

氏名	こ ばやし たえ こ 小 林 妙 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2318 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	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

論文調査委員 (主 査) 教 授 伊 藤 維 昭 教 授 丸 岡 啓 二 助 教 授 秋 山 芳 展

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質の立体構造形成の過程の中で、化学結合の変化を伴うものにジスルフィド結合の形成がある。ジスルフィド結合は、細胞表層タンパク質に特徴的に見られ、真核細胞では小胞体内腔で、大腸菌ではペリプラズム空間において、膜を越えて輸送されたタンパク質に対して導入される。これは、システイン残基の酸化という単純な化学反応であるが、生体内で有効に起こるためには特異的な因子による補助が必要である。大腸菌のペリプラズムタンパク質 DsbA はタンパク質にジスルフィド結合を導入する酵素である。DsbA はその活性中心 (Cys30-X-X-Cys: 酸化されジスルフィド状態にある) によって新生分泌タンパク質中のシステイン残基のペアーを酸化してジスルフィド結合を導入する。その結果還元された DsbA の Cys30, Cys33 は膜蛋白質 DsbB によって再酸化・リサイクルされる。DsbB は 4 回膜貫通タンパク質であり、二つのペリプラズム領域に活性に必須のシステイン残基を 2 個ずつ持つ。本研究では、DsbB がどのように酸化状態に保たれるのか、言い換えると、DsbA-DsbB 系への酸化力がどのように供給されるのかという未解決の問題を追求した。

申請者は、呼吸鎖電子伝達系の関与を考え、呼吸鎖成分が欠損した状態の大腸菌細胞内における DsbA, DsbB の酸化還元状態を調べた。まず、細胞内タンパク質におけるチオール基の酸化還元状態を正確に決定するため、酸変性の後チオール基をアルキル化剤 4-acetoamido-4'-maleimidylstilbene-2, 2'-disulfonic acid で修飾し、電気泳動で分離する実験方法を確立した。そして、呼吸鎖機能に必要なプロトヘムを欠乏させたとき、また、呼吸鎖の重要成分であるキノンを欠乏させたときには、DsbA が還元型となり、その結果分泌タンパク質のジスルフィド結合形成が不全となることを明らかにした。この時、DsbB は、DsbA が還元型で蓄積するより以前に還元され次いで DsbA とのジスルフィド複合体となって機能を停止した。これらの結果から、呼吸鎖機能が DsbA, DsbB を介して起こるジスルフィド結合形成反応に必要であること、呼吸鎖機能の標的は DsbB であることを示した。

次に、DsbB の酸化還元状態を詳細に調べた。DsbB は通常 2 個のジスルフィド結合 (Cys41-Cys44, Cys104-Cys130) を形成していること、Cys104-Cys130 ジスルフィドの形成は Cys41 と Cys44 の存在に依存していることを明らかにした。また、DsbB の第一ペリプラズムドメインの Cys41-Cys44 ジスルフィドが、見かけ上還元剤によって還元されない特異な状態にあることを見出した。この現象は、膜標品においても観察されたが、呼吸鎖成分が欠損している時、脱気状態、あるいは界面活性剤で膜を可溶化した時には失われた。これらの結果から、DsbB の Cys41 と Cys44 は膜中において呼吸鎖成分と共役して、酸素により強く酸化されていることが明らかとなった。

上記の研究に引き続いて、米国のグループにより、呼吸鎖成分のうちキノンが直接 DsbB の活性化に働くとの *in vitro* の結果が発表された。申請者は呼吸鎖成分による酸化を受けるために重要な DsbB の領域を、詳細な変異解析によって見出した。DsbB の Cys41-Val-Leu-Cys44 の C 末端側に引き続く膜貫通領域との間に位置する 4 残基 (Ile45-Tyr46-Glu47-Arg48) が呼吸鎖による酸化には特に重要であることが明らかとなり、またこの領域のアミノ酸残基そのものよりは、残基の数が 4 個であることが重要であることが示唆された。これらの結果から、DsbB の Cys41, Cys44 残基は、膜の脂質層に溶

解したキノン分子と効率よく反応するためには、膜表面から一定の距離に存在する必要があるとのモデルを提唱した。

論文審査の結果の要旨

分泌タンパク質等に特徴的に見られるジスルフィド結合は、それらのタンパク質の折り畳みを誘導し、また最終的な安定性を賦与する。近年、大腸菌を用いた遺伝生化学的な研究により、生細胞におけるジスルフィド結合の形成は、複数の補助因子が機能して初めて効率的に起こることが明らかとなった。しかし、ジスルフィド結合導入酵素 DsbA とその再酸化因子である膜タンパク質 DsbB の連携の重要性は理解されたものの、DsbA/B によるジスルフィド結合形成システムにオーバーオール酸化力を与える機構、言い換えると、この系から放出される電子が受容される経路とその機構は大きな疑問として残されていた。

申請者は呼吸鎖電子伝達系が、DsbB を介して DsbA/DsbB ジスルフィド結合形成システムに酸化力を与えることを初めて明らかにした。この問題は、他の研究室でも追求されたように思われるが、正しい結果を出すことができたのは申請者らの研究のみである。これにはいくつかの原因がある。まず、申請者は呼吸鎖欠損変異株のグルコース発酵に依存した増殖は、培地の酸性化による二次的影響を受けやすいことに気づき、呼吸鎖欠損の真の効果が現れる培養条件を設定した。第2に、DsbA や DsbB など酸化還元活性タンパク質におけるシステイン残基の細胞内酸化・還元状態を明確に区別する方法として、細胞の強酸による直接処理と SH 修飾試薬 4-acetoamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid による修飾を用いる方法を開発し、使用したことである。この方法は、直ちに国際的な影響を持ち、現在ではこの分野の研究の標準的な手法となっている。

申請者は、さらに DsbB の酸化還元状態を詳細に調べ、その Cys41-Cys44 間のジスルフィド結合は見かけ上還元剤によって還元を受けないとの興味ある事実を見出した。Cys41 および Cys44 残基が呼吸鎖のターゲットであり、常に強く酸化されていることが明らかとなった。Cys41-Cys44 の還元剤抵抗性が DsbB の呼吸鎖とのカップリングの簡便な指標となることを利用し、DsbB の変異解析に利用した。その結果、呼吸鎖による酸化を受ける能力が失われた変異体の分離、解析に成功し、Cys41-Cys44 の C 末端側に位置する膜貫通領域との間の 4 残基が特に重要であることを明らかにした。

以上、申請者の研究によって、新生分泌タンパク質のシステイン残基の酸化に伴う電子は以下のような経路をたどることが明らかとなった：分泌タンパク質→DsbA (Cys30, Cys33)→DsbB (Cys104, Cys130)→DsbB (Cys41, Cys44)→呼吸鎖成分→酸素。米国の Bardwell らは、この研究に引き続き精製標品を用いたアッセイを行い、キノンが直接 DsbB に作用して活性化することを発表した。申請者は、DsbB の変異解析の結果に基づきキノンが DsbB と直接相互作用するとするならば、その作用標的の DsbB の Cys41, Cys44 残基が膜表面から一定の距離に存在する必要があるのではないかとの極めて興味深いモデルを提唱している。このモデルは今後キノンと DsbB タンパク質との相互作用に関する重要なガイド役の一つとなっていくものと考えられる。

以上、本論文における研究結果により、呼吸鎖成分がタンパク質におけるジスルフィド結合の形成に必要であることが初めて明らかとなり、その電子伝達系路が解明された。そして、呼吸鎖とのカップリングに重要な DsbB の領域が同定された。また DsbB とキノン分子との相互作用に関して、有用なモデルが提唱された。本研究はまた、タンパク質折り畳みの 1 反応が、細胞のエネルギーメタボリズムに連なっているとの新しい概念を生むものでもある。申請者の研究は、タンパク質の構造形成および、呼吸鎖の機能に関する細胞生物学・生化学の分野に貢献するところが大きい。よって、博士(理学)の学位論文として十分な価値があるものと認める。

なお、本論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について諮問した結果、合格と認めた。