余分なAMSを取り除いた後、ウエスタンブロッティングを行って、AMSが付加

されているかどうかを調べたが、DsbBのCys49は修飾されていなかった（未発表データ）。Arg48の直後から膜貫通領域に入ると考えると、Arg48の後ろにAlaを挿入してもCXXCモチーフと膜との間の距離は変化しないことから、膜からの距離が重要であるとの上記の考えに一致している。

DsbBの変異株で、DsbB活性部位の膜からの距離を左右する変異は、呼吸鎖とのカップリングを失うことは興味深い。前述したが、我々の見つけたDsbBのCys41-Cys44のDTT抵抗性は膜に組み込まれている状態でのみ見られる現象であった。例えば界面活性剤によって膜を可溶化すると、DsbBはDTTによって完全に還元される。この原因としてはもちろん膜に存在するキノン（キノール）を酸化するチトクローム末端酸化酵素も可溶化されることがある。しかし、それに加えて、DsbBは膜に組み込まれている方が効率よく呼吸鎖からの酸化力を受け取っているようだ。（例えば、可溶化状態でキノンを添加してもDsbBはDTT抵抗性を失う。）膜に正しく組み込まれることで、キノンとの相互作用を最適にしているのかもしれない。またそれ以外に補助的な因子が存在する可能性も否定はできない。



A model for the disulfide bond formation cascade in *E. coli*

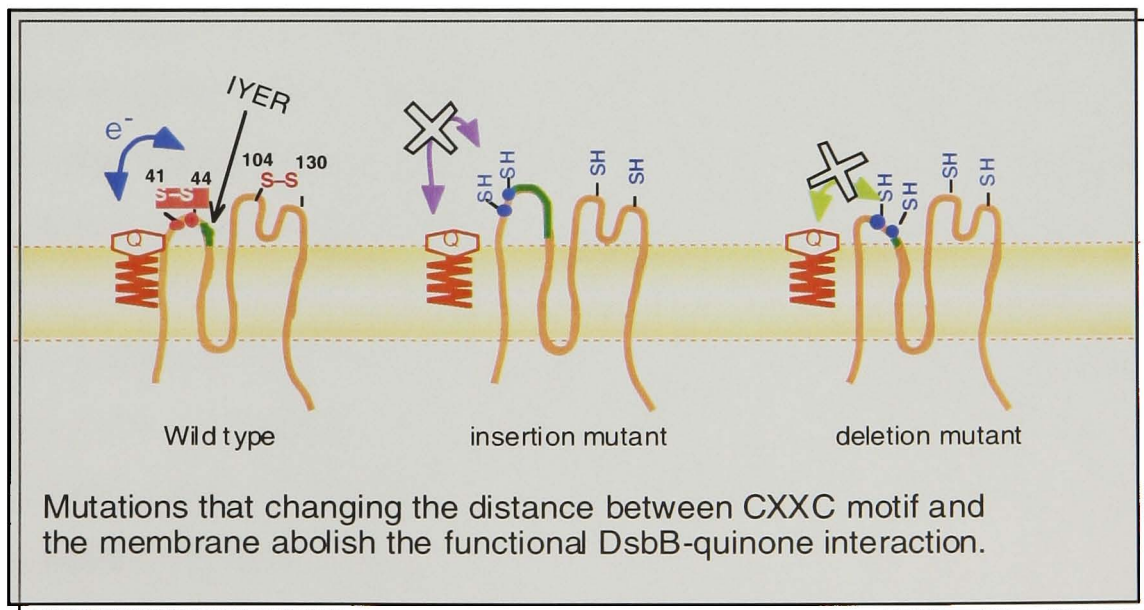


図 4 DsbA/DsbB ジスルフィド結合システムの新しいモデルと DsbB 変異体

Bardwellらの方法(67)を用いて、変異体DsbBの活性を*in vitro*で測定した（未発表データ）。野生型DsbBとアラニン挿入変異体DsbB46::1Alaをそれぞれ精製した。これらのDsbBはHis6タグを持っているので、Ni-NTAカラムで容易に精製できる。DsbB-His6-Myc過剰発現株から調製した膜をドデシルマルトシド (n-dodecyl β -D-maltoside) で可溶化し、Ni-NTAカラムに吸着させ、イミダゾール勾配で溶出後、ヒドロキシアパタイトカラム、ゲル濾過カラムにかけ、精製を行い、精製したDsbBのDsbA酸化活性を調べた。ストップフローと蛍光計を用いて、ユビキノンの水溶性アナログであるユビキノナー1を用い、キノン、還元型DsbAと触媒量の精製DsbBを混合後、DsbAの酸化反応を調べた。すると、野生型DsbBでは還元型DsbAの酸化による蛍光の減少が有意にみられた。一方、変異体DsbBではDsbA酸化活性は見られなかった。次に、DsbBによるキノン還元反応を追った。キノンはキノールに比べて約10倍の強い吸収を275nm付近に持つので、キノンからキノールへの変化は吸光度の減少で追うことができる。触媒量のDsbBによるキノンの還元反応を回転させるために多量の還元型DsbAを加えて、DsbBのキノン還元活性を調べた。すると、野生型DsbBはキノンを還元したが、変異体DsbBはキノンを還元出来なかった。以上、変異体DsbBはキノンから酸化力を受け取れず、DsbAを酸化することが出来ないことが分かった。これらのアッセイではキノンとの相互作用ができないのか、DsbAと相互作用できないのかが区別できないが、DsbB46::1Ala変異体は第一ベリプラズム領域の変異体であり、DsbA[C33S]とDsbA-DsbBジスルフィド複合体を作るので、おそらくDsbAとの相互作用自体の欠損は、それほど顕著ではないと予想される。これらのことから考察して、CXXCモチーフ後ろにアラニンが挿入した変異体は、キノンと反応できないと考えられる。現在、京都大学農学部の三芳秀人先生の研究室からユビキノンの類縁体（キノンの側鎖の長さ、位置が異なるもの等）を譲って戴いたので、それらとの反応を調べ、野生型と変異型を比較し、キノンとDsbBの電子伝達機構や反応機構の解明につとめたいと考えている。また、キノン環にアジド基を付加したユビキノナー1アナログを用いて、フォトクロスリンクを行い、キノン結合部位を決定することも考えている。また、DsbBの結晶構造が分かれば、様々な情

報がえられるであろう。今後はこれらの解明に貢献したい。

3-6. 真核生物と原核生物のジスルフィド結合形成システムの比較

真核生物のジスルフィド結合形成は小胞体内腔 (ER) で行われる。以前は、細胞質に比べてER内では酸化型グルタチオンの比(GSSG/GSH)が高いことから、酸化型グルタチオンが酸化力の源となっており、PDIが誤ったジスルフィドの掛け替えを行うと考えられていた。ところが1999年になって、タンパク質のジスルフィド結合形成に必須なタンパク質性の因子Ero1pが遺伝学解析によって見いだされた。ジスルフィド結合形成に欠損を示す変異体を酵母で探索したのだが、その方法は大腸菌でDsb因子を見つけるのに用いた方法の一つ(33)と類似していた。即ち、還元剤ジチオスレイトール(DTT)を含む培地中で生育欠損を示す変異を探索し、その結果、*ero1-1*という変異を取得、Ero1遺伝子を同定した。*ero1-1*変異株では、分泌タンパク質であるカルボキシペプチダーゼY (CPY)のジスルフィド結合形成が不全になっていた。またこの変異は、Ero1遺伝子をプラスミドから発現させると相補された。一方、グルタチオン合成酵素の欠損変異株では、CPYのジスルフィド結合形成に何の支障も見られなかったことから、ER内のジスルフィド結合形成に、酸化型グルタチオンは関与しないことが示唆された。Ero1pは膜結合型のERルーメンタンパク質であり、ER膜のルーメン（内腔）側に結合している。最近、Ero1pがPDIを酸化型に維持していること、また、PDIが分泌タンパク質にジスルフィド結合を導入することが示された(84)。即ち、PDIがジスルフィド結合導入因子であり、Ero1pがPDIを再酸化するリサイクル因子であることが示唆された。本来PDIはジスルフィド結合異性化酵素であると考えられていたが、異性化活性を積極的に示すためには基質のジスルフィド結合を攻撃するフリーのシステインを持たなければならず、還元型でなければならない。しかし、細胞内でPDIはほとんどが酸化型に保たれていることから、PDIは主にジスルフィド結合の「導入」に働くことが示唆された。また、興味深いことに、Ero1pは活性に必須な2つのシステインペアーを持ち、そのうち一つのジスルフィド結合(Cys100-Cys105)を使って、PDIを酸化すること、もう一方のシステインペアー(CXXCモチーフを形成するCys352, Cys355)は、Ero1p自身を酸化状態に維持するた

めに必要であることが示された。この結果から、Cys100-Cys105がPDIを酸化し、Cys352, Cys355が酸化力を「未知の因子」から受け取ってCys100, Cys105を再酸化するのではないかと提案されている(11)。これらが解明されるにつれ、一次配列上のホモロジーは見られないのにも関わらず、Ero1pと大腸菌DsbBの類似性の高さには驚いてしまう。しかし最近、Ero1pが何から酸化力を受け取るかが明らかにされた。大腸菌と違ってキノンではなく、FAD (flavin adenine dinucleotide) がEro1pの活性に必須であり、酸化力を供給していることが*in vivo*, *in vitro*で示された(85)。この報告によると、Ero1pはFAD 結合モチーフを持たないが、FADをnon-covalentに結合しており、周囲のFAD量に依存してPDIによる酸化的フォールディングを促進した。このEro1p/PDIによる酸化的フォールディングは、酸化型グルタチオンによるものよりも400倍も速いことが*in vitro*で示された。Ero1p活性はFAD量に依存していることから、Ero1pが利用できるFAD量の制御が、Ero1p機能制御のキーポイントである可能性が高い。

では、話を戻して、当初酸化力の源であると思われていた細胞質内と小胞体内のグルタチオン比の違いは何を意味していたのだろうか？Ero1pの細胞内の発現量を増加させると、GSSG/GSHの値は大きくなることから、酸化型グルタチオンの産生には、Ero1pが寄与していることが明らかにされた(79)。(*in vitro* でEro1p自身はグルタチオン酸化活性が無いことから、おそらく間接的にグルタチオンを酸化しているのだろうと考えられている(85)。) この結果から、細胞質よりも小胞体内で酸化型グルタチオン (GSSG)が多かったのは、GSSG自体が酸化力を供給する「原因」だったのでなく、Ero1p等の作用の「結果」であったことが明らかとなった。現在は、グルタチオンは小胞体内のレドックス緩衝液として働き、ER内の酸化ストレス等を軽減しているのではないかと提案されている(79)。(先ほど、細胞内でPDIがほぼ酸化型に保たれていると記したが、還元型のグルタチオンはPDIによるジスルフィド結合異性化活性の発揮を可能にしているかもしれない。) 一方、小胞体内の酸化型グルタチオン濃度を上昇させ、タンパク質の酸化的フォールディングを促進させる細胞質因子として、yFMO(yeast Flavin-containing monooxygenase) (86)が同定された。ER膜の細胞質側に結合していることから、yFMOの機能は、小胞体内の細胞質から酸化

型グルタチオンを輸送することではないかと提案されている。その後の解析で、この酵素は、還元ストレス下で誘導されること、その遺伝子はunfolding protein response element (UPRE)下にコードされていることが明らかにされた(87)。(ちなみにPDI, Ero1pもUPRE下にある。) yFMOは最終的にER内のGSSG濃度を増加させ、ER内の還元ストレスを緩和する様だが、具体的な機能についてはほとんど分かっていない(87)。するとこの因子がEro1pの酸化に関与する可能性も残されているかもしれない。近年、ヒトでもEro1pのホモログ、Ero1-L α , Ero1-L β が同定された(88)(89)(90)。タンパク質のジスルフィド結合形成は、detailは違うけれども機能的には、大腸菌から人にまで類似したシステムで行われているようであり、とても興味深い。

本研究によってジスルフィド結合形成システムに呼吸鎖が関与していること、また、呼吸鎖によってDsbシステムに酸化力が供給され、そのターゲットはDsbBのCys41-Cys44であることを解明した。本研究で、長い間の疑問点であったDsbシステムから放出される電子がどこにゆくのか、つまり、何によって酸化力が供給されているのかという疑問を、世界に先駆けて解決する事ができた。また、呼吸鎖とのカップリングに異常を示すDsbB変異体を初めて分離した。これらの変異株は今後の様々な機構の解明に有効であろう。私は、これらの変異株を用いて、DsbBとキノンとの反応機構の解明を行いたいと考えている。また、DsbBとDsbAの相互作用についての研究は現在高橋らによって進展中である。DsbBの分子内酸化機構も未だ十分に解明されてはいない。また、大腸菌と真核生物のジスルフィド結合形成システムには似ている点と、また、異なる点があることも興味深い。これらの問題点を解決し、ジスルフィド結合形成システムの解明に貢献したい。

第4章 材料と方法

本研究では、特に記述のない限り、大腸菌の遺伝学実験上の操作は Miller (101) 及び Silhavy (102) らの方法に、DNA 操作は Sambrook (103) 及び Asubel (104) らの方法に従い、酵素類は宝酒造、東洋紡及び New England Biolabs から、その他実験試薬は、和光純薬、ナカライテスク、Sigma から購入した。

4-1. 大腸菌株

本研究で用いた一連の大腸菌株は、全て K-12 株に由来している。

菌株	(遺伝型; 参考文献)
W3110	(wild type strain)
MC4100	(F <i>araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flbB5301</i> ; ref(91))
CU141	(MC4100 / F' <i>lacI^Q lacPL8 lacZ⁺ Y⁺ A⁺ pro⁺</i> ; ref(92))
KS272	(MC4100 <i>ΔlacX74, galE, galK, thi, rpsL150, ΔphoA</i> ; ref(93))
SS141	(SS141 (MC4100 <i>dsbB::kan5 / F'<i>lacI^Q lacPL8 lacZ⁺ Y⁺ A⁺ pro⁺</i></i> ; ref(31))
LE392	(ref(94))
H500	(LE392, <i>ΔhemA::kan</i> ; ref(73))
H500 <i>hemP</i>	(LE392, <i>ΔhemA::kan hemP</i>)
AN387	(<i>ubi⁺ men⁺</i> ; ref(95))
AN384	(AN387, <i>ubiA420 menA401</i> ; ref(77))
TA36	(KS272, <i>ubiA::Cm</i> from MU1127 (MM386, <i>ubiA::Cm</i> ; ref(95)))
TA58	(AN387, <i>dsbB::cat</i>)
TA162	(AN384, <i>dsbB::kan5</i>)
TA164	(AN387, <i>dsbB::kan5</i>)
TA228	(KS272, <i>dsbA::Km dsbB::cat</i>)
CC118	(ref(81))

4-2. プラスミド

a. ベクタープラスミド

pSTY29: pACYC 由来, マルチクローニングサイトを *lac* promoter 下に持つ (宝酒造株式会社)

pNO1575: pBR 由来, マルチクローニングサイトを *lac* promoter 下に持つ (96)

pTYE007: pBlueScript SK(-) (Stratagene 社) 由来, *lac* promoter 下にマルチクローニングサイト、更に下流に His6-Myc タグを持つ (97)

pTWV229:pBR322由来, *lac promoter* 下にマルチクローニングサイトを持つ (宝酒造株式会社)

pSS52: pSTV29をPstIで切断後、T4 Polymeraseで末端を平滑化し、再びself-ligationをすることにより*lacZ*部分にフレームシフトを誘起したもの。

b. 種々の遺伝子を含むプラスミド

pSS39: pSTV29の*lac promoter* 下に、W3110由来の*dsbB* 遺伝子をクローニングしたもの(31)。

pSS1: pNO1575の*lac promoter* 下にpKY192(22)由来の*bla-phoA* 遺伝子をクローニングしたもの。

pSS43: pTYE007の*lac promoter* 下にDsbB[CCCC]-His6-Mycをコードする(63)。

pSS51: pSS52の*lac promoter* 下にDsbB[CCCC]-His6-Mycをコードする(63)。

pTAK1: pSS51のHindIII-KpnI断片(*dsbB-his6-myc*)をpTWV229にリクローニングした。

DsbBのCys→Ser置換変異

pSS44: pTYE007の*lac promoter* 下にDsbB[SCCC]-His6-Mycをコードする。

pSS45: pTYE007の*lac promoter* 下にDsbB[CSCC]-His6-Mycをコードする。

pSS46: pTYE007の*lac promoter* 下にDsbB[CCSC]-His6-Mycをコードする。

pSS47: pTYE007の*lac promoter* 下にDsbB[CCCS]-His6-Mycをコードする。

pSS53: pSS52の*lac promoter* 下にDsbB[SCCC]-His6-Mycをコードする(63)。

pSS54: pSS52の*lac promoter* 下にDsbB[CSCC]-His6-Mycをコードする(63)。

pSS55: pSS52の*lac promoter* 下にDsbB[CCSC]-His6-Mycをコードする(63)。

pSS56: pSS52の*lac promoter* 下にDsbB[CCCS]-His6-Mycをコードする(63)。

pTAK4: pTYE007の*lac promoter* 下にDsbB[SSCC]-His6-Mycをコードする。

pSS44にSite direct mutagenesisでCys44Serを導入して作成した。

pTAK7: pTYE007の*lac promoter* 下にDsbB[CCSS]-His6-Mycをコードする。

pSS46にSite direct mutagenesisでCys130Serを導入して作成した。

pTAK8: pSS52の*lac promoter* 下にDsbB[SSCC]-His6-Mycをコードする。

pTAK4のKpnI-BamHI断片(*dsbB-his6-myc*)をpSS52にリクローニングした。

pTAK10: pSS52の*lac promoter* 下にDsbB[CCSS]-His6-Mycをコードする。

pTAK6のKpnI-BamHI断片(*dsbB-his6-myc*)をpSS52にリクローニングした。

pTAK14: pTYE007の*lac promoter* 下にDsbB[CSSS]-His6-Mycをコードする。

pTAK7のAflIII-BsgI断片2.8kbとpSS45のAflIII-BsgI断片0.7kbをつないで作成した。

pTAK18: pSS52の*lac promoter* 下にDsbB[CSSS]-His6-Mycをコードする。

pTAK14のKpnI-BamHI断片(*dsbB-his6-myc*)をpSS52にリクローニングした。

DsbBのCXXCモチーフ内部のXX配列 (Val42-Leu43) の置換変異：プライマー欄に示すmutagenic primerを用いて、Site direct mutagenesisを行い、作成した。

pTAK30: pSS51のDsbBのVal42-Leu43をGly-Hisに置き換えた。

pTAK31: pSS51のDsbBのVal42-Leu43をGly-Proに置き換えた。

pTAK32: pSS51のDsbBのVal42-Leu43をPro-Hisに置き換えた。

pTAK33: pSS51のDsbBのVal42-Leu43をGly-Tyrに置き換えた。

pTAK34: pSS51のDsbBのVal42-Leu43をVal-Alaに置き換えた。

pTAK35: pSS51のDsbBのVal42-Leu43をPro-Thrに置き換えた。

DsbBのアラニン置換変異。プライマー欄に示すmutagenic primerを用いて、Site direct mutagenesisを行い、作成した。

pTAK56: pTAK1のDsbBのIle45をAlaに置換した。

pTAK58: pTAK1のDsbBのTyr46をAlaに置換した。

pTAK60: pTAK1のDsbBのGlu47をAlaに置換した。

pTAK62: pTAK1のDsbBのArg48をAlaに置換した。

DsbBの挿入、欠失変異。プライマー欄に示すmutagenic primerを用いて、Site direct mutagenesisを行って、作成した。

pTAK44: pTAK1のDsbBのTyr46のC末端側にAla-Asp-Ser-Tyr-Thr-Gln-Valの挿入を持つ。

pTAK67: pTAK1のDsbBのTyr46のC末端側に一つAlaの挿入を持つ。

pTAK155: pTAK1のDsbBのTyr46のC末端側に二つAlaの挿入を持つ。

pTAK157: pTAK1のDsbBのTyr46のC末端側に三つAlaの挿入を持つ。

pTAK89: pTAK1のDsbBのCys44のC末端側にAlaの挿入を持つ。

pTAK91: pTAK1のDsbBのIle45のC末端側にAlaの挿入を持つ。

pTAK92: pTAK1のDsbBのGlu47のC末端側にAlaの挿入を持つ。

pTAK124: pTAK1のDsbBのArg48のC末端側にAlaの挿入を持つ。

pTAK49: pTAK1のDsbBのTyr46を欠失している。

DsbB[CCSS]変異体

pTAK115:pTAK44のDsbB[CCSS]版

pTAK44のAflIII-BsgI断片(0.8kb)はpTAK10のAflIII-BsgI断片(2.8 kb)につなぎ、そのKpnI-HindIII断片(*dsbB-his6-myc*)をpTWV229にリクローニングした。

pTAK116: pTAK49のDsbB[CCSS]版

pTAK117: pTAK62のDsbB[CCSS]版

pTAK120: pTAK89のDsbB[CCSS]版

pTAK121: pTAK91のDsbB[CCSS]版

pTAK118: pTAK67のDsbB[CCSS]版

pTAK122: pTAK92のDsbB[CCSS]版

4-3. プライマー

Site Direct mutagenesisに用いたプライマーセットの片方を示す。Site Direct mutagenesisは、QuickChange Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene 社製)を用いて行った。

[DsbBのCys→Ser置換変異]

Cys44Ser 5'-CCTAGCGTGCTCTCTATTTATGAACG-3'

Cys130Ser 5'-CCGTTTGCCACCTCTGATTTTATGG-3'

[DsbBのCXXCモチーフ内部のXX配列 (Val42-Leu43) の置換]

Val42-Leu43→Gly-His	5'-CTGAAACCTTGCGGTCAGTGTATTTATGAACGC-3'
Val42-Leu43→Gly-Pro	5'-CTGAAACCTTGCGGTCCGTGTATTTATGAACGC-3'
Val42-Leu43→Pro-His	5'-CTGAAACCTTGCCCCGCACTGTATTTATGAACGC-3'
Val42-Leu43→Gly-Tyr	5'-CTGAAACCTTGCGGTACTGTATTTATGAACGC-3'
Val42-Leu43→Val-Ala	5'-CTGAAACCTTGCGGTACTGTATTTATGAACGC-3'
Val42-Leu43→Pro-Thr	5'-CTGAAACCTTGCGTGGCCTGTATTTATGAACGC-3'

[DsbBのアラニン置換変異]

Ile45Ala	5'-GCGTGCTCTGTGCTTATGAACGCTG-3'
Tyr46Ala	5'-GTGCTCTGTATTGCGGAACGCTGCGC-3'
Glu47Ala	5'-GCTCTGTATTTATGCACGCTGCGCG-3'
Arg48Ala	5'-GCTCTGTATTTATGCACGCTGCGCG-3'

[DsbBの挿入、欠失変異]

Tyr46のC末端側への挿入

7 アミノ酸(Ala-Asp-Ser-Tyr-Thr-Gln-Val)挿入

5'-GCTGACTCTTATACACAAGTAGAACGCTGCGCGTTATTCGGC-3'

1 Alaの挿入	5'-CTCTGTATTTATGCGGAACGCTGCGCG-3'
2 Alaの挿入	5'-CTCTGTATTTATGCGGCCGAACGCTGCGCGTTATTC-3'
3 Alaの挿入	5'-GTATTTATGCGGCCGCTGAACGCTGCGCGTTATTC-3'

Cys44, Ile45, Glu47, Arg48のC末端側へ1つAla挿入

Cys44のC末端側	5'-GCGTGCTCTGTGCGATTATGAACG-3'
Ile45のC末端側	5'-GTGCTCTGTATTGCGTATGAACGCTGC-3'
Glu47のC末端側	5'-GTATTTATGAAGCCCGCTGCGCG-3'
Arg48のC末端側	5'-GTATTTATGAACGCGCCTGCGCGTTATTC-3'

欠失変異

ΔTyr46 5'-GAAACCTTGCGTGCTCTGTATTGAACGCTGCGCGTTATTCGGC-3'

4-4. 培地と培養条件

L培地は、1リットルあたり、10 g の trypton、5 g の yeast extract、5 g の NaCl、1.7 mmol の NaOH を含んでいる。グルコースは最終濃度 0.4% になるように、また、リン酸緩衝液 (pH 7.5) を K_3PO_4 の最終濃度が 0.09 M になるように L 培地に添加した。

次の薬剤は、カッコ内に示す濃度になるように、添加した。

5-Aminolevulinic acid (ALA; 50 µg/ml)
 hemin chloride (10 µg/ml)
 p-hydroxybenzoate (PHB; 100 µg/ml)

Isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG; 1 mM)
cyclic AMP (cAMP; 1mM)

細胞の培養は、全て 37℃で、振盪により好氣的に行った。また、その増殖の程度はクレット光電比色計 (No. 54 フィルター)、もしくはタイテックの Photo meter 518 を用いて調べた。

4-5. 膜の調製

培養液を氷上で冷却し、遠心操作で pellet down した菌を 10mM Tris-HCl (pH 8.1), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む buffer 中に懸濁し、氷水で冷却しつつ超音波破碎機 (Heat Systems Ultrasonicator) で 20 秒間細胞を破碎する操作 (sonication) を 3 回行った。破碎されていない細胞を、4℃で 9000g × 5min の遠心操作で取り除き、上澄み液を 4℃、530000g × 20 min、超遠心機 (Hitachi Micro Ultracentrifuge) で遠心操作を行った。ベレットとして得られた膜は、上記の buffer に懸濁し、膜サンプル (膜標品) とした。

4-6. タンパク質の酸化還元状態の決定

1) TCA 沈殿

細胞培養液、もしくは膜サンプルを含む溶液に等量の 10% の TCA 水溶液を加え、0℃で 20 min 以上 放置して全タンパク質を変性・沈殿させ、遠心により回収後、アセトンで 2 回洗浄して TCA を取り除き、その後、1% SDS 溶液に溶解させる。

2) SH 基修飾試薬による修飾

タンパク質のジスルフィド結合の有無を調べるために、TCA 沈殿後に溶解させる SDS 溶液中に SH 基修飾試薬 IAA もしくは AMS を添加しておき、SH 基の人工的な酸化を防いだ。AMS (molecular probe 社) を添加した場合は、人工的な酸化を防ぐと同時にタンパク質の SDS-PAGE における移動度を遅らせることができる。SH 基修飾試薬に IAA を用いる場合、Zalkin らの方法 (70) で、SDS-Tris-EDTA 溶液 (1.5% SDS, 100 mM Tris, 5 mM EDTA; pH 9.0) に 35 mM になるよう IAA を加えて実験を行った。また、SH 基修飾試薬に AMS (molecular probe 社) を用いる場合、SDS-Tris 溶液 (1% SDS, 50mM Tris; pH 7.5 もしくは 1% SDS, 100mM Tris; pH 7.5) に 15 mM、あるいは 20mM になるよう AMS を加えた。SDS 溶液に溶解させるには、室温で 30min、穏やかに攪拌した。その後、AMS を用いているものには 37℃で 10min の処理 (72) を行った。等量の 2×SDS sample buffer (125 mM Tris (pH 8.1), 4% SDS, 20% (v/v) Glycerol, 微量 Bromophenol Blue) を加えた後、可溶性タンパク質を目的とする場合 100℃で 3min、膜タンパク質を目的とする場合 37℃で 5min の処理を行った。

3) SDS-PAGE

上記の方法で調製したサンプルを、次に示す方法の SDS-PAGE で分離した。DsbA、 β -ラクタマーゼ、DsbB の分離には、特に記述しない限り Leammli の 12.5% のポリアクリルアミドゲル (98) を用いた。DsbB の分離には、改良法 (15%

Acrylamide-0.12% N, N'-methylene-bis-acrylamide, 250 mM Tris (pH 8.7), 10mM NaCl, 0.1% SDS を分離ゲルとした方法)(99)も用いた。還元状態での SDS-PAGE を行う場合は、サンプルに 1/10 容量の 1.4M β -メルカプトエタノールを加え、非還元状態での SDS-PAGE を行う場合は、還元剤を加えないで、電気泳動を行った。

また、非還元/還元 の 2 次元電気泳動には、まず、非還元状態で一次元目の SDS-PAGE を行い、泳動ゲルの 1 レーン分を切り出し、10% (v/v) の β -メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer 中で、37℃ で 30min 攪拌した後、2 次元目のゲルのスタッピングゲル上部に水平に密着させて電気泳動を行った。

4) ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE により各タンパク質を分離した後、泳動ゲルをセミドライ型タンパク質転写装置で PVDF メンブレン (Immobilon-P™, MILLIPORE 社) に電気泳動的に転写した。タンパク質が転写したメンブレンを Blotto (5% スキムミルクを含む PBS-Tween20 Buffer: 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 0.02% NaNH_2 , 0.1% (v/v) Tween20) 中で 42℃ で 1 時間、もしくは 4℃ で一晩浸してブロッキングを行い、その後、下記の濃度に希釈した一次抗体を含む Blotto に室温で 1 時間浸して一次抗体処理を行い、PBS-Tween20 Buffer で洗浄後、希釈した二次抗体を含む PBS-Tween20 Buffer に室温で 1 時間浸して二次抗体処理を行った。メンブレンを PBS-Tween20 Buffer で洗浄した後、ウエスタンブロッティング検出キット (ECL™, Amersham Pharmacia Biotech 社) をもちい、二次抗体上のペルオキシダーゼによる発光を X 線フィルム上に露光して、または、富士フィルムの Luminescence Image Analyzer (LAS-1000) を用いて検出した。

【一次抗体】	ウサギポリクローナル抗 DsbA 抗体	1/5000 に希釈
	ウサギポリクローナル抗 β -ラクタマーゼ抗体	1/5000 に希釈
	ウサギポリクローナル抗 DsbB 抗体	1/100 に希釈
	ウサギポリクローナル anti-c-Myc(A-14) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)	1/3000 に希釈
【二次抗体】	西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ抗ウサギ IgG (H+L), Biorad 社)	1/5000 に希釈

4-7. DsbB 抗体の作製と精製

DsbB の C 末端のアミノ酸配列に相当する 14 残基の N 末端に Cys を付加した合成ペプチド (NH_2 -CSQPFKAKKRDLFGR-COOH) を作り、このペプチドの N 末端の Cys に keyhole limpet hemocyanin (KLH) をカップリングさせたものを、ウサギに inject し、ポリクローナル抗体を作製した。以上の操作はサワデー社に依頼して行った。得られた抗血清を、抗体作製に用いたペプチドを N 末端の Cys で Thiopropyl Sepharose 6B (Amersham Pharmacia Biotech) にカップリングしたカラムに通し、Tris (pH 7.5) 緩衝液で洗浄後、カラムに結合した抗体を 0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5) で溶出し、すぐに 2 M Tris (pH 8.0) 緩衝液で中和する操作を行ってアフィニティー精製を行った。

4-8. DTT抵抗性のアッセイ

培養液を氷上で冷やし、遠心分離で集菌後、10mM Tris-HCl バッファー(pH 8.1)に懸濁したもの、もしくは膜標品を、20mM DTTの存在下で氷上 10 分間インキュベートした。その後、TCAを終濃度5%になるように加え、反応をストップさせ、AMS修飾を行った。

4-9. DTTを含む培地を用いたviabilityの観察

L-glucose培地に IPTG、cAMPをそれぞれ終濃度 1mMになるように加え、各濃度になるようにDTTを添加したプレートを作成し、その後、すぐにアッセイに用いた。一方、植菌用の細胞をL-glucose培地中でKU=40まで増やし、培養液を生理食塩水で10倍ごとに希釈を行い、各希釈液から2 μ lを上記のプレート上にスポットし、37℃で20時間培養を行った。

4-10. 残存チオールの定量方法

チオールの定量はチオール定量試薬5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB; Ellman's Reagent)を用いて(79)、終濃度0.1mMになるようにサンプルに加え、混合後すぐに412nmの吸収を測定した。

参考文献

1. 伊藤維昭 (1994) 永田和宏編 . ストレスタンパク質-基礎と臨床, 49-61.
2. Gething, M. J. and Sambrook, J. (1992) *Nature*, **355**, 33-44.
3. Bardwell, J. C. A. (1994) *Mol. Microbiol.*, **14**, 199-205.
4. Missiakas, D. and Raina, S. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 2465-2471.
5. Raina, S. and Missiakas, D. (1997) *Annu. Rev. Microbiol.*, **51**, 179-202.
6. Bulleid, N., J. (1993) *Advances In Protein Chemistry*, **44**, 125-148.
7. Schmid, F., X., Mayr, L., M., Mucke, M. and Schonbrunner, E., R. (1993) *Advances In Protein Chemistry*, **44**, 25-65.
8. Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. and White, F. H. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 1309-1314.
9. Goldberger, R. F., Epstein, C. J. and Anfinsen, C. B. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 628-635.
10. Frand, A. R., Cuozzo, J. W. and Kaiser, C. A. (2000) *Trends in Cell Biol.*, **10**, 203-210.
11. Frand, A. R. and Kaiser, C. A. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2833-2843.
12. Thronton, J. M. (1981) *J. Mol. Biol.*, **151**, 261-287.
13. Derman, A. I. and Beckwith, J. (1991) *J. Bacteriol.*, **173**, 7719-7722.
14. Holmgren, A. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 13963-13966.
15. Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D. and Beckwith, J. (1993) *Science*, **262**, 1744-1747.
16. Prinz, W. A., Asuland, F., Holmgren, A. and Beckwith, J. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 15661-15667.
17. Stewart, E. J., Åslund, F. and Beckwith, J. (1998)
18. Åslund, F., Zheng, M., Beckwith, J. and Storz, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 6161-6165.
19. Jakob, U., Muse, W., Eser, M. and Bardwell, J. C. A. (1999) *Cell*, **96**, 341-352.
20. Åslund, F. and Beckwith, J. (1999) *Cell*, **96**, 751-753.
21. Bardwell, J. C. A., McGovern, K. and Beckwith, J. (1991) *Cell*, **67**, 581-589.
22. Kamitani, S., Akiyama, Y. and Ito, K. (1992) *EMBO J.*, **11**, 57-62.
23. Bardwell, J. C. A., Lee, J. O., Jander, G., Martin, N., Belin, D. and Beckwith, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 1038-1042.
24. Sone, M., Akiyama, Y. and Ito, K. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 10349-10352.

25. Hwang, C., Sinskey, A. J. and Lodish, H. F. (1992) *Science*, **257**, 1496-1502.
26. Frand, A. R. and Kaiser, C. A. (1998) *Mol. Cell*, **1**, 161-170.
27. Pollard, M. G., Travers, K. J. and Weissman, J. S. (1998) *Mol. Cell*, **1**, 171-182.
28. Akiyama, Y. and Ito, K. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 8146-8150.
29. Akiyama, Y., Kamitani, S., Kusukawa, N. and Ito, K. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 22440-22445.
30. Connolly, L., Penas, A. D. L., Alba, B. M. and Gross, C. A. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 2012-2021.
31. Kishigami, S., Kanaya, E., Kikuchi, M. and Ito, K. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 17072-17074.
32. Gilhot, C., Jander, G., Martin, N., L. and Beckwith, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 9895-9899.
33. Missiakas, D., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 7084-7088.
34. Missiakas, D., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1994) *EMBO J.*, **13**, 2013-2020.
35. Andersen, C. L., Matthery-Dupraz, A., Missiakas, D. and Raina, S. (1997) *Mol. Microbiol.*, **26**, 121-132.
36. Missiakas, D., Schwager, F. and Raina, S. (1995) *EMBO J.*, **14**, 3415-3424.
37. Crooke, H. and Cole, J. (1995) *Mol. Microbiol.*, **15**, 1139-1150.
38. Zapun, A., Missikas, D., Raina, S. and Creighton, T. E. (1995) *Biochemistry*, **34**, 5075-5089.
39. McCarthy, A. A., Haebel, P. W., Törrönen, A., Rybin, V., Baker, E. N. and Metcalf, P. (2000) *Nature Struct. Biol.*, **7**, 196-199.
40. Bessete, P. H., Cotto, J. J., Gilbert, H. F. and Georgiou, G. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 7784-7792.
41. Chen, J., Song, J., Zhang, S., Wang, Y., Cui, D. and Wang, C. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 19601-19605.
42. Shao, F., Bader, M. W., Jakob, U. and Bardwell, J. C. A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 13349-13352.
43. Joly, J. C. and Swartz, J. R. (1997) *Biochemistry*, **36**, 10067-10072.
44. Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G. and Beckwith, J. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 6602-6608.
45. Rietsch, A., Belin, D., Martin, N. and Beckwith, J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 13048-13053.
46. Stewart, E. J., Katzen, F. and Beckwith, J. (1999) *EMBO J.*, **18**, 5963-5971.

47. Chung, J., Chen, T. and Missiakas, D. (2000) *Mol. Microbiol.*, **35**, 1099-1109.
48. Gordon, E. H., Page, M. D., Willis, A. C. and Ferguson, S. J. (2000) *Mol. Microbiol.*, **35**, 1360-1374.
49. Katzen, F. and Beckwith, J. (2000) *Cell*, **103**, 769-779.
50. Krupp, R., Chan, C. and Missiakas, D. (2000) *J. Biol. Chem.*, **in press**.
51. Martin, J. C. L., Bardwell, J. C. A. and Kuriyan, J. (1993) *Nature*, **365**, 464-468.
52. Wunderlich, M., Otto, A., Seckler, and Glockshuber, R. (1993) *Biochemistry*, **32**, 12251-12256.
53. Zapun, A. and Creighton, T. E. (1994) *Biochemistry*, **33**, 5202-5211.
54. Kanaya, E., Anaguchi, H. and Kikuchi, M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 4273-4278.
55. Zapun, A., Bardwell, J. C. A. and Creighton, T. E. (1993) *Biochemistry*, **32**, 5083-8092.
56. Nelson, J. W. and Creighton, T. E. (1994) *Biochemistry*, **33**, 5974-5983.
57. Wunderlich, M. and Glockshuber, R. (1993) *Protein Sci.*, **2**, 717-726.
58. Wunderlich, M., Jaenicke, R. and Glockshuber, R. (1993) *J. Mol. Biol.*, **233**, 559-566.
59. Grauschopf, U., Winther, J. R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P. and Bardwell, J. C. A. (1995) *Cell*, **83**, 947-955.
60. Åslund, F., Berndt, K. D. and Holmgren, A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 30780-30786.
61. Kishigami, S., Akiyama, Y. and Ito, K. (1995) *FEBS Lett.*, **364**, 55-58.
62. Jander, G., Martin, N. L. and Beckwith, J. (1994) *EMBO J.*, **13**, 5121-5127.
63. Kishigami, S. and Ito, K. (1996) *Genes to Cells*, **1**, 201-208.
64. Kobayashi, T., Kishigami, S., Sone, M., Inokuchi, H., Mogi, T. and Ito, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 11857-11862.
65. Kobayashi, T. and Ito, K. (1999) *EMBO J.*, **18**, 1192-1198.
66. Bader, M., Muse, W., Zander, T. and Bardwell, J. C. A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 10302-10307.
67. Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C. and Bardwell, J. C. A. (1999) *Cell*, **98**, 217-227.
68. Bader, M. W., Xie, T., Yu, C.-A. and Bardwell, J. C. A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 26082-26088.
69. Kobayashi, T., Takahashi, Y. and Ito, K. (2000) *Mol. Microbiol.*, **in press**.
70. Pollitt, S. and Zalkin, H. (1983) *J. Bacteriol.*, **153**, 27-32.
71. Vestweber, D. and Schatz, G. (1988) *J. Cell Biol.*, **107**, 2045-2049.
72. Uchida, K., Mori, H. and Mizushima, S. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 30863-30868.
73. Nakayashiki, T., Nishimura, K., Tanaka, R. and Inokuchi, H. (1995) *Mol. Gen.*

- Genet.*, **249**, 139-146.
74. Avissar, Y. J. and Beale, S. I. (1989) *J. Bacteriol.*, **171**, 2919-2924.
 75. Drolet, M., Péloquin, Y., Cousineau, L. and Sasarman, A. (1989) *Mol. Gen. Genet.*, **216**, 347-352.
 76. Schultz, S. C., Dalbadie-McFarland, G., Neitzel, J. J. and Richards, J. H. (1987) *Proteins*, **2**, 290-297.
 77. Wallace, B. J. and Young, I. G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.*, **461**, 84-100.
 78. Young, I. G., Leppik, R. A., Hamilton, J. A. and Gibson, F. (1972) *J. Bacteriol.*, **110**, 18-25.
 79. Cuozzo, J. W. and Kaiser, C. A. (1999) *Nature Cell Biol.*, **1**, 130-135.
 80. Bardwell, J. C. A. and Beckwith, J. (1993) *Cell*, **74**, 769-771.
 81. Manoil, C. and Bailey, J. (1997) *J. Mol. Biol.*, **267**, 250-263.
 82. Glockshuber, R. (1999) *Nature*, **401**, 30-31.
 83. Kadokura, H., Bader, M., Tian, H., Bardwell, J. C. A. and Beckwith, J. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 10884-10889.
 84. Frand, A. R. and Kaiser, C. A. (1999) *Mol. Cell*, **4**, 469-477.
 85. Tu, B. P., Ho-Schleyer, S. C., Travers, K. J. and Weissman, J. S. (2000) *Science*, **290**, 1571-1574.
 86. Suh, J.-K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M. and Robertus, J. D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 2687-2691.
 87. Suh, J.-K. and Robertus, J. D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 121-126.
 88. Cabibbo, A., Pagani, M., Fabbri, M., Rocchi, M., Farmery, M. R., Bulleid, N. J. and Sitia, R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4827-4833.
 89. Benham, A. M., Cabibbo, A., Fassio, A., Bullied, N., Sitia, R. and Baakman, I. (2000) *EMBO J.*, **19**, 4493-4502.
 90. Pagani, M., Fabbri, M., Benedetti, C., Fassio, A., Pilati, S., Bulleid, N. J., Cabibbo, A. and Sitia, R. (2000)
 91. Casadaban, M. (1976) *J. Mol. Biol.*, **104**, 541-555.
 92. Akiyama, Y., Ogura, T. and Ito, K. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 5218-5224.
 93. Strauch, K. L. and Beckwith, J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 1576-1580.
 94. Bork, K., Beggs, J. D., Brammar, W. J., Hopkins, A. S. and Murray, N. E. (1976) *Mol. Gen. Genet.*, **146**, 199-207.
 95. Suzuki, K., Ueda, M., Yuasa, M., Nakagawa, T., Kawamura, M. and Matsuda, H. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1814-1819.
 96. Ito, K., Wittekind, M., Nomura, M., Shiba, K., Yura, T., Miura, A. and Nashimoto,

- H. (1983) *Cell*, **32**, 789-797.
97. Akiyama, Y., Yoshihisa, T. and Ito, K. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 23485-23490.
98. Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
99. Ito, K., Bassford, P. and Beckwith, J. (1981) *Cell*, **24**, 707-717
100. Dartigalongue, C., Nikaido, H. and Raina, S. (2000) *EMBO J.*, **19**, 5980-5988.
101. Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
102. Silhavy, T. J., Berman, M. L. and Enquist, L. W. (1984) *Experiments with Gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, N. Y.
103. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory press, N. Y.
104. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Stuhl, K. (1990) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.

謝辞

本研究にあたり、多くの方々のご助力をいただきました。この場をお借りしまして、感謝の意を表したいと思います。

伊藤維昭教授には、修士課程入学以来、実験の具体的操作はもちろん、研究への取り組み方や進め方など、ここには書ききれないほどの事を、熱心にかつ細やかな配慮でご指導していただきました。深く感謝しています。DsbA/DsbBによるジスルフィド結合形成に呼吸鎖が関与しているという面白いテーマに取り組み、それを明らかにすることができたのは、先生の的確なご助言のおかげだと思っています。とても幸運でしたし、楽しかったです。未熟者ですが、これからもよろしくお願いします。

秋山芳展博士、森博之博士には、実験技術や研究の進め方など、詳しくご指導していただきました。また多くのご助言をいただきました。深く感謝しています。

東京大学の茂木立志博士、京都大学の井口八郎博士には呼吸鎖欠損変異株を、京都大学の三芳秀人博士にはキノン類縁体を快く分与していただき、また数々のご助言をいただきました。ありがとうございます。

構造形成分野の研究室の皆さんには大変お世話になりました。望月清子さんには、事務的なことばかりでなく、研究が進めやすい環境を整えていただきました。現NIHの岸上哲志博士、現群馬大学の曾根道夫博士にはDsbの実験に関する多くのご助言をいただきました。高橋由貴さんには、実験を進めるにあたり貴重な変異株を分与していただきました。現基生研の白井良憲博士、現北海道大学の木原章雄博士、現通産省工業技術院の本間貴之博士には実験操作等、様々なことを教えていただきました。当研究室の松尾英一博士、松本弦博士には、研究に対する姿勢や実験操作を教わり、また公私共に相談にのっていただきました。稲葉謙二博士には理論等を教えていただきました。Zsolt Segletes博士、中戸川仁君、千葉志信君、才川直哉君、金原和江さん、佐藤康成君、千葉和彦君、下川直美さん、下畑宣行君、清水祐介君にも、色々とお世話になりました。矢部俊樹君には実験補助を、佐野美千代さん、山田幹浩君、山崎麻紀さん、北沢知美さん、山口恵さん、桜井良子さん、八又政子さん、中川さとのさん、塚崎昌子さんには、実験補助や洗い物をしていただきました。その他、個々に名前をあげなかった方々にも大変お世話になりました。ありがとうございます。