

*Thermus thermophilus* HB8 の TthA0610, TthA1422 発現系の構築と機能解析

- ペリプラズム酵素群のシステムバイオロジー構築に向けて -

***Thermus thermophilus* HB8 periplasmic proteins TthA0610, TthA1422 expression in *E. coli* and their redox properties in their biological properties**○田村 隆<sup>1</sup>, 吉田隆真<sup>1</sup>, 海老原章郎<sup>3</sup>, 倉光成紀<sup>2</sup>, 稲垣賢二<sup>1</sup>

Takashi Tamura, Takamasa Yoshida, Akio Ebihara, Seiki Kuramitsu, 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

(Divi. of Bioscience, Grad. Sch. Nat. Sci. &amp; 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]。大腸菌 DsbA はチオレドキシシンファミリーに属する 21kDa のモノマー蛋白質であり，その活性中心配列は Cys-Pro-His-Cys である。DsbA は高い酸化還元電位 (-122 mV) を持ち，ペリプラズム空間に分泌された蛋白質にジスルフィド架橋を導入する酸化反応を触媒する。その際にジスルフィド架橋の”架け間違い”も生じるためにこれを修正するイソメラーゼとして二量体蛋白質 DsbC もペリプラズムで機能している [2]。これらの酸化還元蛋白質群はシステムとして機能している (図 1)。

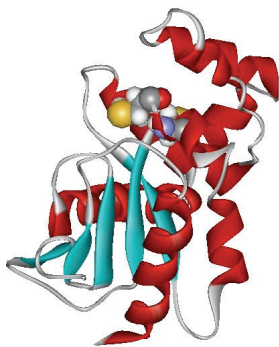


図 1 大腸菌 DsbA

同じくグラム陰性真正細菌である *Thermus thermophilus* HB8 も高温条件下で正しいフォールディングを導入するための DsbA システムがペリプラズム空間で機能している可能性が高い。ゲノムシーケンスの解析結果から，ペリプラズム移行シグナル配列を持つ Trx superfamily に属する蛋白質として TthA0610 と TthA1422 がコードされていた。網羅的な発現系構築の過程では TthA0610, TthA1422 を大腸菌で発現させることは出来なかった。そこで予想されるシグナル配列部分を大腸菌 DsbA のシグナル配列とで置換して大腸菌発現系を構築して機能解析を行った。

【方法・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 が登録されていた。しかし，アミノ酸配列では TthA0610 は DsbA よりはむしろ DsbC に似ている。すなわち TthA0610 の活性中心と推定される Cys-Pro-Tyr-Cys 配列は，一次配列上 DsbA の [CPHC] よりも下流であり DsbC の活性中心である Cys-Gly-Tyr-Cys に重なる位置にあった (図 2)。DsbA タグがコードされている発現プラミストベクター pET39b を利用して TthA0610 の異種発現プラスミドを構築した。まず *E. coli* DsbA 遺伝子のシグナルペプチド配列の下流に Not I サイトを導入した。TthA0610 のシグナルペプチド配列よりも下流の配列をコードする遺伝子領域をゲノムから増幅して，pET39b の Not I/Xho I サイトに挿入した。この融合型遺伝子は，大腸菌ペリプラズム空間に TthA0610 蛋白質の成熟型として発現できた。TthA1422 も同様に DsbA のシグナル配列を利用して生産するとペリプラズム空間に分泌されたが，

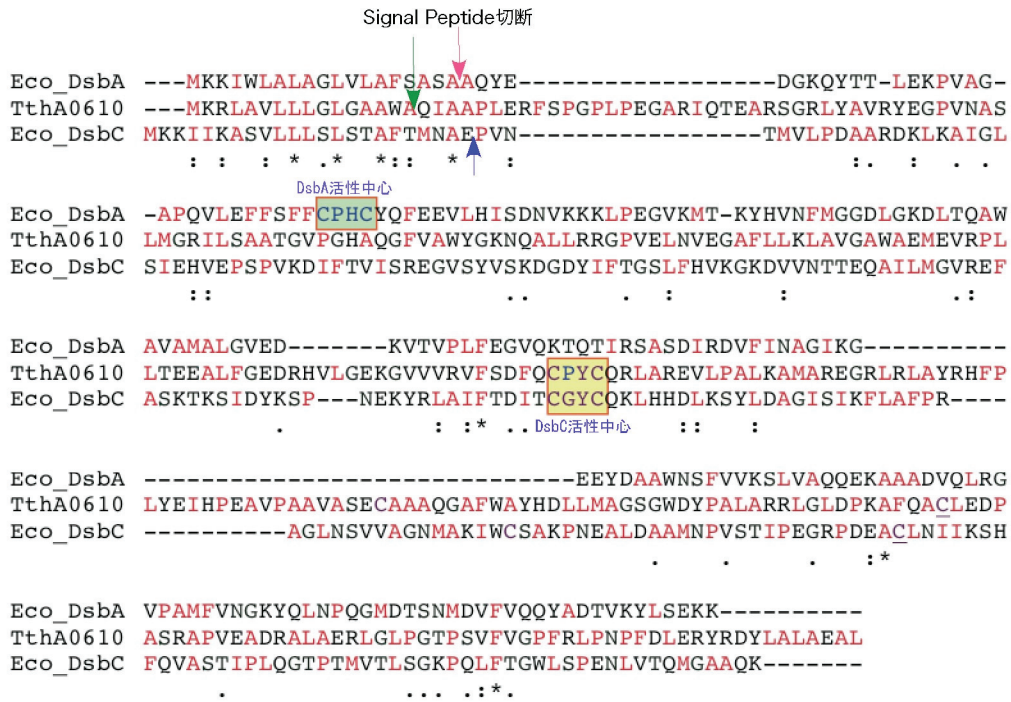


図 2. TthA0610 と DsbA, DsbC のアライメント。

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。

N 末端に Ala-Ala 残基が余分に残された。TthA0610 と TthA1422 の酸化還元電位[3]はそれぞれ-161, -157 mV であった。これはジスルフィドイソメラーゼ活性を示す哺乳類 PDI (-175 mV) や大腸菌 DsbC (-160 mV) の電位に近い値であった。高温条件下では、酸化反応を触媒する DsbA の必要性が低く敢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

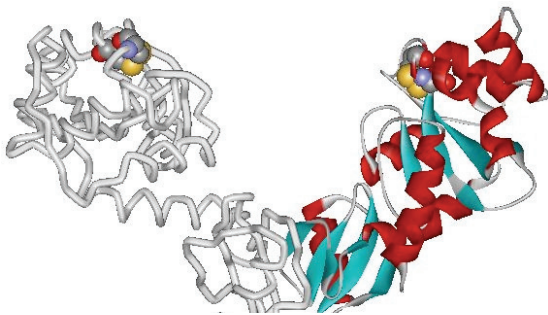


図 3 DsbC の二量体構造と活性中心  
CGYC 配列に挟まれたクレフト部分  
で酸化と還元を同時に行う

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。複数の蛋白質が同時或いは連続して働く機構とその生理的意義を解明するためには、システムとして機能をシミュレーションするシステムバイオロジーの手法が必要になる。大腸菌の DabA/DsbC の系とも比較しながらペリプラズム酵素群の機能解析を進めたい。高温条件下

正しい蛋白質のフォールディングを効率よく行う系は、組換え蛋白質のリフォールディング触媒を開発する観点からも有用である。

#### Reference

- [1] Kamitani, S., Akiyama Y., Ito K. (1992) *EMBO J.* **11**, 57-62.
- [2] Missiakas, D., Georgopoulos, C., and Raina, S. (1994) *EMBO J.* **13**, 2013-2020.
- [3] Kobayashi, T., Kishigami, S., Sone, M., Inokuchi, H., Mogi, T., Ito, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **94**, 11857-11862.