

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月23日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580112

研究課題名（和文） 高温条件下で働くタンパク質リフォールディング触媒の開発と速度論解析

研究課題名（英文） Development of thermostable protein-refolding catalysis and characterization of the kinetic properties

研究代表者

田村 隆 (TAMURA TAKASHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：40253009

研究成果の概要（和文）：

ジスルフィド結合は、タンパク質が正しい構造を維持する上で重要な役割を果たす。大腸菌は細胞壁ペプチドグリカンの外側にペリプラズム空間を持ち、そこに分泌されたタンパク質に正しいジスルフィド架橋を形成する酸化還元系を持つ。その機能を担う DsbA は活性中心に CPHC モチーフを持ち、チオレドキシンスーパーファミリーの中で最も酸化力の高い酵素である。これらのホモログ蛋白質では Cys 残基に挟まれた2つのアミノ酸残基が酸化還元電位を決定する。本研究室では DsbA の Cys 間のアミノ酸配列をランダムに変異させて野生型の約 40 倍活性の高い DsbA[CDIC] を発見した。本研究ではこの DsbA[CDIC] と同じ酸化還元電位値を持つが活性は低い DsbA[CRIC] について生化学的諸性質を比較した。また高度好熱菌のペリプラズムに分泌される DsbA ホモログの異種発現系を確立した。その触媒機能を解析して高温条件下でのタンパク質のリフォールディング技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：

The present study assessed the contribution of active site sequence of *Escherichia coli* DsbA by screening a library of mutant *dsbA* genes with the genetically randomized active-site sequence CXXC. Alleles of 24 *dsbA* mutants gave significant variation in the cellular functions, and a mutant *dsbA* gene that encodes Cys-Asp-Ile-Cys sequence enhanced phage sensitivity by 40-fold more than the wild-type *dsbA*. The redox potential of DsbA [CDIC] was determined to be -171.8 mV, which suggested less oxidizing catalyst than the wild type DsbA (-125.9 mV) and the redox potential was close to that of yeast protein disulfide isomerase (175 mV). It was suggested that DsbA[CDIC] improved the net yield of the correctly folded periplasmic proteins through the disulfide isomerase catalysis. Thermostable homologs were also characterized for application of folding catalysis at high temperature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酵素化学

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え技術によって、天然には極微量しか存在しない蛋白質や分子設計を施された変異酵素の効率的な生産が可能になると期待されてきた。しかし現実には、発現産物が正しい立体構造をとることができず、可溶性画分に回収できない場合が少なくない。不溶性になった発現産物は、超遠心分離法などを使えば大スケールでも簡便に精製可能であることから、これを正しく巻き戻すことが出来れば製造コストや採算の面からもメリットが期待される。このような背景のもと、蛋白質のフォールディング機構が詳細に研究されてきた。

本来、蛋白質の誤った構造を解きほぐし、正しい構造に巻き戻すには、それなりのエネルギーが必要と考えるのが妥当と思われるし、「化学反応の促進→加熱」という連想は誰もが抱くところである。しかし、蛋白質に熱を加えること即ち変性という定説もあって蛋白質のフォールディングに加熱はタブーとされている。本研究では、蛋白質のリフォールディングをあえて適度な熱を加えながら行なうという新発想から始まった。そのために、高温条件下で蛋白質のリフォールディングを触媒するジスルフィド形成(または修復)酵素を開発することに思い至った。蛋白質のフォールディング過程をジスルフィド結合やチオール基の消長を手かがりにして化学的に解析することは有効なアプローチといえる。誤った S-S 架橋を持ったままのポリペプチド鎖は正しいフォールディングに辿り着けないこともジスルフィド形成/修復がフォールディング過程の本質的な段階を支配することを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は「1.新たなジスルフィド触媒の開発」「2.それらの機能解析」「3.ジスルフィド触媒による効率的なリフォールディング技術の確立」のステップによる三年計画で実施した。大腸菌DsbA蛋白質の活性中心配列[Cys-Pro-His-Cys]の下線部配列にランダム変異を導入し、リフォールディング効率を飛躍的に向上させる新規配列を探索した。同時に、2)高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8の機能未同定のDsbAホモログ、TthA0610とTthA1422の発現系を構築して、その諸性質および変性RNaseの巻き戻しに関わる速度論解析に基づくフォールディング触媒としての機能解析を行なった。また耐熱性触媒の組み合わせによる効率的なタンパク質リフォールディング触媒システムを構築した。そして23年度は、DsbAの機能発現にはチオール基の酸化触媒だけでなくジスルフィドイソメラーゼ活性やシャペロン活性が重要であることを明らかにした。従来よりDsbAの生理機能とは高い酸化還元電位によるジスルフィド架橋形成能に依ると理解されてきたが、ジスルフィド架橋の異性化やペプチド主鎖のフォールディング助成も大きな要因として機能することが解明された。

3. 研究の方法

(1) バクテリオファージM13を利用したDsbA[CXXC]変異ライブラリの構築とスクリーニング

DsbAは、活性中心配列Cys-Pro-His-CysのPro-His配列によって高い酸化還元電位が付与されている。該当塩基配列の上流と下流にそれぞれXhoI, SpeIサイトを導入し、ランダム6塩基配列を含む二本鎖DNA断片と交換したDsbA[CxxC]ライブラリを構築した。*E. coli* JCB472株[*dsbA*欠損, F']に変異DsbA[CXXC]を発現させて、200 pfu

の感染力価の M13 ファージ粒子を感染させる。M13 ファージは、大腸菌に感染する際に F ピリを必要とするので、DsbA が機能していない大腸菌はこの侵入者に対して耐性である。逆に、変異 DsbA がよく機能すれば有意に 200 pfu 以上の感染力価を示す。プラーク数をカウントすることにより、宿主をファージ高感受性にする *dsbA* や非感受性に変える *dsbA* を選抜した。選抜された *dsbA*[CXXC] 遺伝子について高発現ベクターによる大量発現を行い、これを精製して、酸化還元電位を測定した。高発現ベクターは市販の pET39b を利用した。pET39b にはすでに *dsbA* 遺伝子がコードされており、融合蛋白質の DsbA タグとして使える。*PinA-SaII* の DNA 断片の交換によりライブラリープラスミドから pET39b に活性中心配列を移植した。

(2) 高度好熱菌のホモログ TthA0610, TthA1422 の発現系構築と機能解析

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 のゲノム解析により TthA0610, TthA1422 の両遺伝子はそれぞれ DsbA, チオレドキシンとアノテーションされていた。しかし両遺伝子は大腸菌での発現ができず機能解析が進んでいなかった。TthA0610, TthA1422 の N 末端にはそれぞれ 19 残基, 17 残基の細胞外移行シグナル配列の存在が予測された。*E. coli* DsbA のアミノ基末端にも 19 残基のシグナル配列が存在し、ペリプラズムへ移行する際にそれが切断されることが知られている。そこで TthA0610, TthA1422 のシグナル配列をコードする領域を *E. coli* DsbA のシグナル配列と交換して発現させた。

(3) 酸化還元電位測定

これらのジスルフィド触媒の酸化還元電位測定は、シスチン/システイン酸化還元緩衝液で蛋白質を平衡化させて行った。還元型 DsbA をチオール基修飾剤 AMS(分子量 500)でふたつの Cys 残基を化学修飾して、電気泳

動法により(非修飾の)酸化型 DsbA と分離して定量して平衡定数を求めた。ここからネルンストの式により

DsbA[CXXC]の酸化還元電位を算出した。TthA0610 や TthA1422 も同様にして測定した。高度好熱菌由来の DsbA ホモログである TthA0610, TthA1422 の活性中心配列はともに CPYC である。分子量がそれぞれ 30kDa, 16kDa と大きさが異なっているが酸化還元電位が近い。その役割分担を解明するためにこれらのタンパク質を発現させて精製しての酸化還元電位を測定し、触媒機能を比較した。

(4) 大腸菌 DsbA[CXXC], 高度好熱菌 TthA0610, TthA1422 の速度解析

リフォールディングの速度論解析には変性 RNase A を基質とするリフォールディング反応を用いた。グルタチオン還元酵素と共役させて NADPH の消光を指標とする簡便な方法を採用した。活性中心配列をランダム変異を導入した大腸菌 DsbA[CXXC]酵素群から有用な新規触媒を探索した。高度好熱菌 TthA0610, TthA1422 が担う機能分担を解明するために混合した状態で協調的な効果を検討した。このリフォールディング触媒の基質としては、最もリフォールディングが容易な蛋白質の一つである RNaseA を持ちいて詳細に検討した。RNaseA の活性回復の経過を直接モニターする非酵素的アッセイ法としてメチレンブルー発色法が報告されているので、その条件検討をおこなって解析方法を検討した。

大腸菌 DsbA の変異酵素について、RNase のリフォールディング速度解析とインシュリン還元反応、ジスルフィド結合を持たないグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素のリフォールディング活性の評価はシャペロン活性として用いた。

4. 研究成果

(1) バクテリオファージ M13 を利用した DsbA[CXXC]変異ライブラリーの構築とスクリーニング

DsbA[CXXC]のコンビナトリアル変異ライ

ブラリを構築して 26 種類の変異遺伝子が得られた。これを *dsbA* 遺伝子欠損株 *E. coli* JCB472 (*F'*, *dsbA*) に形質転換し、力価 200 pfu の M13 ファージ粒子を感染させてプラーク形成能を評価した。プラーク形成を野生型 *DsbA* よりも 40 倍程度高くする新規な配列をもつ *DsbA*[CDIC] を同定した。酸化還元バッファとチオール修飾剤を用いて酸化還元電位を測定した結果、予想に反して *DsbA*[CDIC] の標準酸化還元電位は -172 mV であり、野生型 *DsbA* (-122mV) よりも酸化力の低い変異型酵素であった。残りの変異 *DsbA* もすべて個別に大腸菌で発現させて精製し、その標準酸化還元電位を測定した。これらの酸化還元電位と M13 ファージ感染力には直線的な相関性はなかった。M13 ファージ感染を示さなかった変異酵素のグループ (KT, GL, HL, II, AG, HI) は -153 ~ -159 mV の狭い範囲に酸化還元電位が集中した。従来、*DsbA* の作用は、チオレドキシソファミリの中で高い酸化力 (= 高い酸化還元電位) に因ると考えられてきたが、この定説に反して酸化還元電位と *DsbA* 作用には直線的な関係がないことが本研究により初めて示された。

(2) リフォールディング活性評価

一般に、化学反応は「平衡支配」あるいは「速度論支配」のいずれかで進行すると考えられている。酸化還元電位は平衡定数に由来する。*DsbA* の細胞機能を解読する手がかりとして速度論的性質に活路を求めることにした。*DsbA*[CDIC] の酸化還元電位が PDI (タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ) の電位に近い値を示したので、変性 RNase-SG を基質とするリフォールディング過程の速度解析を行った結果、*DsbA*[CDIC] は野生型 *DsbA* よりも 100 倍以上の高いジスルフィドイソメラーゼ活性を示した。*DsbA*[CDIC] は正しいジスルフィドの架替え活性を獲得した結果、細胞内での高い触媒作用を示したと考えられる。

(3) PDI 型 *DsbA* 酵素の速度論解析

変異ライブラリには *DsbA*[CDIC] と同じ酸化還元電位を持ちながら *in vivo* 活性は野生型 *DsbA* と同程度の *DsbA*[CRIC] が含まれていた。そこで *DsbA*[CDIC] の高い機能を解明するために両酵素の比較を変性 RNase のリフォールディング速度、シャペロン活性 (ジスルフィド結合を持たないグリセアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素の巻き戻し活性)、およびインスリン還元活性を比較した。

変性 RNase リフォールディングの速度解析では、*DsbA*[CDIC] が *DsbA*[CRIC] よりも高い触媒能を示した。*DsbA*[CDIC] の触媒活性は高くウシ PDI と同程度の活性回復を達成した。ジスルフィド結合を持たない GAPDH を巻き戻すシャペロン活性においても *DsbA*[CDIC] は *DsbA*[CRIC] よりも高い触媒能を示した。しかし、インスリン還元反応は単純なジスルフィド還元反応なので、同じ酸化還元電位を持つ *DsbA*[CDIC] と *DsbA*[CRIC] は同程度の活性を示した。

以上の結果より *DsbA*[CDIC] は、*DsbA*[CRIC] に対して優れたジスルフィドイソメラーゼ活性とシャペロン活性を持つために、*DsbA*[CRIC] よりも高い細胞内機能を発現することが示唆された。本研究により *DsbA* の機能は酸化還元電位だけでなくイソメラーゼ活性やシャペロン活性など速度論的性質にも触媒作用に重要な役割を果たすことが示された。

(4) 高度好熱菌の *DsbA* ホモログの発現系構築

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 の TthA0610, TthA1422 の両遺伝子は、その ORF を大腸菌で発現させることができなかった。そこで TthA0610 のシグナル配列を *DsbA* のシグナル配列に置換して発現させる異種発現法を開発した。大腸菌のシグナル配列が切断された成熟型 TthA0610 が *E. coli* のペリプラズムに発現した。この成熟酵素は浸透圧ショック法により大腸菌ペリプラズム空間から精製した。TthA1422 も同様にシグナル融合蛋白質として発現させたが、こちらは N 末端に Ala-Ala 残基が余分に残った。

(5) 変性 RNaseA を用いたリフォールディング反応アッセイ系の確立

RNaseA は分子内にジスルフィド結合を4つ有している。これを100 mM ジチオスレイトール, 6 M グアニジン塩酸塩で還元的に変性させ, 2 mM H₂O₂, 50 μM CuSO₄ でミスフォールドさせてリフォールディング基質とした。メチレンブルーを用いたRNaseアッセイにより, ウシ肝PDIは131 ng/min, TthA0610は40 ng/min, TthA1422は72 ng/minのRNaseA活性を再生した。この結果から, リフォールディング触媒能は, PDI > TthA1422 > TthA0610であった。

α鎖とβ鎖が2つのジスルフィド結合で連結されているインスリン分子は還元されると不溶性となって白濁する。このインスリン還元反応を指標としてジスルフィド還元反応を比較した。濁度 OD₆₅₀ の増加速度は, PDI > TthA0610 > TthA1422であった。還元反応の開始に要する time lag も PDI < TthA0610 < TthA1422 となったのでやはり TthA0610はTthA1422よりも活性型が高い。

両蛋白質の機能比較よりミスフォールドRNaseのリフォールディング反応ではTthA1422がTthA0610より1.8倍反応速度が高く, インスリン還元反応ではTthA0610がTthA1422よりも優れていた。本研究の結果からTthA0610は誤ったジスルフィドの還元に関与し、TthA1422はポリペプチド鎖の巻き戻しに有利と考えられるが, 両蛋白質は競合するよりもむしろ協調して蛋白質の正しい構造の維持に機能する可能性が高いと考えられる。つまり高温条件下で好氣的に生育する *T. thermophilus* ではDsbAなどのジチオール酸化触媒の必要性が低く, 自然酸化により生じる誤ったジスルフィド架橋の異性をTthA0610/1422がともに担うと考えられる。

5. 主な発表論文等

(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] (計9件)

1. T. Tamura, K. Sato, T. Okugochi, K. Komori, T. Imai, M. Kuwahara, H. Mihara, N. Esaki, and K. Inagaki, Selenite reduction by thioredoxin system: kinetics and identification of protein-bound selenide. *Biosci. Biotech. Biochem.* **75**, 1184-1187
2. ~~(OK)~~ T. Tamura, K. Kawamura, K. Inagaki, Identification and conformer analysis of a novel redox-active motif, Pro-Ala-Ser-Cys-Cys-Ser, in *Drosophila* thioredoxin reductase by semiempirical molecular orbital calculation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **75**, 516-521 (2011) 査読有
3. T. Utsumi, J. Arima, C. Sakaguchi, T. Tamura, C. Sasaki, H. Kusakabe, S. Sugio, K. Inagaki, Arg305 of *Streptomyces* L-glutamate oxidase plays a crucial role for substrate recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 951-955 (2011) 査読有
4. K. Fukuda, T. Tamura, H. Ito, S. Yamamoto, K. Ochi, K. Inagaki; Production improvement of antifungal, antitrypanosomal nucleoside sinefungin by *rpoB* mutation and optimization of resting cell system of *Streptomyces incarnatus* NRRL 8089 *J. Biosci. Bioeng.* **109**, 459-465 (2010) 査読有
5. K. Fukuda, T. Tamura, K. Sato, K. Inagaki; Identification of ornithine-lactam as a biosynthetic intermediate for sinefungin biosynthesis in *Streptomyces incarnatus* NRRL8089 *Actinomycetologica*, **24**, 63-65 (2010) 査読有
6. K. Matsuura, T. Yashiro, K. Shimizu, S. Tatsumi, and T. Tamura, Cuckoo fungus mimics termite eggs by producing the cellulose-digesting enzyme beta-glucosidase, *Current Biology*, **19**, 30-36 (2009) 査読有
7. J. Arima, C. Sasaki, C. Sakaguchi, H. Mizuno, T. Tamura, A. Kashima, H. Kusakabe, S. Sugio, and K. Inagaki, Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *FEBS Journal*, **276**, 3894-3903 (2009) 査読有
8. T. Tamura, Conflicting Two Hypotheses on Reductive Selenite Assimilation in

- Escharichia coli. Biomed. Res. Trace Elem.* **20**, 226-231 (2009) 査読有
9. K. Fukuda, T. Tamura, Y. Segawa, Y. Mutaguchi, K. Inagaki; Enhanced production of fluorinated nucleoside antibiotic nucleocidin by rifampicin-resistant mutant of *Streptomyces calvus* IFO13200. *Actinomycetologica*, **23**, 51-55 (2009) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 清遠亜沙子, 田村隆, 吉田隆真, 稲垣賢二: ジスルフィドイソメラーゼの酸化還元電位を持つ DsbA の活性測定, 第 63 回日本生物工学会大会, 2011 年 9 月 26 日, 東京
2. 田村 隆, 吉田隆真, 森 祐磨, 海老原章郎, 倉光成紀, 稲垣賢二, *Thermus thermophilus* HB8 のペリプラズムフォルディングシステム TthA0610/1422 系の発現と機能解析第 10 回「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」連携研究会 2011 年 08 月 20 日理化学研究所 播磨研究所
3. 清遠亜沙子, 田村 隆, 吉田隆真, 稲垣賢二: ジスルフィドイソメラーゼの酸化還元電位を持つ DsbA[CRIC] の発現系検討 日本生物工学会 2010 年 10 月 27 日宮崎
4. T. Tamura, A. Kiyoto, T. Yoshida, K. Ito* K. Inagaki, Combinatorial Mutation of the Active-site Dipeptide Sequence Revealed No Correlation between the Redox Potentials and Biological Functionality of DsbA[CXXC] The 3rd International Symposium on Protein Community 2010 年 09 月 13 日奈良
5. 吉田隆真, 田村 隆, 海老原章郎, 倉光成紀, 稲垣賢二: 耐熱性ジスルフィド形成蛋白質 TthA0610, TthA1422 の発現と機能解析 2009 年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会 2009 年 10 月 30 日那覇市

6. T. Tamura, A novel active-site sequence Cys-Asp-Ile-Cys altered E. coli DsbA into a potent protein disulfide isomerase The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine 2009 年 10 月 06 日札幌

[図書] (計 1 件)

- ① 田村 隆(分担)他、医学評論社、放線菌と生きる. pp199-200, 2011,

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 変異型 RNA ポリメラーゼ β -サブユニット遺伝子

発明者: 田村 隆

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願2012-002943

出願年月日: 2012年1月11日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

<http://www.agr.okayama-u.ac.jp/App1Enz/> ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 隆 (TAMURA TAKASHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・

准教授

研究者番号: 40253009

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

倉光成紀 (KURAMITSU SEIKI)

大阪大学大学院理学部研究科・

教授

研究者番号: 60153368