

## 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 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580092

研究課題名（和文）大腸菌ペリプラズムにおけるタンパク質ジスルフィド結合形成機構の解析

研究課題名（英文）Mechanisms of oxidative protein folding in the periplasm of *E. coli*

研究代表者

門倉 広 (KADOKURA HIROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：70224558

研究成果の概要（和文）：

ジスルフィド結合は2つのシステインが酸化されて形成する共有結合である。多くの分泌タンパク質や膜タンパク質の細胞質外ドメインの構造中に見いだされ、これらタンパク質の立体構造形成や、生物機能の発現に重要な役割をはたしている。本研究では、DsbAとよばれる大腸菌の酵素が基質タンパク質にジスルフィド結合を導入する際に形成される反応中間体を生体内で検出するとともに、この中間体を経て基質タンパク質中にジスルフィド結合が形成される過程を追跡することに初めて成功した。更に、その中間体の解析から、分泌タンパク質の立体構造形成のメカニズムについて様々な新知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

Disulfide bonds, formed between pairs of cysteines, are important for the folding, activity, and stability of many secretory and membrane proteins. In a bacterium *Escherichia coli*, an enzyme called DsbA introduces disulfide bonds into folding proteins in the periplasm. In this study, I detected, in vivo, the intermediates of disulfide bond formation that were formed between DsbA and its substrates. Detailed characterization of the intermediates revealed a number of new insights into protein folding in this cellular compartment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
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・応用微生物学

キーワード：ジスルフィド結合、立体構造形成、分泌、DsbA

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のジスルフィド結合は2つのシステインが酸化されて形成する共有結合である。ジスルフィド結合は多くの分泌タンパク質や膜タンパク質の細胞質外ドメイン

の構造中に見いだされ、これらタンパク質の立体構造形成や、生物機能の発現に重要な役割をはたしている。

タンパク質のジスルフィド結合形成は主としてグラム陰性細菌のペリプラズムや真

核生物の小胞体で酵素触媒の働きによって行われる。その仕組みはグラム陰性細菌である大腸菌のペリプラズムで最も詳しく調べられている。

大腸菌におけるジスルフィド結合形成にかかわる因子の基本的性質は、遺伝学および生化学的解析によって、明らかにされている。即ち、ペリプラズムに基質タンパク質が現れるとペリプラズム酵素 DsbA が、これに直接ジスルフィド結合を導入する。

DsbA は活性中心に2つのシステインをもつ。これらのシステインは、細胞内では、ジスルフィド結合を形成して（即ち酸化型に保たれて）いる。DsbA は自身のジスルフィド結合を基質上の2つのシステイン対に与えることによりこれを酸化する。

しかし基質となるタンパク質に生体内でジスルフィド結合が導入される具体的な分子メカニズムについては多くのことが不明である。例えば、分泌タンパク質の、個々のジスルフィド結合がどのような順番で、どのような原理のもと、形成していくのか、その具体的な仕組みは不明である。

## 2. 研究の目的

大腸菌ペリプラズムでタンパク質にジスルフィド結合を導入する上で中心的な役割を担っている DsbA が基質タンパク質にどのようにしてジスルフィド結合を導入するのかその分子メカニズムを明らかにすることを主たる目的にした。

その機構の解明は、タンパク質の立体構造形成の原理を明らかにするという点で科学の基礎の発展に貢献するだけでなく、ジスルフィド結合を持つ多数の有用タンパク質を微生物細胞を用いて効率よく生産していくための礎となる知見をもたらすと期待した。

また、ここから、得られる知見は、大腸菌以外の、様々な生物におけるジスルフィド結合形成機構を理解するための有用な概念を提供するとも期待した。

## 3. 研究の方法

先述したように、ジスルフィド結合はタンパク質のシステイン間に形成される分子内架橋である（図1）。

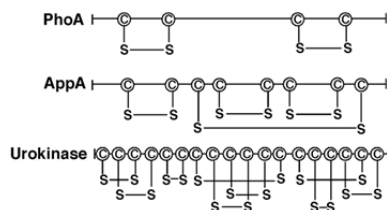


図1 タンパク質のジスルフィド結合

本研究では、生体内でジスルフィド結合が形成する仕組みを解明するために、主と

して次の二つのアプローチをとった。

(1) まず、パルスチェイス実験を用いて、基質タンパク質中にジスルフィド結合が形成する過程を追跡した。ジスルフィド結合形成は、基質上の1個のシステインと、DsbA上の1個のシステインとが分子間のジスルフィド結合で連結した共有結合中間体を経て進行すると予想されている（図2）。

基質



図2 DsbAによる基質タンパク質へのジスルフィド結合の導入

本研究では、特に、これらの中間体の構造を調べることにより、ジスルフィド結合が形成する分子機構の詳細を解析した。

(2) また、大腸菌の表層には、表層のレドックス状態に影響しうる因子（後述のシステイントランスポーターなど）やタンパク質の折りたたみ一般に影響する分子シャペロン（後述の SurA など）が存在する。これらの因子が、DsbAによる基質タンパク質へのジスルフィド結合導入過程に関与するかどうかを調べるために、これら因子を欠損する大腸菌で、タンパク質のジスルフィド結合形成が、どのような影響を受けるのかを調べた。

## 4. 研究成果

(1) 大腸菌ペリプラズム酵素アルカリ性ホスファターゼ (PhoA) のC末側に存在するジスルフィド結合の形成

大腸菌ペリプラズムでは、DsbA が分泌タンパク質にジスルフィド結合を直接導入する。その反応過程で、DsbA の Cys30 と基質のシステインが分子間ジスルフィド結合で連結された中間体を形成する。PhoA をモデル基質として用いることによって、この反応中間体を生体内で実際に検出するとともに、この反応中間体を経てジスルフィド結合を形成する過程を追跡することに世界で初めて成功した（図3）。

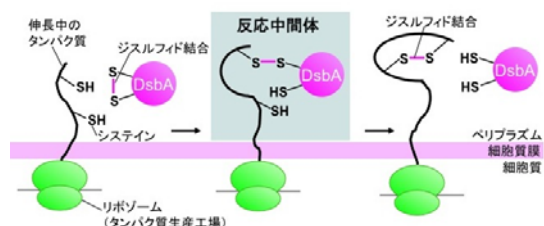


図3 PhoAにジスルフィド結合が導入される際に形成する反応中間体の検出

更に、その中間体の解析から、ペリプラズムへのタンパク質の輸送がタンパク質の合成と同時に起こるかあるいは合成後に起こるかの違いによって、タンパク質の立体構造形成過程に違いが出てくることを突き止めた(図4)。

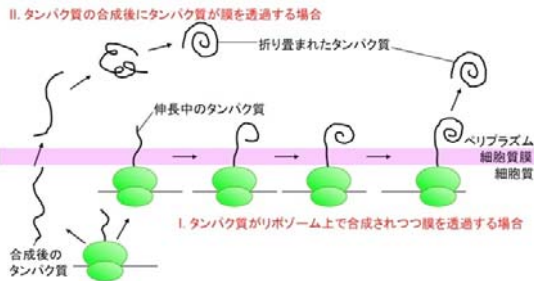


図4 リボソームはペリプラズムにおけるタンパク質の立体構造形成に影響しうる

このことから、リボソームの活性が、サイトゾル以外で起こるタンパク質の立体構造形成過程にも影響しうるということが初めて明らかになった。

PhoA には2組のジスルフィド結合が存在する。上記の研究では、そのうちの、C末側に存在するジスルフィド結合が作られる際に形成する反応中間体について調べた。

本研究の内容は、Cell誌に報告した。

## (2) 大腸菌外膜βパレルタンパク質LptD(Imp)におけるジスルフィド結合形成機構

LptD/LptE 複合体は大腸菌の外膜でリポ多糖を運ぶためのトランスロコン(輸送装置)として機能する。このうち、LptDは、分子内に2組のジスルフィド結合をもつ。本研究でLptDの生合成を調べると、最終的な局在部位である外膜への輸送と、パートナーであるLptEとの複合体形成(即ち、トランスロコンを構成するLptDとLptEの集合)に依存して、LptD分子内のジスルフィド結合の再配列が誘起され、LptDが活性型のタンパク質に折り畳まれることが分かった(図5)。

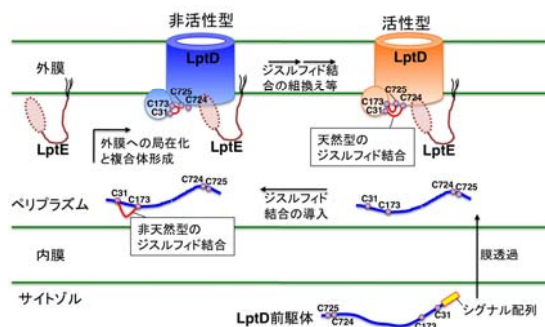


図5 LptD(Imp)におけるジスルフィド結合形成過程

それでは、なぜLptDはこのようなユニークな方法を使って折り畳まれ、活性化されるのか?複合体中、LptD部分がリポ多糖を輸送するための孔を形成するのに対して、LptE部分は孔を制御するための栓として働く(図5)。よって、この活性化システムは、LptDの無秩序な活性化を抑制し、LptDが機能すべき場所で、適切な制御因子の存在下、活性化し、働くことを可能にする仕組みだととらえることができる。同様の制御は、バクテリアに限らず、動物細胞を含む、真核生物細胞の、細胞表層複合体の生合成過程でも利用されている可能性がある。

なお、ペリプラズムに存在する分子シャペロンであるSurAが、LptDにおけるジスルフィド結合形成に関わることも明らかにした。

本研究の内容の一部はScience誌に報告した。

## (3) 大腸菌ペリプラズム酵素アルカリ性ホスファターゼ(PhoA)のN末側に存在するジスルフィド結合の形成

上記(1)の研究では、PhoAのもつ2組のジスルフィド結合うちの、C末側に存在するジスルフィド結合が作られる際に形成する反応中間体について調べた。一方、PhoAのN末側に存在するジスルフィド結合が作られる際に形成する反応中間体は、恐らく短寿命であることから、当初、これを検出することができなかった。本研究では、様々な工夫によって、最終的には、N末側のジスルフィド結合が形成される際の中間体も検出することに成功した。この中間体の構造を調べたところ、ジスルフィド結合を形成するPhoAのN末側の2個のシステインのうちの特定のシステインだけがDsbAとの共有結合複合体の形成に使われることが明らかになった。しかし、本研究では、その理由までは明らかにすることができなかった。

なぜ、基質上の特定のシステインのみが酵素との中間体形成に使われるのかは今後の重要な課題である。

## (4) 大腸菌ペリプラズムにおけるシステインのシャトルシステムとジスルフィド結合形成

大腸菌は、宿主の防御機能により環境中に放出される高濃度の過酸化水素にさらされる。我々は、環境中に過酸化水素が存在すると、大腸菌がシステイン排出トランスポーターを利用して、細胞質中から大量のシステインをペリプラズムへと供給することを見出した。このシステインは過酸化水素を水に還元した後、酸化型になる。この酸化型システインは細胞質に取りこまれ再利用される。即ち、大腸菌はこのようなシステインのシャトルシステムを利用してペリプラズムの過酸

化酸素を還元除去していることが分かった。

更に、このシステムがジスルフィド結合形成促進酵素 DsbA の活性化状態に影響を及ぼしていることを見いだした。

本研究の一部を論文にまとめ Journal of Biological Chemistry 誌に報告した。

#### 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 5 件)

- ① Chng, S.S., Xue, M., Garner, R.A., Kadokura, H., Boyd, D., Beckwith, J., Kahne, D. Disulfide rearrangement triggered by translocon assembly controls lipopolysaccharide export. *Science*, 337, 1665-1668, 2012. (査読あり)
- ② Kadokura, H., Beckwith, H. Mechanisms of oxidative protein folding in the bacterial cell envelope. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1231-1246, 2010. (査読あり)
- ③ Ohtsu, I., Wiriathanawudhiwong, N., Morigasaki, S., Nakatani, T., Kadokura H., Takagi H. The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 285, 17479-17487, 2010. (査読あり)
- ④ 門倉 広 分泌タンパク質にジスルフィド結合を形成する仕組み：ジスルフィド結合形成反応中間体の検出 化学と生物 48, 695-705, 2010. (査読なし)
- ⑤ Kadokura, H., Beckwith, J. Detecting folding intermediates of a protein as it passes through the bacterial translocation channel. *Cell* 138, 1164-1173, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計 6 件；うち招待講演 3 件)

- ① 門倉 広、河野憲二「哺乳動物細胞小胞体におけるジスルフィド結合形成を解析する為の新規レポーターの作成」日本農芸化学会 2012 年度大会 (2012 年 3 月 23 日、京都女子大学；一般講演)
- ② 門倉 広、Jon Beckwith、河野憲二「反応中間体の解析から見えてきた、生体内における分泌蛋白質の酸化的フォールディングの仕組み」第 84 回 日本生化学会大会 (2011 年 9 月 21 日、京都国際会館；

シンポジウム講演)

- ③ Kadokura, H. 「Developing a genetic assay for the analysis of disulfide bond formation in the ER of mammalian cells」*Microbial Genetics and Genomics V* (May 1, 2011 at Harvard Medical School in Boston; Oral)
- ④ Kadokura, H. 「Mechanisms of oxidative protein folding in vivo: Novel features revealed by the analysis of disulfide-linked enzyme-substrate complexes」*The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Protein Community* (September 14, 2010, Hotel Nikko Nara; Oral, Invited presentation)
- ⑤ 門倉 広「生体内で分泌蛋白質にジスルフィド結合を形成する仕組み：ジスルフィド結合形成反応中間体の検出およびその解析」第 10 回日本蛋白質学会大会 (2010 年 6 月 16 日、札幌コンベンションセンター；ワークショップオーガナイザーおよび招待講演)
- ⑥ 門倉 広、河野憲二、Jon Beckwith「生体内における分泌タンパク質ジスルフィド結合形成反応中間体の解析」日本農芸化学会 2010 年度大会 (2010 年 3 月 29 日、東京大学駒場キャンパス；一般講演)

[その他]

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/kouno/kouno.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

門倉 広 (KADOKURA HIROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：70224558