

## 大腸菌におけるジスルフィド結合導入システムの構造的基盤

○稲葉 謙次<sup>1,2</sup>、村上 聡<sup>3</sup>、鈴木 守<sup>4</sup>、中川 敦史<sup>4</sup>、山下 栄樹<sup>4</sup>、岡田 健吾<sup>5</sup>、伊藤 維昭<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>京大・ウイルス研、<sup>2</sup>JST CREST、<sup>3</sup>阪大・産研、<sup>4</sup>阪大・蛋白研、<sup>5</sup>奈良先端大)  
e-mail: kinaba@virus.kyoto-u.ac.jp

[背景] 大腸菌のペリプラズムには、ジスルフィド結合を新規に創生し分泌蛋白質に導入するためのシステムが存在する。

そのシステムを構成する主要な因子が DsbB (内膜蛋白質) と DsbA (水溶性蛋白質) である。DsbB は呼吸鎖成分であるユビキノン分子の酸化力をジスルフィド結合という形に変換する分子機械であり、DsbB によって創られたジスルフィド結合は DsbA を介してフォールディング途上の基質蛋白質に受け渡される。

図 1 に、基質蛋白質から最終電子受容体である酸素までの電子の流れを示す。

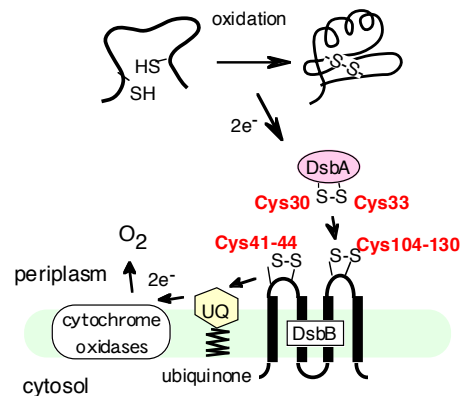


図 1 大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合導入のためのレドックスカスケード

これまで我々は、このジスルフィド結合導入システムに関する詳細な生化学的研究を行い、幾つかの興味深い発見および解明をした。第一に、DsbA 酸化酵素であるはずの DsbB は DsbA よりも低い酸化還元電位を有し、両酵素の活性部位間には 0.13 V もの酸化還元電位のアップヒルが存在することが判明した[1, 2]。第二に、DsbB による DsbA 再酸化反応過程において、DsbB に結合したユビキノンは通常の淡黄色 ( $\lambda_{\max} = \sim 400$  nm) から強いピンク色 ( $\lambda_{\max} = \sim 500$  nm) を発する状態へと遷移することを発見した[3, 4]。第三に、このユビキノンの特殊な電子状態は DsbB の Cys44 チオレートアニオンと電荷移動錯体を形成することにより引き起こされることを実験および理論により突き止め [5]、Cys44-ユビキノン間の共鳴構造の形成が、本来起こりやすい DsbB から DsbA への逆電子移動を防ぐ一つの要素になっていることを解明した。

[本論] 本発表では、この数年間精力的に取り組んできた DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の X 線結晶構造解析 (3.7 Å 分解能) の成果を報告する。図 2 で示すように、DsbB は四回膜貫通ヘリックス(TM1~TM4)をもつ four-helix bundle 型の膜蛋白質であり、これに加え、膜に水平方向のヘリックスが TM3 と TM4 を結ぶペリプラズムループ中に存在する。注目すべきことに、DsbA は DsbB Cys104 近傍の伸びたセグメント

(Pro100-Phe106) を自身の hydrophobic groove 内に強く引っ張り込むばかりでなく (図 2 B)、DsbB の水平ヘリックスをより膜側へ近づくように押し込んでいるように見える。その結果として、休止状態ではジスルフィド結合を形成する Cys104-Cys130 ペアは、複合体の状態ではジスルフィド結合が形成できない距離にまで互いに引き離される。しかも、Cys130 の移動した先は Cys41-Cys44 ペアの近傍である。複合体における DsbB のシステイン残基の配置は、まさに Cys130 が DsbA-DsbB 間のジスルフィド結合を求核攻撃するのを (すなわち DsbB から DsbA への逆電子移動反応を) 防ぎ、かつ順方向の電子移動反応のみを促進する上で適したものである。以上の構造解析から、DsbA-DsbB 間に存在する酸化還元電位の逆転を克服するための巧妙な分子メカニズムが明らかとなった。

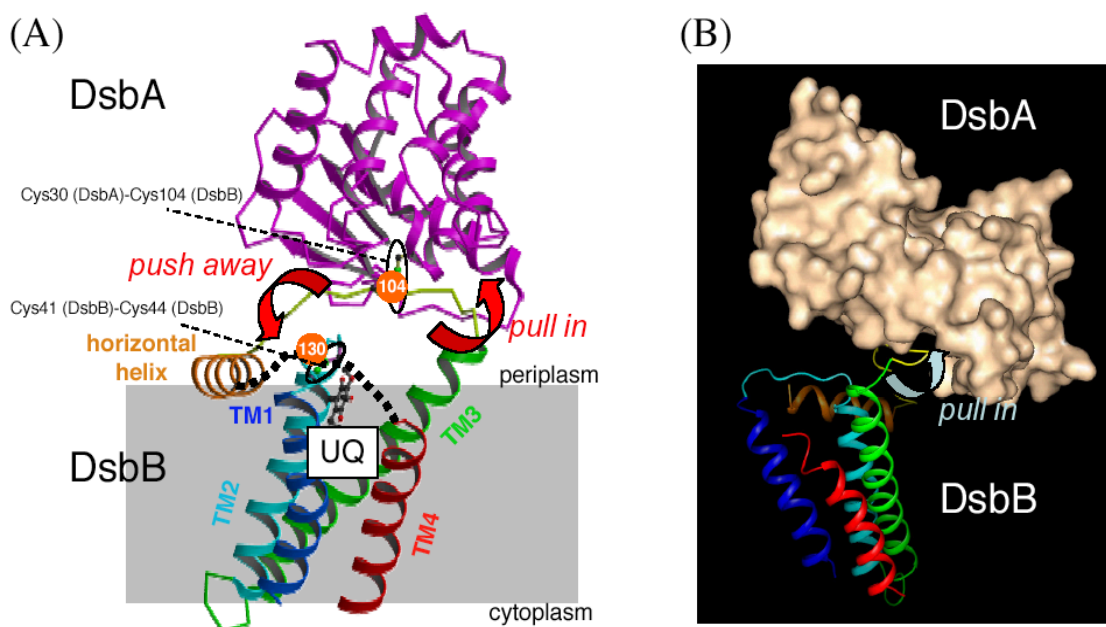


図 2 DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の結晶構造。DsbBのCys104とCys130の位置は丸いオレンジで示す。(B)は(A)を90°回し、かつDsbAをsurface表示したものの。

さらに、ユビキノンは DsbB の four-helix bundle の中央上部に結合し、その近傍に Cys41-Cys44 ペアが存在することが判明した (図 2 A)。ユビキノンが特異的に Cys41-Cys44 ペアを酸化し、またその過程で Cys44-ユビキノン間の電荷移動錯体が形成される構造的基盤も得られるに至った。

#### [参考文献]

1. Inaba, K. & Ito, K. (2002) *EMBO J*, **21**, 2646-2654
2. Inaba, K., Takahashi, Y. & Ito, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 33035-33044
3. Inaba, K. et al. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 6761-6768
4. Takahashi, Y., Inaba, K. & Ito, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 47057-47065
5. Inaba, K. et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 287-292