

Thermus thermophilus HB8 の TthA0610/1422 系の機能解析と superfolder GFP の設計
- ペリプラズム空間での蛋白質フォールディングの速度論解析に向けて -
***Thermus thermophilus* HB8 periplasmic proteins TthA0610, TthA1422 and their redox-mediated disulfide bond formation**

○田村 隆¹, 吉田隆真¹, 森 祐磨¹, 海老原章郎³, 倉光成紀², 稲垣賢二¹
Takashi Tamura, Takamasa Yoshida, Asako Kiyoto, Akio Ebihara, Seiki Kuramitsu, and
Kenji Inagaki

1 岡山大学大学院 自然科学研究科 バイオサイエンス専攻

2 大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 3 岐阜大学 応用生物科学部

(Dept of Bioscience, Grad. Sch. Nat. Sci. & Tech., Okayama Univ.)

e-mail: tktamura@cc.okayama-u.ac.jp

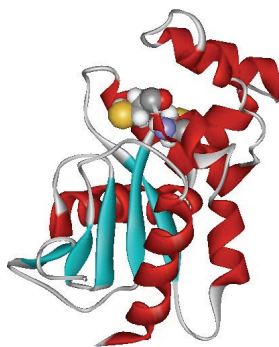


図1 大腸菌 DsbA

【背景】大腸菌などのグラム陰性真正細菌はペプチドグリカンからなる細胞壁のさらに外側にペリプラズム空間を持ち、そこに分泌された蛋白質のジスルフィド架橋を形成するための酸化還元系を持つ [1]。このしくみは、細胞外に分泌される各種の加水分解酵素の立体構造形成に必要であり、性繊毛などの巨大な蛋白質複合体の構築にも必須である [2]。高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB8 には大腸菌のジスルフィド形成酵素 DsbA のホモログとして TthA0610 が同定されていた。しかし、そのアミノ酸配列のアライメントを取ると

TthA0610 は DsbA よりむしろ DsbC に似ている。すなわち TthA0610 の活性中心配列と推定される Cys-Pro-Tyr-Cys 配列は、一次配列上は DsbC の配列である Cys-Gly-Tyr-Cys に重なる位置にあった。大腸菌 DsbC はジスルフィド架橋のイソメラーゼとして働き、DsbA によって導入された S-S 結合の架け間違いを修正するホモ二量体蛋白質である [3]。

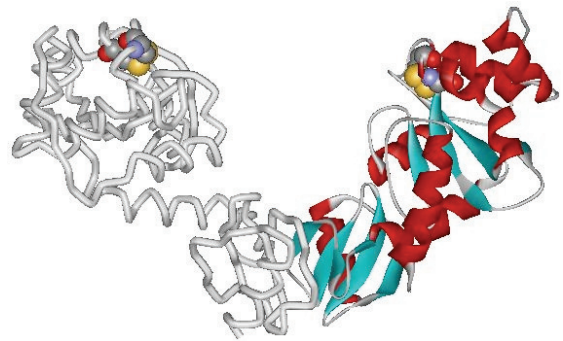


図2 DsbC の二量体構造

【リフォールディング触媒としての可能性】

我々は、TthA0610 蛋白質の構造と機能について2つの観点から興味を持って取り組んでいる。ひとつは高温条件下、蛋白質のジスルフィド架橋の掛けかえを触媒するリフォールディング触媒としての応用である。「熱」は、蛋白質の立体構造を崩して変性をもたらすという理由でタブーとされるが、蛋白質のフォールディングを促進するにはやはり熱エネルギーが必要である。この矛盾を解決するには、高温条件下でも働くリフォールディング触媒が必要である。TthA0610 にはそのような機能が期待できる。もうひとつは生きた細胞における働きとして、TthA0610 蛋白質の生理的機能の解明である。

大腸菌のように DabA と DsbC の系をもつ細菌では、一度作った架橋をまた架け直すという無駄な作業を経て正しい立体構造が作られる。これは DsbA の酸化還元電位が高すぎる (-122

mV)ためと考えられている。我々は、大腸菌 DsbA のペリプラズム移行シグナル配列を利用して TthA0610 と TthA1422(同様のペリプラズム蛋白質でチオレドキシンと相同性が高い) を大腸菌ペリプラズム空間で発現させて、その酸化還元電位をそれぞれ-161, -157 mV と決定した。これらは、DsbA よりも低い酸化還元電位であり、ともに DsbC の電位(-160 mV)に相当する。高温条件下では、あえて両蛋白質ともジスルフィド架橋の掛けかえを担っているのか。なぜジスルフィドイソメラーゼが2種類も必要なのか。など興味ある課題を提供している。さらに PDI や DsbC はイソメラーゼとして機能するために二つの CXXC 配列を持つが TthA0610 と TthA1422 は共にモノマー蛋白質である点も謎である。

【システムバイオロジー解析に向けて】

緑色蛍光蛋白質 GFP は、組換え蛋白質の細胞内局在をモニターする目的にひろく使われている。ペリプラズム移行シグナル配列と融合して発現させれば、ペリプラズム空間における蛋白質のフォールディング過程を経時的に追跡する研究に役立つ筈である。GFP は 23kDa のモノマー蛋白質でありフォールディング速度論解析の材料としても適切なサイズといえる。しかし、GFP は分子内ジスルフィド結合を持たないので現在の構造では S-S 架橋形成システムのイメージング解析には使えない。本研究では、正しい S-S 架橋形成をモニターできる改変型 GFP 「ひかる S-S」を分子設計して、ペリプラズム空間におけるフォールディング過程をリアルタイムに追跡する斬新な実験系の確立を目指している。まず耐熱性の蛋白質に改変するために 6 箇所のアミノ酸置換による superfolder 構造 [4] への変異 (S31R/Y40N/N106T/Y146F/I172V/A207V) を実施した。現在、ペリプラズム空間への移行シグナル配列との連結と Thermus 系での発現系構築に向けて研究を進めている。

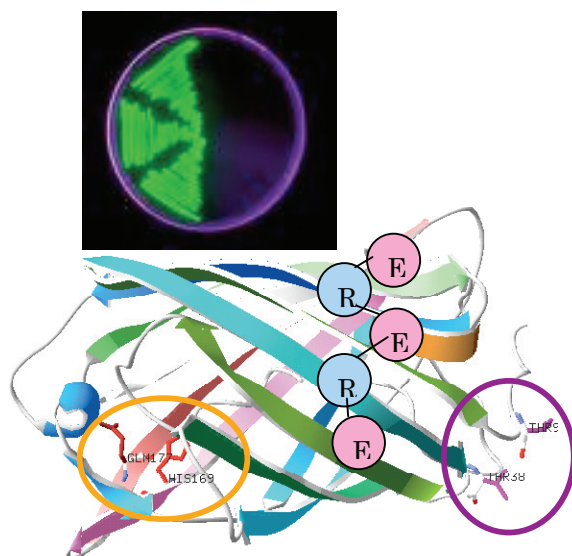


図3 sGFP への S-S 架橋導入計画。
バレル構造の両端にループ構造が多数存在する。この領域にジスルフィド架橋を導入する。

Reference

- [1] S. Kamitani, Y. Akiyama K. Ito (1992) *EMBO J.* **11**, 57-62.
- [2] D. Missiakas, C. Georgopoulos and S. Raina (1994) *EMBO J.* **13**, 2013-2020.
- [3] J.C. Joly, J.R. Stewart (1997) *Biochemistry*, **36**, 10067-10072.
- [4] F. Cava, M.A. de Pedro, E. Blas-Galindo, G.S. Waldo, L.F. Westblade, and J. Berenguer (2010) *Environ. Microbiol.* **10**, 605-610.

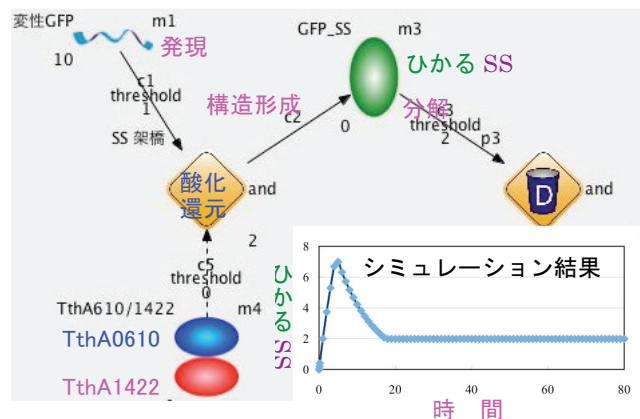


図4 ひかる S-S のシステム生物学解析
in vitro 実験で得られる発現・酸化還元・分解などの反応速度定数を入力してシミュレーションを行なう。この予測結果を *in vivo* 実験で観察される緑色蛍光の経時変化と比較してモデルの修正を進める。