

## TthA0610 はジスルフィド架橋形成酵素 DsbA のホモログ ?

～耐熱性の蛋白質リフォールディング酵素を求めて～

Does TthA0610 play the role of DsbA in *Thermus thermophilus* HB8 ?

- A quest for a catalysis capable of protein refolding under heat -

○田村 隆, 馬場啓子, 稲垣賢二

Takashi Tamura, Keiko Baba, Kenji Inagaki

(岡山大学大学院 自然科学研究科 バイオサイエンス専攻)

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

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

【目的】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、消化酵素として細胞外に分泌される各種の加水分解酵素のフォールディングの促進に必要であるだけでなく、接合伝達などに関わる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, 3]。高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB8 の全ゲノム配列の解読の結果、大腸菌のジスルフィド形成酵素 DsbA のホモログとして TthA0610 が登録されている。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 よりはむしろ DsbC に似ていることが示された。すなわち TthA0610 の redox center と推定される Cys-Pro-Tyr-Cys 配列は、一次配列上 DsbA の [CPHC] の位置よりも下流であり DsbC の redox center である Cys-Gly-Tyr-Cys に重なる位置にあった(図 1)。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酵素として働く[4]。

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。ひとつは本蛋白質が高温条件下、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なることを期待しての機能解析である。「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ことが出来る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。

もうひとつは一匹の生きた細胞における働きとして、TthA0610 蛋白質がジスルフィド架橋形成と掛けかえの二役を担っている可能性である。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) ためと考えられる。DsbA がやや低い電位を持つならば、高い精度で正しい架橋形成が可能である。TthA0610 の酸化還元電位を測定し、フォールディング触媒としての機能を解析するために、TthA0610 遺伝子を大腸菌において発現させる発現プラスミドの構

築を現在検討している。また、本菌 HB8 の TthA0610 をコードする遺伝子を *kan* 耐性遺伝子マーカーでノックアウトした結果、興味深いことに HB8 株の対数増殖期に見られる菌体凝集が起らなかった(図 2)。菌の凝集がピリなどの細胞外構造に依存する現象であれば TthA0610 がそのような構築物の形成に必須である可能性が示唆された。

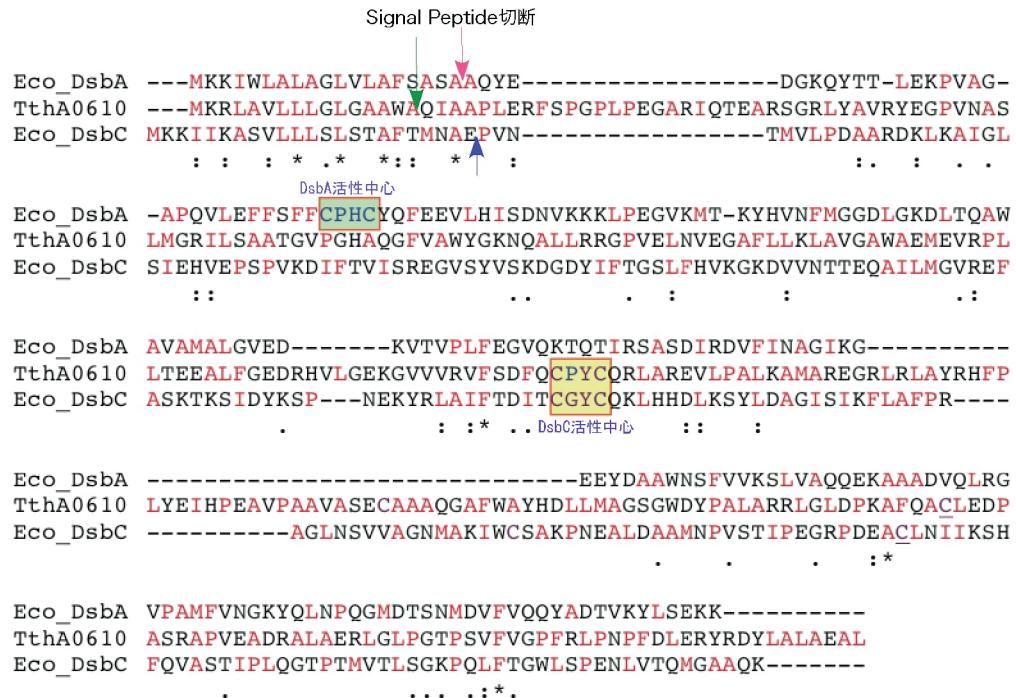


図 1. TthA0610 と DsbA, DsbC のアライメント。

DsbA は活性中心に CPHC の配列を持ち、DsbC は CGYC 配列を持つ。2つの Cys 残基に挟まれたジペプチド配列が蛋白質の redox potential を決定する。TthA0610 は一次構造上 DsbC とほぼ同じ位置に CPYC の配列を持つ。これらの蛋白質は細胞から分泌される際に切断されるシグナルペプチド配列を持つ。

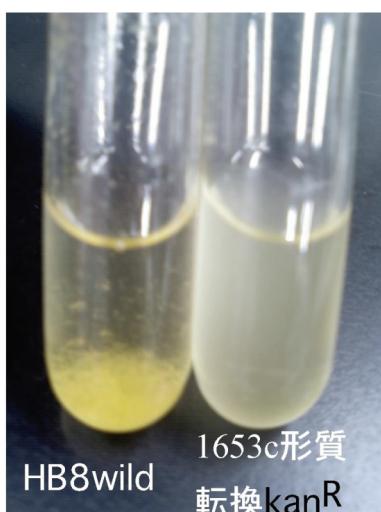


図 2. 野生株 HB8 と  $\Delta tthA0610$  の生育

ノックアウト作成プラスミド 1653c をエレクトロポレーションにより *Thermus thermophilus* HB8 株に形質転換して TT 培地上でカナマイシン耐性株を選抜した。PCR 増幅による ORF 鎖長の変化および制限酵素感受性により遺伝子挿入を確認した。 $\Delta tthA0610$  株は菌体が凝集しない。

#### Reference

- [1] Missiakas D. & Raina, S. (1997) *J. Bacteriol.* 179, 2465-2471.
- [2] Bardwell, J.C.A., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991) *Cell* 67, 581-589.
- [3] Dailey, F.E. & Berg, H. C. (1993) *PNAS* 90, 1043-1047.
- [4] Missiakas, D., Georgopoulos, C., and Raina, S. (1994) *EMBO J.* 13, 2013-2020.