

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：若手研究（A）
研究期間：2007 ～ 2010
課題番号：19687005
研究課題名（和文） 蛋白質ジスルフィド結合の創生に関わる細胞マシーナリの構造生物化学
研究課題名（英文） Structural studies on the cellular machineries involved in protein disulfide bond generation
研究代表者
稲葉 謙次（INABA KENJI）
九州大学・生体防御医学研究所・特別准教授
研究者番号：10423039

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：ジスルフィド結合、レドックス、細胞品質管理、DsbB、Ero1

1. 研究計画の概要

二つのシステイン残基間で形成される**ジスルフィド結合**は、蛋白質の高次構造形成のみならず機能発現制御に大きく寄与しており、細胞品質管理に深く関与する。本研究課題では、細胞における蛋白質ジスルフィド結合形成システムの構造生物学的研究を展開し、その機能発現メカニズムを分子構造レベルで解明する。特に大腸菌における DsbB-DsbA システム、およびヒト細胞の小胞体に存在する Ero1-PDI システムを対象とし、両システムの機能発現メカニズムに関する知見を照合することにより、細胞内でのジスルフィド結合形成に関する普遍的原理を見だし、一つの独創的学問分野を確立させる。

2. 研究の進捗状況

大腸菌においてユビキノンと共役して蛋白質ジスルフィド結合を創り出す膜酸化酵素 DsbB の構造生物学的および生化学的研究を徹底的に遂行した。中でも、DsbB の反応始状態の結晶構造を、モノクローナル抗体 Fab フラグメントとの共結晶化により、3.3 Å 分解能で解くことに成功した。また DsbB の膜に水平に位置するヘリックスの機能的役割について詳細な変異体解析を行い、この膜水平ヘリックスと膜との親和性が DsbA から DsbB への効率的な電子移動反応に重要であることを解明した。以上の結果、DsbB が基質である DsbA を酸化する過程における構造ダイナミズムが原子レベルで明らかとなり、DsbB の作用機序に関する深い知見が得られた。以上の研究成果は、2009 年 3 月 18 日付けの *EMBO J* 誌に掲載されるに至った。さらに最近、ヒト細胞の小胞体において補酵

素である FAD 分子と共役してジスルフィド結合を創り出す酸化酵素 Ero1 の結晶構造を 2.3 Å 分解能で決定することにも成功した。これにより、Ero1 が FAD 分子と共役してジスルフィド結合を創り出す化学スキームおよび Ero1 がパートナー蛋白質である PDI を特異的かつ効率よく再酸化する分子機構の詳細が明らかとなった。この成果について、現在論文投稿中である。

3. 現在までの達成度

先述のように、当初予定した研究課題がおよそ全て達成できており、進展は極めて順調である。ヒト由来 Ero1 の結晶構造に関する仕事についても、国際一流雑誌に受理されるよう最善を尽くす。

4. 今後の研究の推進方策

Ero1 による PDI 酸化機構をより詳細に解明するため、Ero1-PDI 複合体の結晶構造解析を主として行う。ヒト細胞の小胞体には 20 種類もの PDI family タンパク質が存在するが、Ero1 は PDI のみを特異的に効率よく酸化する。小胞体におけるレドックスカスケードの機構を分子構造レベルで正確に理解することは小胞体品質管理の分子メカニズムの解明につながり、残された重要研究課題である。

5. 代表的な研究成果

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(英文 6 件、和文 5 件 計 11 件)
(査読付き英文論文)

Inaba, K.*, Murakami, S., Nakagawa, A., Iida, H., Kinjo, M., Ito, K. and Suzuki, M. "Dynamic nature of disulfide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB" *EMBO J* 28, 779-791 (2009)

Inaba, K.* "Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*" *J. Biochem.* 146, 591-597 (2009)

Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K., Akiyama, S., Ito, K. and Akiyama, Y. "A pair of circularly permuted PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*" *J. Biol. Chem.* 283, 35042-35052 (2008)

Ito, K. and Inaba, K. "The disulfide bond formation (Dsb) system" *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 450-458 (2008)

Inaba, K.* "Protein disulfide bond generation in *Escherichia coli* DsbB-DsbA" *J. Synchr. Rad.* 15, 199-201 (2008) 雑誌の表紙を飾る

Inaba, K. and Ito, K. "Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine" *Biochem. Biophys. Acta. Molecular Cell Research* 1783, 520-529 (2008)

(和文総説)

稲葉 謙次 「DsbB の結晶構造が解かれるまで -臥薪嘗胆、初志貫徹」実験医学(羊土社) Vol.26 p945-948 (2009)

稲葉 謙次、伊藤 維昭「構造が明らかにしたジスルフィド結合の形成機構」蛋白質核酸酵素、共立出版、Vol. 52, p853-861, 2007

[学会発表](国際学会 9 件、国内学会 9 件 計 18 件)

(国際学会)

Inaba, K. (invited)
"Structures of mammalian Ero1a and ERdj5" Gordon Research Conference on thiol-based redox regulation & signaling, Lucca, Italy, May 9-14, 2010

Inaba, K. (invited)

"Structure and mechanism of the DsbB-DsbA protein disulfide generation system in *E. coli*" XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Osaka, Japan, Aug 23-30, 2008

Inaba, K. (invited)

"Structural basis for protein disulfide generation in the cell" Gordon conference on thiol-based redox regulation & signaling, Lucca, Italy, May 25-30, 2008

Inaba, K. (invited)

"Structural basis of the DsbA-DsbB-UQ oxidative system in *E. coli*." Boden Conference on disulfide bonds and their role in protein folding and function, Queensland, Australia July 29 August 2, 2007

(国内学会)

稲葉 謙次 (招待講演)

「細胞品質管理に関わるタンパク質ジスルフィド結合形成・開裂因子の構造的基盤の確立」第32回日本分子生物学会年会 第7回日本分子生物学会三菱化学奨励賞受賞記念講演会、横浜、2009年12/11

[図書](計3件)

稲葉 謙次「ジスルフィド結合、チオレドキシソフォールド、Dsb 蛋白質」キーワード：蛋白質の一生、共立出版、Vol. 53, p940, 969, 1043, 2008

稲葉 謙次、伊藤 維昭「細胞内に張り巡らされた蛋白質ジスルフィドネットワーク」蛋白質の一生 集中マスター、羊土社、p77-85, 2007

[その他]

受賞

2009年12月 第7回日本分子生物学会三菱化学奨励賞

研究題目：細胞品質管理に関わるタンパク質ジスルフィド結合形成・開裂因子の構造基盤の確立

2009年4月 文部科学大臣表彰若手科学者賞
研究題目：細胞における蛋白質ジスルフィド結合形成の分子機構の研究

研究室ホームページ

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labop/gpc/>