



蛋白質の立体構造形成を補助する細胞因子の構造と機能発現メカニズムの解明 ～蛋白質ジスルフィド結合形成機構を中心に～

概要

九州大学、大阪大学、京都大学、東京工科大学の研究グループ（代表：九州大学生体防御医学研究所ポストゲノムセンター蛋白質化学分野 稲葉謙次 SSP 特任准教授）は、細胞の中で蛋白質ジスルフィド結合を創り出す膜酸化酵素 DsbB の高分解能結晶構造解析に成功しました。これにより、DsbB が膜内在性の補酵素であるユビキノン分子と共役してジスルフィド結合を創りだし、ジスルフィド結合導入酵素である DsbA を介して、立体構造形成途上の蛋白質にジスルフィド結合が受け渡される分子メカニズムの全貌が明らかとなりました。

本研究成果は、2009年2月12日（米国東部時間）*EMBO Journal* 誌オンライン版に掲載されました。（<http://www.nature.com/emboj/journal/vaop/ncurrent/abs/emboj200921a.html>）

背景

蛋白質は、細胞の中で正しく立体構造を形成することにより独自の機能を発揮します。細胞の中には、蛋白質の立体構造形成を補助する巧みなシステムを兼ね備えており、その一つがジスルフィド結合を効率よく導入するためのシステムです。ジスルフィド結合は、空間的に隣接する二つのシステインと呼ばれるアミノ酸が酸化されることにより形成される硫黄原子間の共有結合です。ジスルフィド結合は細胞膜表層や細胞外に分泌される蛋白質に多くみられ、細胞の中で合成される全蛋白質の約10%がジスルフィド結合をもちます。ヒト細胞における遺伝子の数が2万数千と言われているので、ヒトが創り出す2千種類以上もの蛋白質がジスルフィド結合をもっていることとなります。細胞外の環境は、細胞内に比べ、物理的にも化学的にも変動が大きく過酷であるため、共有結合であるジスルフィド結合を蛋白質分子内（ときには分子間）で形成することにより、その立体構造をより頑強にしていると考えられます。ジスルフィド結合を有する蛋白質として、免疫作用において中心的役割を担う免疫グロブリン（抗体）や抗原提示分子（MHC分子）、さらにはインスリンや細胞成長因子を代表とするホルモン、病原性細菌が分泌する毒素などが挙げられます。したがって、ジスルフィド結合は蛋白質化学の分野にとどまらず、医学的にも工学的にも注目されるべき生体分子中にみられる化学結合です。

内容

一般に膜蛋白質の結晶構造解析は、その取り扱いの難しさや膜蛋白質固有の結晶化のしにくさ等の問題により、極めて難しい課題です。

本研究代表者はこの数年間、大腸菌の蛋白質ジスルフィド結合導入システムに関する生化学的・構造生物学的研究を展開してきました。大腸菌のペリプラズム¹⁾という空間には、ジスルフィド結合導入酵素として DsbA と呼ばれる水溶性蛋白質が存在します。そして DsbA を常に活性型に保つ働きがある酵素が、細胞内膜に存在する膜蛋白質 DsbB です。DsbB はユビキノン（別称：coenzyme Q）と呼ばれる呼吸鎖電子伝達ネットワーク²⁾に関わる脂溶性分子との共同作業によりジスルフィド結合を創りだし、それを DsbA に受け渡す役割があります。

今回、ジスルフィド結合形成において中心的役割を担う膜蛋白質 DsbB とユビキノン分子との複合体の高分解能構造について、X線結晶構造解析という手法を用いて解析することに成功しました。この結晶構造解析において、DsbB を特異的に認識するモノクローナル抗体³⁾の Fab フラグメントと DsbB の複合体を調整することにより、本来結晶化しにくいはずの DsbB の素性を改良し、良質の DsbB の結晶を得るに至りました（図 A 参照）。

モノクローナル抗体を用いて膜蛋白質の結晶構造解析に成功した例は、世界的にもこれまで数件程度

しかありません。2006年に本研究グループは、DsbBとDsbAの反応中間複合体の結晶構造をCell誌に発表しましたが、そのとき解かれたDsbBの構造は非常に低分解能のものであり、アミノ酸側鎖に関する情報や一部の領域の構造情報が欠失しておりました。

今回、より高分解能の構造解析に成功したことにより、DsbBの構造および機能発現メカニズムに関する多くの新しい知見が得られました。特に本研究において、DsbAと結合する前の始状態DsbBの構造を初めて明らかにし、2006年に発表したDsbB-DsbA反応中間複合体さらに2008年にアメリカのグループにより報告されたDsbA解離後のDsbB中間状態の構造と比較照合することにより、DsbBがDsbAにジスルフィド結合を受け渡す過程における構造ダイナミクスが明らかになりました(図B参照)。さらにDsbBのユビキノン結合部位の構造がアミノ酸側鎖も含め明らかとなり、以前本研究グループが生化学実験および理論化学計算に基づき提唱した蛋白質ジスルフィド結合新規創生の化学スキームを、構造生物学的に立証できました。以上の結果を統合し、大腸菌の中で蛋白質ジスルフィド結合が創りだされ、高次構造形成途上の蛋白質に受け渡されるシステムの巧妙な分子メカニズムが原子分子レベルで解明されました。

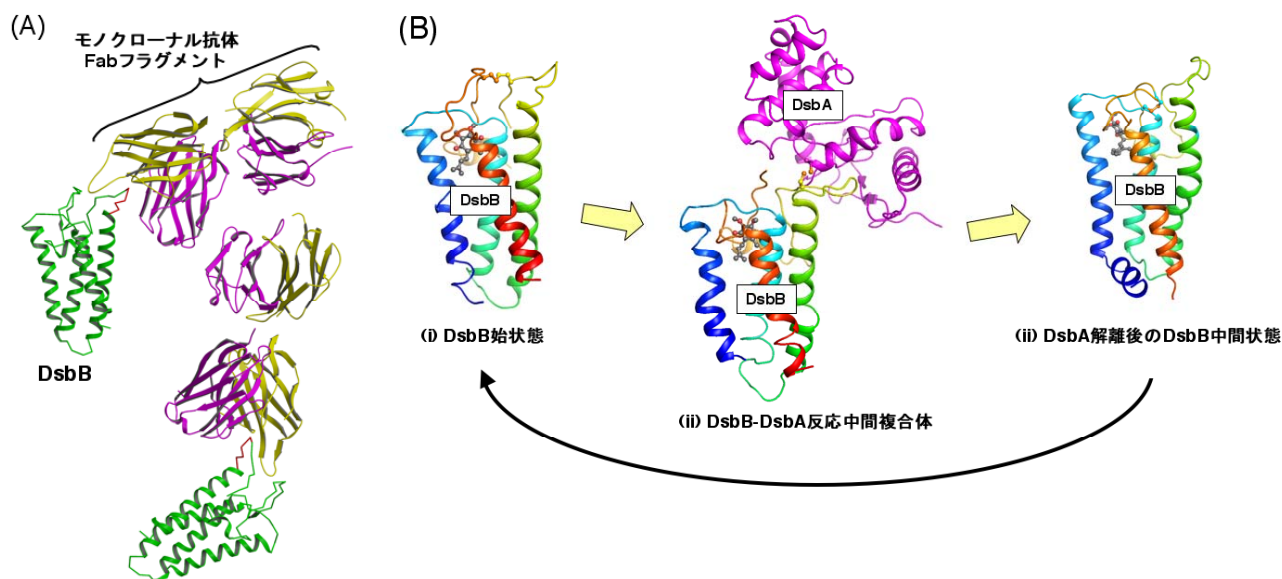


図 (A) : DsbB-モノクローナル抗体 Fab フラグメント複合体の結晶構造

図 (B) : DsbB が DsbA にジスルフィド結合を受け渡す過程のスナップショット

■効果、今後の展開

大腸菌のジスルフィド結合導入システムに類似したシステムは、酵母、植物、動物などの真核細胞の小胞体やミトコンドリアにも存在することが知られています。真核細胞の小胞体では、ユビキノンではなく FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド) を補酵素として、Ero1 という酵素がジスルフィド結合を創りだします。ミトコンドリアでも、Ero1 と同様、FAD を補酵素として Erv1 という酵素がジスルフィド結合を創りだします。興味深いことに、DsbB, Ero1, Erv1 の三者は互いにアミノ酸配列の相同性がほとんどないにもかかわらず、非常に類似した4本の α 螺旋構造からなる基本骨格をもつことが分かりました。

このように、蛋白質ジスルフィド結合を形成するための細胞システムの普遍的な分子基盤が明らかとなりました。一方で、高等生物細胞ではさらに多くの因子がジスルフィド結合の形成に関与しており、その複雑性が浮き彫りとなりつつあります。例えば、ヒト細胞の小胞体には約20種類ものジスルフィド結合形成に関わる Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリーの因子が存在します。しかしながら、高等生物細胞において何故それほど多種のジスルフィド結合形成因子が必要なのか、またそれぞれの因子が具体的にどのような機能を有するのか、全く未解明の問題です。

今回の成果により、細胞の生命活動にとって重要な役割を担うジスルフィド結合がどのような化学メカニズムにより形成され、蛋白質に導入されるのかの理解が大きく進展しました。今後は、高等生物細胞における同システムの仕組みについて、構造に立脚した分子機構の理解を深めるとともに、プロテオミクス解析などの手法によるジスルフィド結合形成因子間の相互作用ネットワークや機能分担に関する知見を得ることが極めて重要です。細胞に存在するジスルフィド結合導入システ

ムを応用すれば、複数のジスルフィド結合を有する有用な酵素や抗体、細胞増殖因子などを大量に生産することも可能となり、その工学的利用も大いに期待できます。

【用語解説】

- 1) ペリプラズム：大腸菌などのグラム陰性細菌において、内膜と外膜の間に存在する空間のこと。
- 2) 呼吸鎖電子伝達ネットワーク：細胞が生命活動を営む上で必要なエネルギーの源である ATP を合成するために、細胞膜には I~IV の四種類（大腸菌の場合 III はない）の呼吸鎖複合体が存在する。これら複合体間の電子伝達を司るネットワークのことをいう。
- 3) モノクローナル抗体：単クローン性の抗体のことで、アミノ酸配列が均一である。そのため、抗原に対する親和性も均一であり、特異性も高い。抗体は一般に、抗原認識部位である可変領域を含む Fab フラグメントと、抗原認識部位を含まない Fc フラグメントに分断される。

【お問い合わせ】

九州大学生体防御医学研究所 SSP 特任准教授 稲葉 謙次

電話：092-642-6433

FAX：092-642-6433

Mail：inaba-k@bioreg.kyushu-u.ac.jp