T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成因子DsbAとDsbBの反応機構の解明
Title(English)	
著者(和文)	矢澤健二郎
Author(English)	Kenjiro Yazawa
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9129号, 授与年月日:2013年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:岡畑 恵雄
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9129号, Conferred date:2013/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

平成二十四年度　学位論文

大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成因子DsbAとDsbBの反応機構の解明



東京工業大学大学院 生命理工学研究科
生体分子機能工学専攻

指導教員
岡畑　恵雄　教授
森　俊明　准教授

矢澤　健二郎

Kenjiro Yazawa

大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成因子 DsbA と DsbB の反応機構の解明

目次

第 1 章 序論

1-1 タンパク質ジスルフィド結合形成システム 1

1-1-1 DsbAの構造とタンパク質の酸化反応 2

1-1-2 DsbBの構造とDsbAの酸化反応 7

1-1-3 酸化還元電位とは逆に進行するDsbBによるDsbAの酸化反応経路 9

1-1-4 DsbA-DsbB-UQ複合体の構造解析 17

1-2 DsbA-DsbB-ユビキノンシステムの速度論的解析 21

1-3 水晶発振子マイクロバランス法を用いた分子間相互作用解析 23

1-3-1 水晶発振子マイクロバランス（QCM）法 23

1-3-2 QCM 法を用いた分子間相互作用の解析 29

1-4 本研究の目的 33

第 2 章 水晶発振子上への膜タンパク質 DsbB の固定化と DsbA との反応観察系の構築

2-1 緒言 39

2-2 実験方法 41

2-2-1 試薬 41

2-2-2 機器 43

2-2-3 培地、試薬溶液、緩衝液の調製 44

2-2-4 DsbA (native)遺伝子の大腸菌ゲノムからの PCR 抽出 50

2-2-5 DsbA 変異体発現用ベクター(C33A, C30A, P151S, P151N, P151H) の作製 65

2-2-6 DsbB 発現用ベクターの作製 71

2-2-7 BCCP-DsbB 発現用プラスミドの調製 74

2-2-8 DsbA の発現および精製 81

2-2-9 DsbA 変異体の発現および精製 87

2-2-10 DsbA 変異体の MALDI TOF-MS による同定 87

2-2-11 大腸菌 C41(DE3)を用いた DsbB の発現と精製 89

2-2-12 ビオチン化 DsbB の作製 101

2-2-13 BCCP-DsbB の発現と精製 104

2-3 SDS-PAGE を用いた DsbB または BCCP-DsbB と DsbA の反応確認 113

2-3-1 DsbB と DsbA の反応確認 114

2-3-2 BCCP-DsbB と DsbA との反応確認 117

2-4 QCM 金基板上への DsbB の固定化 119

2-4-1 さまざまな固定化方法 119

2-4-2 アミンカップリング法による固定化 120

2-4-3 DsbB 直接ビオチン化によるアビジンへの固定化 123

2-4-4 界面活性剤可溶化 DsbB の BCCP タグを利用した固定化 126

2-4-5 BCCP タグを利用して脂質膜に埋め込む固定化 128

2-4-6 DsbB の翻訳同時膜埋め込みによる固定化の試み 133

2-5 平面脂質二分子膜に埋め込んだ DsbB のキャラクタリゼーション 138

2-5-1 DDM 可溶化系と脂質膜置換系の比較 138

2-5-2 BCCP-DsbB 固定化量と DsbA の結合量の相関 139

2-5-3 置換する脂質の種類の効果 140

2-5-4 D 値を用いた平面脂質二分子膜形成の評価 141

2-5-5 アビジンの結合を利用した平面脂質二分子膜形成の評価 142

2-5-6 BCCP-DsbB の乾燥重量による真の固定化量の算出 144

2-6 DsbB による DsbA 酸化反応の動力学解析方法 148

2-6-1 結合過程 148

2-6-2 チオール-ジスルフィド結合交換過程 152

2-6-3 ユビキノン依存的 DsbB 再酸化過程 155

2-7 DsbB による DsbA 酸化反応の動力学解析 157

2-7-1 脂質二分子膜置換系および DDM 可溶化系における DsbB と DsbA の結合過程の比較 157

2-7-2 脂質二分子膜埋め込み DsbB と DsbA のチオール–ジスルフィド交換過程 160

2-7-3 ユビキノンによる DsbB 再酸化過程 162

2-8 結言 168

第 3 章 DsbB による DsbA 酸化反応機構の解明

3-1 緒言 171

3-2 実験方法 174

3-2-1 試薬 174

3-2-2 BCCP-DsbB 変異体発現用ベクターの作製 174

3-2-3 BCCP-DsbB 変異体の発現および精製 175

3-2-4 BCCP-DsbB 変異体の紫外吸光法による定量 178

3-3 QCM を用いた DsbA と DsbB の中間複合体形成の評価 179

3-3-1 DsbA(native)と DsbB または DsbB(C41A,C44A)の QCM での反応観察 180

3-3-2 DsbA(C33A)と DsbB または DsbB(C41A,C44A)の QCM での結合反応観察 180

3-3-3 DsbA(C33A)と DsbB(native)または DsbB(C41A,C44A)の結合過程の動力学解析 181

3-4 SDS-PAGE を用いた DsbB による DsbA 酸化反応産物の定量 186

3-5 ユビキノンの効果 191

3-5-1 Redox Buffer を用いた DsbB と内在性ユビキノン 8 の酸化還元状態の調節 192

3-5-2 還元型ユビキノールを有する DsbB と DsbA との反応動力学解析 195

3-5-3 ユビキノン-10 が過剰に存在する場合の DsbB と DsbA との反応動力学解析 196

3-6 酸化還元電位パラドックスの解決 201

3-6-1 還元型 DsbB と酸化型 DsbA の反応観察 201

3-6-2 DsbB 変異体と DsbA(C33A)の結合反応観察 203

3-7 結言 207

第 4 章 DsbB による DsbA 酸化反応の pH 耐性機構の解明

4-1 緒言 211

4-2 実験方法 215

4-3 種々の pH での SDS-PAGE を用いた DsbB による DsbA 酸化反応産物の定量 216

4-4 種々の pH 条件下での DsbB による DsbA 酸化反応の動力学解析 218

4-4-1 DsbA と DsbB の種々の pH 条件下における反応観察と動力学解析 218

4-4-2 DsbA(C33A)と DsbB の種々の pH における反応観察と動力学解析 224

4-4-3 DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の種々の pH における反応観察と動力学解析 229

4-4-4 DsbA の Cys33 の pK_a の決定 235

4-4-5 SDS-PAGE を用いた DsbB の Cys44 および Cys130 の pK_a 測定 242

4-5 種々の pH でのユビキノンの影響の評価 246

4-6 DsbA と DsbB の酸化反応の pH 依存性のまとめ 250

4-6-1 DsbB による DsbA 酸化反応の動力学定数の pH 速度曲線と酸化量の相関 250

4-6-2 pH 条件に依存した DsbB による DsbA 酸化反応経路 251

4-7 結言 255

第 5 章 DsbA によるタンパク質の酸化反応観察の試み

5-1 緒言 259

5-2 実験方法 261

5-2-1 BCCP-DsbA と 3 種類の変異体の調製 261

5-2-2 TEM1 β-lactamase と 2 種類の変異体の調製 269

5-3 SDS-PAGE での BCCP-DsbA によるβ-lactamase の酸化反応の確認 276

5-3-1 BCCP-DsbA とβ-lactamase の反応 276

5-3-2 BCCP-DsbA(P151T)とβ-lactamase の反応 279

5-4 QCM を用いた BCCP-DsbA によるβ-lactamase の酸化観察の試み 281

5-5 PURESYSTEM で発現させたβ-lactamase への DsbA による S-S 結合形成の試み 283

5-5-1 β-lactamase を PURESYSTEM で発現させるための mRNA の調製 283

5-5-2 PURESYSTEM で発現させたβ-lactamase の DsbA による S-S 結合形成の試み 289

5-6 結言 293

第 6 章 結論 295

目次

第 1 章　序論

1-1　タンパク質ジスルフィド結合形成システム

タンパク質のジスルフィド結合は、ポリペプチド分子内あるいは分子間のシステイン残基間に形成される共有結合である。ジスルフィド結合は多くの分泌タンパク質や膜タンパク質の細胞質外のドメインに見いだされ、これらのタンパク質の生物機能の発現や高次構造の安定化に重要な役割を果たしている。ジスルフィド結合の形成は主として原核細胞ではペリプラズム、真核生物では小胞体内腔で行われ、それらに対応する酸化酵素がタンパク質の膜透過の直後あるいはその透過プロセスと共役してシステイン残基の酸化を促進していると言われている。

この20年ほどの間に、大腸菌では細胞内におけるジスルフィド結合形成に関わる因子の研究が急速に進み、ペリプラズムに存在する複数のDisulfide bond formation factor(Dsb因子)が働いて、タンパク質内に効率よくジスルフィド結合が導入されることが明らかになった。ペリプラズムには**図1-1**に示したようにジスルフィド結合導入酵素として、Disulfide-bond formation protein A(DsbA)が存在する。このDsbAがフォールディング途上のタンパク質のジスルフィド結合を形成し、DsbA自身は還元型となる。還元型となったDsbAは4回貫通型の膜タンパク質DsbBによって再び酸化状態に戻される。その後、DsbBは膜内在性の補酵素ユビキノン(UQ)によって再び酸化状態に戻される。ユビキノンが受け取った電子はユビキノール酸化酵素（Ubiquinol Oxidase）を介して、最終的に酸素が電子受容体となる[1]。

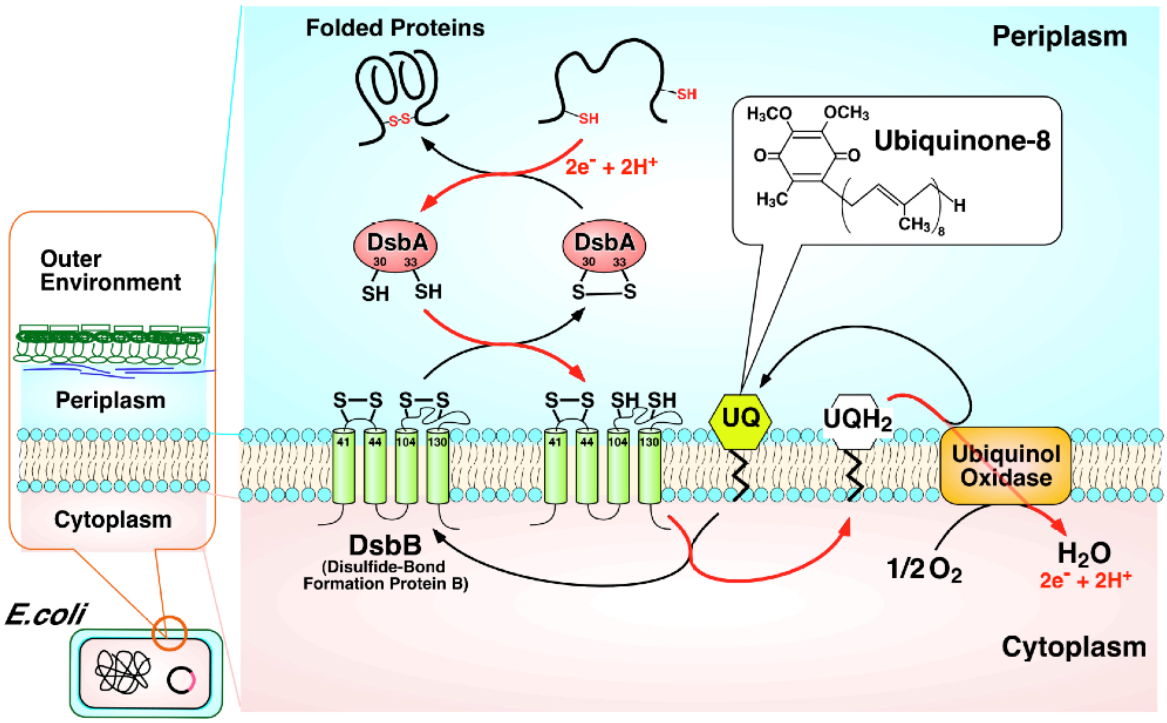


図1-1：大腸菌のジスルフィド結合形成に関わるDsbシステム

1-1-1　DsbAの構造とタンパク質の酸化反応

タンパク質のジスルフィドの形成過程は、酸素などの電子受容体の存在下、自発的に起こると考えられてきた。しかし、今から20年ほど前にBeckwithグループと伊藤グループが、同時期にそれぞれ独立に大腸菌の*dsbA*変異株を単離し、その解析から、生体内での効率よいジスルフィド結合形成には酵素による手助けが必要であることを初めて示した[2,3]。*dsbA*変異を有する大腸菌は、生育は可能であるが、ジスルフィド結合の形成に欠損を生じるため、分泌タンパク質の多くが天然型の立体構造をとれずに細胞内で速やかに分解を受ける。そのため変異株は、鞭毛が形成できずに運動性を失う、還元剤や金属に対する感受性が上昇するなど、多様な表現型を示す[7]。

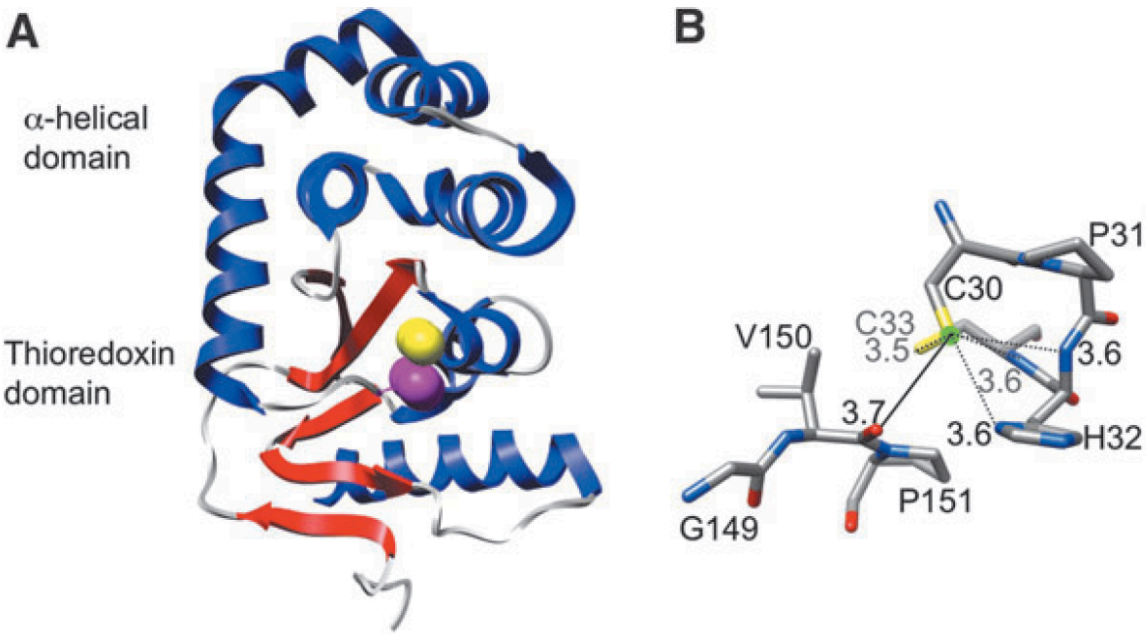


図1-2：DsbAの三次元構造[4]

(A)酸化型DsbAの構造。αヘリックスを青で、βシートを赤で、151番目の残基の*cis*-プロリンをマゼンダで、活性部位のシステインの硫黄原子を黄色で示した。Cys30の硫黄原子は表面に露出している。(B)還元型DsbAの活性部位のスティック表記による拡大図。Cys30のチオレートアニオンを安定化していると考えられる水素結合相互作用を点線で示し、その距離をÅ単位で示した。緑の球はCys30の硫黄を示している。*cis*-プロリンループ内に存在するVal150の主鎖の酸素とCys30の硫黄原子との間の距離は実線で示した。

DsbA(E.C.5.3.4.1)は分子量21 Kのペリプラズムタンパク質であり、チオレドキシン様のフォールド中に、活性中心Cys30-Pro31-His32-Cys33をもつ[5]。活性中心を構成する2つのシステインは生体内ではジスルフィド結合を形成していて、DsbAは酸化型で存在している[6]。ジスルフィド結合の導入は、**図1-3**のようにリボソームから翻訳伸長した新生ポリペプチド鎖がSecトランスロコンを通過しペリプラズムに移行する際に、速やかにDsbAによって導入される[7]。

新生タンパク質にジスルフィド結合が導入された結果、DsbA自身は基質分子から2つの電子を受け取り還元型になる。この反応過程で、基質上の1つのシステイン

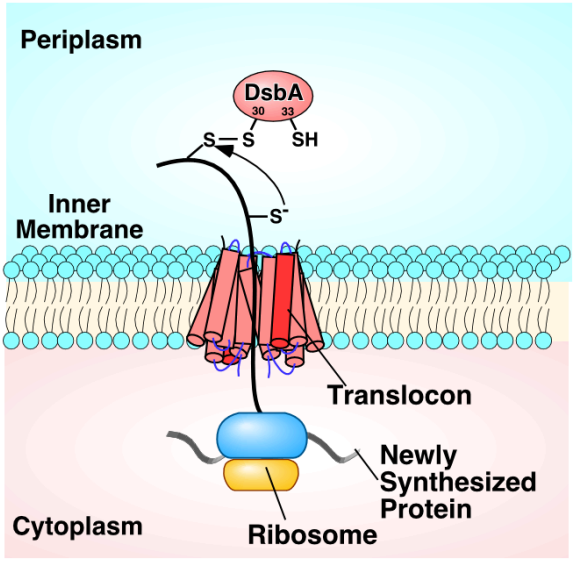


図1-3：大腸菌ペリプラズムでのDsbAによる新生タンパク質へのS-S結合導入

残基とDsbAのシステイン残基とが分子間ジスルフィド結合で連結した中間体が形成されると考えられている。

DsbAの活性部位のCys30のpK_aは、約3.5と通常のタンパク質分子中の平均値8.3に比べて極端に低く、反応性の高いチオレートアニオンになりやすい[8]。一方、Cys33のpK_aは10より大きいと予測されている[8]。また、DsbAの酸化還元電位は-124 mVであり、PDI(-175 mV)、チオレドキシン(-270 mV)、グルタチオン(Glu-Cys-Gly;-240 mV)[9]、システイン(-220 mV)、DTT(-330 mV)[10]に比べて非常に高く、DsbAの強い酸化力を示している[11]。DsbAの酸化還元電位はチオレドキシン様タンパク質の中でDsbL(-95 mV)に次いで2番目に高い[12]。DsbAは試験管内において、PhoA[13]、RNaseA[14]、Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor[15]などの基質となるタンパク質を速やかに酸化できると報告されている。これは、チオレドキシンが–270 mVという低い酸化還元電位をもち、細胞質内でジスルフィドの還元に働いているのとは対照的である[9]。このようにDsbAが高い酸化力を持つ理由のひとつは、DsbAは酸化型に比べて還元型が構造的に22.7 kJ/mol安定であることにある[10, 16]。これに対し一般のタンパク質で

は、ジスルフィド結合の形成により構造が安定化する。このように酸化型DsbAが、還元型に比べて不安定であることが酸化型の反応性を高め、基質にジスルフィドを導入するための熱力学的駆動力として働いている。このようなDsbAの強い酸化力には、活性部位CXXCモチーフの内部のXX配列、すなわちPro31-His32配列が寄与していることが明らかとなっている（**図1-2**）[17]。DsbAのチオレドキシンフォールドの最初のヘリックスのN末端に存在する正電荷の双極子モーメントによってCys30は安定化されている[18]。Pro31はヘリックス双極子とチオレートアニオンの静電的相互作用を高め、一方、His32は静電相互作用的あるいは水素結合的にチオレートアニオンを安定化することが分かっている。この効果は還元型の場合で可能で、酸化型では起こらない。DsbAの分子表面には、活性中心に沿うような形で、比較的深い疎水的な溝が存在しており、この部分でDsbAは基質分子と相互作用していると推測されている[5]。さらに、酸化型DsbAは還元型DsbAよりも構造的に柔軟であることが分かっており、このことがDsbAの触媒的反応に重要な役割を果たしていると考えられる[19]。酸化型DsbAが柔軟であるからこそ基質認識が促進され、一方、還元型DsbAが剛直であるために、S-S結合形成後の基質解離が促進されると考えられている。DsbAが基質タンパク質を疎水的相互作用で認識するというモデルは、基質タンパク質のフォールディングが完了していない間にシステイン残基を認識すると考えれば理にかなっていると思われる。フォールディングが完了してしまえば、システインは内部に埋もれてしまう可能性があるからである。事実、DsbAはDTTと反応するよりも、構造を形成していない基質タンパク質と10から25倍も速く認識する[14]。さらに、DsbA(Cys33変異体)がunfold状態のRNase T1と複合体を形成しているときは、DsbAが4.7 kJ/mol安定化されていることが分かっている[20]。これらの点から、DsbAは立体構造のほぐれた分子のみを基質として認識できると考えら

れる。基質タンパク質のジスルフィド結合を形成した後、DsbAは解離し、タンパク質のフォールディングが起こる。

図 1-2 に示したように DsbA の X 線結晶解析は 1993 年に発表されており、DsbA はチオレドキシンと一次配列上は 10%しか相同性がないにもかかわらず [21]、立体構造ではチオレドキシンに類似していることが明らかとなった [22]。チオレドキシンフォールドは多くの酸化還元タンパク質に見られるものの、配列相同性は小さい。一方で、4 つのβシートや 3 つのαヘリックス、CXXC モチーフを持つことは共通している。チオレドキシンの活性サイトである CGPC モチーフを DsbA の CPHC モチーフに変換すると、DsbA の性質に近くなったことが報告されている [21]。DsbA はチオレドキシン様ドメインのほかに、数本のαヘリックスから構成されるαヘリカルドメインをもち、活性部位は二つのドメイン間に形成される疎水的な溝の中に位置している [5]。DsbA をはじめとするチオレドキシンフォールドを有するタンパク質のレドックスの特性は、活性システイン部位 Cys-X-X-Cys の X のアミノ酸残基に強く影響されるが [17,21]、DsbA の構造に影響を与えるのは、CXXC モチーフだけではない。DsbA を含む大部分のチオレドキシンスーパーファミリーは種間で保存された *cis*-proline 残基を有する [23,24]。この残基を含むループは、3 次元的には CXXC モチーフの近傍であるが、配列的にはほど遠い (DsbA の場合、Cys30-Pro31-His32-Cys33 と Pro151)。これまでにこの *cis*-proline ループがチオレドキシンやその類縁体の安定性や構造に対して重要な役割をすることが分かってきている。DsbA 中に存在する *cis*-proline である Pro151 を Threonine に変異させると、大腸菌細胞内において、DsbA と基質タンパク質とが複合体を形成後、解離しにくくなることが観察されていることから、この残基は構造的・機能的に DsbA の基質タンパク質の解離過程に重要な役割を担っていることが分かった [25,26]。また、DsbA

と基質ペプチドとの複合体の結晶構造において、*cis*-proline の上流の数残基が基質の一部分と逆平行βシートを形成しており、このことから *cis*-proline 残基は基質の認識にも重要であることが分かった[27]。さらに、近年の研究より、DsbA の *cis*-proline の隣の Val150 が DsbA のレドックス特性と基質特異性に大きく影響していることが分かった[28,29]。このように、CXXC モチーフに加えて、*cis*-proline ループは DsbA や他のチオレドキシンスーパーファミリーの酵素の特性を調べるうえで重要であることがわかった。

1-1-2　DsbBの構造とDsbAの酸化反応

フォールディング途上の基質を酸化するとDsbA自身は還元型になる。再び基質を酸化できるようになるためには、DsbAは再酸化されねばならない。この役割は内膜に存在する分子量20 Kの4回貫通型膜タンパク質DsbB(E.C.1.8.5)が担っている（**図1-1**）。DsbBは4つの膜貫通部位と2つのペリプラズムドメインを有する[30]。各ペリプラズムドメインにはDsbBの機能に必須なシステインが2個ずつ計4個 (Cys41とCys44、Cys104とCys130)存在している（**図1-1**）。DsbBのCys41-Cys44の近傍は、DsbAと同様にCys-X-X-Cysというモチーフを有しているが、Cys41-Cys44の領域は大変短くチオレドキシンフォールドは存在しない[31]。言い換えると、DsbBはチオレドキシンスーパーファミリーには属さない。DsbBは通常、細胞内でCys41とCys44、Cys104とCys130の間でジスルフィド結合を形成した酸化型の状態に維持されているが、*dsbB*欠損変異株では還元型になる。そのため*dsbB*変異株では、*dsbA*変異株同様、ジスルフィド結合形成が欠損する。

DsbAはDsbBによって酸化される。それでは、DsbBは何によって酸化されるのであろうか？伊藤らは、呼吸鎖電子伝達系の構成因子であるヘムあるいはキノン (ユ

ビキノンおよびメナキノン)を欠乏状態におくと、DsbAとDsbBが還元型になり、分泌タンパク質のシスルフィド結合形成が起こらなくなることから、呼吸鎖の機能がDsbBの酸化に必要であることを示した[32]。のちにBardwellらが生化学実験から、キノンがDsbBからの直接の電子受容体として働くことを証明した[33]。DsbBからの電子はまずキノンに渡され、ここからシトクロム(チトクロム)酸化酵素などの末端酸化還元酵素を経て、最終的には酸素やフマル酸などの電子受容体の還元に使われる(**図1-1**)。

DsbBの有する2組のシステイン対は還元型DsbAを酸化し、キノンを還元するうえで、どのような役割を担っているのであろうか？DsbAの活性部位のCys33を他のアミノ酸に変えた変異体では、DsbAのCys30とDsbBのCys104との間で分子間ジスルフィド結合を形成したことから、これら2つのアミノ酸は直接相互作用しうることが分かった（**図1-4**）[34, 35]。次に伊藤らは、DsbBのそれぞれのシステイン対に変異を導入し、その役割の詳細な解析を行なった。電子が経路内を上流から下流へと順に流れる場合、下流に位置する因子が欠如すると上流の因子は還元型になるはずである。一方、上流の因子を欠如させても下流の因子は酸化型のままのはずである。このような観点から、結果の解釈を行ない、還元型DsbAに由来する電子は、DsbB内をCys104-Cys130対からCys41-Cys44対へと移動し、呼吸鎖へと受け渡されると予測した[36]。のちに、Bardwellらは生化学実験により、Cys41-Cys44が実際にユビキノンを還元できることを示している[37]。Cys41-Cys44がキノンによって酸化されるメカニズムについて、DsbBの2つの領域がキノンとの相互作用に重要であるらしいと考えられた。Beckwithグループの門倉らはジスルフィド結合形成機能の低下を指標にスクリーニングを行ない、DsbBのArg48がCysあるいはHisに変換した変異株を得た[38]。この変異株では、ジスルフィド結合形成が嫌気的条件でのみ欠損した。この結

果を裏づけるように、精製酵素はメナキノン(嫌気的条件下で働くキノン)を利用できなかった。さらに、ユビキノンに対する親和性も低下していた。よってDsbBのArg48はキノンとの相互作用に重要であることが示された。一方、伊藤らはCys44とArg48の間にAlaを挿入するとDsbBの呼吸鎖による酸化に著しい欠損を生じることを示している[39]。したがって、Arg48とその分子内における位置(Cys44からの距離)がDsbBとキノンとの相互作用に重要らしいと考えられた。

1-1-3　酸化還元電位とは逆に進行するDsbBによるDsbAの酸化反応経路

(1) DsbA-DsbB-ユビキノンの酸化還元電位のパラドックス

しかしながら近年、DsbA-DsbB-キノン電子伝達経路に疑問を投げかける結果が相次いで報告された。一般に、酸化還元反応は活性部位間の酸化還元電位の勾配により駆動される。したがって DsbB の酸化還元電位は DsbA より高いであろうと予想される。しかしながら、DsbB の各ジスルフィドの酸化還元電位を低分子酸化還元化合物との平衡反応を測定し見積もった結果、**図 1-4** のように Cys104-Cys130 ペアが–224 mV、Cys41-Cys44 ペアが–207 mV であった。すなわち、DsbB の 2 つの活性部位は共に DsbA(–120 mV)よりも低い酸化還元電位（弱い酸化力）をもつことが判明した [40,41]。

DsbA-DsbB 間の酸化還元電位の“uphill”は DsbA 再酸化反応の律速因子になっているだろうと予想したが，酸化還元電位が大きく低下した（つまり DsbB の酸化還元電位に近づいた）DsbA 変異体の再酸化速度が野生型と変わらないことから，DsbA-DsbB 間の酸化還元電位のギャップが律速因子ではないことが示唆された [40]。

酸化還元電位の逆転を克服するDsbA再酸化反応メカニズムはどのようなものであろうか？1 つの解釈として、ユビキノンの強い酸化力（+110 mV）さえあれば

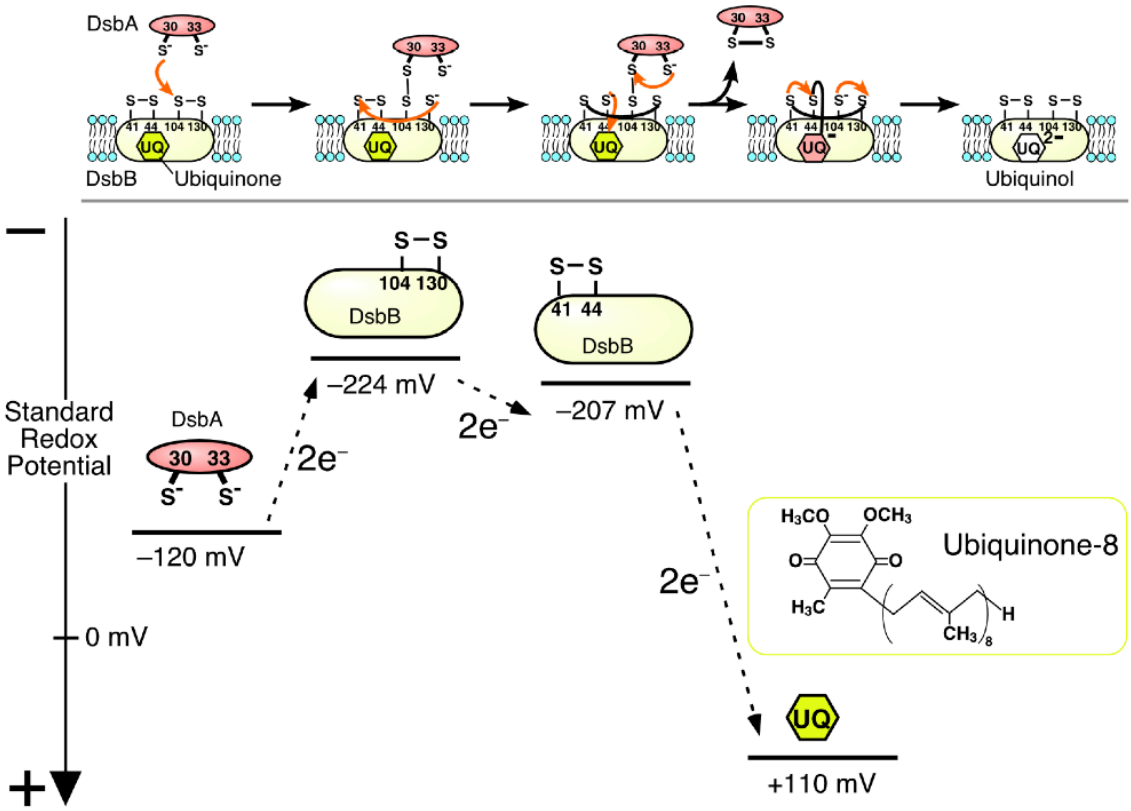


図 1-4：DsbA、DsbB およびユビキノンの酸化還元電位 [40,41]

DsbA-DsbB 間の電位の逆転を何とか克服できると考えられる。実際、ユビキノン非存在下では、DsbB は DsbA を完全には酸化することはできず、また catalytic turnover も観られない。しかし、ユビキノン非結合型 DsbB と還元型 DsbA を 1 対 1 に混合した結果、個々の酸化還元電位からは予想し難い DsbA 酸化反応が半当量近く進行し、同時に 2 種の部分還元型の DsbB が生じた [41]。これら部分還元型の DsbB をプロテアーゼ消化および質量分析により調べた結果、Cys41-Cys44 ペアおよび Cys104-Cys130 ペアのいずれか片方が還元された生成物であることが判明した [41]。つまり、DsbB はユビキノンの助けを借りなくても，DsbA と特異的な相互作用をすることにより自身の酸化還元電位を変動させ、DsbA をある一定量酸化できるように巧妙な仕組みを備えていると考えることができる。

(2) DsbA-DsbB-ユビキノンの反応経路

上記ユビキノン非結合型 DsbB と還元型 DsbA の反応において、部分還元型の DsbB に加え、DsbA と DsbB が分子間ジスルフィド結合によりリンクした DsbA-DsbB 複合体の蓄積が観察された。この複合体にユビキノンを添加すると、DsbA、DsbB 共に酸化型として開裂した。このことから、DsbB による DsbA の再酸化反応には、単純なジスルフィド交換により進行する経路（Pathway I）と、中間体として DsbA-DsbB 複合体を経由する経路（Pathway II）が存在することが稲葉・伊藤グループにより提唱された [41]。**図 1-5** に示したように Pathway I では DsbA と DsbB の中間体が形成された後すぐに DsbA の Cys33 による分子内求核反応によって DsbA の酸化が起こる経路である。一方、Pathway II では DsbA と DsbB が結合後 DsbB 分子内でジスルフィド結合の組み替えが起こった後で DsbA の酸化が進行する経路である。稲葉らは DsbB による DsbA の酸化は主に Pathway I で進行し、Pathway II は副次的に進行すると考えている [41,42]。

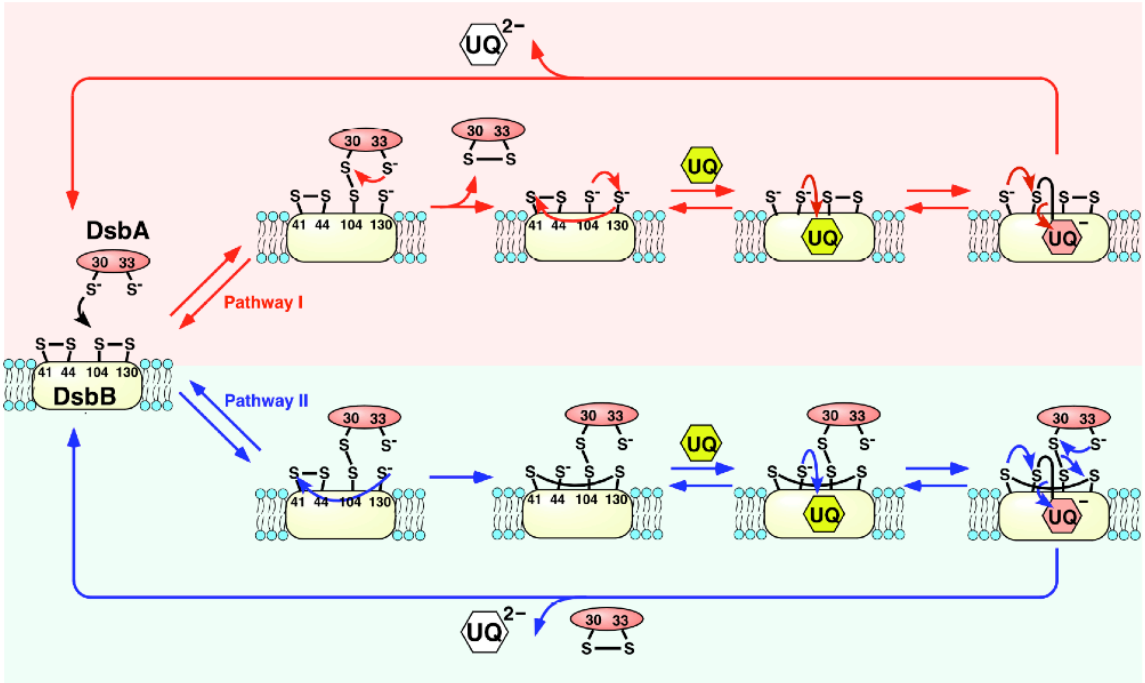


図 1-5：DsbB による DsbA 酸化における 2 つの反応経路

一方で、Beckwith グループの門倉らは、DsbA 再酸化反応中に DsbA の Cys30 と DsbB の Cys104 の間、および DsbB の Cys130 と Cys41 の間の 2 本のジスルフィド結合を含む DsbA-DsbB 複合体が形成されることを示唆している[43]。門倉らは、DsbB 分子内の電子の移動の解析を容易にする目的で、**図 1-6** に示したように DsbB を N 末端側(α)と C 末端側(β)、2 本のポリペプチドとして発現させ、その活性を大腸菌内で再構成することに成功した。

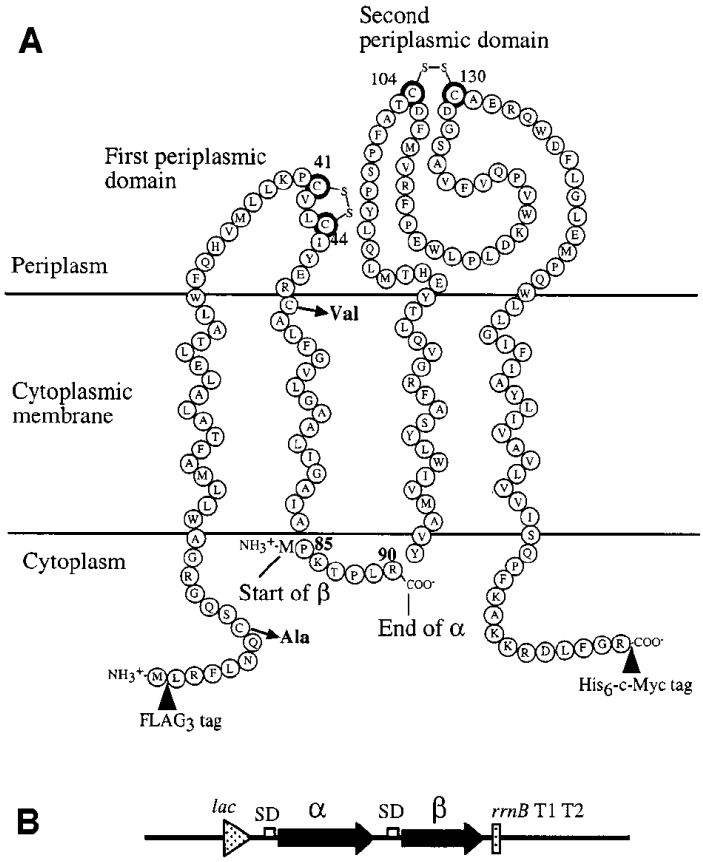


図 1-6：門倉らが行った DsbB 切断断片の共発現系の概念図

(A)4 回貫通型の DsbB を α (Met1 から Arg90)と β (Pro85 から Arg176)の 2 つの断片に分けて発現させた。(B) α 領域と β 領域を *lac* プロモーターの制御下に配置したオペロン。

その結果、門倉らは反応中間体と考えられるヘテロ 3 量体を検出した。この 3 量体は DsbA と、DsbB の分割された 2 個のドメイン(αとβ)から構成されており、DsbA

と C 末端側ドメイン(β)が Cys30 と Cys104 間の分子間シスルフィド結合で連結され､C 末端側ドメイン(β)と N 末端側ドメイン(α)が Cys130 と Cys41 間の分子内ジスルフィド結合で連結されていた。この結果を基に、門倉らは DsbA と DsbB の複合体を経由した後、DsbA の酸化が達成される反応モデルを提唱している。このモデルは、稲葉らの提唱する Pathway II に相当する(**図 1-5**)。その後 2004 年に稲葉らは門倉らのモデル(Pathway II)をサポートする現象を発見した[44]。DsbA 再酸化反応中に DsbB に結合した本来淡黄色(λ_{max} = 約 400 nm)を示すユビキノン分子が 500 nm に強い吸収(ピンク色)をもつ特殊な電子状態に遷移することが分かった(**図 1-8**)。そして、DsbB 活性部位の系統的な変異体解析により、この遷移は DsbB の Cys44 が還元型になることにより引き起こされることを解明した。稲葉らの解釈では、**図 1-7** のように①DsbA-DsbB 間でジスルフィド結合を形成することにより Cys130 がフリーになり、②それが Cys41-Cys44 を求核攻撃し、③Cys41-Cys130 ジスルフィド結合を形成する。その結果フリーになった Cys44 がユビキノン分子と相互作用し、ユビキノンの電子状態を変化させる。このような中間状態を経て、DsbA から DsbB へ 2 電子渡り、最終的にユビキノンがそれを受け取ることで反応の 1 サイクルが終結する。ここで肝心なことは、フリーとなった Cys130 が Cys41 と速やかに安定なジスルフィドを形成することにより、酸化還元電位的には起こりやすい DsbB から DsbA への逆電子移動反応が起こりにくくなっている点である。

また、高橋らは嫌気条件下で働くメナキノン分子も DsbB 上で同様の電子状態遷移(青紫色、λ_{max} = 約 550 nm)を起こすことを観察している(**図 1-8**)[45]。

稲葉らは、DsbB 分子上で起こるキノンの電子状態遷移の実体を探るため，いくつかの基礎的実験を行い，キノンの特殊な発色は pH 依存的であり，中性 pH 以上でのみ観察される（$pK_a = 6.6$）こと、ヨードアセトアミドなどのシステイン修飾試

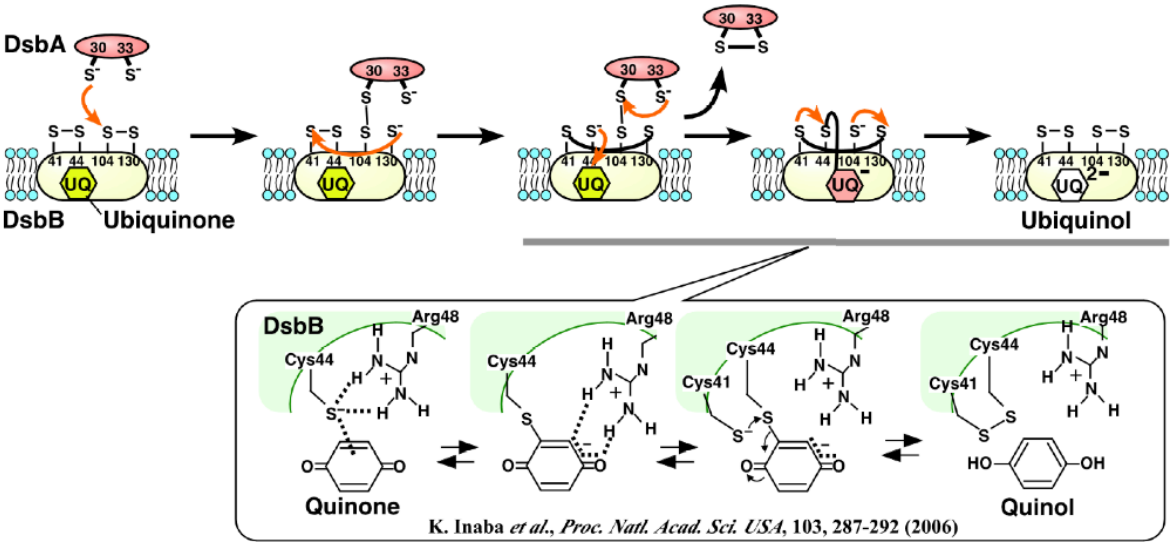


図 1-7：DsbB による DsbA 酸化反応におけるユビキノンの電子状態変化

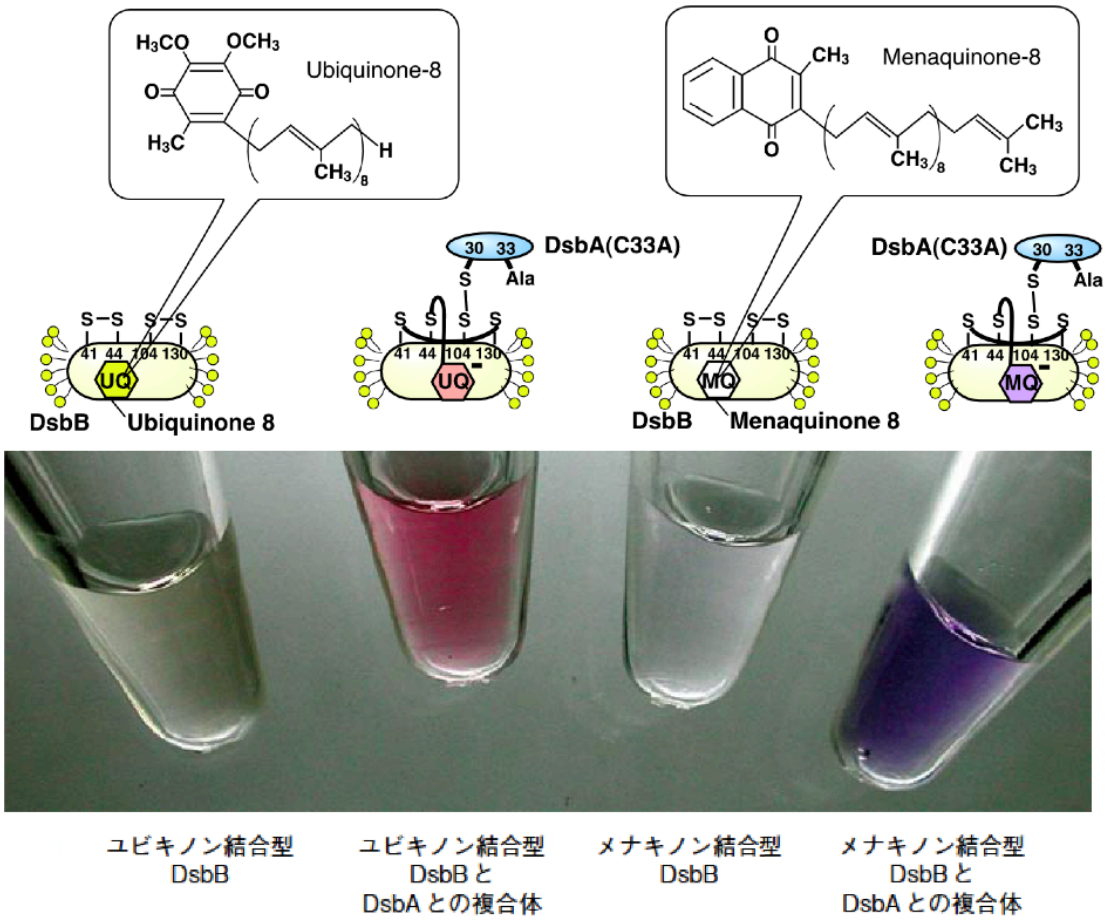


図 1-8：DsbB の Cys44 のチオレートアニオンと UQ、MK が相互作用することによって生じる呈色 [46]

薬や SDS，塩酸グアニジンなどの変性剤の添加によって，キノンの色は消滅することを発見した[44]。以上の結果から、DsbB の高次構造上で Cys44 のチオレートアニオンとキノン分子が電荷移動錯体を形成することが、キノン電子状態遷移の正体であると推測した。この推測は、速い経路と遅い経路の反応モデルとも合致するものであった。この仮説を検証するため，量子化学シミュレーションに取り組んだ[47]。しかし、単純にベンゾキノンとチオレートアニオン間の電荷移動錯体を仮定しただけでは、実験結果に合う計算結果は得られなかった。そこで，すべての生物種の DsbB で Cys44 の 4 残基 C 末端側に Arg48 が保存されていること[38]に着目し、グアニジニウム基の正電荷を考慮に入れて再度シミュレーションを試みた結果、**図 1-9(a)**で示した geometry において実験結果に合う吸収波長と吸光度が算出された。Arg48 のグアニジニウム基は静電的な相互作用により Cys44 のチオレートアニオンを安定化し、その結果チオレートとベンゾキノンの間の電荷移動錯体が安定に形成されると解釈できる。実際、Cys44 と Arg48 を含む領域は α ヘリックスをとっていると予測され、4 残基離れた両アミノ酸の側鎖が近接することは十分に想定される。この想定は，Arg48 に変異を加えたり，Cys44 と Arg48 の間に Ala を挿入したりするとユビキノンの電子状態遷移が起こらない[38,39]ことからも、実験的サポートを得ている。さらに，稲葉らの量子化学シミュレーションではチオレートとキノン間の電荷移動錯体に加え、両分子が共有結合で結ばれた付加生成物が過渡的に生成することも予想された。付加生成物の状態では、Cys44 上にあった電子は完全にキノン側へ移動し、**図 1-9(b)**のようにキノンのカルボニル酸素と Arg48 のグアニジニウム基の間に新たな静電相互作用が生じる。ここでグアニジニウム基の正電荷は、キノン分子の求電子性を高めることに寄与していると考えられる。

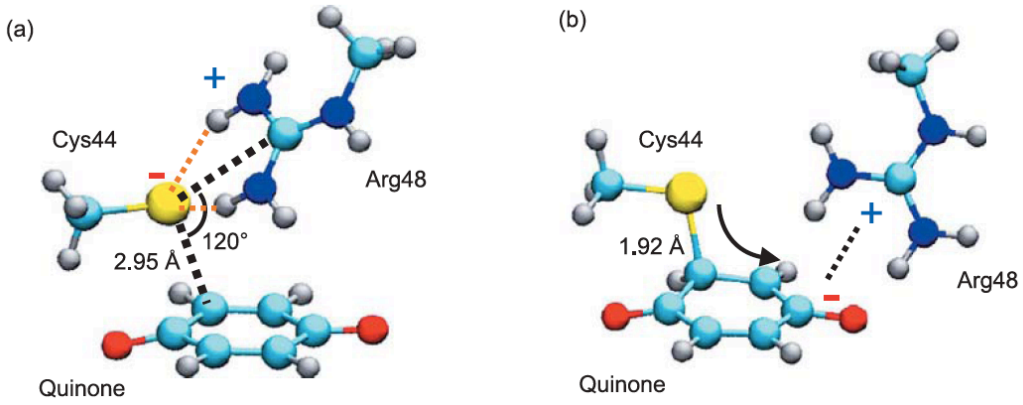


図 1-9 : (a)正に帯電したグアニジニウム基が重要な寄与をしている、チオレートアニオンとキノンのあいだで形成された complex および(b)付加体の量子化学シミュレーションモデル [49]。薄青 : 炭素、 濃青 : 窒素、赤 : 酸素、黄色 : 硫黄、白 : 水素。点線は推定される水素結合を表す。

門倉、Beckwith らの提案した協奏モデル(Pathway II)は Tapley らの stopped flow を用いた動力学測定によってもサポートされている [48]。Tapley らは DsbA と DsbB が結合後、続いて速いチオール-ジスルフィド結合交換反応が起こることは、特徴的な紫色を生じる Cys44 チオレートとキノンとの電荷移動錯体の形成によって確認している。この素早いチオール-ジスルフィド結合交換反応に続いて、より遅く起こるキノンの還元および DsbA の解離が続く。実験の結果、DsbA の酸化速度は、ユビキノンの還元速度と同じであることを述べている [48]。また、DsbB について、イソプレノイド鎖の長さはユビキノンの反応性に影響を与えることを stopped flow を用いた 500 nm 付近の吸収の減少から測定した。人為的に添加した UQ1 は内在性の UQ8 よりも 6 倍反応速度が低下していた。このことから長いイソプレノイド鎖はユビキノンをしっかりと膜に固定する、または DsbB の Cys44 近傍の適切な位置にユビキノンを配置するために必要なのかもしれない。このように、DsbB と DsbA のそれぞれ 4 個、2 個のシステインの共同作業が、酸化力の高い DsbA の還元型を酸化するために必要なのかもしれないと考えられた。

1-1-4　DsbA-DsbB-UQ複合体の構造解析

水溶性分泌タンパク質である DsbA の X 線結晶構造解析は 1993 年に報告されていたものの [50]、4 回膜貫通型タンパク質である DsbB の構造解析には困難を極めていた。その原因は DsbB の膜外ドメインは比較的小さく高品質の結晶を得ることが困難であったことにある。そのため、上記に述べた DsbA の再酸化を担う DsbB の分子機構については、国際的に議論が続けられていた。しかし、2006 年に稲葉らは、DsbB の結晶構造を DsbA との複合体の状態で解くことに初めて成功した [51]。あえて水溶性タンパク質である DsbA との複合体として結晶化することを狙ったところに成功の要因があった。DsbA-DsbB-ユビキノン複合体の結晶構造を**図 1-10** に示した。アミノ酸配列から予測された通り、DsbB は 4 本の膜貫通ヘリックス（TM1～TM4）からなり、4 本のヘリックスバンドルの基本骨格を持つ。これら膜貫通ヘリックスのうち、TM3 が特に長く傾いているのが特徴である。さらに、DsbB は TM3 から TM4 にかけての長いペリプラズム側ループの中に、膜に水平方向のαヘリックスを 1 本持つ。この膜水平ヘリックスから TM4 にかけての領域は、電子密度が欠失しており、この領域は非常に動きやすい性質をもつものと考えられる。電子受容体として機能する補酵素ユビキノンは、DsbB のヘリックスバンドルの中、TM2 の N 末端近傍に位置する。一方、DsbA については、DsbB 複合体のときと単独のときとで、構造に大きな違いはなかった。注目すべきことに、DsbA にはフォールディング途上の基質と結合すると考えられている疎水的な深い溝が存在する。DsbB の Cys104 を含む延びた領域はまさにこの溝にはまりこむ形で DsbA の Cys30 と結合している。DsbA は、DsbB のこの高次構造に欠けた領域を、フォールディング途上の基質タンパク質かのように認識していると考えられる。

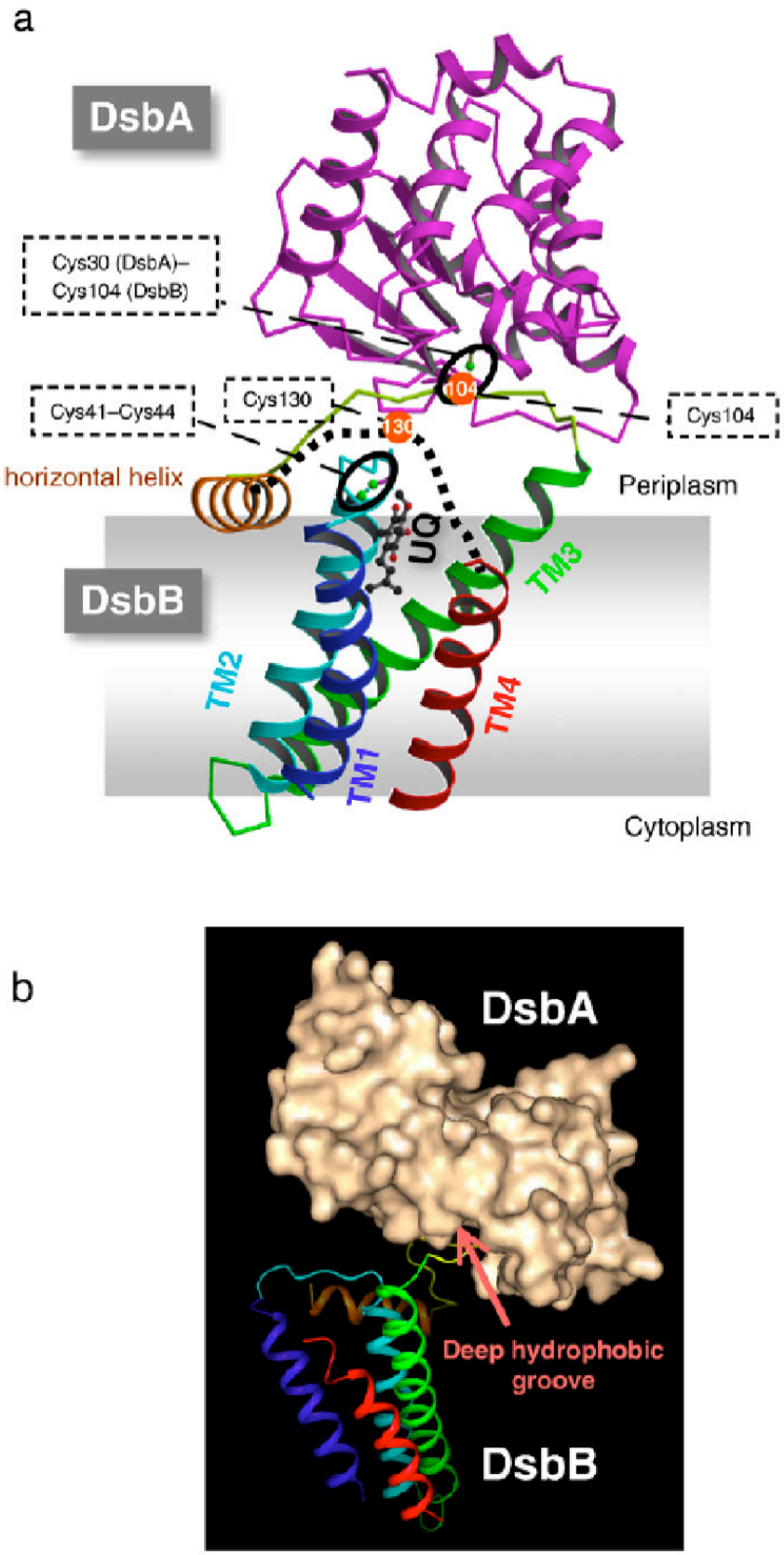


図 1-10：(a) DsbA-DsbB-ユビキノン複合体の結晶構造　(b) DsbA 中の疎水的な深い溝と DsbB の位置関係 [31,52]

この稲葉らの発表した DsbA(C33A)-DsbB(C130S)-ユビキノン複合体の結晶構造が発表された後、DsbB(native)と DsbA(C33A)とユビキノンの複合体の X 線結晶構造解析を Malojčić らが 2008 年に行った[53]。また、DsbA との複合体を形成した状態ではなく DsbB だけの結晶構造を求めるために、近年 Zhou らによって、Cys44 と Cys104 をセリンに置換した DsbB(C44S,C104S)について、NMR を利用した構造解析がなされた。このことで、DsbB 分子内のチオール-ジスルフィド結合交換が起こった Cys41-Cys130 の内部ジスルフィド結合を形成した状態の構造解析がなされた[6]。X 線結晶構造解析の場合と同様に NMR の場合も変異体(DsbB(C44S,C104S)を用いることでコンフォメーション変化が抑えられて、NMR 解析が可能になった。

しかし、依然として Cys104-Cys130 のジスルフィド結合の部分に関する情報が欠けていた。そこで、稲葉らは 2009 年に DsbB(C41S)についての構造解析を行った[42]。ここでは C41S 変異体を使用しているが、DsbB の構造を uniform にするために行ったものである。これにより解かれた始状態 DsbB の結晶構造と DsbA-DsbB-ユビキノン反応中間複合体の結晶構造を比較することにより、DsbA の結合によって誘起される DsbB の膜外ループ領域の大きな構造変化が明らかとなった(**図 1-11**)。

DsbB のペリプラズム側ループ中には**図 1-11** に示すように膜に水平に結合した特徴的なαヘリックスが存在するが、この膜水平ヘリックスは両親媒性の性質を有し、膜側にはいくつかの疎水性アミノ酸が集中し、膜との相互作用に深く関わると予想された。そこで、これら疎水性領域に電荷を有するアミノ酸を系統的に導入し、その機能的影響を解析した。その結果、膜水平ヘリックスが膜から解離することにより、DsbB の DsbA 酸化機能が大きく低下することが判明した。稲葉らは、膜水平ヘリックスが膜とペリフェラルに結合することにより DsbB のシステインの動きが巧妙にコントロールされ、DsbA から DsbB への電子移動反応が駆動されるモデル

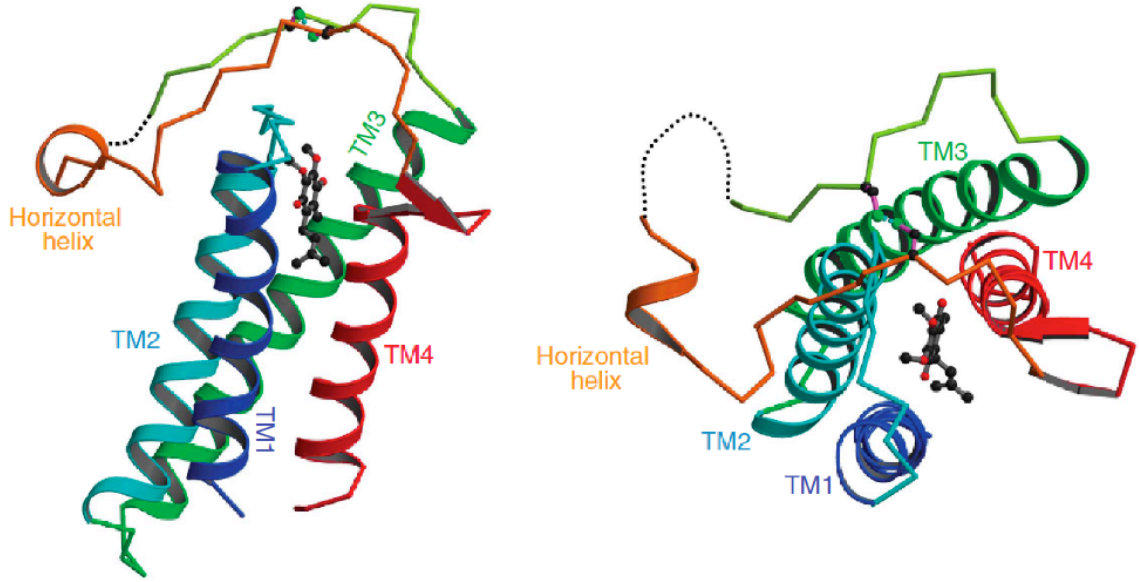


図 1-11：DsbB(C41S)の(左)膜水平方向、(右)膜垂直方向からのリボン表示

DsbB(C41S)の TM1(12–35 残基), TM2(43–63 残基), TM3(69–96 残基), TM4(142–161 残基)と膜水平ヘリックス(116–120 残基)をそれぞれ青、シアン、緑、赤、オレンジで示した。ユビキノンは ball と stick 表示で示した。黒が炭素原子、赤が酸素原子である。点線部位は Arg109–Trp113 領域を示しており、この領域は電子密度が不明瞭であった。

を提唱した[42]。以上の結果、本来酸化されにくいはずの DsbA を効率良く酸化するため、DsbB が実に巧妙な構造ダイナミズムを確立していることが解明された。

1-2 DsbA-DsbB-ユビキノンシステムの速度論的解析

DsbB による DsbA の酸化反応については、これまで、SDS-PAGE 解析[41, 43–45]や吸光度分析[44–48]が主に利用されている。

SDS-PAGE 解析では、**図 1-12** のように細胞を培養液ごとトリクロロ酢酸(TCA)で処理し、全タンパク質をそのままの酸化還元状態で変性させた後、SDS-PAGE を行うことで、DsbA および DsbB の酸化還元状態および複合体形成を観察している。-SH 基に対する修飾剤である 4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-Disulfonic Acid, Disodium Salt（AMS）を用いれば-SH 基 1 つと反応すると 500 Da 程分子量が増加するので、SDS-PAGE により酸化状態と還元状態の区別がつく。SDS-PAGE を用いた解析は、トリクロロ酢酸（TCA）によって、細胞中のタンパク質を変性し、反応を停止させることで、その状態での DsbA と DsbB の反応解析が可能であり、*in vivo* での平衡論的な議論は可能であるものの、速度論的な理解に欠ける。

一方、吸光度分析では stopped flow が使用され、DsbA の CXXC モチーフ近傍に存在するトリプトファンに由来する蛍光が酸化型よりも還元型で 3 倍強いことに着目し、DsbA 酸化反応を蛍光強度の減少で追う実験が行われた。さらには、DsbB が DsbA を再酸化する過程において、ユビキノンが本来の淡黄色（最大吸光波長は約 400 nm）から強いピンク色（最大吸光波長は約 500 nm）に過渡的に遷移する現象を利用して解析が行われた。ユビキノンの蛍光強度変化や DsbA のトリプトファンの吸収を観察する実験系においては、速度論的議論は可能であるが、膜タンパク質 DsbB を界面活性剤 DDM で可溶化した状態で測定を行うことを逸脱することはできない。膜タンパク質は常に周囲を取り囲む脂質分子と接した状態に存在するものであり、特定の脂質分子と強く相互作用し、そのタンパク質の機能に必須となる

場合もしばしば存在する。そこで、膜タンパク質の機能解析においては DDM で可溶化した状態よりも、脂質膜に再構成した状態で測定することが望ましい。膜タンパク質 DsbB についても、脂質膜に埋め込んだ状態で DsbA との反応を測定する必要がある。

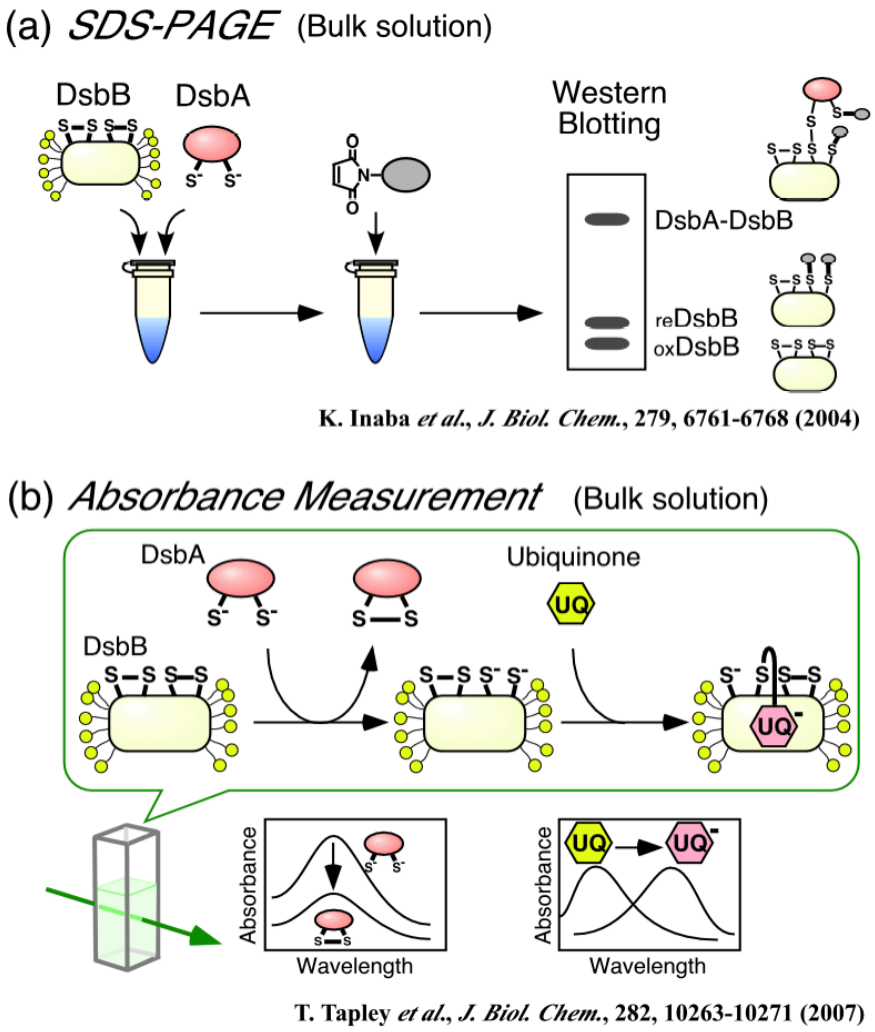


図 1-12：DsbB と DsbA の反応についてのこれまでに行われた研究例

1-3　水晶発振子マイクロバランス法を用いた分子間相互作用解析

1-3-1　水晶発振子マイクロバランス（QCM）法

(1) 水晶の圧電効果

ある種の結晶では、機械的なひずみをかけると結晶内のカチオンとアニオンの相対的な位置関係が変化し、結果として両者の重心は一致しなくなり分極が生じる。この現象は圧電効果 (piezoelectric effect) と呼ばれている。逆に結晶の上下に電極を取り付けて電圧を加えると、**図 1-13** に示したようにカチオンは負の電極へアニオンは正の電極へと移動し、結晶はひずみを生じることになる（逆圧電効果)。これらの現象は 1880 年にフランスの物理学者 Curie 兄弟によって発見された [54]。この発見の重要性は、機械的現象と電気的現象がイオン結晶を介して結びつけられた点にある。このような圧電効果は、水晶、ロッシェル塩($NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)、電気石など種々の結晶に見いだされているが、その中でも特に水晶（石英、quartz ; SiO_2）は、圧電特性、化学的性質、熱的安定性に優れていることが知られている。

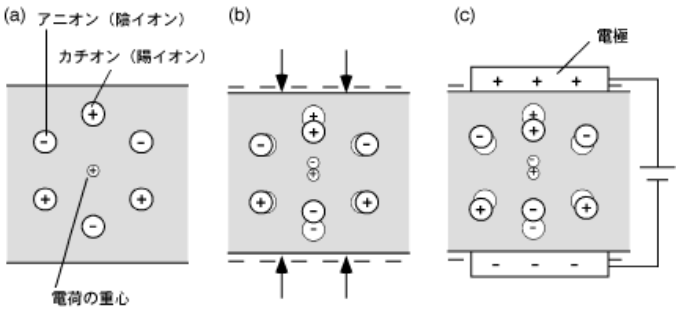


図 1-13：6 個のイオンからなる 2 次元結晶モデルと圧電効果および逆圧電効果 [55]

a) 初期状態：カチオンとアニオンそれぞれの電荷の重心は一致している。

b) 圧電効果：結晶に機械的ひずみを加えると正負の電荷の重心がずれる。

c) 逆圧電効果：結晶に電圧をかけると電荷が移動し、機械的ひずみが生じる。

図は圧縮された状態を示しているが、電極の極性を逆転すると結晶は膨張する。

(2) 水晶発振子

このような逆圧電効果を利用して水晶板の両面に電極を取り付けたものに電圧をかけてひずみを生じさせた後に印加電圧を解除すると、**図 1-14** のように水晶板はずり振動を生じてから元に戻る現象を示す。このときの印加電圧を交流電場としてずり方向の共振周波数に同期させると、水晶板は発振子としてその水晶板のもつ固有振動数で共振振動させることができる[55,56]。このような水晶発振子は、きわめて安定な振動数が得られることから、時計、通信機器、コンピュータなど様々な分野に周波数制御素子として幅広く利用されている。水晶の圧電効果によるひずみは、結晶の対称性、電場の方向性、結晶軸に対する結晶基板の切り出し角度に依存する。そのため、結晶軸に対して適当な角度で切り出された結晶だけが、結晶表面に平行方向に振動するずり振動を起こす。水晶は、**図 1-15** のように三方晶系に属する結晶である。水晶の六角プリズムの中心軸を z 軸とし、z 軸に垂直な成分のうち(六角形の)対角線方向を x 軸、それらに垂直な成分を y 軸とする。y 軸に垂直に切り出した水晶板を Y-cut、Y-cut を x 軸回りで回転し z 軸とのなす角度を 35°15' としたものを AT-cut と呼ぶ。AT カット型水晶発振子はずり振動を起こすことが知られており、またその振動は**図 1-16** のようにおもりのついたバネ、振り子、振動する弦の振動、すなわち単振動と類似しているものとして捉えることができる。AT カット型水晶発振子はその振動数の温度依存性が極めて小さいため、広く使われている。本研究に用いた 27 MHz 水晶発振子も AT カット型の水晶を用いている。

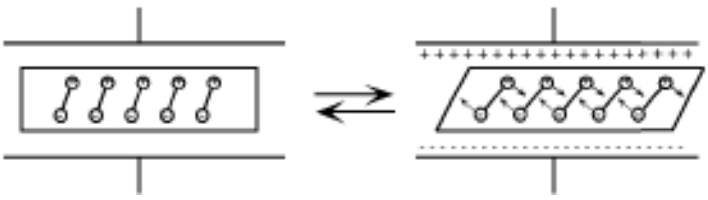


図 1-14：ずり振動の逆電圧効果の模式図[56]

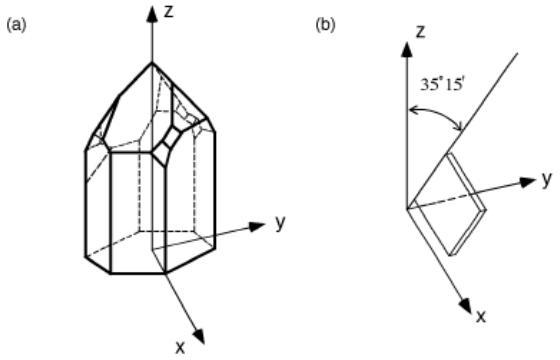


図 1-15：水晶の構造 [55]

(a) 結晶軸の取り方: 右水晶の構造(旋光性の異なる左水晶も存在する)

(b) AT カット型水晶発振子: 水晶板の面は x 軸に平行で、z 軸から 35° 15' 傾いている。

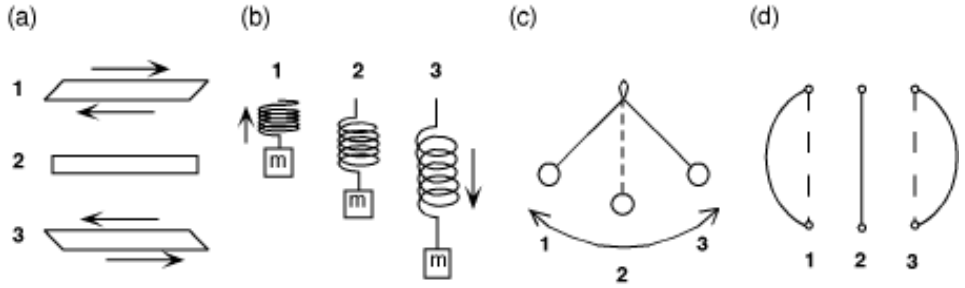


図 1-16：力学的振動系の模式図 [56]

(a) AT カット水晶のずり振動, (b) おもりのついたバネの振動,

(c) 左右に振れる振り子の振動, (d) はじかれた弦の振動

（3）水晶発振子による質量測定

水晶発振子はその電極上に物質が付着すると付着した物質の質量に比例して振動数が減少することが 1950 年代に報告されている [54, 57]。水晶発振子の微量天秤(マイクロバランス)としての利用は 1960 年代頃から始まり、広い分野での応用がなされてきた。振動数変化量と付着物質の質量との関係は以下に示す Sauerbrey の式で表される [58]。

$$\Delta F = \frac{-2F_0^2}{(\rho_q \mu_q)^{1/2}} \Delta m \qquad (1\text{-}1)$$

ここで、ΔF は振動数変化量(Hz)、F_0 は基本振動数(Hz)、A は水晶板に取り付けた電

極の面積(5.7 mm^2)、ρ_q は水晶の密度(2.65 g cm^{-3})、μ_q は水晶のずり剪断係数(2.95×10^{11} dyn cm^{-2})、Δm(ng/cm^{-2})は電極 1 cm^{-2} あたりに付着した物質の量である。式(1-1)の定数項を K と置くと次式のようになる。

$$\Delta F = -K\Delta m \qquad (1\text{-}2)$$

27 MHz AT カット型水晶発振子の場合は LB 膜累積実験により比例定数 K を求めると、K = 1.62 Hz ng^{-1} cm^2 となり、電極 1 cm^2 あたり約 0.62 ng の物質が付着すると 1 Hz 振動数が減少することが確かめられている [59]。これは、理論計算値の K = 1.6505 Hz ng^{-1} cm^2 と良い一致を示す。

水晶発振子をマイクロバランスとして使用するときには電極に付着した物質の粘弾性の効果を考慮しなければならない [61]。式(1-1)および式(1-2)に示したような、水晶発振子の電極上にかかる質量の増加と振動数の減少との相関関係は、付着した物質の剛性率と密度が水晶と同等であるような十分な弾性体について、またその付着量が極微量であるときにのみ成立する。したがって、液体や、極めて弾性の低いゴム、多量の膜などの QCM 電極上への吸着では、この相関から逸脱することが知られている。粘性物質に対する振動数減少と物性値の相関について、水晶発振子の共振振動数近傍での電気的等価回路で表したときの電気機械振動系での理論計算による検討が Kanazawa らによって報告されている [60,61]。水晶発振子の電気的等価回路は**図 1-17** のように表される。C_0 は水晶自体の持つ静電容量に、電極の持つ浮遊容量が加わったもので、並列容量と呼ばれている。L_m、C_m は水晶板の結晶方向に基づく定数となり、製造段階でのカッティングによって決定される。電極上に弾性体が付加された場合は、実際は水晶板が変形を受けたのと同様に考えられるので、これらの値が変化する。R_m は水晶の振動のエネルギー的損失による値で、電極上に付着した物質の特性によって変化する。よって、R_m を測定することによって電

極に接触した物質の特性、特に粘弾性を測定できる[62]。したがって、水晶発振子をマイクロバランスとして用いる際には膜量を少なくして粘弾性の効果が無視できる範囲内で行う必要がある。

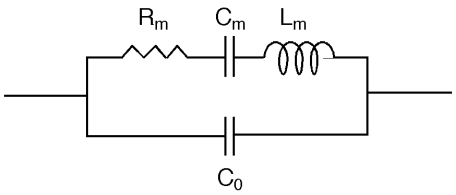


図 1-17：水晶発振子の電気的等価回路モデル

本研究で使用した基本振動数 27 MHz の AT カット型水晶発振子は、厚さ 60 μm の非常に薄い水晶板の両面に下地としてチタンを蒸着し、その上にさらに金を蒸着した構造となっている。これにより、金電極表面を強力な酸化剤により洗浄し、繰り返し使用することが可能である。水溶液中で水晶発振子を用いる場合、両面の電極間やむき出しになっている通電部分での漏電を防ぐために、本研究で用いた水晶発振子はセルと水晶基板とを一体化し、水晶基板をセルの底面として利用することにより基板の反対側が水溶液に触れないよう工夫してある。

（4）27 MHz 水晶発振子 AFFINIX Q4 測定装置

本研究で用いた 27 MHz AT カット型水晶発振子は、空気中では一般的な回路で充分安定に発振するが、本研究のように発振子の電極を修飾し粘性の高い水中で安定に発振させるためには、さらに回路を工夫する必要がある。回路の負性抵抗は、水晶発振子の等価抵抗よりも充分に大きくなければならない。この負性抵抗は発振の余裕度を反映しており、この値が大きいほど発振子に高い負荷がかかっても発振させられる。従ってこの条件を満足するような回路が開発され、コンデンサー容量

などの微調整を施すことにより気相、水相どちらでも安定に発振可能となった。この回路を用いて 4 つの発振子を同時に間欠式に発振させる装置が、㈱イニシアムと㈱ULVAC により開発された。そして 2002 年に「４チャンネル水晶発振子バイオセンサーAFFINIX Q４」として、㈱イニシアムより販売されるようになった。その外観を図 1-18 に示した。発振回路にセル一体化水晶発振子を 4 つ接続し、間欠式に直流電圧(約 3 V)を印加することにより 4 つの水晶発振子を同時に発振させた。それぞれの水晶発振子の共振振動数の測定データは、1 秒毎に 1 点ずつ専用ソフト「Origin 6.1」によりそれぞれリアルタイムに表示され、各種測定解析やグラフ作成が可能となっている。セル (500 μL) は、装置付属の恒温槽の上に設置した発振回路に差し込むことで任意の温度（測定可能温度：10~40℃、温度精度：±0.1℃）に設定できる。また測定セル内は上下運動する羽付撹拌棒によって撹拌（撹拌速度 1 秒間に 10 往復程度）されるため系内は常に均一に保つことができ、撹拌棒内部の吸引口によってセル内の溶液を除去することも可能である。

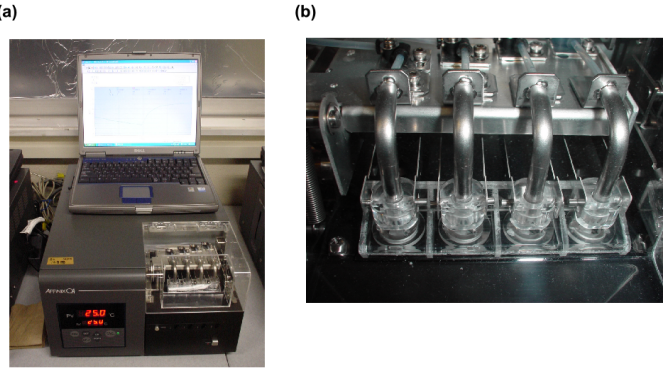


図 1-18：4 穴式 QCM; AFFINIX Q4 の装置外観

左) 装置全体外観, 右) 撹拌部　4 つのコネクターにセル一体型の QCM センサーチップを差し、羽つき吸引管の上下運動により撹拌する。発振回路はコンピュータのプログラムにより各センサーセルを順に発振させる。周波数カウンターはそれらを順次読みとり、コンピュータにデータを記憶する。

（5）アドミッタンス解析法 [63]

ネットワークアナライザやインピーダンスアナライザは、**図 1-19** のように周波数、または電力掃引した出力信号の振幅や位相、またはその両方にテストサンプルが与える影響を調べることができる装置で、電子デバイスなどの評価に用いられている。これらの装置を水晶振動子に用いると、振動子の共振点近傍における周波数掃引により伝送のアドミッタンス(*Y*)と位相差の周波数依存性を示す共振曲線を得ることができ、縦軸をコンダクタンス(*G*)としたときの共振曲線のピークトップの周波数から水晶振動子の共振振動数 f_s と、共振曲線の半値幅を共振振動数で除することで振動子のエネルギー散逸値 *D* 値(もしくは *Q* 値)を測定することができる。

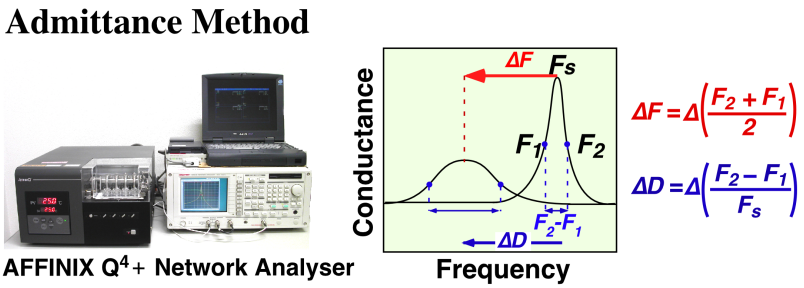


図 1-19：ネットワークアナライザを用いた水晶発振子の周波数 *F* およびエネルギー散逸値 *D* の測定装置

D 値は基板上の物質の粘弾性特性を反映するため、これまで SiO_2 基板上でのリポソームの崩壊する様子を観察したり[64]、基板上での脂質二分子膜形成過程の観察[3]に応用されている。

1-3-2　QCM 法を用いた分子間相互作用の解析

(1) QCM 基板上への膜タンパク質の固定化

当研究室ではこれまで水晶発振子が平面センサーであることを利用して、膜タンパク質を界面活性剤中ではなく、**図 1-20** のように脂質膜に埋め込んだ状態で基板

に固定化するための 2 つの手法を確立した [65, 66]。具体的には、一つは、図 1-20(A)のようにビオチン化脂質をアンカー分子としてアビジン基板に固定化しておき、そのアンカー分子を利用して基板上に脂質膜を再構成させる手法である。この方法は膜タンパク質の流動性を保った状態で脂質膜中に導入することが可能であるが、膜タンパク質の配向や導入量の制御ができないという欠点がある。当研究室の森田は、図 1-21 のように Biotin 化脂質をアンカー分子として固定化し、そのアンカー分子を利用して QCM 基板上に、タンパク質の膜透過過程において機能する膜タンパク質である SecYE を平面脂質二分子膜上に再構成させ、70S リボソームとの相互作用観察を行った [66]。

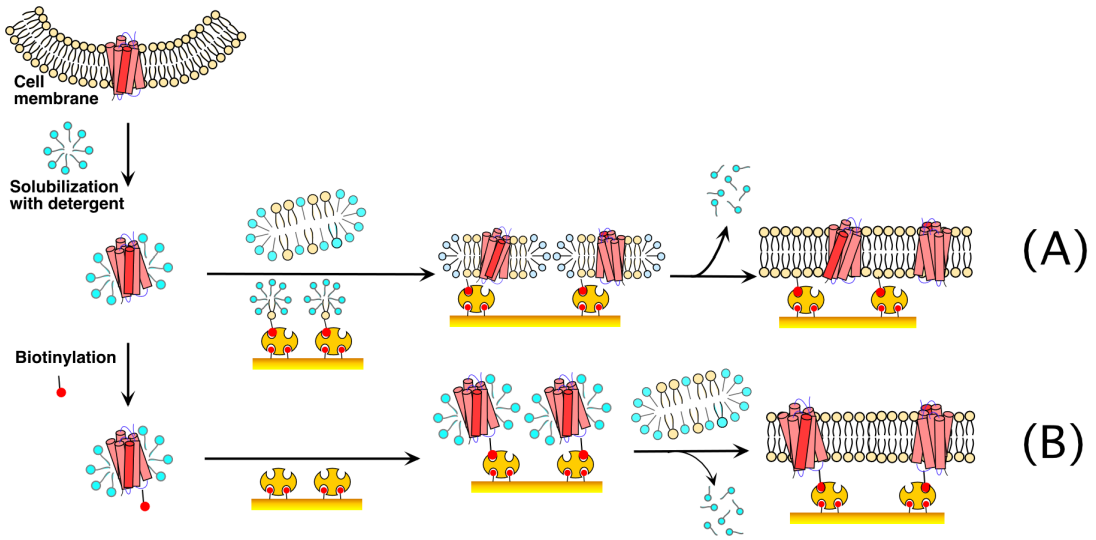


図 1-20：膜タンパク質と脂質二分子膜の固定化方法

(A)biotin 化した膜タンパク質を固定化した後、脂質二分子膜を再構成する

(B)biotin 化脂質をアンカーとして固定化し、その上に膜タンパク質と脂質二分子膜を再構成する

もう一つの手法は、図 1-20(B)のように膜タンパク質をビオチン化してアビジン基板に固定化し、その後界面活性剤を脂質分子と置換することで平面膜を形成させる手法である。この方法は脂質膜内の膜タンパク質の流動性がないという欠点があるが、膜タンパク質の配向や密度を制御することが可能である。当研究室の石津は

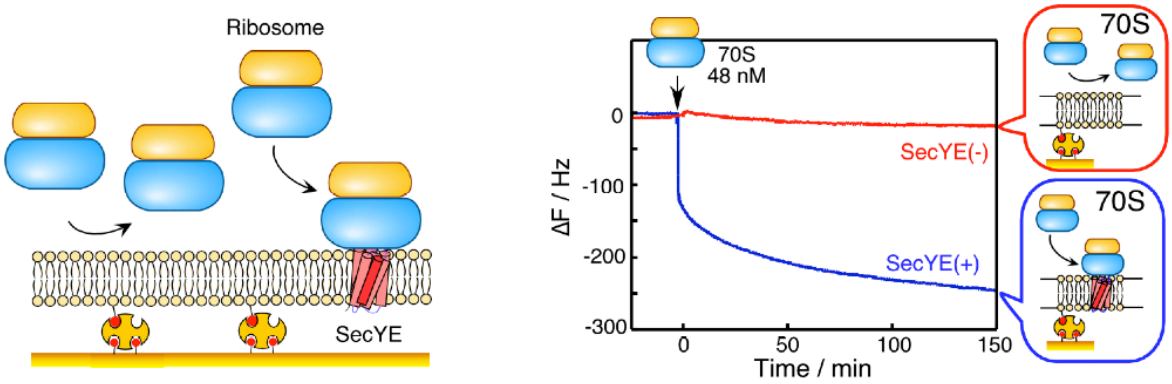


図 1-21：QCM 上での SecYE 導入平面脂質二分子膜とリボソームの結合観察

図 1-22 に示したようにカリウムイオンチャネルである膜タンパク質 KcsA をビオチン化して、アビジン基板に固定化した後、界面活性剤を脂質分子と置換することで、KcsA とサソリ毒 Agitoxin 2 の相互作用解析を QCM 上で行った[67]。

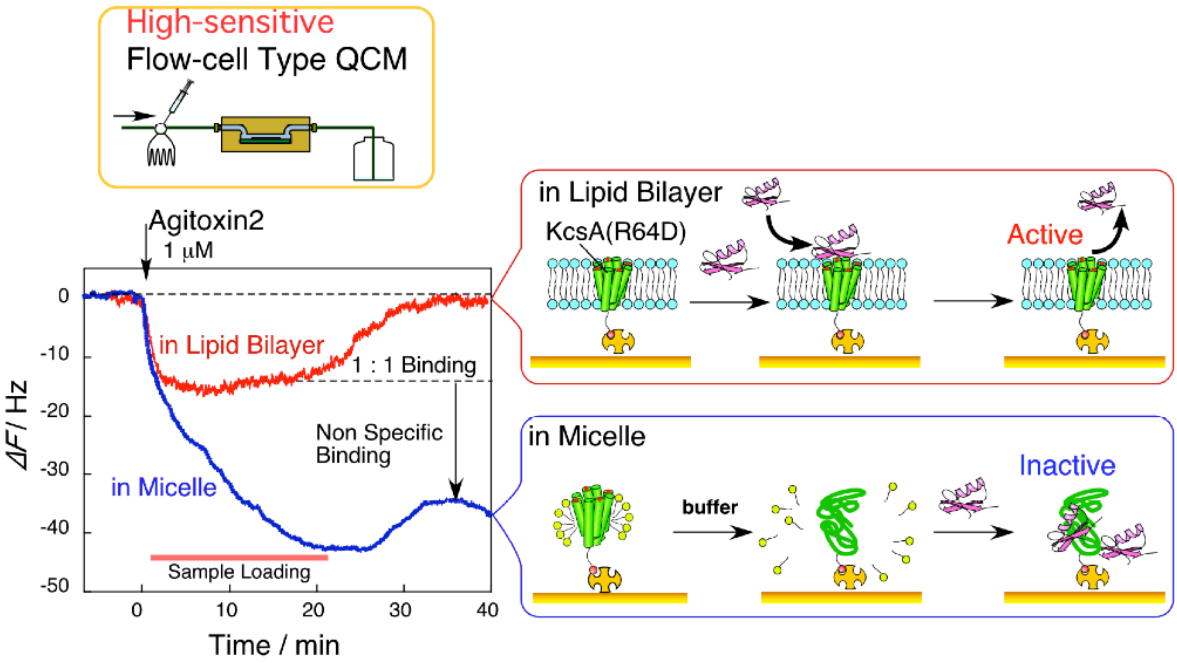


図 1-22：QCM 上での KcsA 導入平面脂質二分子膜と Agitoxin2 の結合観察

このような QCM 基板上で膜タンパク質の反応を解析する実験系は DsbA と DsbB の系にも適用できると考えられる。

(2) QCM を用いた酵素反応中間体の追跡

当研究室ではこれまでQCM基板上で酵素反応の中間体を質量変化として観察してきた。当研究室の高野は以前、**図 1-23** に示すように QCM 基板上でグルコアミラーゼ基質のスブチリシンによる加水分解反応を観察した[68]。その結果、グルコアミラーゼ基質とスブチリシンとのあいだの ES 複合体形成に伴う振動数減少と加水分解反応に伴う振動数上昇が観察された。

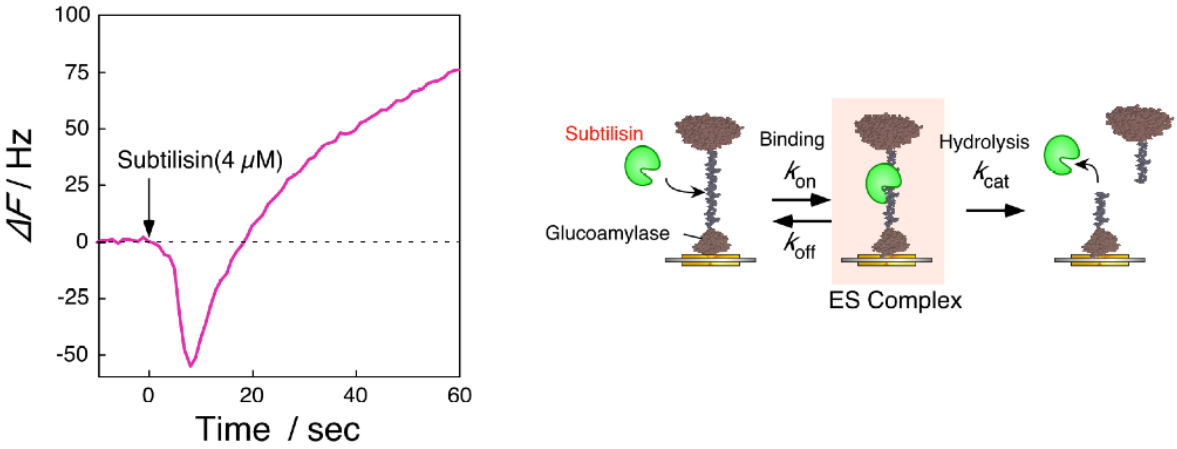


図 1-23 : QCM を用いたスブチリシンによるグルコアミラーゼの加水分解反応観察

20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$ at 25 °C.

このようなQCM基板上で酵素反応の中間体を追跡する手法はこれまで検出が困難であった DsbA と DsbB の反応中間体の解析にも有用であると思われる。

1-4　本研究の目的

これまでに述べたように DsbA-DsbB-ユビキノンの反応および構造について多くの知見が存在するものの、2 つの点が明らかになっていない。一つは DsbA と DsbB の反応機構について、DsbA と DsbB に含まれるそれぞれ 2 個、4 個のシステイン間でどのように電子伝達が進行するのかという点。もう一つは、Dsb システムがチオールージスルフィド交換反応であり、通常はアルカリ性のみで活性が高いにもかかわらず広範囲の pH において機能が維持される点であり、これは Dsb システムが存在するペリプラズム空間の pH が外界の環境に応じて酸性側にもアルカリ側にも変化することを考慮すると生理学的にも興味深い。また、これまでの研究ではほとんどの研究が膜タンパク質である DsbB を界面活性剤で可溶化して使用しており、膜タンパク質の活性が保たれているのか疑問である。さらに DsbA と DsbB の反応中間体の生成過程が経時的には十分に解明されていない。これまでに述べたように QCM 法は金電極上に膜タンパク質を固定化するのに適していること、さらに振動数変化から反応中間体の生成・分解を経時的に追跡できるので、DsbB を QCM 基板上に固定化すれば DsbA の結合に伴う DsbA-DsbB 中間体の検出と、その生成・分解速度を正確に求めることができると考えられる。

本研究では、**図 1-24** に示したように質量センサーである水晶発振子(QCM)の基板上に、膜タンパク質 DsbB を脂質二分子膜中に配向固定化し、界面活性剤の存在しない、より *in vivo* に近い実験系で DsbA-DsbB-ユビキノンの反応を観察し、さらに、反応系の pH を種々に変化させ、動力学の観点から、DsbA-DsbB-ユビキノンの反応機構を明らかにすることを目的とする。

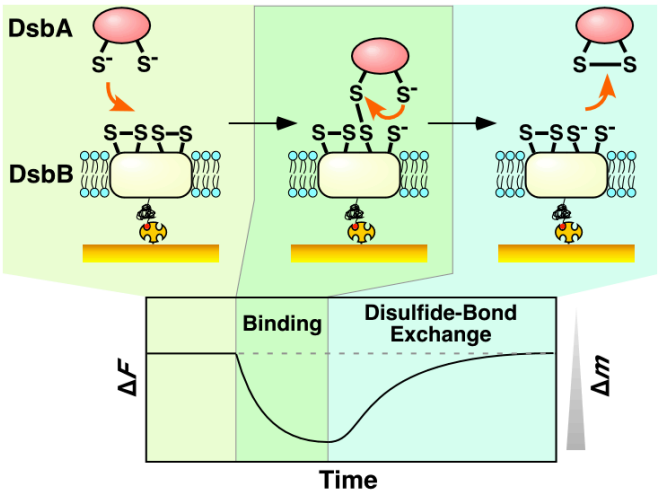


図 1-24：本研究の目的

本論文は、本章の序論に続いて以下の 5 章から構成されている。

第 2 章「水晶発振子に固定化した膜タンパク質 DsbB 上での DsbA との反応観察系の構築」では、QCM の金基板上に膜タンパク質 DsbB を脂質二分子膜に埋め込んで配向固定化する方法を確立し、DsbA との反応観察を行ったことを示した。その後、得られた反応チャートから、動力学解析により結合、解離、酸化の各過程の速度パラメータを得た。

第 3 章「DsbB による DsbA 酸化反応機構の解明」では、DsbA と DsbB の反応に伴い両者間で形成される中間体を QCM で質量変化として検出できる特性を利用し、野生型 DsbB が DsbA と中間体を形成する場合と、変異体 DsbB(C41A,C44A)が DsbA と中間体を形成できない場合の両者の反応動力学について比較した。得られた動力学パラメータから DsbB による DsbA 酸化反応では、DsbA と DsbB 間で形成される複合体が、DsbA 酸化における駆動力となっていることが分かった。

第 4 章「DsbB による DsbA 酸化反応の pH 耐性機構の解明」では、QCM を用いて DsbA と DsbB の反応時の pH 条件を種々に変化させて、動力学パラメータの pH-

速度曲線を求めた。さらに、SDS-PAGE を利用して酸化 DsbA の定量を各 pH 条件下で行った。それらの結果より、DsbA と DsbB とで形成される安定複合体が広い pH 範囲で効率良く DsbA 酸化を可能にしている機構を示した。

第 5 章「DsbA による基質タンパク質の酸化反応観察の試み」では、基質モデルとして S-S 結合を 1 つ有する TEM1 β-lactamase を用いて、QCM 上にアビジンを介して固定化した biotin-BCCP-DsbA との反応観察を行った。SDS-PAGE で DsbA によるβ-lactamase への S-S 導入反応を確認した後、QCM での観察を試みた。

第六章「結論」では、各章のまとめと考察、さらに今後の展望について示した。

第 1 章　参考文献

1) H. Kadokura, F. Katzen, and J. Beckwith, *Annu. Rev. Biochem.*, **72**,111-135 (2003).

2) J. Bardwell, K. McGovern, and J. Beckwith, *Cell,* **67**, 581–589 (1991).

3) S. Kamitani, Y. Akiyama, and K. Ito, *EMBO J.*, **11**, 57-62 (1992).

4) H. Kadokura and J. Beckwith, *Antioxid. Redox Signal.,* **13**, 1231-46 (2010).

5) L. Guddat, J. Bardwell, T. Zander, and J. Martin, *Protein Sci.*, **6**, 1148– 1156 (1997).

6) S. Kishigami, Y. Akiyama, and K. Ito*, FEBS Lett.*, **364**, 55-58 (1995).

7) Y. Akiyama and K. Ito, *J. Biol. Chem.*, **268**, 8146-8150 (1993).

8) J. Nelson and T. Creighton, *Biochemistry*, **33**, 5974-5983 (1994).

9) E. Aslund, K. Berndt, and A. Holmgren, *J. Biol. Chem.*, **272**, 30780-30786 (1997).

10) M. Wunderlich, R. Jaenicke, and R. Glockshuber, *J. Mol. Biol.*, **233**, 559-566 (1993).

11) M. Wunderlich and R. Glockshuber, *Fold. Des.,* **3**, 161–171 (1998).

12) K. Ito and K. Inaba, *Curr. Opin. Struc. Biol.,* **18**, 450–458 (2008).

13) Y. Akiyama, S. Kamitani, N. Kusukawa, and K. Ito, *J. Biol. Chem.*, **267**, 22440–22445 (1992).

14) M. Wunderlich, A. Otto, R. Seckler, and R. Glockshuber, *Biochemistry,* **32**, 12251–12256 (1993).

15) A. Zapun and T. Creighton, *Biochemistry*, **33**, 5202-5211 (1994).

16) A. Zapun, J. Bardwell, and T. Creighton, *Biochemistry,* **32**, 5083– 5092 (1993).

17) U. Grauschopf, J. Winther, P. Korber, T. Zander, P. Dallinger, and J. Bardwell, *Cell,* **83**, 947–955 (1995).

18) L. Guddat, J. Bardwell, and J. Martin, *Structure,* **6**, 757–767 (1998).

19) J. Horne, E. Auvergne, M. Coles, T. Velkov, Y. Chin, W. Charman, R. Prankerd, P. Gooley, and M. Scanlon, *J. Mol. Biol.*, **371**, 703–716 (2007).

20) C. Frech, M. Wunderlich, R. Glockshuber, and F. Schmid, *EMBO J.,* **15**, 392–398 (1996).

21) S. Quan, I. Schneider, J. Pan, A. Hacht, and J. Bardwell**,** *J. Biol. Chem.,* **282**, 28823–28833 (2007).

22) J. Martin, J. Bardwel, and J. Kuriyan, *Nature,* **365**, 464-468 (1993).

23) J. Martin, *Structure,* **3**, 245–250 (1995).

24) J. Charbonnier, P. Belin, M. Moutiez, E. Stura, and E. Quemeneur, *Protein Sci.,* **8**, 96–105 (1999).

25) H. Kadokura, H. Tian, T. Zander, J. Bardwell, and J. Beckwith, *Science,* **303**, 534–537 (2004).

26) H. Kadokura, L. Nichols, and J. Beckwith, *J. Bacteriol.,* **187**, 1519‐1522 (2005).

27) J. Paxman, N. Borg, J. Horne, P. Thompson, Y. Chin, P. Sharma, J. Simpson, J. Wielens, S. Piek, C. Kahler, H. Sakellaris, M. Pearce, S. Bottomley, J. Rossjohn, and M. Scanlon, *J. Biol. Chem.,* **284**, 17835–17845 (2009).

28) C. Lafaye, T. Iwema, P. Carpentier, C. Jullian-Binard, J. Kroll, J. Collet, and L. Serre, *J. Mol. Biol.,* **392**, 952–966 (2009).

29) G. Ren, D. Stephan, Z. Xu, Y. Zheng, D. Tang, R. Harrison, M. Kurz, R. Jarrott, S. Shouldice, A. Hiniker, J. Martin, B. Heras, and J. Bardwell, *J. Biol. Chem.,* **284,** 10150–10159 (2009).

30) G. Jander, N. Martin, and J. Beckwith, *EMBO J.*, **13**, 5121– 5127 (1994).

31) K. Inaba and K. Ito, *Biochim. Biophys. Acta.*, **4**, 520-529 (2008).

32) T. Kobayashi, S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi, and K. Ito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11857–11862 (1997).

33) M. Bader, W. Muse, D. Ballou, C. Gassner, and J. Bardwell, *Cell*, **98**, 217-227 (1999).

34) C. Guilhot, G. Jander, N. Martin, and Beckwith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9895-9899 (1995).

35) S. Kishigami, E. Kanaya, M. Kikuchi, and K. Ito, *J. Biol.Chem.*, **270**, 17072-17074 (1995).

36) T. Kobayashi and K. Ito, *EMBO J.*, **18**, 1192-1198 (1999).

37) J. Regeimbal and J. Bardwell, *J. Biol. Chem.*, **277**, 32706–32713 (2002).

38) H. Kadokura, M. Bader, H. Tian, J.C. Bardwell, and J. Beckwith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10884–10889 (2000).

39) T. Kobayashi, Y. Takahashi, and K. Ito, *Mol. Microbiol.*, **39**, 158-165 (2001).

40) K. Inaba and K. Ito, *EMBO J.* **21**, 2646–2654 (2002).

41) K. Inaba, Y. Takahashi, and K. Ito, *J. Biol. Chem.*, **280**, 33035–33044 (2005).

42) K. Inaba, S. Murakami, A. Nakagawa, H. Iida, M. Kinjo, K. Ito, and M. Suzuki, *EMBO J*, **28**, 779–791 (2009).

43) H. Kadokura and J. Beckwith, *EMBO J.*, **21**, 2354–2363 (2002).

44) K. Inaba, Y. Takahashi, N. Fujieda, K. Kano, H. Miyoshi, and K. Ito, *J. Biol. Chem.*, **279**, 6761–6768 (2004).

45) Y. Takahashi, K. Inaba, and K. Ito, *J. Biol. Chem.*, **279**, 47057–47065 (2004).

46）稲葉謙次, PROTEIN COMMUNITY, **1**, 5–10 (2006).

47) K. Inaba, Y. Takahashi, K. Ito, and S. Hayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **280**, 287–292 (2006).

48) T. Tapley, T. Eichner, S. Gleiter, D. Ballou, and J. Bardwell. *J. Biol. Chem.,* **282**, 10263–10271 (2007).

49）稲葉謙次, 日本生物物理学会会報誌, **46**, 257-262 (2006).

50) J. Martin, J. Bardwell, and J. Kuriyan, *Nature*, **365**, 464–468 (1993).

51) K. Inaba, S. Murakami, M. Suzuki, A. Nakagawa, E. Yamashita, K. Okada, and K. Ito, *Cell*, **127**, 789–801 (2006).

52）稲葉謙次, 伊藤維昭, 蛋白質核酸酵素, **52**, 853-861 (2007).

53) G. Malojc˘ic´, R. Owen, J. Grimshaw, R. Glockshuber, *FEBS Lett*. **582**, 3301–3307 (2008).

54) 滝貞男,「人工水晶とその電気的応用」, 日刊工業新聞社 (1974).

55) 嶋津克明, 現代科学, 14-19 (1998).

56) D. A. Buttry and M. D. Ward, *Chem. Rev*., **92**, 1355-1379 (1992).

57) W. H. King Jr., *Anal. Chem*. **36**, 1735-1739 (1964).

58) G. Sauerbrey and *Z. Physik*., **155**, 206-222 (1959).

59) Y. Ebara, K. Itakura, and Y. Okahata, *Langmuir*, **12**, 5165-5170 (1996).

60) K. Kanazawa and J. Gordon, *Anal. Chim. Acta*, **175**, 99-105 (1985).

61) K. Kanazawa and J. Gordon, *Anal. Chem*., **57**, 1770-1771 (1985).

62) H. Muramatsu and K. Kimura, *Anal. Chem*., **64**, 2502-2507 (1992).

63) 古澤宏幸, 輪講, (2009).

64) 工藤恭彦, 修士論文, 東京工業大学 (2009).

65) 三友秀之, 博士論文, 東京工業大学 (2006).

66) 森田貴之, 修士論文, 東京工業大学 (2007).

67) 石津縁, 修士論文, 東京工業大学 (2005).

68) H. Furusawa, H. Takano, and Y. Okahata, *Org. Biomol. Chem*., **6**, 727-731 (2008).

第２章　水晶発振子上への膜タンパク質 DsbB の固定化と DsbA との反応観察系の構築

2-1　緒言

膜タンパク質は、エネルギー変換、物質輸送、情報伝達といった生命にとって重要な機能を担い、膜タンパク質の機能解析はその機能を制御する医薬品の合理的な設計などに有効である。こうした膜タンパク質の活性を観察し機能を評価するには脂質二分子膜中に存在する状態で行うのが理想であるが、これまでの膜タンパク質の活性測定は界面活性剤を用いたミセル内やベシクルを用いた分散系で行われており定量的かつ経時的な測定が困難である場合が多かった。以前より当研究室では水晶発振子マイクロバランス(QCM)を、その基板上に物質が吸着すると質量に応じて振動数が変化することを利用して分子間相互作用を質量変化として検出するバイオセンサーとして利用してきた。本章では、QCM の金電極上に大腸菌細胞内のジスルフィド結合導入に関与する DsbB(DiSulfide Bond formation protein B)膜タンパク質を脂質二分子膜内に固定化する方法について述べる。

DsbA と DsbB の反応は、DsbA の Cys30 が脂質二分子膜内の DsbB の Cys104 を求核攻撃することが引き金となり、DsbA の Cys33 が Cys30(DsbA)－Cys104(DsbB)の S-S 結合を開裂することで DsbA の酸化が達成されることが知られている[1] (**図 2-1**)。QCM 上で DsbA と DsbB の反応における中間体を基板上での質量変化として検出することで、膜タンパク質 DsbB の活性を評価した。

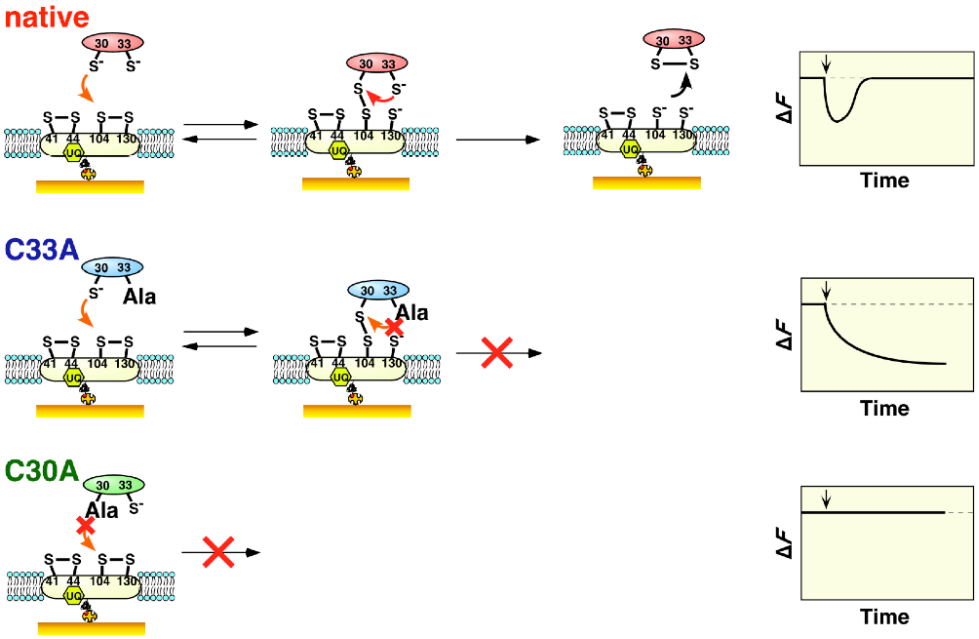


図 2-1：QCM 上での DsbB との反応における DsbA 変異体の予想される効果

ここでは DsbA の 2 つのシステインの変異体、DsbA(C30A)および DsbA(C33A)を作製した。DsbB を固定化した QCM 基板に DsbA(C30A)を添加した場合、**図 2-1** のように反応初期過程における Cys30(DsbA)が Cys104(DsbB)を求核攻撃するステップが起こらなくなるので、DsbA は DsbB と相互作用せず QCM で振動数変化は検出されないと予想される。また、DsbA(C33A)を添加した場合、DsbA の酸化反応が起こらなくなるので DsbA は DsbB と複合体を形成し続けることで振動数減少のみが観察されると予想される。さらに、DsbA 変異体については Cys33Ala, Cys30Ala 以外にも、Pro151 の変異体を用いて、大腸菌細胞内において DsbA と DsbB の複合体の形成が促進されたことが報告されているので [2]、本研究でも P151N, P151H, P151S の 3 種類を作製した。

本章では、水晶発振子基板上において、DsbB を脂質二分子膜に埋め込んだ状態で配向固定化し、DsbA との反応を質量変化の観点からリアルタイムに観察し、反応の動力学解析が可能な実験系を構築したことを述べる。

2-2　実験方法

2-2-1　試薬

Bacto-Tryptone、Bacto-Yeast Extract、Bacto-Agar、スキムミルクは DIFCO 社より購入した。Isopropil-β-D-thio-galactopyranoside（IPTG）、アンピシリンナトリウム、クロラムフェニコール、DAB (3,3'-diaminobenzidine)、アクリルアミド、ビスアクリルアミド、炭酸水素ナトリウム、Tris（tris(hydroxymethyl)aminomethane）、リシルエンドペプチダーゼ(質量分析グレード)、トリクロロ酢酸、アセトニトリル、アセトン、3-sn-ホスファチジルコリン(卵黄由来)、N-ヒドロキシスクシンイミドは和光純薬から購入した。DNA 分子量マーカー（Perfect DNA™ Markers, 0.5-12kbp）、pET-22b プラスミドは Novagen 社より購入した。エチジウムブロマイド水溶液は IBI 社より購入した。SimplyBlue™ SafeStain は Invitrogen 社より購入した。タンパク質分子量マーカー（Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Unstained, Kaleidoscope）、ウエスタンブロット用濾紙（Extra Thick Blot Paper PROTEIN XL Size）、タンパク質定量試薬（Bio-Rad Protein Assay）は BIO-RAD より購入した。塩化ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム二水和物、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、phenylmetylsulfonyl fluoride （PMSF ; プロテアーゼ阻害剤）、D-ビオチン、ペルオキソ二硫酸アンモニウム、Tetramethylethylenediamine（TEMED）、グリシン、イミダゾール、クエン酸一水和物、クエン酸三ナトリウム二水和物、ラウリル硫酸ナトリウム、2-プロパノール、Bromo Phenol Blue、PIPES（Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)、dimethyl sulfoxide（DMSO）、ホウ酸、塩化カリウム、硫酸ニッケル(II)六水和物、エタノール、グリセロール、メタノール、1-ブタノール、酢酸、2M NaOH、クロロホルム、3, 3'-ジチオジプロピオン酸、2-

アミノエタノール、硫酸は、ナカライテスクより購入した。オリゴヌクレオチドプライマーは、逆相カラムで精製したものを OPERON 社から購入した。Ni-NTA カラム (His Trap HP 5 mL) 、陰イオン交換カラム (DEAE Fast Flow 5 mL)、疎水性カラム (Hi Trap Phenyl HP 1 mL)、ウエスタンブロット転写用メンブレン（Hybond-P (Membrane optimized for protein transfer)）は GE ヘルスケア社より購入した。Biotin-$(AC_5)_2$ Sulfo-OSu、n-ドデシル-β-D-マルトシド（DDM）、MOPS、EDTA/2Na、HEPES、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド・塩酸塩 (EDC) は DOJINDO から購入した。制限酵素 (NdeI, EcoRI)、10×Ex Taq buffer, Ex Taq DNA polymerase, dNTP, 10×loading buffer, Agarose L03 はタカラバイオ株式会社より購入した。QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit は QIAGEN 社から購入した。Ligation Convenience Kit, OneSTEP Ladder 100 (0.1-2 kbp)はニッポン・ジーン社から購入した。CEQ DTCS Quick Start Kit は Beckman Coulter 社から購入した。JM109 (DE3)、PinPoint™ Xa-1 Vector は Promega から購入した。QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit は Stratagene 社から購入した。HRP-Avidin は Zymed 社より購入した。SeaKem GTG agarose は、Cambrex Bio Science Rockland 株式会社より購入した。pH 標準緩衝液 (4.01, 6.86, 9.18)は関東化学から購入した。Tween 20、CHCA は SIGMA から購入した。シナピン酸は東京化成から購入した。In-FusionTM Advantage PCR Cloning Kit は Clontech 株式会社より購入した。RapiGest SF Surfactant は、Waters から購入した。NeutrAvidin Biotin Binding Protein、Zeba Micro Desalt Spin Columns(Exclusion limit : 7000)、Zeba Desalt Spin Columns(0.5 mL, Exclusion limit : 7000)は Thermo Scientific 株式会社から購入した。

いずれの試薬も精製を行わずに使用した。

2-2-2　機器

オートクレーブ：オートクレーブ BS325（トミー精工）

ボルテックス：VORTEX GENIE II (エムエス機器株式会社)

エレクトロポレーション：ジーンパルサー(Bio-Rad)

pH メーター：AR-10 accumet pH meter (Fisher Scientific)

フィルター濾過器：NALGENE Reusable Bottle Top Filter Unit(Nalge Company)

アガロースゲル電気泳動装置：i-Mupid（アドバンス株式会社)、Mupid®-2plus（アドバンス株式会社）

超音波破菌装置：超音波細胞破砕機 INSONATOR 201M (KUBOTA)

遠心機：微量高速冷却遠心機　MX-301(日立工機株式会社製)

超遠心機：分離用超遠心機 himac CP80WX(日立工機株式会社製)

大量培養した大腸菌の集菌用遠心機：日立高速冷却遠心機 himac CR 22F(日立工機株式会社製)

DNA シーケンサー：CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter)

吸光度測定装置：GeneQuant 1300(GE ヘルスケア)

大腸菌濁度測定用吸光度測定装置：GeneQuant RNA/DNA Calculator(GE ヘルスケア社)

タンパク質精製用液体クロマトグラフィー：ÄKTA purifier、Frac 950(GE ヘルスケア)

サーマルサイクラー：PC707(ASTEC)

ウエスタンブロッティング用転写装置：Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell(Bio-Rad)

SDS-PAGE 装置：リアルスラブ電気泳動装置

SDS-PAGE 用電源：リアルパワー(Bio-Craft)

クリーンベンチ：クリーンベンチ MCV-711ATS(SANYO)

スピンダウン用遠心機：チビタン小型微量遠心器(TOMY HF120)(トミー精工)

大腸菌少量培養用振とう装置：BioShaker BR-13FP(TAITEC)

大腸菌大量培養用振とう装置：BIO-SHAKER BR-40LF(TAITEC)

インキュベーター：INCUBATOR IC-300(井内盛栄堂)

SDS-PAGE ゲル脱色用振とう機：DOUBLE SHAKER NR-3 (TAITEC)

SDS-PAGE サンプル 99 °C 加熱装置：DRY BATH INCUBATOR(Fast Gene)

超音波洗浄機：超音波洗浄機(アイワ医科工業株式会社)

アスピレーター：ASPIRATOR AS-01(アズワン)

恒温水槽：THERMO MINDER SD(TAITEC)

超純水 (Milli-Q)作製機：Academic A10(MILLIPORE)

トランスイルミネーター：FAS III(TOYOBO)

質量分析装置：AXIMA-CFR(SHIMADZU)

ネットワークアナライザー：Network Analyzer(Advantest)

分子間相互作用定量水晶発振子マイクロバランス装置：AFFINIX Q4(Initium)

エバポレーター：ROTARY VACUUM EVAPORATOR（東京理化器械株式会社）

ダイアフラムポンプ：DIVAC 0.6 L(東京理化器械株式会社)

脱気用超音波照射器：ULTRA SONIC AUTOMATIC WASHER(井内盛栄堂)

2-2-3　培地、試薬溶液、緩衝液の調製

LB 培地 500 mL の調製：1 L ビーカーに bacto tryptone 5 g, bacto yeast extract 2.5 g, NaCl 5 g を入れた後、水道水 500 mL を入れて、スターラーで撹拌し、完全に溶解

させた。その後、2 M NaOH を 0.25 mL 入れた後、500 mL 耐熱ビンに移し替え、蓋を少し開けた状態で 121 °C, 20 分, 2 気圧でオートクレーブ滅菌後、完全に蓋を閉めた。

アンピシリン水溶液：生化学用アンピシリンナトリウムを濃度 100 mg/mL になるように滅菌水に溶解し、0.22 μm フィルターmillex-GV（MILLIPORE）で濾過滅菌して調製し–20 °C で保存した。

アンピシリン含有 LB プレート 8 枚の調製：500 mL 三角フラスコに bacto tryptone 2 g, bacto yeast extract 1 g, NaCl 2 g, 寒天 3 g を入れた後、水道水を 200 mL 添加し、軽く振り混ぜた後、アルミホイルで蓋をした後、オートクレーブ滅菌した。手で触れることができる温度まで冷ました後、クリーンベンチ内で 100 mg/mL アンピシリン水溶液を 200 μL 添加した。プラスチックシャーレに約 25 mL ずつ分注した。泡が生じたときは炎であぶることで除去した。プレートはアルミホイルで遮光しながら、約 24 時間放置した。

Pre-SOB 培地 500 mL：500 mL 耐熱ビンに Bacto Tryptone 10 g, Bacto yeast extract 2.5 g, NaCl 0.292 g, KCl 0.0932 g を入れて Milli-Q 水 495 mL を加えて振り混ぜた。蓋を完全に閉めない状態で、オートクレーブ滅菌後、蓋を閉めた。

SOC 培地 100 mL：クリーンベンチ内で、pre-SOB 培地 50 mL, 1 M グルコース溶液 1 mL, 2 M Mg^{2+}溶液 1 mL を加えて混ぜた後、1 mL ずつプラスチックチューブに分注し、-20 °C 保存した。

1 M IPTG 溶液：生化学用 IPTG 500 mg を滅菌水 2 mL に溶解し、0.22 μm フィルターで濾過滅菌して-20 °C で保存した。

50×TAE（Tris-acetate, EDTA）緩衝液：500 mL ビーカーに Tris 121.25 g, 酢酸 29.75 mL, EDTA-2Na 18.6 g を入れて、Milli-Q 水 を加えて、スターラーで撹拌しながら

完全に溶解させた。500 mL メスシリンダーに移した後、ビーカーを Milli-Q 水で洗い込みしながら 500 mL までメスアップした。パラフィルムで封をして、転倒混和した。

30%アクリルアミド溶液：acrylamide 58 g と *N, N*'-Methylene bisacrylamide 2 g を混合し milli-Q 水で 200 mL にメスアップし調製し、遮光冷蔵保存した。

1.5 M Tris-HCl（pH 8.8）：Tris 90.75 g を 450 mL の milli-Q 水に溶解し、HCl で pH を 8.8 に調整後、milli-Q 水で 500 mL にメスアップし 4 °C で保存した。

0.5 M Tris-HCl（pH 6.8）：Tris 6.0 g を 90 mL の milli-Q 水に溶解し、HCl で pH を 6.8 に調整後、milli-Q 水で 100 mL にメスアップし 4 °C で保存した。

10% SDS：sodium dodecyl sulfate 10 g を 90 mL の milli-Q 水に溶解し、milli-Q 水で 100 mL にメスアップし調製した。

10% APS：ammonium peroxodisulfate 200 mg を 2 mL の milli-Q 水に溶解し、100 μL ずつ分注して-20 °C で保存した。

2×sample buffer for SDS-PAGE：0.5 M Tris-HCl（pH 6.8）2 mL, 10% SDS 4 mL, glycerol 2 mL, milli-Q 水 0.8 mL, 2% BPB 20 μL, β-mercaptethanol 1.2 mL を混合して調製し-20°C で保存した。グリセロールをピペットマンで採取する際は、チップの先端をはさみで切って使用した。

10×running buffer for SDS-PAGE：Tris 15.15 g（終濃度 250 mM）、Glycine 72.05 g（終濃度 1.92 M）を 500 mL の milli-Q 水に溶解し、SDS 5 g を添加して調製した。

Running gel : 1.5 M Tris-HCl（pH 8.8）2.5 mL、所定の濃度になるように 30% アクリルアミド溶液、Milli-Q 水を加え 10 mL にした。これに 10% SDS を 100 μL、10% APS を 50 μL、TEMED を 10 μL を加えよく混ぜ、ゲルメーカーに流した。

Stacking gel : 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1.05 mL、30% アクリルアミド溶液 625 μL、

Milli-Q 水を 2.56 mL 加えた。これに 10% SDS を 42 μL、10% APS を 25 μL、TEMED を 5 μL を加えよく混ぜ、ゲルメーカーに流した。

10% DDM 溶液 1mL：DDM 0.1 g を 1mL の MilliQ 水に溶解させた。

1 M Tris-HCl, pH 7.5, 500 mL の作製：Tris 60.55 g を Milli-Q 水 400 mL に溶解させ、6 M HCl で pH を 7.5 に合わせた。その後、Milli-Q 水で洗い込みしながら、500 mL メスフラスコの標線までメスアップした。

400 mM ホウ酸/NaOH, pH8.0 の調製：ホウ酸を 6.183 g 量り取り、200 mL の Milli-Q 水に加熱しながら、溶解させた。2 M NaOH で pH 8.0 になるまで滴定した。Milli-Q 水で 250 mL までメスアップ後、0.22 μm フィルターで濾過し、さらに脱気した。

BBS/EDTA バッファー 100 mL の作製：400 mM ホウ酸/NaOH, pH8.0 を 50 mL、5 M NaCl を 3.2 mL、500 mM EDTA, pH 8.0 を 1 mL メスフラスコに入れて、Milli-Q 水で 100 mL までメスアップした。

1%アガロースゲルの作製(4 枚)：500 mL 三角フラスコにアガロース L03 を 1 g 量り取り、0.5×TAE buffer 100 mL を入れて、レンジで突沸しないように注意しながら完全に溶解させた。机上で円を描くように丁寧に振り混ぜた。手で持てるくらいまで冷ました後、ゲル型へ流し込み、コームを取り付けた。1 時間くらい室温で放置した。

1 M MOPS-NaOH, pH 7.0 buffer 100 mL の調製：MOPS 20.93 g を 200 mL ビーカーに量り取り、50 mL の Milli-Q 水に溶解させた。2 M NaOH で pH 7.0 にした。100 mL までメスアップした。0.45 μm フィルター濾過後、脱気した。

DsbA 陰イオンカラム A buffer (10 mM MOPS/NaOH, pH 7.0) 1 L の作製：1 M MOPS-NaOH, pH7.0 を 10 mL、Milli-Q 水 990 mL を混合した。

DsbA 陰イオンカラム B buffer (10 mM MOPS-NaOH, pH 7.0, 500 mM NaCl) 1 L の作製 : 1 M MOPS-NaOH, pH 7.0 を 10 mL、5 M NaCl 100 mL と Milli-Q 水 890 mL を混合した。

3.5 M 硫酸アンモニウム溶液 250 mL の調製:硫酸アンモニウム 115.6 g を Milli-Q 水 200 mL に加熱しながら撹拌し、完全に溶解させた。250 mL までメスアップした。

DsbA 疎水性カラム A buffer (1 M 硫酸アンモニウム, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) 1 L の調製 : 2 M 硫酸アンモニウムを 500 mL、5 M NaCl を 20 mL、1 M Tris-HCl, pH 8.0 を 20 mL を混合し、Milli-Q 水で 1 L までメスアップした。

DsbA 疎水性カラム B buffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) 1 L の調製 : 5 M NaCl を 20 mL、1 M Tris-HCl, pH 8.0 を 20 mL を混合し、Milli-Q 水で 1 L までメスアップした。

200 mM リン酸水素二ナトリウム溶液 500 mL の作製 : リン酸水素二ナトリウム・12 水和物を 35.82 g 量り取り、Milli-Q 水 300 mL に溶解させ、500 mL までメスアップし、0.45 μm フィルター濾過、脱気を行った。

200 mM リン酸二水素ナトリウム溶液 500 mL の作製 : リン酸二水素ナトリウム・二水和物を 15.605 g 量り取り、Milli-Q 水 300 mL に溶解させ、500 mL までメスアップした。0.45 μm フィルター濾過、脱気を行った。

1 M Hepes/NaOH buffer, pH 7.5 の作製 (500 mL) : Milli-Q 水を 300 mL 入れた後、119.2 g の HEPES をビーカーに入れて、すぐに、スターラーで撹拌した(先に HEPES を入れると底で固まる)。5 M NaOH で pH 7.5 にした後、0.45 μm フィルター濾過、脱気を行った)。

1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 の作製 (500 mL) : Tris 60.55 g を 400 mL の Milli-Q 水

に溶解させた。6 M HCl で pH を 8.0 にした後、Milli-Q 水で 500 mL にメスアップした。0.45 μm フィルター濾過、脱気を行った。

0.5 M クエン酸三ナトリウム溶液 (250 mL)の作製：クエン酸三ナトリウム二水和物を 36.75 g 量り取り、Milli-Q 水 200 mL に溶解させた。250 mL にメスアップ後、0.45 μm フィルター濾過、脱気をした。

0.5 M クエン酸溶液 (500 mL)：クエン酸一水和物を 52.66 g 量り取り、Milli-Q 水 400 mL に溶解させた。500 mL にメスアップ後、0.45 μm フィルター濾過、脱気を行った。

0.5 M クエン酸バッファー, pH 4.5 の調製:0.5 M クエン酸三ナトリウム溶液と 0.5 M クエン酸溶液を混合し、pH 4.5 に合わせた。

0.2 M リン酸ナトリウムバッファー, pH 8.0 の調製 : 0.2 M リン酸水素二ナトリウムと 0.2 M リン酸二水素ナトリウムを混合し、pH 8.0 に合わせた。

0.2 M リン酸ナトリウムバッファー, pH 6.0 の調製 : 0.2 M リン酸水素二ナトリウムと 0.2 M リン酸二水素ナトリウムを混合し、pH 6.0 に合わせた。

DsbB His-tag 精製 A buffer(50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl、0.1% DDM)の作製 (250 mL) : 0.2 M リン酸ナトリウム, pH 6.0 を 62.5 mL、5 M NaCl を 15 mL、Milli-Q 水を 170 mL 混合し、0.45 μm フィルター濾過、脱気後、10% DDM を 2.5 mL 添加した。

DsbB His-tag 精製 B buffer(50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl、500 mM イミダゾール、0.1% DDM)の作製 (250 mL)：0.2 M リン酸ナトリウム, pH 6.0 を 62.5 mL、5 M NaCl を 15 mL、3 M イミダゾール 41.7 mL、Milli-Q 水を 128.3 mL 混合し、0.45 μm フィルター濾過、脱気後、10% DDM を 2.5 mL 添加した。

DsbB ゲル濾過 buffer(50 mM リン酸ナトリウム, pH 6.0, 300 mM NaCl, 0.1%

DDM)：200 mM リン酸ナトリウム, pH 6.0 を 250 mL、5 M NaCl を 60 mL、Milli-Q 水を 680 mL 混合後、0.45 μm フィルター濾過、脱気を行った後、10% DDM を 10 mL 添加した。

Transfer buffer : Tris 6 g, Glycine 7.3 g を Milli-Q 水 400 mL に溶解し、MeOH 100 mL を加えた。

TBS : Tris 3 g、NaCl 8 g, KCl 0.2 g を 800 mL の Milli-Q 水に溶解し、HCl で pH を 7.4 に合わせた後、Milli-Q 水を加えて 1 L にメスアップした。

TTBS : 0.05% Tween 20 含有 TBS

5% Skim Milk : Skim Milk 2.5 g に TBS を加えて 50 mL とした。

QCM buffer(50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl)の 100 mL 作製 : 1 M HEPES-NaOH, pH 7.5 を 5 mL、5 M NaCl を 2 mL、Milli-Q 水を 93 mL 混合した。

0.1% DDM 含有 QCM buffer (50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM)の 100 mL 作製 : 1 M HEPES-NaOH, pH 7.5 を 5 mL、5 M NaCl を 2 mL、Milli-Q 水を 92 mL 混合した後、10% DDM を 1 mL 添加した。

脂質懸濁 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl) 10 mL の調製 : 1 M Tris-HCl, pH 7.5 を 500 μL、3 M KCl を 500 μL、Milli-Q 水を 9 mL 混合した。

2-2-4　DsbA (native)遺伝子の大腸菌ゲノムからの PCR 抽出

(1)　プライマーの設計

DsbA の遺伝子は大腸菌 JM109 のゲノム DNA から PCR により抽出し、それを**図 2-2** に示した様に pET22b のマルチクローニングサイトに組み込むためのプライマー設計を行った。

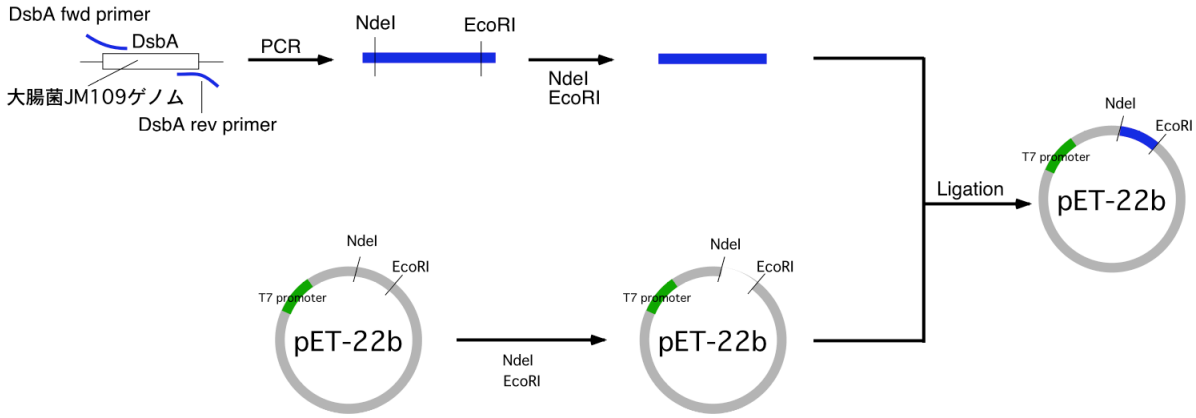


図 2-2：DsbA 遺伝子の大腸菌ゲノムからの抽出と pET22b への組み込み

DsbA 遺伝子を大腸菌 JM109 ゲノムから PCR で増幅させるに際し、以下に示す 2 種類のプライマーを使用した。塩基配列中の下線は制限酵素認識部位である。

① DsbA forward primer

5’…GGAGATATACATATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTG…3’

② DsbA reverse primer

5’…GAGCTCGAATTCTTATTTTTTCTCGGACAGATATTTCAC…3’

(2) ゲノム PCR による DsbA（分泌タンパク質）遺伝子の増幅

［実験操作］

大腸菌 JM109 を一晩培養した Full growth 培養液を PCR チューブに 10 μL 採取し、3000 rpm で 3 分遠心し、上清を除去した。その後、以下の溶液を添加した。

Milli-Q 水	79.5 μL
10×Ex Taq buffer	10 μL
dNTP	8 μL
forward primer for DsbA	1 μL（100 pmol）
reverse primer for DsbA	1 μL（100 pmol）
Ex Taq DNA polymerase	0.5 μL
Total	100 μL

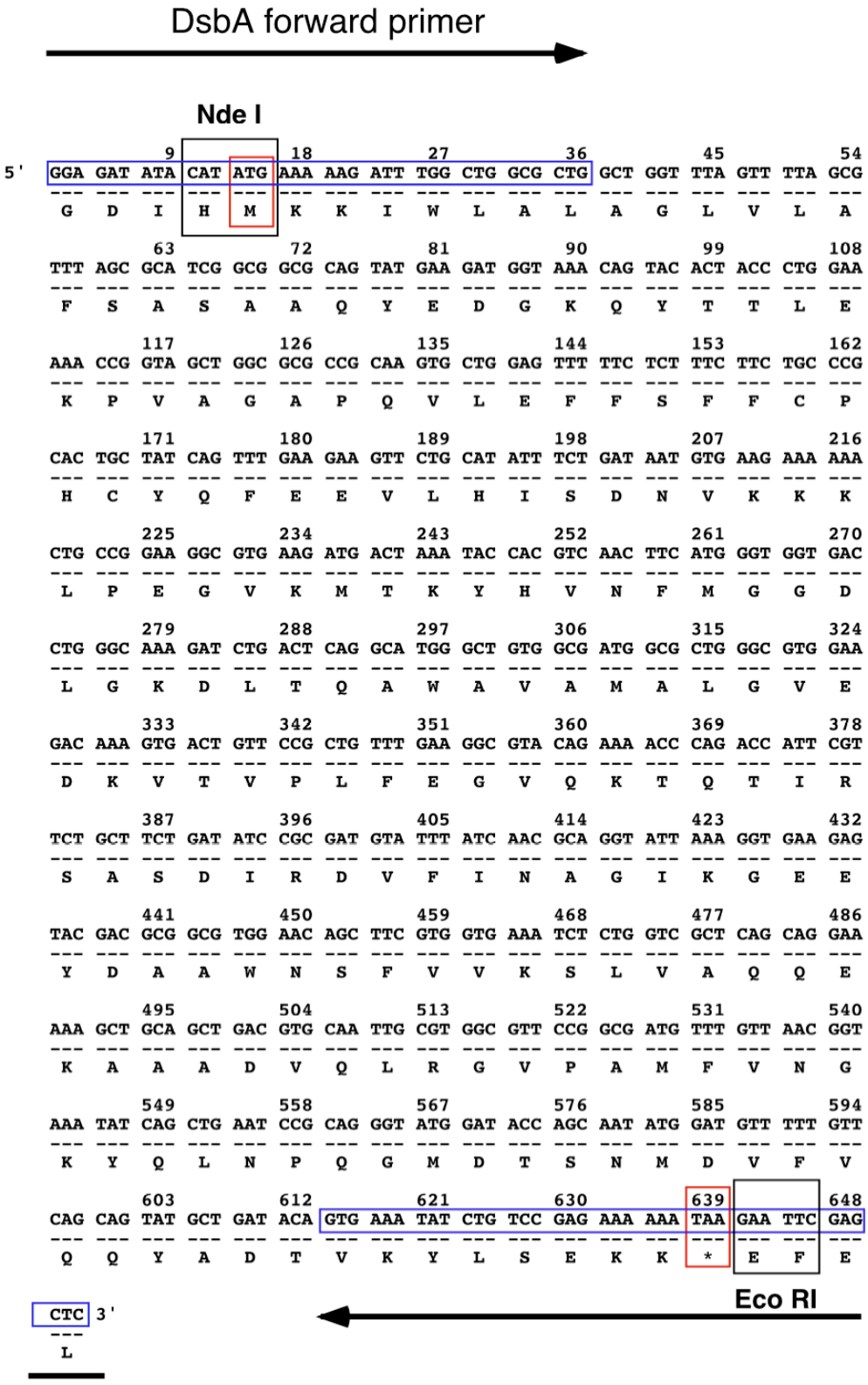


図 2-3 : 大腸菌 JM109 のゲノム PCR で DsbA 遺伝子を増幅するプライマーの設計

DsbA 遺伝子は赤四角で囲んだ開始コドンから終始コドンまでの 627 bp であり、その外側に pET22b と DsbA のライゲーション後生成物の NdeI と EcoRI の認識配列を示した。

94 °C で 5 分加熱後、

94 °C, 1 分 → 55 °C, 1 分 → 72 °C, 1 分を 20 サイクル繰り返した。

PCR 反応後、反応液 9 μL に 10×loading buffer 1 μL を加えて、アガロースゲル電気泳動を行った。

［結果と考察］

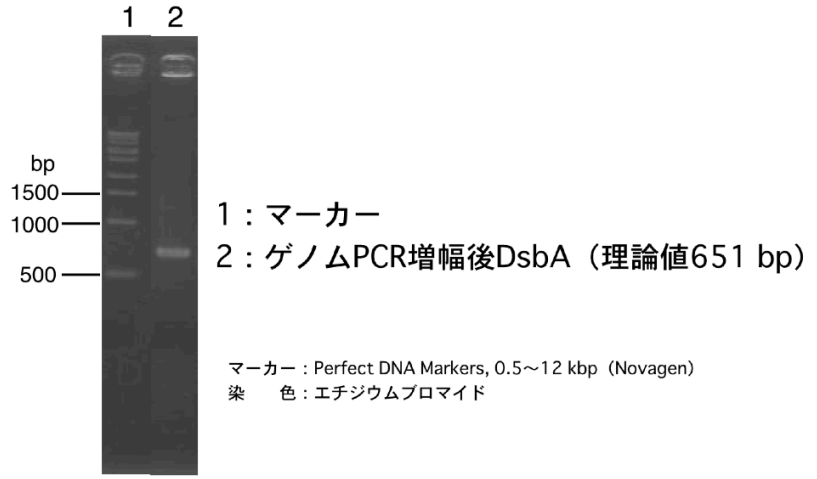


図 2-4：DsbA のゲノム PCR 後の 2%アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動の結果から、DsbA 遺伝子を含む DNA 断片が PCR 増幅されたことが確認された。

(3)　DsbA のゲノム PCR 後の QIAquick PCR Purification Kit による精製

DsbA の PCR 後反応液(91 μL)から PCR 増幅した DNA を精製するために、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社)を用いて付属のプロトコールに従って精製を行った。

［実験操作］

DsbA のゲノム PCR 後の反応液（91 μL）の約 5 倍量の Buffer PB（455 μL）を加えてピペッティングし、QIAquick spin column に移して 13,000 rpm、20 °C で 1 分遠心した。フロースルーを捨て、Buffer PE 750 μL を加え、13,000 rpm、20 °C で 1 分

遠心した。フロースルーを捨てた後、さらに 13,000 rpm、20 °C で 1 分間空遠心し、1.5 mL プラスチックチューブに移し、Milli-Q 水 50 μL をカラムメンブレンの中央に滴下し、1 分間静置した。13,000 rpm、20 °C で 1 分遠心して、全量 50 μL 分回収した。吸光度測定を行い、濃度を算出した。

［結果と考察］

表 2-1： DsbA の PCR purification kit 精製後の吸光度測定結果

DsbA	OD_{230}	OD_{260}	OD_{280}	OD_{320}	OD_{260}/OD_{280}	濃度[ng/μL]	収量[μg]
吸光度	1.22	1.58	0.9	0	1.756	79	3.95

一般に、核酸の純度は OD_{260} / OD_{280} の値から判断できる。精製された DNA では OD_{260} / OD_{280} の値がおよそ 1.8 になる。しかし、タンパク質が多く混入すると、280 nm における吸収の割合が増大し、OD_{260} / OD_{280} の値は低下する。表 2-1 の DsbA の PCR purification kit 精製後の吸光度測定結果より DsbA サンプルの純度に問題はないと思われる。

(4)　DsbA をコードした DNA 断片の NdeI と EcoRI による切断

以下のように反応液を調製し、37 °C で 2 時間 30 分反応させた。

Milli-Q 水	68 μL
10×H buffer	10 μL
DsbA 溶液	20 μL (1580 ng)
NdeI	1 μL
EcoRI	1 μL
Total	100 μL

反応後、以下のようにサンプルを調製し、アガロースゲル電気泳動を行った。

・ゲノム PCR 増幅後 DsbA	
Milli-Q 水	8 μL
10×loading buffer	1 μL
ゲノム PCR 後 DsbA 溶液	1 μL（予想核酸量 79 ng）
Total	10 μL

・Nde I＋Eco RI 処理後 DsbA	
Milli-Q 水	8 μL
10×loading buffer	1 μL
DsbA の NdeI と EcoRI 処理液	1 μL（予想核酸量 16 ng）
Total	10 μL

［結果と考察］

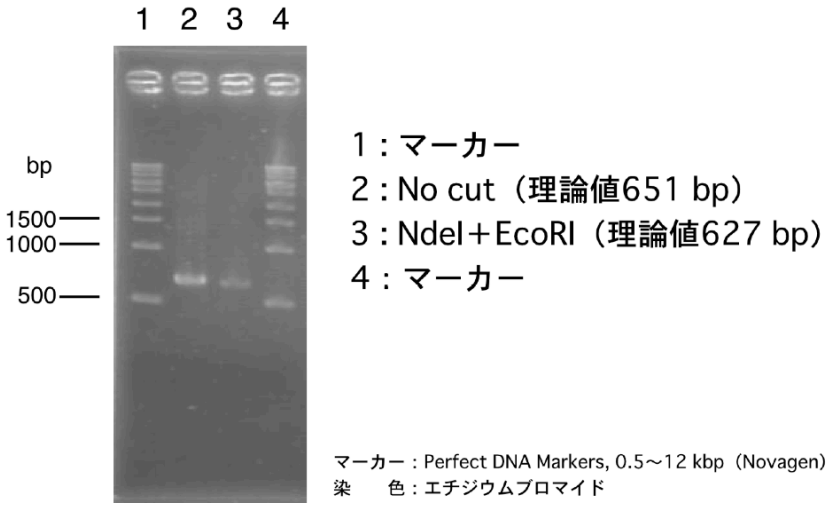


図 2-5：DsbA の制限酵素処理後の 2%アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動の結果より制限酵素処理後は、処理前よりもバンドが少し低分子量側にシフトしているのでNdeIとEcoRIにより切断されたと考えられる。

(5)　pET-22b の制限酵素処理

［実験操作］

以下のように pET-22b を NdeI と EcoRI で切断するための反応液を調製した。37 °C で 3 時間反応させた。

Milli-Q	18.5 μL

10×H buffer	2.5 μL
pET-22b	2 μL（1,000 ng）
NdeI	1 μL
EcoRI	1 μL
Total	25 μL

反応後、QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製を行った。

また､以下のように pET-22b を NdeI と EcoRI それぞれで 1 cut した反応液を調製し、37 °C で 1 時間反応させた。

Milli-Q	7.5 μL
10×H buffer	1 μL
希釈 pET-22b	1 μL（50 ng）
NdeI	1 μL
Total	10.5 μL

Milli-Q	7.5 μL
10×H buffer	1 μL
希釈 pET-22b	1 μL（50 ng）
EcoRI	0.5 μL
Total	10 μL

反応後、以下のようにサンプルを調製し、アガロースゲル電気泳動を行った。

・No cut pET-22b

Milli-Q 水	8 μL
10×loading buffer	1 μL
希釈 pET-22b	1 μL（50 ng）
Total	10 μL

・2 cut pET-22b

Milli-Q 水	5 μL
10×loading buffer	1 μL
pET-22b の NdeI と EcoRI 処理液	4 μL（予想核酸量 80 ng）
Total	10 μL

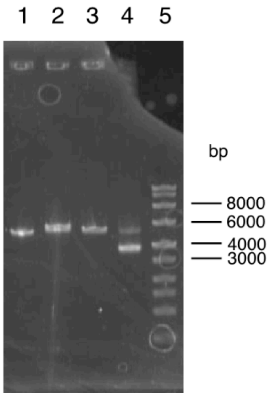
・1 cut pET-22b

NdeI 処理 pET-22b 溶液	10 μL（50 ng）
10×loading buffer	1 μL
Total	11 μL

・1 cut pET-22b

EcoRI 処理 pET-22b 溶液	10 μL（50 ng）
10×loading buffer	1 μL
Total	11 μL

［結果と考察］



（　）：バンド位置の理論値
1：NdeI＋EcoRI（5397 bp）
2：EcoRI（5493 bp）
3：NdeI（5493 bp）
4：No cut（5493 bp）
5：マーカー

マーカー：Perfect DNA Markers, 0.5～12 kbp（Novagen）
染　色：エチジウムブロマイド

図 2-6：pET-22b の制限酵素処理後の 0.6%アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動の結果より、pET-22b は NdeI と EcoRI により 2cut されたと判断した。

(6)　pET-22b の Bacterial alkaline phosphatase（BAP）処理による脱リン酸化

この先、pET-22b（ベクター）と DsbA（インサート）をライゲーション反応させるが、pET-22b 内でのセルフライゲーションを防ぐため、BAP 処理による脱リン酸化操作を行った。

［実験操作］

以下のような反応液を調製し、37 °C で overnight 反応させ、pET-22b の BAP 処理を行った。

Milli-Q 水	42.5 μL
10×BAP buffer	10 μL
2 cut 後、PCR purification Kit で精製した pET-22b 溶液	46 μL（920 ng）
BAP（0.6 units/μL）	1.5 μL
Total	100 μL

(7)　pET-22b（ベクター）と DsbA（インサート）のアガロースゲル切り出し精製

pET-22b（ベクター）と DsbA（インサート）について、アガロースゲル切り出し精製を行った。

［実験操作］

切り出し精製用 1%アガロースゲル (SeaKem GTG Agarose)を作成し、以下のように泳動サンプルを調製した。泳動後、EtBr で染色し、UV 照射し、目的バンド位置を確認後、ゲルを切り出し、1.5 mL チューブに回収した。

pET-22b BAP 処理後サンプル	100 μL（920 ng）	Nde I, Eco RI 処理後 DsbA サンプル	90 μL（1185 ng）
10×Loading buffer	10 μL	10×Loading buffer	10 μL
Total	110 μL	Total	100 μL

［結果と考察］

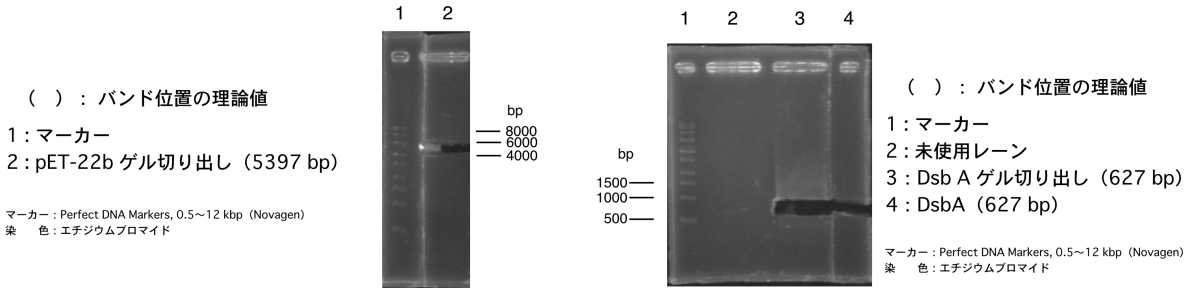


図 2-7：DsbA と pET-22b の 1%アガロースゲル切り出し精製

pET-22b、DsbA のバンドを切り出した結果、それぞれ 230 mg、350 mg のアガロースゲルを回収した。この後、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製した。

(8)　QIAquick Gel Extraction Kit を用いたベクターとインサートの精製

回収したゲル（pET-22b：230 mg、DsbA：350 mg）を QIAquick Gel Extraction Kit

を用いて精製した。このキットには、NaI 類似の塩が含まれていると考えられる。この塩の高濃度条件下ではアガロースゲルが溶け、しかも酸性条件にすることで DNA がガラスに吸着するという性質を利用している。スピンカラムのフィルター部分にシリカ膜を用い、ここに DNA を吸着させる。単純な遠心操作で DNA が溶出、精製できるようになっている。

［実験操作］

切り出したゲルの 3 倍容量の Buffer QG (チオシアン酸グアニジン 50～100%:pH 7.5 以下で黄色に呈色する pH 指示薬入り)をゲル入りプラスチックチューブに 4 本に加え、2 分おきにボルテックスしながら 50 °C で 15 分間インキュベートした。ゲルが完全に溶け、溶液の色が黄色であることを確認した。プロトコールには、「500 bp 以下と 4,000 bp 以上の DNA 断片に対しては、ここでイソプロパノールを加えると、収率が向上する」と指示されているため、pET-22b のゲル溶液にのみイソプロパノールを 230 μL 添加した。各プラスチックチューブ中の溶液をそれぞれ 4 本の QIAquick spin column に数回に分けて移し、13,000×g、25 °C、1 分間遠心した。フロースルーを捨てた。次に、4 つのカラムに Buffer PE (EtOH, グアニジウム塩酸塩) 750 μL を添加して 2 分間静置した後、13,000×g、25 °C、1 分間遠心した。フロースルーを捨てた後、さらに 13000×g、25 °C、1 分間空遠心して、カラムを新しい 1.5 mL プラスチックチューブに移した。milliQ 水 30 μL をカラムメンブレンの中心に添加し、1 分間静置して 13,000×g、25 °C で 1 分間遠心し、30 μL の DNA 溶液を回収した。その後、以下の 2 種類のサンプルの吸光度測定を行い、濃度を測定した。

（ⅰ）Kit で精製した pET-22b 溶液 30 μL から 10 μL をとって、milliQ 90 μL で希釈したサンプル

（ii）Kit で精製した DsbA 溶液 30 μL から 10 μL をとって、milliQ 90 μL で希釈したサンプル

また、以下のようなサンプルを調製し、アガロースゲル電気泳動を行った。

・No cut pET-22b

milliQ	8 μL
10×loading buffer	1 μL
No cut pET-22b	1 μL（50 ng）
Total	10 μL

・切り出し精製後 pET-22b

milliQ	5 μL
10×loading buffer	1 μL
pET-22b ゲル切出精製溶液	4 μL（予想核酸量 30 ng）
Total	10μL

・No cut DsbA

milliQ	8 μL
10×loading buffer	1 μL
ゲノム PCR 後 DsbA 溶液	1 μL（79 ng）
Total	10 μL

・切り出し精製後 DsbA

milliQ	6 μL
10×loading buffer	1 μL
DsbA ゲル切出精製溶液	3 μL（26 ng）
Total	10 μL

［結果と考察］

ベクターとインサート DNA のアガロースゲル切り出し精製後の濃度と収量を**表 2-2** に示した。

表 2-2：ベクターとインサート DNA のアガロースゲル切り出し精製後の吸光度

	OD_{230}	OD_{260}	OD_{280}	OD_{320}	OD_{260}/OD_{280}	濃度[ng/μL]	収量[μg]
pET-22b	2.36	0.15	0.10	0	1.5	Invalid	（推測）0.225
DsbA	4.38	0.19	0.13	0.02	1.55	Invalid	（推測）0.255

図 2-8 のアガロースゲル電気泳動の結果より、ゲル精製後の pET-22b、DsbA それぞれのレーンには適切な位置に一つのバンドが観察されている。また、ベクターとインサート DNA 共にライゲーション反応に必要な量を回収できた。

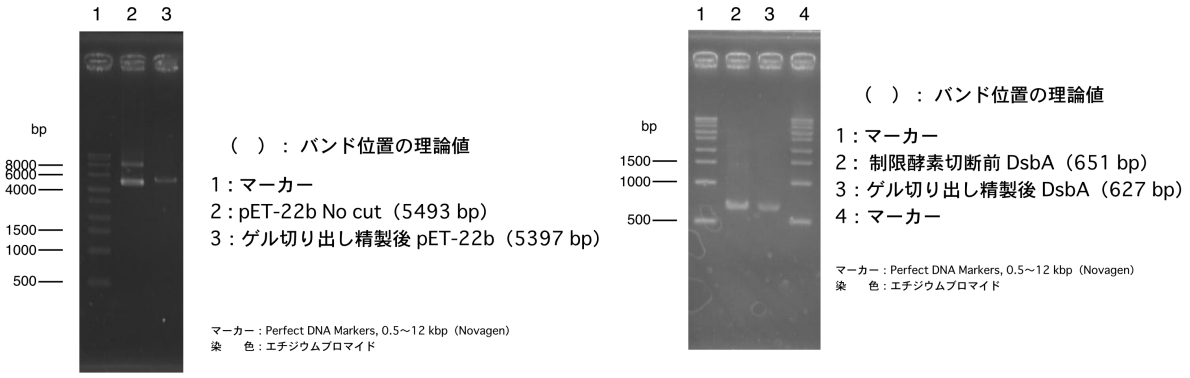


図 2-8：pET-22b と DsbA のゲル切り出し精製後の（左）1%（右）2%アガロースゲル電気泳動

(9)　ライゲーション反応

DsbA インサートと pET-22b ベクターをライゲーションし、JM109 に Heat shock 法で形質転換した。

［実験操作］

ライゲーション反応は、Ligation Convenience Kit (ニッポン・ジーン社)を使用して行った。 Kit に付属の 2×Ligation mix を氷上で完全に融解後、ピペッティングで良く混ぜておいた。

1.5 mL チューブに以下のような反応液を調製し、16 °C で 15 分間インキュベートした。

・pET22b：DsbA≒1：8（モル比）

2×Ligation mix	5 μL
ベクターpET22b	2.5 μL（18.75 ng）
インサート DsbA	2 μL（推測 DNA 量 17 ng）
milliQ	0.5 μL
Total	10 μL

・コントロール（pET22b の self ligation の影響の評価）

2×Ligation mix	5 μL
ベクターpET22b	2.5 μL（18.75 ng）
milliQ	2.5
Total	10

JM109 コンピテントセル 100 μL に各サンプル全量(10 μL)を加えて、氷上で 10

分間インキュベートした。次に 42 °C で 2 分間インキュベートし、SOC 培地 900 μL を加え、37 °C で約 1 時間インキュベートした。3,500 rpm、25 °C で 3 分間遠心し、上清を捨てて、SOC 培地 100 μL 加えてピペッティングして、アンピシリン含有プレートに塗布した。37 °C で一晩インキュベートした。

［結果と考察］

pET22b：DsbA≒1：8（モル比）のプレートに**約 500 個**のコロニーが観察された。

(10)　QIAprep Spin Miniprep Kit を用いた pET22b-DsbA のプラスミド抽出

［実験操作］

約 500 個のコロニーが生えている JM109（pET22b-DsbA）のプレートから 4 つシングルコロニーを選び、LB 培地 4 mL (アンピシリンを終濃度 100 μg/mL となるように添加済)にそれぞれ植菌し、37 °C、200 rpm で一晩振とう培養した。

培養液を 50 mL ファルコンチューブに移し、25 °C、3,500×g、5 分間遠心し、上清を除去した。その後、Buffer P1 (EDTA、RNase 含有) 250 μL を加えてピペッティングで菌体を懸濁し、1.5 mL プラスチックチューブに移した。Buffer P2 (NaOH、SDS) 250 μL を加え、6 回転倒混和し、速やかに Buffer N3 (グアニジウム塩酸塩、酢酸) 350 μL を加え 6 回転倒混和した。その後、25 °C、13,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を QIAprep Spin Column に移した後、25 °C、13,000 rpm で 1 分間遠心した。フロースルーを除去し、Buffer PB (イソプロパノール、グアニジウム塩酸塩) 500 μL を加えて 25 °C、13,000 rpm で 1 分間遠心した。Buffer PE (EtOH、グアニジウム塩酸塩) 750 μL を加え、25 °C、13,000 rpm で 1 分間遠心後、さらに 25 °C、13,000 rpm で 1 分間空遠心し Buffer PE を完全に除去した。カラムを 1.5 mL プラスチックチューブに移し、milliQ 50 μL をカラムメンブレン中心に添加して 1 分間静置した後、

25 °C、13,000 rpm で 1 分間遠心し、プラスミド溶液を回収した。その後、吸光度測定により、およそ 3 μg/50 μL のプラスミド DNA を得たことを確認した。

(11) 制限酵素処理によるインサートの確認

精製したプラスミドを NdeI と EcoRI により切断することで、インサートが存在するか確認した。

［実験操作］

4 つのコロニー由来の pET22b-DsbA プラスミドに対して、No cut、1 cut、2 cut のサンプルを以下のように調製した。1 cut と 2 cut のサンプル計 8 本は 37 °C で約 1 時間反応させた。

・No cut pET22b-DsbA

Milli-Q 水	9 μL
pET22b-DsbA	1 μL
Total	10 μL

・1 cut pET22b-DsbA

Milli-Q 水	7.5 μL
10×H buffer	1 μL
pET22b-DsbA	1 μL
EcoRI	0.5 μL
Total	10 μL

・2 cut pET22b-DsbA

Milli-Q 水	7 μL
10×H buffer	1 μL
pET22b-DsbA	1 μL
NdeI	0.5 μL
EcoRI	0.5 μL
Total	10 μL

その後、4 つのコロニー由来の pET22b-DsbA プラスミドの No cut、1 cut、2 cut 反応液に対し、10×loading buffer を加え、アガロースゲル電気泳動用の sample を作製した。

［結果と考察］

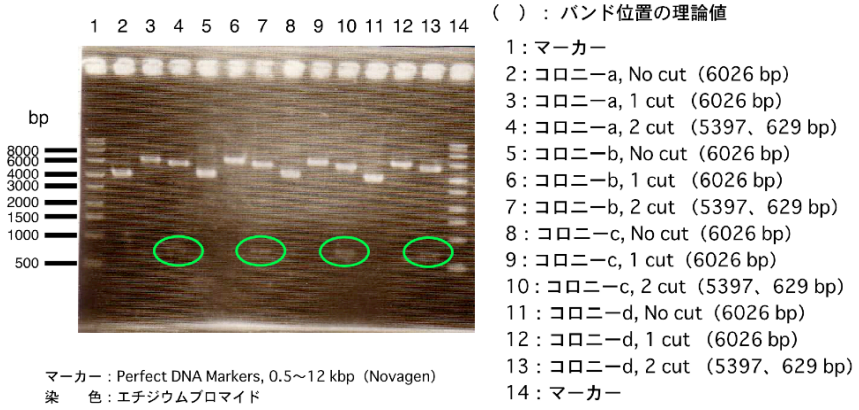


図 2-9：DsbA-pET22b の制限酵素処理後の 1%アガロースゲル電気泳動

ベクターである pET22b とインサートである DsbA 由来のバンドが観察された。

以上より、pET22b-DsbA について、コロニーa、b、c、d 由来のプラスミドは、ライゲーションが成功していることを確認できた。

(12)　DsbA 発現プラスミドのシークエンス確認

今回、DsbA 発現用のプラスミドを作製するにあたり、DsbA の遺伝子を大腸菌 JM109 のゲノム DNA から Taq DNA ポリメラーゼを用いて増幅した。Taq ポリメラーゼが増幅の際、エラーを引き起こす可能性が考えられるので、Taq DNA ポリメラーゼで増幅した DsbA の構造遺伝子の部分に変異が入っている可能性がある。そこで、シークエンスを確認した。

プライマーの配列を以下に示した・

Forward primer for T7 promoter：5’–TAATACGACTCACTATAGGG–3’

Reverse primer for T7 terminator：5’–GCTAGTTATTGCTCAGCGG–3’

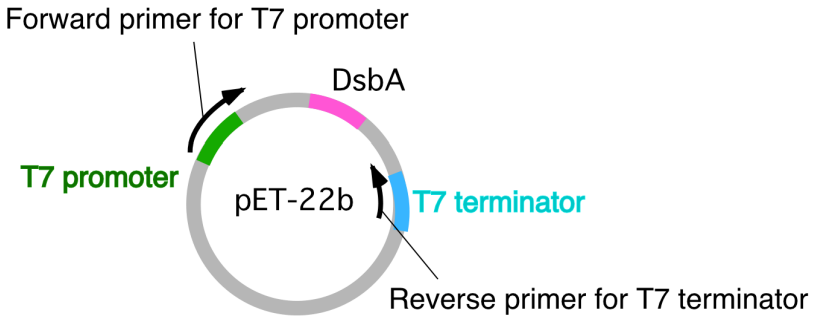


図 2-10：シークエンス確認における Forward primer と Reverse primer

［結果と考察］

DsbA-pET22b のプラスミドについて、大腸菌 JM109 ゲノム DNA から Taq DNA ポリメラーゼで PCR 増幅した DsbA 構造遺伝子インサート部分に変異は入っておらず、正しい配列であることを確認した。

DsbA-pET22b プラスミドのシークエンスが正しいことが確認できたので、このプラスミドを有する大腸菌 JM109 のグリセロールストックを作製し、ディープフリーザー内に保存した。

2-2-5　DsbA 変異体発現用ベクター(C33A, C30A, P151S, P151N, P151H)の作製[7]

(1)　変異導入操作

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社製)を用いて、2-2-4 節で作製したプラスミド pET22b-DsbA に変異を導入し、変異導入プラスミド計 5 種類(C33A, C30A, P151S, P151N, P151H)を作製した。

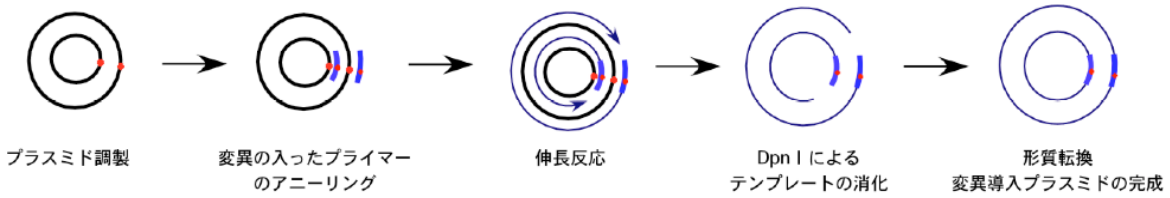


図 2-11：QuikChange 法の概念図

実験操作は、各変異体同様に行った。各変異体作製用の QuikChange 反応プライマーを以下に示した。

forward primer for DsbA (C33A)

5’-CTCTTTCTTCTGCCCGCACGCACGCCTATCAGTTYGAAGAAGTTCTG-3’

reverse primer for DsbA (C33A)

5’-CAGAACTTCTTCAAACTGATAGGCGTGCGGGCAGAAGAAAGAG-3’

forward primer for DsbA (C30A)

5’-GTTTTTCTCTTTCTTCGCCCCGCACTGCTATCAG-3’

reverse primer for DsbA (C30A)

5’-CTGATAGCAGTGCGGGGCGAAGAAAGAGAAAAAC-3’

forward primer for DsbA (P151S)

5’-C GTG CAA TTG CGT GGC GTT TGG GCG ATG TTT GTT AAC GG-3’

reverse primer for DsbA (P151S)

5’-CC GTT AAC AAA CAT CGC CGA AAC GCC ACG CAA TTG CAC G-3’

forward primer for DsbA (P151N)

5’-C GTG CAA TTG CGT GGC GTT AAC GCG ATG TTT GTT AAC GG-3’

reverse primer for DsbA (P151N)

5’-CC GTT AAC AAA CAT CGC GTT AAC GCC ACG CAA TTG CAC G-3’

forward primer for DsbA (P151H)

5’-C GTG CAA TTG CGT GGC GTT CAT GCG ATG TTT GTT AAC GG-3’

reverse primer for DsbA (P151H)

5’-CC GTT AAC AAA CAT CGC ATG AAC GCC ACG CAA TTG CAC G-3’）

［実験操作］

Operon から届いた forward primer for DsbA の入った容器を 10 秒間スピンダウンし、150 μL の Milli-Q 水を加え（終濃度 100 μM）、5 秒間 voltex、スピンダウンをして溶解させた。同様に、reverse primer for DsbA の入った容器を 10 秒間スピンダウンし、100 μL の Milli-Q 水に加え（終濃度 100 μM）、5 秒間 voltex、スピンダウンをして溶解させた。それぞれの溶液を 10 倍に希釈し、10 μM のプライマー溶液を 100 μL 作製した。次に PCR チューブに以下の組成で反応液を調製した。

10×Pfu Ultra HF reaction Buffer	5 μL
pET22b-DsbA (12.5 ng/μL)	1.5 μL (18.75 ng)
forward primer for DsbA (10 μM)	0.88 μL (125 ng, 8.8 pmol)
reverse primer for DsbA (10 μM)	0.88 μL (125 ng, 8.8 pmol)
dNTP mix	1 μL
Milli-Q 水	40.7 μL
Total	50 μL

反応液をタッピング、スピンダウンし、Pfu Ultra HF DNA ポリメラーゼ (2.5 U/μL)を 1 μL 添加した。サーマルサイクラーを使用し、95 °C で 30 秒加熱後、95 °C、30 秒→55 °C、1 分→68 °C、6 分を 16 サイクルというプログラムで PCR を行った。PCR 反応後、反応溶液に DpnⅠを 1 μL 添加し、恒温槽で 37 °C で 1 時間反応させ、テンプレート DNA を消化させた。

(2)　アガロースゲル電気泳動での確認

プラスミド DNA はコイルドコイル構造をとっているが、QuikChange 後（PCR 後）の DNA はニックの入った開環状の構造をとっている。これらを電気泳動すると、構造の違いによって移動度に差が出る。この原理を利用して、変異が導入されたかどうかをアガロースゲル電気泳動によって確認した。

［実験操作］

以下の 4 種類のサンプルを作製し、アガロースゲル電気泳動を行った。

サンプル①	
pET22b-DsbA プラスミドDNA(12.5 ng/μL)	4 μL
Milli-Q	5 μL
10×Loading buffer	1 μL
Total	10 μL

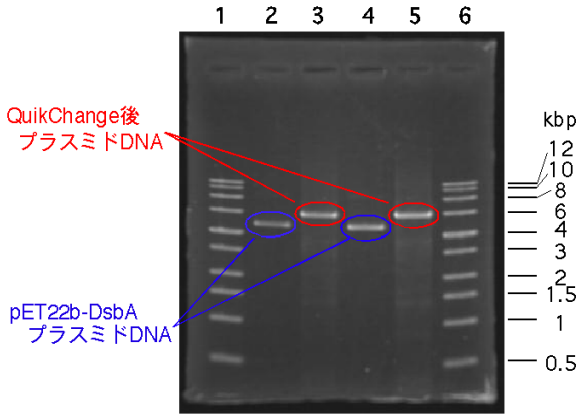
サンプル②	
QuikChange後反応溶液	4 μL
Milli-Q	5 μL
10×Loading buffer	1 μL
Total	10 μL

サンプル③	
pET22b-DsbA プラスミドDNA(12.5 ng/μL)	8 μL
Milli-Q	1 μL
10×Loading buffer	1 μL
Total	10 μL

サンプル④	
QuikChange後反応溶液	8 μL
Milli-Q	1 μL
10×Loading buffer	1 μL
Total	10 μL

［結果と考察］

泳動結果は**図 2-12** のようになった。コイルドコイル構造をとっている DNA はニックの入った開環状 DNA より移動距離が小さくなるので、QuikChange 前と後での移動度の差は構造の違いによるものであると考えられる。変異導入後のプラスミドのほうが移動距離は小さくなったので、変異が導入された可能性が確認できた。この結果は C33A 変異体についてのものであるが、その他の変異体についても同様のアガロースゲル電気泳動の結果が得られた。



1% アガロース、100 V 25 min、EtBr 30 min
マーカー：Perfect DNA Markers, 0.5-12 kbp

レーン 1：分子量マーカー
レーン 2：pET22b-DsbA プラスミドDNA
(6026 bp, 50 ng分)
レーン 3：QuikChange後 反応液
(6026 bp, 50 ng分)
レーン 4：pET22b-DsbA プラスミドDNA
(6026 bp, 100 ng分)
レーン 5：QuikChange後 反応液
(6026 bp, 100 ng分)
レーン 6：分子量マーカー

図 2-12：pET22b-DsbA の変異導入前後の 1%アガロース電気泳動

(3)　JM109(DE3)の Heat shock 法による形質転換

DNA に変異が導入されたことが確認できたので、大腸菌 JM109(DE3)に Heatshock 法によって形質転換した。

［実験操作］

JM109(DE3)のコンピテントセルを氷上で溶解した。それぞれに QuikChange 後、消化反応をおこなった反応溶液をそれぞれに 1 μL 添加し、10 分間氷上でインキュベートした。42 °C の温浴で 1 分間 Heat shock を行い、4 分間氷上でインキュベートした。そこに SOC 液体培地 900 μL を加え、37 °C、200 rpm で 1 時間振とう培養を行った。この培養液 100 μL を Ampicillin 含有 LB プレートに塗布した（プレート 1)。残りの培養液を TOMY 遠心機で 20 °C、3000 rpm、3 分間遠心し、上澄みを 800 μL 除いた。残り 100 μL をよく懸濁し、同様に Ampicillin 含有 LB プレートに塗布した (プレート 2)。2 枚のプレートを 37 °C の恒温器で一晩培養した。

［結果と考察］

翌朝、一晩培養した LB プレートにコロニーが観察された。pET22b-DsbA 各変異体(C33A, C30A, P151S, P151N, P151H)発現用プラスミドは Ampicillin 耐性であり、コロニーが観察できたので大腸菌にプラスミド DNA が形質転換されたことがわかった。

形質転換をして培養した大腸菌から、**2-2-4 節**と同様にして、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN 社製）を用いてプラスミドを抽出した。

(4)　シークエンス解読操作

pET22b-DsbA(native)の場合と同様に、今回作製した DsbA 変異体発現用プラスミドについてもシークエンス解読を行った。

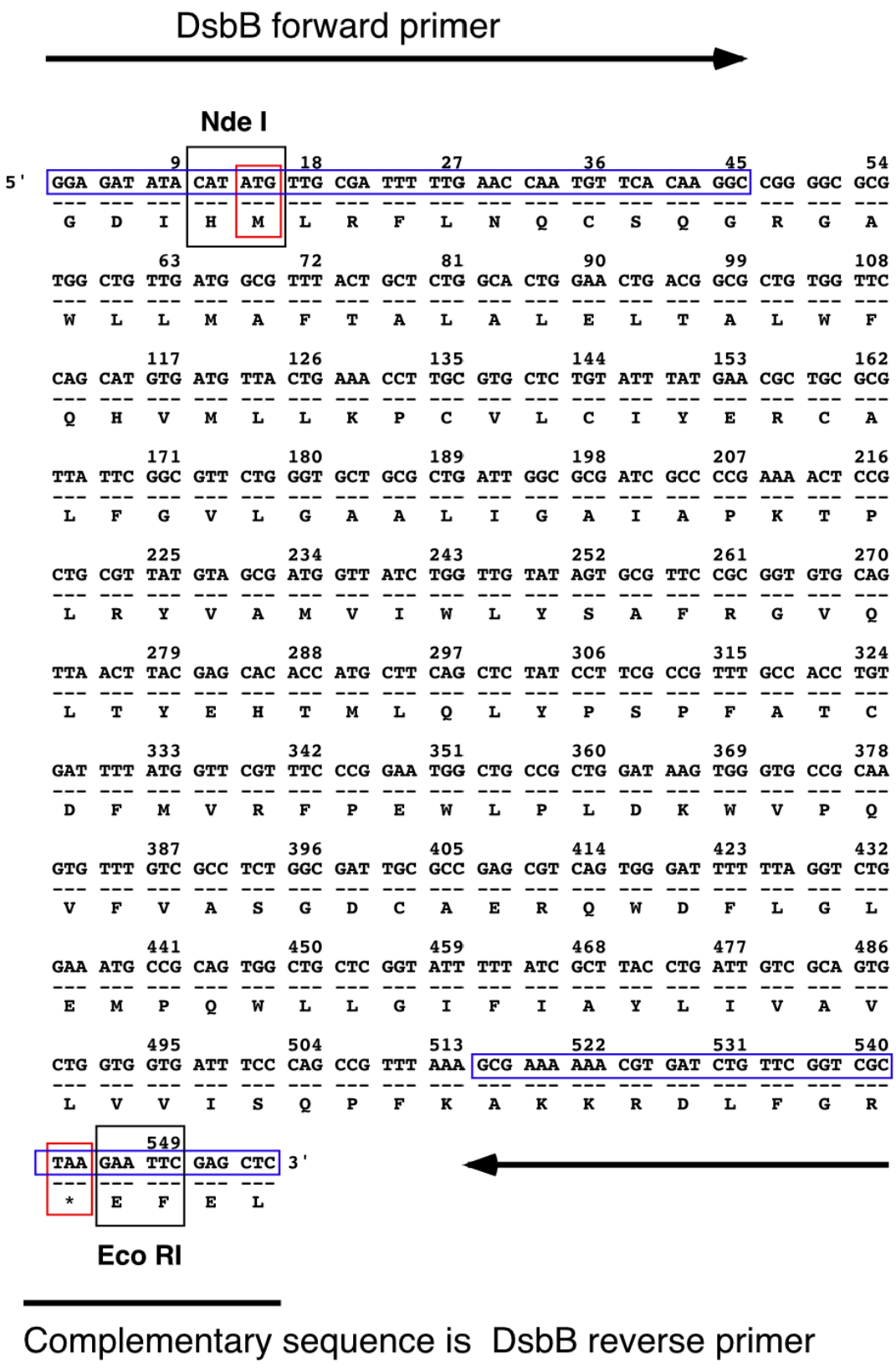


図 2-14：大腸菌 JM109 ゲノム PCR で DsbB 遺伝子を増幅するプライマーの設計

DsbB 遺伝子は赤四角で囲んだ開始コドンから終始コドンまでの 531 bp であり、その外側に pET22b と DsbB のライゲーション後生成物の NdeI と EcoRI の認識配列を示した。

［結果と考察］

5 種類の変異体全てについて、目的の変異が入っていることを確認した。

2-2-6　DsbB 発現用ベクターの作製

(1)　DsbB 遺伝子の大腸菌ゲノムからの PCR 抽出

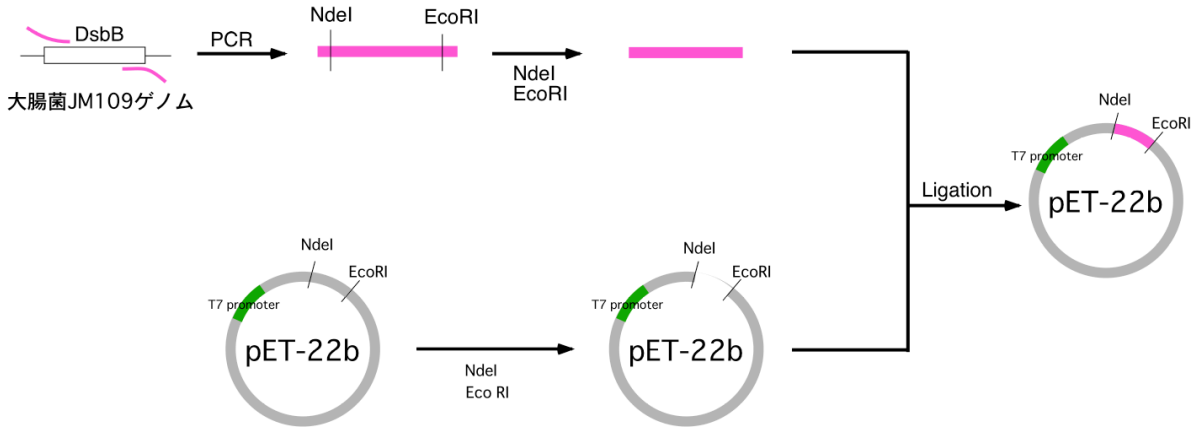


図 2-13：DsbB 遺伝子の大腸菌ゲノムからの抽出と pET22b plasmid への組み込み

2-2-4 節の DsbA(native)の場合と同様に行った。DsbB 遺伝子を大腸菌 JM109 ゲノムから PCR で増幅させるに際し、以下に示す 2 種類のプライマーを使用した。塩基配列中の下線は制限酵素認識部位を表す。

①DsbB forward primer

5’…GGAGATATACAT ATGTTGCGATTTTTGAACCAATGTTCACAAGGC…3’

②DsbB reverse primer

5’…GAGCTCGAATTCTTAGCGACCGAACAGATCACGTTTTTTCGC…3’

(2)　DsbB 発現プラスミドの終止コドンを有効にするための変異・欠失導入

膜タンパク質 DsbB を大腸菌で発現させる際、文献[4,5]によると、DsbB の精製段階において His-tag 精製を行っているが、作製したプラスミド(pET22b-DsbB)は、

pET22b の T7promoter と His-tag コード遺伝子間に DsbB 構造遺伝子を導入したために、フレームシフトによって、His コドンが無効になっている。さらに、野生型の DsbB 構造遺伝子に存在する stop コドンによって、その下流領域の翻訳が進行しないので、6 つの連続した His-tag が翻訳されない。DsbB を大腸菌で発現させる際のこれら 2 つの問題を解決するために、ここでは、QuikChange 法を用いて、フレームシフトを修正し、また、ストップコドンに変異を加えた。

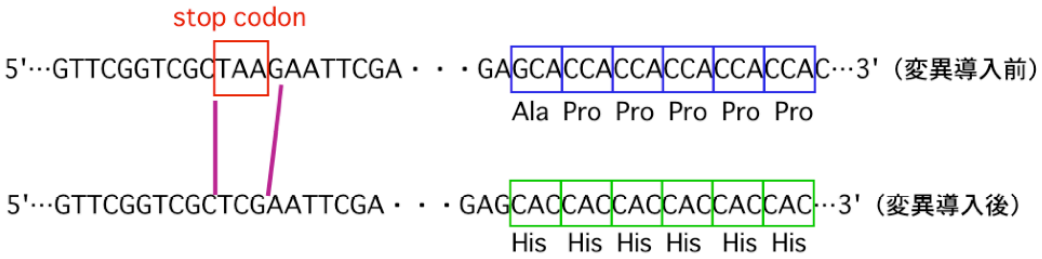


図 2-15：変異導入前後の pET22b-DsbB のシークエンス配列

［実験操作］

以下のような反応液を調製し、Pfu Ultra HF DNA ポリメラーゼ（2.5 U/μL）を 1 μL 添加した。95 °C で 30 秒加熱後、94 °C, 30 秒 → 55 °C, 1 分 → 68 °C, 6 分を 18 サイクル繰り返した。PCR 反応後の溶液に Dpn Ⅰ を 1 μL 添加し、37 °C で 1 時間消化反応させた。その後、アガロースゲル電気泳動を行った。

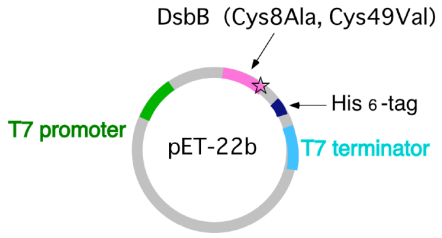
10×reaction Buffer	5 μL
pET22b-DsbB（7.2 ng/μL）	2 μL（14.4 ng）
Quick Change DsbB forward primer（10 μM）	1.5 μL（125 ng, 10.5 pmol）
（配列：5'-gatctgttcggtcgctcgaattcgagctccgtcgac-3'）	
Quick Change DsbB reverse primer（10 μM）	1.5 μL（125 ng, 10.5 pmol）
（配列：5'-gtcgacggagctcgaattcgagcgaccgaacagatc-3'）	
dNTP mix	1 μL
Milli-Q 水	39 μL
total	50 μL

［結果と考察］

シークエンス解読により、正しく変異導入されていることを確認した。

(3)　C8A,C49V 変異導入

文献[1, 3-5]では DsbB を発現させる際、DsbB の構造遺伝子領域の 8 番目と 49 番目の Cys を、それぞれ Ala と Val に置換したものを使用している。これら 2 種類の Cys は、タンパク質のジスルフィド結合形成反応に関与するチオレドキシンフォールドの活性中心配列（Cys-Xaa-Xaa-Cys）の Cys とは別に、大腸菌 DsbB の構造遺伝子領域に存在するものであり、種間では保存されておらず、これらを置換しても、*in vivo* または *in vitro* で害は生じない。Cys8Ala、Cys49Val という置換は、DsbB 分子間のジスルフィド結合形成に伴う凝集を避けることに寄与すると考えられる。



☆＝pET22bに付加されているHis-tagを翻訳させるため、
DsbB構造遺伝子末端の終止コドンに変異を加えてある

図 2-16：使用したベクター

2-2-5 節と同様にして、DsbB に QuikChange 法を用いて、C8A, C49V の変異導入を施した。用いたプライマー配列を以下に示した。

Forward Primer for C8A mutation

5’-G CGA TTT TTG AAC CAA GCG TCA CAA GGC CGG GGC-3’

Reverse Primer for C8A mutation

5’-GCC CCG GCC TTG TGA CGC TTG GTT CAA AAA TCG C-3’

Forward Primer for C49V mutation

5’-C TGT ATT TAT GAA CGC GTG GCG TTA TTC GGC GTT CTG-3’

Reverse Primer for C49V mutation

5’-CAG AAC GCC GAA TAA CGC CAC GCG TTC ATA AAT ACA G-3’

シークエンス解読により、正しく変異導入されていることを確認した。

2-2-7　BCCP-DsbB 発現用プラスミドの調製

BCCP（Biotin Carboxyl Carrier Protein）はプロピオン酸菌由来のビオチン関連酵素であるトランスカルボキシラーゼのドメインであり、大腸菌体内でビオチンリガーゼによって Lys88 がビオチン化されることが知られている[6]。そのため、目的タンパク質を BCCP との融合タンパク質として、大腸菌タンパク質発現システムを用いて調製すると、ビオチンを部位特異的に 1 カ所導入することができ、Avidin 基板上に目的タンパク質を配向固定化することができる（**図 2-17**）。そのために BCCP-DsbB 融合タンパク質を作製した。

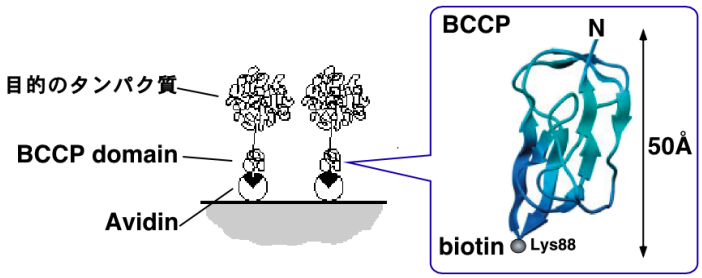


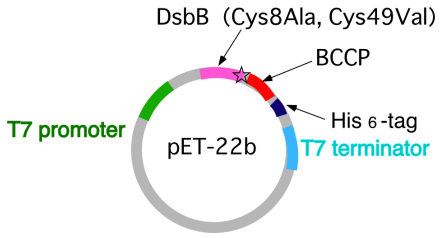
図 2-17：BCCP 融合タンパク質のイメージ図と BCCP の立体構造

(左) BCCP-融合タンパク質の基板固定化（右）BCCP の構造

BCCP-DsbB の設計については、以下のことに留意した。

①DsbB の N 末端、C 末端側はどちらも細胞質側に存在するため、BCCP を付加するのは、N 末端、C 末端どちらでも良い。②論文[4,5]で DsbB を発現させる際、His-tag

が C 末端側に付加されていたということは、発現および精製に影響が少ないからであると考えられる。同様に、BCCP-DsbB を作製するときも C 末端側に BCCP を付加した方が、発現および精製に影響は少ないと思われる。また、膜タンパク質の膜埋め込みの観点から考えると、C 末端側に付加する方が安全と考えられる。③ BCCP タグは分子量約 13 kDa であり、膜タンパク質 DsbB が約 20 kDa であることを考えると、かなり大きいタグであると言える。BCCP タグにこだわらずに、分子量が小さい Avi タグも存在する。しかしながら、BCCP タグでは当研究室で QCM 基板上に翻訳開始因子 IF2 の BCCP タグ融合体である BCCP-IF2 を発現調製し、金基板上の Avidin と Avidin-Biotin 相互作用で固定化した実績がある。今回は BCCP タグを DsbB の C 末端側に付加することにした。ベクターマップを**図 2-18** に示した。



☆＝pET22bに付加されているHis-tagを翻訳させるため、
DsbB構造遺伝子末端の終止コドンに変異を加えてある

図 2-18：BCCP-DsbB 発現用ベクター

具体的には、BCCP ドメインを有する pinpoint Xa ベクター（Promega）から BCCP ドメインを PCR で増幅し、それをインサートとして、また、DsbB 発現用プラスミドである pET22b-DsbB(C8A, C49V)をベクターとし、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Clontech)を用いて、BCCP-DsbB 発現用ベクターを作製した。

(1)　In Fusion 反応を利用した BCCP-DsbB 発現用ベクターの調製

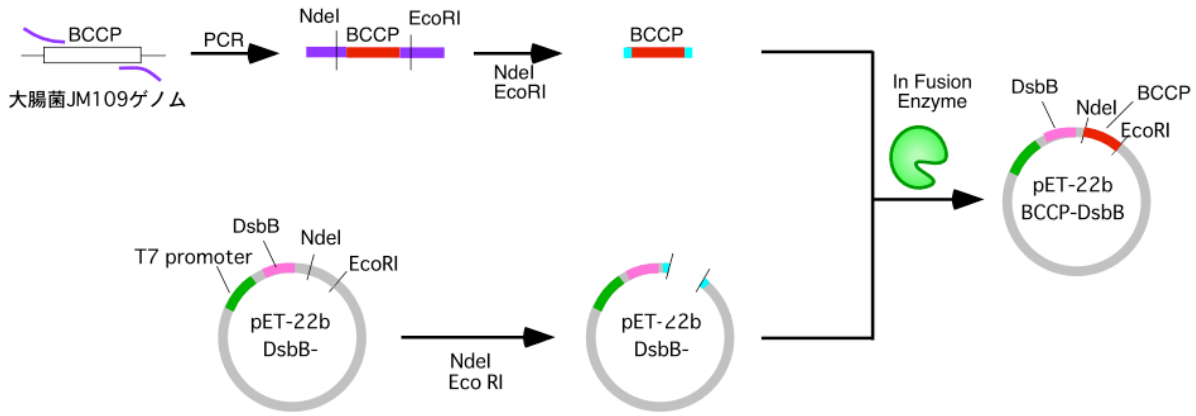


図 2-19：In Fusion 反応の概念図

［実験操作］

以下のような反応液を調製し、37 °C で約 4 時間反応させた。

Milli-Q 水	8.5 μL
pET22b-DsbB(C8A, C49V)（105 ng/μL）	12 μL
10×M buffer	2.5 μL
Hind III	1 μL
Xho I	1 μL
Total	25 μL

反応液を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)を用いて精製し、30 μL の Milli-Q 水でベクターを溶出させた。

［結果と考察］

表 2-3：ベクターの QIAquick PCR purification kit 精製後の吸光度測定結果（10 倍希釈値）

	OD_{230}	OD_{260}	OD_{280}	OD_{320}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	濃度[ng/μL]
吸光度	0.048	0.053	0.030	0.003	1.852	1.111	25.0

制限酵素処理後のベクターを精製し、In Fusion 反応に必要量が得られた。

(2)　KOD-plus ver2 を用いた BCCP インサートの調製

［実験操作］

以下のような反応液を調製した。

Milli-Q 水	28 μL
10×buffer for KOD ver2	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
25 mM MgSO4	3 μL
BCCP DsbB fwd primer（10 μM）	1.5 μL
5’…TCC GTC GAC AAG CTT ATG AAA CTG AAG GTA ACA GTC AAC G…3’	
BCCP DsbB rev primer（10 μM）	1.5 μL
5’…GTG GTG GTG CTC GAG ACC TTC GAT GAG CTC GAG ATC C…3’	
Pinpoint Xa-1 プラスミド（10 ng/μL）	5 μL
KOD-Plus	1 μL
Total	50 μL

上記の反応液について、

94 °C, 2 min 加熱後、

98 °C, 10 sec→60 °C, 30 sec→68 °C, 30 sec を 25 サイクル繰り返し、

4 °C で放置

というプログラムで PCR を行った。

その後、アガロースゲル切り出し精製を行った。吸光度測定を行った。

［結果と考察］

表 2-4：QIAquick PCR purification kit 精製後の吸光度測定結果（10 倍希釈値）

	OD_{230}	OD_{260}	OD_{280}	OD_{320}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	濃度[ng/μL]
吸光度	0.23	0.025	0.017	0.007	1.800	0.081	9.0

BCCP インサートを精製し、In Fusion 反応に必要量が得られた。

(3)　In Fusion 反応

［実験操作］

下記の反応液を調製した。

ベクター（25 ng/μL）	8 μL
インサート（9 ng/μL）	6 μL
5×reaction buffer	4 μL
In Fusion enzyme	2 μL
Total	20 μL

37 °C で 15 分反応させ、さらに 50 °C で 15 分反応させた。4 °C で保存した。反応溶液を TE buffer（pH 8.0）で 50 μL にメスアップした。その希釈液を 2.5 μL 用いて、JM109 コンピテントセルを Heat shock 法で形質転換した。また、ネガティブコントロールとしてベクター溶液 1 μL（25 ng）を用いて、同様に JM109 を形質転換した。

［結果と考察］

ネガティブコントロールのプレート(25 個)に比べ、ポジティブコントロールのプレート(250 個)では、コロニー数が多く、In Fusion 反応が成功したと判断した。

(4)　コロニーの制限酵素処理

［実験操作］

A～D コロニーについて、QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN)を使用して、定法に従い、プラスミド抽出を行った。吸光度測定を行った。

A～D コロニー由来のプラスミドについて以下のように制限酵素処理反応を行った。

A～D 各コロニー由来 DNA	9 μL
10×M buffer	1 μL
Hind III	0.5 μL
Xho I	0.5 μL
Total	11 μL

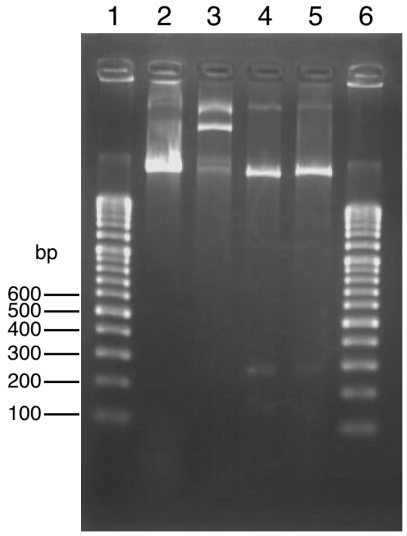
37 ℃で 20 分処理後、10×loading buffer を 1 μL 加えて、アガロースゲル電気泳動を行った。

［結果と考察］

表 2-5：抽出した BCCP-DsbB-pET22b プラスミドの吸光度測定結果(10 倍希釈)

	230 nm	260 nm	280 nm	320 nm	260 nm/280 nm	260 nm/230 nm	濃度[ng/μL]
A コロニー由来	0.098	0.103	0.059	0.009	1.880	1.056	47
B コロニー由来	0.052	0.066	0.039	0.004	1.771	1.292	31
C コロニー由来	0.08	0.104	0.063	0.014	1.837	1.364	45
D コロニー由来	0.049	0.066	0.039	0.006	1.818	1.395	30

C、D コロニーについて、インサートが確認できた。C, D コロニー由来のプラスミドについて、BCCP ドメインを PCR 増幅し、BCCP インサートが含まれているか確認した。



1：マーカー（5 μL）
2：Aコロニー由来プラスミドの制限酵素処理後反応液
3：Bコロニー由来プラスミドの制限酵素処理後反応液
4：Cコロニー由来プラスミドの制限酵素処理後反応液
5：Dコロニー由来プラスミドの制限酵素処理後反応液
6：マーカー（5 μL）

マーカー：OneSTEP Ladder 100 (0.1～2 kbp)（Nippongene）
染　　色：エチジウムブロマイド
アガロース：2%

図 2-20：プラスミドの制限酵素処理により、インサートの存否を確認するためのアガロースゲル電気泳動

(5)　KOD-plus ver 2 を用いた BCCP ドメインの有無の確認とシークエンス確認

［実験操作］

以下のような反応液を調製した。

Milli-Q 水	31.5 μL
10×buffer for KOD ver2	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
25 mM $MgSO_4$	3 μL
Fwd primer（10 μM）	1.5 μL
Rev primer（10 μM）	1.5 μL
C or D コロニー由来プラスミド DNA	1.5 μL
KOD-Plus	1 μL
Total	50 μL

上記の反応液について、

94 °C, 2 min 加熱後、

98 °C, 10 sec→60 °C, 30 sec→68 °C, 30 sec を 25 サイクル繰り返し、

4 °C で放置

というプログラムで PCR を行った。その後、アガロースゲル電気泳動を行った。

［結果と考察］

C、D コロニーには BCCP インサートが含まれていることが分かった。D コロニーについて、シークエンス解読を行った。

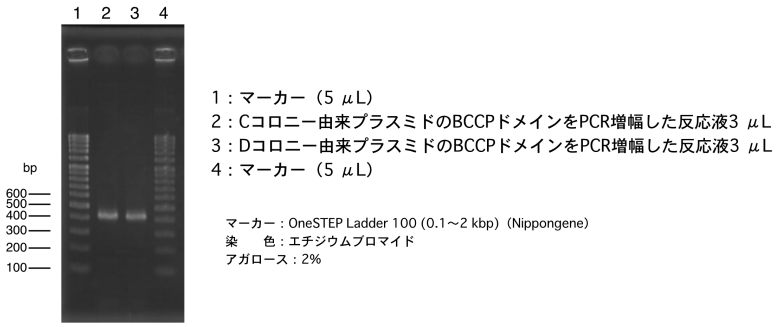


図 2-21：BCCP ドメインを PCR 増幅し、インサートの存否を確認するためのアガロースゲル電気泳動

以下に示したようにシークエンスが正しいことが確認できた。

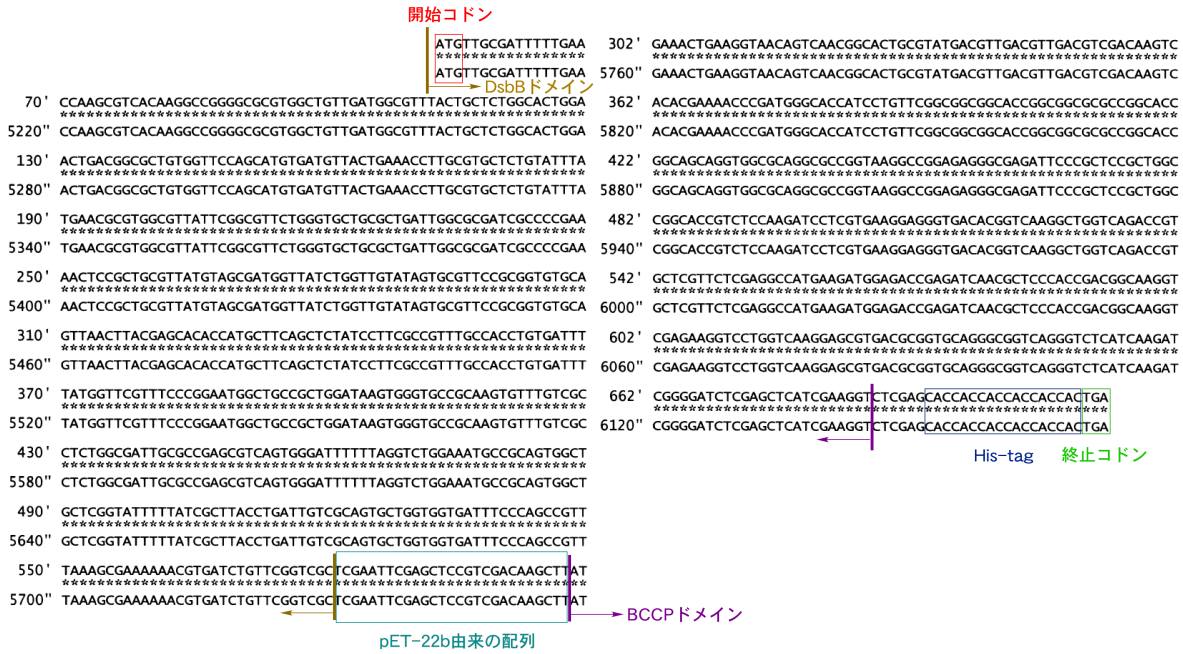


図 2-22：BCCP-DsbB 発現用プラスミドのシークエンス解読結果

BCCP-DsbB 発現ベクターを調製することができた。

2-2-8　DsbA の発現および精製

(1)　大腸菌 JM109(DE3)の DsbA(native)-pET22b を用いた形質転換（Heat shock 法）

これまでに報告された論文[7]では大腸菌 JM83 を用いて DsbA を発現させ、1 L の LB 培地あたり 7 mg の DsbA を回収していた。同じ JM シリーズの大腸菌 JM109（DE3）を用いて DsbA の発現を行った。

［実験操作］

JM109（DE3）のコンピテントセル 2 本を氷上で溶解させ、0.125 ng もしくは 1.25 ng 分の DsbA-pET22b のプラスミド DNA 溶液を加えて 10 分間氷上でインキュベートした。その後、42 °C で 1 分間ヒートショックを行い、氷上で 2 分間インキュベ

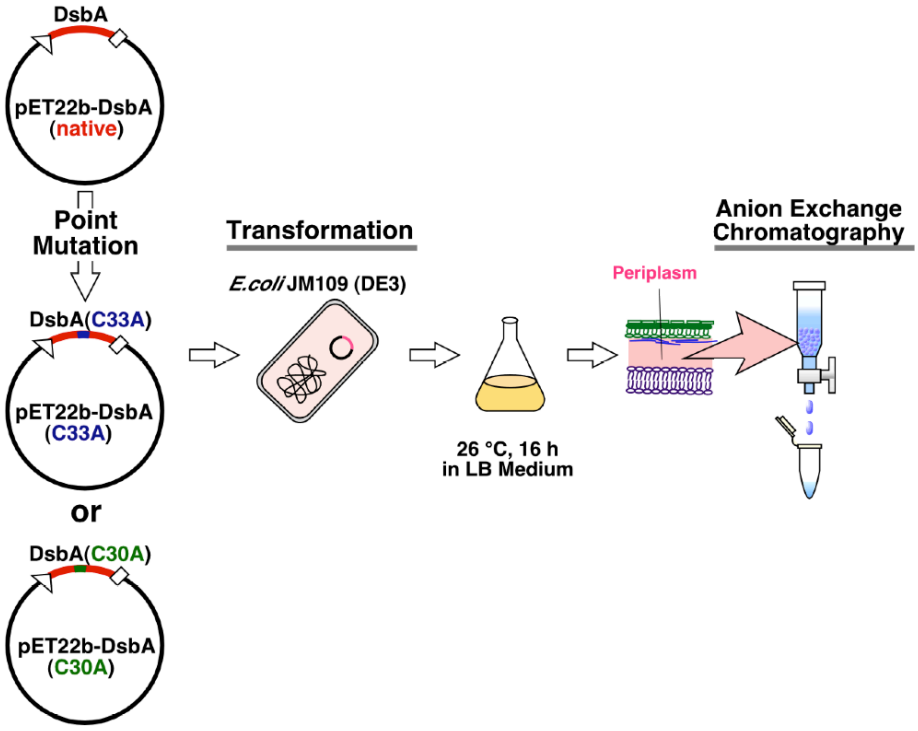


図 2-23：DsbA および DsbA 変異体の発現・精製

ートした。この大腸菌に SOC 液体培地 900 μL を加えて、37 °C の恒温培養器で 40 分間放置した。この後、4 °C、3000 rpm、3 分間遠心し（TOMY 遠心機を使用）、菌体を沈殿させた。上澄みを 800 μL 除き、残り 100 μL をよく懸濁した後、アンピシリン含有プレートに塗布し、37 °C 恒温器で一晩培養した。

(2)　大腸菌 JM109（DE3）を用いた DsbA(native)の少量培養

JM109（DE3）を用いて DsbA の小スケール発現誘導を行った。

［実験操作］

JM109(DE3)-pET22b-DsbA(native)について、液体 LB 培地 6 mL（アンピシリンを終濃度 100 μg/mL となるように添加済）に植菌し、26 °C、200 rpm で振とう培養した。

翌日、Full growth の状態である培養液について、新たに用意した LB 培地 6 mL

（アンピシリンを終濃度 100 μg/mL となるように添加済み）に植え継ぎを行った。200 rpm、26 °C で培養した。OD_{600}＝1.0 前後となったところで、IPTG を終濃度 1 mM になるように加えた後、さらに 26 °C で 16 時間培養した。

16 時間後培養を停止し、SDS-PAGE を行うことで DsbA の発現が誘導されているか調べた。SDS-PAGE 用のサンプルは、SDS-PAGE の 1 レーン分について、

$$OD_{600} \times \text{サンプル溶液（}\mu\text{L）} = 60$$

となるように培養液をサンプリングし、5,000×g、4 °C、3 分間遠心（TOMY 遠心機を使用）し、菌体を沈殿させた後、上清を除いた。その後、Milli-Q 水を 10 μL 加えながら pellet を溶かし、2 ×sample buffer を 10 μL 加え、スピンダウンした後、99 °C で 3 分間加熱し、ボルテックスした。

［結果と考察］

A～C コロニー由来の JM109(DE3)-pET22b-DsbA について、いずれも DsbA が過剰発現されていることが分かった。また、IPTG を添加した系に比較すれば小さいが、IPTG 非添加の系においても、DsbA が発現誘導されていることが分かった。

(3)　大腸菌 JM109（DE3）を用いた DsbA(native)の大量発現

JM109（DE3）を発現宿主として、DsbA の小スケール発現誘導が確認できたので、1 L の LB 培地を用いて、大量培養を行った。

［実験操作］

250 mL の LB 液体培地を入れた羽付き三角フラスコ 4 本それぞれに、アンピシリンを終濃度 100 μg/mL となるように添加した。前日から培養していた JM109 (DE3)-DsbA-pET22b の Full growth 培養液を 4 本の羽付きフラスコに植え継ぎ、その後、羽付き三角フラスコを大型シェーカーで 160 rpm、26 °C で振とう培養した。

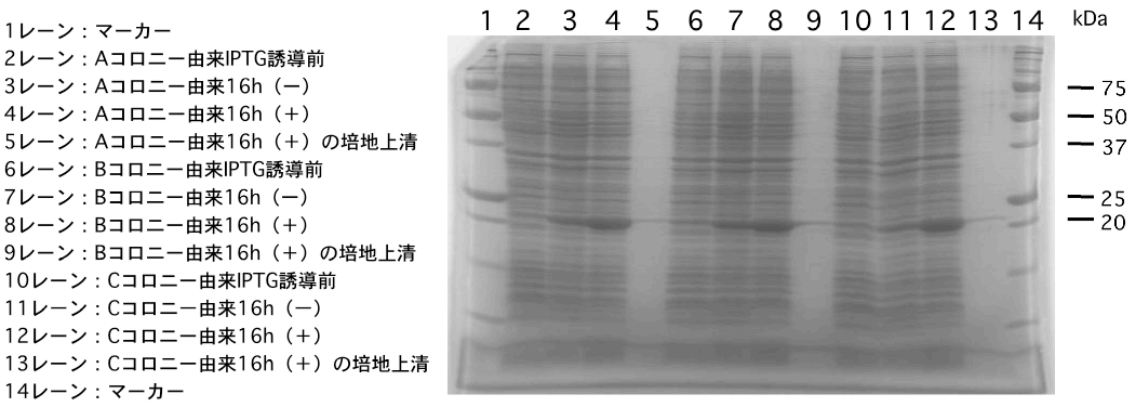


図 2-24：大腸菌 JM109（DE3）を用いた DsbA の小スケール発現誘導の SDS-PAGE
（アクリルアミド 15%）マーカー：Precision Plus Protein Unstained Standards（Bio-Rad）

OD_{600} が約 1.0 付近となったところで、IPTG を添加しない系として用いるため 6 mL ほどの培養液を採取した。残りの培養液に対し、IPTG を終濃度 1 mM となるように加えた後、16 時間培養した。

(4) DsbA を大量発現した JM109（DE3）の EDTA 処理によるスフェロプラスト化[7]

DsbA は内膜と外膜の間のペリプラズム画分に存在する分泌タンパク質であり、このようなペリプラズムタンパク質は、大腸菌を EDTA 処理して外膜を不安定化させ、スフェロプラスト化（外膜がいくらか失われて球状になった状態）することで、細胞外に漏れ出す画分として分離することができる。そこで、DsbA を大量発現した JM109（DE3）を EDTA 含有バッファーで処理し、スフェロプラスト化させた。

［実験操作］

低温室内にて、ディープフリーザーで保存しておいたペレットについて、氷冷 BBS/EDTA buffer（200 mM ホウ酸/NaOH, pH 8.0、160 mM NaCl、5 mM EDTA）を

20 mL 加えて、懸濁させた。懸濁液を 100 mL ビーカーに移し、スターラーで 2 時間撹拌した。その後、48,000×g、4 °C、30 分間 超遠心した。上清を 5 L の 10 mM MOPS/NaOH（pH 7.0）で約 5 時間透析した。透析後のサンプルについて、0.45 μm フィルター濾過した。その後、2 回に分けて、陰イオンカラム精製を行った。

(5)　DsbA の陰イオン交換カラムによる精製

［実験操作］

精製は ÄKTA Purifier(GE ヘルスケア社製)を使用して行った。メソッドは以下の通りである。

カラム：Hi Trap DEAE FF 5 mL A buffer : 10 mM MOPS/NaOH (pH 7.0) B buffer : 10 mM MOPS/NaOH (pH 7.0)、500 mM NaCl Flow rate : 2.5 mL/min (run2 では 2.0 mL/min)、Fraction Size : 2.0 mL Time program : Wash（0%）with 2 CV、Elution (B: 0→100% linear gradient) with 15 CV、Clean with 5 CV

［結果と考察］

溶出画分をそれぞれ SDS-PAGE で確認したところ(**図 2-26**)、目的物と思われるバンドが A7, A8, A9 の画分に見られたので回収した。

(6)　DsbA サンプルの濃縮、透析、定量

精製後回収したサンプルに対して、アミコンウルトラ-15 限外濾過膜（分画分子量:10,000）を使用して 4000×g で遠心することで 10 mL くらいまで濃縮を行った。その後、10 mM MOPS/NaOH（pH 7.0）のバッファー 4 L で透析を行った。

透析後の DsbA サンプル溶液を回収した。全量 12 mL 程度であった。吸光度測定を行い、紫外吸光法により DsbA サンプル溶液の濃度、収量を確認した（DsbA の

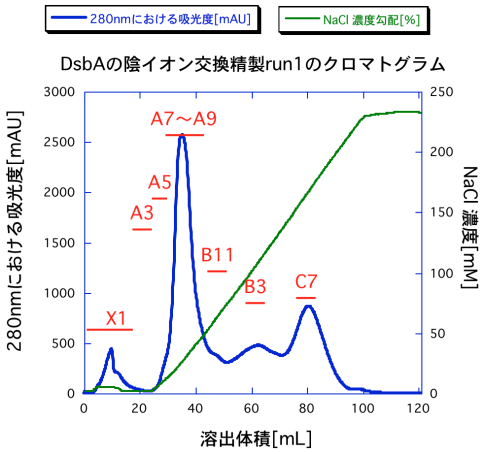
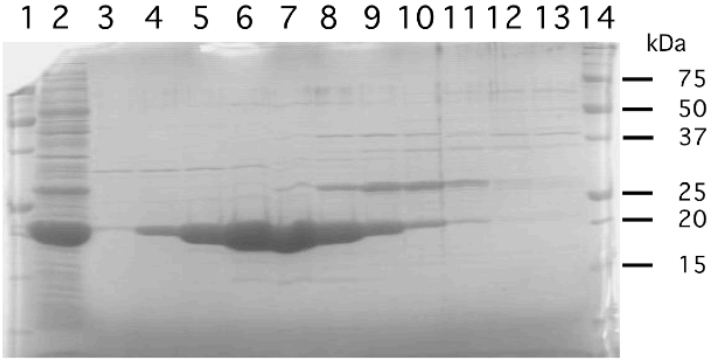


図 2-25：DsbA の陰イオン交換カラム精製クロマトグラム

1レーン：マーカー（10 μL）
2レーン：ペリプラズム画分上清（5 μL）
3レーン：A5画分（5 μL）
4レーン：A6画分（5 μL）
5レーン：A7画分（5 μL）
6レーン：A8画分（5 μL）
7レーン：A9画分（5 μL）
8レーン：A10画分（5 μL）
9レーン：A11画分（5 μL）
10レーン：A12画分（5 μL）
11レーン：B12画分（5 μL）
12レーン：B11画分（5 μL）
13レーン：B10画分（5 μL）
14レーン：マーカー（10 μL）



1レーン：マーカー（10 μL）
2レーン：X1画分（5 μL）
3レーン：A3画分（5 μL）
4レーン：B9画分（5 μL）
5レーン：B7画分（5 μL）
6レーン：B5画分（5 μL）
7レーン：B3画分（5 μL）
8レーン：B1画分（5 μL）
9レーン：C2画分（5 μL）
10レーン：C4画分（5 μL）
11レーン：C6画分（5 μL）
12レーン：C8画分（5 μL）
13レーン：C10画分（5 μL）
14レーン：マーカー（10 μL）

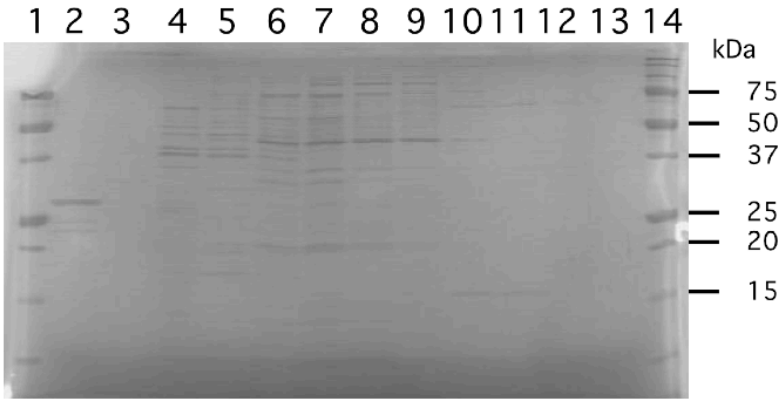


図 2-26：DsbA の陰イオン交換カラム精製後の SDS-PAGE の結果

（アクリルアミド 15 %）マーカー：Precision Plus Protein Unstained Standards（Bio-Rad）

280 nm におけるモル吸光係数は、$\varepsilon_{280\ nm} = 21{,}740\ M^{-1}cm^{-1}$ とした[7]。

濃度は 33.3 μM であった。収量は 9.5 mg であった。

その後、QCM セル内へのインジェクト用サンプルとするために、アミコンウルトラ-15 限外濾過膜を用いて 989 μM 程度まで濃縮した。40 μL ずつプラスチックチューブに分注し、−80 °C ディープフリーザーに保存した。最終的な収量は、8.2 mg となった。

2-2-9　DsbA 変異体の発現および精製

DsbA 変異体(C33A, C30A, P151S, P151N, P151H)についても野生型のときと同様に発現および精製を行った。紫外吸収法により、濃度と収量を求め、**表 2-6** に示した。

表 2-6：紫外吸収法により求めた DsbA 各変異体の濃度と収量

	濃度 [μM]	収量[mg]
C33A	846	7.8
C30A	1480	10.2
P151S	1014	12.1
P151N	827	9.89
P151H	584	7.36

QCM 実験に十分量の DsbA 各変異体が得られた。

2-2-10　DsbA 各変異体の MALDI TOF-MS による同定

得られたタンパク質が目的物である DsbA あるいは各変異体であるかを確認するために、Peptide Mass Fingerprint(PMF)法による同定を行った。今回はプロテアーゼ

で分解した試料タンパク質断片を MALDI 法（Matrix Assisted Laser Desorption Ionization；マトリックス支援レーザー励起イオン化法）TOF-MS（Time of Flight Mass Spectrometer；飛行時間型質量分析装置）で分析した。そのスペクトル結果をデータベースにあるスペクトルと比較して試料タンパク質を同定および変異導入の確認を行った。リシン残基の C 末端側を特異的に分解する Lys-C（リシンエンドペプチダーゼ）を用いて DsbA(native)を分解し、試料タンパク質とした [8]。MS 測定は AXIMA-CFR(SHIMADZU)、もしくは東京工業大学バイオ技術センターに依頼した。

［実験操作］

10 mM MOPS/NaOH(pH 7.0)に溶かした 50 μg/100 μL の DsbA(native, P151S)と 500 μg/100 μL の DsbA(C33A, C30A)（＊）に TCA を 40 μL 加えて氷上で 37 min 静置した。その後、4 °C, 12,000×g, 5 min 遠心を行い、上澄みを別のプラスチックチューブに移し替えた。そして、冷アセトン 600 μL 加え、再び 4 °C, 12,000×g, 5 min 遠心し、上清を除去後、今度は冷アセトン 200 μL で同様に遠心をかけ、上清を除去後真空乾燥させて、保存した。そして、RapiGestSF 1mg の入った 100 mM 炭酸水素アンモニウム 1 mL(0.1%(w/v))から先ほど保存したチューブに 50 μL 加えてボルテックスし、DTT 2.6 μL(終濃度 5 mM)加えて 60 °C で 30 min 静置させた。静置が終わり、冷めてからヨードアセトアミド 9.3 μL(終濃度 15 mM)加えアルミホイルで遮光して 30 min 静置した。その後、100 μg/mL の Lys-C を 10 μL 添加して 11 時間（DsbA(native, P151S)）または 3 時間(DsbA(C33A, C30A))反応させた。反応後、10% TFA 3.8 μL(終濃度 0.5%)加えて、37 °C, 45 min 静置させ、20 °C, 13,000 rpm, 10 min 遠心後上清を別のプラスチックチューブに回収した。以降の操作は ZipTip によるタンパク質濃縮を行った。まず、ZipTip C18(QIAGEN)を用いて 0.1% TFA/50%アセトニトリル水溶液 10 μL の吸着および排出を 3 サイクル行って膨潤させた。その後、

0.1 % TFA 10 μL の吸引と排出を 2 回行い、洗浄・平衡化させた。そして、新たなチューブに先ほどのタンパク質 10 μL 入れ、そこで 10 回の吸引・排出により、タンパク質を ZipTip に吸着させた。その後、0.1 % TFA 10 μL 洗浄・脱塩し、0.1% TFA/50%アセトニトリル水溶液 5 μL を新たなチューブに加えて 5 回ホッピングすることで ZipTip から吸着していたタンパク質を溶出させた。これを MALDI-TOF-MS の試料とした。また、ZipTip C18 の洗浄については 0.1% TFA/50% アセトニトリル水溶液 5 μL で 10 回吸収・排出を行った。(ZipTip の再生)測定は、DsbA (native, C33A, C30A, P151S)についてはバイオ技術センターに依頼し、DsbA(P151N, P151H)については、当研究室の AXIMA-CFR(SHIMADZU)を用いて行った。リフレクトロンモードで測定しマトリックスは CHCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)を使用した。さらにデータベースは Mascot Search を利用した。

（＊）DsbA(native, P151S)と DsbA(C33A, C30A)でタンパク質濃度が異なるのは、DsbA(C33A, C30A)のサンプルについては、よりピークシグナルを大きくするために濃度を大きくしたことによる。

［結果と考察］

DsbA(native), DsbA(C33A), DsbA(C30A)について結果を**図 2-27** に示した。DsbA を Lys-C で処理後の 8 残基から 48 残基までの断片に着目し、変異導入前には分子量 4778 のピークが確認された一方で、変異導入に伴い分子量 4689 にピークがシフトしたことから、変異導入されたことがわかった。DsbA(P151S), DsbA(P151N), DsbA(P151H)についても同様に変異導入に伴うピークが確認された。

2-2-11　大腸菌 C41(DE3)を用いた DsbB の発現と精製

2-2-6 節で作製したベクターを用いて、大腸菌に DsbB を発現させた。

(1)　Heat Shock 法による DsbB 発現用プラスミドを用いた C41（DE3）の形質転換

pET22b-DsbB（C8A, C49V）を用いて、大腸菌 C41（DE3）を Heat Shock 法で形質転換した。C41（DE3）は、膜タンパク質など細胞毒性の強いタンパク質発現用に使用される宿主である。

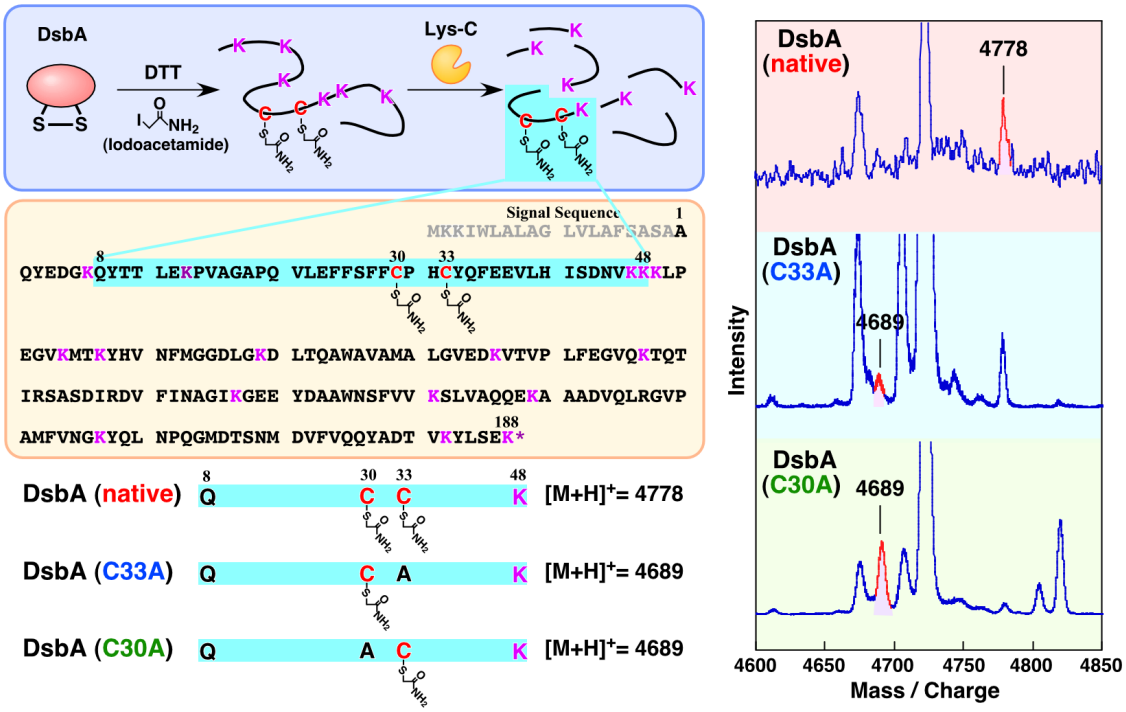


図 2-27：Lys-C を用いた PMF 法による DsbA の変異導入の確認

［実験操作］

ディープフリーザーに保存されていた C41（DE3）のコンピテントセル 200 μL を氷上で溶解させ、81 ng 分の pET22b-DsbB(C8A, C49V)のプラスミド DNA 溶液を加えて、10 分間氷上でインキュベートした。その後、42 °C で 1 分間ヒートショックを行い、氷上で 2 分間インキュベートした。この大腸菌に、SOC 液体培地 900 μL を加えて、37 °C, 200 rpm, 30 分間振とうした。培養液 100 μL をアンピシリン添加プレートに塗布した。その後、残りの培養液を 20 °C、3000 rpm、3 分間遠心し、

菌体を沈殿させた。上澄みを除き、残り 100 μL をよく懸濁した後、アンピシリン含有プレートに塗布し 37 °C 恒温器で一晩培養し、翌日コロニーを得た。

(2)　C41(DE3)-pET22b- DsbB(Cys8Ala, Cys49Val)を用いた DsbB の小スケール発現

C41(DE3)を用いて DsbB の小スケール発現を行った。また、IPTG を終濃度 15 μM と 0.15 mM 添加した場合の発現量の変化を確認した。

［実験操作］

C41(DE3)-pET22b-DsbB(Cys8Ala, Cys49Val)のプレートからコロニーを選び、マスタープレートを作製すると共に、それぞれ液体 LB 培地 5 mL（アンピシリンを終濃度 100 μg/mL となるように添加済）に植菌し、37 °C、200 rpm で振とう培養した。翌日、Full growth の状態である A～D の培養液それぞれについて、OD_{600}＝約 0.01 になるように新たに用意した LB 培地 5 mL（アンピシリンを終濃度 100 μg/mL となるように添加済み）4 本分に植え継ぎを行った。200 rpm、37 °C で培養した。培養液を 4 本用意し、**表 2-7** の条件で発現誘導を行った。

表 2-7：DsbB 小スケール発現における培養条件

Sample	IPTG 添加時の OD_{600}	IPTG / μM
1	–	–
2	0.6	15
3	1.0	15
4	1.0	15

4 本の培養液それぞれについて、4～5 時間後と 6～7 時間後の時点で濁度測定およ

び SDS-PAGE 用のサンプルを回収した。

［結果と考察］

表 2-8 に IPTG 添加時の濁度と IPTG 濃度を種々に変化させたときの吸光度測定結果を示した。

図 2-28 の SDS-PAGE の結果から、IPTG 添加により DsbB(20 kDa)と考えられるバンドが誘導されたことが分かる。20 kDa よりも小さめにバンドが確認されているのは、膜タンパクが疎水性基を多く持ち、SDS の結合量が増えたことで、負電荷の割合が大きいと考えれば妥当である。

表 2-8：DsbB 発現用 C41(DE3)の種々の条件での濁度変化(5 倍希釈)

	IPTG 添加 4～5 時間後	IPTG 添加 6～7 時間後
IPTG 非添加	0.522	0.511
OD_{600}＝0.6、IPTG 終濃度 15 μM	0.373	0.352
OD_{600}＝1.0、IPTG 終濃度 15 μM	0.357	0.362
OD_{600}＝1.0、IPTG 終濃度 0.15 mM	0.285	0.272

1レーン：マーカー（10 μL）
2レーン：Aコロニー由来, 0 h（−）
3レーン：Aコロニー由来, 4 h（−）
4レーン：Aコロニー由来, OD_{600}=0.6, IPTG 4h（+）, IPTG 15 μM
5レーン：Aコロニー由来, OD_{600}=1.0, IPTG 4h（+）, IPTG 15 μM
6レーン：Aコロニー由来, OD_{600}=1.0, IPTG 4h（+）, IPTG 150 μM
7レーン：Aコロニー由来, 6 h（−）
8レーン：Aコロニー由来, OD_{600}=0.6, IPTG 7h（+）, IPTG 15 μM
9レーン：Aコロニー由来, OD_{600}=1.0, IPTG 7h（+）, IPTG 15 μM
10レーン：Aコロニー由来, OD_{600}=1.0, IPTG 7h（+）, IPTG 150 μM
11レーン：マーカー（10 μL）

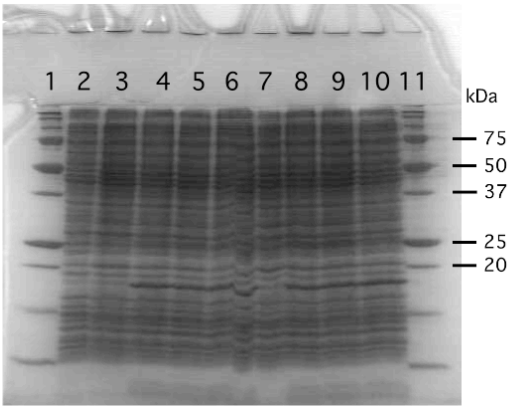


図 2-28：コロニーA 由来 C41(DE3)-pET22b-DsbB(Cys8Ala, Cys49Val)での小スケール発現誘導の SDS-PAGE

アクリルアミド：15%、マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）

37 °C, 10 分でサンプル調製した。

IPTG の効果は、終濃度 15 μM と 0.15 mM のどちらでも DsbB が誘導されたことから、IPTG 濃度は 15 μM で十分であることが分かった。むしろ、IPTG を終濃度 0.15 mM になるように添加した場合、今回の大腸菌の濁度測定値の結果から、「rapid growth cessation」が起こり、大腸菌が増殖の増殖が停止することが分かり、やはり IPTG は終濃度 10〜15 μM が適すると考えられる。また、IPTG を添加する際の培養液の濁度について、OD_{600}＝0.6 の場合と OD_{600}＝1.0 の場合で、菌体増殖と DsbB 発現量に関して差が見られなかったので OD_{600}＝0.6 のときに IPTG を添加すれば良いと考えられる。

(3)　大腸菌 C41(DE3)を用いた DsbB の大スケール発現誘導

3 L の LB 培地を用いて、大量培養を行った。

［実験操作］

1 L の LB 液体培地を入れた三角フラスコ 3 本それぞれに、アンピシリンを終濃度 100 μg/mL となるように添加した。前日から培養していた Full growth の C41（DE3）pET22b-DsbB（Cys8Ala, Cys49Val）培養液を各フラスコに植え継ぎ、大型シェーカーで 200 rpm、37 °C で振とう培養した。OD_{600} が 0.6 付近となったところで、IPTG を添加しない系として用いるため 3 mL ほどの培養液を試験管に採取し、そのまま培養した。残りの培養液に対し、IPTG を終濃度 15 μM となるように加えた後、4 時間培養した。4 時間経過したところで、培養液を日立の himac 遠心機を用いて 3000 rpm、4 °C、30 分間遠心した。上清をデカントで除いた後、菌体ペレットを Cold Buffer A（50 mM Tris-HCl（pH 8.0）、300 mM NaCl、1 mM PMSF）を約 70 mL 使用して、洗い込みをしながら、50 mL 遠沈管に回収した。

［結果と考察］

IPTG 添加 4 時間後の OD_{600}＝0.19、IPTG 非添加 4 時間後の OD_{600}＝0.54 であった。IPTG 添加、非添加において、濁度に差が生じていた。

(4)　破菌および膜画分の界面活性剤による可溶化

DsbB を大量発現した菌体を超音波破菌した。超音波破菌を行う上で、注意することは熱の発生である。超音波破砕の過程で大腸菌のリソソームが破壊され、内部からプロテアーゼが溶出し、DsbB を切断することが最も危険である。今回の超音波破砕では、温度の上昇を防ぐため、1 分間超音波照射後、1 分休み、再度 1 分照射するようにして、連続した超音波照射を避けるように留意した。

［実験操作］

超音波細胞破砕機 INSONATOR 201M (KUBOTA) を使用し、200 W、4 °C の条件で 1 分照射、1 分休みというサイクルを 10 回繰り返し、超音波破菌した。この破菌液を 35 mL ポリカーボネートチューブ 2 本に回収し、10,000×g 、4 °C において 30 分間遠心することで未破菌残渣を除いた。上清を超遠心用アツチューブに回収した。100,000×g、4 °C で 60 分間超遠心することで膜画分をペレットとして回収した。赤茶色のペレットが残った（膜画分は呼吸鎖酵素群を多く含んでいるため、このような色を呈する）。そのペレットを薬さじで回収し、ダウンス型のガラスホモジナイザーに移した。ペレットをホモジナイザーに移すときは、DDM（−）可溶化用バッファー（50 mM リン酸ナトリウム（pH 8.0）、300 mM NaCl）を約 11 mL 用いながら、洗い込むようにした。ホモジナイザーを使って、手動でペレットをすりつぶした。すりつぶした溶液をシリンジに移し、シリンジ針（unimed 製の 0.70 ×50 mm 針）に通した。肌色の乳液状となったサンプルに 10 % DDM 1.1 mL をスターラーで撹拌しながら添加した（添加後の DDM の終濃度 1%）。すると溶液はや

や透明になった。そのまま 30 分間撹拌を続けた。その後、100,000×g で 30 分間遠心することで可溶化されていない画分を除いた。この上清に対し、Ni-NTA カラム精製を行った。



図 2-29 : アツチューブの底面に付いた膜画分（左）、ダウンス型ホモジナイザー（中）、DDM での可溶化前後の様子（右）

(5)　DsbB の His-tag を利用した Ni-NTA カラム精製

［実験操作］

液体クロマトグラフィー装置である ÄKTA purifier（GE 製）を使用し、カラムは His-tag 精製用カラム HisTrap HP 5 mL を使用した。HisTrap HP 5 mL カラムは、平衡化バッファー（50 mM リン酸ナトリウム（pH 8.0）、300 mM NaCl、0.1% DDM）で予め置換した。また、DDM で可溶化した DsbB をカラムにアプライする際は、シリンジを用いて、手動でサンプル・ループにアプライした。SDS-PAGE 用サンプルの調製の際には、膜タンパク質の凝集を防ぐため、99 °C で加熱するのでなく、37 °C で 5 分以上放置した。以下のような溶出メソッドで、DsbB の Ni-NTA カラム精製を行った。

Column：His Trap HP 5 mL（HiTrap Chelating HP 5 mL）
A buffer：50 mM sodium phosphate(pH6.0), 300 mM NaCl, 0.1% n-dodecyl-β-D-maltoside
B buffer：50 mM sodium phosphate(pH6.0), 300 mM NaCl, 0.1% n-dodecyl-β-D-maltoside, 500 mM imidazole

Flow rate：3.0 mL/min　　Fraction Size：2.0 mL　　Wash：2 CV Elution：5% B：5 CV　　5→100% B(linear gradient)：20 CV　　100% B：5CV （＊CV = Column Volume）

［結果と考察］

Ni-NTA カラム精製後のクロマトグラム(**図 2-30**)および SDS-PAGE の結果(**図 2-31**, **図 2-32**)より、C9～D9 画分に DsbB と考えられるバンドが見られた。これらのバンドは**図 2-33** に示した抗 Histag 抗体を用いた Western Blotting によって His-tag を有していることが確認されたので、目的の DsbB であると考えられる。C9～D9 画分を回収した。回収量は、計 14 mL 程度となった。文献[4,5]では、この後、pH 4.5 バッファー処理を行っている。これは pH 4.5 の 50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液中で一晩透析を行った後、40,000 x g で遠心するという操作である。pH 4.5 の条件下において、DsbB は可溶性であるが、不純物は不溶性であるので、超遠心処理することで、不純物を除去できるということである。しかし、予備実験で pH 4.5 バッファー処理を行っても SDS-PAGE から判断した精製度には変化がなかったので、本実験では pH 4.5 処理を行わず、ゲル濾過カラム精製することにした。Ni-NTA カラム精製後の**図 2-32** の SDS-PAGE の結果から、DsbB の分子量の周辺にもバンドが多く存在し、DsbB をゲル濾過カラムで精製するのは、困難であるように考えられるが、今回の実験では、DsbB は界面活性剤 DDM で可溶化されており（DDM は会合数が 80～90 程度と知られており、ミセルサイズは 45 kDa ほどになる)、ゲル濾過カラム精製を試みる価値があると考えられる。

(6)　DsbB のゲル濾過カラム精製

［実験操作］

His-tag 精製後の Dsb B サンプル計 14 mL 程度を 4 mL, 5 mL, 5 mL と 3 つに分け

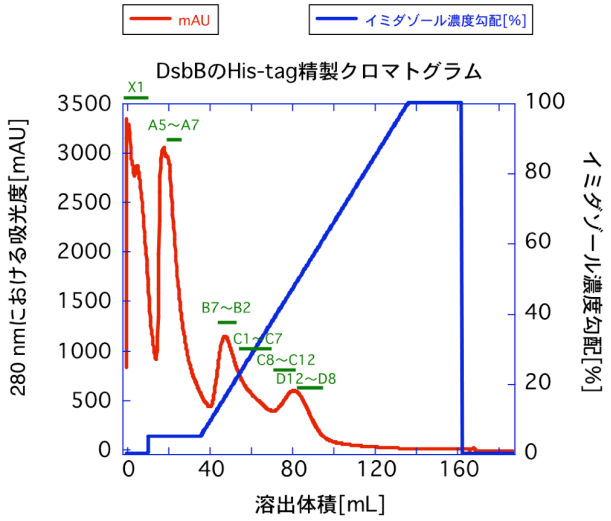
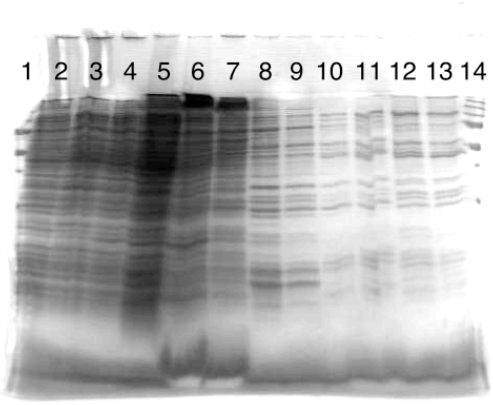


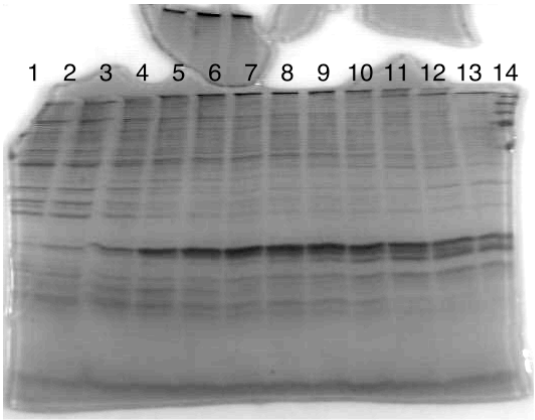
図 2-30：DsbB の Ni-NTA カラム精製のクロマトグラム



1レーン：マーカー（10 μL）……このゲルでは消えてしまっている。
2レーン：IPTG 0 h
3レーン：IPTG 4 h（−）
4レーン：IPTG 4 h（+）
5レーン：10,000×g, 20分遠心後の上清（10 μL）
6レーン：Ni-NTAカラム精製前（10 μL）
7レーン：X1（10 μL）
8レーン：A5（10 μL）
9レーン：A7（10 μL）
10レーン：B7（10 μL）
11レーン：B5（10 μL）
12レーン：B2（10 μL）
13レーン：C1（10 μL）
14レーン：マーカー（10 μL）…このゲルでは消えてしまっている。

図 2-31：His-tag 精製後の各フラクションの SDS-PAGE

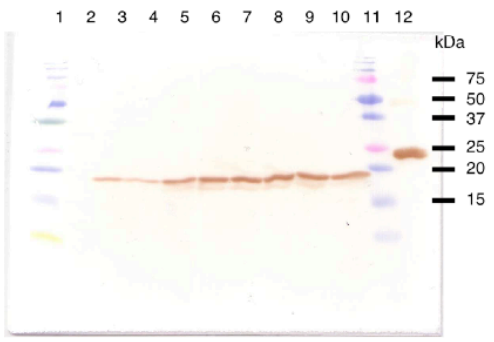
アクリルアミド：15%、マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）



1レーン：マーカー（10 μL）…このゲルでは消えてしまっている。
2レーン：C3（10 μL）
3レーン：C5（10 μL）
4レーン：C7（10 μL）
5レーン：C9（10 μL）
6レーン：C10（10 μL）
7レーン：C11（10 μL）
8レーン：C12（10 μL）
9レーン：D12（10 μL）
10レーン：D11（10 μL）
11レーン：D10（10 μL）
12レーン：D9（10 μL）
13レーン：D8（10 μL）
14レーン：マーカー（10 μL）…このゲルでは消えてしまっている。

図 2-32：His-tag 精製後各フラクションの SDS-PAGE

アクリルアミド：15%、マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）



1レーン：マーカー（Precision Plus Protein Standards Dual Color, 10 μL）
2レーン：4h（−）（10 μL）
3レーン：4h（+）（10 μL）
4レーン：C7（10 μL）
5レーン：C10（10 μL）
6レーン：C11（10 μL）
7レーン：C12（10 μL）
8レーン：D12（10 μL）
9レーン：D11（10 μL）
10レーン：D9（10 μL）
11レーン：マーカー（Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope, 10 μL）
12レーン：RRF（=Ribosome Recycling Factor）

図 2-33：抗 His-tag 抗体を用いた DsbB の Western Blotting による確認

泳動したサンプルについて、2, 3 レーンにはそれぞれ小スケール発現誘導時の OD_{600}＝0.6 における IPTG 非添加と IPTG 終濃度 15 μM 添加 4 時間後の培養液を用いた。4〜10 レーンには、図 2-32 に示した His-tag 精製後の SDS-PAGE の各フラクションの半分量のサンプルを泳動させた。

て、アミコンウルトラ-4 (MWCO : 30,000)を用いて、それぞれ約 850 μL, 1 mL, 1 mL まで濃縮した。1 mL サンプルループを用いて、DsbB サンプルをカラムにアプライし、ÄKTA purifier（GE 製）を使用して、溶出メソッドは以下の通り行った。

Column：HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade
Buffer：50 mM sodium phosphate(pH6.0), 300 mM NaCl, 0.1% n-dodecyl-β-D-maltoside
Flow rate：0.50 mL/min
Fraction Size：2.0 mL
Length of Elution：1.5 CV(run1), 1.2 CV(run2, 3)

［結果と考察］

ゲル濾過カラム後のクロマトグラムおよび SDS-PAGE の結果より、不純物のバンドが除かれて、DsbB の純度が向上したことが分かる。Run2、Run3 も同様の結果となった。

(7)　DsbB の紫外吸光法による定量

ゲル濾過精製 run1〜run3 の SDS-PAGE の結果より判断して、run1, 2, 3 において、

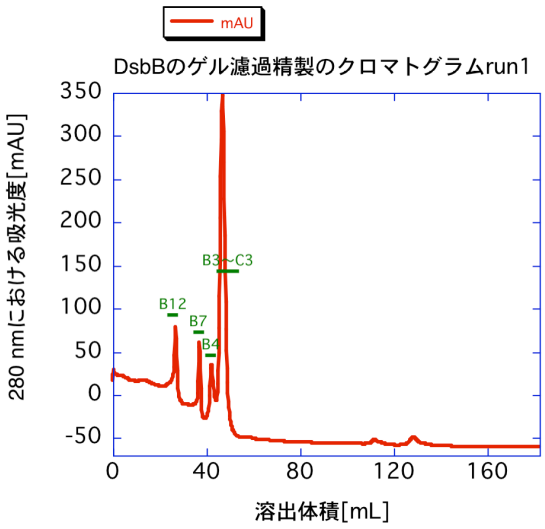


図 2-34：DsbB のゲル濾過カラム精製 run1 におけるクロマトグラム

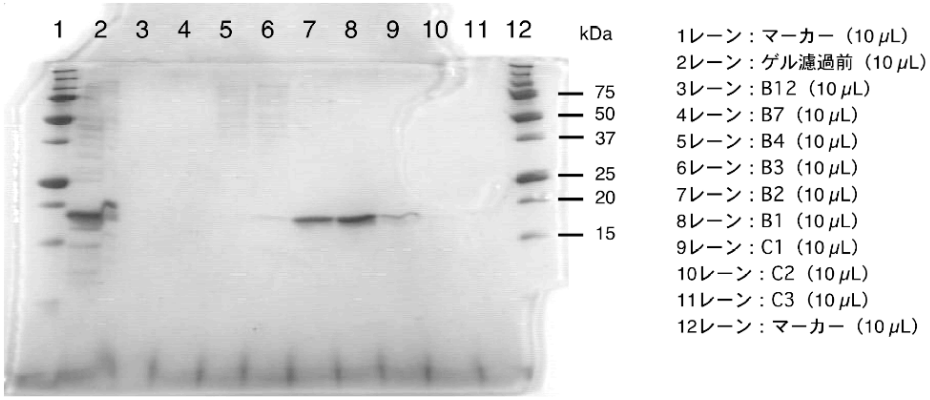


図 2-35：DsbB のゲル濾過カラム精製 run1 後の各フラクションの SDS-PAGE

アクリルアミド：15%、マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）

それぞれの B1, B2 画分を回収した。合計で約 10 mL となった。このサンプルについて、ゲル濾過バッファーで 2 倍希釈して吸光度測定を行った。吸光度測定の reference には、ゲル濾過バッファーを用いた。

なお、DsbB の分子量は 20,146 であり、モル吸光係数は ε_{280} = 47,870 $M^{-1}cm^{-1}$ として収量を算出した。吸光度測定結果を**表 2-9** に示した。

表 2-9：DsbB サンプルの吸光度測定結果（2 倍希釈）

	A260	A280	A320
吸光度	0.109	0.174	0.019

濃度は、(0.174－0.019)×2 / 47,870＝6.48 μM、収量は、20,146×6.48 / 10^6＝0.131 mg/mL となった。よって、ゲル濾過カラム精製後の DsbB（3 L の LB 培養スケール）について、濃度 6.5 μM（0.13 mg/mL）であり、収量は 1.3 mg であった。

(8)　Western Blotting による DsbB の確認

発現させた DsbB は His-tag を有しているので、抗 His-tag 抗体を用いて Western Blot を行うことにより、ゲル濾過精製後のバンドが目的の DsbB か確認を行った。

［実験操作］

回収したゲル濾過精製後の DsbB サンプルを 10 μL 採取し、2×SDS Sample Buffer 10 μL を加えて 37 ℃ で 8 分間インキュベートし、15% SDS-PAGE に流した。泳動後、スタッキングゲルを除き、サンプルを流したレーンを切った。ランニングゲルの大きさにあわせて PVDF(PolyVinylidene DiFluoride, ポリフッ化ビニリデン)メンブレン(BIO-RAD)とブロッティング用濾紙(BIO-RAD)を切り、メンブレンはメタノールに 10 秒、MilliQ 水に 5 分間浸した後、Transfer Buffer(25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol)に 10 分間浸した。転写装置 SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD) の台に、濾紙、メンブレン、ゲル、濾紙の順に重ね、Transfer Buffer で全体を濡らした後、メンブレン周辺の空気を除いた後、装置のふたをして、定電圧を 12 V に設定し、45 分間転写を行った。

マーカーがメンブレンに転写されているのを確認し、メンブレンを TBS Buffer

(20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl)で洗浄後、ブロッキング溶液(スキムミルク 2 g, TBS Buffer 40 mL)に浸し、4 °C で 2 時間静置した。

メンブレンを TTBS buffer (20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween)で 5 分間×3 回洗浄し、TBS buffer で洗ってから TBS Buffer で 1,000 倍希釈した一次抗体である Penta-His Antibody, BSA-free(QIAGEN)に 1 時間浸した。

その後、メンブレンを同様に、TTBS buffer で 5 分間×3 回洗浄し、TBS buffer で洗ってから、TBS buffer で 1,000 倍希釈した二次抗体である Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate(BIO-RAD)に 1 時間浸した。

その後、メンブレンを同様に、TTBS buffer で 5 分間×3 回洗浄し、TBS buffer で洗ってから、メンブレンを H_2O_2 を使用直前に 7.5 μL 加えた検出用バッファー (DAB(3,3'-diaminobenzidine) タブレット 1 錠, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5))に 3 分間浸し、バンドが現れてきたところで Milli-Q 中にメンブレンを移して反応を停止させた。

[結果と考察]

抗 His-tag 抗体を用いた、Western Blotting によって、ゲル濾過精製後の 18 kDa 付近のバンドは His-tag を有する目的タンパク質 DsbB であることが確認できた。

2-2-12　ビオチン化 DsbB の作製

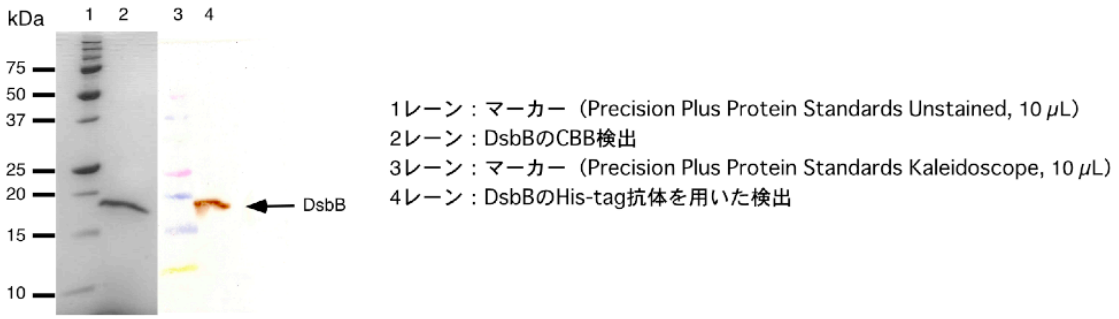


図 2-36 : 抗 His-tag 抗体を用いた、精製後 DsbB の Western Blotting による確認(アクリルアミド 15%)

QCM 基板上に膜タンパク質を固定化するための手法として、膜タンパク質 DsbB をビオチン化して、基板上に固定化した NeutrAvidin との相互作用を利用することにした。タンパク質のビオチン化には主に以下の**図 2-37** に示した手法がある。

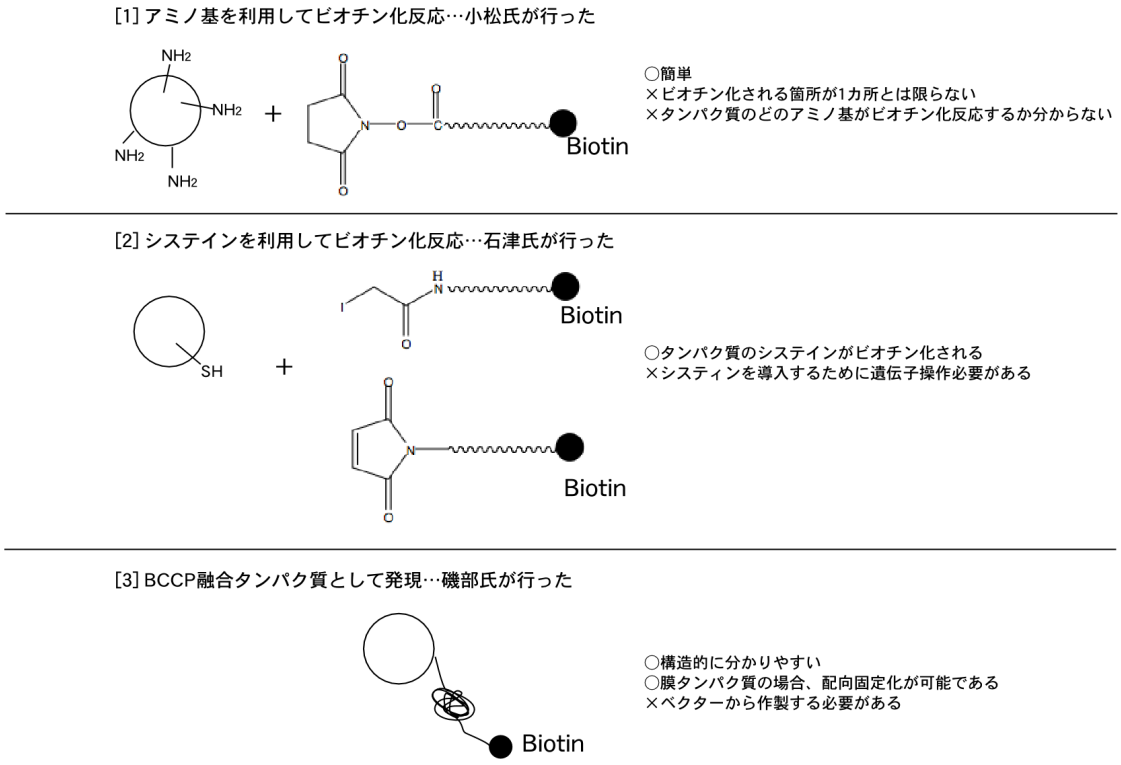


図 2-37：タンパク質をビオチン化するための当研究室で行われてきた 3 種類の手法 [6, 8, 9]

上記の手法のうち、システインを利用したビオチン化は、DsbB が-SH 基の反応に関わる膜タンパク質である以上、採用はできない。ここではタンパク質のアミノ基を利用したビオチン化を行った。

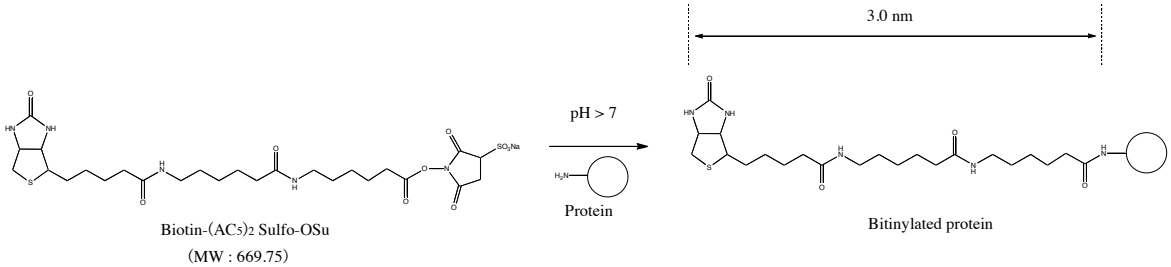


図 2-38：ビオチン化反応スキーム

［実験操作］

DsbB は 50 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH 6.0, 0.1% DDM, 300 mM NaCl に溶解している(6.5 μM)ので、ビオチン化反応の反応条件である pH 7.0 以上とするために、6.5 μM の DsbB サンプル 100 μL に対して、微量透析器透くん（MWCO : 14,000, 日本ジェネティクス社製）を用いて、50 mM Hepes-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM のバッファーに置換した。

Biotin$(AC_5)_2$Sulfo-OSu(1.6 mg/mL, dissolved in Milli-Q, dojindo 社製)を DsbB に対して 9 当量となるように 2.5 μL 添加した。25 °C で 15 分もしくは 1 時間反応させた。Tris buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% DDM)を 100 μL 添加し、反応を停止した。この後、微量透析器透くんを用いて、バッファー(50 mM Hepes, pH 7.5, 0.1% DDM, 100 mM NaCl)中で透析することで、未反応のビオチン化試薬を除去した。ビオチン化されたことを確認するために TOF-MS 分析を行った。ビオチン化反応後の溶液を Zip Tip C4(MILLIPORE)により脱塩精製した。溶出には 90%アセトニトリル、0.1% TFA 溶液を使用した。そのサンプルについて、MALDI-TOF/MS(島津, AXIMA-CFR)を使用して、ビオチン化の確認を行った。マトリックスはシナピン酸を使用した。混晶を作製する際は、シナピン酸をサンプルプレートにスポットしておき、乾かないうちにビオチン化 DsbB サンプルをピペットでよく混ぜた後、風乾させるようにした。測定は、Positive ion, Linear mode で行い、power は 150 に設定した。

［結果と考察］

MALDI-TOF/MS 分析の結果を**図 2-39** に示した。(a)と(b)を比較すると、ビオチンか反応 15 分後にのサンプルでは DsbB がビオチン化されたことに伴うピークが観察された。さらに(c)よりビオチン化反応時間を 60 分にしたサンプルでは、1 分

子中に数カ所ビオチン化されたことが分かった。1 カ所のみビオチン化させるには、反応時間 15 分で十分であり、ビオチン化反応 15 分後のサンプルを Biotin 化-DsbB とした。

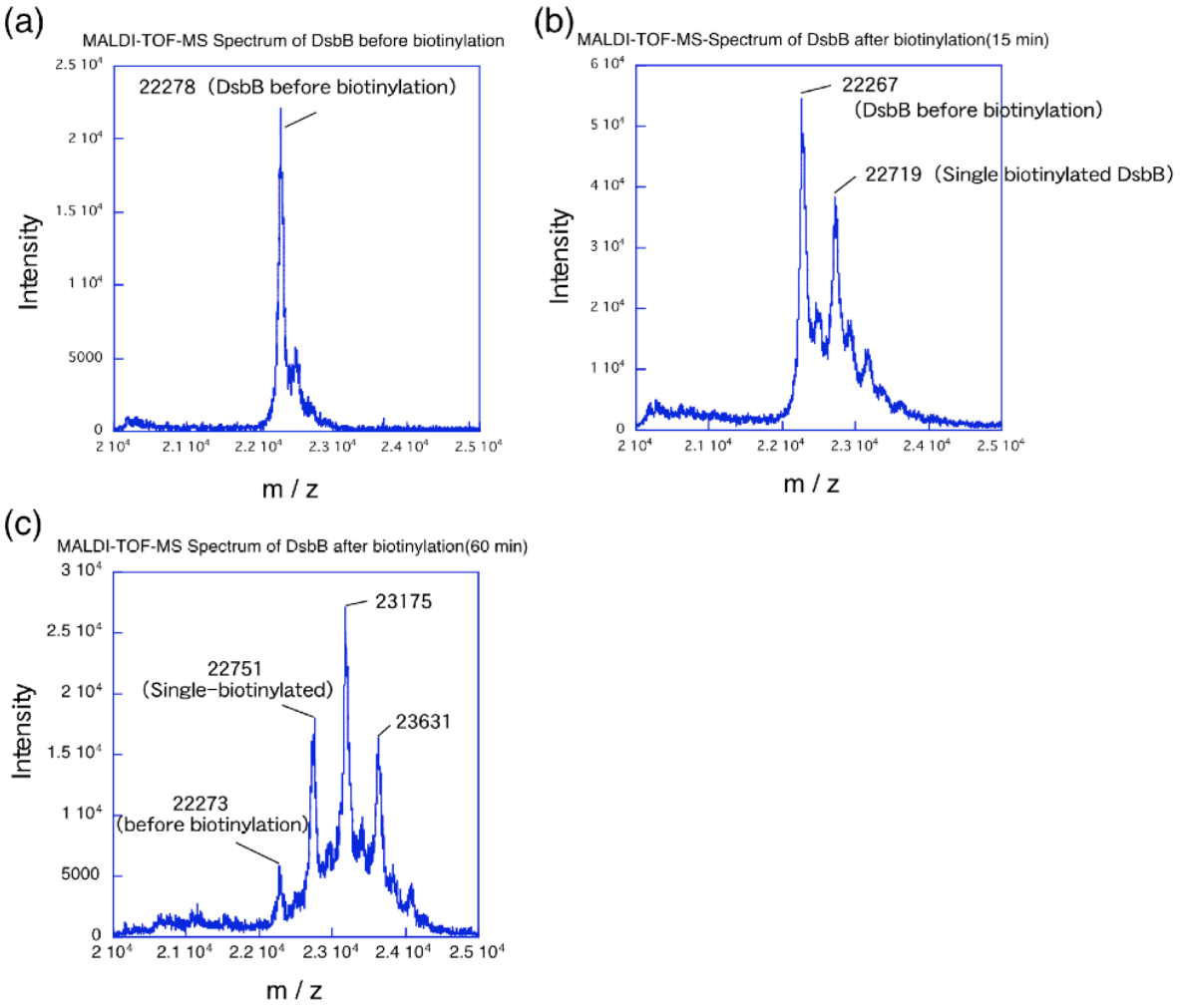


図 2-39：MALDI-TOF-MS による DsbB のビオチン化の確認

マトリックスにはシナピン酸を用いた。Positive ion, Linear モードで測定した。Power は 150 に設定した。

2-2-13　BCCP-DsbB の発現と精製

2-2-7 節で作製した BCCP-DsbB 発現用プラスミドを用いて、大腸菌 C41(DE3)に BCCP-DsbB を発現させた。

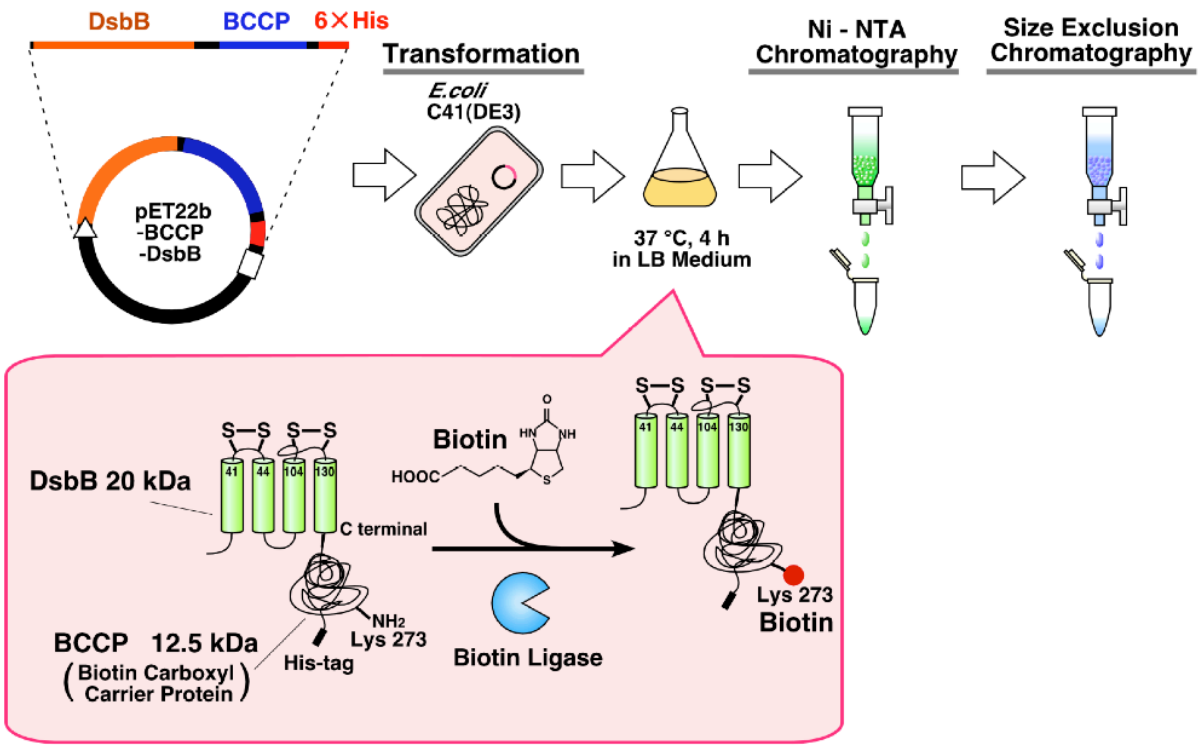


図 2-40：bio-BCCP-DsbB の発現と精製

(1)　Heat Shock 法での BCCP-DsbB 発現用 plasmid を用いた C41(DE3)の形質転換

［実験操作］

ディープフリーザーに保存されている C41（DE3）のコンピテントセル 1 本を氷上で溶解させ、97 ng 分の pET22b-BCCP-DsbB(C8A, C49V)のプラスミド DNA 溶液 1 μL を加えて、10 分間氷上でインキュベートした。その後、42 °C で 2 分間ヒートショックを行い、氷上で 2 分間インキュベートした。この大腸菌に、SOC 液体培地 900 μL を加えて、37 °C, 200 rpm, 1 時間振とうした。培養液を 20 °C、3000 rpm、3 分間遠心し、菌体を沈殿させた。上澄みを除き、残り 100 μL をよく懸濁した後、アンピシリン含有プレートに塗布し、37 °C 恒温器で一晩培養し、翌日コロニーを得た。

(2)　大腸菌 C41(DE3)を用いた BCCP-DsbB の大スケール発現誘導

膜タンパク質 DsbB に BCCP タグが付加することで、発現および精製の最適条件は変わると思われるが、**2-2-11 節**で検討した培養条件で 3.3 L の LB 培地を用いて、大量培養を行った。

［実験操作］

1.1 L の LB 液体培地を入れた 2 L 三角フラスコ 3 本それぞれに、アンピシリンを終濃度 100 μg/mL となるように添加した。また、1 mM ビオチン水溶液を各フラスコに 2.2 mL 添加した（終濃度 2 μM）。前日から培養していた Full growth の C41（DE3）pET22b-BCCP-DsbB（C8A, C49V）培養液 30 mL を各フラスコに添加し、大型シェーカーで 200 rpm、37 °C で振とう培養した。約 2 時間後、OD_{600} が 0.6 付近となったところで、0.1 M IPTG を終濃度 15 μM となるように加えた後、37 °C, 200 rpm で 4 時間培養した。4 時間経過したところで、培養液を日立の himac 遠心機を用いて 3000 rpm、4 °C、30 分間遠心した。上清をデカントで除いた後、Cold Buffer A（50 mM Tris-HCl（pH 8.0）、300 mM NaCl、1 mM PMSF）を約 90 mL 使用して、菌体ペレットを洗い込みしながら、50 mL 遠沈管に回収した。

(3)　破菌および膜画分の界面活性剤による可溶化

BCCP-DsbB を大量発現した菌体を破菌するにあたり、超音波破砕と比較して穏やかな破砕法であるフレンチプレスを使用した。

［実験操作］

菌体懸濁液をフレンチプレス（OHTAKE 社製）で破菌した。この破菌液を 35 mL ポリカーボネートチューブ 4 本に回収し、10,000×g, 4 °C において 30 分間遠心することで未破菌残渣を除いた。上清を超遠心用アツチューブに回収した。100,000

×g、4 °C で 60 分間超遠心することで膜画分をペレットとして回収した。赤茶色のペレットが残った（膜画分は呼吸鎖酵素群を多く含んでいるため、このような色を呈する）。そのペレットを薬さじで回収し、ダウンス型のガラスホモジナイザーに移した。ペレットをホモジナイザーに移すときは、DDM（－）可溶化用バッファー（50 mM リン酸ナトリウム（pH 8.0）、300 mM NaCl）を約 12 mL 用いながら、洗い込むようにした。ホモジナイザーを使って、手動でペレットを 7 回丁寧にすりつぶした。すりつぶした溶液をシリンジに移し、シリンジ針（unimed 製の 0.70×50 mm 針）に通した。肌色の乳液状となったサンプルに 10% DDM 1.2 mL をスターラーで撹拌しながらゆっくりと添加した（添加後の DDM の終濃度 1%）。すると溶液はやや透明になった。そのまま 30 分間撹拌を続けた。その後、100,000×g で 30 分間遠心することで可溶化されていない画分を除いた。この上清に対し、Ni-NTA カラム精製を行った。

(4)　BCCP-DsbB の His-tag を利用した Ni-NTA カラム精製

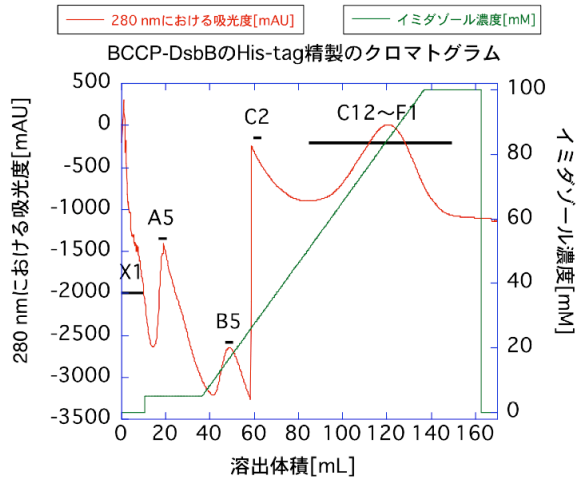
［実験操作］

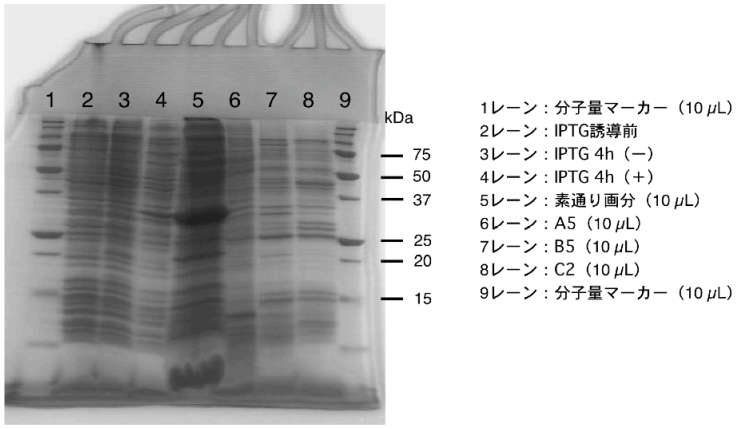
液体クロマトグラフィー装置である ÄKTA purifier（GE 製）を使用し、カラムは His-tag 精製用カラム HisTrap HP 5 mL を使用した。HisTrap HP 5 mL カラムは、平衡化バッファー（50 mM リン酸ナトリウム（pH 8.0）、300 mM NaCl、0.1% DDM）で予め置換しておいた。また、DDM で可溶化した BCCP-DsbB をカラムにアプライする際は、シリンジを用いて手動でサンプルループにアプライした。以下のような溶出メソッドで、BCCP-DsbB の Ni-NTA カラム精製を行った。

Column：His Trap HP 5 mL（HiTrap Chelating HP 5 mL）
A buffer：50 mM sodium phosphate (pH6.0), 300 mM NaCl, 0.1% DDM

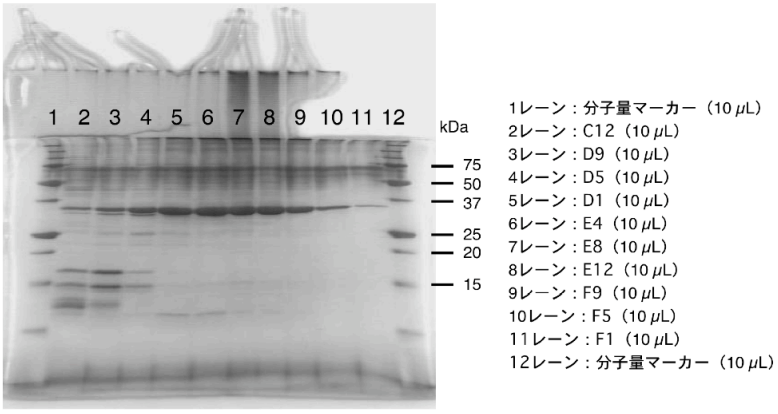
B buffer：50 mM sodium phosphate (pH6.0), 300 mM NaCl, 0.1%DDM, 500 mM imidazole
Flow rate：3.0 mL/min　　Fraction Size：2.0 mL　　Wash：2 CV
Elution：5% B：5 CV　　5→100% B(linear gradient)：20 CV　　100% B：5 CV（＊CV = Column Volume）

［結果と考察］





アクリルアミド：15%ゲル, 分子量マーカー: Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）



アクリルアミド：15%ゲル, 分子量マーカー: Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）

図 2-41：DsbB の His-tag 精製におけるクロマトグラムと還元 SDS-PAGE＊

膜タンパク質であり加熱に伴う凝集を防ぐため、37 °C でサンプル調製した。

Ni-NTA カラム精製後のクロマトグラムおよび SDS-PAGE の結果より、C12～F1 画分に BCCP-DsbB と考えられるバンドが見られた。SDS-PAGE の結果から判断し、D3～F5 の計 23 画分を回収した。回収量は、計 46 mL 程度となった。DsbB を精製したときと同様に、BCCP-DsbB の精製においても His-tag カラムに続いて、ゲル濾過カラム精製することにした。

(5)　BCCP-DsbB のゲル濾過カラム精製

［実験操作］

His-tag 精製後の BCCP-DsbB サンプル計 46 mL 程度をアミコンウルトラ-15, MWCO : 30,000 (MILLIPORE)を用いて、約 5 倍濃縮した。濃縮した BCCP-DsbB サンプルを 8 回に分けて、ゲル濾過カラム精製を行った。

ゲル濾過カラムは予め Milli-Q 水で 2 Column Volume 分、ゲル濾過バッファーで 2 CV 分洗浄しておいた。ゲル濾過カラムがつまるのを防止するため、ゲル濾過カラムに供するサンプルは、不溶物を沈殿除去するために 20,000×g で 10 分間遠心し、上清を 1 mL サンプルループを用いて、カラムにアプライした（20,000×g の遠心に伴う沈殿などは存在しなかった）。ÄKTA purifier（GE 製）を使用して、溶出メソッドは以下の通り行った。溶出プログラムは以下の通り。

Column：HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade
Buffer：50 mM sodium phosphate(pH6.0), 300 mM NaCl, 0.1% n-dodecyl-β-D-maltoside
Empty loop with : 1.2 mL
Flow rate：0.50 mL/min
Fraction Size：2.0 mL
Length of Elution：1.2 CV(run1, 3, 4, 5, 6, 7, 8), 2.0 CV(run2),

［結果と考察］

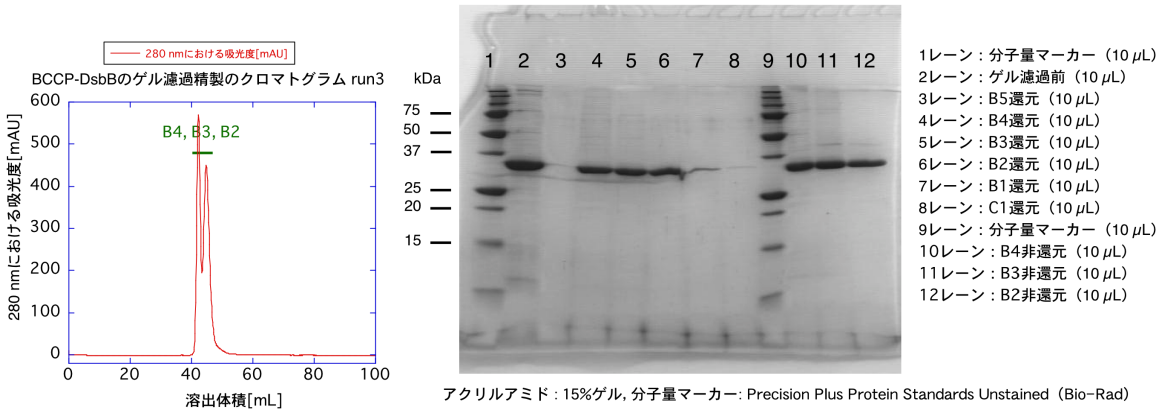


図 2-42：BCCP-DsbB のゲル濾過精製のクロマトグラムと還元・非還元 SDS-PAGE

膜タンパク質であり加熱に伴う凝集を防ぐため、37 °C でサンプル調製した。

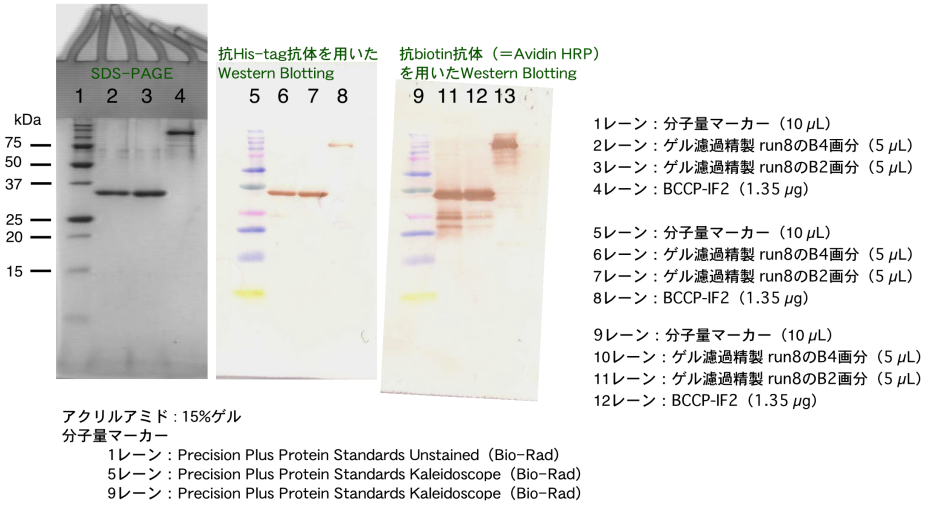


図 2-43：抗 His-tag 抗体と抗ビオチン抗体を用いた、BCCP-DsbB の Western Blotting

SDS-PAGE については還元 PAGE を行った。抗ビオチン抗体（＝HRP-Avidin, ZYMED 社製）を用いた Western Blotting では、抗体の希釈率は 5,000 倍で行った。

ゲル濾過カラム後のクロマトグラムおよび SDS-PAGE の結果より、不純物のバンドが除かれて、DsbB の純度が向上したことが分かる。しかしながら、溶出体積 40～45 mL 付近に 2 つのピークが存在する。SDS-PAGE では、どちらも同一のバンドを示しているように見える。今回クロマトグラムに示したのは、280 nm のチャートのみであるが、260 nm, 230 nm のチャートで比べても両者で違いは見られない。

B4 画分に溶出してきたのは、分子間で S-S 結合を形成した 2 量体である可能性もあるため、還元剤であるβ-メルカプトエタノール非含有の sample buffer を用いた非還元 PAGE を行った(**図 2-43**)。しかしながら、やはり B4 画分と B2 画分で違いは見られなかった。さらに、Western Blotting により、BCCP-DsbB に対して 2 種類の抗体（抗ビオチン抗体、抗 His-tag 抗体）で検出しても、B4 画分と B2 画分には違いが見られなかった。また **2-4-5 節**で述べるが、QCM で活性を調べても、B4 画分、B2 画分の BCCP-DsbB どちらも活性を有していた。よって、B4 画分に溶出したのは、S-S 結合以外の相互作用で分子間結合を形成した BCCP-DsbB と考えられる。そのため本実験では、B4 画分と B2 画分の BCCP-DsbB を区別せずに使用した。

(6)　BCCP-DsbB の紫外吸光法による定量

ゲル濾過精製の SDS-PAGE の結果より判断して、B4, B3, B2 画分を別々に回収した。このサンプルについて、アミコンウルトラ-15 を用いて約 12 倍に濃縮した後、吸光度測定を行った。吸光度測定の reference には、ゲル濾過バッファーを用いた。

なお、BCCP-DsbB の分子量は 35,052 である。

また、光路長 1 cm のセルで 1 M のタンパク質溶液を測定したときの吸光度であるモル吸光係数 ε は、

ε (1 M, 280 nm, 1cm) = Tyr の残基数×1390 + Trp の残基数×5800

$$= 7\times1390 + 7\times5800 = 50{,}330\ M^{-1}cm^{-1}$$

吸光度測定結果を**表 2-10** に示した。

よって、濃度および収量を計算すると、

B4 画分については、(0.278—0.033)×10 / 50,330 = 48.7 μM、すなわち 35,052×48.7 / 10^6 = 1.71 mg/mL である。

表 2-10：B4, B3, B2 画分の BCCP-DsbB の吸光度測定結果（10 倍希釈値）

	A_{260}	A_{280}	A_{320}	濃度 / μM	収量 / mg
吸光度(B4 画分)	0.18	0.28	0.03	49	2.0
吸光度(B3 画分)	0.34	0.46	0.10	73	3.0
吸光度(B2 画分)	0.23	0.36	0.04	63	3.3

1.17 mL 回収したので、収量は 2.0 mg であった。

B3 画分については、(0.463－0.098)×10 / 50,330 = 72.5 μM、すなわち 35,052×72.5 / 10^6 = 2.54 mg/mL である。

1.2 mL 回収したので、収量は 3.0 mg であった。

B2 画分については、(0.360－0.041)×10 / 50,330 = 63.4 μM、すなわち 35,052×63.4 / 10^6 = 2.22 mg/mL である。

1.5 mL 回収したので、収量は 3.3 mg であった。

各画分について、90～100 μL ずつチューブに分注し、液体窒素で瞬間凍結し、－80 °C ディープフリーザーに保存した。

以上まとめると、ゲル濾過カラム精製後の BCCP-DsbB（3.3 L の LB 培養スケール）について、B4, B3, B2 画分全て合わせると、収量は 8.3 mg であった（BCCP の付加していない DsbB の場合、3 L 培養スケールで収量は 1.3 mg であった）。BCCP-DsbB は、膜タンパク質としての発現量は大変良いと言える。

タンパク質精製においては、目的タンパク質が可溶性として得られない場合、別種の可溶性タンパク質との融合体として発現させることで、可溶性画分に移行させる手法も存在する。MBP、GST、チオレドキシン、Nus タグなどが代表例であるが、今回の BCCP も DsbB と融合することで可溶性画分に移行させるタグとして機能したのかもしれない。

2-3　SDS-PAGE を用いた DsbB または BCCP-DsbB と DsbA の反応確認

DsbB は DsbA(C33A)とは結合し、DsbA(C30A)とは結合しないことが分かっている [1]。この反応の際に留意することは、DsbA を還元状態（-SH）にして、DsbB を酸化状態（S-S）にすることである。DsbB は通常酸化状態であるので、こちらの条件は解決済みであるが、DsbA を還元状態にするためには、還元反応を行う必要がある。論文では、図 2-44 のように DTT を用いた還元反応が主流であるが [1,4,5,7]、QCM に Dsb システムを適用する際、DTT は QCM の金基板に結合すると考えられるので、代わりに TCEP が使用できるか検討することにした。TCEP は DTT よりも還元能力が高く、さらに広い pH 範囲で還元力が維持されることが分かっている。

反応スキームとしては、図 2-45 のように DsbA を TCEP で還元→脱塩カラムで TCEP を除去→DsbB と反応→TCA 添加により変性、反応停止→TCA 沈殿→ヨードアセトアミド添加により、残存している-SH 基をアルキル化し、分子内、分子間でのジスルフィド結合の形成を防ぐ→非還元 SDS-PAGE である。

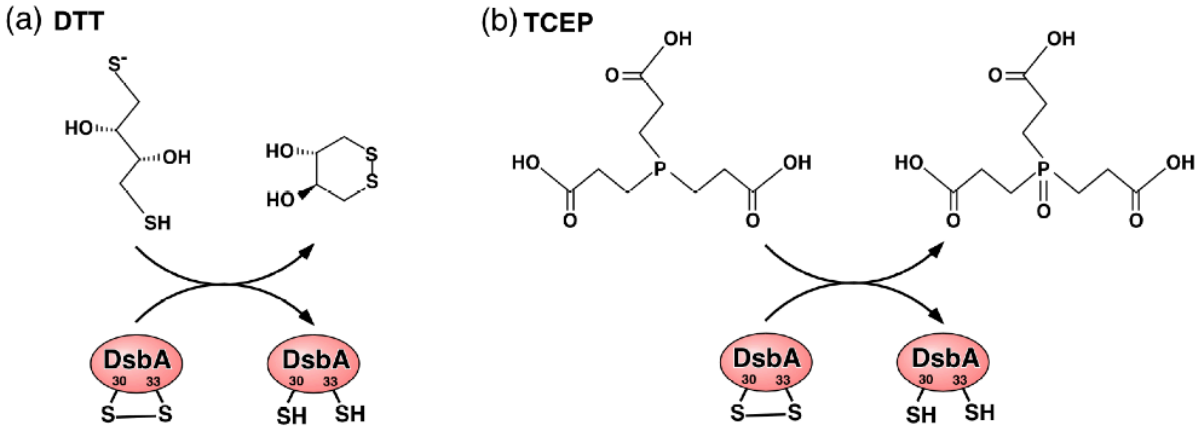


図 2-44：DTT「dithiothreitol」と TCEP「Tris(2-carboxyethyl)phosphine」による DsbA の還元

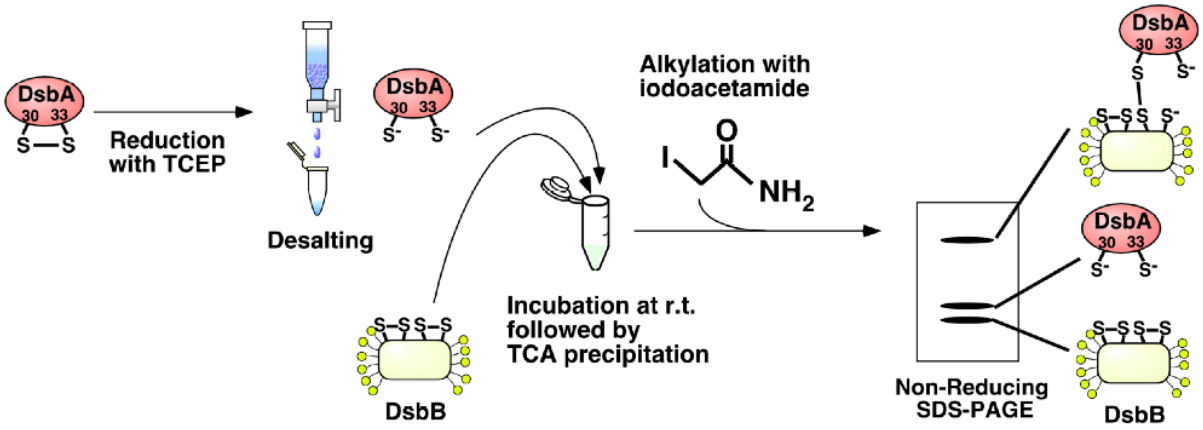


図 2-45：SDS-PAGE を利用した DsbA と DsbB の反応スキーム

2-3-1　DsbB と DsbA の反応確認

［実験操作］

90 μM の DsbA 100 μL（10 mM MOPS buffer, pH 7.0 に溶解させてある）に 35 mM TCEP (dissolved in 10 mM MOPS buffer, pH7.0) 3 μL を加えた。室温で 20 分間以上反応させた(DsbA：TCEP≒1：12)。DsbA サンプルのうち 12 μL を採取し、Zeba Micro Desalt Spin Columns(PIERCE)で TCEP を除いた。具体的には、カラムのボトム蓋を外し、キャップをゆるめた。1.5 mL プラスチックチューブを底にセットした。保存液を除去するために、1,000×g で 1 分間遠心した。新しいプラスチックチューブにカラムをセットし、キャップを外し、12 μL のサンプルをカラム担体の中央にアプライした。サンプルが担体に吸収されたのを確認後、担体の中央に 10 mM MOPS buffer(pH 7.0)を 3 μL 添加した。1,000×g で 2 分間遠心し、脱塩された DsbA を得た。使用後、カラムは Milli-Q 水 50 μL を添加し、1,000×g で 1 分間遠心することを 3 回繰り返し、洗浄した。

脱塩後の 90 μM の DsbA 10 μL と約 6.5 μM の DsbB 30 μL を 37 °C で反応させた(反応時間は 1 分, 3 分, 5 分の 3 つの場合を行った) (DsbA：DsbB≒22.5 μM：4.9 μM)。

50%トリクロロ酢酸を 8 μL 加えることで、反応を停止させた。4 °C, 16,000×g で 10 分遠心した。その後、上清を除去し、沈殿物に対し、200 μL のアセトンを添加し、4 °C, 16,000×g で 2 分間遠心した。上清を除去後、このアセトン沈殿を再度繰り返した。ペレットに対し(このペレットは視覚可能である)、Milli-Q 水を 7 μL と 100 mM ヨードアセトアミド溶液 (dissolved in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)を 3 μL 加え、ボルテックス、スピンダウンした。30 分暗所で反応させた。その後、非還元 PAGE 用のサンプルバッファー(β-メルカプトエタノール非含有)を 10 μL 加えた。定電流 20 mA で非還元 SDS-PAGE を行った。

［結果と考察］

図 2-46 の SDS-PAGE の結果より、DsbA(C33A)と DsbB の反応レーンにおいて 35 kDa 付近にバンドが観察された。膜タンパク質は疎水的であるため SDS が多く結合し、泳動度は水溶性タンパク質に比べ大きくなることが知られているので、35 kDa 付近のバンドは DsbA(C33A)と DsbB との結合に由来するものと考えられる。また、DsbA(C30A)と DsbB との結合はほぼ確認されなかった。このことから、DsbB は活性を維持していることが分かった。また、DsbA(C33A)については MALDI-TOF MS 分析の結果、変異が入っていることが 6 種類の DsbA のうち、唯一確認できなかったが、今回の実験結果より、変異が導入されていることが確認された。ところで、DsbA(C33A)以外の 5 種類の DsbA についても DsbB との複合体由来のバンドが小さいながらも観察されている。さらに、興味深いのは、DsbA(C33A)だけが分子間で二量体を形成していることである。DsbA(native), DsbA(P151S), DsbA(P151N), DsbA(P151H)においては二量体が形成されていないのは分子内に 2 種類の-SH(30 番目と 33 番目)を有しているため、分子間で反応が起こるよりも分子内で S-S 結合が形成されたと考えれば、納得できる。しかしながら、DsbA(C30A)については、

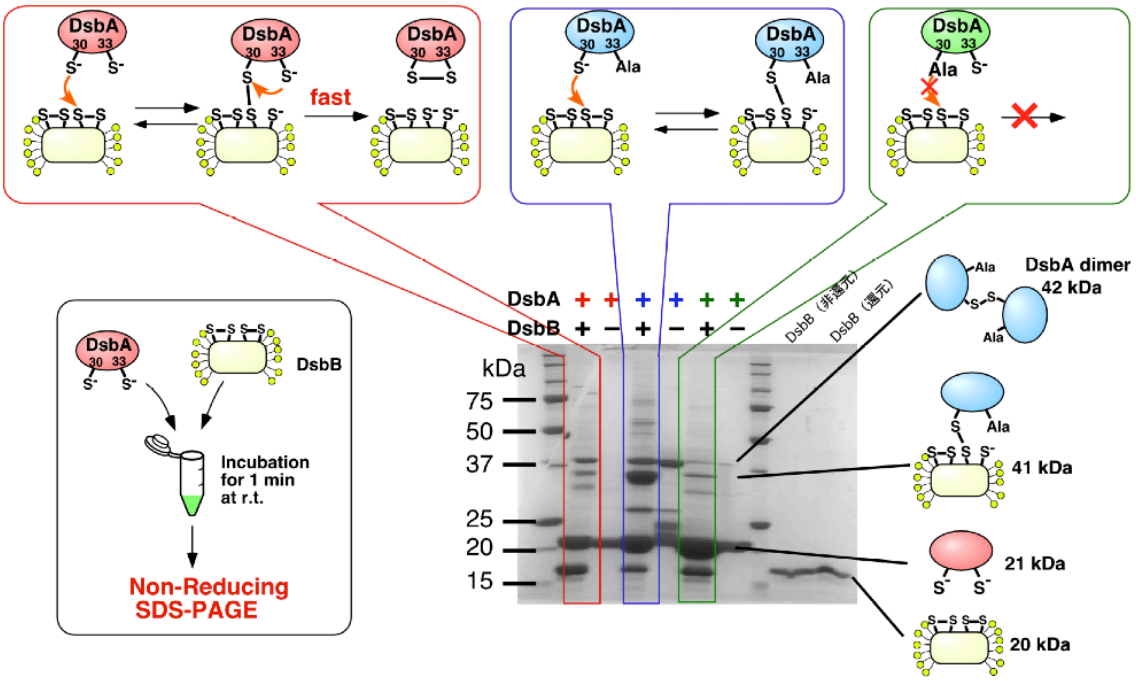


図 2-46：DsbB と各 DsbA（native, C33A, C30A）の反応の SDS-PAGE での評価

反応時間 5 分、アクリルアミド 12%、マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）

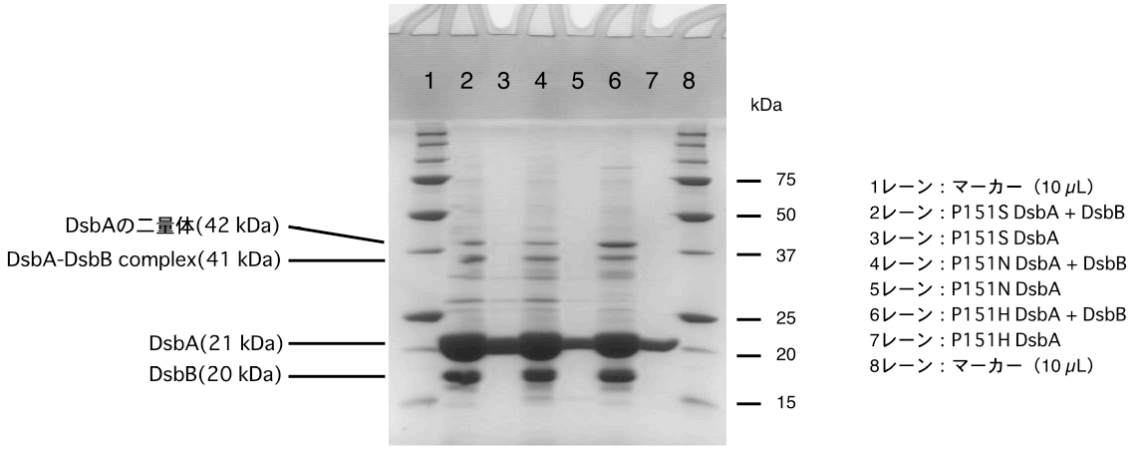


図 2-47：DsbB と各 DsbA（P151S, P151N, P151H）との反応の SDS-PAGE における評価

反応時間 5 分、アクリルアミド 12%、マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）

分子内には－SH 基が一つしか有していないのに、C33A の場合のように二量体を形成しなかった。おそらく、DsbA(C33A)の場合 30 番目の－SH 基は分子表面に存在するのに対し、DsbA(C30A)の場合は 33 番目の－SH 基は分子内部に存在し、反

応しやすかったからと考えられる。これは、DsbA の Cys30 が DsbB の Cys104 を求核攻撃することを考えれば、Cys30 が分子表面に存在することは理にかなっている。

2-3-2　BCCP-DsbB と DsbA との反応確認

前項で、DsbB と DsbA の反応性を SDS-PAGE で確認した。同様に、BCCP タグの付いた BCCP-DsbB についても、SDS-PAGE を用いて、DsbA との反応性を確認した。結果を図 2-48，図 2-49 に示した。DsbA(C33A)と BCCP-DsbB の複合体(56 kDa)が観察された。また、DsbA(native)および、DsbA(Proline mutant)と BCCP-DsbB もバンドとしては僅かだが、複合体形成(56 kDa)されていることが分かる。しかしながら、各種 DsbA について、二量体由来のバンド(42 kDa)も観察されている。さらに、DsbA(C30A)は BCCP-DsbB と複合体を形成しないと予想されるが、今回の結果では、複合体を形成していることが分かる。このことから、SDS-PAGE を用いて DsbA と DsbB の反応観察をした場合、artifact などのバンドの影響を多く受けてしまい、定量的な議論をするのは難しいと考えられる。

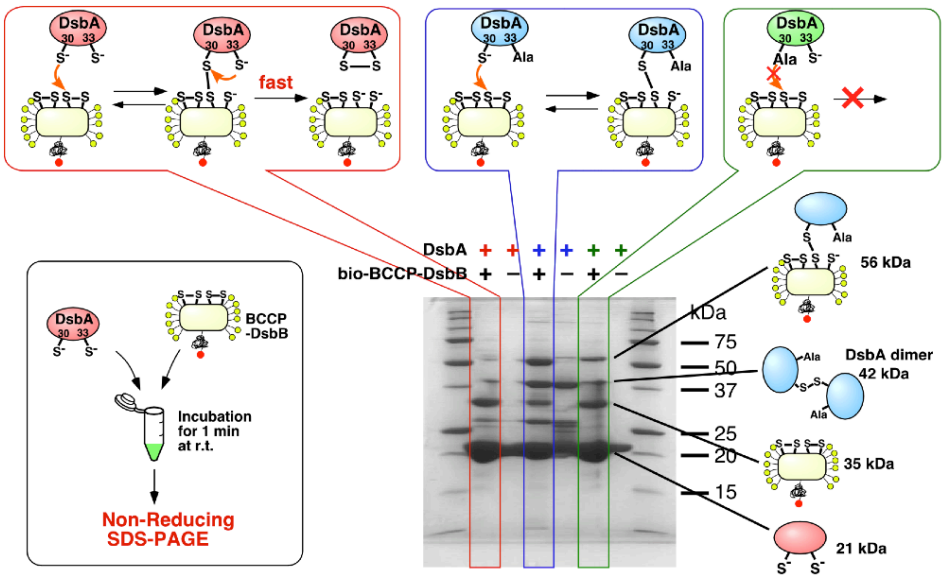


図 2-48：BCCP-DsbB と DsbA の反応の SDS-PAGE による評価

反応時間 1 分、アクリルアミド 12%、マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）

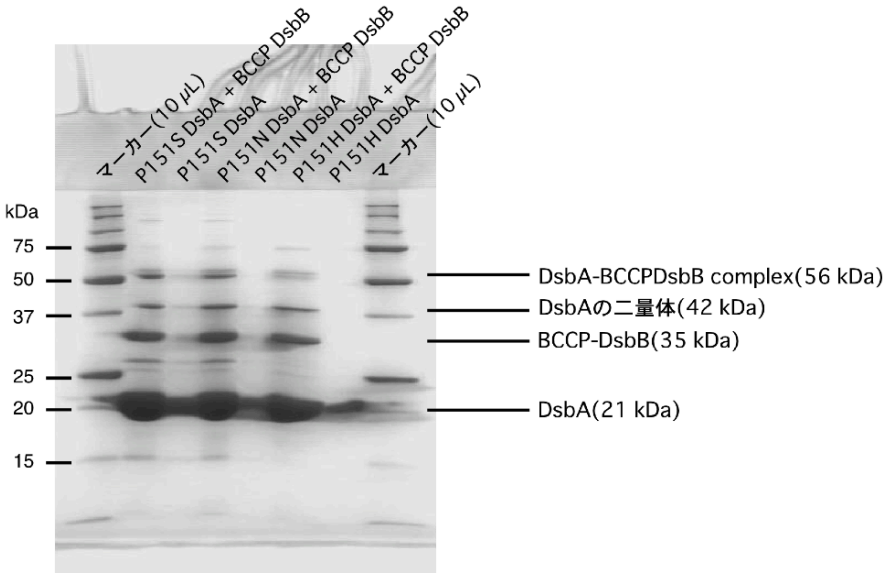


図 2-49：BCCP-DsbB と DsbA(P151S), DsbA(P151N), DsbA(P151H)との反応の SDS-PAGE における評価（反応時間 1 分）

反応時間 1 分、アクリルアミド 12%、マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）

2-4　QCM 金基板上への DsbB の固定化

2-4-1　さまざまな固定化方法

膜タンパク質 DsbB を水晶発振子の金基板上に固定化するために、**図 2-50** に示す 4 つの手法について検討した。

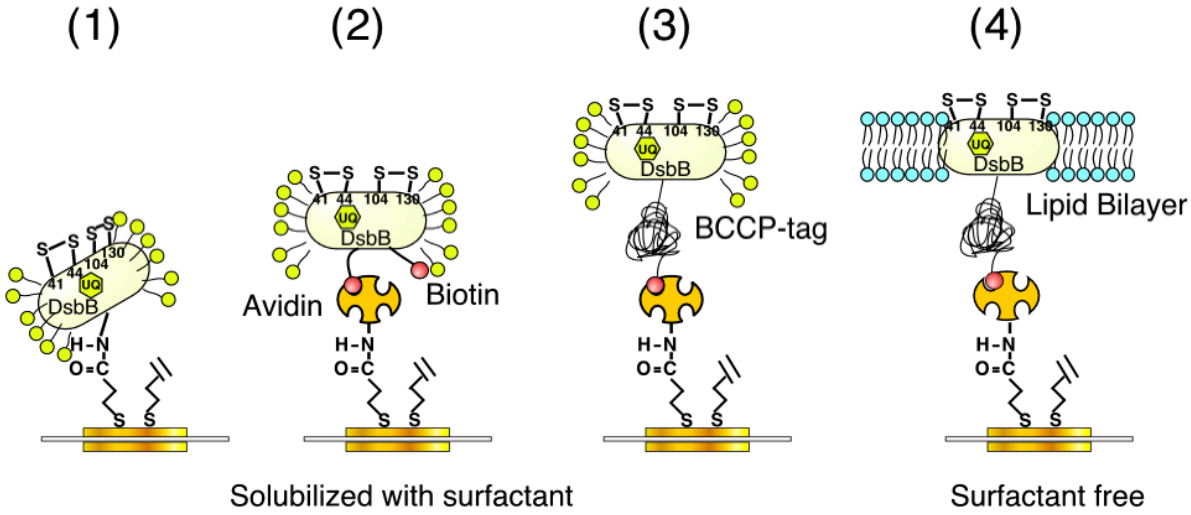


図 2-50：本研究で検討した膜タンパク質の固定化方法

(1)アミンカップリングによる方法、(2)膜タンパク質をビオチン化する方法、(3)BCCP タグ融合タンパク質として発現する方法、(4)BCCP タグ融合タンパク質をアンカーとして脂質膜置換する方法

最も簡便な方法として、(1)アミンカップリング法による固定化がある。しかし、この方法は、固定化された分子の自由度が低い、配向を制御することができないといった欠点もある。2 つ目の方法として、(2)膜タンパク質 DsbB のアミノ基を利用してビオチン基を導入し、基板上に固定化したアビジンに固定化する手法が考えられる。この場合、DsbB が有するどのリシン由来のアミノ基がビオチン化されるか分からず、ビオチン化される箇所が一箇所ではない可能性もある。3 つ目の方法として、(3)界面活性剤に可溶化した膜タンパク質 DsbB の C 末端側に BCCP タグを利用してビオチンを導入し、基板上のアビジンに固定化する方法が考えられる。こ

の場合、界面活性剤で可溶化した膜タンパク質の安定性が問題である。4 つ目の方法として、(4)膜タンパク質 DsbB を BCCP 融合タンパク質として作製し、基板に固定化することに加えて、固定化した膜タンパク質 DsbB をアンカーとして、脂質膜に置換する手法が考えられる。膜タンパク質を扱う上で膜貫通部分の疎水性残基の露出に伴う凝集を避けるため界面活性剤の使用は必要不可欠であるが、DsbB の周りを脂質膜に置き換えれば、界面活性剤は除去することが可能であり、より生体内に近い条件での Dsb 因子の反応観察が可能となる。

以下に、上記 4 つの固定化方法について実験を行い、Dsb 因子の反応を解析するための実験系を検討したことを述べる。

2-4-2　アミンカップリング法による固定化

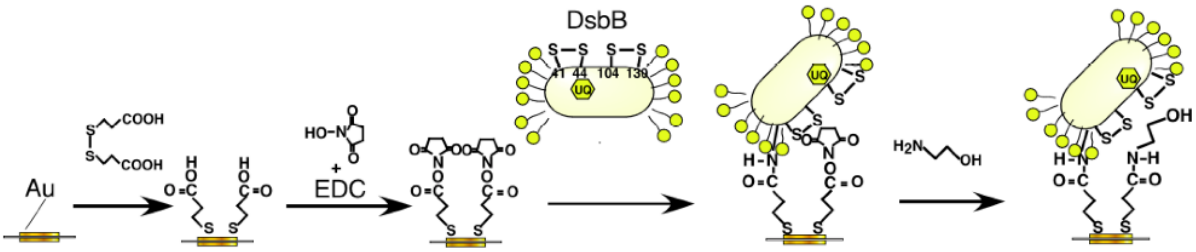


図 2-51 : QCM 金基板にアミンカップリング法で DsbB を固定化するためのスキーム

［実験操作］

水晶発振子のセルに 1% SDS 溶液を 200 μL ずつ入れて、金電極表面を綿棒により軽く擦り、Milli-Q 水で洗浄した。電極上に水が残っていないことを確認した後、金電極表面に piranha 溶液 (30% H_2O_2 : H_2SO_4 = 1 : 3) を 2 μL のせて 5 分間静置した後、Milli-Q 水で洗浄することを 3 回繰り返した。ピランハ洗浄後は基板を気相に触れさせないように注意しながら、4 mM ジチオジプロピオン酸水溶液を 250 μL

のせて 30 分以上静置した。Milli-Q 水で洗浄後、100 mg/mL N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）水溶液と 100 mg/mL 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）水溶液の等量混合液を 50 μL のせて 20 分間静置した。Milli-Q 水で洗浄後、50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl の buffer をセルに 500 μL ずつ満たした。セルを QCM 装置にセットし、発振させて振動数が安定したところで、終濃度 650 nM となるように DsbB 溶液を 5 μL インジェクトした。セルを装置から取り外し、10 mM エタノールアミンを含むバッファー溶液 (50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl) 200 μL でセル内を置換し、20 分間静置した。DsbB 固定化後のセルに対し、0.1%DDM 含有 buffer (50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM)で置換し、装置にセットした。還元剤 TCEP で室温 30 分以上処理（DsbA : TCEP=1:12）後、Zeba Desalt Spin Columns（Pierce 社製）で脱塩処理した DsbA を終濃度 900 nM となるようにインジェクトし、DsbB との反応を観察した。

その後、TCEP をセル内に終濃度 350 μM となるように添加した。

(＊)還元剤 TCEP は水に溶解させた状態では pH 約 2.5 を示す。そこで、タンパク質を変性させることを防ぐため、TCEP は NaOH で中和処理した。

［結果と考察］

活性エステルを提示した金基板に対し、DsbB の添加したところ振動数減少が観察された(**図 2-52**)。QCM 基板上に DsbB をアミンカップリング法で固定化できたと考えられる。続いて DsbB をアミンカップリングで固定化した基板に DsbA(C33A), DsbA(C30A), DsbA(native)の 3 種類の DsbA をそれぞれ添加した。3 種類の DsbA のうち、DsbA(C33A)を添加したときは、振動数減少が観察された(**図 2-52**)。また、DsbA(C30A)を添加した場合、振動数は変化せず、反応は見られなかった。結合が

観察されると考えられる DsbA(C33A)の結合が見られたことから、DsbA の Cys30 に由来する DsbB との特異的な結合と考えられる。一方、反応しないと思われる DsbA(C30A)では振動数変化が見られなかったことから、非特異的な結合がほとんどないことが分かった。また、DsbA(native)を添加した場合は振動数が変化せず、反応は見られなかった。DsbA(native)の結合を観察するには、活性のある DsbB の固定化量を増やす必要がある。

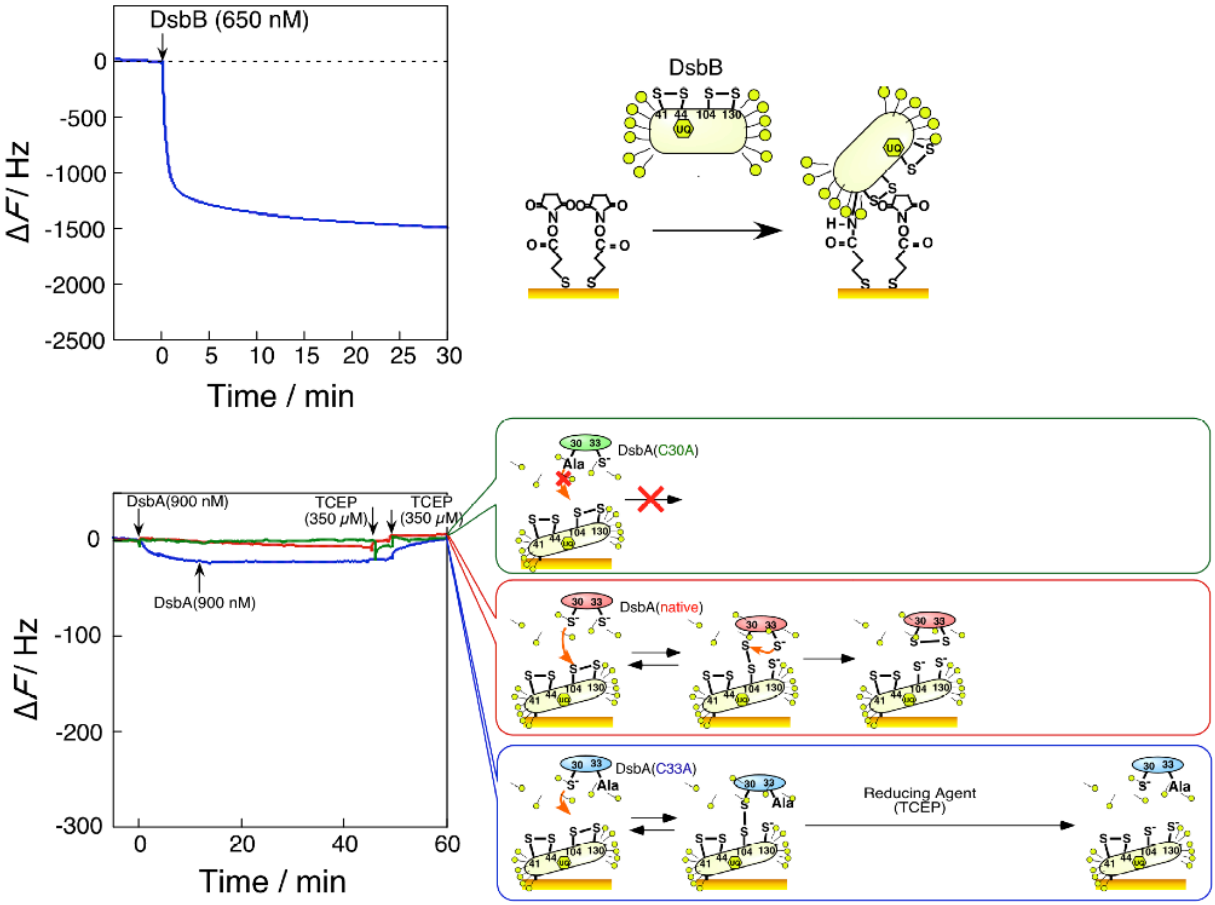


図 2-52：膜タンパク質 DsbB をアミンカップリング法で固定化したときの DsbA との反応チャート

50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM at 25 °C.

DsbA と DsbB の反応チャートの横軸が分単位であることに注意。

観察された DsbA(C33A)と DsbB との反応が、Cys30(DsbA)と DsbB のシステイン残基間で形成された S-S 結合であることを確認するために還元剤 TCEP を添加した。

その結果、DsbB との結合が観察された DsbA(C33A)を添加したセルだけ振動数の上昇が観察された(図 2-52)。このことから DsbA(C33A)と DsbB の間の結合は、ジスルフィド結合由来の特異結合であることが分かった。しかし、基板上に DsbB を約 1500 Hz 固定化したことを考えると、DsbA は約 1500 Hz 程度結合すると予想される。今回の DsbA(C33A)と DsbB の結合に伴う振動数変化は 20 Hz 前後であり、この値は DsbB が DDM とのミセルとなって基板に結合していることを考慮しても理論値よりも小さい。このことから、アミンカップリング法で固定化されたほとんどの DsbB は活性を有していないと考えられる。

2-4-3　DsbB 直接ビオチン化によるアビジンへの固定化

［実験操作］

QCM セル金基板の NHS と EDC 処理までは、2-4-2 節と同様に行った。Milli-Q 水で洗浄後、50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl の buffer を各セルに 500 μL ずつ満たし発振させて振動数が安定したところで、10 mg/mL NAv 水溶液を 1 μL インジェクトした。セルを装置から取り外し、10 mM エタノールアミン(dissolved in 50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl)を各セルに 200 μL ずつ添加し、20 分間静置した。

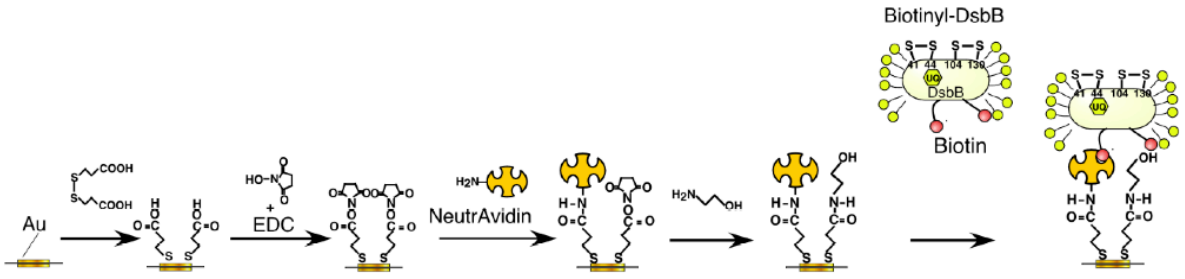


図 2-53：QCM 金基板にビオチン化 DsbB を固定化するためのスキーム

NeutrAvidin 固定化後のセルに対し、0.1%DDM 含有 buffer（50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM）で置換し、装置にセットした。装置が安定化したところで、biotinyl-DsbB 5 μL をインジェクトし、結合を観察した。

biotinyl-DsbB 固定化後のセルに対し、0.1%DDM 含有 buffer（50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM）で置換し、装置にセットした。装置が安定化したところで、還元剤 TCEP 処理（DsbA : TCEP=1:12）後、Zeba micro desalt spin column（Pierce 社製）で脱塩処理した DsbA をインジェクトし、DsbB との反応を観察した。

その後、還元剤 TCEP を QCM セル内に添加した。

［結果と考察］

NeutrAvidin 固定化基板に Biotin 化-DsbB を添加すると、Avidin－Biotin 結合によると思われる振動数減少が観察された(**図 2-54**)。Biotin 化-DsbB は DDM とのミセル状態で基板に固定化されたと考えられる。また、Biotin を予め添加しておいた基板に対しては Biotin 化-DsbB がほとんど結合しなかったことから、Biotin 化-DsbB を QCM 基板上に特異的に固定化できたと考えられる。続いて、Biotin 化-DsbB を固定化した基板に DsbA(C33A)を添加すると、結合に伴う振動数減少が観察されたが、DsbA(native)、DsbA(C30A)を添加した場合には、結合は観察されなかった(**図 2-54**)。また、アミンカップリング法で DsbB を固定化した場合よりも DsbA(C33A)の結合量が増加した。このことは、DsbB を固定化するためにアミンカップリング法を用いるよりも、DsbB のアミノ基を利用して Biotin 化して Avidin－Biotin 相互作用で固定化する方が DsbB の活性を保つことができることが分かった。

TCEP 添加によって、DsbB との結合が観察された DsbA(C33A)を添加したセルだけ振動数の上昇が観察された(**図 2-54**)。このことから、DsbA(C33A)と DsbB は、ジ

スルフィド結合によって、特異的に結合していることが分かった。

ビオチン化 DsbB を使用した場合、定性的には特異結合が観察されたものの、biotinyl-DsbB を基板に−600 Hz 程度固定化したことを考えると、予想される DsbA の結合量は–600 Hz 程度であると考えられるため、DsbB が DDM とのミセルとなって基板に結合していることを考えても、DsbA(C33A)の結合量約 50 Hz は小さいと考えられる。DsbB のビオチン化反応の際には、DsbB のリシン残基由来のアミノ基がランダムにビオチン化されるため、活性が保たれずに固定化された DsbB も多く存在したと考えられる。

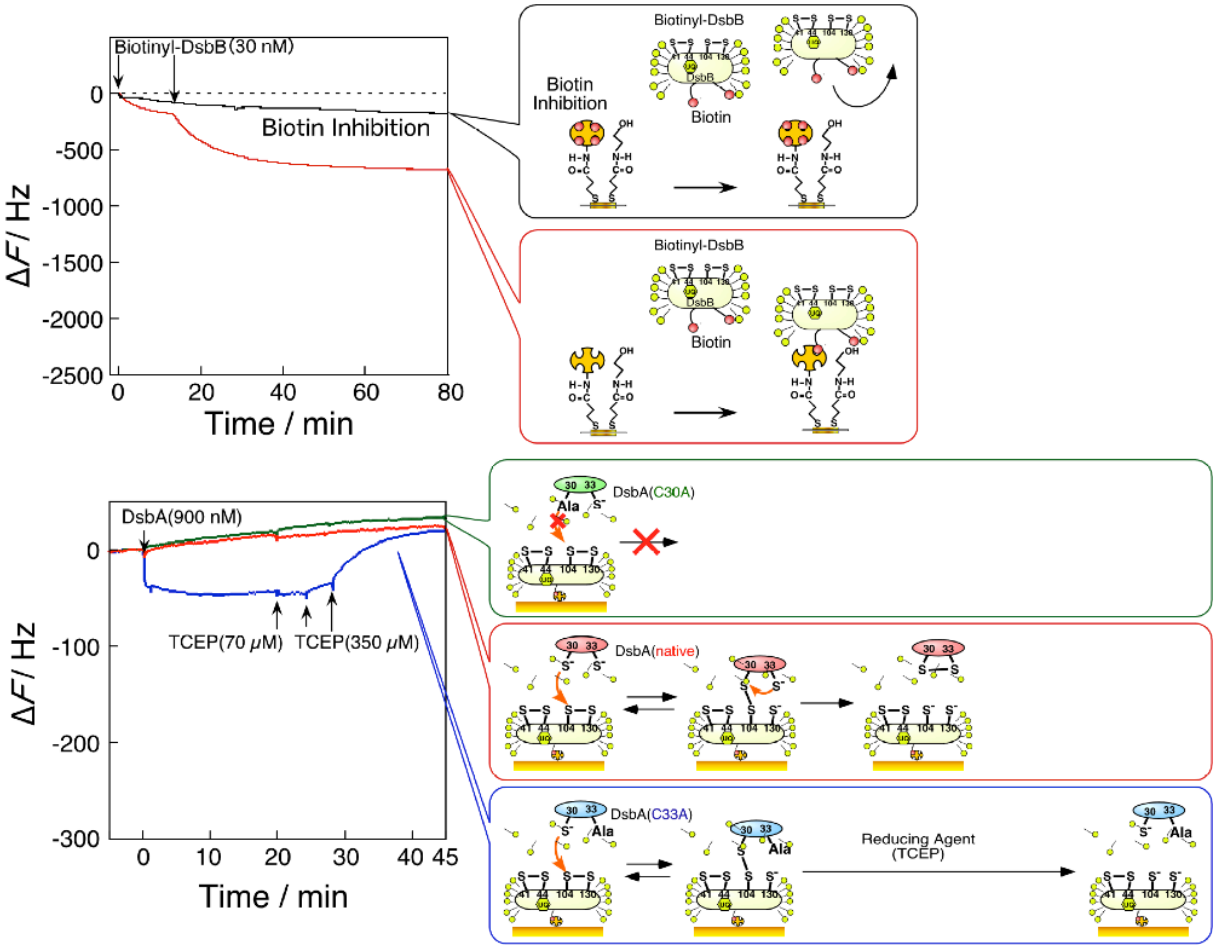


図 2-54：アビジン－ビオチン固定化系への還元剤 TCEP 添加による効果

50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM at 25 °C.

DsbA と DsbB の反応チャートの横軸が分単位であることに注意。

2-4-4　界面活性剤可溶化 DsbB の BCCP タグを利用した固定化

［実験操作］

NeutrAvidin の固定化は 2-4-3 節と同様に行った。NeutrAvidin 固定化後のセルに対し、0.1%DDM 含有 buffer（50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM）で置換し、装置にセットした。振動数が安定化したところで、BCCP-DsbB をインジェクトし、結合を観察した。BCCP-DsbB 固定化後のセルに対し、0.1%DDM 含有 buffer（50 mM Hepes(pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1% DDM）で置換し、装置にセットした。装置が安定化したところで、還元剤 TCEP(12 当量)で 30 分以上処理後、Zeba micro desalt spin column（Pierce 社製）で脱塩処理した DsbA をインジェクトし、結合を観察した。その後、TCEP を QCM セル内に添加した。

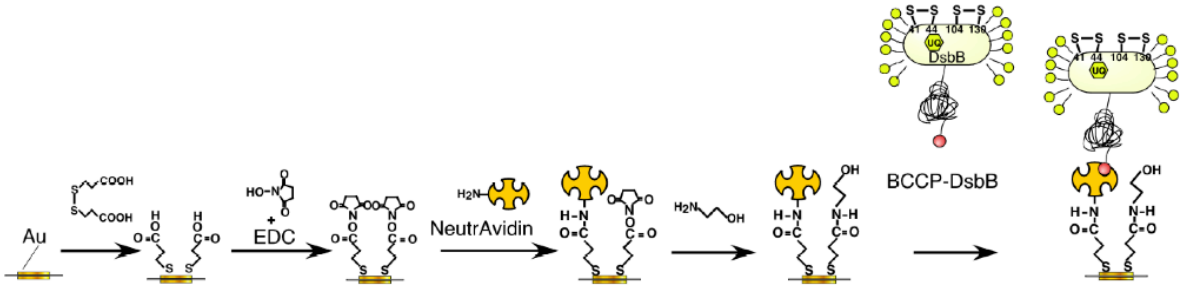


図 2-55：QCM 基板上に BCCP-DsbB を固定化するためのスキーム

［結果と考察］

NeutrAvidin 基板に対して、BCCP-DsbB を添加したところ、結合に伴う振動数減少が観察された(図 2-56)。BCCP-DsbB は分子量約 35 kDa であるため、BCCP-DsbB のみの吸着では理論計算上では–400 Hz 程度の振動数変化しか起こらないはずである。このことは BCCP-DsbB が DDM のミセルと一緒に基板に固定化されたことを示している。また、ビオチン阻害基板についても BCCP-DsbB が非特異結合していることが分かる。非特異結合軽減策として、NeutrAvidin を Avidin に変えても非特異結合の割合は変化なかった。また、DDM 濃度を 0.1%から 0.2%, 0.4%, 0.8%と変

化させたが、非特異結合の割合は変わらなかった。同じ BCCP タグを有するタンパク質としてタンパク質の翻訳過程において開始因子の働きをする Initiation Factor 2 の BCCP タグ融合タイプ(BCCP-IF2)でも非特異結合するか確認したところ、BCCP-DsbB と同程度非特異結合した。BCCP-DsbB の基板への非特異結合は存在するがそのまま実験を続けた。

続いて BCCP-DsbB 固定化基板に対して、DsbA(C33A)を添加したところ、結合に伴う振動数減少が観察された(図 2-56)。また、DsbA(native)および DsbA(C30A)については結合が観察されなかった。

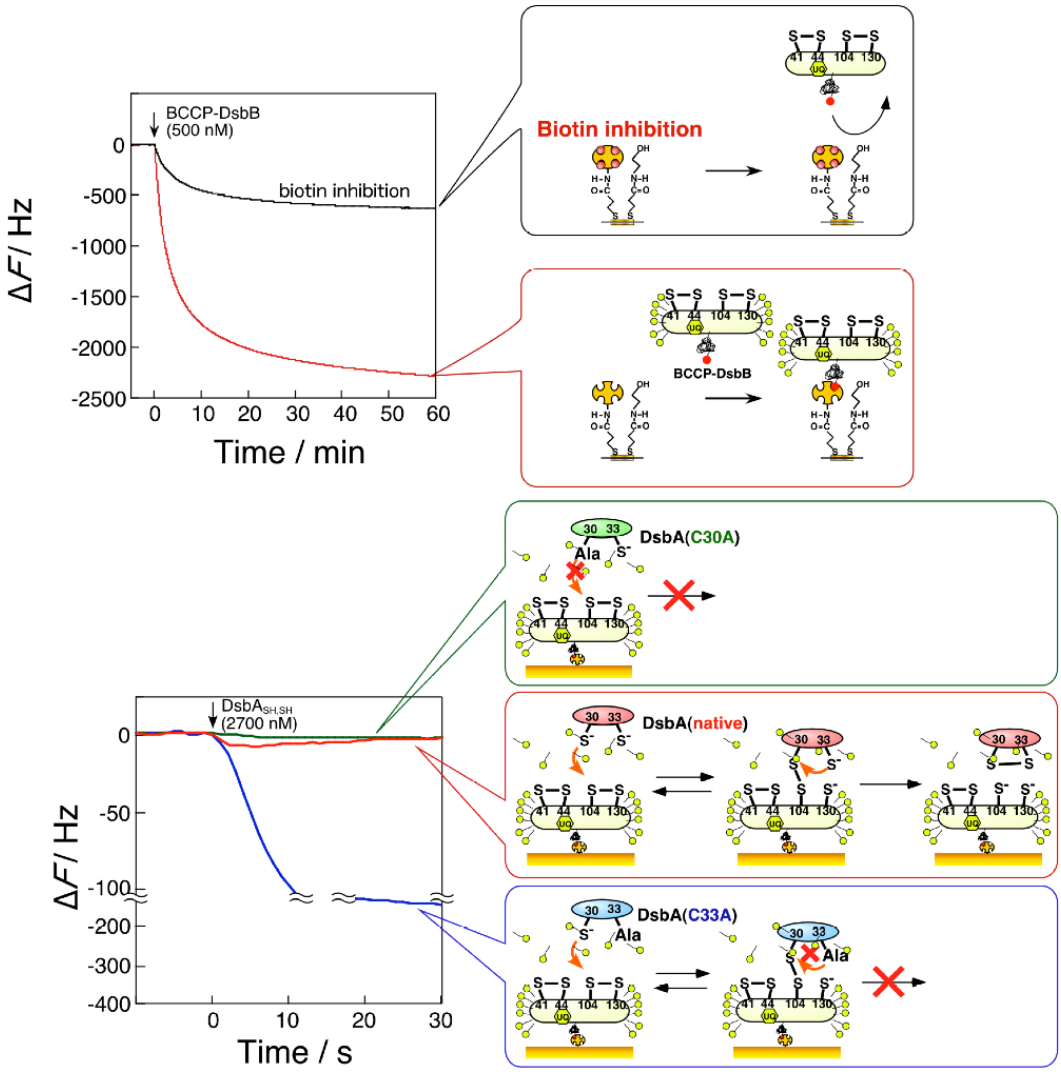


図 2-56：QCM を用いた DsbA(native, C33A, C30A)と BCCP-DsbB との反応観察

(50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM at 25 °C)

その後、TCEP 添加によって、DsbB との結合が観察された DsbA(C33A)を添加したセルだけ振動数の上昇が観察された(**図 2-57**)。このことから DsbA(C33A)と DsbB は、ジスルフィド結合で特異的に結合していることが分かった。DsbA(C33A)の結合量はおよそ－50 Hz であったが、理論値 1200 Hz よりも小さい。界面活性剤存在下で実験していることが DsbB の活性減少につながっているのかもしれない。

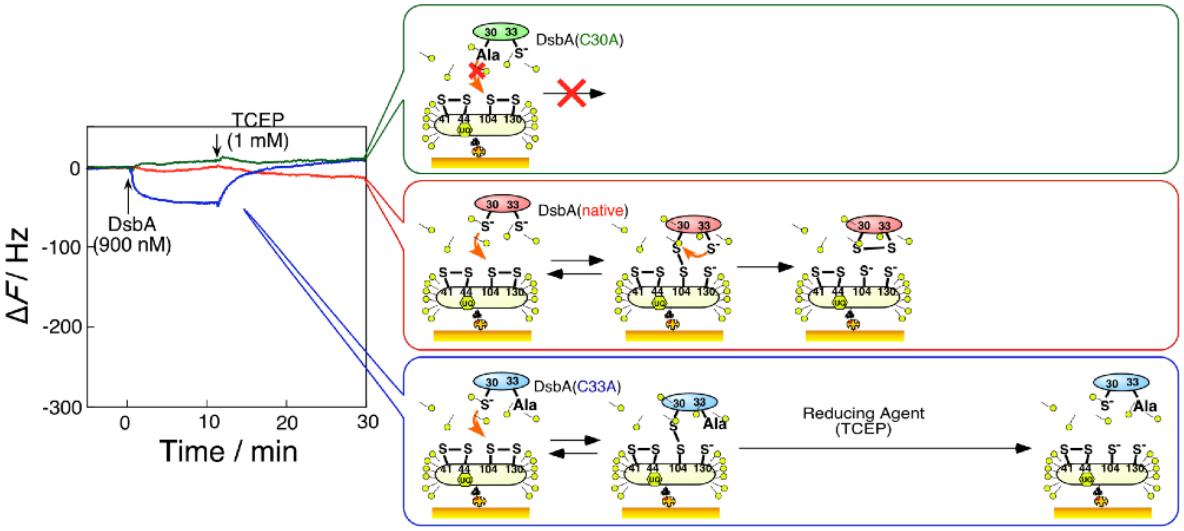


図 2-57：BCCP タグを利用した固定化系への還元剤 TCEP 添加による効果

(50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM at 25 °C)

2-4-5　BCCP タグを利用して脂質膜に埋め込む固定化

(1) BCCP-DsbB をアンカーとした脂質膜の作製

当研究室の三友と森田は、QCM 基板上への平面脂質二分子膜の作製法を確立した [14,16]。その手法にならって、BCCP タグを有する膜タンパク質 DsbB をアビジン－ビオチン相互作用を介して、基板に固定化した後、それをアンカーとして平面脂質二分子膜を再構成した。

［実験操作］

1% SDS を 200 μL 入れて綿棒で軽く丁寧に擦った。Milli-Q 水で洗浄し、ゴム単球で金基板上の水滴を取り除いた後、金基板にピランハ溶液を 2.5 μL のせて、5 分

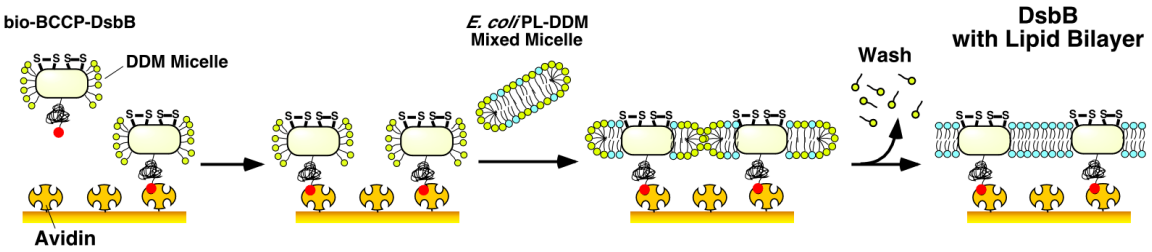


図 2-58：BCCP-DsbB をアンカーとした平面脂質二分子膜作製の概念図

間程放置し、Milli-Q 水で洗浄することを 3 回繰り返した。Milli-Q 水で洗浄後、金基板が気相に触れないように Milli-Q 水をセルに満たしておいた。その後、セル中の Milli-Q 水を捨てて、すぐに 4 mM ジチオジプロピオン酸水溶液を 250 μL 添加し、30 分以上放置した。その後、Milli-Q 水で洗浄後、100 mg/mL NHS と 100 mg/mL EDC を等量ずつ混合し、セル内に 50 μL 以上添加した。20 分放置した後、Milli-Q 水で洗浄し、HEPES buffer (50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl)を 50 μL 満たした。10 mg/mL NeutrAvidin 水溶液を 1 μL 添加し、1 時間放置した。その後、セル内の溶液を除去し、10 mM エタノールアミン溶液（dissolved in HEPES buffer）を 200 μL セルに添加し、10 分放置した。

セルを Milli-Q で洗浄した後、0.1% DDM 含有 HEPES buffer (50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM)を 500 μL 添加し、QCM 装置にセットした。振動数の安定化を待った後、撹拌を開始し、振動数が安定化したところで、BCCP-DsbB を添加した。振動数減少が－2000 Hz に達したところで、1 mM biotin 溶液を 5 μL 添加し、NeutrAvidin に対する BCCP-DsbB の結合を阻害した。その後、セル内を 0.1% DDM 含有 HEPES buffer で 4 回洗浄した（430 μL の上澄みを除き、430 μL の 0.1% DDM 含有 HEPES buffer を加えることを 4 回繰り返した）。その後、セルから 450 μL 除き、*E. coli* Phospholipids extract（*E. coli* PL）脂質と界面活性剤 DDM の混

合ミセル溶液（＊）を 20 μL (*E.coli* PL を約 100 μg 含む)と HEPES buffer 430 μL を予め混合したものを添加した。添加後は、1 時間程度放置することで、混合ミセルを膜タンパク質 BCCP-DsbB に十分に吸着させるようにした。その後、セル内を HEPES buffer で 4 回洗浄した（430 μL 除き、QCM buffer 430 μL 添加することを 4 回繰り返した)。再度 HEPES buffer で 4 回洗浄した。続いて、DsbA と DsbB の反応最適 pH 条件である pH 6 [4] の QCM buffer(50 mM Citrate, pH 6, 100 mM NaCl)で 4 回洗浄した。振動数変化が安定するまで待った。

（＊）*E.coli* PL 脂質と界面活性剤 DDM の混合ミセルは以下のように作製した。

ナスフラスコ内部を窒素気流で満たした後、*E.coli* PL 脂質（10 mg/mL）のクロロホルム溶液を 200 μL 加えた。アルミホイルで遮光した後、1 時間以上室温でエバポレートを行った。380 μL の懸濁用 buffer（50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, pH 7.5）を加え、ボルテックスおよびバス型ソニケーターで超音波処理することで、脂質薄膜をナスフラスコから剥離させ、リポソームとした。そこに、10% DDM を 17.6 μL 加えて、優しく混ぜることで、リポソームを脂質－DDM 混合ミセルとして可溶化した。

［結果と考察］

以下**図 2-59** に BCCP-DsbB をアンカーとした平面脂質二分子膜作製における QCM チャートを示した。BCCP-DsbB を 2000 Hz まで固定化後、DDM (+) buffer でバルク中の余分な BCCP-DsbB を洗浄し、*E.coli* 脂質-DDM の混合ミセル（脂質 100 μg 分）を加えて DDM(-)で希釈する（DDM 濃度：2.0 mM → 0.54 mM）と振動数はさらに減少した。この結果は、DDM 単独のミセルよりも大きな *E.coli* 脂質-DDM 混合ミセルが吸着したためであると考えられる。続いてこの脂質-DDM 混合ミセルの基板を DDM (–) buffer で洗浄し、バルク中の DDM や過剰に加えた脂質を除いた結果、最終的に ΔF は－2200 Hz 程度の振動数減少が観察された。この結果は、アンカーの脂質分子の周りについていた DDM が離れると同時に脂質分子が自律的に

会合して二分子膜を形成していく挙動を示していると考えられる。最終的に DDM 溶液中とあまり変わらない振動数となったのは DDM が脂質膜と置き換わったからであると考えられる。

(2)　QCM を用いた DsbA および DsbA 変異体と DsbB の反応による活性確認

DsbB を脂質膜中に配向固定化した QCM 基板を用いて、DsbA との反応を確認した。

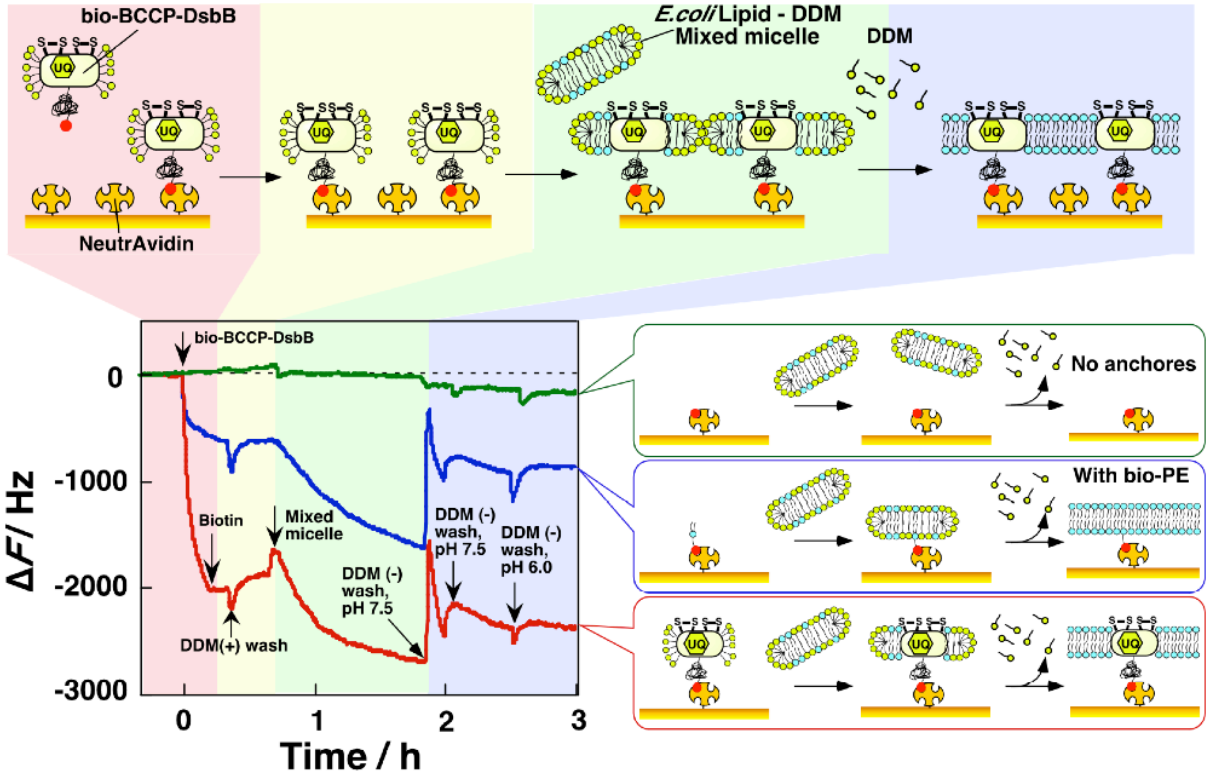


図 2-59：BCCP-DsbB をアンカーとした平面脂質二分子膜作製の QCM チャート

(50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, (0.1% DDM) at 25 °C)

［実験操作］

DsbA は 30 当量の還元剤 TCEP と 100 mM Sodium citrate buffer (pH 6)中で、室温 30 分反応させた後、脱塩カラムで処理し、QCM セルに添加した。

［結果と考察］

DsbA(native)を添加した結果、振動数減少の後、振動数上昇が起こった(図 2-60)。これは、DsbA と DsbB が結合し、その後、DsbA の酸化が進行したと考えられる。DsbA(C33A)を添加した結果、振動数減少のみが観察された。これは DsbA と DsbB が結合した後、DsbA の Cys33 が Ala に変異していることで、DsbA の酸化が進行しなかったと考えられる。さらに、DsbA(C30A)を添加した結果、振動数変化は観察されなかった。Cys30 に変異が加わっているため、最初の求核反応が進行しなかったことによると考えられる。これらの結果より、DsbA と DsbB の反応を QCM 上で観察した場合、DsbA と DsbB とのあいだでジスルフィド結合が形成することで振動数減少として検出できることが確認され、静電的相互作用などに伴う非特異結合の影響は小さいことが分かった。

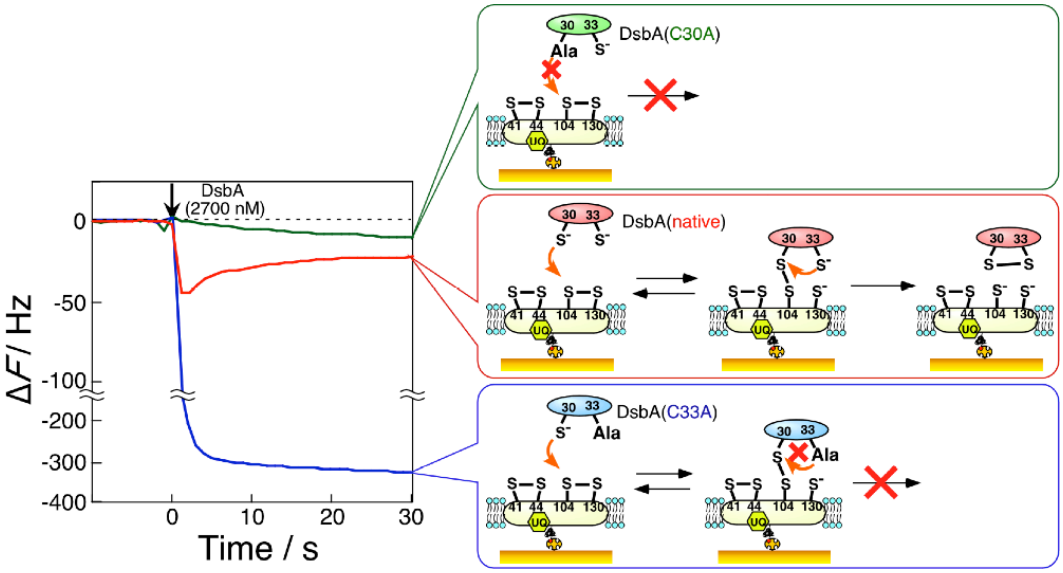


図 2-60：QCM 金基板上に調製した脂質二分子膜内に配向固定化した DsbB と DsbA および変異体との反応挙動

50 mM Citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl at 25 °C

還元剤 TCEP 添加によって、DsbA(C33A)と DsbB との間の結合が切断された(図

2-61)。このことから DsbA(C33A)と DsbB の間の結合は、S-S 結合によるものであることがわかった。

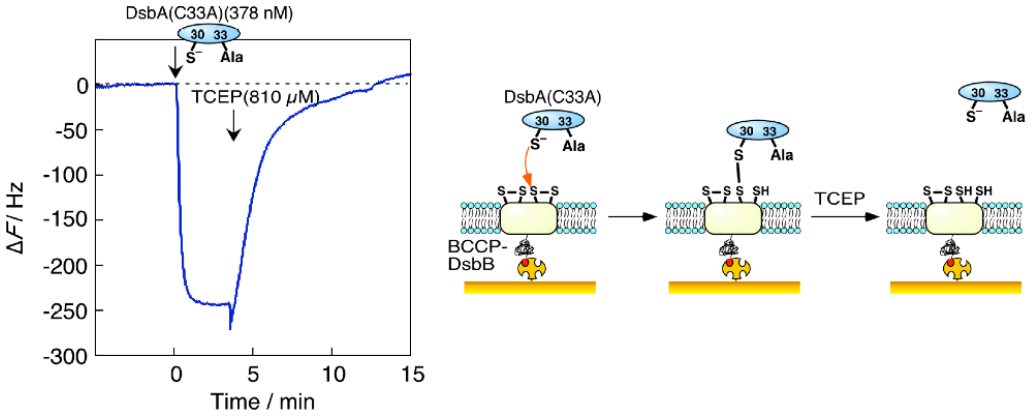


図 2-61：脂質二分子膜固定化系への還元剤 TCEP 添加による効果

(50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl at 25 °C)

2-4-6　DsbB の翻訳同時膜埋め込みによる固定化の試み

2-4-5 節において、DsbB を BCCP タグとの融合タンパク質として発現させ、QCM 基板上の NeutrAvidin と配向固定化し、脂質膜内に固定化することができた。ところで、近年、無細胞タンパク質合成系を用いて膜タンパク質を発現させ、界面活性剤による可溶化の過程を経ずに、膜タンパク質が脂質膜に組み込まれるという報告がなされている [10,11,12]。本項では水晶発振子マイクロバランスの基板上に無細胞翻訳系を利用して膜タンパク質 DsbB を発現させ、QCM 基板上に作製した脂質二分子膜内に直接埋め込むことを検討した(図 2-62)。DsbB が脂質二分子膜に埋め込まれた後も活性を維持しているかの確認手段としては、DsbA(C33A)との結合を観察することで評価を行った。ここでは、より多くの翻訳産物が得られると期待できる大腸菌ライセートを用いた無細胞系のタンパク質合成キットである RTS(Rapid Translation System)*E.coli* キットを用いて実験を行った。DsbB を無細胞系で発現した場合に危惧されるのは、無細胞反応系には還元剤が含まれているため、DsbB が

ジスルフィド結合を形成していない可能性が高いことである。そこで、本実験では大腸菌が内在的に有しているイソプレン骨格を 8 つ持つユビキノン 8(市販していない)の代替として、水溶性のユビキノン 1 を無細胞翻訳反応後に添加した。今回は 2 本のジスルフィド結合ともに還元状態で発現されると考えられるが、DsbB のジスルフィド結合は UQ1 によって形成されると予想される。

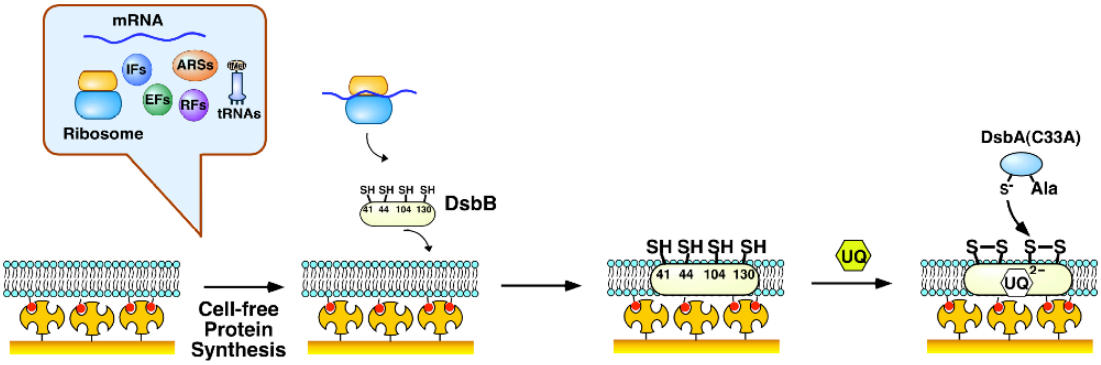


図 2-62 : QCM 基板上で無細胞翻訳系を用いた膜タンパク質の翻訳同時膜埋め込み

金基板上に二分子膜を形成するためのスキームを図 2-63 に示した。

(A) NAv 基板上に bio-PE の 1% DDM 溶液を加えることで、基板上の NAv に bio-PE のミセルが結合する（ミセルとして結合するので振動数変化量は bio-PE 自身の質量よりも多く見積もられる）。(B) バルク中の余分な bio-PE ミセルを除いた後、*E.coli* PL と DDM の混合ミセルを加えて *E.coli* 脂質を基板に固定化する。(C) ここで DDM(-) Buffer で素早く希釈することにより、二分子膜を基板上に形成させる。

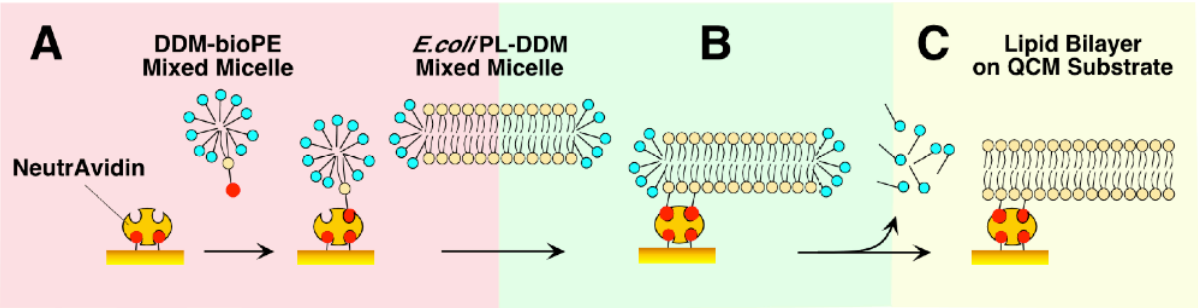


図 2-63：脂質膜作製の模式図

［実験操作］

(1) *E.coli* PL-DDM 混合ミセルの調製

50 mL ナス型フラスコに 10 mg/ml (chloroform) *E.coli* polar Lipid Extract (*E.coli* PL) を 100 μL 入れ、常温で 1 h 以上エバポレーターを用いて試薬中の chloroform を除去した。そこへ Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM KCl) を 190 μL 入れ、ボルテックスをして壁に貼り付いた脂質をリポソームとして Buffer 中に分散させた。そこへ 10% DDM を 8.8 μL 加えて (終濃度 0.44% DDM)脂質を可溶化させた。

(2) 脂質膜基板の調製

NAv が固定されたセル内を 500 μL の DDM(+) buffer (50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1% DDM)で満たし、セルを装置にセットして発振させ、振動数が安定したら 1% DDM 含有 1 mg/mL bio-PE 溶液（Milli-Q 水に 1 mg/mL となるように bio-PE を加え、1%となるように DDM を加えて可溶化する）を 2 μL インジェクトし、bio-PE を基板に固定化した。DDM(+) buffer で洗浄後、セルから 500 μL の buffer のうち上層の 450 μL 除き、(1)で調製した大腸菌脂質-DDM 混合ミセル 20 μL と DDM(-) buffer を 430 μL 予め混合したものをセルに添加した。 (ここで、大腸菌脂質-DDM 混合ミセル 450 μL の添加時に DDM(+) buffer が 50 μL 残っているので DDM の終濃度は 0.028%となった)。1 時間後、系内の界面活性剤 DDM および余分な脂質分子を除くため KCl を塩として含む DDM (-) buffer(50 mM Hepes-KOH, pH 7.6, 100 mM KCl)で 4 回洗浄を行った。通常は NaCl を塩として含むバッファーを用いるが、無細胞系反応液には KCl を塩として使用するのが一般的であるので、KCl を塩として含むバッファーを用いた。その後もう一回同様に洗浄を行った。

(3) 無細胞翻訳反応液の調製

その後、QCM セル内の溶液を手で振り払った後、できるだけ速やかに、*E.coli* ライセートを含む反応液 25 μL を金基板上にマウントした。乾燥を防ぐため、QCM セルの表面をパラフィルムで覆った(その際、圧がかかり水晶板が割れないように注意した)。翻訳反応は 30 °C で 5 時間 30 分行った。その後、10 mM ユビキノン-1(UQ-1)を各セルに 1 μL 添加し、30 °C で 30 分インキュベートした。その後、QCM セル内を pH 6 の反応観察用バッファー(50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl)に置換した。セルを QCM 装置にセットした。3 当量の TCEP で 30 分還元処理した DsbA(C33A)を Zeba Desalt Spin Column(Pierce)で脱塩後、QCM セルにインジェクトし、反応を観察した。

E. coli Lysate	6 μL
Reaction Mix	5 μL
Amino Acids	6 μL
Methionine	0.5 μL
Reconstitution Buffer	2.5 μL
pET22b-DsbB*プラスミド(63 ng/μL)	5 μL (315 ng)
Total	25 μL

*今回用いた DsbB は活性部位ではない Cys8 および Cys49 をそれぞれ Ala と Val に変異させたものを使用している。さらに Stop コドンも欠失させて pET ベクター由来の His タグを有効にしているので、発現させた DsbB の抗 His-tag 抗体によるウエスタンブロットが可能である。

［結果と考察］

DsbA(C33A)を添加したところ、UQ1 添加なし(黒色チャート)、UQ1 添加あり(ピンクのチャート)どちらの場合も DsbA との結合が観察されなかった(**図 2-64**)。原因として、DsbB が発現されていない、もしくは発現されているが膜に埋め込まれていない、埋め込まれていたとしても量が少ないあるいは向きが逆であった、等が考えられる。そのため SDS-PAGE さらにウエスタンブロットを行い、RTS キットによって、DsbB が発現されたことを確認する必要がある。その対策として、**図 2-65**

に示した Invitrogen から市販されている円盤状ディスク膜[12]を利用することも一つの手段だと思われる。このディスクはアポリポタンパク質が脂質の周囲を取り囲んで形成されている。この系を利用して、BCCP-DsbB をコードしたプラスミドを(ビオチンリガーゼを添加した)無細胞翻訳系で発現させ、QCM 基板上の NeutrAvidin と固定化する手法が考えられる。

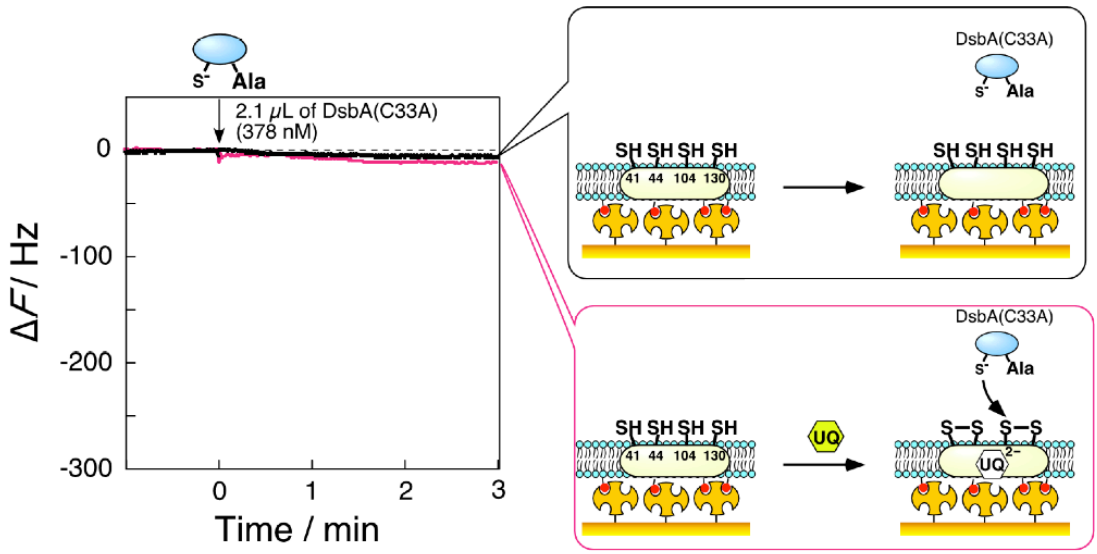


図 2-64：QCM 基板上の支持型二分子膜に DsbB が埋め込まれたことの DsbA(C33A)の結合による確認

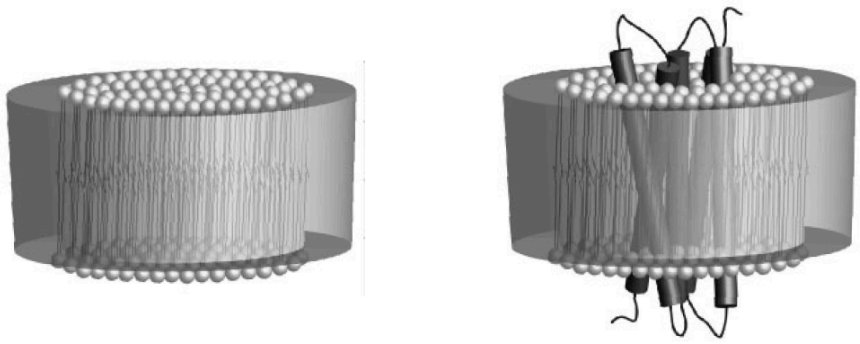


図 2-65 : Invitrogen から市販されている円盤状ディスク膜を利用した膜タンパク質の翻訳同時埋め込み[18]

2-5　平面脂質二分子膜に埋め込んだ DsbB のキャラクタリゼーション

2-5-1　DDM 可溶化系と脂質膜置換系の比較

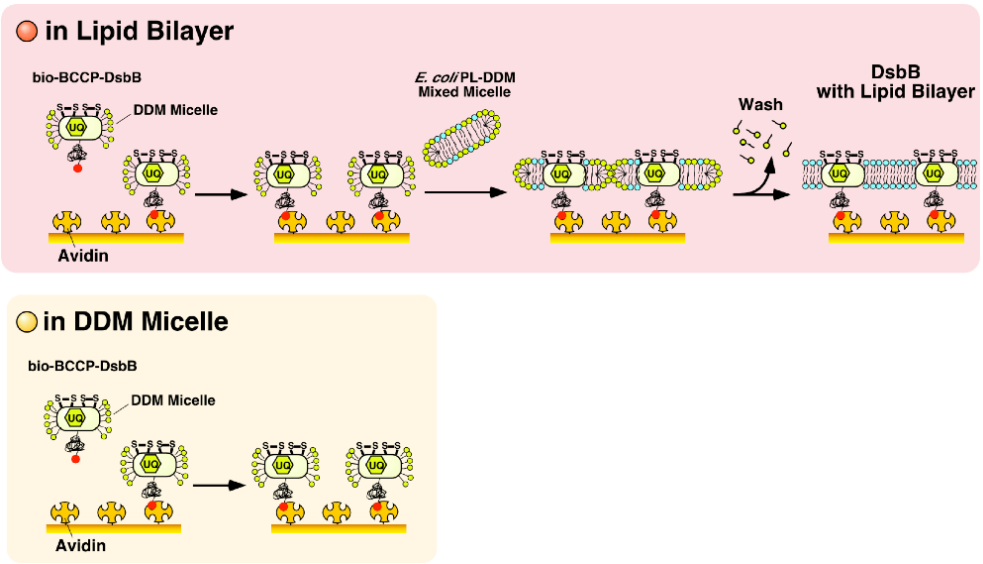


図 2-66：脂質膜置換系と DDM 可溶化系

これまでの実験結果から、DDM 可溶化系と脂質置換系では、DsbA と DsbB の結合親和性に違いが見られた。以下に実際の QCM チャートを示した。

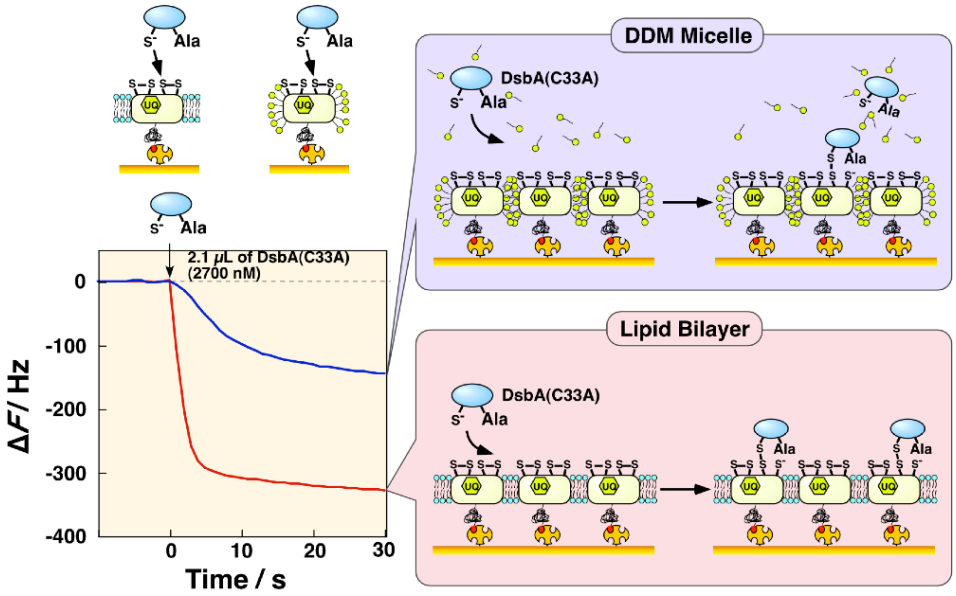


図 2-67：DDM 可溶化系と脂質二分子膜置換系との DsbA(C33A)結合量の比較

50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl, (0.1% DDM) at 25 °C

水晶発振子を用いた分子間相互作用観察において、界面活性剤はしばしば非特異結合を防止するために添加される。非特異結合を防ぐということは、同時に特異結合もある程度阻害すると考えられる。今回の実験結果でも、脂質膜置換系にした場合、DDM 可溶化系の場合よりも DsbA と DsbB の結合親和性が向上した。これまで膜タンパク質 DsbB とリガンドとの反応解析において行われてきた実験系は界面活性剤を用いた可溶化系であるが、本研究では、Planar sensor である QCM の利点を生かし、脂質膜中での DsbB との反応観察を行うことで、より *in vivo* に近い条件で DsbA と DsbB との反応解析が可能になったと考えられる。

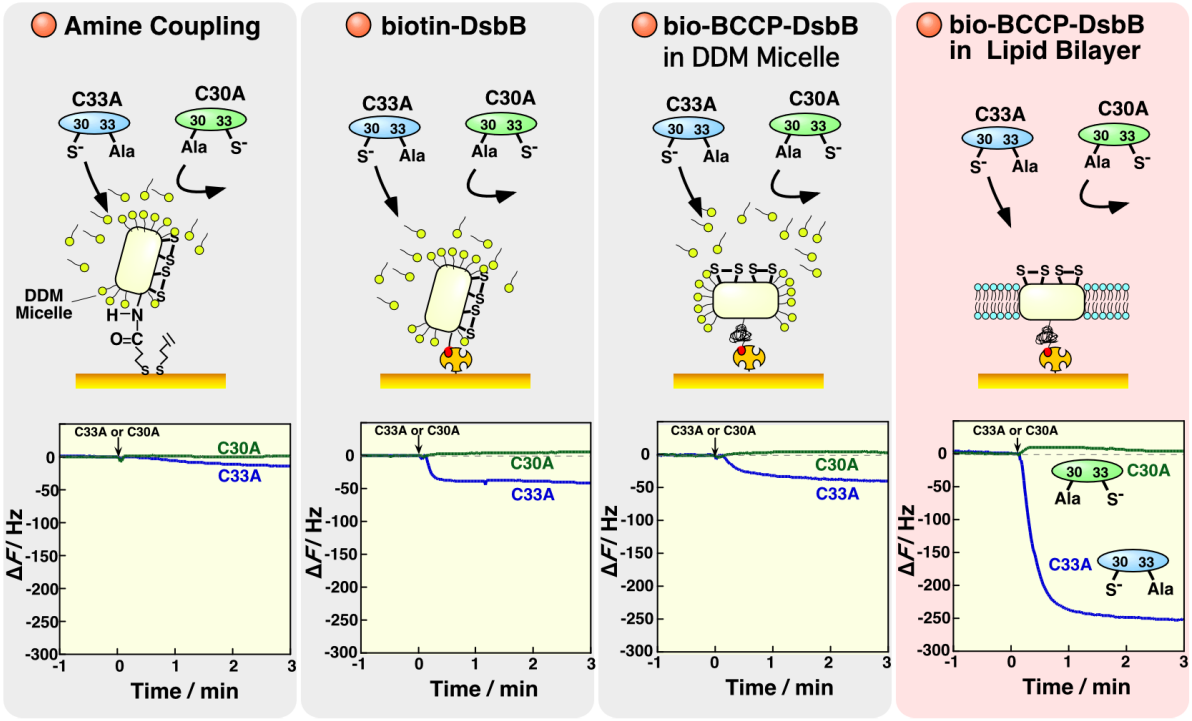


図 2-68：種々の膜タンパク質 DsbB 固定化系における DsbA 反応性の比較

50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 25 °C, [DsbA]=378 nM.

2-5-2　BCCP-DsbB 固定化量と DsbA の結合量の相関

脂質膜置換系において、膜タンパク質 BCCP-DsbB と DsbA が特異的に結合していることを示すため、BCCP-DsbB の固定化量を種々に変化させ、その固定化量に

応じて、DsbA の結合量が比例関係になっているか確かめた。DsbB の固定化量と DsbA(C33A)の結合量をプロットしたところ両者の間には比例関係が成り立っているので、QCM を用いた脂質膜置換系においては DsbA と DsbB 間の特異的な結合を観察していることが確認できた(図 2-69)。

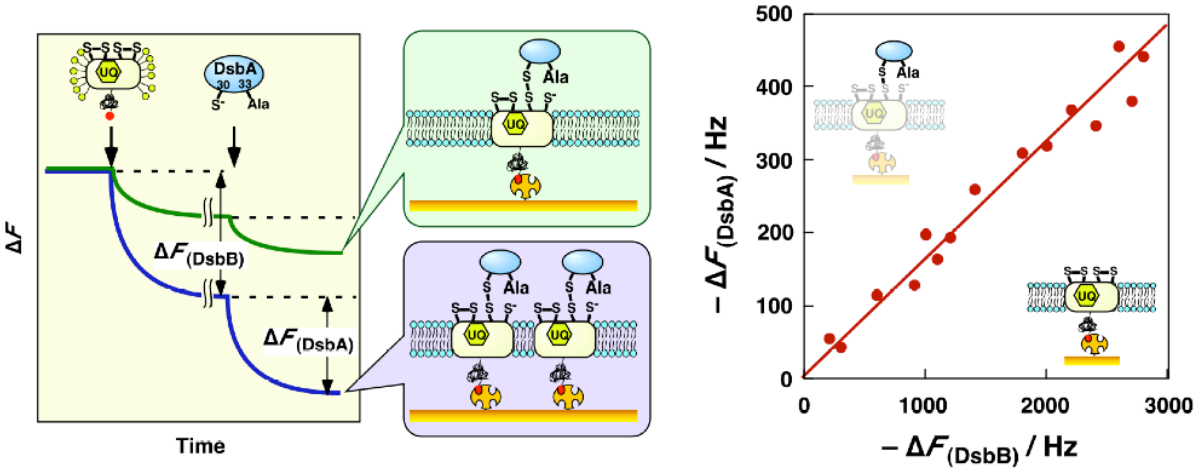


図 2-69：脂質二分子膜置換系での BCCP-DsbB 固定化量と DsbA 結合量の関係

50 mM Citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl at 25 °C

2-5-3　置換する脂質の種類の効果

DsbA(C33A)と DsbB の結合量が増加したのは、DDM が系内から除去されたことの他に、DsbB は大腸菌の内膜タンパク質であり、その本来の環境、すなわち大腸菌脂質である *E.coli* PL 中に存在することが、活性向上につながった可能性も考えられる。そこで、酸性脂質である *E.coli* PL の代わりに、卵黄由来中性脂質である Egg PC を用いて、同様に BCCP-DsbB をアンカーとした平面脂質二分子膜を作製し、DsbA(C33A)との結合活性を観察した。図 2-70 に結果を示した。中性脂質中においても DsbA(C33A)の DsbB に対する結合は観察され、DsbA(C33A)は活性を保持していることが分かった。しかしながら、結合量の観点から見ると、*E.coli* 脂質環境下よりも中性脂質中では DsbB の活性が低下していることが分かった。

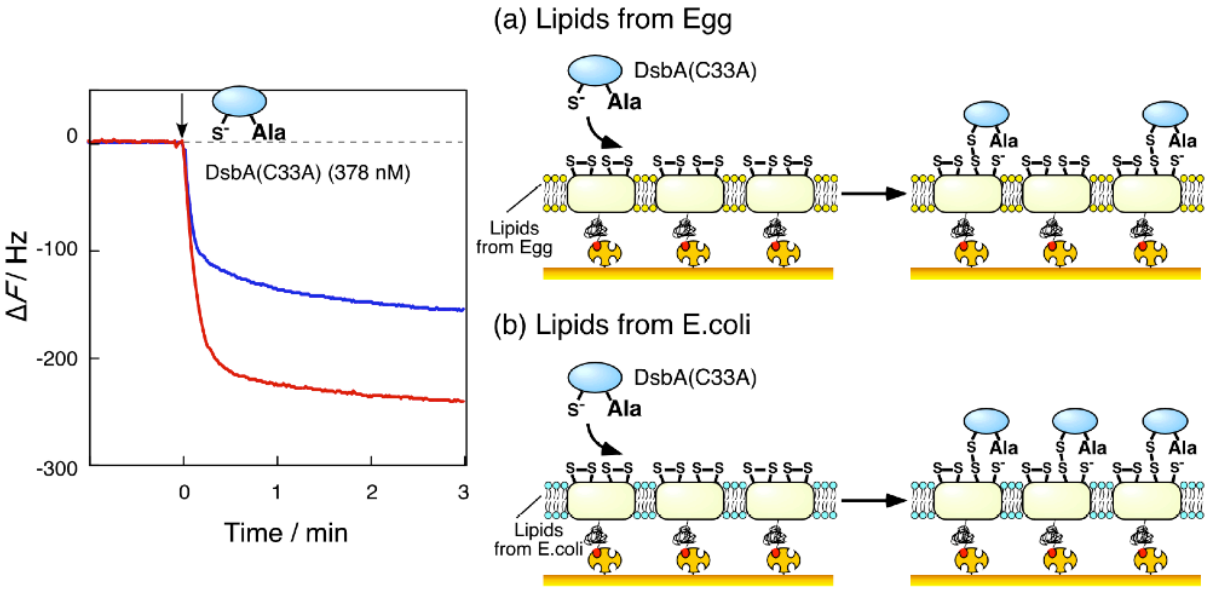
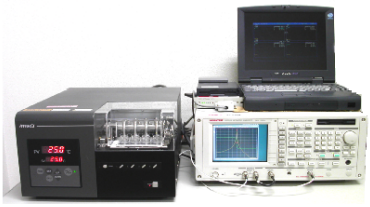


図 2-70：大腸菌由来と卵黄由来脂質二分子膜中での膜タンパク質 DsbB の活性測定

50 mM Citrate buffer (pH 6), 100 mM NaCl at 25 °C

2-5-4　*D* 値を用いた平面脂質二分子膜形成の評価

QCM はネットワークアナライザと組み合わせることで、基板上に吸着した物質の粘弾性を表すパラメータである *D* 値を測定することができる(**図 2-71**)。平面脂質二分子膜が構築されている場合には *D* 値は 0 となるので [13, 14]、平面上の脂質二分子膜が形成されたかの確認手段として利用できる。エネルギー散逸値 *D* を測定することにより、基板上の二分子膜が平面膜かリポソーム状態かを評価した。



AFFINIX Q4 + Network Analyzer

図 2-71：AFFINIX Q4 と Network Analyzer

［実験操作］

D 値測定に際し、「F&D MEASUREMENT Ver. 2.04 4CHFD2G.BAS」を使用し、span を 50 kHz、filter を 5 として測定を行った。

［結果と考察］

Δ*F* とともにΔ*D* 値の変化を追跡したチャートが**図 2-72** である。脂質膜再構成後のΔ*D* の変化は bio-BCCP-DsbB 導入の有無に関わらず 10 x 10^{-6} ~ 15 x 10^{-6} 程度であり、かたいタンパク質である NAv を基板に一層固定化したときの変化と同程度であった。また、リポソームのような高い粘性を持つ物質が吸着したときは約 200 x 10^{-6} 程度の大きなΔ*D* の変化になることがわかっている [13,14]。今回作成した脂質二分子膜では、このような大きなΔ*D* ではなかったため、平面二分子膜ができていると評価した。

2-5-5　アビジンの結合を利用した平面脂質二分子膜形成の評価

アビジンの吸着を利用して平面脂質二分子膜形成の評価 [13, 14] を行った。具体的には、膜形成時に用いた脂質の中にビオチン化脂質を混合させておき、同様の操作により平面膜を形成させ、膜表面に提示されたビオチンに対し、QCM 金基板上を一層覆う程度のアビジンの結合が見えるかどうかで評価した。

［実験操作］

用いる脂質の中に 5 mol%の bio-PE を混合して脂質膜への置換を行い、1 mg/mL Avidin を 2 μL インジェクトした。

［結果と考察］

bio-PE 含有 *E.coli* 脂質を用いて脂質置換した基板に Avidin をインジェクトした結果、bio-BCCP-DsbB の埋め込みの有無に関わらず、Avidin の結合が確認された(**図 2-73 赤、青**)。一方、bio-PE を添加していない場合、bio-BCCP-DsbB を埋め込んだ

脂質膜については Avidin の結合はほぼ観察されなかったが、埋め込まなかった場合は、Avidin の非特異的吸着が約−200 Hz 観察された。

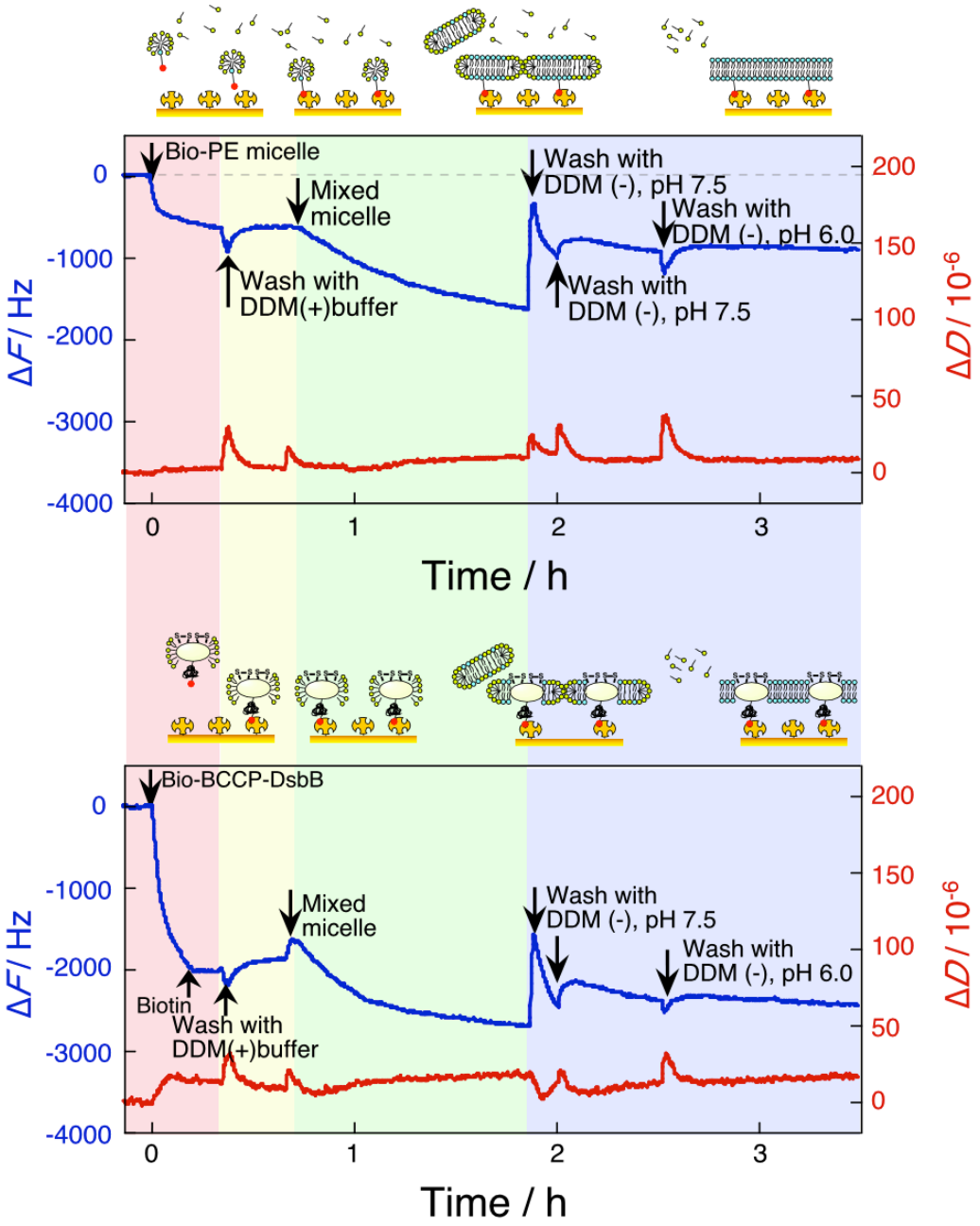


図 2-72：*D* 値を用いた平面脂質二分子膜形成の確認

25 °C, Mixed micelle 添加前まで：50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM

Mixed micelle 添加後から DDM(-) buffer 希釈前まで：

50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.027% DDM

DDM(-) buffer, pH 7.5：50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl

DDM(-) buffer, pH 6.0：50 mM citrate buffer, pH 6.0, 100 mM NaCl

また、Avidin の分子量 66 kDa、Avidin の断面積 36 nm^2 (結晶構造 (PDB : 1AVD) より概算) より Avidin 分子が基板上に一層結合したときの重量変化量は 305 ng/cm^2 と計算され、理論的な振動数変化量は–930 Hz であると見積もられることから、本実験で観察された Avidin の結合量は Avidin 分子が表面をほぼ一層覆った値であることが確認された。このことから、基板表面はほぼ一層脂質膜で覆われたことが確認された(図 2-73)。

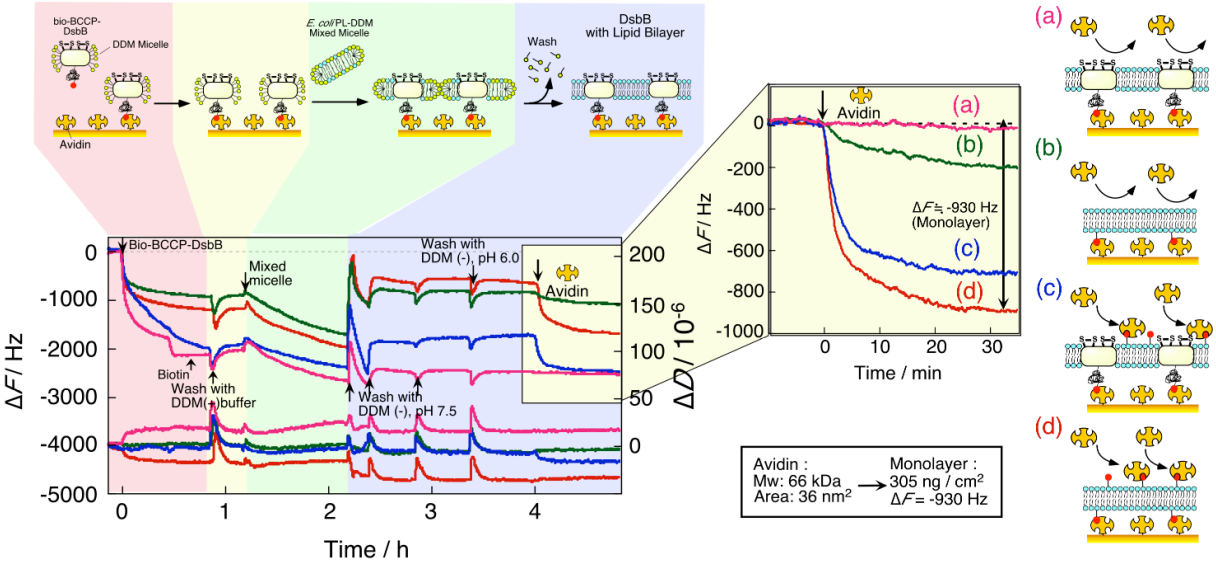


図 2-73：平面脂質膜形成の確認のためのアビジンの一層吸着実験

25 °C, Mixed micelle 添加前まで：50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM
Mixed micelle 添加後から DDM(-) buffer 希釈前まで：50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.027% DDM　DDM(-) buffer, pH 7.5：50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl
DDM(-) buffer, pH 6.0：50 mM citrate buffer, pH 6.0, 100 mM NaCl

2-5-6　BCCP-DsbB の乾燥重量による真の固定化量の算出

水晶発振子による生体分子の測定においては、固定化した生体分子による水の振動によって、測定結果が実際よりも多く見積もられることが知られている。この水分子による影響は、生体分子を固定化した後、乾燥させて気相中で測定し、水の影響を受けない真の固定化重量を算出することで換算可能となる。そのため、ここで

は、気相中における bio-BCCP-DsbB の乾燥重量の測定を行った。実験の概要を以下(図 2-74)に示した。

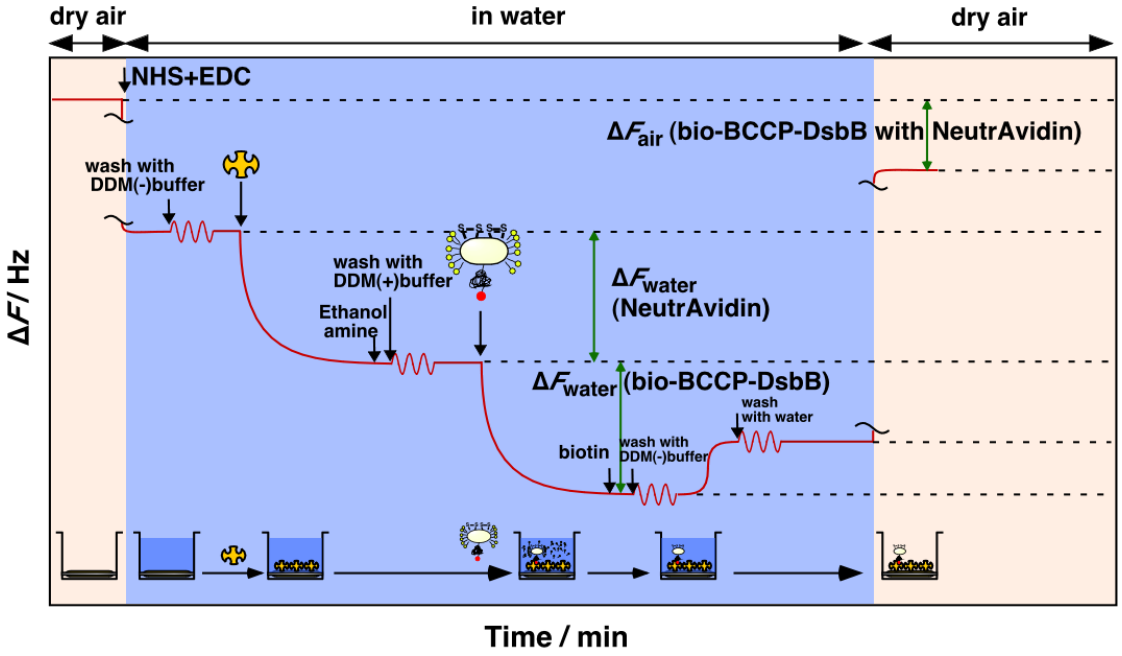


図 2-74：QCM 基板上への bio-BCCP-DsbB の固定化における乾燥重量の測定法

［実験操作］

2-4-2 節と同様に、ジチオジプロピオン酸を固定化した QCM 金基板を調製した。MilliQ-水で洗浄後、QCM セル内の水をキムワイプ、ゴム単球を用いて丁寧に除いた後、QCM セルを発振回路に接続した。シリカゲルと一緒に密閉し、発振が安定するまで乾燥させた(図 2-75)。安定した値を F_0 とした。その後、100 mg/mL NHS と 100 mg/mL EDC を等量ずつ混合し、セル内に 50 µL 添加した。20 ~ 30 分放置した後、HEPES buffer (50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl)で 4 回洗浄し、撹拌を開始した。振動数が安定したところで、10 mg/mL NeutrAvidin 水溶液を 1 µL 添加し、吸着に伴う振動数減少が安定するまで待った(F_{water}(NAv))。その後、1 M エタノールアミン溶液を 5 µL セルに添加し(終濃度 10 mM)、10 分以上放置した。

セルを 0.1% DDM 含有 HEPES buffer (50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl, 0.1% DDM)で 4 回洗浄し、振動数の安定化を待った後、bio-BCCP-DsbB を添加し、振動数変化が安定化するまで待った(F_{water}(bio-BCCP-DsbB with NAv))。1 mM biotin 溶液を 5 μL 添加した。その後、セル内を DDM 非含有 HEPES buffer で 4 回洗浄した。振動数変化が安定化後、MilliQ 水で洗浄し、マイクロピペット、キムワイプ、TLC 用ゴム単球を用いて、出来る限り水を除いた後、シリカゲルと一緒に密閉し、乾燥させた(F_{air}(bio-BCCP-DsbB with NAv))。

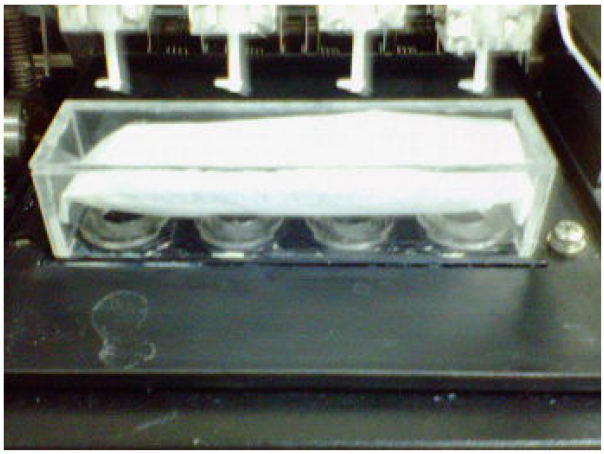


図 2-75：シリカゲルを用いた QCM セルの乾燥

［結果と考察］

NAv についての QCM 金基板への固定化における$(-\Delta F_{water})/(-\Delta F_{air})$の値は、以前当研究室の小関が測定した 2.8 を使用し [17]、今回の実験結果で得られたΔF_{water}(NAv)の値をΔF_{air}(NAv)に換算した。bio-BCCP-DsbB を脂質膜に埋め込んだ状態の QCM 基板を調製する際、bio-BCCP-DsbB を 2000 Hz 固定化している。そこで、$-\Delta F_{water}$ = 2000 Hz をΔF_{air} に換算し、$(-\Delta F_{water})/(-\Delta F_{air})$の値については 2.18 となった(**図 2-76**)。BCCP-DsbB の QCM 金基板表面への固定化量は 0.92 pmol、被覆率は 70 %となった(**図 2-77**)。

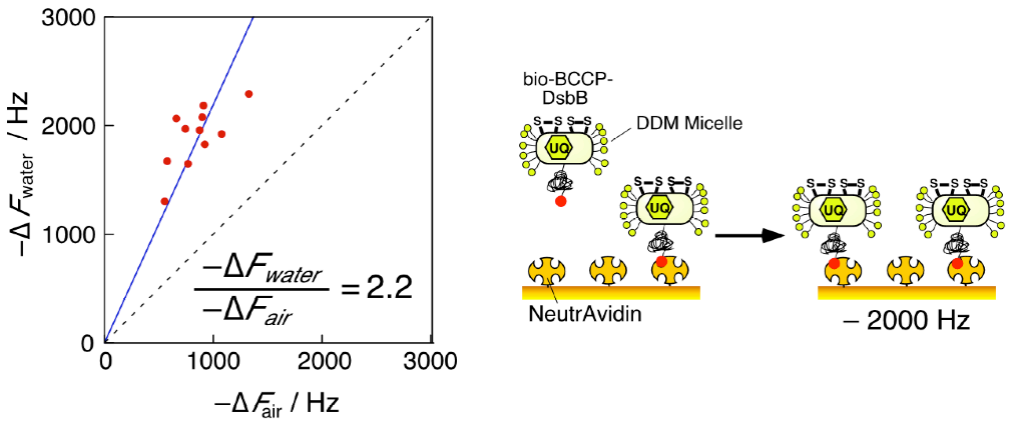


図 2-76：膜タンパク質 BCCP-DsbB の QCM 基板への固定化の(-ΔF_{water})/(-ΔF_{air})値

25 °C, DDM (+) or (-) buffer, pH 7.5：50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, (0.1% DDM)

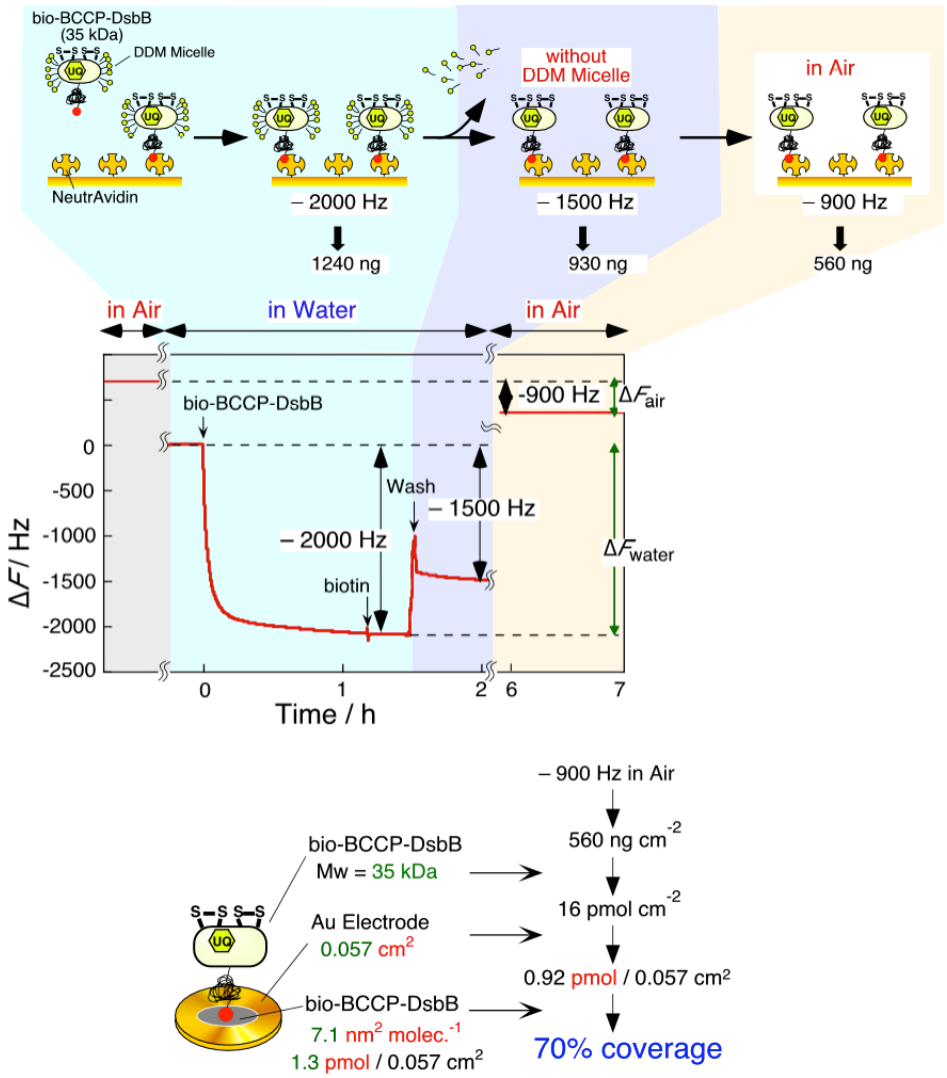


図 2-77：乾燥重量測定法での BCCP-DsbB の QCM 基板への固定化の被覆率計算

25 °C, DDM (+) or (-) buffer, pH 7.5：50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, (0.1% DDM)

2-6　DsbB による DsbA 酸化反応の動力学解析方法

2-6-1　結合過程

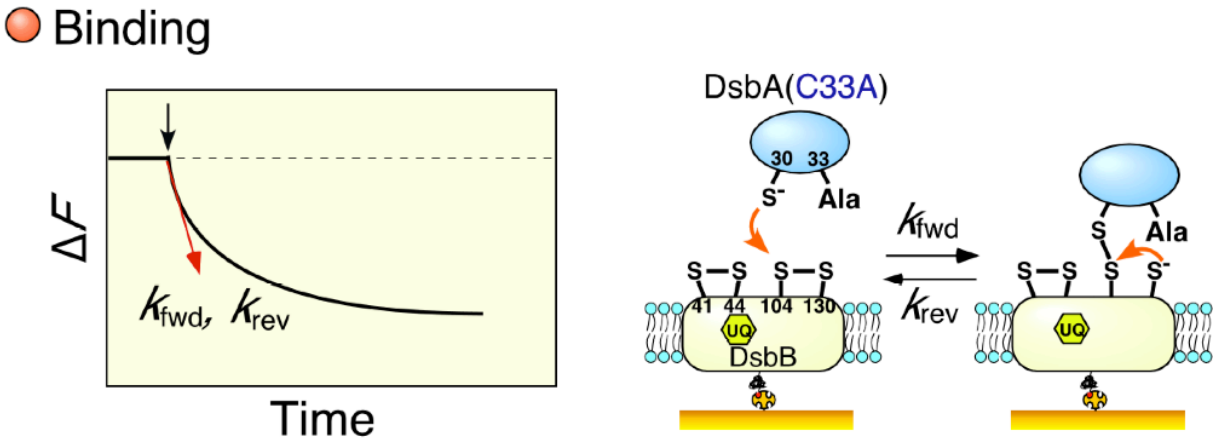


図2-78：DsbBとDsbAの反応における結合過程の速度パラメータk_{fwd}とk_{rev}

DsbAとDsbBとの結合過程を解析するために、DsbAのCys33をAlaに置換した変異体DsbA(C33A)を利用した(図2-78)。DsbA(C33A)とDsbBとの結合過程、すなわち、二基質反応（発振子に固定化したホスト分子H (DsbB)に対するゲスト分子G (DsbA(C33A))の相互作用）に関して、2通りの解析法（飽和法・緩和法）について述べる。

(1) 飽和法（平衡法）

任意のゲスト濃度において、振動数変化（重量変化）が平衡に達したときの変化量を測定する。実際には、振動数変化量が一定になる濃度域まで測定を行う。解離定数 K_d (M^{-1}) が求められる。二基質の平衡反応式は次式で表すことができる。

$$[\mathrm{DsbB}] + [\mathrm{DsbA}] \underset{k_{rev}}{\overset{k_{fwd}}{\rightleftharpoons}} [\mathrm{DsbBDsbA}] \qquad (2\text{-}1)$$

ここで、[DsbB] は基板上の DsbB 濃度、[DsbA] は溶液中の DsbA 濃度、[DsbBDsbA] は生成した複合体の濃度、k_{fwd} は結合速度定数 (M^{-1} s^{-1})、k_{rev} は解離速度定数 (s^{-1}) である。複合体の生成速度は次式により表すことができる。

$$\frac{d}{dt}[\mathrm{DsbBDsbA}] = k_{fwd}[\mathrm{DsbB}][\mathrm{DsbA}] - k_{rev}[\mathrm{DsbBDsbA}] \tag{2-2}$$

以下の二つの条件 (θ は複合体の最大量に対する形成した複合体の割合)

$$\theta = \frac{[\mathrm{DsbBDsbA}]}{[\mathrm{DsbBDsbA}]_{max}} = \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}} \tag{2-3}$$

$$[\mathrm{DsbB}] = (1 - \theta)[\mathrm{DsbBDsbA}]_{max} \tag{2-4}$$

を用いると (2-2) 式は

$$\frac{d}{dt}[\mathrm{DsbBDsbA}] = k_{fwd}(1-\theta)[\mathrm{DsbBDsbA}]_{max}[\mathrm{DsbA}] - k_{rev}\theta[\mathrm{DsbBDsbA}]_{max} \tag{2-5}$$

$t \to \infty$ の平衡状態のときには、次式が成り立つ。

$$0 = k_{fwd}(1 - \theta_{t\to\infty})[\mathrm{DsbBDsbA}]_{max}[\mathrm{DsbA}]_{t\to\infty} - k_{rev}\theta_{t\to\infty}[\mathrm{DsbBDsbA}]_{max} \tag{2-6}$$

ここで $\theta_{t\to\infty}$ について解くと

$$\theta_{t\to\infty} = \frac{k_{fwd}[\mathrm{DsbA}]_{t\to\infty}}{k_{rev} + k_{fwd}[\mathrm{DsbA}]_{t\to\infty}} \tag{2-7}$$

また解離定数 K_d (M) は次式で表すことができる。

$$K_d = \frac{k_{rev}}{k_{fwd}} \tag{2-8}$$

(2-7) 式は、(2-3) 式、(2-8) 式より次式で表すことができる。

$$\frac{\Delta F_{t\to\infty}}{\Delta F_{max}} = \frac{[\mathrm{DsbA}]_{t\to\infty}}{K_d + [\mathrm{DsbA}]_{t\to\infty}} \tag{2-9}$$

また本研究の測定条件では、溶液中のゲスト分子(DsbA)は、基板上のホスト分子(DsbB)と比較して大過剰存在するので、次式の近似が成り立つ。

$$[\mathrm{DsbA}]_{t\to\infty} \fallingdotseq [\mathrm{DsbA}]_0 \tag{2-10}$$

よって (2-9) 式は次式で表すことができる。

$$\frac{\Delta F_{t\to\infty}}{\Delta F_{\max}} = \frac{[\mathrm{DsbA}]_0}{K_\mathrm{d}+[\mathrm{DsbA}]_0} \tag{2-11}$$

この式を変形すれば以下の式が成り立つ。

$$\Delta F_{t\to\infty} = \frac{\Delta F_{\max}[\mathrm{DsbA}]_0}{K_\mathrm{d}+[\mathrm{DsbA}]_0} \tag{2-12}$$

(2-12) 式を利用して、各酵素濃度での質量増加 ΔF を回帰分析することで飽和結合量 $\Delta F_{\max}$ 、解離定数 K_d を求めた。

(2) 緩和法

任意のゲスト(DsbA)濃度において、振動数変化（重量変化）量を経時的に測定する。結合速度定数 $k_{\mathrm{fwd}}(\mathrm{M^{-1}s^{-1}})$、解離速度定数 $k_{\mathrm{rev}}(\mathrm{s^{-1}})$ 、解離定数$K_\mathrm{d}(\mathrm{M^{-1}})$ が求められる。

二基質の平衡反応式は次式で表すことができる。

$$[\mathrm{DsbB}] + [\mathrm{DsbA}] \underset{k_{\mathrm{rev}}}{\overset{k_{\mathrm{fwd}}}{\rightleftharpoons}} [\mathrm{DsbBDsbA}] \tag{2-13}$$

ここで、[DsbB] は基板上の DsbB 濃度、[DsbA] は溶液中の DsbA 濃度、[DsbBDsbA] は生成した複合体の濃度、k_{fwd} は結合速度定数 $(\mathrm{M^{-1}\,s^{-1}})$、$k_{\mathrm{rev}}$ は解離速度定数 $(\mathrm{s^{-1}})$ を表している。複合体の生成速度は、次式により表すことができる。

$$\frac{d}{dt}[\mathrm{DsbBDsbA}] = k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbB}][\mathrm{DsbA}] - k_{\mathrm{rev}}[\mathrm{DsbBDsbA}] \tag{2-14}$$

DsbB 濃度 [DsbB] は初めの DsbB 濃度 $[\mathrm{DsbB}]_0$ を用いて以下のような式で表すことができる。

$$[\mathrm{DsbB}] = [\mathrm{DsbB}]_0 - [\mathrm{DsbBDsbA}] \tag{2-15}$$

この式を用いて、複合体の生成速度は次式のように変形できる。

$$\frac{d}{dt}[\mathrm{DsbBDsbA}] = k_{\mathrm{fwd}}([\mathrm{DsbB}]_0 - [\mathrm{DsbBDsbA}])[\mathrm{DsbA}] - k_{\mathrm{rev}}[\mathrm{DsbBDsbA}]$$
$$= k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbB}]_0[\mathrm{DsbA}] - [\mathrm{DsbBDsbA}](k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA}] + k_{\mathrm{rev}}) \quad (2\text{-}16)$$
$$= -(k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA}] + k_{\mathrm{rev}})([\mathrm{DsbBDsbA}] - \frac{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbB}]_0[\mathrm{DsbA}]}{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA}] + k_{\mathrm{rev}}})$$

ここで、

$$[\mathrm{DsbBDsbA}]^* = [\mathrm{DsbBDsbA}] - \frac{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbB}]_0[\mathrm{DsbA}]}{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA}] + k_{\mathrm{rev}}} \quad (2\text{-}17)$$

とすると

$$\frac{d}{dt}[\mathrm{DsbBDsbA}]^* = \frac{d}{dt}[\mathrm{DsbBDsbA}] \quad (2\text{-}18)$$

よって、(2-18) 式は次のようになる。

$$\frac{d}{dt}[\mathrm{DsbBDsbA}]^* = -(k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA}] + k_{\mathrm{rev}})[\mathrm{DsbBDsbA}]^* \quad (2\text{-}19)$$

この式を時間で積分することにより、以下の式が得られる。

$$[\mathrm{DsbBDsbA}]^* = Ae^{-\frac{1}{\tau}t} \quad (2\text{-}20)$$

$$\frac{1}{\tau} = k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA}] + k_{\mathrm{rev}} \quad (2\text{-}21)$$

$$[\mathrm{DsbBDsbA}] = \frac{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbB}]_0[\mathrm{DsbA}]}{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA}] + k_{\mathrm{rev}}} + Ae^{-\frac{1}{\tau}t} \quad (2\text{-}22)$$

ここで、$t = 0$ のとき、$[\mathrm{DsbBDsbA}] = 0$ ゆえ、

$$\mathrm{A} = -\frac{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbB}]_0[\mathrm{DsbA}]}{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA}] + k_{\mathrm{rev}}} \quad (2\text{-}23)$$

よって、複合体の生成濃度は以下の式となる。

$$[\mathrm{DsbBDsbA}] = \frac{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbB}]_0[\mathrm{DsbA}]}{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA}] + k_{\mathrm{rev}}}(1 - e^{-\frac{1}{\tau}t}) \quad (2\text{-}24)$$

ここで、$t \rightarrow \infty$のとき、

$$[\mathrm{DsbBDsbA}]_{t\rightarrow\infty} = \frac{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbB}]_0[\mathrm{DsbA}]}{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA}] + k_{\mathrm{rev}}}(1 - 0) \quad (2\text{-}25)$$

よって、

$$[\mathrm{DsbBDsbA}]=[\mathrm{DsbBDsbA}]_{t\to\infty}(1-e^{-\frac{1}{\tau}t}) \tag{2-26}$$

水晶発振子を用いた測定では、複合体の生成濃度を [DsbBDsbA] $\propto \Delta m \propto \Delta F$ として、

$$\Delta F = \Delta F_{\max}(1-e^{-\frac{1}{\tau}t}) \tag{2-27}$$

の経時変化を測定した結果を、(2-27) 式で回帰分析することにより緩和時間の逆数 $1/\tau$ が求められる。さまざまなゲスト(DsbA)濃度での複合体生成量の経時変化の結果を同様な方法で回帰分析し、その結果得られた各緩和時間の逆数 $1/\tau$ を求めた。

今回の測定では、

$$[\mathrm{DsbA}]_t \fallingdotseq [\mathrm{DsbA}]_0 \tag{2-28}$$

が成り立つので、各緩和時間の逆数 $1/\tau$ を添加したゲスト濃度 [DsbA]でプロットすることにより得られる直線から、(2-21) 式にしたがって傾きから k_{fwd} を、y 切片から k_{rev} を求めることができる。そして(2-8) 式 にあるように、k_{rev} を k_{fwd} で除することにより解離定数 K_{d} (M) を算出した。

2-6-2　チオール-ジスルフィド結合交換過程

DsbA (native)を添加した際に得られた QCM チャートを**図 2-79** に示す手法で解析し，結合速度定数（k_{fwd}），解離速度定数（k_{rev}），および触媒速度定数（k_{cat}）を求めた。

DsbA(native)と DsbB の間の反応は、Cys30(DsbA)による Cys104(DsbB)への求核攻撃が起こり（結合過程）、その後 Cys33(DsbA)による分子内求核反応によって、ジ

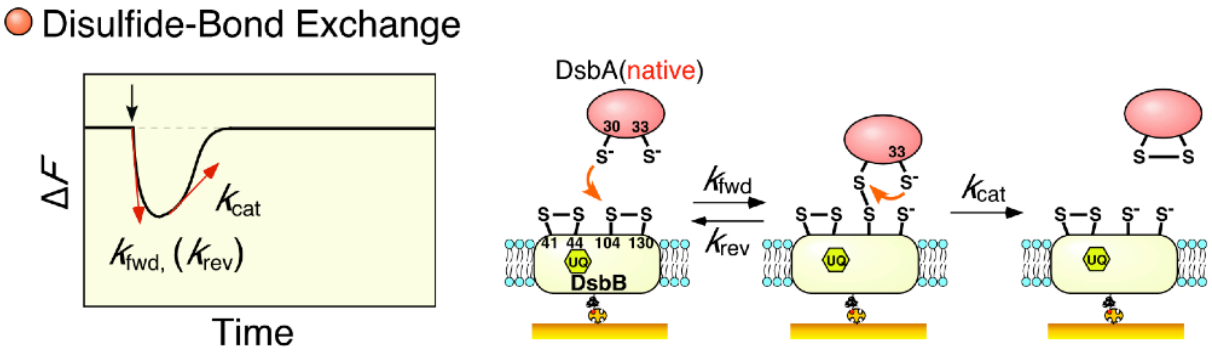


図 2-79：酵素－基質複合体生成過程の観察を伴う QCM チャートの動力学解析

スルフィド結合の開裂が引き起こされ（チオール－ジスルフィド結合交換過程)、（2-29）のように記述される。

$$DsbA_{red} + DsbB_{ox} \underset{k_{rev}}{\overset{k_{fwd}}{\rightleftharpoons}} DsbADsbB \xrightarrow{k_{cat}} DsbA_{ox} + DsbB_{red} \qquad (2\text{-}29)$$

ここで一連の反応における各因子の濃度の経時変化を表す式は

$$\frac{d}{dt}[DsbB_{ox}] = -k_{fwd}[DsbB_{ox}][DsbA_{red}] \qquad (2\text{-}30)$$

$$\frac{d}{dt}[DsbBDsbA] = k_{fwd}[DsbB_{ox}][DsbA_{red}] - (k_{rev} + k_{cat})[DsbBDsbA] \qquad (2\text{-}31)$$

$$\frac{d}{dt}[DsbB_{red}] = k_{cat}[DsbBDsbA] \qquad (2\text{-}32)$$

となる。ここで基板上での反応は酵素 (DsbA)大過剰（$[DsbA_{red}]>>[DsbB_{ox}]$）の条件であるため、

$$[DsbA] \approx [DsbA_{red}]_0 \qquad (2\text{-}33)$$

$$[DsbA_{red}]_0 >> [DsbA_{red}], [DsbBDsbA], [DsbA_{ox}] \qquad (2\text{-}34)$$

$$[DsbB_{ox}]_0 = [DsbB_{ox}] + [DsbBDsbA] + [DsbB_{red}] \qquad (2\text{-}35)$$

となる。式（2-31）の両辺を t で微分すると、

$$\frac{d^2}{dt^2}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] = k_{\mathrm{fwd}}\left[\mathrm{DsbA_{red}}\right]_0 \frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbB_{ox}}\right] - \left(k_{\mathrm{rev}} + k_{\mathrm{cat}}\right)\frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] \tag{2-36}$$

ここで、式(2-35)より、

$$\left[\mathrm{DsbB_{ox}}\right] = \left[\mathrm{DsbB_{ox}}\right]_0 - \left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] - \left[\mathrm{DsbB_{red}}\right] \tag{2-37}$$

の関係が成り立つ。式（2-37）の両辺を t で微分すると,

$$\frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbB_{ox}}\right] = -\frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] - \frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbB_{red}}\right] \tag{2-38}$$

となる。続いて式（2-32）を式（2-38）に代入すると,

$$\frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbB_{ox}}\right] = -\frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] - k_{\mathrm{cat}}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] \tag{2-39}$$

を得る。この式（2-39）を式（2-36）に代入すると

$$\frac{d^2}{dt^2}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] = -k_{\mathrm{fwd}}\left[\mathrm{DsbA_{red}}\right]_0\left(\frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] + k_{\mathrm{cat}}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right]\right) - \left(k_{\mathrm{rev}} + k_{\mathrm{cat}}\right)\frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right]$$

$$= -k_{\mathrm{fwd}}k_{\mathrm{cat}}\left[\mathrm{DsbA_{red}}\right]_0\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] - \left(k_{\mathrm{fwd}}\left[\mathrm{DsbA_{red}}\right]_0 + k_{\mathrm{rev}} + k_{\mathrm{cat}}\right)\frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right]$$

$$\Leftrightarrow \frac{d^2}{dt^2}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] + \left(k_{\mathrm{fwd}}\left[\mathrm{DsbA_{red}}\right]_0 + k_{\mathrm{rev}} + k_{\mathrm{cat}}\right)\frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] + k_{\mathrm{fwd}}k_{\mathrm{cat}}\left[\mathrm{DsbA_{red}}\right]_0\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] = 0$$

(2-40)

を得る。ここで,

$$A = k_{\mathrm{fwd}}\left[\mathrm{DsbA_{red}}\right]_0 + k_{\mathrm{rev}} + k_{\mathrm{cat}} \tag{2-41}$$

$$B = k_{\mathrm{fwd}}k_{\mathrm{cat}}\left[\mathrm{DsbA_{red}}\right]_0 \tag{2-42}$$

とおくと，式（2-40）は

$$\frac{d^2}{dt^2}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] + A\frac{d}{dt}\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] + B\left[\mathrm{DsbBDsbA}\right] = 0 \tag{2-43}$$

となり，典型的な 2 階線形微分方程式が得られる。初期条件 t = 0 において

$$[\mathrm{DsbBDsbA}] = 0 \tag{2-44}$$

$$\frac{d}{dt}[\mathrm{DsbBDsbA}] = k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbB_{ox}}]_0[\mathrm{DsbA_{red}}]_0 \tag{2-45}$$

よって，式（2-43）の解は，

$$[\mathrm{DsbBDsbA}] = M\left(e^{-Ft} - e^{-Gt}\right) \tag{2-46}$$

となる。ただし，

$$F = \frac{1}{2}\left(A - \sqrt{A^2 - 4B}\right) \tag{2-47}$$

$$G = \frac{1}{2}\left(A + \sqrt{A^2 - 4B}\right) \tag{2-48}$$

$$M = \frac{k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA_{red}}]_0[\mathrm{DsbB_{ox}}]_0}{G - F} \tag{2-49}$$

DsbA と DsbB で形成される複合体の量を測定し、(2-46)式でカーブフィッティングすることで、F と G を求めることができる。

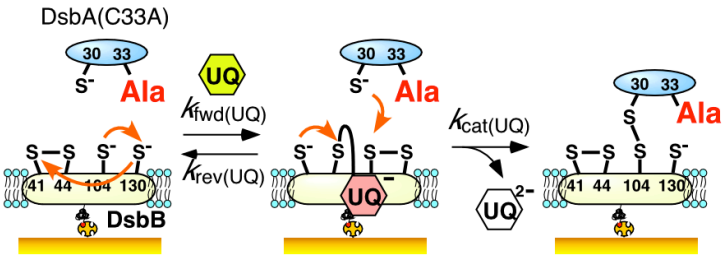
$$F + G(=A) = k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{DsbA_{red}}]_0 + k_{\mathrm{rev}} + k_{\mathrm{cat}} \tag{2-50}$$

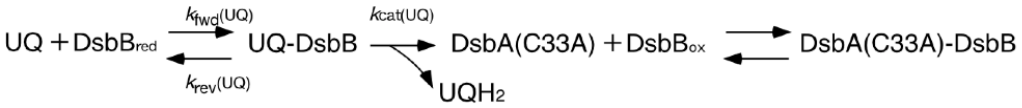
$$FG = k_{\mathrm{fwd}}k_{\mathrm{cat}}[\mathrm{DsbA_{red}}]_0 \tag{2-51}$$

本研究では$k_{\mathrm{cat}} >> k_{\mathrm{rev}}$としてカーブフィッティングを行い、$k_{\mathrm{fwd}}, k_{\mathrm{cat}}$を算出した。

2-6-3　ユビキノン依存的DsbB再酸化過程

ユビキノン(UQ)に依存的に進行するDsbBの再酸化反応(**図2-80**)について、以下に示す式が書ける。





(2-52)

図2-80：ユビキノン依存的に起こるDsbBの再酸化過程

ここで、上記の式において、UQがDsbBに結合する過程は、DsbA(C33A)がDsbBに結合することによる振動数変化として間接的に検出可能なので、UQがDsbBに結合する過程よりも十分速い場合には、このUQによるDsbBの酸化過程はミカエリス－メンテン式で解析できる。すなわち、式(2-52)における反応速度Vは、

$$V = \frac{V_{\max}[\mathrm{UQ}]}{K_{\mathrm{m}} + [\mathrm{UQ}]} \tag{2-53}$$

と書ける。

QCMチャートにおける初速度は、[Hz/sec]という単位で表されるが、DsbA(C33A)とDsbBの結合において、飽和結合量を$\Delta F_{\max}$とすれば、k_{cat}は、初速度を飽和結合量で除した値として導出することができる。

また、k_{fwd}の値は、系内に添加したUQ1濃度における初速度の値をA[Hz/sec]とすると、$k_{\mathrm{fwd}}[\mathrm{UQ1}] = A/\Delta F_{\max}$となるため、$k_{\mathrm{fwd}}$の値を求めることができる。

2-7　DsbB による DsbA 酸化反応の動力学解析

2-7-1　脂質二分子膜置換系および DDM 可溶化系における DsbB と DsbA の結合過程の比較

DsbA(C33A)の添加濃度を種々に変化させて、脂質二分子膜置換系における DsbB と DsbA(C33A)の結合過程の動力学解析を飽和法と緩和法により行った。式(2-27)に従って、回帰分析した結果を**図 2-81** に示した。得られた各ΔF を添加した DsbA(C33A)濃度に対してプロットした結果を**図 2-82(左)**に示した。式(2-12)を用いて回帰分析して、飽和結合量ΔF_{max}、解離定数 K_d を求めた。また、得られた各緩和時間の逆数 $1 / \tau$ を添加した DsbA(C33A)濃度に対してプロットした結果を**図 2-82(右)**に示した。式(2-21)に従って、傾きから k_{fwd} を、y 切片から k_{rev} を求めた。さらに k_{rev} を k_{fwd} で除することにより、解離定数 K_d を求め、**表 2-11** にまとめた。

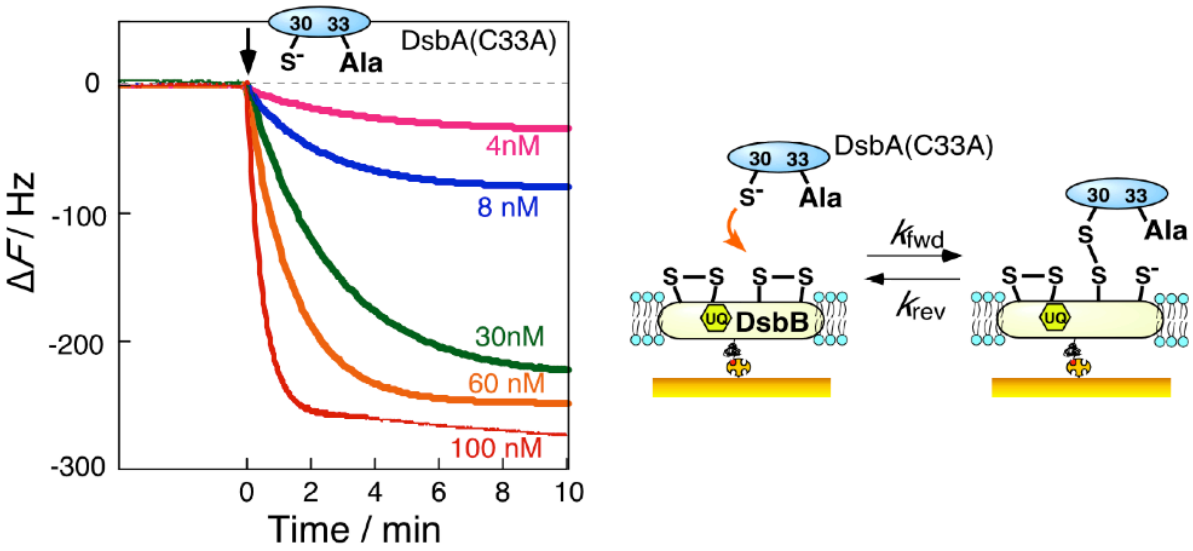


図 2-81：脂質膜置換系における DsbA(C33A)個別添加に対する DsbB との結合の振動数変化のカーブフィッティング 50 mM Citrate, pH 6, 100 mM NaCl, 25 °C

次に DDM 可溶化条件下での DsbA と DsbB の結合過程の動力学解析を行った。

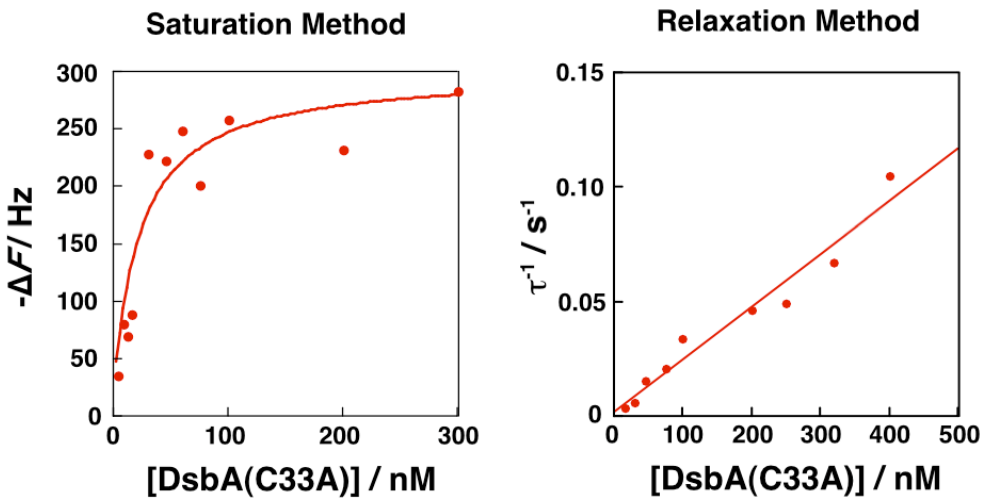


図 2-82:脂質膜置換系における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の飽和法と緩和法を利用した動力学解析 50 mM Citrate, pH 6, 100 mM NaCl, 25 °C

(左)飽和曲線近似によるプロット、(右)添加した DsbA(C33A)濃度に対する緩和時間の逆数プロット

本来の環境である脂質二分子膜内に存在する場合と、界面活性剤存在下とで、膜タンパク質 DsbB の活性に影響が現れるのか調べた。DsbA(C33A)個別添加の結果、得られたチャートについて、結合が 1 種類ではなく、速い成分(界面活性剤非依存的)と遅い成分(界面活性剤依存的)の 2 種類存在するとしてフィッティングを行った(図 2-83、図 2-84)。

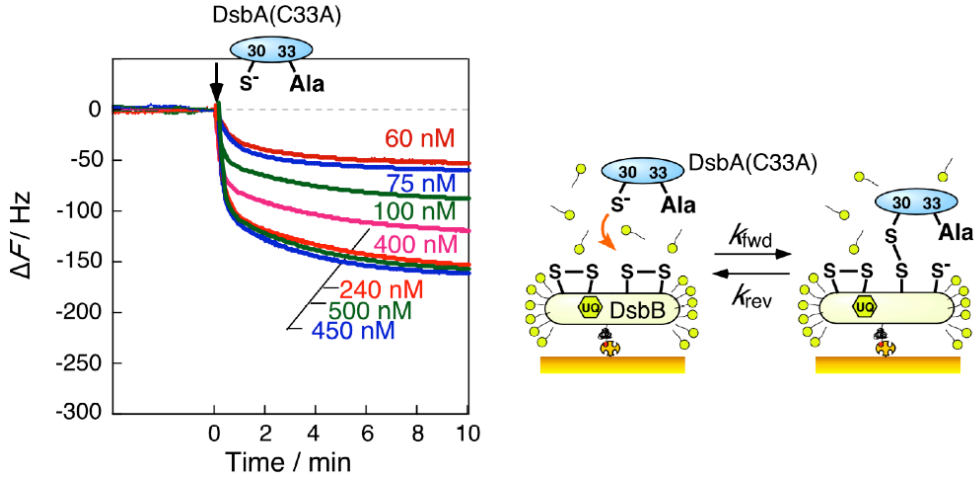


図 2-83：DDM 可溶化系における DsbA(C33A)個別添加に対する DsbB との結合の振動数変化のカーブフィッティング

50 mM Citrate, pH 6, 100 mM NaCl, 0.1% DDM, 25 °C

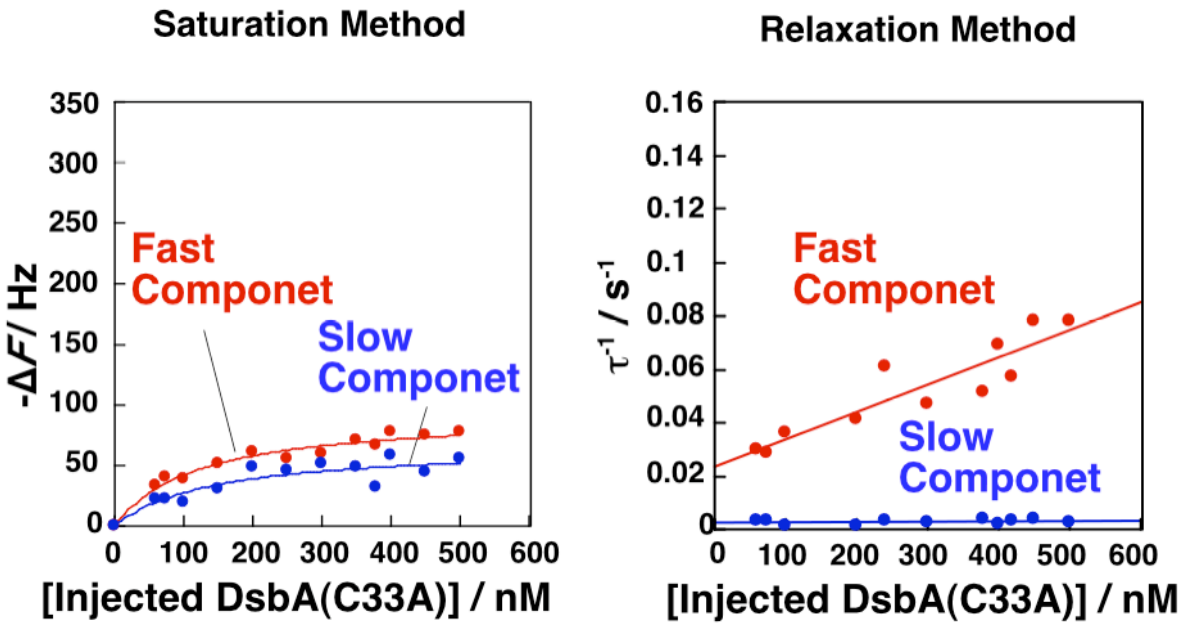


図 2-84：DDM 可溶化系における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の飽和法と緩和法による動力学解析 50 mM Citrate, pH 6, 100 mM NaCl, 0.1% DDM, 25 °C

(左)飽和曲線近似によるプロット、(右)添加した DsbA(C33A)濃度に対する緩和時間の逆数プロット

以下の表 2-11 に DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の脂質置換系と DDM 可溶化系の動力学定数をまとめた。

表 2-11：DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の脂質置換系と DDM 可溶化系の動力学定数の比較　50 mM Citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl, 25 °C.

			k_{fwd} / 10^5 M^{-1} s^{-1}	k_{rev} / 10^{-2} s^{-1}	K_d / nM
DsbA(C33A) 30 33 S⁻ Ala S–S S–S UQ	in bilayer		2.8	0.13	22
DsbA(C33A) 30 33 S⁻ Ala S–S S–S UQ	in DDM	fast (58%)	1.0	2.3	230
		slow (42%)	0.01	0.2	2000

以下の**図 2-85** に示したように、脂質膜置換系と比較し、DDM 可溶化系では、非特異結合に由来すると考えられる遅い成分が存在することが分かった。また、速い成分で比較すると、DDM 可溶化系では脂質膜置換系に比べ 20 倍ほど k_{rev} が大きいことが分かった。

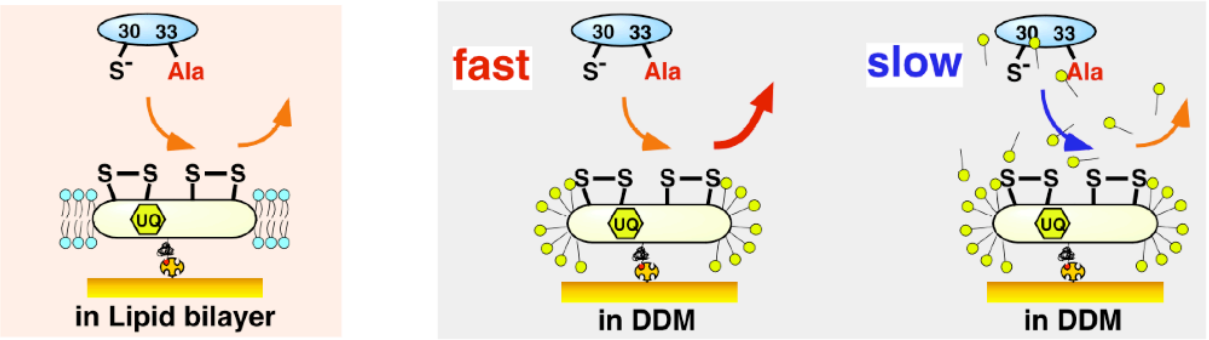


図 2-85：pH 6.0, 25 °C における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の脂質置換系と DDM 可溶化系の動力学定数の比較

2-7-2　脂質二分子膜埋め込み DsbB と DsbA のチオール–ジスルフィド交換過程

DsbA(native)の添加濃度を種々に変化させて、DsbB とのチオール–ジスルフィド交換過程の動力学解析を行った。酸化型 DsbA(native)と DsbB(native)の反応チャートを非特異結合由来のリファレンスとして、それらを還元型 DsbA(native)と DsbB(native)のチャートから差し引いたものを解析対象とした(**図 2-86**)。式(2-46)に従って、回帰分析した結果を**図 2-87** に示した。

図 2-88 に脂質膜置換系での DsbA(C33A)と DsbB の結合過程および DsbA(native)と DsbB のチオール-ジスルフィド結合交換反応の動力学パラメータをまとめた。DsbA(C33A)変異体および DsbA(native)の DsbB との結合速度定数 k_{fwd} の値を比較すると、近い値であることから、DsbA に変異を導入しても活性は維持されていると考えられる。また、k_{cat} の値に対して k_{rev} の値は 60 倍ほど小さく、DsbA と DsbB の複合体が形成されると、DsbA が酸化される方向に反応が進行することがわかった。

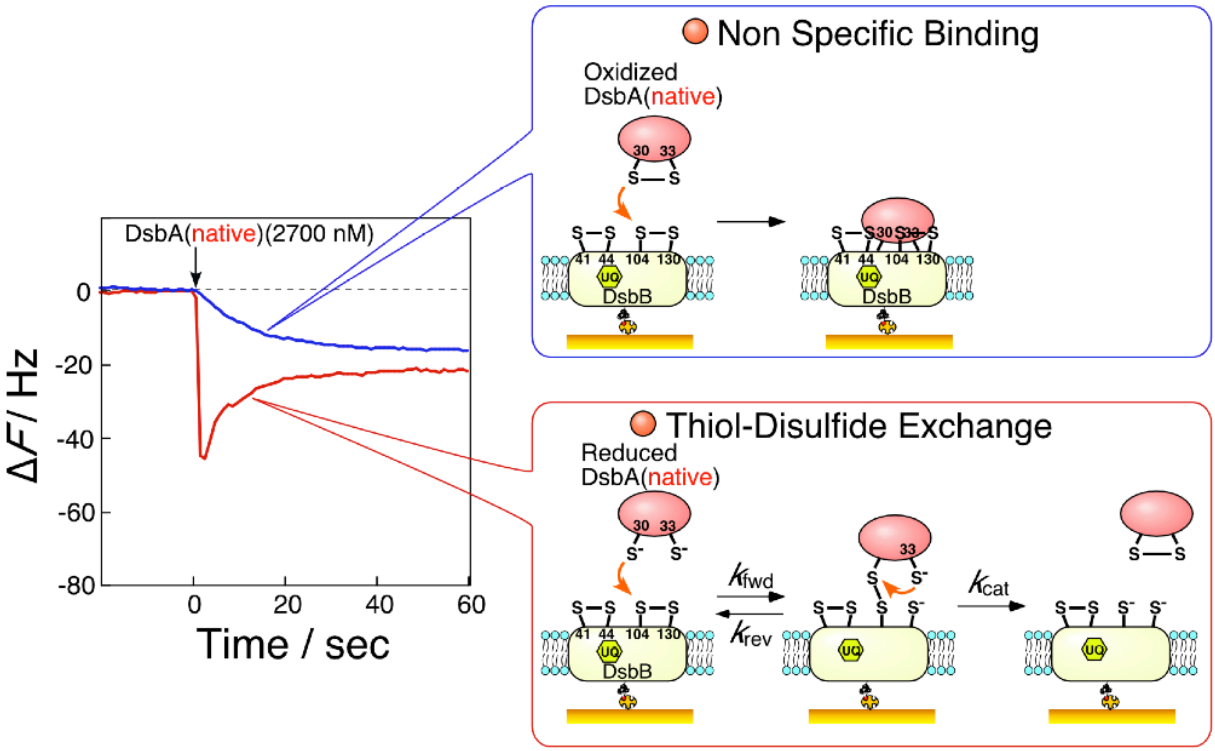


図 2-86：脂質置換系での還元型および酸化型 DsbA(native)と DsbB のチオール-ジスルフィド結合交換における反応チャート

50 mM Citrate, pH 6, 100 mM NaCl, 25 °C

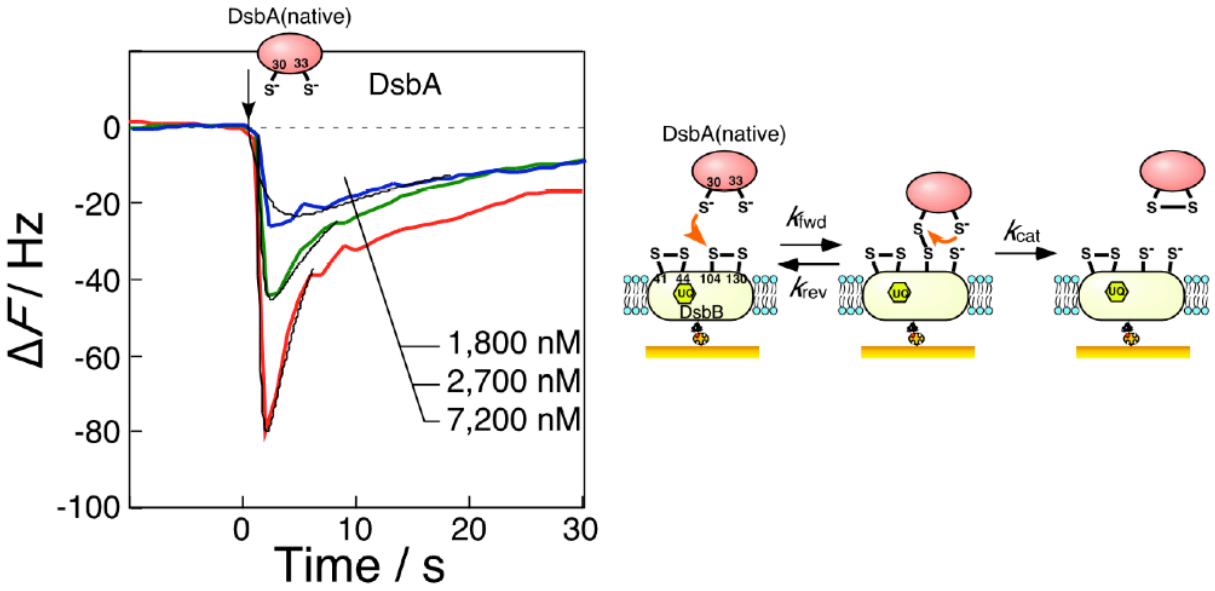


図 2-87：脂質置換系での DsbA(native)と DsbB のチオール-ジスルフィド結合交換における反応チャートのカーブフィッティング

50 mM Citrate, pH 6, 100 mM NaCl, 25 °C

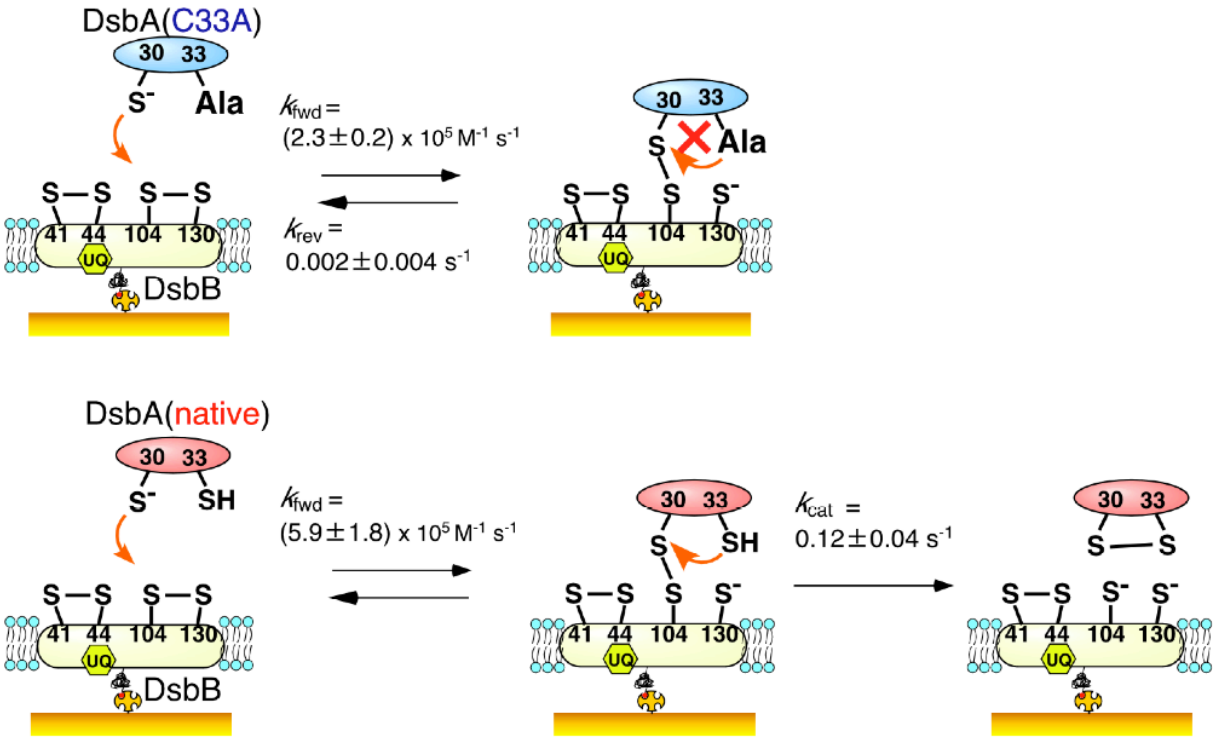


図 2-88：脂質膜置換系での DsbA(C33A)と DsbB の結合過程および DsbA(native)と DsbB のチオール-ジスルフィド結合交換反応の動力学パラメータ

2-7-3　ユビキノンによる DsbB 再酸化過程

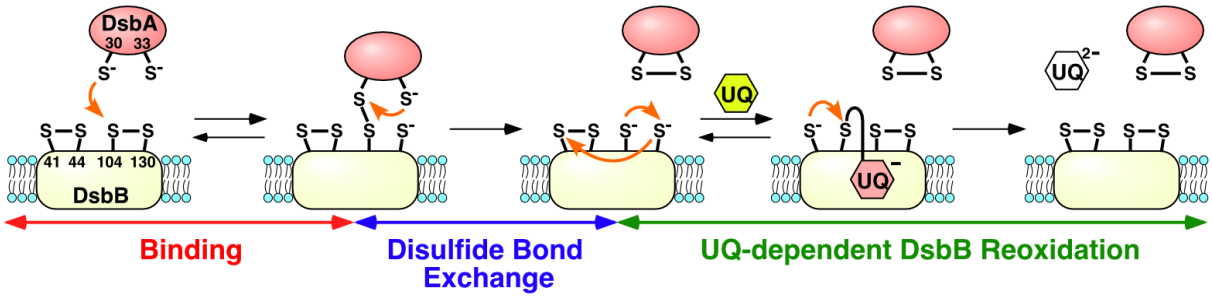


図 2-89：大腸菌細胞内で起こる DsbB による DsbA の再酸化サイクル

大腸菌細胞内で起こるタンパク質ジスルフィド結合形成において、フォールディング途上のタンパク質を DsbA が酸化し、還元型となった DsbA を DsbB が再酸化する。その後さらに DsbB を再酸化する働きをするのが、大腸菌細胞膜に内在するユビキノン-8 である[1]。ここでは、ユビキノンによる DsbB の再酸化過程(図 2-89)

について、水晶発振子を用いて観察した。

(1)ユビキノン 1(UQ1)存在下における DsbA (native)の反応性の変化

大腸菌細胞内に存在する DsbB には膜内在性のユビキノン(UQ8)が DsbB とラウロイルサルコシンのような強力な界面活性剤でも除去できないほど強固に結合している [1]。本研究で使用している DsbB は、大腸菌で発現させたものであるので、ユビキノンが結合した状態で調製していることになる。そこで本研究で QCM を用いて観察した DsbA と DsbB の反応は、呼吸鎖成分ユビキノンと DsbA、DsbB が協同で働くことで 1 サイクル半の turnover が起こっていると考えられる(図 2-90)。

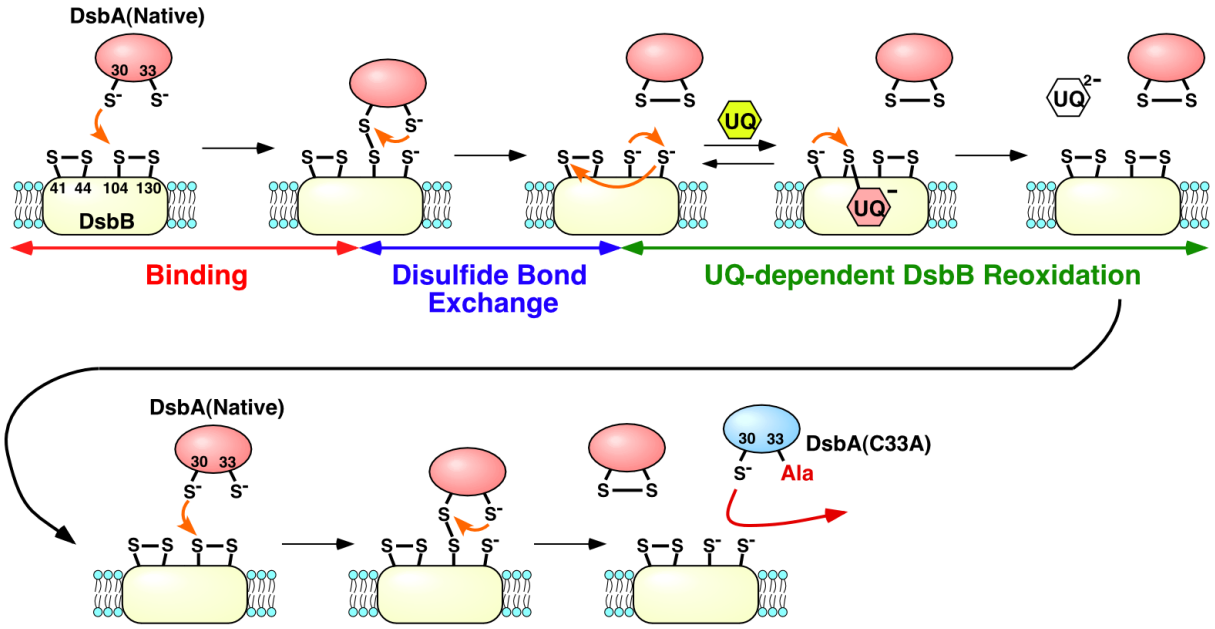


図 2-90：本研究の実験系の DsbB による DsbA 再酸化過程とユビキノンの関係

今回の実験系において、大腸菌の内膜に内在性のユビキノン 8 が DsbB に対して 1 当量結合していた場合、DsbB による DsbA の再酸化反応は 1.5 サイクル進行する。

上記のスキームより、仮に系内にユビキノンを添加すれば、添加したユビキノンによる DsbB の再酸化反応が進行し、DsbA(C33A)との結合活性を取り戻すと考えられる。ここでは、まず系内に添加するユビキノンとして、文献 [1, 15] で使用されて

いたユビキノンの水溶性アナログである UQ1(イソプレン骨格 1 つ)を QCM セル内に過剰に加えた場合の実験を行った。

ユビキノンの水溶性アナログである UQ1 を系内に過剰量存在させた場合、DsbA(native)と反応後の DsbB は、DsbA(C33A)との活性を有していたことがわかった(図 2-91)。これは、DsbA(native)と反応後の DsbB は Cys104、Cys130 が還元型になっていたが、UQ1 によって再酸化されたことで DsbA(C33A)との反応性を回復したと考えられる。

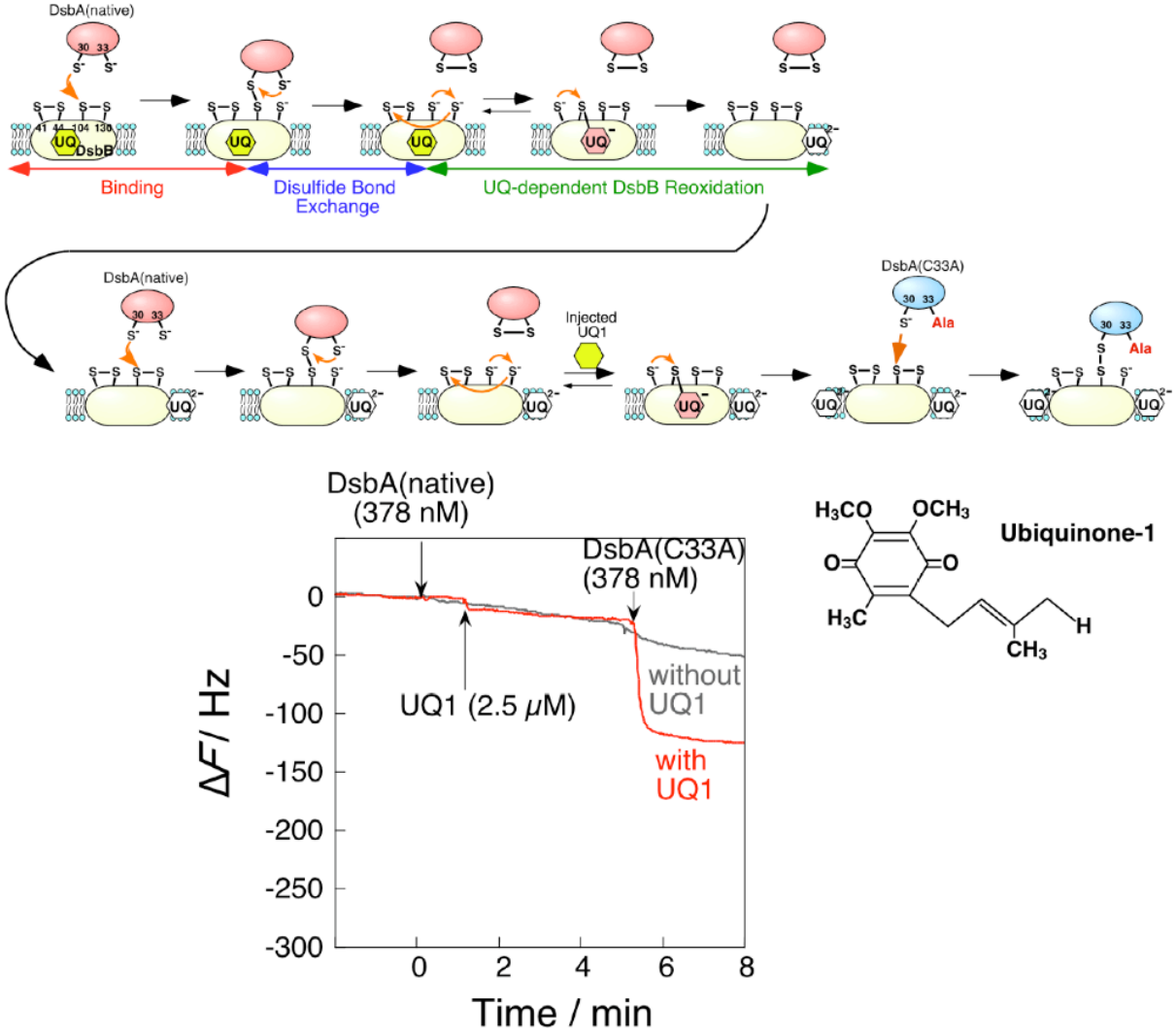


図 2-91：DsbA(native)を添加後に UQ1 を終濃度 2.5 μM で加えた場合の DsbB の再酸化効果

50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, at 25 °C

(2) ユビキノンによる DsbB の再酸化過程の動力学解析

ユビキノン依存的に起こる DsbB の再酸化過程の動力学解析を行うため、ユビキノンの水溶性アナログであるユビキノン-1(UQ1)を用いて、UQ1 の添加濃度を種々に変化させて、動力学解析を行った(図 2-92)。

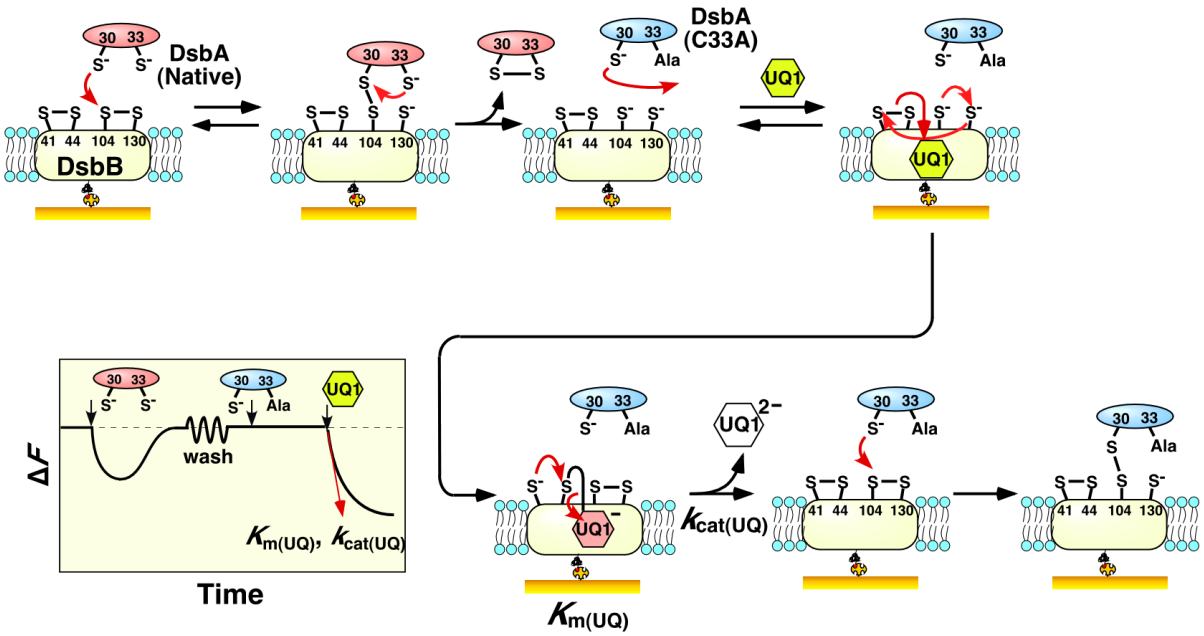


図 2-92：ユビキノンによる DsbB 再酸化過程をミカエリス・メンテン解析するための実験系の構築

BCCP-DsbB を 2000 Hz 固定化後、脂質膜置換した QCM 基板に DsbA(native)を加えたことで、1 サイクル半のターンオーバーが起こり、DsbB の Cys104 は還元型となっていると考えられる。その後、系内を wash することで反応系から DsbA(native)を除いた後で DsbB(C33A)を加えると、振動数変化が生じた(データは示していない)。これは、DsbA(native)と反応しなかった、DsbB が残存していたことによると考えられる。その後、UQ1 を添加すると、DsbB が UQ1 によって酸化されたことにより、DsbA(C33A)との結合活性を回復したことに伴う振動数減少が観察された。その QCM チャートを図 2-93 に示した。

UQ1 個別添加における振動数変化のチャートから、反応の初速度を求めた。しかし、今回の実験結果においては UQ1 と反応可能な DsbB の割合は個々のセルによって異なっているので(DsbA(C33A)と反応した DsbB は UQ1 との反応には関与できない)、その分を補正した初速度を求めた。

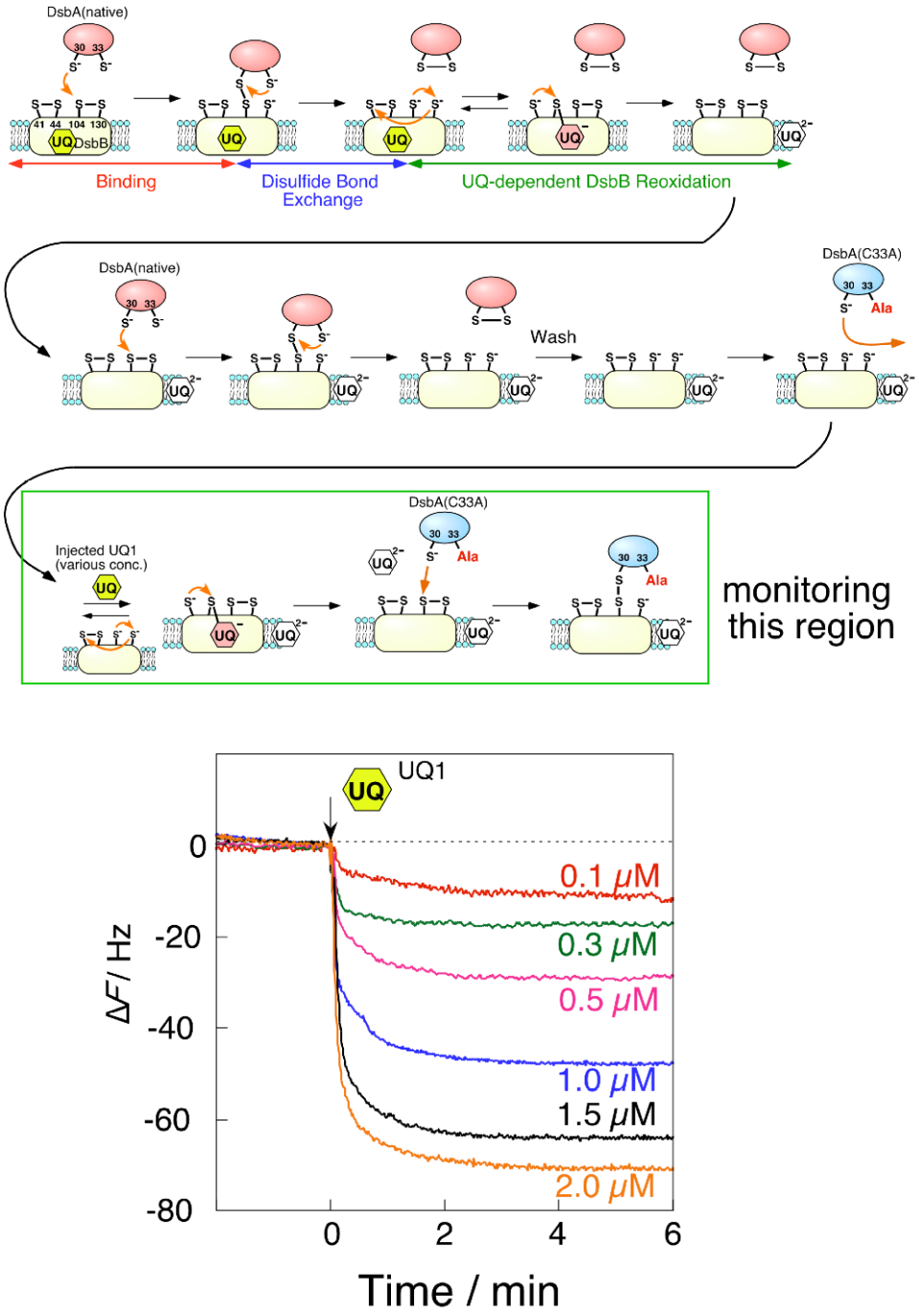


図 2-93：QCM セル内への UQ1 個別添加における振動数変化の様子

50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, at 25 °C

具体的には、

$$(\text{初速度}) = (\text{チャートから求めた初速度}) \times \frac{(\text{DsbA(C33A)とDsbBの飽和結合量316 Hz}) - (\text{DsbA(C33A)添加による振動数変化})}{(\text{DsbA(C33A)とDsbBの飽和結合量316 Hz})}$$

として算出した。図 2-94 に反応の初速度の UQ1 添加濃度に対するプロットを示した。

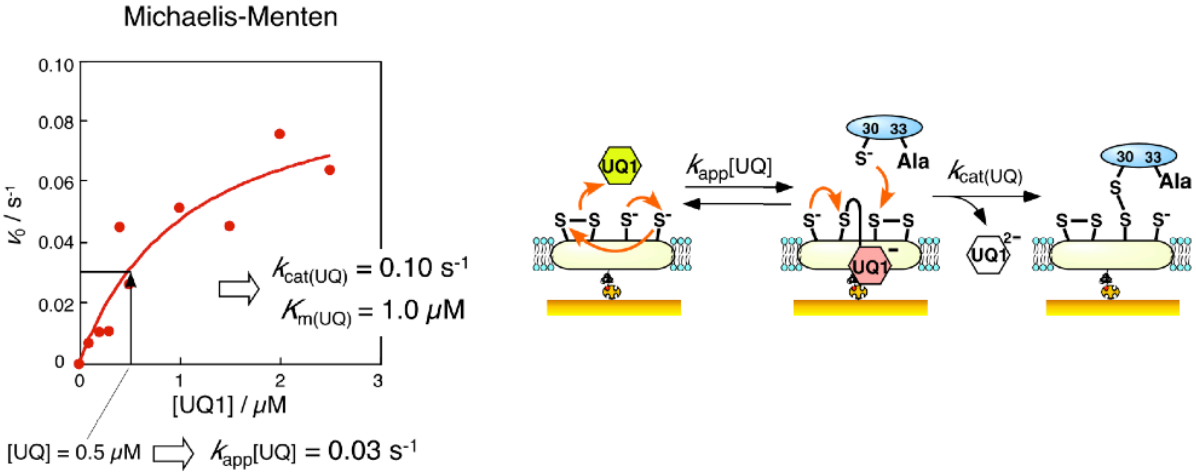


図 2-94：初速度の UQ1 添加濃度に対するプロット

図 2-94 のプロットから、K_m=1.1 μM と算出し、また、反応速度定数 k_{fwd} については、k_{fwd}[UQ1]=([UQ1]のときの初速度) / (100%反応したときの結合量)として[UQ1]=0.5 μM のとき、k_{fwd}[UQ1]=2/316 s^{-1} として k_{fwd} = 1.3×10^4 M^{-1} s^{-1} を得た。ここで本測定系において、k_{fwd}[UQ1]=6.3×10^{-3} s^{-1} となり、DsbA が DsbB に結合する過程の $k_{fwd(DsbA(C33A)-DsbB)}$[DsbA(C33A)]=0.1 s^{-1} に比べて小さく、本測定系において UQ1 依存的な DsbB の再酸化過程をミカエリス解析するための条件を満たしていることがわかる。UQ1 の DsbB への親和性を表す K_m 値は文献(1 μM)[15] とほぼ同じになった。また、k_{fwd} の値は DsbA と DsbB の結合過程の値と比較して 10 倍小さいことが分かった。

2-8　結言

本章では、水晶発振子上において、膜タンパク質 DsbB とリガンドである DsbA との間で起こる S-S 結合形成反応を質量変化として検出する実験系を構築した。まず、DsbA およびその変異体の調製を行い、Peptide Mass Fingerprint 法によって、DsbA の同定および、DsbA 変異体に目的の変異が導入されていることを確認した。また、膜タンパク質 DsbB および biotinyl-DsbB、BCCP-DsbB の調製を行った。調製した DsbA と DsbB を用いて、SDS-PAGE を行い、DsbA および DsbB 共に活性を確認することができた。さらに、膜タンパク質 DsbB の QCM 金基板への固定化方法について検討した。種々の方法を試した結果、ビオチンが C 末端に付加している BCCP-DsbB と QCM 基板上のアビジンとの間の相互作用を利用し、DsbB の C 末端側を基板上に固定化した後で、当研究室で以前確立された基板上への脂質膜作製法にならって、DsbB の周囲を脂質膜で置換した。*D* 値測定、乾燥重量測定、アビジンの一層吸着実験などによる二分子膜形成の確認実験を行ったところ、QCM 基板上に DsbB が平面脂質膜内に埋め込まれて存在していることが分かった。従来行われてきた膜タンパク質 DsbB を界面活性剤 DDM で可溶化した実験系に比べて、DsbB の周囲の界面活性剤を脂質膜で置換した実験系では、DsbA との結合量が増加した。このことから DsbA と DsbB との相互作用観察するためには、DDM 存在下ではなく、より *in vivo* 条件に近い、脂質膜置換系で行うことの有用性が示された。DsbA と DsbB との反応において、DsbA(C33A)と DsbB とはジスルフィド結合によって複合体を形成することが確認できた一方で、DsbA(C30A)と DsbB との結合は観察されなかったことから、DsbA と DsbB のあいだのジスルフィド結合以外の非特異結合がほとんどないことが確認された。DsbA(native)と DsbB を反応させ

たところ、結合に伴う振動数減少およびチオール-ジスルフィド交換に伴う振動数上昇が観察され、DsbB が活性を有していることが分かった。その後、DsbA と DsbB の反応について、QCM を用いて得られたチャートから動力学解析を行った。従来行われてきた吸光度測定、SDS-PAGE 解析などによる DsbA と DsbB の反応解析で求めることのできなかった速度論的パラメータについて、本章では、質量変化という観点から分子間相互作用をリアルタイムモニタリングする水晶発振子を用いて DsbB を平面脂質二分子膜に埋め込んだ状態で DsbA との反応解析を行うことができた。

第 2 章　参考文献

1）K. Inaba, Y. Takahashi, and K. Ito, *J. Biol Chem*, **280**, 33035-33044 (2005).

2）H. Kadokura, H. Tian, T. Zander, J. C. Bardwell, and J. Beckwith, *Science,* **303**, 534–537 (2004).

3）H. Kadokura and J. Beckwith, *EMBO J*, **21**, 2354-2363 (2002).

4）M. Bader, W. Muse, T. Zander, and J. Bardwell, *J. Biol. Chem.*, **273**, 10302-10307 (1998).

5）M. Bader, W. Muse, D. Ballou, and C. Gassner, *Cell*, **98**, 217-227 (1999).

6）磯部英美, 修士論文, 東京工業大学 (2007).

7) M. Wunderlich and R. Glockshuber, *Protein Science*, **2**, 717-726 (1993).

8) 小松真友, 修士論文, 東京工業大学 (2005).

9) 石津縁, 修士論文, 東京工業大学 (2005).

10) 野村 M.慎一郎, 細胞機能の実空間モデリング, 生物物理, **48**, 174-179 (2008).

11) M. Kaneda, S. Nomura, S. Ichinose, S. Kondo, K. Nakahama, K. Akiyoshi, and I. Morita, *Biomaterials*, **30**, 3971-3977 (2009).

12) F. Katzen, J. Fletcher, J. Yang, D. Kang, T. Peterson, J. Cappuccio, C. Blanchette, T. Sulchek, B. Chromy, P. Hoeprich, M. Coleman, and W. Kudlicki, *J. Proteome Res.*, **7**, 3535–3542 (2008).

13) 工藤恭彦, 修士論文, 東京工業大学 (2009).

14) 三友秀之, 博士論文, 東京工業大学 (2007).

15) H. Kadokura, M. Bader, H. Tian, J.C. Bardwell, and J. Beckwith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10884–10889 (2000).

16) 森田貴之, 修士論文, 東京工業大学 (2007).

17) 小関智光, 博士論文, 東京工業大学 (2006).

18) MembraneMax™ Protein Expression Kits プロトコール, Invitrogen (2012)

第 3 章　DsbB による DsbA 酸化反応機構の解明

3-1　緒言

DsbB による DsbA の酸化反応は、DsbB のジスルフィド結合(S–S)と DsbA のチオール基(–SH)とのあいだで進行する単純なチオール-ジスルフィド交換反応であるため、DsbA からユビキノンへの電子移動反応を媒介するのであれば、DsbB には一組のシステインペアが存在すれば十分と考えられる。しかし、実際には DsbB は 2 組のシステインペアを有しており、DsbB の 4 つのシステインが DsbA の酸化過程においてどのように関わるのか議論が続いている[1]。さらに、**図 3-1** に示したように DsbA と DsbB の酸化還元電位はそれぞれ、-120 mV, -224 mV(Cys104-Cys130), -207 mV(Cys41-Cys44)と測定されており、DsbA は DsbB よりも酸化的であるのに、DsbB によって DsbA が酸化される現象の矛盾が指摘されてきた[1]。この回答として DsbB に付随して精製されるユビキノンの酸化還元電位が+110 mV であることから、ユビキノンが最終的に DsbB の酸化還元電位をより酸化的にしている可能性が挙げられたが、稲葉らが行ったユビキノン欠損 DsbB が DsbA を半当量ほど酸化した実験結果から、この可能性は否定された[1]。したがって、DsbB による DsbA の酸化経路を解明することは、酸化還元電位の観点からは説明できない DsbA から DsbB への電子の移動という妙技を解く鍵となると考えられる。DsbB による DsbA 酸化の反応機構については**図 3-2** に示したように Pathway I[1,2] と Pathway II[3,4] が提唱されており、どちらの Pathway においても DsbA の Cys30 のチオレートイオンによる DsbB

の Cys104 への求核攻撃がトリガーになる。Pathway I は DsbA と DsbB の中間体を形成したのち速やかに DsbA の Cys33 が分子内求核反応することで DsbA の酸化が進行し DsbB から離れていく反応経路であり、Pathway II は、DsbB 分子内の 4 つのシステイン残基間で S-S 交換反応が進行した後、DsbA と DsbB が複合体を形成した安定中間体を経て DsbA の酸化が進行する反応経路である [5]。本章では、QCM が基板上における酵素反応の反応中間体(ES Complex)を実時間で検出できる利点を生かし、**図 3-3** に示したように、QCM 上に DsbB あるいは DsbB の 4 つのシステインのうち 2 つを変異させた DsbB(C41A,C44A)を固定化し、DsbA を加えたときの振動数変化の経時変化から反応速度を求めた。ジスルフィド結合を 2 組有する DsbB(native)の場合、Pathway I と Pathway II の DsbA の酸化経路があると考えられるのに対し、DsbB(C41A,C44A)の場合には Pathway I の DsbA の酸化のみが進行すると考えられる。そこで、DsbA と DsbB の反応動力学解析を行い、結合速度定数 k_{fwd}, 逆反応速度定数 k_{rev}、触媒速度定数 k_{cat} の 3 つの速度定数を求めて、Pathway I か II のどちらの反応経路を通るのかについて考察した。

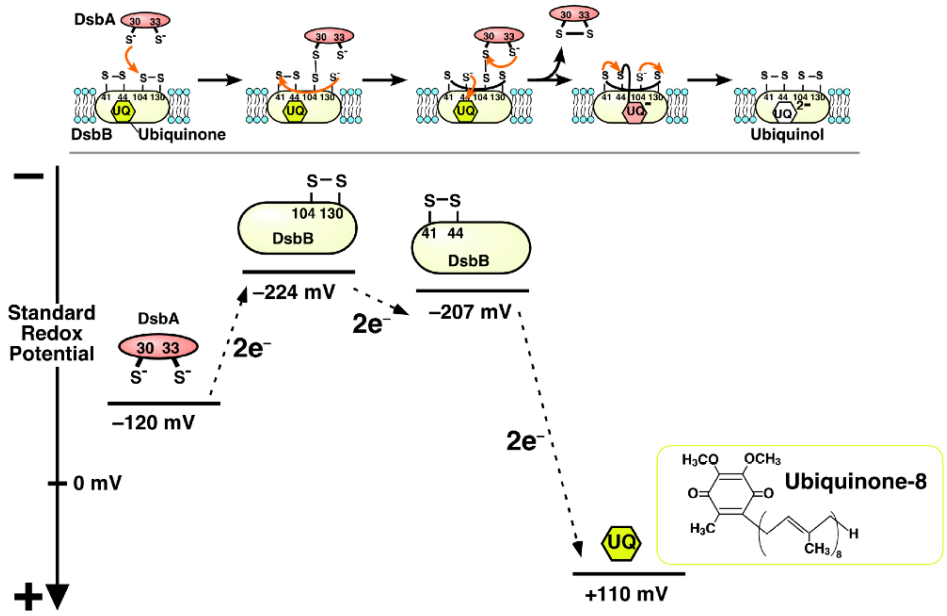


図 3-1：DsbA、DsbB およびユビキノンの酸化還元電位

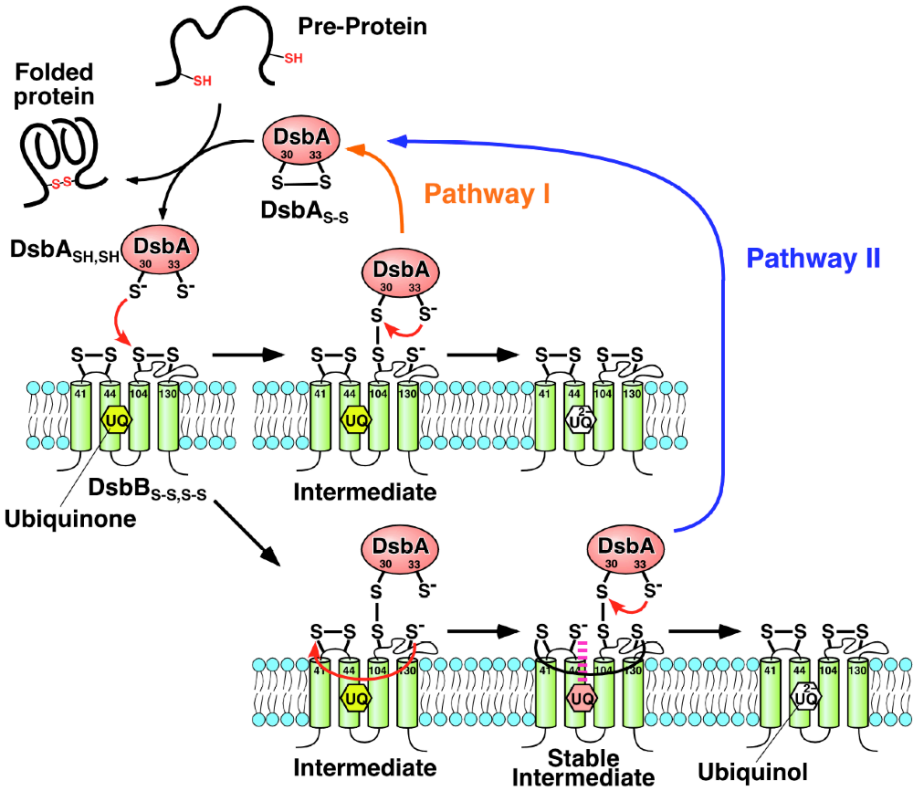


図 3-2：DsbB による DsbA 酸化において提唱されている 2 つの経路

DsbA と DsbB が結合後、DsbA 分子内求核反応が進行する Pathwayl と DsbB 分子内で異性化の過程を経る PathwayII

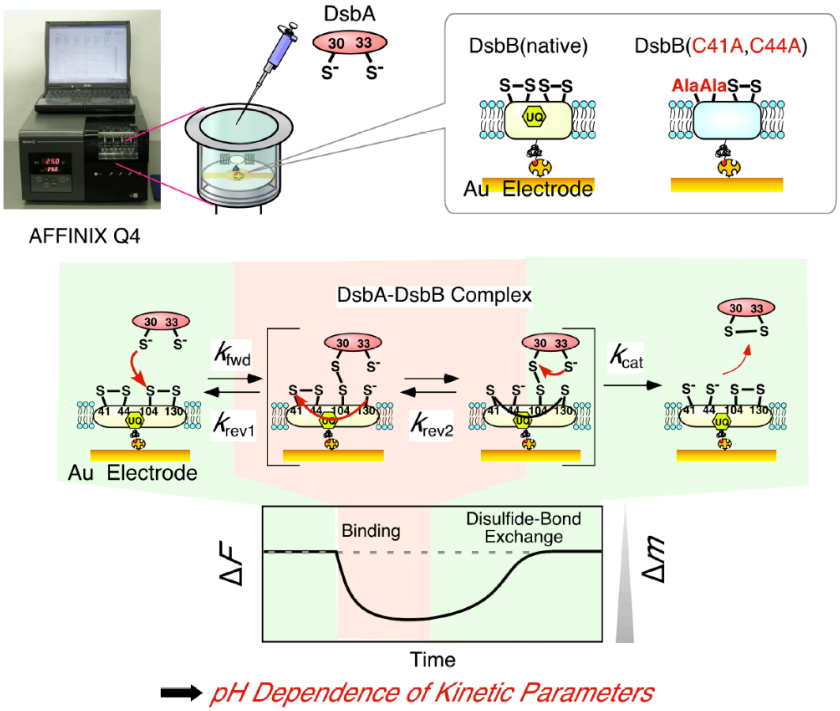


図 3-3：水晶発振子を用いた DsbA-DsbB 複合体形成に伴う振動数減少の観察

3-2　実験方法

3-2-1　試薬

4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-Disulfonic Acid, Disodium Salt (AMS) は Molecular Probe より購入した。ユビキノン-10 は和光純薬より購入した。シスチン、システイン、ジチオスレイトール(DTT)はナカライテスクより購入した。Trans-4,5-Dihydroxy-1,2-Dithiane(酸化型 DTT)は和光純薬より購入した。

3-2-2　BCCP-DsbB 変異体発現用ベクターの作製

BCCP-DsbB 変異体発現用のベクターである BCCP-DsbB(C41A), BCCP-DsbB(C44A), BCCP-DsbB(C104A), BCCP-DsbB(C130A) および BCCP-DsbB(C41AC44A) を作製した。QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社製)を用いて、**2-2 節**で作製したプラスミド pET22b-BCCP-DsbB に変異を導入し、変異導入プラスミド計 5 種類(BCCP-DsbB(C41A), BCCP-DsbB(C44A), BCCP-DsbB(C104A), BCCP-DsbB(C130A)、および、BCCP-DsbB(C41AC44A))を作製した。実験操作は、**2-2-5 節**で述べた方法で行った。ジデオキシ法を利用したシークエンス解読により変異導入を確認した。各変異体作製用の QuikChange 反応プライマーを以下に示した。

forward primer for BCCP-DsbB (C41A)
5’- GATGTTACTGAAACCTGCCGTGCTCTGTATTTATG -3’
reverse primer for BCCP-DsbB (C41A)
5’- CATAAATACAGAGCACGGCAGGTTTCAGTAACATC -3’
forward primer for BCCP-DsbB (C44A)
5’- GAAACCTTGCGTGCTCGCTATTTATGAACGCGTG -3’
reverse primer for BCCP-DsbB (C44A)

5’- CACGCGTTCATAAATAGCGAGCACGCAAGGTTTC -3’

forward primer for BCCP-DsbB (C104A)

5’-CTTCGCCGTTTGCCACCGCTGATTTTATGGTTCGTTTC -3’

reverse primer for BCCP-DsbB (C104A)

5’-GAAACGAACCATAAAATCAGCGGTGGCAAACGGCGAAG -3’

forward primer for BCCP-DsbB (C130A)

5’-GTCGCCTCTGGCGATGCCGCCGAGCGTCAGTCG -3’

reverse primer for BCCP-DsbB (C130A)

5’-CCACTGACGCTCGGCGGCATCGCCAGAGGCGAC-3’

forward primer for BCCP-DsbB (C41A,C44A)

5’-GAAACCTGCCGTGCTCGCTATTTATGAACGCGTG-3’

reverse primer for BCCP-DsbB (C41A,C44A)

5’-CACGCGTTCATAAATAGCGAGCACGGCAGGTTTC-3’

シークエンス解読により、正しく変異導入されていることを確認した。

3-2-3　BCCP-DsbB 変異体の発現および精製

5 種類の BCCP-DsbB 変異体 (BCCP-DsbB(C41A), BCCP-DsbB(C44A), BCCP-DsbB(C104A), BCCP-DsbB(C130A)、BCCP-DsbB(C41A,C44A))についても **2-2 節**の BCCP-DsbB(native)のときと同様に発現および精製を行った。N-NTA カラムおよびゲルろ過カラム精製のクロマトグラムおよび SDS-PAGE での確認、さらに収量について以下に述べた。BCCP-DsbB 変異体の C 末端の His-tag を利用して、Ni-NTA カラム精製を行った。精製方法は以下の通りである。

Column：HisTrap HP 5 mL（HiTrap Chelating HP 5 mL）
A buffer：50 mM sodium phosphate (pH6.0), 300 mM NaCl, 0.1% DDM
B buffer：50 mM sodium phosphate (pH6.0), 300 mM NaCl, 0.1%DDM, 500 mM imidazole
Flow rate：3.0 mL/min　Fraction Size：2.0 mL　Wash：2 CV
Elution：5% B：5 CV　　5→100% B(linear gradient)：20 CV　　100% B：5 CV
（＊CV = Column Volume）

BCCP-DsbB(C41A)の Ni-NTA カラム精製クロマトグラムを**図 3-4** に、SDS-PAGE の結果を**図 3-5** に示した。

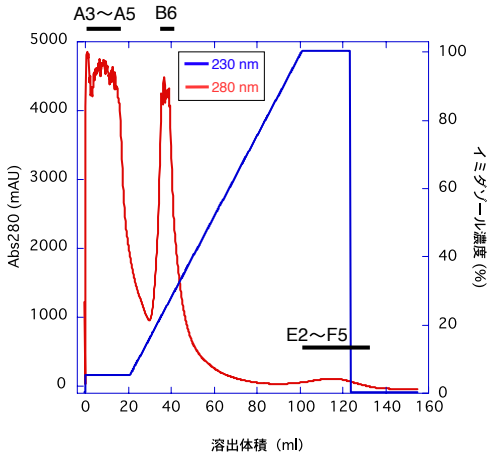
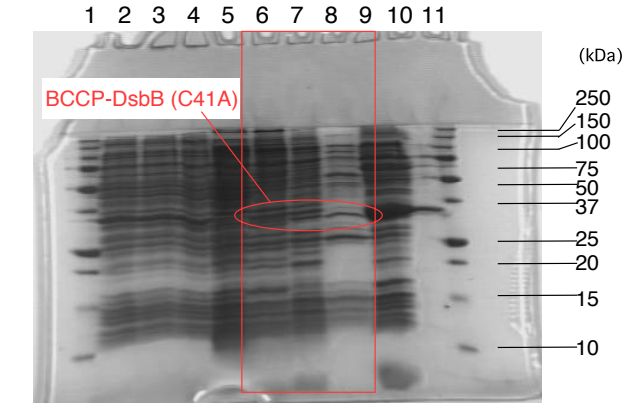


図 3-4：BCCP-DsbB(C41A)の Ni-NTA カラム精製のクロマトグラム



15%ポリアクリルアミドゲル、20 mA 60 min.、CBB染色
分子量マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstaind (Bio-Rad)

レーン 1：マーカー
レーン 2：4 時間培養 ITPG(＋)
レーン 3：4 時間培養 IPTG(＋)
レーン 4：4 時間培養 IPTG(＋)
レーン 5：100,000×g 超遠心上清
レーン 6：His-tag 精製溶出画分 A3
レーン 7：His-tag 精製溶出画分 A5
レーン 8：His-tag 精製溶出画分 B6
レーン 9：His-tag 精製フロースルー
レーン 10：His-tag 精製溶出画分
レーン 11：マーカー

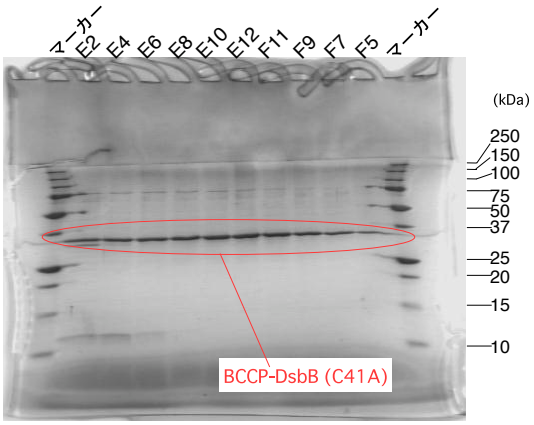


図 3-5：BCCP-DsbB (C41A)の His-tag 精製溶出画分の SDS-PAGE

15%ゲル、CBB 染色、マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstaind (Bio-Rad)

E2～F5 のサンプル計 38 mL をアミコンウルトラ-15（Molecular Weight Cut Off : 30,000）で濃縮し、4 °C, 20,000×g, 10 分間遠心後、上清を 1 mL ずつ、計 3 mL を 1 mL サンプルループを用いて 3 回に分けてアプライし、ゲル濾過精製を行った。カラムは予め Milli-Q 水 2 CV、ゲル濾過バッファー2 CV で洗浄した。ÄKTA purifier を使用し、精製方法は以下の通りに行った。

Column：HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade
Buffer：50 mM sodium phosphate (pH 6.0), 300 mM NaCl, 0.1% DDM
Flow rate：0.50 mL/min
Fraction Size：2.0 mL
Length of Elution：1.2 CV

ゲルろ過カラム精製クロマトグラムと SDS-PAGE の結果を**図 3-6** に示した。

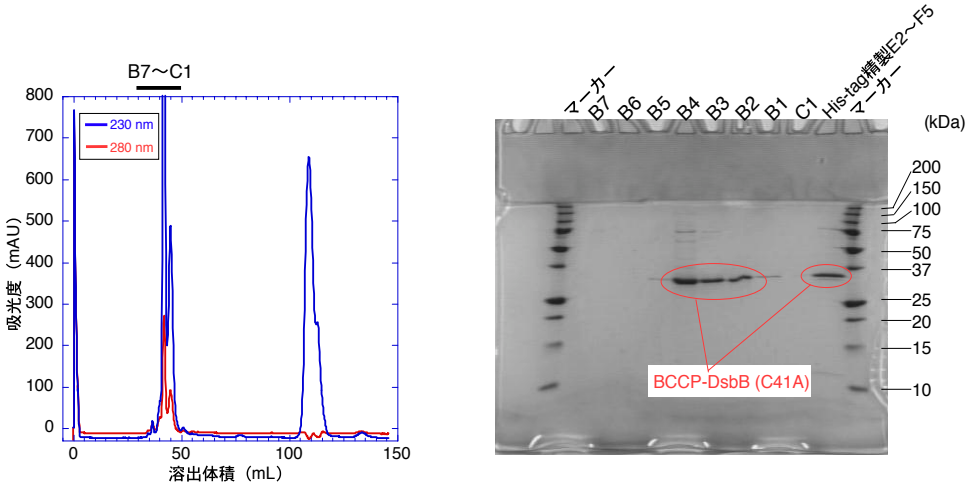


図 3-6：BCCP-DsbB (C41A)のゲル濾過カラム精製の溶出画分と SDS-PAGE

15%アクリルアミドゲル、20 mA, 60 min.、CBB 染色

マーカー：Precision Plus Protein Unstained Standards

B4, B3, B2 のフラクションを回収し、濃縮、定量を行った。他の BCCP-DsbB 変異体についても同様に調製した。

3-2-4　BCCP-DsbB 変異体の紫外吸光法による定量

紫外吸光法により、定量を行った。**表 3-1** に結果をまとめた。調製した BCCP-DsbB のうち、C104A 変異体だけがピンク色を呈していた。これは**図 3-7** に示したように DsbB の Cys130 が Cys104 とジスルフィド結合を形成できないために、Cys41–Cys44 間のジスルフィド結合に対して分子内求核反応を起こし、Cys44 に電子が移動することで、これまでに提唱されているユビキノンの電子状態遷移 [1,4] が起こっていると考えられる。

表 3-1：BCCP-DsbB 各変異体の紫外吸光法による定量結果

	C41A	C44A	C104A	C130A	C41A,C44A
濃度	83 μM	52 μM	151 μM	85 μM	80 μM
3 L の LB 培地での収量	1.0 mg	2.2 mg	2.6 mg	4.5 mg	12 mg

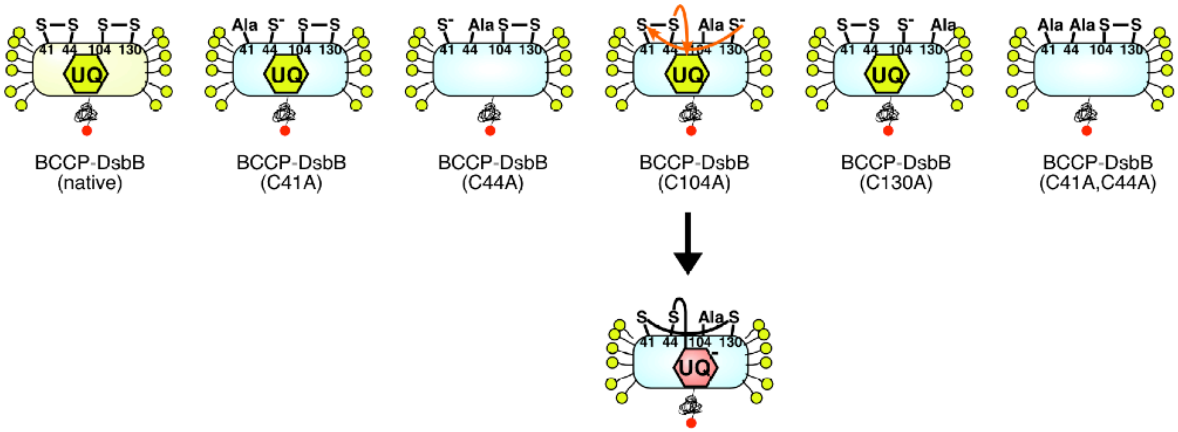


図 3-7：調製した BCCP-DsbB(native)および変異体のユビキノンとの電子状態

3-3　QCM を用いた DsbA と DsbB の中間複合体形成の評価

水晶発振子基板上に、ジスルフィド結合を 2 組有する野生型 DsbB(native)と 1 組有する DsbB(C41A,C44A)を固定化し、DsbA との反応挙動を観察した。**図 3-8** に示したように、DsbB による DsbA の酸化が Pathway I で進行する場合、両者で差が見られず、DsbA の添加に伴い DsbB の野生型と変異体で共に振動数減少の後、振動数上昇が起こると考えられる。一方、Pathway II が進行する場合、DsbB(native)の場合のみ振動数減少の後、振動数上昇が観察され、DsbB(C41A,C44A)の場合は振動数変化が起こらないと考えられる。

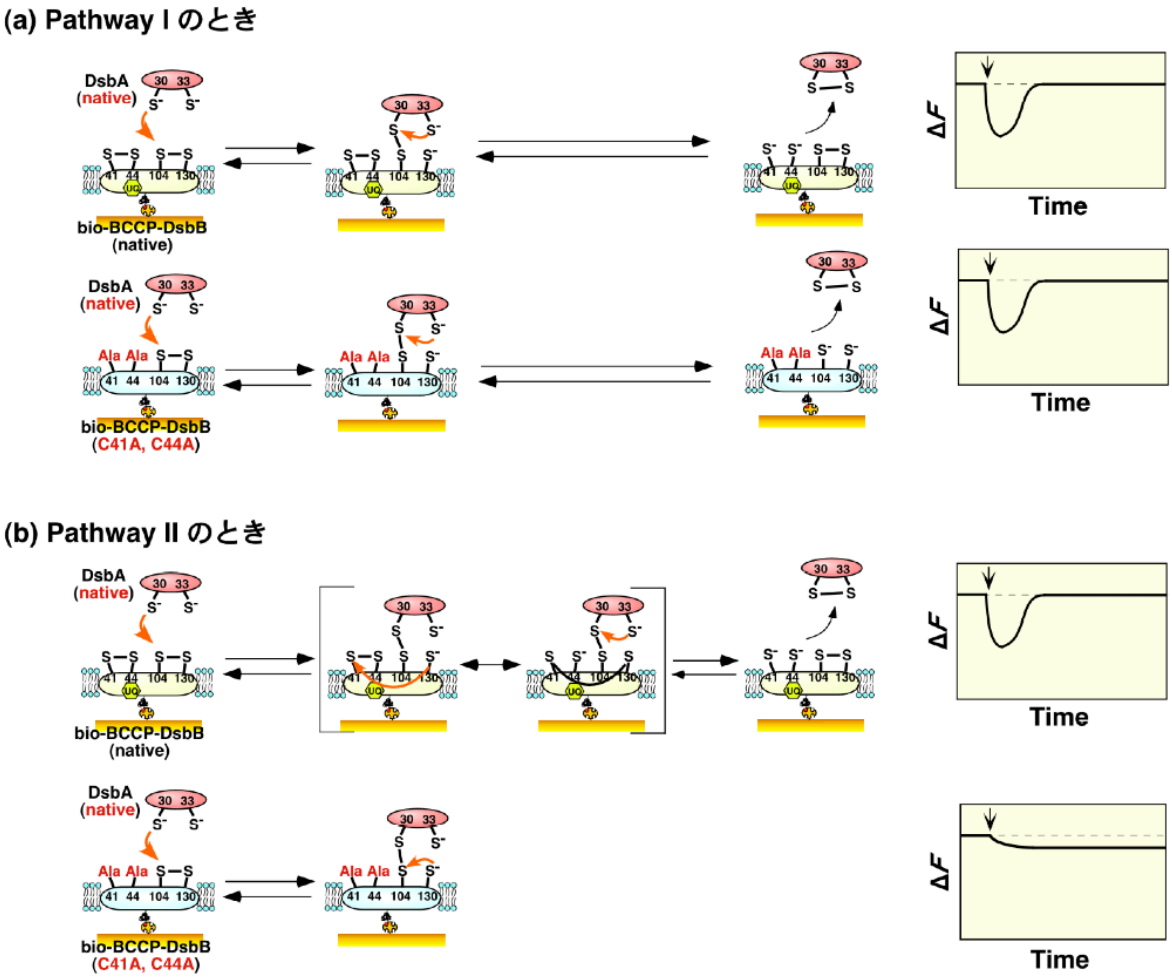


図 3-8：DsbB による DsbA の酸化反応についてこれまで提唱された 2 つの経路

3-3-1　DsbA(native)と DsbB または DsbB(C41A,C44A)の QCM での反応観察

2-4 節と同様に、QCM 基板上で DsbB を脂質二分子膜中に配向固定化した。DsbA は 30 当量の還元剤 TCEP と 100 mM Sodium citrate buffer (pH 6)中で、室温 30 分反応させた後、脱塩カラムで処理し、QCM セルに添加した。

DsbB(native)を固定化した基板に DsbA(native)を添加した結果、図 3-9 のように振動数減少後、振動数上昇が確認された。一方、DsbA(native)を DsbB(C41A,C44A)に添加した場合、非特異結合と考えられる振動数変化が観察され、反応に伴う振動数変化は確認されなかった。この結果から DsbB による DsbA の酸化反応は、DsbB の 2 組のジスルフィド結合を利用して DsbA との間で安定な中間体を形成する Pathway II で進行することが分かった。

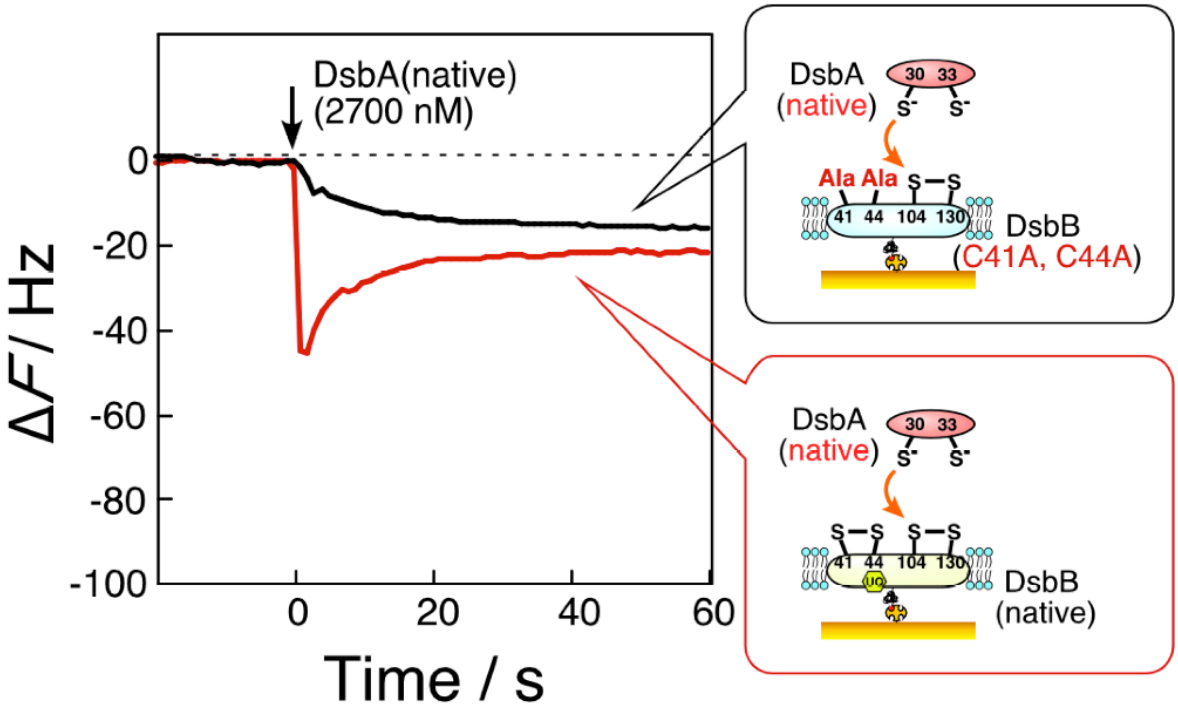


図 3-9：DsbB 野生型と変異体との DsbA(native)との反応挙動の比較

25 °C, 50 mM citrate(pH 6), 100 mM NaCl.

3-3-2　DsbA(C33A)と DsbB または DsbB(C41A,C44A)の QCM での結合反応観察

2-4 節と同様に、QCM 基板上に DsbB を脂質二分子膜中に配向固定化した。DsbA(C33A)は 30 当量の還元剤 TCEP と 100 mM Sodium citrate buffer (pH 6)中で室温 30 分反応させた後、脱塩カラムで処理し、QCM セルに添加した。

図 3-10 に示すように DsbA(C33A)と DsbB(native)の反応では結合が観察された一方、DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合は大きく減少したことから、DsbB(C41A,C44A)は DsbA との複合体を形成しにくいことが分かった。

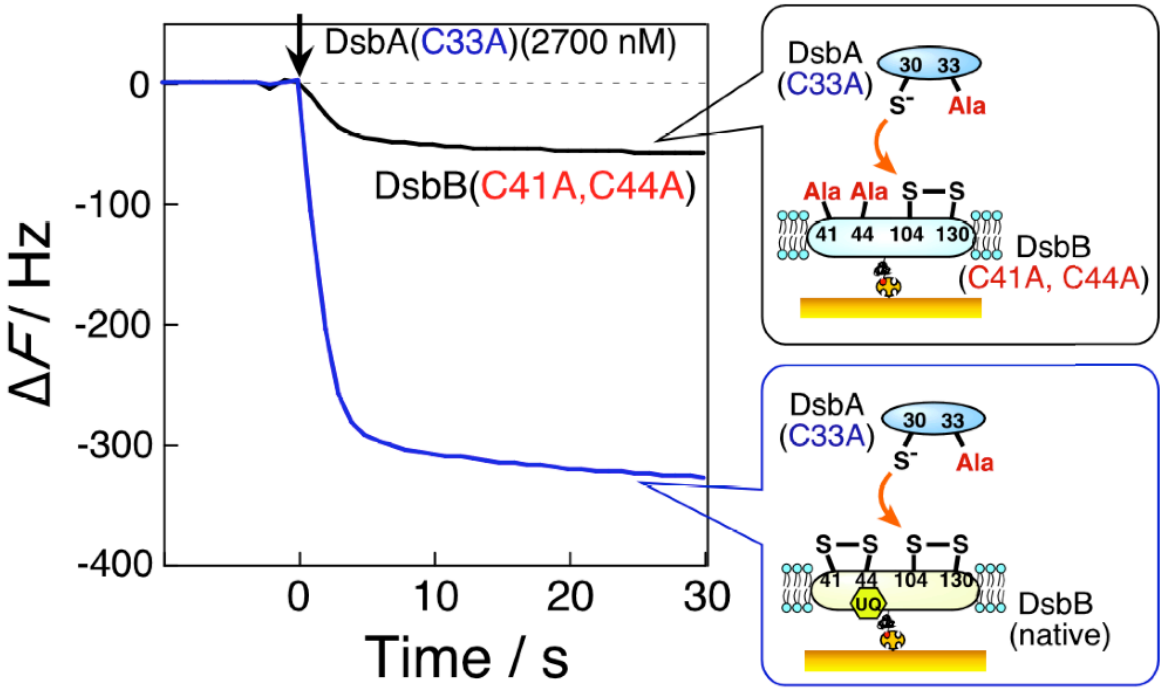


図 3-10：DsbA(C33A)と DsbB(native)および DsbB(C41A,C44A)の反応チャート

25 °C, 50 mM citrate(pH 6), 100 mM NaCl.

3-3-3　DsbA(C33A)と DsbB(native)または DsbB(C41A,C44A)の結合過程の動力学解析

DsbA(C33A)の添加濃度を変えて DsbB と反応させ、図 3-11 に示すように、得られた反応チャートについて、2-5 節の手法により、飽和法と緩和法により動力学解析を行い、結合速度定数 k_{fwd} および解離速度定数 k_{rev} を求めた。

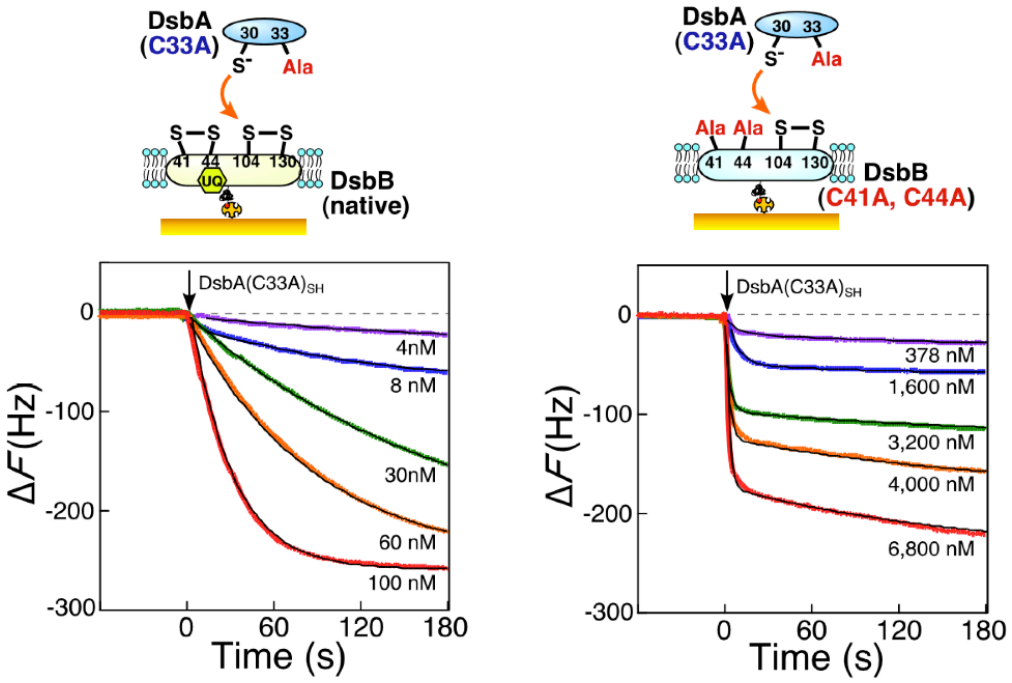


図 3-11：DsbA(C33A)と DsbB(native)および DsbB(C41A,C44A)の反応チャートのカーブフィット

25 °C, 50 mM Citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

結果を**図 3-12** に示した。k_{rev} について、DsbB(C41A,C44A)の場合、野生型よりも約 60 倍大きいことがわかった。このことから、DsbB にジスルフィド結合が 2 組存在することで、DsbB の Cys130 が Cys30(DsbA)と Cys104(DsbB)間のジスルフィド結合を攻撃することに伴う逆反応を 60 倍抑えていることがわかった。一方、k_{fwd} について、DsbB(C41A,C44A)の場合、野生型よりも 5 倍小さいことがわかった。

しかし、DsbB(C41A,C44A)については、変異導入によってコンフォメーションが変化したことも考えられ、上記の結果は、単なる DsbB(C41A,C44A)が変性したことによるとも判断できる。ところで、以前の研究で円二色性スペクトルによって DsbB(C41S,C44A)と野生型がともに同じスペクトル形状であり、DsbB(C41A,C44A)でも立体構造は野生型と同様に維持されていることが示されている[6]。そこで、QCM を用いて DsbA(C33A)と DsbB の野生型と変異型との飽和結合量を比較した。

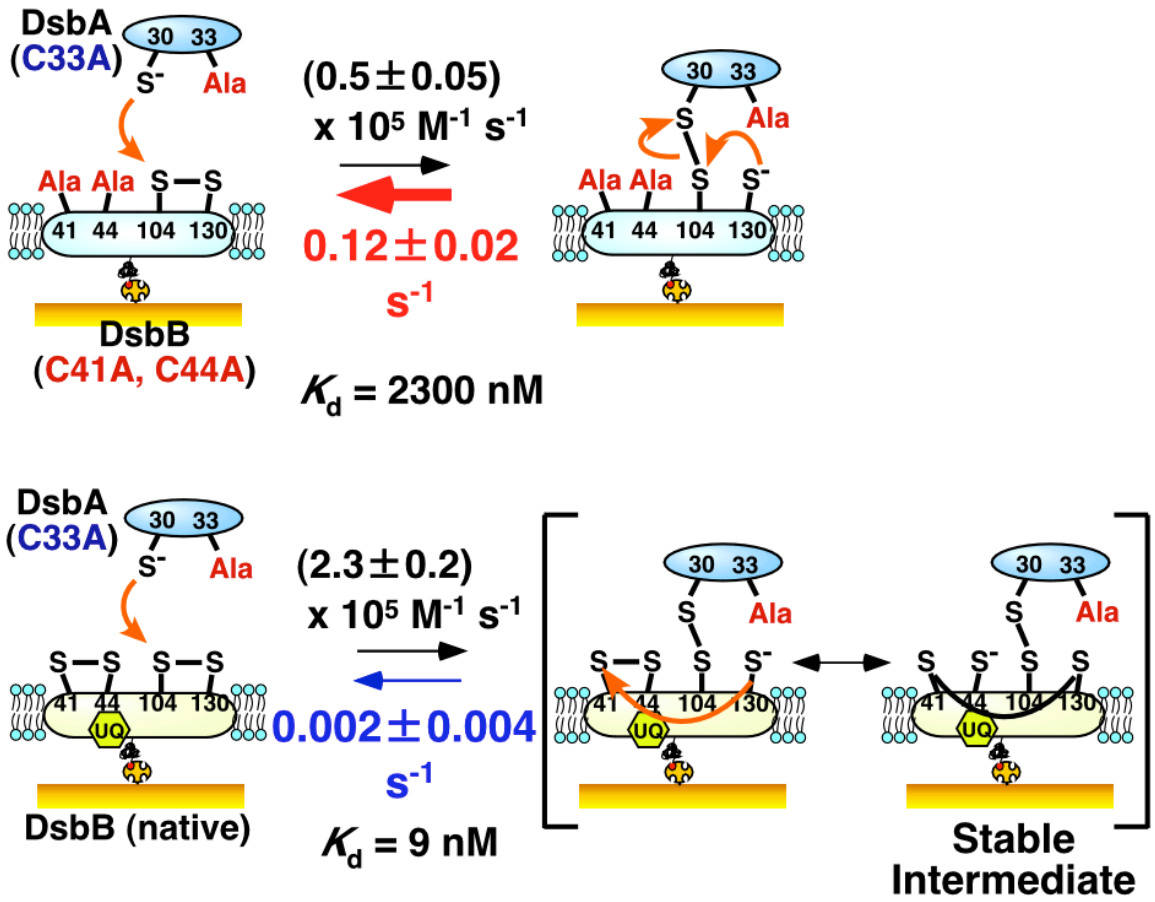


図 3-12：DsbA(C33A)と DsbB(native)または DsbB(C41A,C44A)の反応動力学

25 °C, 50 mM Citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

図 3-13 に示したように DsbA(C33A)の添加濃度を増加させるにつれ、DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の飽和結合量は、DsbA(C33A)と DsbB(native)のそれに近づいた。以上の結果より DsbB(C41A,C44A)の場合、DsbA との結合の際の逆反応が大きくなったことは、構造変化や変性によるものではないことが確認できた。

図 3-14 に DsbA と DsbB の反応の動力学定数をまとめた。DsbA(C33A)と DsbB の反応解析から求めた k_{rev} が 0.002s^{-1} であり k_{cat} が 0.12 s^{-1} で、k_{rev} が小さいので、DsbA と DsbB との中間体が形成されれば、安定に DsbA の酸化が進行することがわかった。一方、DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の反応解析から求めた k_{rev} が 0.12 s^{-1} であり k_{cat} の 0.12 s^{-1} と同等の値であるので、DsbB にシステインが 1 組しかない場合

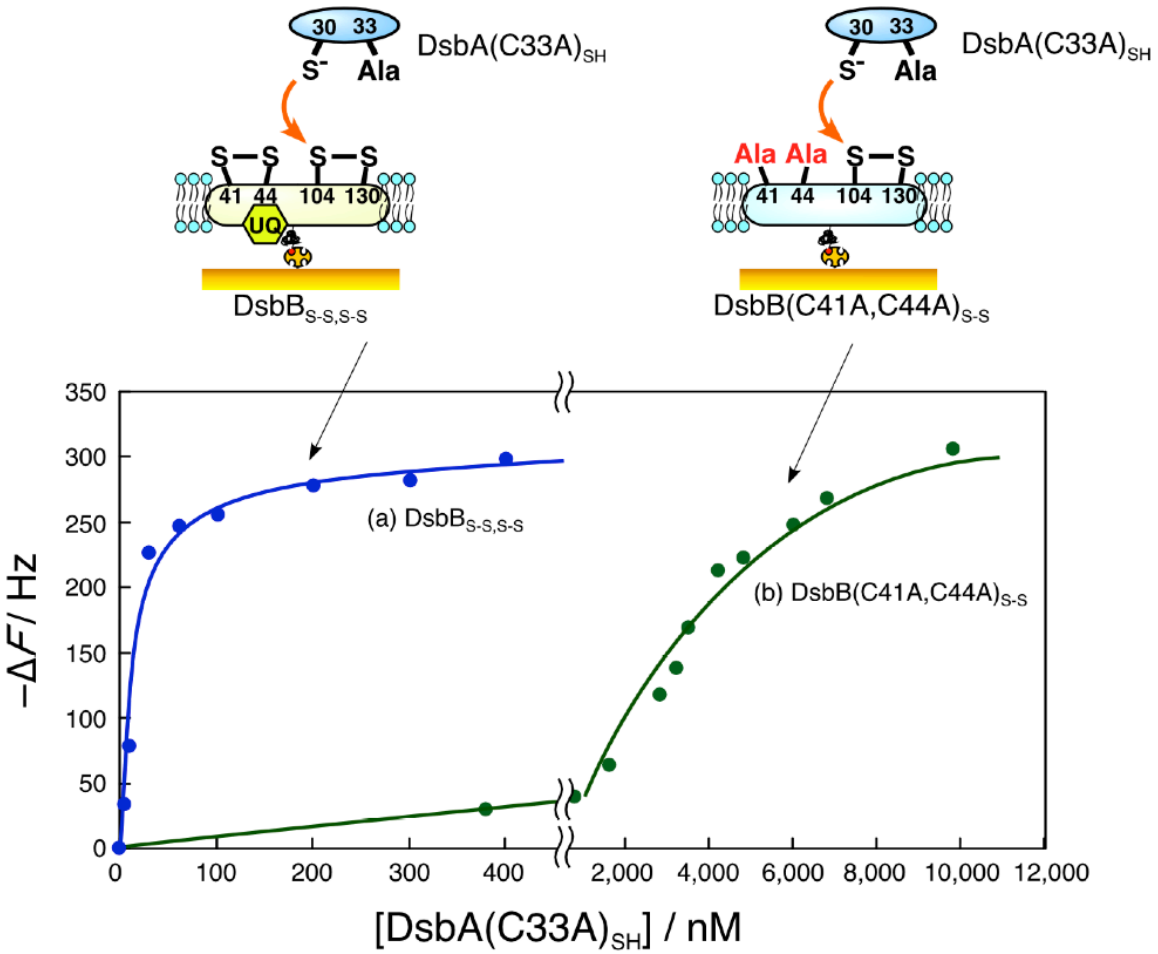


図 3-13：DsbB 野生型または変異体と DsbA(C33A)との飽和結合量の比較

25 °C, 50 mM Citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

には DsbA と DsbB が結合後、逆反応が進行し DsbA の酸化効率は低下すると考えられる。DsbB は自身の 2 組、計 4 つのシステインを全て使用して、DsbA との安定複合体を形成することで逆反応を抑制し、DsbA の酸化効率を大きく向上させていることがわかった。

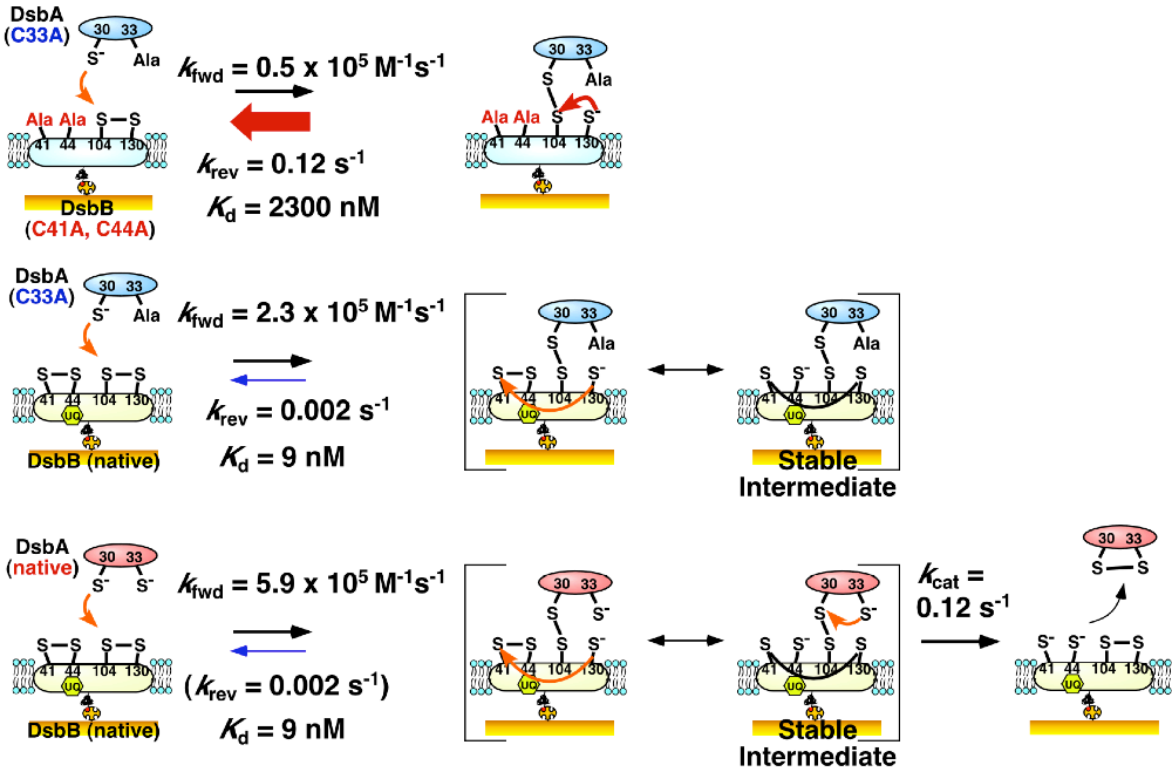


図 3-14：DsbA と DsbB の反応の動力学定数の比較

25 °C, 50 mM Citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

3-4　　SDS-PAGE を用いた DsbB による DsbA 酸化反応産物の定量

QCM を用いた場合、DsbB による DsbA の酸化の素過程の速度パラメータの議論はできるが、最終的な反応産物である酸化 DsbA の定量はできない。そこで、分子量約 500 Da のチオール基修飾剤 4-Acetamido-4′-Maleimidylstilbene-2,2′-Disulfonic acid (AMS)を利用した SDS-PAGE によって、DsbB(native)と DsbB(C41A,C44A)が酸化した DsbA の量を比較した [10]。

実験の概要を図 3-15 に示した。DsbB によって DsbA が酸化された場合は、AMS と反応せず 21 kDa に DsbA 由来のバンドが検出されるのに対して、DsbB と DsbA の反応が起こらない場合は還元型 DsbA が AMS と反応し 22 kDa のバンドが検出されることを利用した。

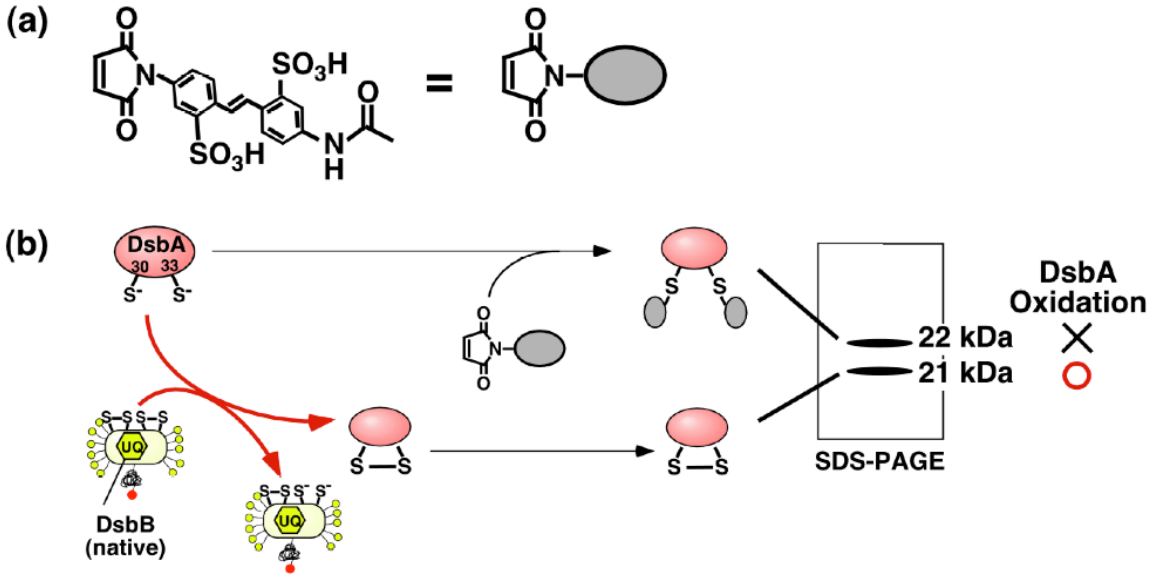


図 3-15：SDS-PAGE を用いた DsbB による DsbA の酸化反応産物の定量

(a)AMS の構造、(b)DsbA の酸化または還元状態によるバンド移動度の違い

測定スキームを図 3-16 に示した。TCEP で還元処理後の 17 μM の DsbA を 34 μM の酸化型 DsbB と反応バッファー(100 mM Sodium citrate, pH 6, 0.1% DDM)中で混合

し、室温で 3 分反応させた。3 分後、トリクロロ酢酸を加えて反応をクエンチし、0 °C で 30 分放置した。その後、4 °C, 16,000×g, 10 分遠心した。ペレットを冷アセトン 200 µL で 2 回洗浄した。Modification buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% SDS, 23 mM AMS) 10 µL で溶解し、37 °C で 2 時間反応させた。非還元用の SDS-PAGE サンプルバッファーを 10 µL 添加し、37 °C で 5 分反応させた後、非還元 PAGE を行った。BCCP-DsbB(C41A,C44A)変異体についても同様に SDS-PAGE 用サンプルを調製した。

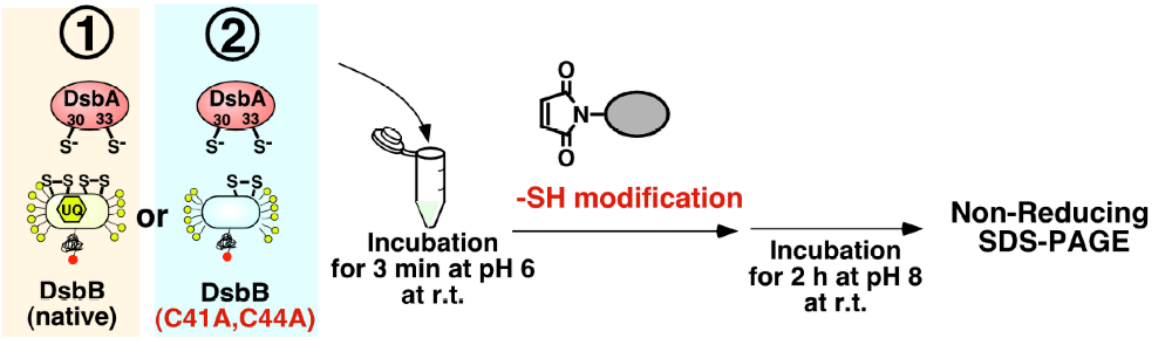


図 3-16：SDS-PAGE を用いた DsbB による DsbA の酸化反応率の測定スキーム

SDS-PAGE の結果を**図 3-17** に示した。1 レーンは還元型 DsbA(native)と DsbB(native)の反応後のサンプルであるが、21 kDa に酸化型 DsbA のバンドが検出された。一方、2 レーンは還元型 DsbA と DsbB(C41A,C44A)の反応後のサンプルであるが、酸化型 DsbA のバンドは 1 レーンの DsbB(native)の場合よりも観察されなかった。これらの結果より、DsbB(native)による DsbA 酸化効率は DsbB(C41A,C44A)の場合と比較し、大きく向上していることがわかった。

SDS-PAGE を利用して DsbB により酸化された DsbA をバンドの大きさで定量したが、**図 3-17** の結果より DsbA の酸化が 100%進行していなかった。このことは単に DsbB との反応時間が短いことや DsbB の量が足りないという実験的な理由に起

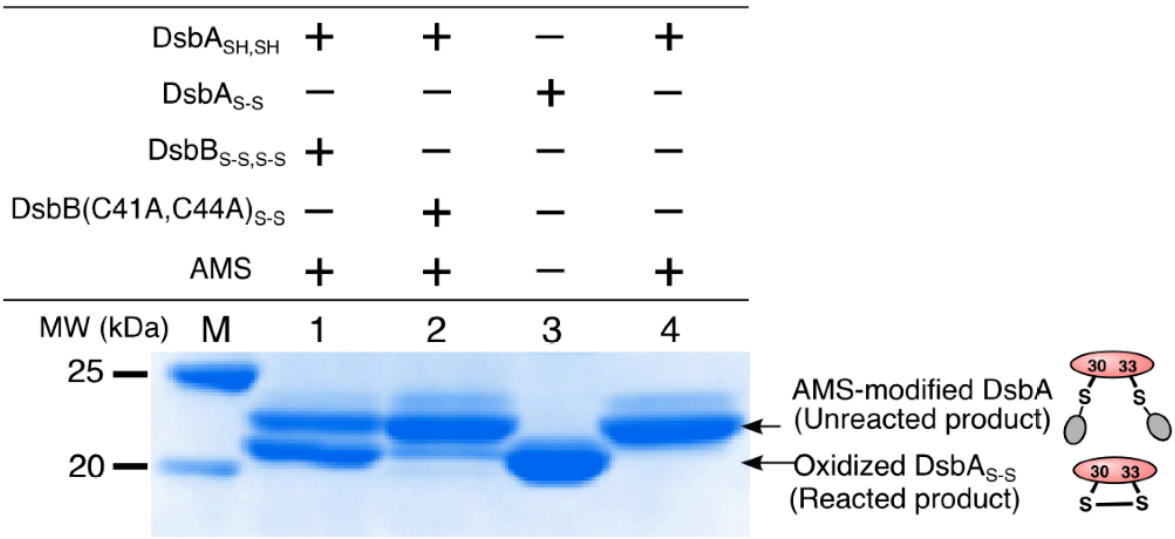


図 3-17：SDS-PAGE を利用した DsbB による DsbA の酸化反応解析

因するのであろうか。それとも酸化還元電位などに起因した DsbA の酸化が進行しない理由が他にあるのだろうか。そこで、DsbA と DsbB の量比や反応時間を種々に変化させて実験を行った。

DsbA(native)と DsbB(native)の反応時間を変化させる実験では、DsbA と DsbB を混合して室温で 1 分、3 分、10 分、30 分反応後に TCA を添加し、反応を停止させた。DsbA(native)と DsbB(native)の反応量比を変化させる実験では、DsbA : DsbB を 1 : 5、1 : 10 、1 : 20 と変化させて、室温で 3 分反応させた。

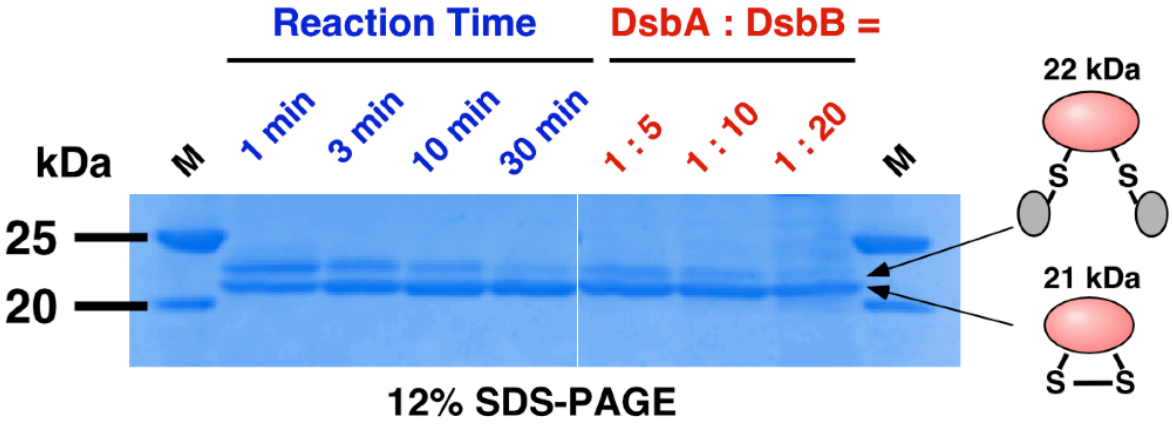


図 3-18：SDS-PAGE を利用した DsbB(native)による DsbA の酸化反応解析

SDS-PAGE の結果を図 3-18 に示した。DsbA と DsbB の反応時間を長くする、または、DsbA に対する DsbB の量比を多くすれば DsbA の酸化反応は定量的に進行することがわかった。

DsbB(C41A,C44A)についても実験条件を変更して、DsbA(native)の酸化を定量的に達成できるか確認した。DsbA(native)と DsbB(C41A,C44A)を混合して室温で 1 分、3 分、10 分、30 分反応後に TCA を添加し、反応を停止させた。また、DsbA(native) : DsbB(C41A,C44A) を 1 : 2、1 : 30 、1 : 90 と変化させて、室温で 30 分反応させた。

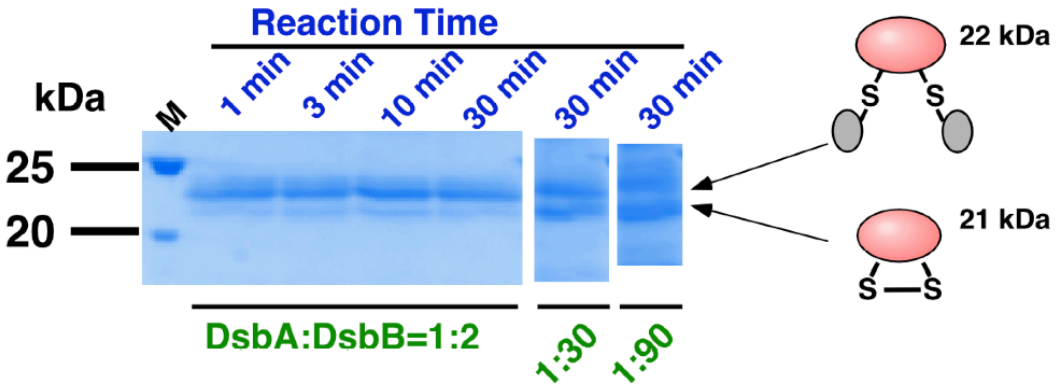


図 3-19：SDS-PAGE による DsbB(native)と DsbB(C41A,C44A)による DsbA(native)の酸化効率の比較

12% アクリルアミドゲル、分子量マーカー:Precision Plus Protein Unstained Standards(Bio-Rad)

その結果、図 3-19 のように反応時間が 1 分の場合と 30 分の場合で酸化された DsbA 量に変化がなかった。また、DsbB(C41A,C44A)の比率を多くすると酸化された DsbA の量は多くなった。これらの結果より図 3-20 に示したように DsbB(C41A,C44A)が DsbA を酸化した後、還元型 DsbB(C41A,C44A)から酸化型 DsbA(native)への電子の移動が進行することがわかった。言い換えると、DsbB(C41A,C44A)による DsbA(native)の酸化反応では、逆反応が 2 箇所に存在すると思われる。これは DsbA が結合後に DsbB の Cys130 はチオレートアニオンの状

態になるが、システインを 4 つ有している野性型の場合では Cys41 と Cys130 がループを形成した安定状態を形成できるが、C41A,C44A 変異体ではこのような安定状態を形成できず、DsbA への逆反応が進行するものと考えられる。DsbB の 4 つのシステインは k_{cat} の部分の逆反応をも抑える働きがあることがわかった。



図 3-20：還元型 DsbB(C41A,C44A)から酸化型 DsbA(native)への電子の移動

DsbB(C41A,C44A)による DsbA(native)の酸化反応では、逆反応が 2 箇所に存在する

3-5　ユビキノンの効果

これまでの実験結果から DsbB による DsbA の酸化反応は、DsbA と DsbB が結合後 DsbB の 2 組のジスルフィド結合間での異性化反応を経て、DsbA と DsbB が安定複合体を形成することが必要であることがわかった。この反応経路はこれまで議論されてきた Pathway II に相当するが、**図 3-21** に示したようにユビキノンが DsbA と DsbB の反応動力学に寄与している可能性も考えられる。

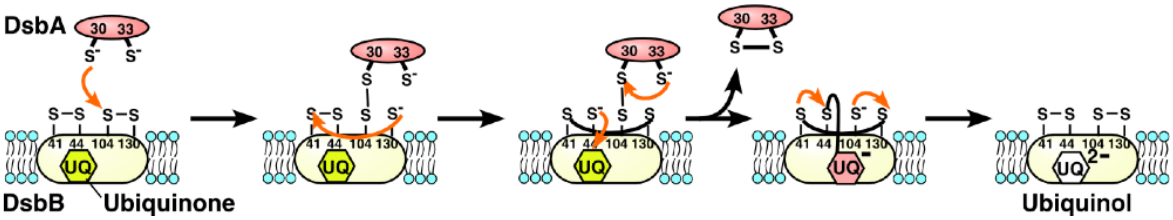


図 3-21：DsbB を介した DsbA からユビキノンへの電子の移動

量子化学シミュレーションの結果から DsbA-DsbB-ユビキノン三者の電荷移動錯体形成による安定化が提案されており [11]、また、Stopped flow を利用した吸光度測定の結果からユビキノンの還元が DsbA の酸化反応における律速段階であることが示されている [4]。DsbB を大腸菌で発現させた場合、1 当量以下のユビキノン 8 が結合した状態で調製され [3,6]、DsbB に対するユビキノン 8 の結合力はラウロイルサルコシンという強力な界面活性剤で洗浄しても離れないほど強固であることが知られており [1]、本研究で作製した DsbB もユビキノンを有していると思われる。DsbA と DsbB の反応について内在ユビキノン 8 の影響を除外するために、稲葉らはユビキノン欠損株を作製している [1]。これはユビキノン 8 の生合成経路に関与する酵素を欠乏させて大腸菌がユビキノンを生成できなくしたものである。本項ではその代替法を考えた。

3-5-1　Redox Buffer を用いた DsbB と内在性ユビキノン 8 の酸化還元状態の調節

DsbB に 2 組の S-S 結合が存在して活性を有する状態で、ユビキノン 8 が還元されてユビキノール UQ^{2-}になって失活している状態を再現するため、レドックスバッファーを使用することを考えた。**図 3-22** に示したように DsbB の 2 つの S-S 結合のうち、Cys41-Cys44 および Cys104-Cys130 の酸化還元電位はそれぞれ–207 mV および–224 mV である [1]。一方、ユビキノンの酸化還元電位は+110 mV である [1]。そこで、酸化還元電位を–207 mV から+110 mV の間に調整すれば、DsbB は S-S 結合を 2 本形成した状態で、かつユビキノンは還元された状態を再現できると考えられる。レドックスバッファーは酸化型および還元型 DTT を使用し、その比率を種々に変化させることでレドックス電位を制御した [1]。

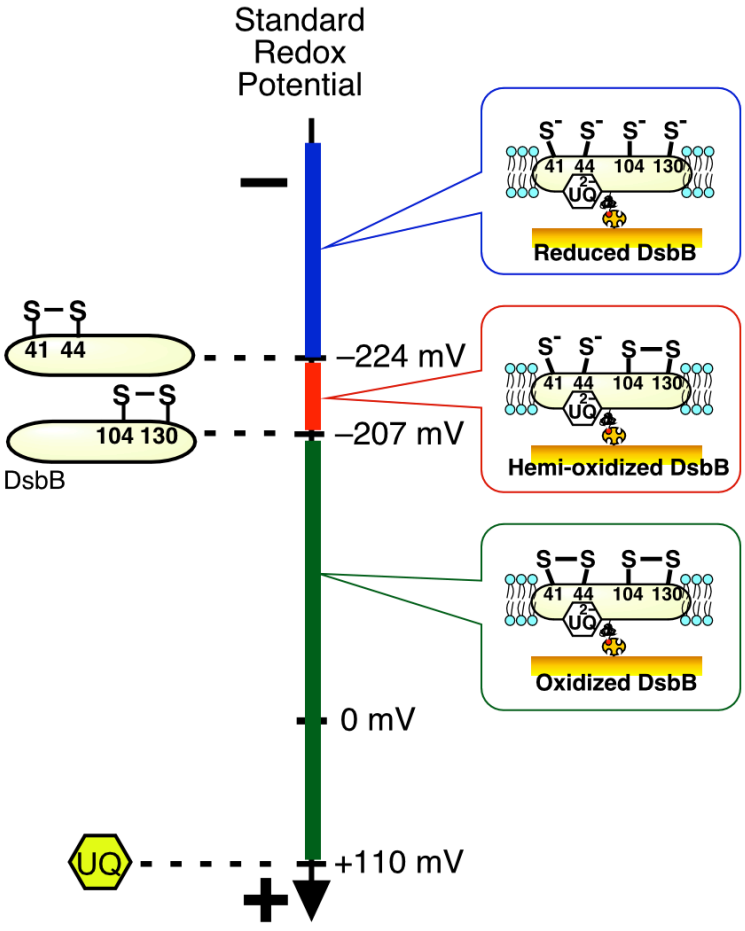


図 3-22：Redox Buffer を利用した DsbB とユビキノンの酸化還元状態の調節

まず、レドックス電位を変化させることで、DsbB と DsbA の反応挙動が変化するのか、DsbA(C33A)と DsbB(native)の結合反応を利用して、予備実験を行った。DsbB の 2 つの S-S 結合のうち 2 つとも形成させた状態(S-S, S-S)および片方のみ形成させた状態(-SH,-SH, S-S)、さらにシステインは全て還元型になっている状態(-SH, -SH, -SH, -SH)の 3 つの状態を再現した。その後 DsbA(C33A)との反応を観察した。

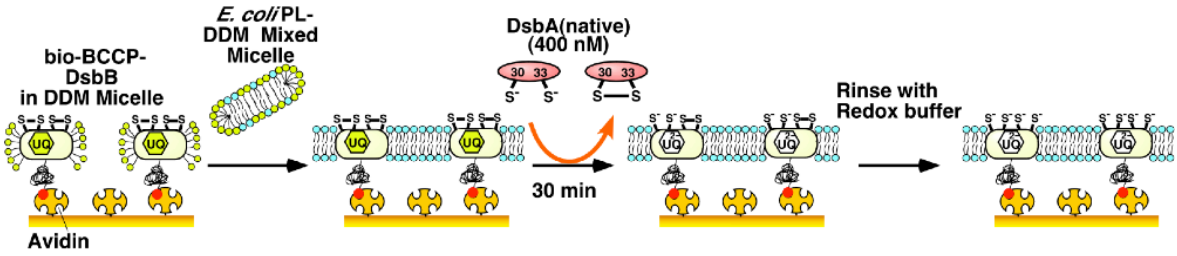


図 3-23：　QCM 基板上の DsbB とユビキノンの酸化還元状態の調節スキーム

DsbB を QCM 基板上の平面脂質二分子膜に埋め込んだ後、過剰量の還元型 DsbA を添加しユビキノンを完全に還元した後で、レドックスバッファーを用いて酸化還元電位の調節を行った。

QCM 基板上の DsbB とユビキノンの酸化還元状態の調節スキームを**図 3-23** に示した。**2-4 節**と同様に BCCP-DsbB の周囲を脂質膜で置換した。その後、30 当量の還元剤 TCEP で室温 30 分以上 100 mM Sodium citrate buffer (pH 6)中で還元処理後、脱塩した DsbA(native)を終濃度 400 nM となるように添加し、30 分以上インキュベートすることで、ユビキノンを還元型ユビキノール(UQ^{2-})の状態にした。酸化型 DTT と還元型 DTT の比率を変化させて以下の 3 種類のレドックスバッファーを調製した。酸化環境($DsbB_{S\text{-}S,S\text{-}S}$)の再現には酸化バッファー(50 mM リン酸ナトリウム, pH 8.0, 100 mM NaCl, 100 mM oxidized DTT, 1 μM reduced DTT, レドックス電位：–162 mV)を用いた。部分酸化環境($DsbB_{SH,\ SH,\ S\text{-}S}$)の再現には、部分酸化バッファー(50 mM リン酸ナトリウム, pH 8.0, 100 mM NaCl, 100 mM oxidized DTT, 100 μM reduced DTT, レドックス電位：–222 mV)を用いた。還元環境($DsbB_{SH,\ SH,\ SH,\ SH}$)の再

現には、還元バッファー(50 mM リン酸ナトリウム, pH 8.0, 100 mM NaCl, 100 mM oxidized DTT, 10 mM reduced DTT, レドックス電位：–282 mV)を用いた。これらのレドックスバッファー中で 25 °C で 2 時間以上インキュベートすることでレドックス環境を制御した。その後、セルを pH 6 の QCM バッファー(50 mM Citrate, pH 6, 100 mM NaCl)で洗浄し、30 当量の還元剤 TCEP で室温 30 分以上 100 mM Sodium citrate buffer (pH 6)中で還元処理および脱塩後の DsbA(native)または DsbA(C33A)を添加した。

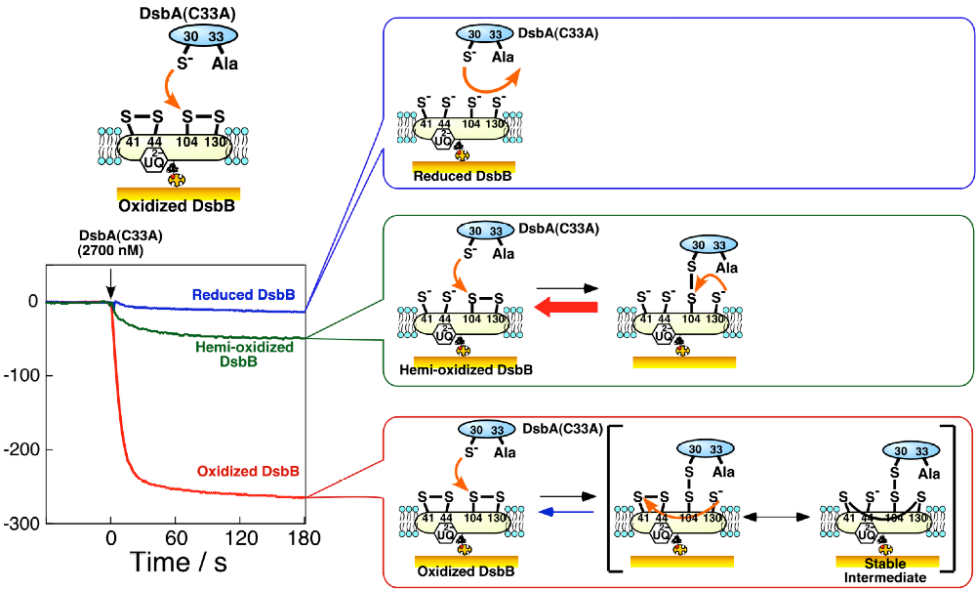


図 3-24 : DsbA(C33A)と種々のレドックス状態の DsbB の反応

25 °C, 50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

図 3-24 に示したようにレドックスバッファーによって酸化還元電位を制御することで、DsbB の酸化還元状態を制御できたことがわかった。また、NeutrAvidin を固定化するのに使用していたジチオジプロピオン酸は QCM 金基板と金―チオール結合しているため、DTT とのあいだでチオール-ジスルフィド交換反応が起こって、NeutrAvidin が解離することが危惧されたが、そのようなことは起きなかった。

3-5-2　還元型ユビキノールを有する DsbB と DsbA との反応動力学解析

次に、ユビキノンを還元型のユビキノール(UQ^{2-})にした状態で、かつ、DsbB を酸化型にして、DsbA および DsbA(C33A)との反応の動力学解析を行った。

図 3-25 のように還元型 DsbA(native)を添加したところ、内在性のユビキノンが存在する場合と同様、DsbA が DsbB と結合後、DsbA が解離する挙動が観察された。また、**図 3-26** のように種々の濃度の還元 DsbA(C33A)を添加したところ、結合挙動が観察された。

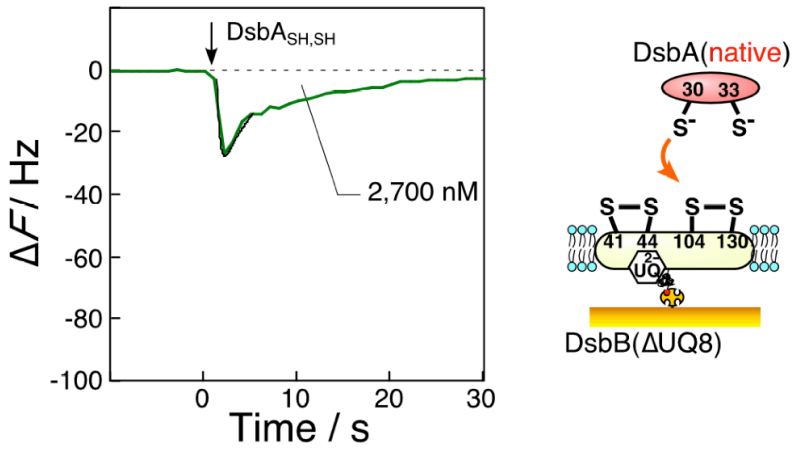


図 3-25 : DsbA と DsbB(還元型ユビキノン)の反応チャートのカーブフィット

25 °C, 50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

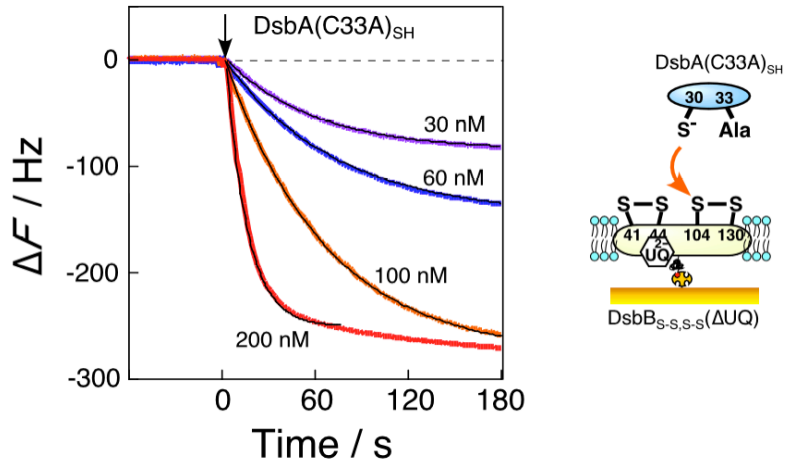


図 3-26 : DsbA(C33A)と DsbB(UQ^{2-})の反応チャートのカーブフィット

25 °C, 50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

動力学解析の結果を**表 3-2** に示した。k_{fwd}, k_{rev}, k_{cat} の各パラメータについて、ユビキノンが還元型になったことによる顕著な違いは見られなかった。これらの結果よりユビキノンは DsbA と DsbB の反応動力学に影響を及ぼしていないと考えられる。

3-5-3　ユビキノン-10 が過剰に存在する場合の DsbB と DsbA との反応動力学解析

ユビキノン-10 を脂質膜中に過剰に存在させた場合の DsbB の反応性の変化を観察した。大腸菌由来の DsbB が本来有するのはイソプレン骨格が 8 のユビキノン-8 であるが、ユビキノン-8 は入手困難であるので市販されているユビキノン-10 を用いて実験を行った。以前の研究では、Dsb システムに外部からユビキノンを加える場合、DsbB を界面活性剤 DDM に可溶化させた系で行われていたため、水溶性のユビキノン-1 しか使用されていなかった [1–4, 11]。本研究では QCM 金基板上に平面脂質膜を構築しており、その作製時に脂溶性ユビキノン 10 を混合可能なため、脂質膜中にユビキノン 10 を含有させることが可能である(**図 3-27**)。

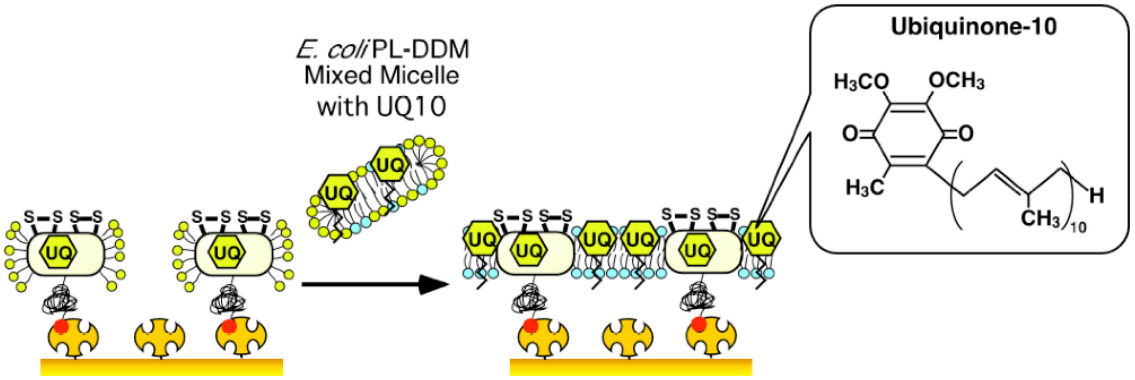


図 3-27：DsbB の周囲に過剰のユビキノン-10 を配置するための実験スキーム

ユビキノン-10 を 1.45 mg/mL の割合で溶解させたクロロホルム溶液 200 µL を、10 mg/mL *E.coli* 脂質 200 µL と混合し、エバポレートすることでナスフラスコ底面に薄膜を形成させた(ユビキノン 10 は脂質に対しモル数換算で約 11%含有させてい

る)。薄膜はユビキノン 10 由来の黄色を帯びていた。以降の QCM 基板作製操作は 2-4 節と同様に行った。

図 3-28(a)のように還元 DsbA(native)を添加したところ、少しのラグタイムのようなものが観察された後、DsbA が解離していく挙動が観察された。ユビキノン-10 が DsbB の周囲に存在することで、DsbA と反応後に DsbB のリサイクルが起こり、マルチターンオーバーの反応が観察された可能性もある。一方、DsbA(C33A)を添加したところ、図 3-28(b)のように結合挙動が観察された。また、DsbA(C33A)の添加濃度を変化させたときのチャートと曲線解析の結果を図 3-29 に示した。

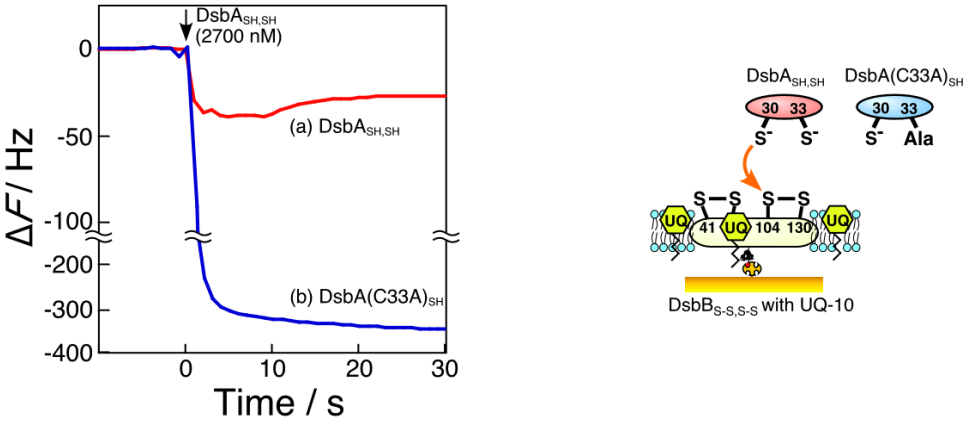


図 3-28 : UQ10 が膜内に大過剰存在する環境における DsbA と DsbB の反応

(a) DsbA(native)と DsbB, (b) DsbA(C33A)と DsbB　25 °C, 50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

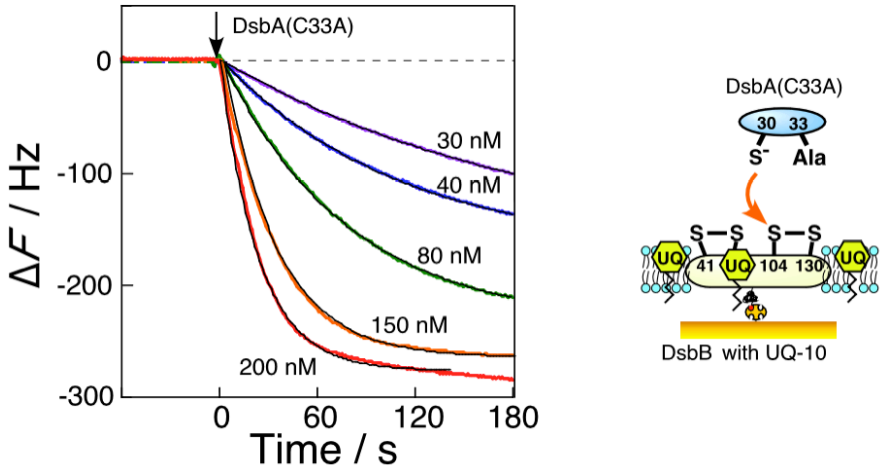


図 3-29 : UQ10 が膜内に大過剰存在する環境における DsbA(C33A)と DsbB の反応チャートのカーブフィット　25 °C, 50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

動力学解析の結果を**表 3-2** に示した。k_{fwd}, k_{rev}, k_{cat} の各パラメータについて、ユビキノンが過剰に存在することによる顕著な違いは見られなかった。これらの結果より、ユビキノンは DsbA と DsbB の反応動力学には影響を与えずに、ユビキノンは DsbB をリサイクルすることに特化していると考えられる。

表 3-2：DsbB が還元型ユビキノールを有する場合とユビキノンが過剰に存在する場合との動力学の比較

括弧内の k_{cat} の値は DsbA(native)を利用して求めた値。25 °C, 50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

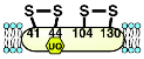
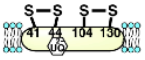
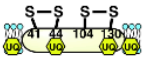
DsbA	DsbB		k_{fwd} / 10^5 M^{-1} s^{-1}	k_{rev} / s^{-1}	k_{cat} / s^{-1}
DsbA(C33A)	DsbB(native)		2.3 ± 0.2	0.0020 ± 0.004	(0.12 ± 0.04)
DsbA(C33A)	DsbB (UQ^{2-})		3.6 ± 0.2	0.0012 ± 0.004	(0.15 ± 0.06)
DsbA(C33A)	DsbB (excess UQ10)		1.8 ± 0.1	0.0024 ± 0.002	——

図 3-30 に、電子が DsbA、DsbB、ユビキノンの 3 者のうちどこに推移するのかを基準として描いた DsbA と DsbB の反応モデルを示した。(A)が稲葉らの提唱する Pathway I である [1]。(C)が Pathway II である [1]。DsbB が分子内の Cys41 と Cys130 の間で Interloop を形成することを初めて示した門倉らの提唱するのは(C)でもあり(D)でもあり [3] 曖昧である。一方、QCM を使用した本実験では(B)のモデルを支持したい。つまり、ユビキノンは DsbA と DsbB の反応には影響しておらず、DsbB をリサイクルすることに特化しているという考えである。しかし、(B)と(C)のモデルは QCM では区別できない。つまり、ユビキノンがピンク色を示す状態に吸収極大のシフトが起きることと、DsbA が DsbB によって酸化されることは別の反応であるし、QCM でも区別できない。ただ、稲葉らが DsbB のユビキノン欠損株を用いても DsbA の酸化活性があることを SDS-PAGE で確認していること [1]、および本章

の結果をあわせると、ユビキノンは DsbA と DsbB の反応速度に影響を与えていないと考えられる。また、QCM の実験において、DsbA と反応後の還元型となった DsbB は酸素によって hour スケールではあるが自然酸化されることを確かめている。DsbB は酸素によって自然酸化されるが、その速度は遅く効率が悪いので、膜内にユビキノン-8 を配置させることで、DsbB のリサイクル効率を高めたと考えられる。キノン類(好気性条件で使用されるユビキノンおよび嫌気的条件で使用されるメナキノン)が欠損している大腸菌が無事に生育できることからも、キノンは大腸菌の生育には必須ではないと思われる[1]。DsbA と DsbB の反応に関して言えば、重要なのはキノンよりも DsbB の Arg48 のグアニジノ基由来の正電荷であると考えられる[11]。全ての生物種の DsbB には Cys44 から 4 残基 C 末端側に Arg48 が保存されているという報告もある[7]。Arg48 と Cys44 の静電的相互作用が DsbB の安定性に大きく寄与していると思われる。実際，Arg48 を他のアミノ酸に置換すると，ユビキノンの発色がなくなると同時に Cys41-Cys44 ジスルフィドの形成速度が大きく低下することが知られている[8]。

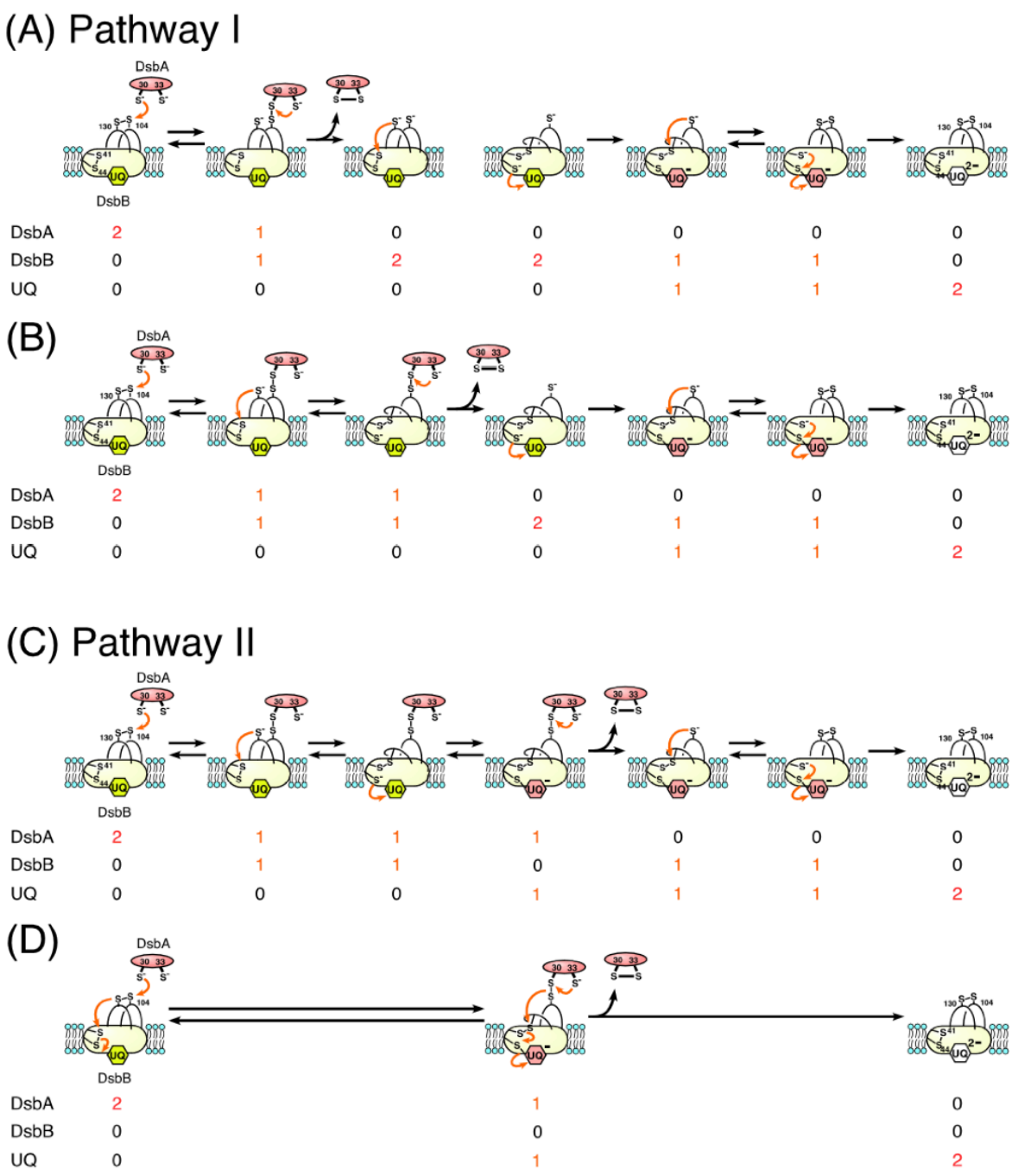


図 3-30：DsbA-DsbB-ユビキノンの 3 者間での電子移動に着目した反応モデル

3-6 酸化還元電位パラドックスの解決

DsbA は DsbB によって酸化されるにも関わらず、DsbA および DsbB 単独で酸化還元電位を測定すると、DsbA(酸化還元電位：–120 mV)の方が DsbB(酸化還元電位：–207 mV～–224 mV)よりも酸化的であることが示されている。このように DsbA と DsbB の酸化還元電位からでは DsbB による DsbA の酸化現象が説明できないことが 10 年ほど議論になっている[1, 11]。そこで、DsbA と DsbB の反応中間体を検出できる QCM の特性を生かして、このパラドックスの解決を目的として実験を行った。

3-6-1　還元型 DsbB と酸化型 DsbA の反応観察

レドックスバッファーを用いることで、QCM 基板上に固定化した DsbB の酸化還元状態を調節可能であることがわかったので、ここでは、**図 3-31(a)**に示したように本来の酸化還元電位を考慮すれば進行するはずの還元型 DsbB に対して、酸化型 DsbA は反応するのかを確認した。

DsbB を **2-4 節**の手法に従って、QCM 基板上に配向固定化および脂質置換した後、**3-5 節**と同様に、レドックスバッファーを利用して酸化還元電位を–282 mV に調節した。その後、セルを pH 6 の QCM バッファー(50 mM Citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl)で洗浄し、酸化型 DsbA(native)を添加した。

図 3-31(b)より酸化型 DsbA は還元型 DsbB に結合しないことが分かった。このことから、酸化還元電位的には起こるはずの DsbB から DsbA への電子の移動は起こらないことがわかった。

しかしながら、**図 3-31** の結果については別の解釈も考えられる。つまり、酸化

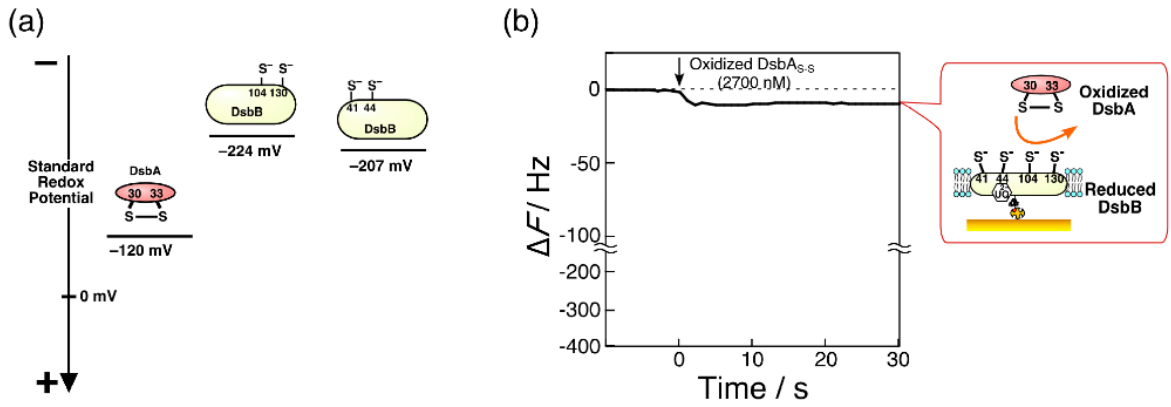


図 3-31：酸化型 DsbA(native)と還元型 DsbB の反応

25 °C, 50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

型 DsbA と還元型 DsbB とのあいだで反応が起きているのにも関わらず、QCM のタイムスケール(1 秒 1 点)では反応を検出できないほど速かったという可能性も考えられる。このことを確かめるため、酸化型 DsbA を添加後にセルを pH 6 バッファー(50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl)で洗浄することで系内から酸化型 DsbA を除いた後、還元型 DsbA(C33A)を添加した。もし、**図 3-31** で反応が起こっていた場合、DsbB は酸化型となるので、還元 DsbA(C33A)は結合するはずである。しかし、**図 3-32** に示すように還元型 DsbA(C33A)は結合しなかったので、還元 DsbB から酸化 DsbA への電子の移動は起こらないことが確認された。

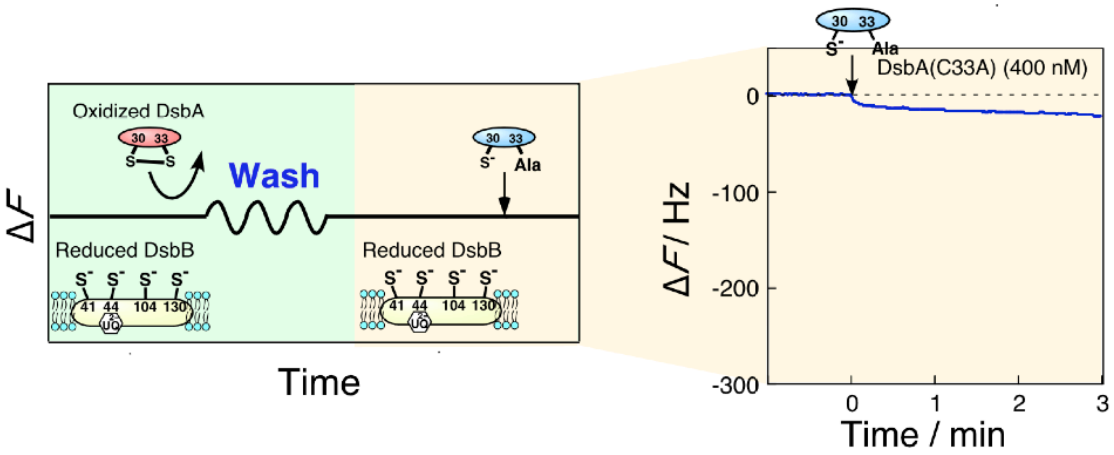


図 3-32：酸化型 DsbA(native)と還元型 DsbB の反応が起こっているかの確認実験

25 °C, 50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

このことから DsbA と DsbB の中間体が形成された時点で、中間体の酸化還元電位が DsbA よりも酸化側(＋側)に変化し、DsbA から DsbB に電子が流れると考えられる。

図 3-33 のように酸化型 DsbA と酸化型 DsbB も結合しないことがわかった。

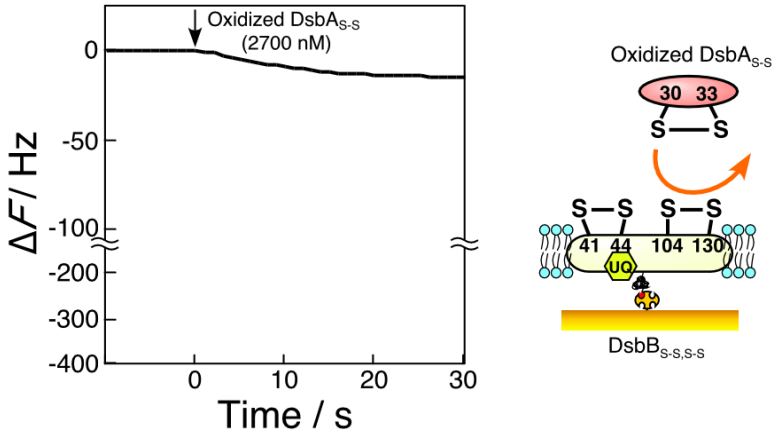


図 3-33：酸化型 DsbA(native)と酸化型 DsbB の反応

25 °C, 50 mM citrate, pH 6.0, 100 mM NaCl.

3-6-2　DsbB 変異体と DsbA(C33A)の結合反応観察

3-3 節の結果から、DsbA(C33A)と BCCP-DsbB(C41A,C44A)の結合活性は大きく低下したことがわかった。本節では BCCP-DsbB(C41A,C44A))の他に 4 種類の変異体 (BCCP-DsbB(C41A), BCCP-DsbB(C44A), BCCP-DsbB(C104A), BCCP-DsbB(C130A))と DsbA(C33A)との反応を観察した。

2-4 節と同様に 4 種類の BCCP-DsbB 変異体について、大腸菌脂質膜中に配向固定化した QCM 基板を作製した。その後、500 mM HEPES-NaOH , pH 7.5 中で 30 当量の還元剤 TCEP を用いて、DsbA(C33A)を室温 30 分以上還元した。その後、脱塩カラムを用いて、TCEP を除き、QCM セル内に終濃度 378 nM となるように DsbA(C33A)をインジェクトした。

図 3-34 に DsbA(C33A)と DsbB wild type および 5 種類の変異体との結合における QCM チャートを示した。

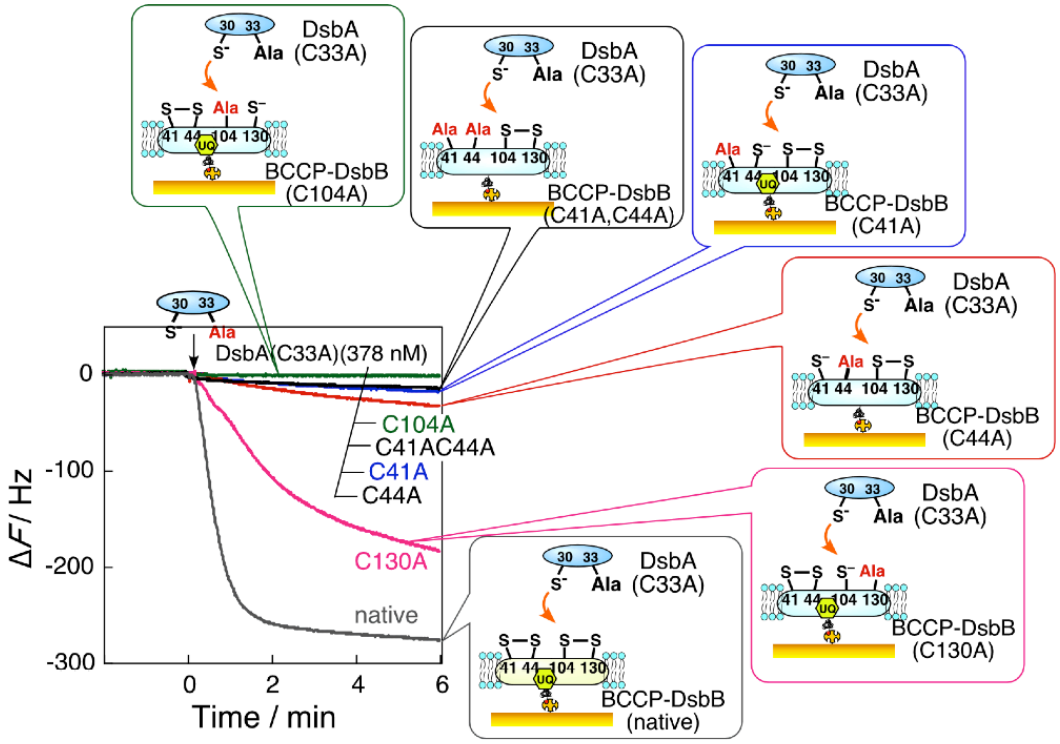


図 3-34：DsbB 変異体と DsbA(C33A)との反応に伴う振動数変化の様子

50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 25 °C.

DsbB(C41A)および DsbB(C44A)について、DsbB(C41A,C44A)と同様に、DsbA(C33A)とほとんど結合しないことがわかった。DsbA(C33A)と結合後、DsbB の Cys130 へ移った電子の行き場が存在しないために、逆反応が起こり、DsbA(C33A)との結合が起こらなかったと考えられる。このことから、DsbB にはシステインが 4 つ存在するからこそ、逆反応が抑制された効率的な DsbA の酸化反応が可能であることが確かめられた。また、DsbA(C33A)と DsbB(C104A)の反応の結果より、両者の結合は確認されなかった。これは、DsbA の Cys30 による DsbB の Cys104 への求核反応が起こらなかったためと考えられる。さらに、DsbA(C130A)と DsbA(C33A)は酸化反応と思われる振動数変化が観察され、グラフの初期の傾きが DsbA(native)の場合

に比べ小さく k_{fwd} が小さいと考えられる。稲葉らは DsbB の結晶構造解析を行う際、DsbB(C130A)と DsbA(C33A)との複合体を材料として用いていた[9]。その際、実際に酸化反応を行って、DsbB(C130A)-DsbA(C33A)複合体を調製していた($K_3Fe(CN)_6$, ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを用いて 1 時間氷上で処理)。今回の QCM の結果得られたチャートが DsbA(C130A)と DsbA(C33A)との酸化反応に由来するとすれば、DsbA(C33A)についても遊離の S^-が奇数個(1 つ)存在するため、DsbA(C33A)自身での酸化反応も当然起こりうると考えられる。

次に、DsbA(C33A)自身の酸化反応が起こっているかどうか確かめた。具体的には、**図 3-35** のようにアミンカップリング法で DsbA(C33A)を QCM 基板に固定化し、そこに DsbA(C33A)を添加した。

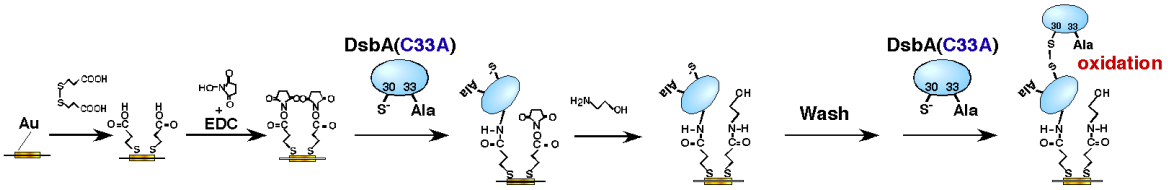


図 3-35 : アミンカップリング法による DsbA(C33A)の固定化と DsbA(C33A)自身の酸化反応の有無の確認

QCM の金基板にジチオジプロピオン酸を結合させた後、100 mg/mL NHS と 100 mg/mL EDC を等量ずつ混合し、セル内に 50 µL 添加した。10 分放置した後、Milli-Q 水で洗浄し、活性化エステルの状態にした。TCEP(+) HEPES buffer (50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 11 µM TCEP)を 500 µL 添加した。30 当量の還元剤 TCEP を用いて buffer(10 mM MOPS-NaOH, pH 7.0)中で室温 30 分処理した DsbA(C33A)を脱塩カラム未処理のまま、終濃度 378 nM となるように添加した。振動数変化が安定化したところで、1 M エタノールアミン水溶液を 1 µL 各セルに添

加し(終濃度 2 mM)、その後、TCEP (－) HEPES buffer で 3 回洗浄した(430 μL × 3 回)。その後、Zeba Desalt Spin Column(Pierce)を用いて TCEP を除いた DsbA(C33A)を終濃度 378 nM となるように添加した。

図 3-36 に結果を示した。DsbA(C33A)自身のダイマー形成は起こっていないことがわかった。DsbA(C33A)および DsbB(C130A)のみが特異的に酸化反応を起こすのは、X 線結晶構造解析の結果明らかになったように、DsbA の疎水性ポケットに DsbB の Cys104 を含む領域が入り込むからなのかもしれない[9]。なお、第 2 章の**図 2-46**, **図 2-48** では DsbA(C33A)どうしでダイマーを形成していたが、これは界面活性剤を使用していたため、DsbA(C33A)が多少失活したことによると考えられる。

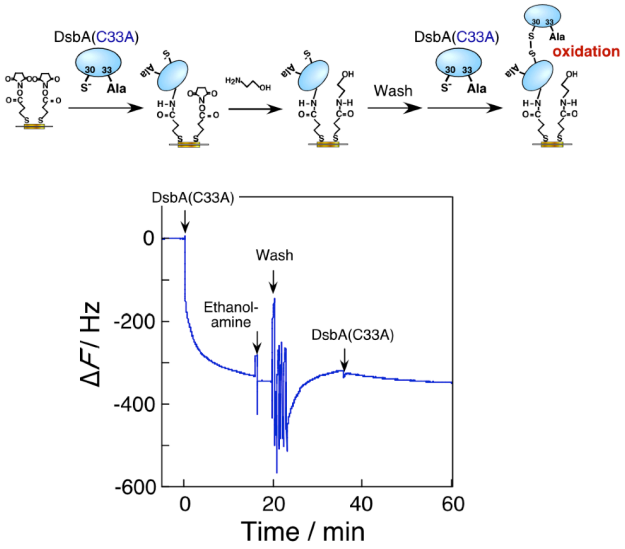


図 3-36：DsbA(C33A)自身の酸化反応の有無の確認チャート

50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 11 μM TCEP, 25 °C.

3-7　結言

本章では、DsbA と DsbB の反応に伴い両者間で形成される中間体を QCM で質量変化として検出できる特性を利用し、ジスルフィド結合を 2 組有する DsbB(native)とジスルフィド結合を 1 組有する DsbB(C41A,C44A)変異体を用いて DsbA(native)または DsbA(C33A)との反応を QCM で観察した。その結果、DsbB による DsbA の酸化反応は、DsbA の 2 つのシステインおよび DsbB の 4 つのシステインが全て関与した協奏的な反応であり、DsbA と DsbB の間で安定な中間体を形成していることが明らかになった。DsbB による DsbA の酸化経路はこれまで提案されていた、DsbB の 1 組のジスルフィド結合のみで反応が進行する Pathway I と DsbB の 2 組のジスルフィド結合が関与して反応が進行する Pathway II のうち、Pathway II が主に進行することが明らかになった。野生型 DsbB が DsbA と中間体を形成する場合と変異体 DsbB(C41A,C44A)が DsbA と中間体を形成できない場合の両者の反応動力学について比較した。その結果、**図 3-37** に示したように安定な中間体を形成することで、形成しない場合と比べ、逆反応を約 60 倍防ぎ、DsbA 酸化の効率を大きく向上させていることがわかった。Pathway I と II では DsbA の Cys33 による分子内求核反応(k_{cat})は等しいと考えられるので、Pathway I に対して Pathway II が進行する割合は逆反応 k_{rev} の比率を考慮し、100 x 60 / (1+60) = 98%となり、98%が Pathway II で進行し、2%が Pathway I で進行すると考えられる(**図 3-37**)。

さらに、DsbB には内在性ユビキノンが付随しているが、レドックスバッファーを利用し、系内の酸化還元電位を制御することで、酸化型ユビキノンを還元型ユビキノールに変換した実験系を構築した。一方、ユビキノン 8 のアナログであるユビキノン-10 を QCM 上の脂質膜作製時に添加することで、ユビキノンが過剰に存在

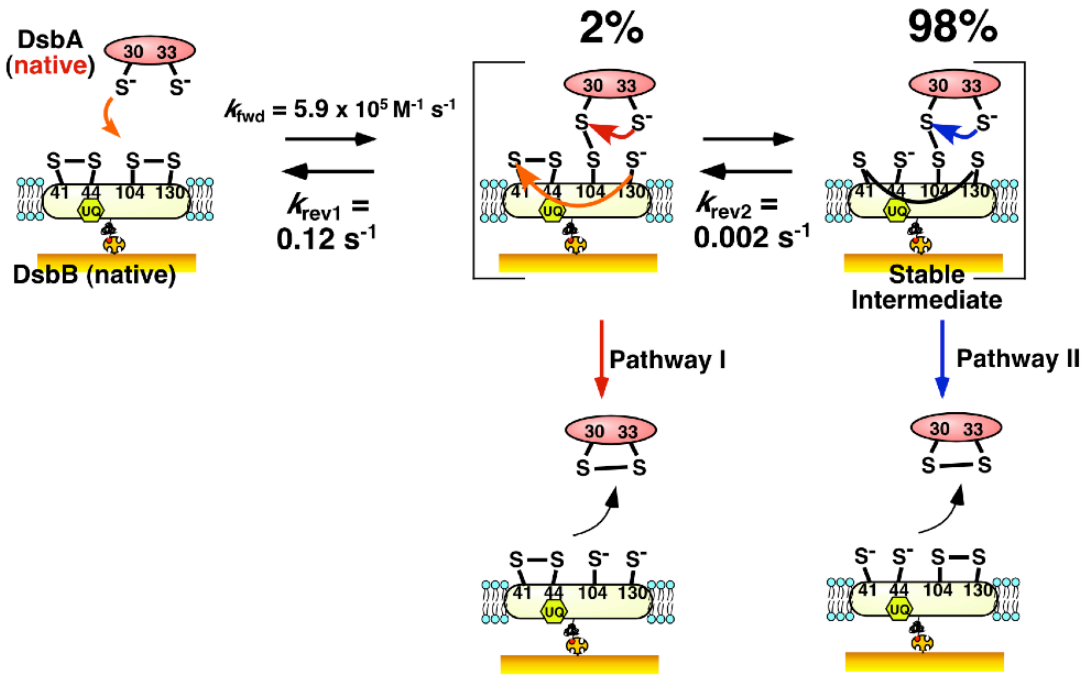


図 3-37：安定中間体を経由した Pathway II により達成される DsbA の酸化

する脂質二分子膜を QCM 基板上に構築した。それらの 2 種類の基板に DsbA(native) および DsbA(C33A)を添加して反応を観察し、動力学解析を行ったところ、ユビキノンは DsbB による DsbA の酸化反応の素過程の速度パラメータに影響を与えておらず、DsbB を再酸化する反応は、DsbA の酸化とは独立していることがわかった。

これまで DsbA と DsbB の反応は酸化還元電位の観点では説明できなかったが、DsbA と DsbB について求められた酸化還元電位はあくまでも DsbA と DsbB の各々個別値であり、DsbA-DsbB 中間体の酸化還元電位は求められていない。実際に、酸化還元電位の観点からは反応が進行すると思われる還元型 DsbB と酸化型 DsbA との反応について QCM 基板上で観察した結果、反応は進行していなかった。図 3-38 に示すように DsbA-DsbB 中間体の酸化還元電位は DsbA よりも＋側に移動し、電子が流れるように構造変化を伴い上手く調節しているものと考えられる。

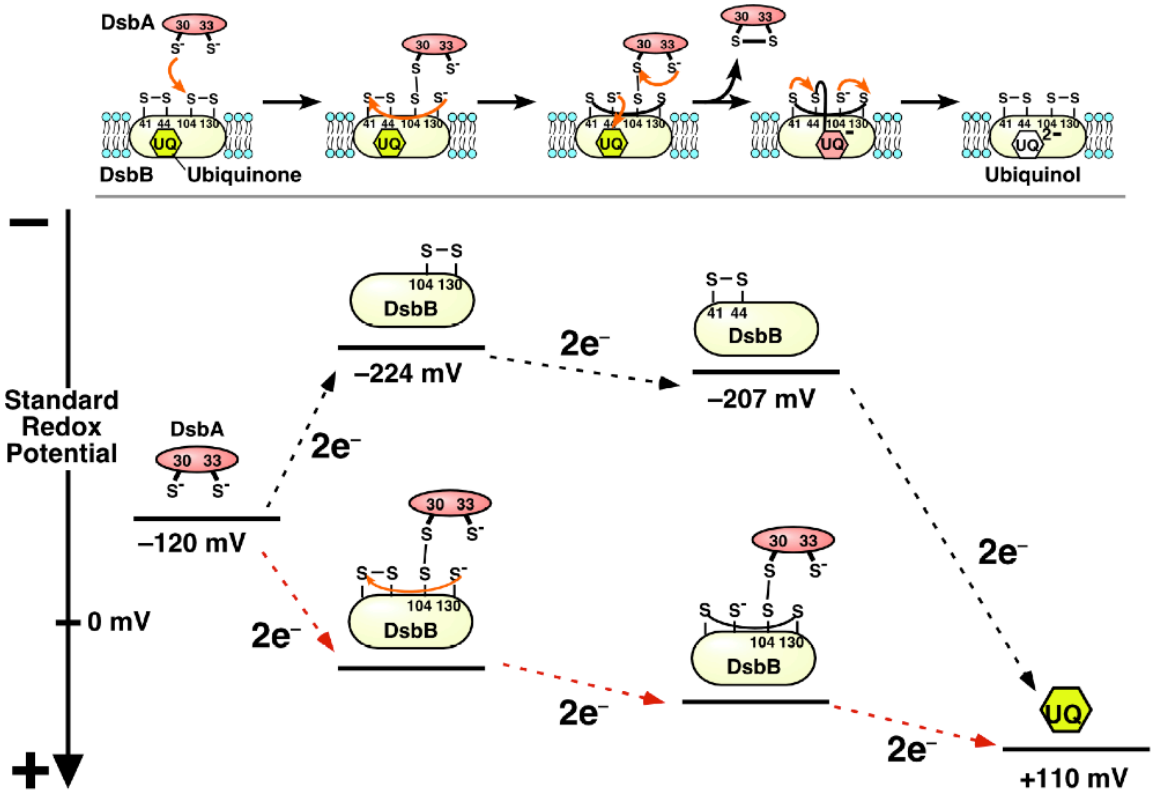


図 3-38：DsbA と DsbB の複合体形成により達成される電子伝達経路

第 3 章　参考文献

1) K. Inaba, Y. Takahashi, and K. Ito, *J. Biol. Chem*., **280**, 33035–33044 (2005).

2) U. Grauschopf, A. Fritz, and R. Glockshuber, *EMBO J*., **22**, 3503– 3513 (2003).

3) H. Kadokura and J. Beckwith, *EMBO J*., **21**, 2354–2363 (2002).

4) T. Tapley, T. Eichner, S. Gleiter, D. Ballou, and J. Bardwell. *J. Biol. Chem.,* **282**, 10263–10271 (2007).

5) H. Kadokura and J. Beckwith, *Antioxid. Redox Signal.,* **13**, 1231-46 (2010).

6) K. Inaba and K. Ito, *EMBO J*. **21**, 2646–2654 (2002).

7) H. Kadokura, M. Bader, H. Tian, J. Bardwell, and J. Beckwith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*., **97**, 10884–10889 (2000).

8）稲葉謙次, 日本生物物理学会会報誌, **46**, 257-262 (2006).

9) K. Inaba, S. Murakami, M. Suzuki, A. Nakagawa, E. Yamashita, K. Okada, and K. Ito, *Cell*, **127**, 789–801 (2006).

10) T. Kobayashi, S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi, and K. Ito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11857–11862 (1997).

11) K. Inaba, Y. Takahashi, K. Ito, and S. Hayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*., **280**, 287–292 (2006).

第 4 章　DsbB による DsbA 酸化反応の pH 耐性機構の解明

4-1　緒言

大腸菌のペリプラズム空間では**図 4-1** に示したようにジスルフィド結合導入因子の DsbA(Disulfide Bond formation protein A)が新生タンパク質のジスルフィド結合形成を促進する。それに伴い還元された DsbA は、内膜に存在する 4 回貫通型膜タンパク質 DsbB によって再酸化される。第 3 章の結果より、この DsbA と DsbB の反応は**図 4-1** に示した Pathway II のように、DsbA の Cys30 による DsbB の Cys104 への求核攻撃に始まり、Cys130 に移った電子が速やかに Cys44 に移ることで安定複合体が形成された後、DsbA の分子内求核反応により DsbA の酸化が達成されるチオール-ジスルフィド交換反応である。チオール基の求核性はチオレートアニオンである場合に大きく、pH によって結合および解離の速度が変化すると考えられる。チオール基の pK_a が一般に 8 ~ 9 であることを考えると、酸性および中性領域では反応速度は大きく低下すると予想されるが [1]、**図 4-2** のように DsbB による DsbA の酸化活性は広範囲の pH 領域(pH 4 ~ 9)において維持され、特に酸性側に最適 pH を有することが知られている [2]。このことは、Dsb システムが存在する大腸菌ペリプラズム空間の pH が外界の環境に応じて酸性側にもアルカリ性側にも変化することを考えると [2,3,4]、生理学的にも意義があると思われる。これまでに DsbA による新生タンパク質へのジスルフィド結合導入反応は酸性条件でも進行することが示されており、DsbA の Cys30 の pK_a が 3.5 と大変低いことが、その要因の 1

つとされている[5]。しかし、DsbA と DsbB が広い pH で反応できる機構についてはこれまでのところわかっていない。

本章では、**図 4-3** に示すように SDS-PAGE 解析法と水晶発振子マイクロバランス法を利用して、DsbA と DsbB の反応の pH ロバストネス機構を解明することを目的とした。具体的には**図 4-3(a)**に示したように高分子量のチオール基修飾剤を用いた SDS-PAGE によって、各 pH における反応産物である酸化 DsbA 量の定量を行った。その際、DsbB(native)と DsbB(C41A,C44A)の 2 種類を使用し DsbA を酸化する効率を各 pH で調べることで、DsbB の 2 組のジスルフィド結合が DsbA の酸化反応量に及ぼす影響を各 pH で調べた。さらに、**図 4-3(ｂ)**に示したように QCM を利用して基板上で起こる DsbA と DsbB の複合体形成を質量変化として検出することで、結合過程およびその後の DsbA 酸化過程についての動力学解析を各 pH 条件で行った。その際、DsbA(C33A)と DsbB(native)の反応から k_{fwd} と k_{rev2} を求め、DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の反応から k_{rev1} を求め、さらに DsbA(native)と DsbB(native)の反応から k_{cat} を求めて、それらの解析を各 pH 条件で行うことで、4 つの速度パラメータの pH-速度曲線を求めた。その pH-速度曲線について変曲点の値から速度定数の pK_a を調べることで、pK_a の観点から反応機構を考察した。

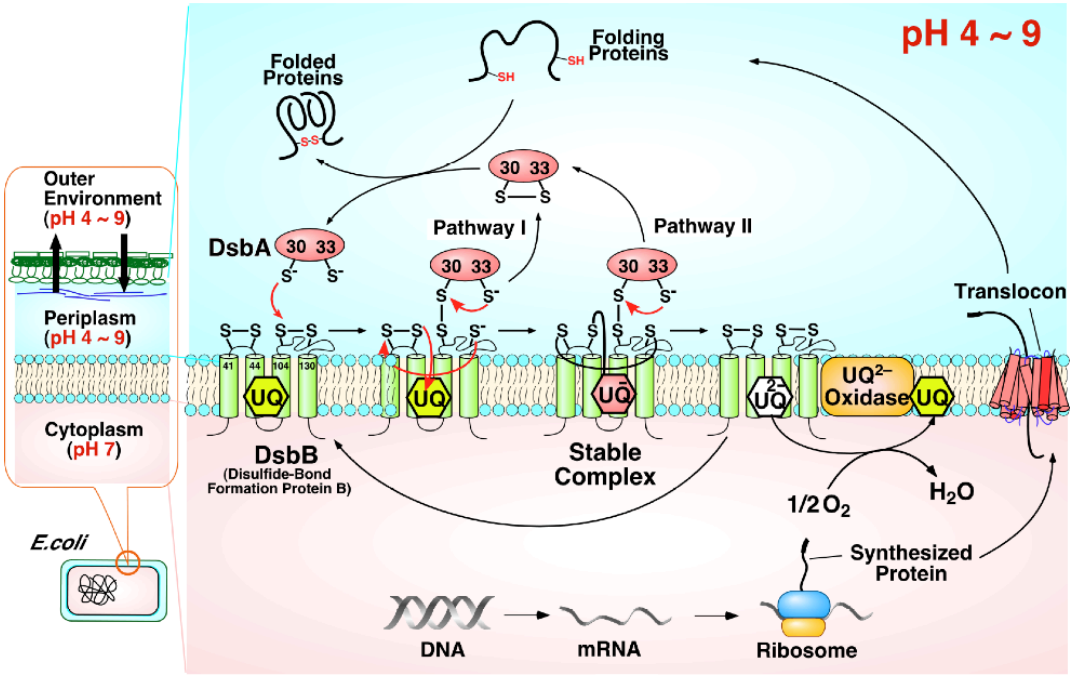


図 4-1：大腸菌ペリプラズム空間で進行する新生タンパク質の S-S 結合形成

大腸菌ペリプラズム空間の pH は外界の pH に依存し、大腸菌の生育可能な pH 4 ~ 9 の間で外界に応じて変化する。

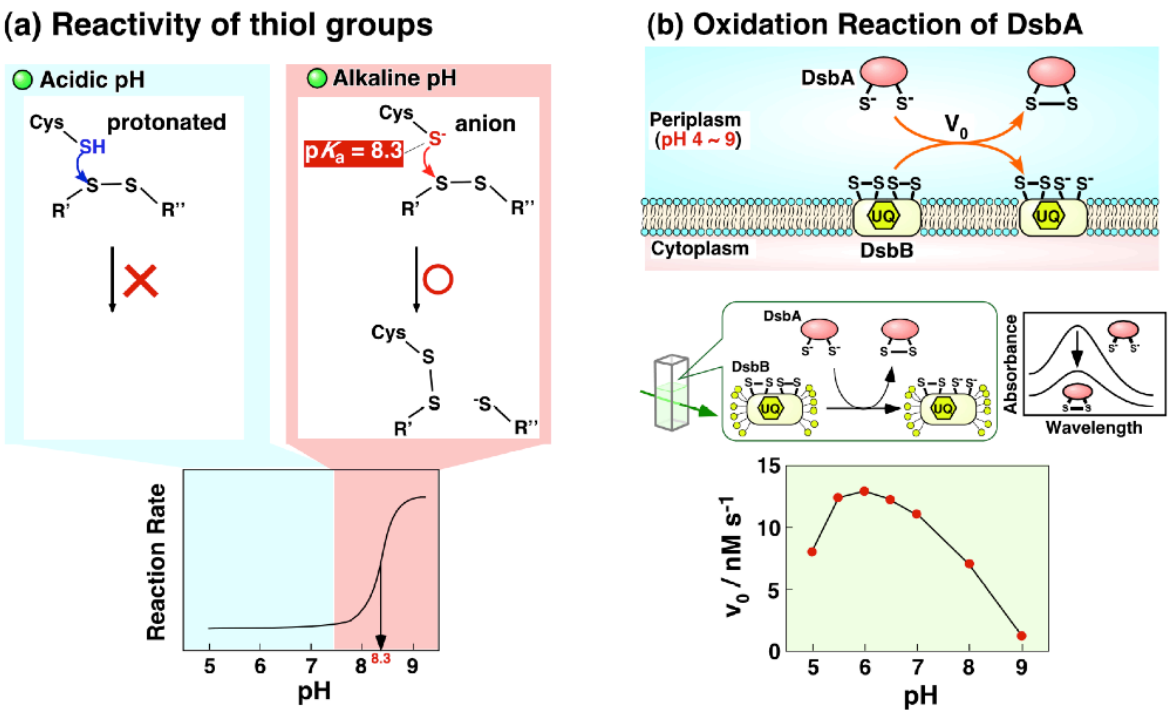


図 4-2：種々の pH における Cys 残基の SH 基の反応性と DsbA と DsbB の反応性

(a)システイン残基のチオール基の求核性はアルカリ性条件でチオレートアニオンになったときに大きいが [1]、(b)DsbA と DsbB の反応性は pH 6 を最適条件とし、広い pH でも反応可能である [2]。

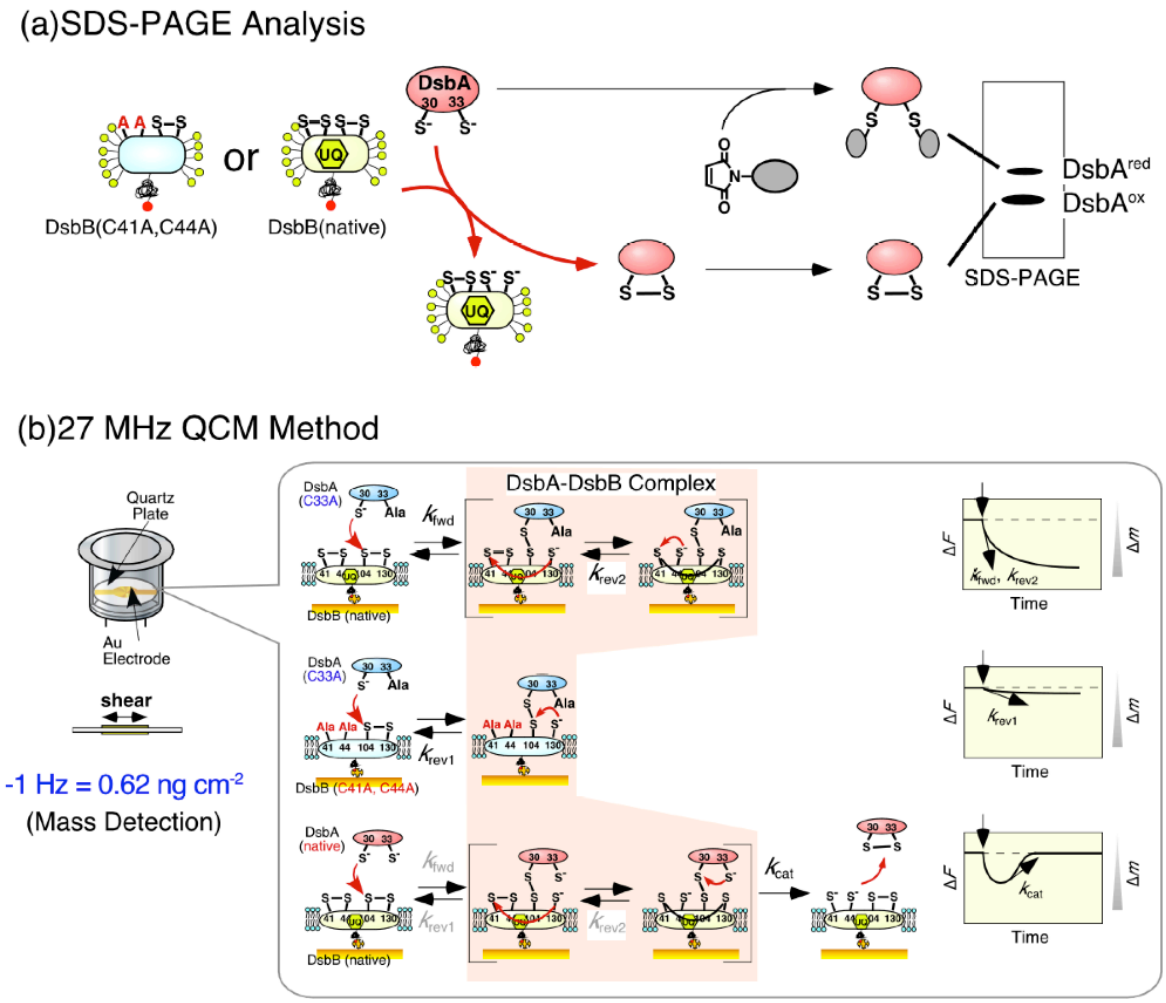


図 4-3：本研究で用いた実験手法

種々の pH 条件下において、(a)SDS-PAGE により反応産物の定量を行い、(b)QCM で DsbA と DsbB の反応動力学解析を行った。

4-2　実験方法

SDS-PAGE による DsbA と DsbB の反応生成物の定量は **3-4 節**で述べた方法で行い、pH 3 から pH 11 で行った。QCM 基板上での DsbB による DsbA の酸化反応観察は **3-3 節**で述べた方法で行い、pH 3 から pH 10 で行った。SUNBRIGHT ME-050MA(malPEG)は NOF corporation より購入した。ユビキノン-1 は SIGMA から購入した。

4-3　種々の pH での SDS-PAGE を用いた DsbB による DsbA 酸化反応産物の定量

DsbB による DsbA の酸化反応について、SDS-PAGE 解析によって各 pH における酸化効率を調べた。DsbB は野生型の DsbB(native)とシステイン残基 2 変異体の DsbB(C41A,C44A)を使用した。実験方法は **3-4 節**において pH 6 で SDS-PAGE 解析を行った操作と同様である。還元剤 TCEP で処理・脱塩した 17 μM の還元型 DsbA を 34 μM の酸化型 DsbB と室温で 3 分間、0.1%の DDM 含有の各 pH バッファー中で反応させた(pH 3.0 ~ pH 6.0 (100 mM Citrate buffer), pH 6.5 ~ 7.0 (100 mM MOPS-NaOH), pH 7.5 (100 mM HEPES-NaOH), pH 8.0 ~ 9.0 (100 mM Tris-HCl), pH 10.0 (100 mM glycine-NaOH))。TCA 沈殿後、Modification buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% SDS, 23 mM AMS) 10 μL で溶解し、37 °C で 2 時間反応させた。非還元用の SDS-PAGE サンプルバッファーを 10 μL 添加し、37 °C で 5 分反応させた後、非還元 PAGE を行った。BCCP-DsbB(C41A, C44A)変異体についても同様に SDS-PAGE 用サンプルを調製した。

各 pH 条件下での SDS-PAGE 解析の結果を**図 4-4** に示した。また、バンド定量ソフトウェアである Image Lab Version 3.0(Bio-Rad)を利用して、DsbB 野生型および変異体がそれぞれ酸化した DsbA の定量結果を**図 4-5** に示した。DsbB(native)を用いた場合は((a)赤のグラフ)、pH 3 から pH 10 までの pH 範囲において、DsbA の酸化は達成されたことがわかった。その中でも pH 4 から pH 8 までにおいて、DsbA の酸化活性が大きい結果であった。一方、DsbB(C41A, C44A)変異体を用いた場合((b)緑のグラフ)、pH 3 から pH 6 までは DsbA の酸化が DsbB(native)の場合と比較して反応量は 1/3 程度であったが、一方 pH 7 以上ではほとんど反応は進行しなかった。

以上の結果より、DsbB(native)は広い pH 範囲において、DsbA の酸化効率を大きく向上させ、さらに DsbA の酸化活性をよりアルカリ性の pH 8 まで可能にしていて、それには DsbB の Cys41 と Cys44 の存在が重要であることがわかった。

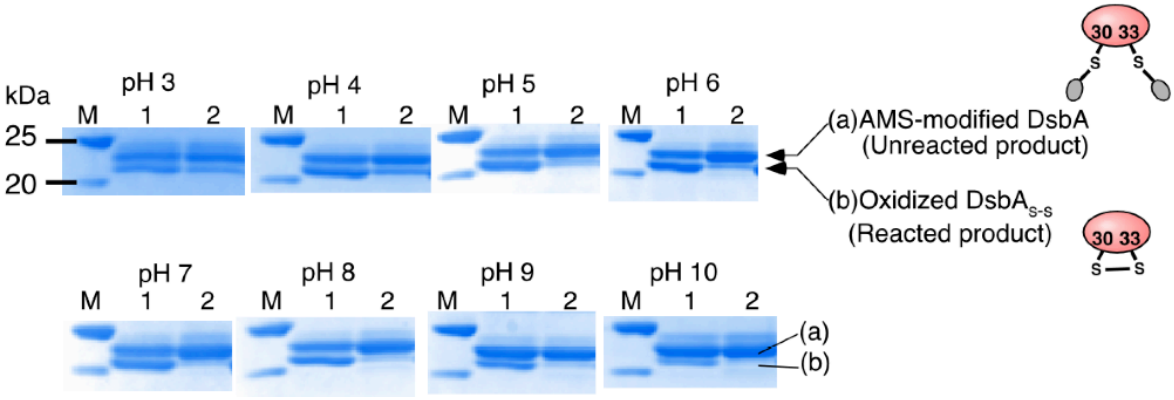


図 4-4：SDS-PAGE 解析を用いた種々の pH 条件で DsbB により酸化された DsbA の定量

レーン 1 は DsbB(native)の場合、レーン 2 は DsbB(C41A,C44A)の場合を表す。

0.1% DDM, pH 3 ~ 6(100 mM citrate), pH 7(100 mM MOPS-NaOH), pH 8 ~ 9(100 mM Tris-HCl), pH 10(100 mM Glycine-NaOH), 25 °C.

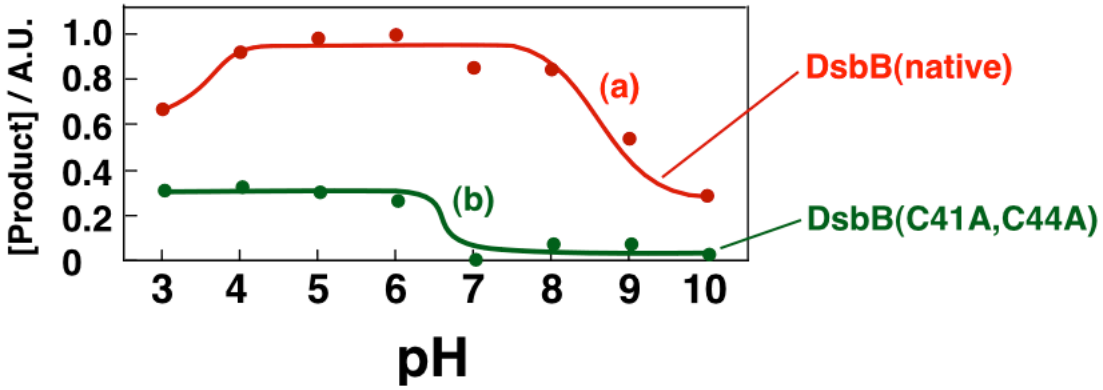


図 4-5：SDS-PAGE 解析を用いた種々の pH 条件での酸化 DsbA の定量

pH 3 ~ 6 (100 mM citrate), pH 7 (100 mM MOPS-NaOH), pH 8 ~ 9 (100 mM Tris-HCl), pH 10 (100 mM Glycine-NaOH), 0.1% DDM, 25 °C.

4-4　種々の pH 条件下での DsbB による DsbA 酸化反応の動力学解析

広い pH 範囲で反応性が維持される機構を動力学パラメータの観点から明らかにするため、QCM を用いて DsbB による DsbA の酸化反応の動力学解析を行った。

4-4-1　DsbA と DsbB の種々の pH 条件下における反応観察と動力学解析

(1)pH 4 ~ pH 8 での反応

QCM を用いて DsbB(native)による DsbA の酸化反応について、種々の pH 条件下について反応観察を行った。結果を図 4-6 に示した。

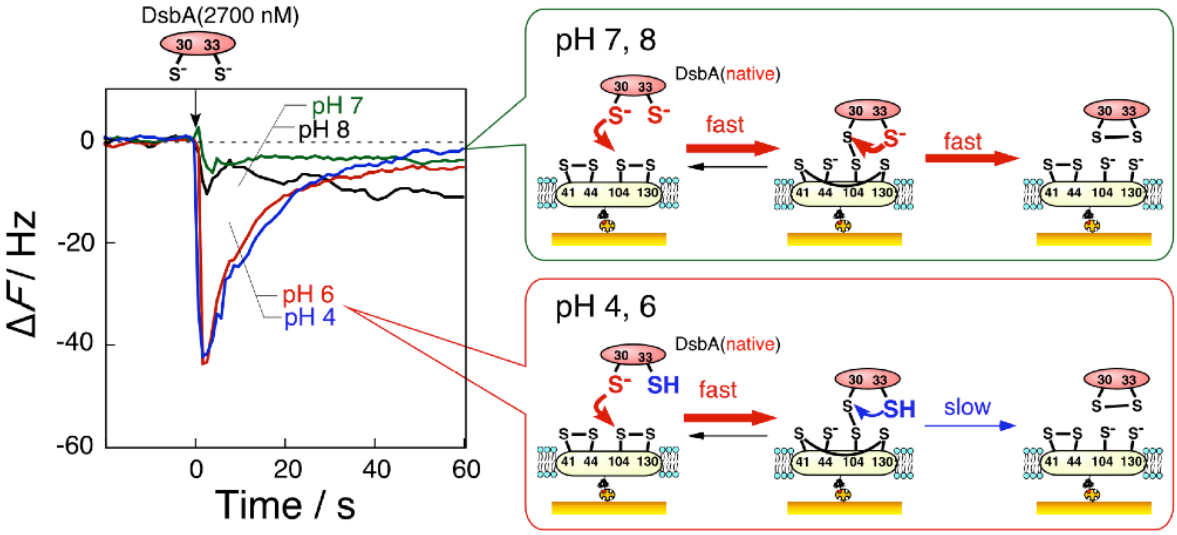


図 4-6：種々の pH 条件での QCM を用いた DsbB による DsbA の酸化反応観察

pH 4, 6(50 mM citrate), pH 7(50 mM MOPS-NaOH), pH 8(50 mM Tris-HCl), 100 mM NaCl, 25 °C.それぞれの pH の反応チャートは、対応する pH の酸化型 DsbA(native)と DsbB の反応チャートを差し引いている。

pH によって挙動に変化が見られた。pH 4 および pH 6 の条件では、振動数減少の後、振動数上昇が観察されたが、pH 7 および pH 8 の条件では振動数変化は確認されなかった。pH 7 および pH 8 で振動数変化が観察されなかったのは、DsbA の Cys33

による分子内求核反応が速すぎたため、QCM で検出できなかったと考えられる。これまでに吸光度解析によって DsbA の Cys33 の pK_a は 10 より大きいことが報告されてきたが[6]、実際は pK_a が 6.5 付近の可能性がある。

(2)pH 7.5 ~ pH 11 での反応

DsbA(native)と DsbB(native)の反応において、pH が 7 より大きい条件では、振動数変化が観察されなかった。この場合、2 通りの理由が考えられる。1 つ目は pH 7 ~ pH 11 では DsbB と DsbA(native)が反応していない、2 つ目は DsbA と DsbB は反応しているが、中間体の解消が速く QCM のタイムスケールで検出できなかった、という可能性がある。両者を判別するために、DsbA(native)を加えた後、12 分程経った後に、DsbA(C33A)を系内に添加する実験を行った。仮に、DsbA(native)が DsbB と反応していれば、DsbB が還元型に変化し、DsbA(C33A)との複合体は形成できないはずである。

結果を**図 4-7** に示した。**図 4-7(a)**のように DsbA(native)を添加した後に DsbA(C33A)を添加しても DsbB との間の複合体形成が起こらないことが分かった。コントロールとして、DsbA(C30A)添加後に DsbA(C33A)を添加すると、**図 4-7(b)**のように結合に伴う振動数減少が観察された。以上の結果より、DsbA と DsbB との間の反応が QCM 装置で観察されなかったのは、決して反応が起こっていなかったのではなく、DsbA と DsbB の間で起こる反応速度(k_{cat})が k_{fwd}[DsbA]より速く[7]、QCM のタイムスケール（1 秒に 1 点）では中間体が検出できなかったためということが分かった。また、pH 11 ではコントロールとしての DsbA(C30A)を添加した後に DsbA(C33A)を添加した場合でも結合が見られなくなったため、DsbB の活性が確認できなかった。これは pH 11 の条件で起こる静電的反発や変性に由来すると

考えられる。しかし、少なくとも pH 10 までは QCM 上で DsbA と DsbB が反応することがわかり、これは**図 4-4** に示した SDS-PAGE の結果と一致している。

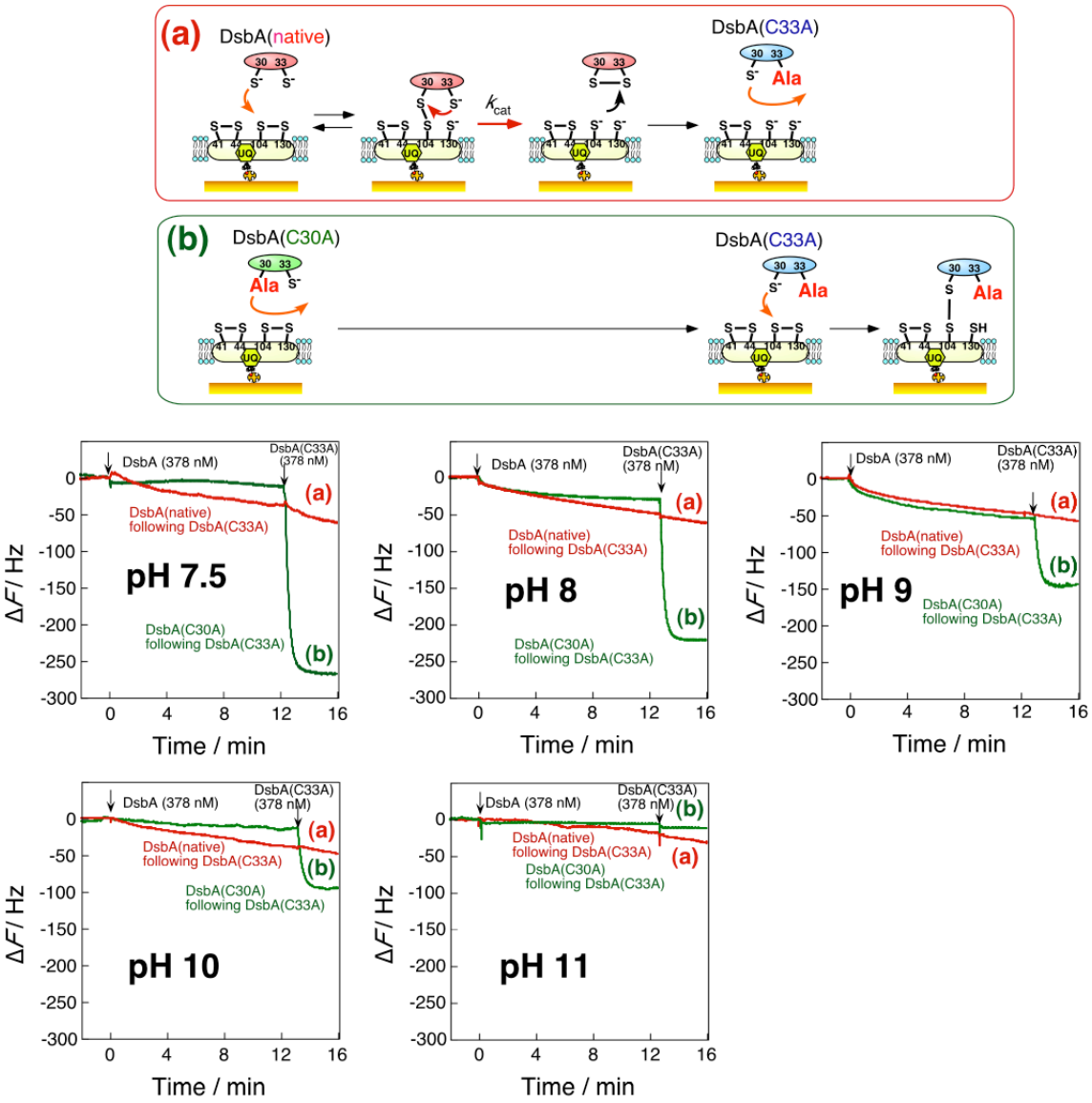


図 4-7：pH 7.5 から pH 11 における DsbA と DsbB の反応性の確認実験

DsbA(native)または DsbA(C30A)を添加後、DsbA(C33A)を添加することで、DsbA(native)の反応性を調べた。pH 7.5 (50 mM HEPES-NaOH), pH 8, 9 (50 mM Tris-HCl), pH 10 (50 mM glycine-NaOH), or pH 11.0 (50 mM Na_2HPO_4-NaOH), 100 mM NaCl at 25 °C.

(3) 酸化型 DsbA(native)と DsbB(native)の種々の pH における反応観察

図 4-10 のように酸化型 DsbA(native)と DsbB は各 pH において反応は観察されず、

非特異結合に由来すると思われる結合のみが観察された。ただし、pH 3 では DsbA または DsbB のどちらかが変性したと考えられる。pH が酸性側でもアルカリ性側でも非特異結合量に大きな差は見られないので、QCM で観察される振動数変化は DsbA と DsbB の間でジスルフィド結合が形成されたことに由来する特異的なものであり、静電的相互作用による結合は小さいことがわかった。

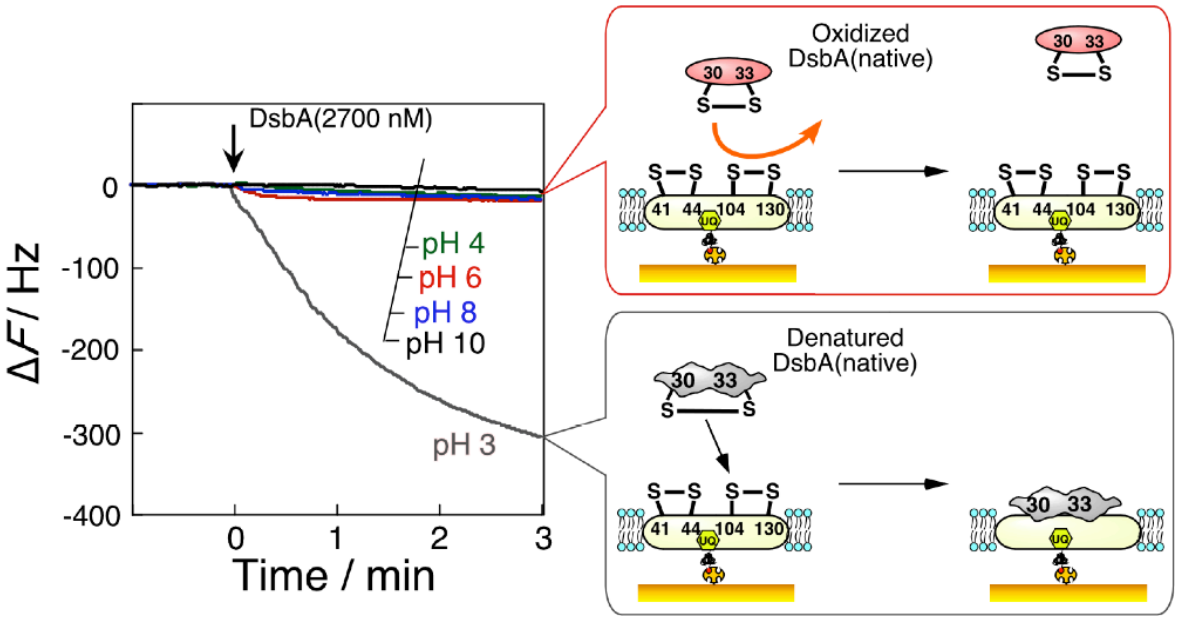


図 4-8：種々の pH 条件での QCM を用いた酸化型 DsbA と DsbB の反応観察

pH 3, 4, 6(50 mM citrate), pH 8(50 mM Tris-HCl), pH 10(50 mM glycine-NaOH), 100 mM NaCl, 25 °C.

(4) 還元 DsbA(C30A)と DsbB(native)の種々の pH における反応観察

図 4-11 のように還元型 DsbA(C30A)と DsbB は各 pH において反応は観察されず、非特異結合に由来すると思われる結合のみが観察された。ただし、pH 3 では DsbA(C30A)または DsbB のどちらかが変性したと考えられる。pH が酸性側でもアルカリ性側でも非特異結合量に大きな差は見られないので、QCM で観察される振動数変化は DsbA と DsbB の間でジスルフィド結合が形成されたことに由来する特異的なものであり、静電的相互作用による結合は小さいことがわかった。

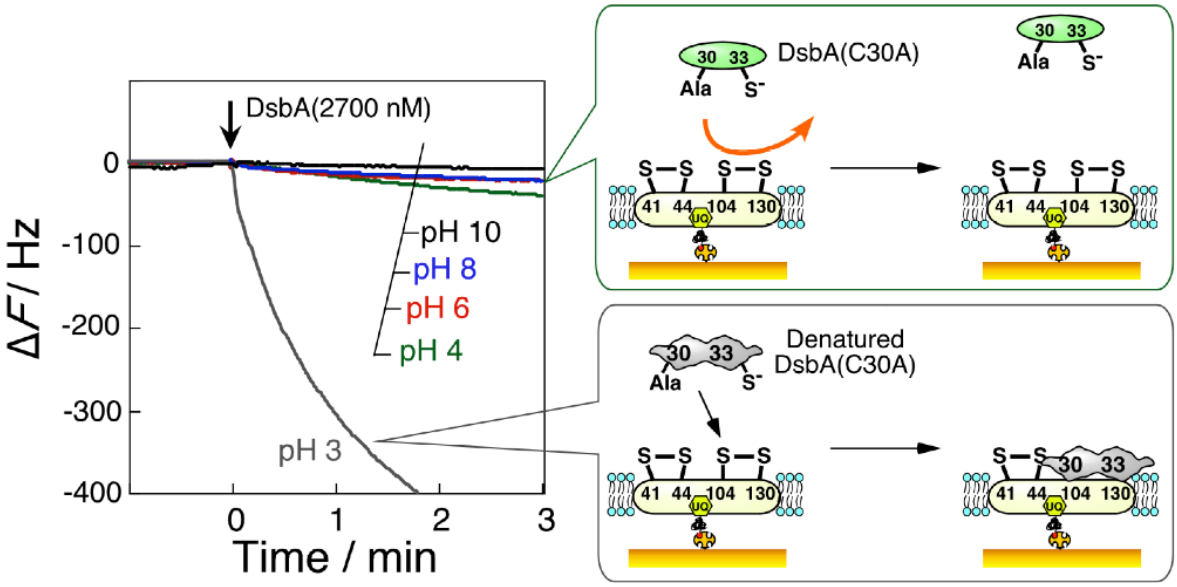


図 4-9：種々の pH 条件での QCM を用いた DsbA(C30A)と DsbB の反応観察

pH 3, 4, 6(50 mM citrate), pH 8(50 mM Tris-HCl), pH 10.0 (50 mM glycine-NaOH), 100 mM NaCl, 25 °C.

(5) pH 3.5 ~ pH 6 における還元型 DsbA(native)と酸化型 DsbB の反応の動力学解析

2-6 節で示した手法により、還元型 DsbA と酸化型 DsbB の各 pH におけるチャートについて、動力学解析を行った。結果を**図 4-10** に示した。pH 6 以下においては振動数減少の後、振動数上昇する挙動が観察された。一方、pH 7 以上では振動数減少は観察されなかった。このことから、pH 7 以上では DsbA の Cys33 がチオレートアニオン（-S$^-$）の状態になることで、k_{cat} が大きくなり、QCM で中間体を検出する前に DsbA の酸化が進行してしまうものと思われる。k_{cat} の pK_a は 6 より大きい範囲に存在することが示唆された。また、pH 6.5 よりアルカリ性側では振動数減少の成分が観察されなかったので解析できなかった。pH 2.5 および pH 3.0 では DsbA または DsbB が変性していると考えられる挙動が観察され、動力学解析が困難であった。

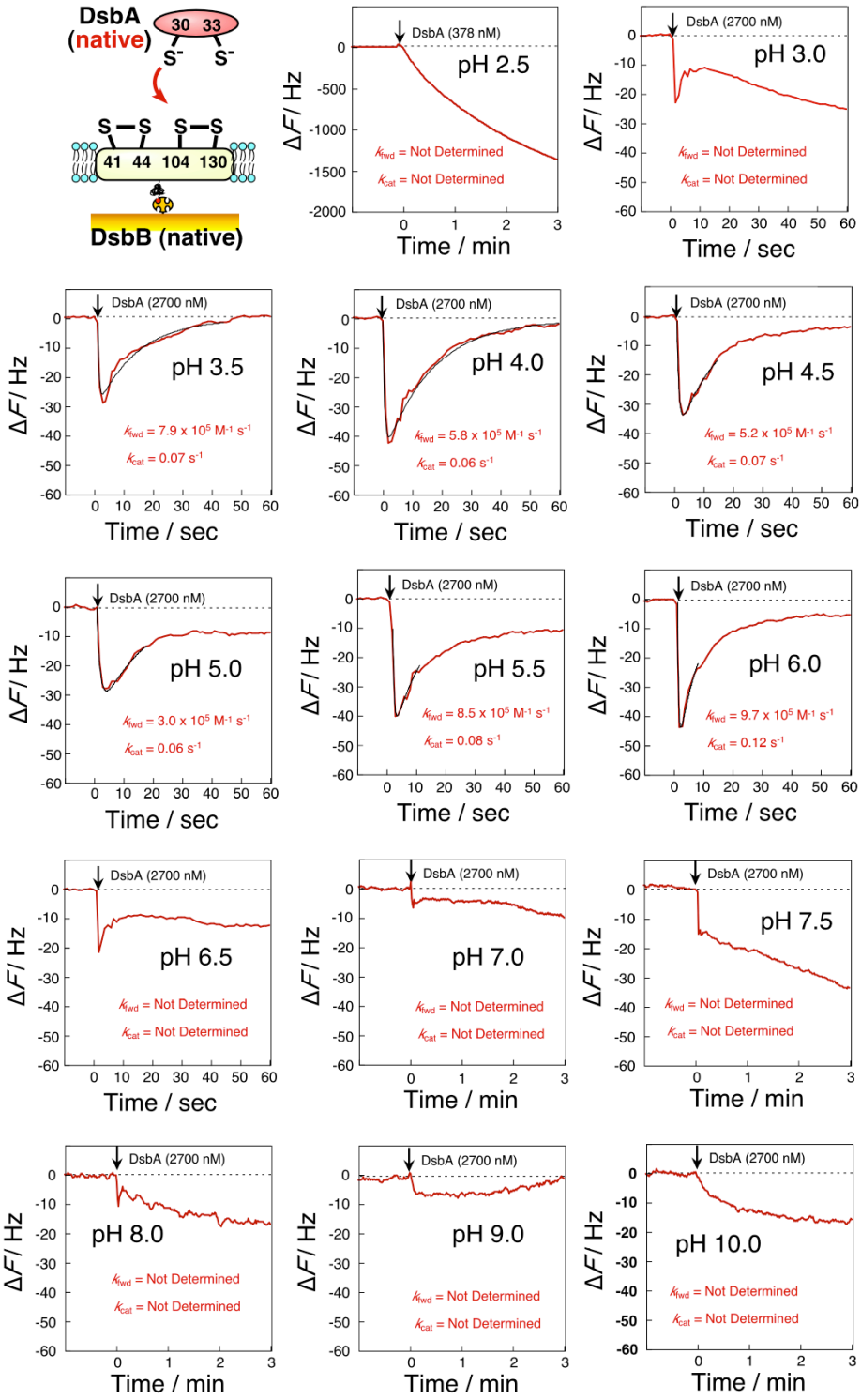


図 4-10：種々の pH 条件での QCM を用いた還元型 DsbA(native)と DsbB(native)の反応動力学解析

pH 2.5 ~ pH 6 (50 mM citrate buffer), pH 6.5, 7.0 (50 mM MOPS-NaOH), pH 7.5 (50 mM HEPES-NaOH), pH 8.0 ~ 9.0 (50 mM Tris-HCl), pH 10.0 (50 mM glycine-NaOH), 100 mM NaCl at 25 °C. それぞれの pH の反応チャートは、対応する pH の酸化型 DsbA(native)と DsbB の反応チャートを差し引いている。

4-4-2　DsbA(C33A)と DsbB の種々の pH における反応観察と動力学解析

DsbA(C33A)と DsbB は各 pH において、図 4-11 に示すように結合挙動が観察された。pH 4 から pH 7 の領域では結合量が大きかったが、pH 8 を境にアルカリ性側では結合量は減少した。

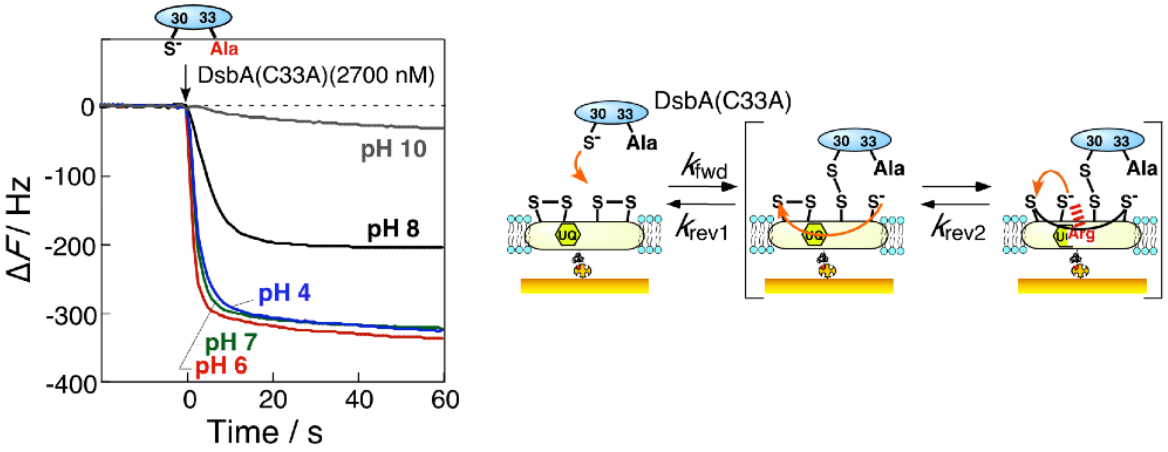


図 4-11：種々の pH 条件での QCM を用いた DsbA(C33A)と DsbB の反応観察

pH 4, 6(50 mM citrate), pH 7(50 mM MOPS-NaOH), pH 8(50 mM Tris-HCl), 100 mM NaCl, 25 °C.

以下図 4-12 から図 4-22 に各 pH で DsbA(C33A)の添加濃度を種々に変えた場合の DsbB(native)との結合チャートを示した。2-6 節で示した動力学解析の手法にならって、飽和法と緩和法を利用した動力学解析を行った。

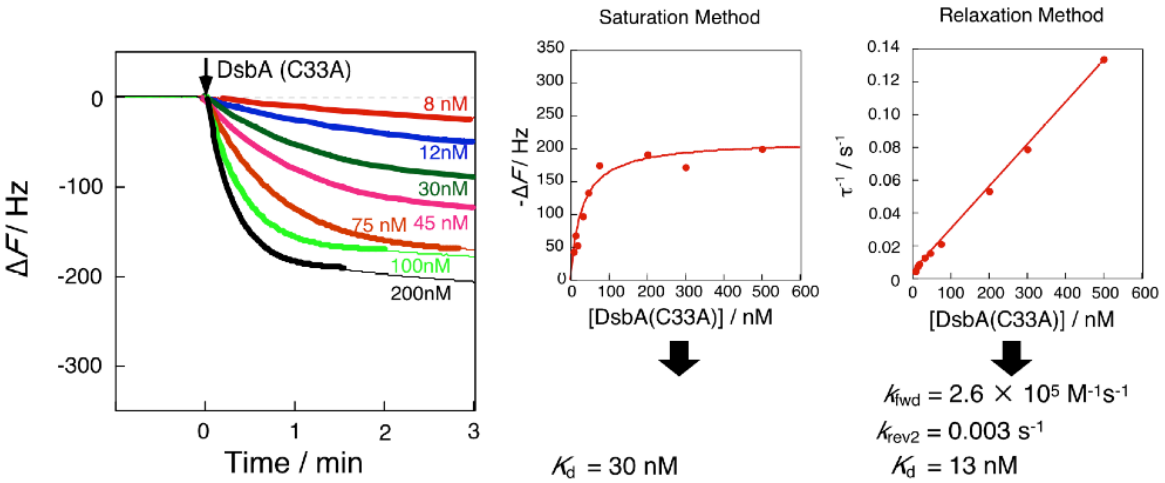


図 4-12：pH 3.5 における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の動力学解析

25 °C, 50 mM citrate buffer, pH 3.5, 100 mM NaCl.

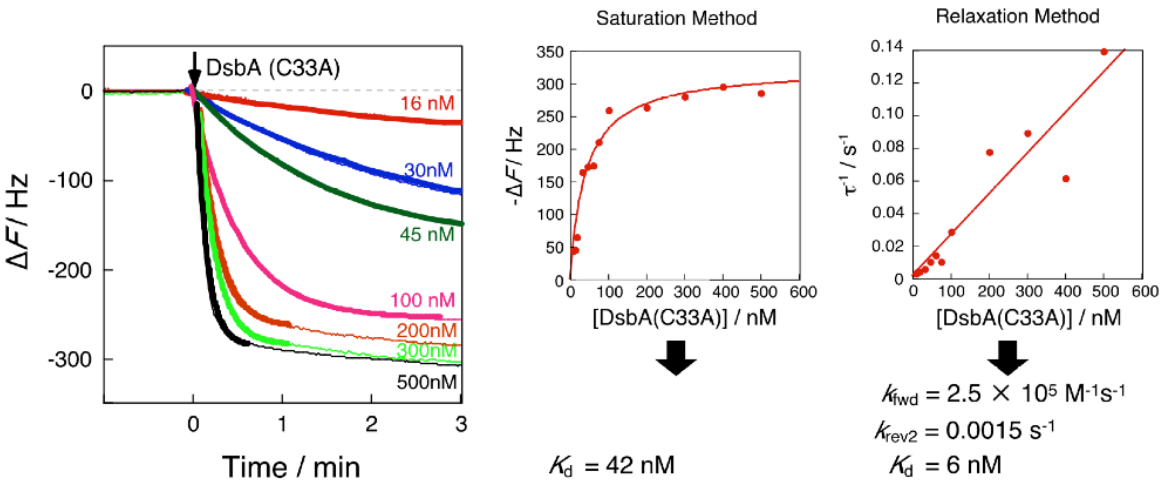


図 4-13：pH 4.0 における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の動力学解析

25 °C, 50 mM citrate buffer, pH 4.0, 100 mM NaCl.

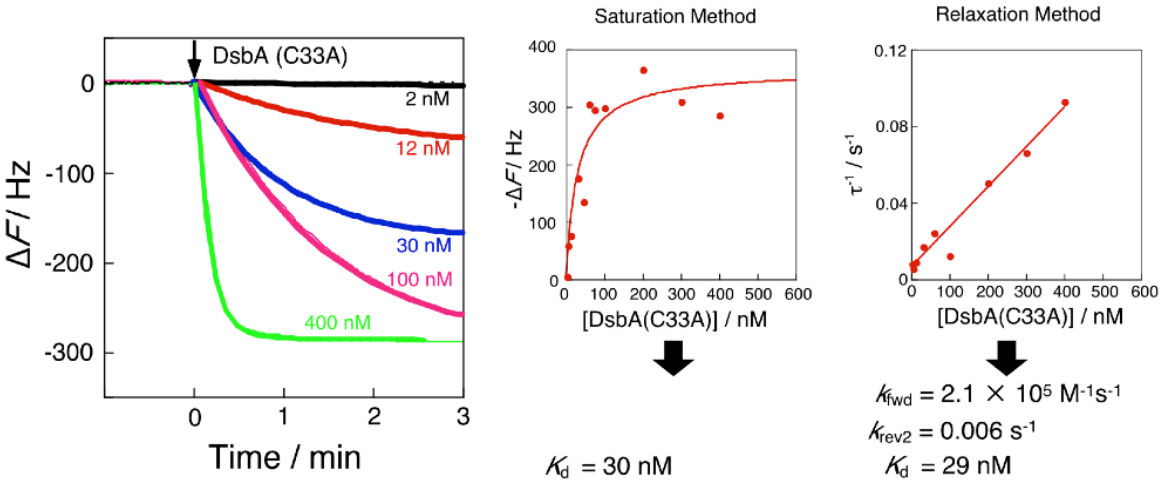


図 4-14：pH 4.5 における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の動力学解析

25 °C, 50 mM citrate buffer, pH 4.5, 100 mM NaCl.

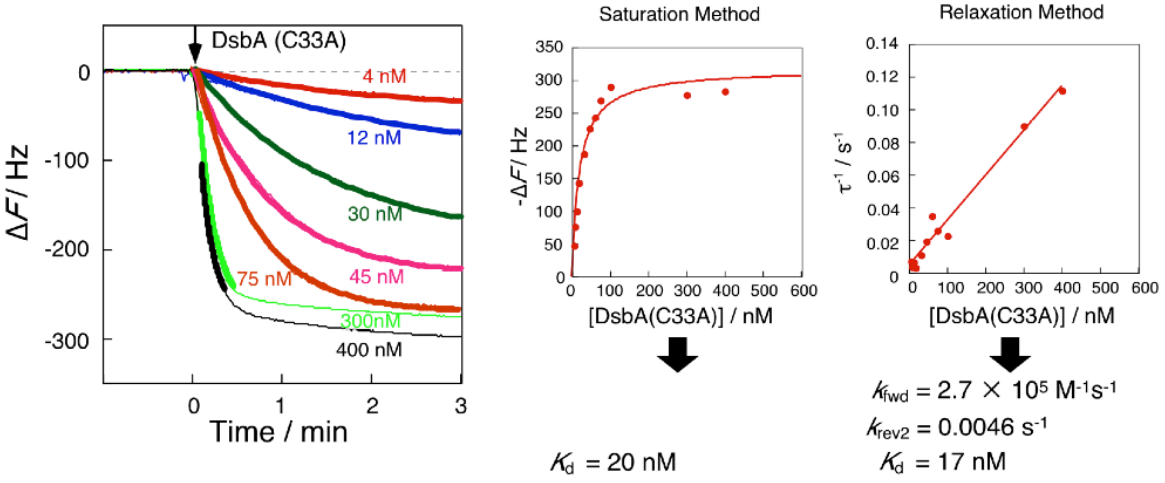


図 4-15：pH 5.0 における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の動力学解析

25 °C, 50 mM citrate buffer, pH 5.0, 100 mM NaCl.

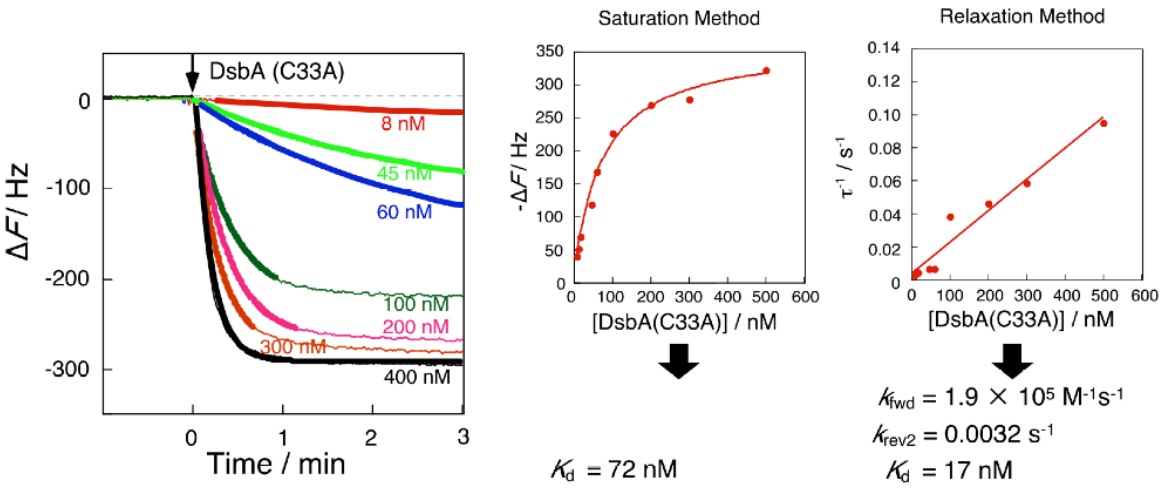


図 4-16：pH 5.5 における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の動力学解析

25 °C, 50 mM citrate buffer, pH 5.5, 100 mM NaCl.

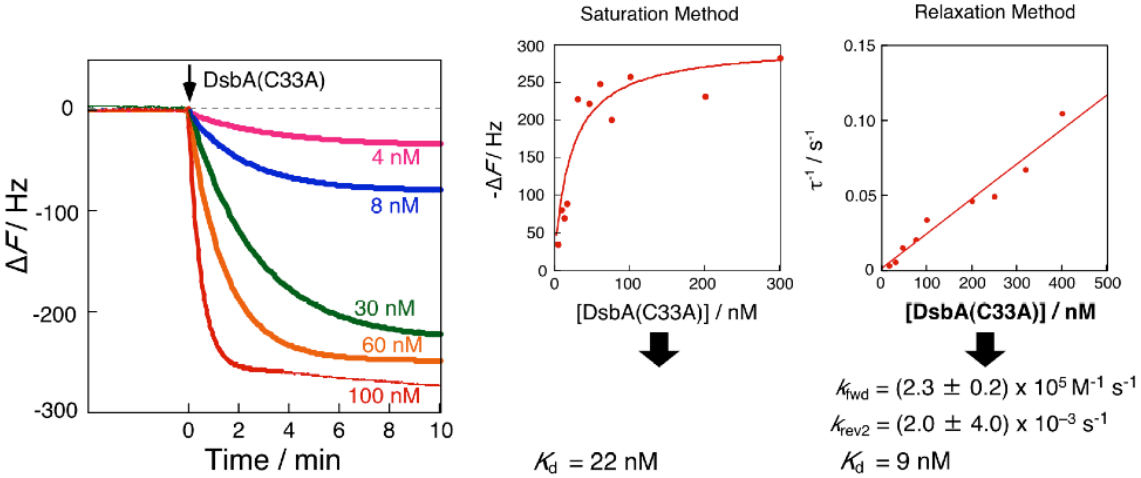


図 4-17：pH 6.0 における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の動力学解析

25 °C, 50 mM citrate buffer, pH 6.0, 100 mM NaCl.

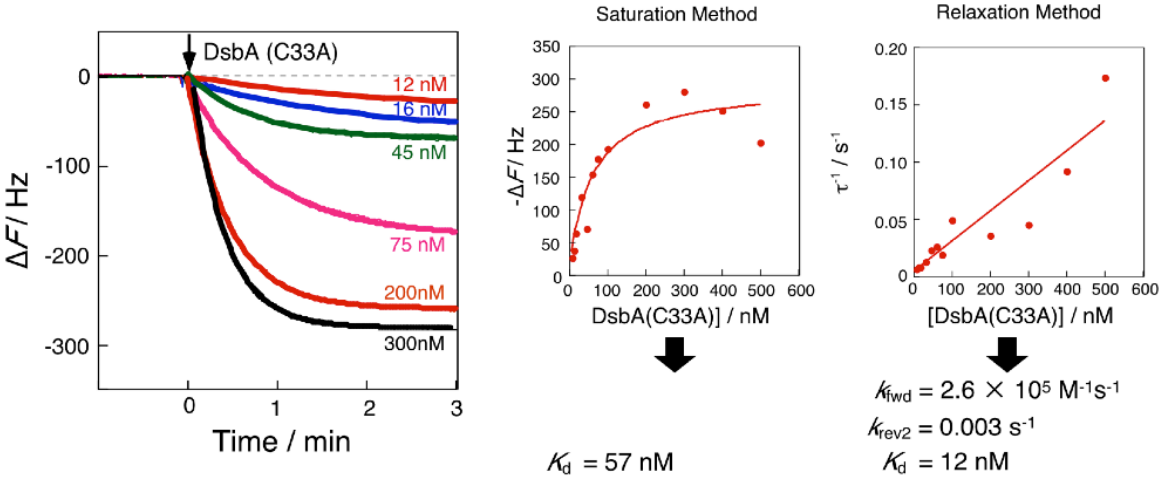


図 4-18：pH 6.5 における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の動力学解析

25 °C, 50 mM MOPS-NaOH buffer, pH 6.5, 100 mM NaCl.

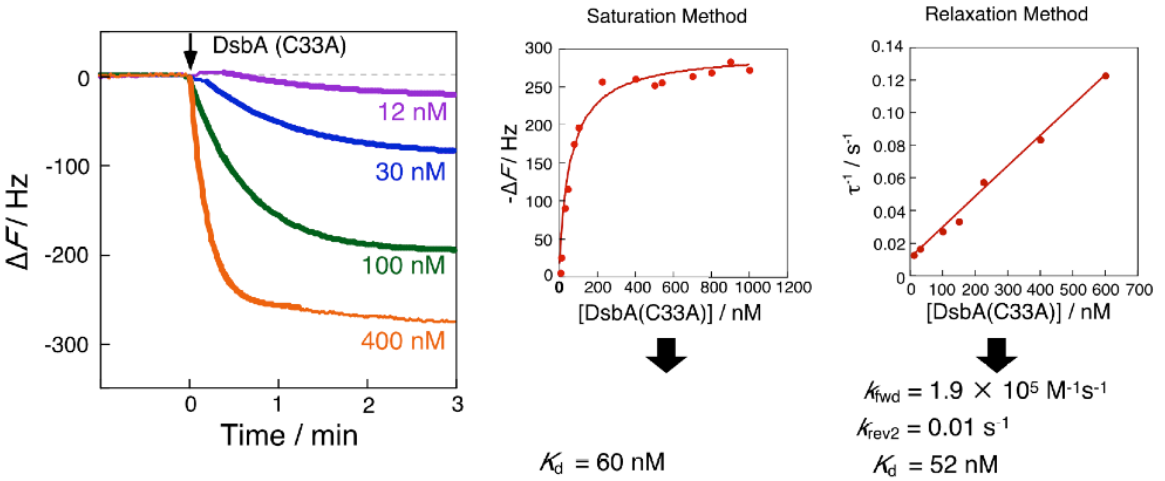


図 4-19：pH 7.5 における DsbA(C33A)と DsbB の結合過程の動力学解析

25 °C, 50 mMHEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl.

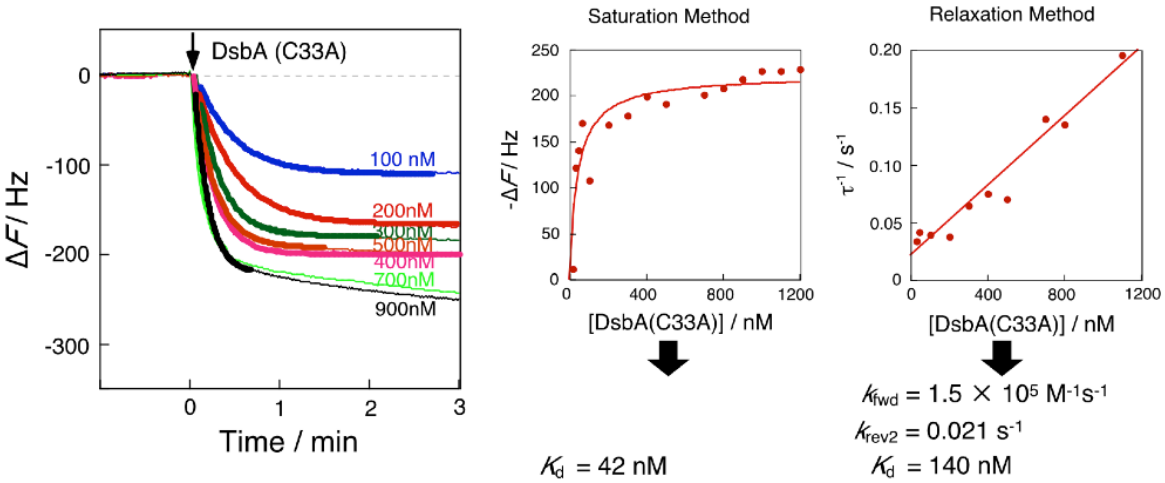


図 4-20：pH 8.0 における DsbA(C33A)と DsbB の結合反応の動力学解析

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl at 25 °C

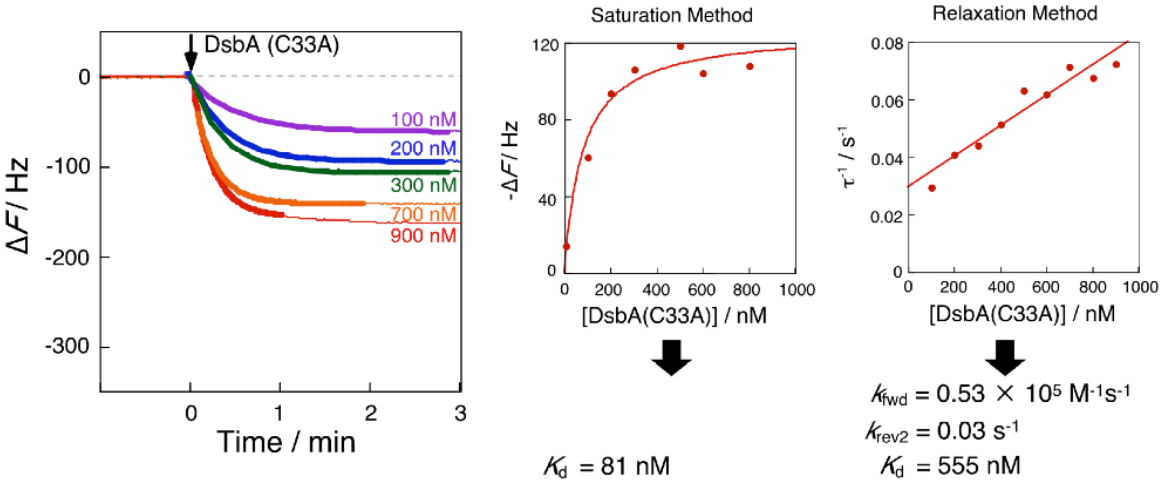


図 4-21：pH 9.0 における DsbA(C33A)と DsbB の結合反応の動力学解析

50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 100 mM NaCl at 25 °C

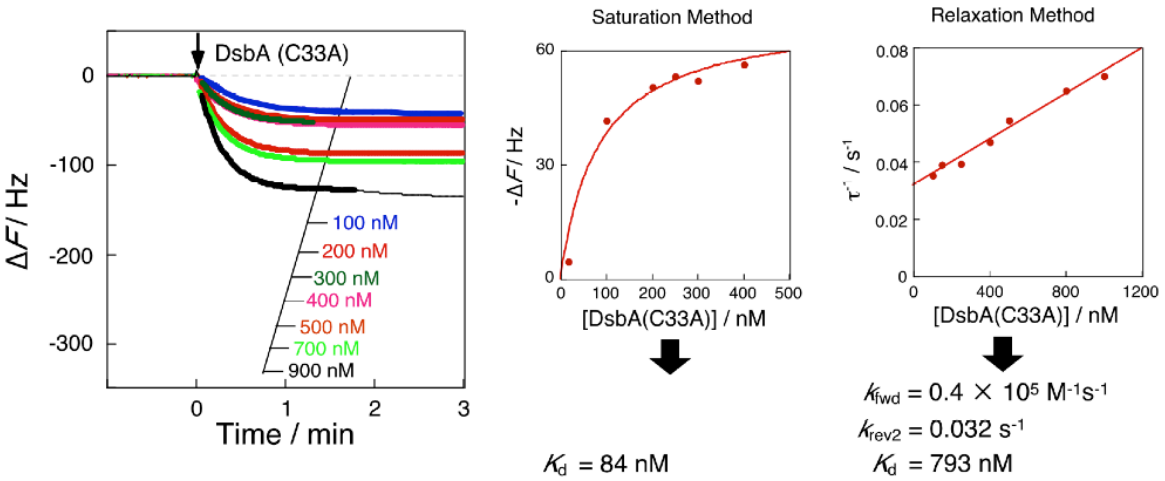


図 4-22：pH 10.0 における DsbA(C33A)と DsbB の結合反応の動力学解析

50 mM glycine-NaOH (pH 10.0), 100 mM NaCl at 25 °C

DsbA(C33A)と DsbB(native)の結合について**図 4-23** に示すように pH 3.0 においては DsbA(C33A)または DsbB(native)が変性し、非特異結合したと思われる挙動が観察された。

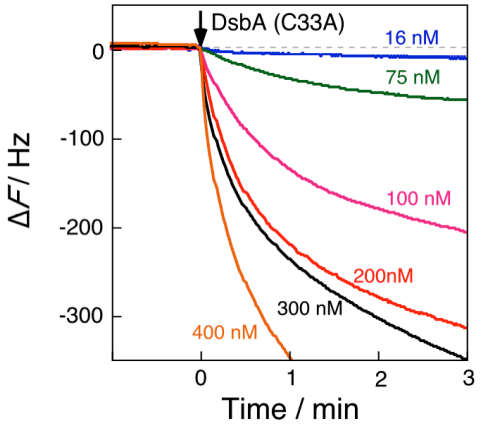


図 4-23：pH 3.0 における DsbA(C33A)と DsbB の結合反応チャート

50 mM Citrate, pH 3.0, 100 mM NaCl, 25 °C

DsbA(C33A)と DsbB(native)の結合過程について各 pH 条件における動力学解析の結果、得られた k_{fwd} と k_{rev2} の pH-速度曲線を**図 4-24** に示した。k_{rev2} については pK_a が 8.0 付近に存在することが分かった。k_{fwd} はアルカリ性側で減少していくことがわかった。k_{rev2} の pK_a は、DsbB の Cys44 による Cys41–Cys130 間のジスルフィド結

合への求核攻撃による逆反応に起因するとも考えられるが(**図 4-11**)、ユビキノンの電子状態遷移の解析により DsbB の Cys44 の pK_a が 6.6 であることが報告されており [8,13]、DsbB の Cys44 による逆反応の可能性は考えにくい。また、DsbB の Cys44 のチオレートアニオンは近傍に存在する DsbB の Arg48 と静電的相互作用によって安定化することが知られており [9,10]、アルカリ性条件ではその安定化作用は大きくなると思われる。k_{fwd} の pH-rate profile がアルカリ性側で小さいことを考えると、変性もしくは静電的反発による影響と考えられる。

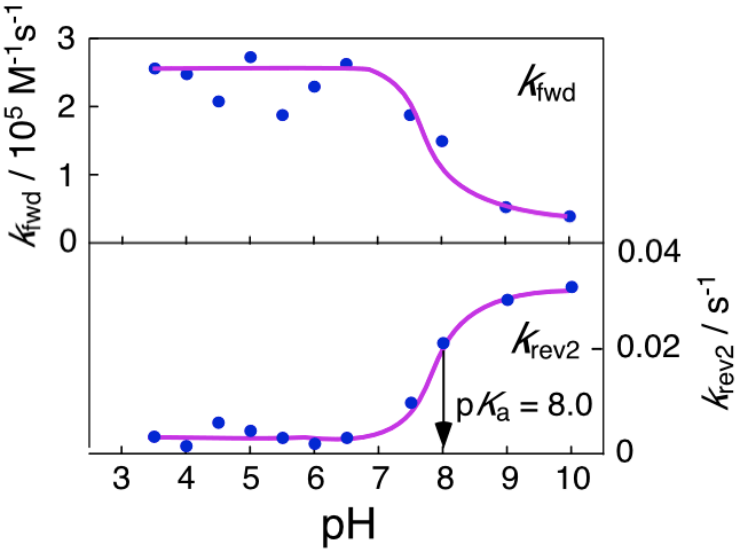


図 4-24：種々の pH 条件での DsbA(C33A)と DsbB の反応の pH-rate profile の算出

pH 3.5 ~ pH 6.0 (50 mM citrate), pH 7.0(50 mM MOPS-NaOH), pH 7.5(50 mM HEPES-NaOH), pH 8.0, 9.0 (50 mM Tris-HCl), pH 10.0(50 mM Glycine-NaOH), 25 °C.

4-4-3　DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の種々の pH における反応観察と動力学解析

図 4-25 に示すように還元 DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)は、各 pH において野生型 DsbB の場合と比べて結合量は少ないものの結合挙動が観察された。DsbA と DsbB の結合には DsbB の 2 組のジスルフィド結合が重要であることがわかった。pH が酸性側では結合挙動が見られたものの、pH 6 を境にアルカリ性側では結合量

は減少した。

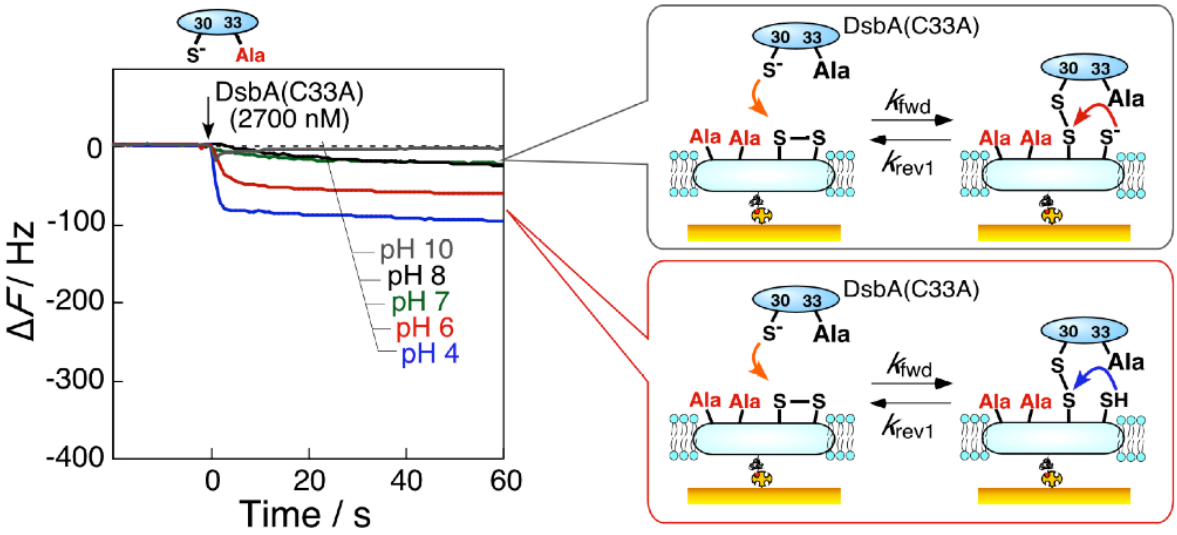


図 4-25：種々の pH 条件での QCM を用いた DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の反応観察

pH 4, 6(50 mM citrate), pH 7(50 mM MOPS-NaOH), pH 8(50 mM Tris-HCl), 100 mM NaCl, 25 °C.

以下**図 4-26** から**図 4-35** に各 pH で DsbA(C33A)の添加濃度を種々に変えた場合の DsbB(C41A,C44A)との結合チャートを示した。**2-6 節**で示した動力学解析の手法にならって、飽和法と緩和法を利用した動力学解析を行った。

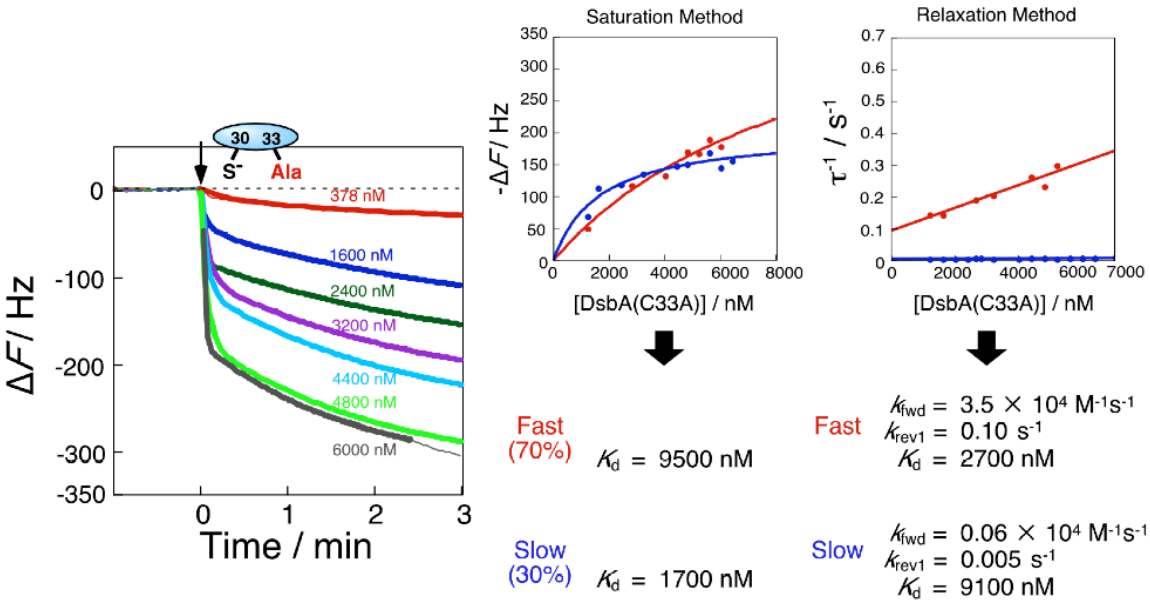


図 4-26：pH 4.5 での DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の動力学解析

50 mM Citrate buffer (pH 4.5), 100 mM NaCl at 25 °C.

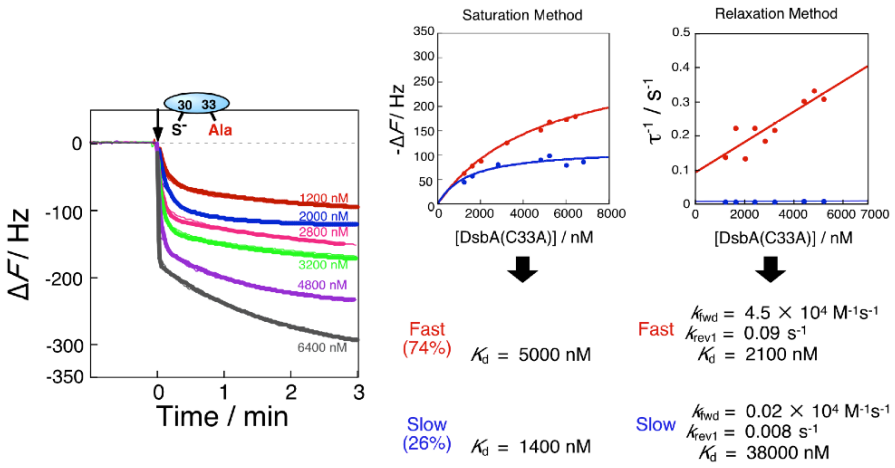


図 4-27：pH 5.0 での DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の動力学解析

50 mM Citrate buffer (pH 5.0), 100 mM NaCl at 25 °C.

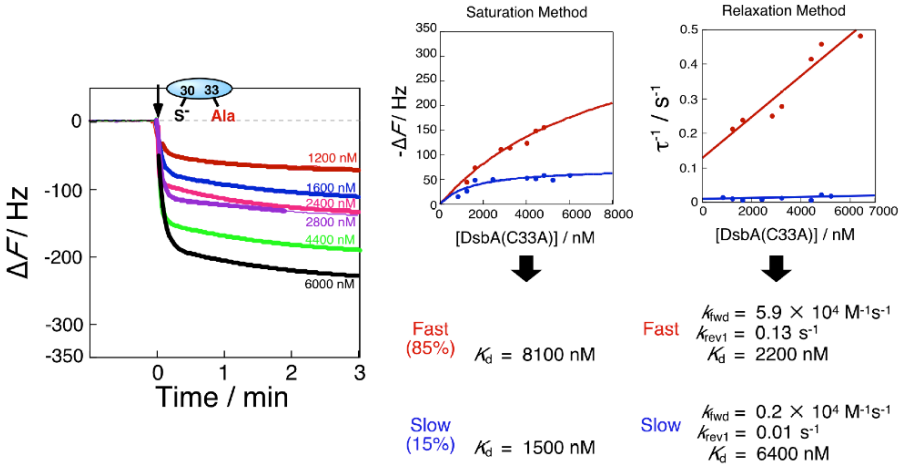


図 4-28：pH 5.5 での DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の動力学解析

50 mM Citrate buffer (pH 5.5), 100 mM NaCl at 25 °C.

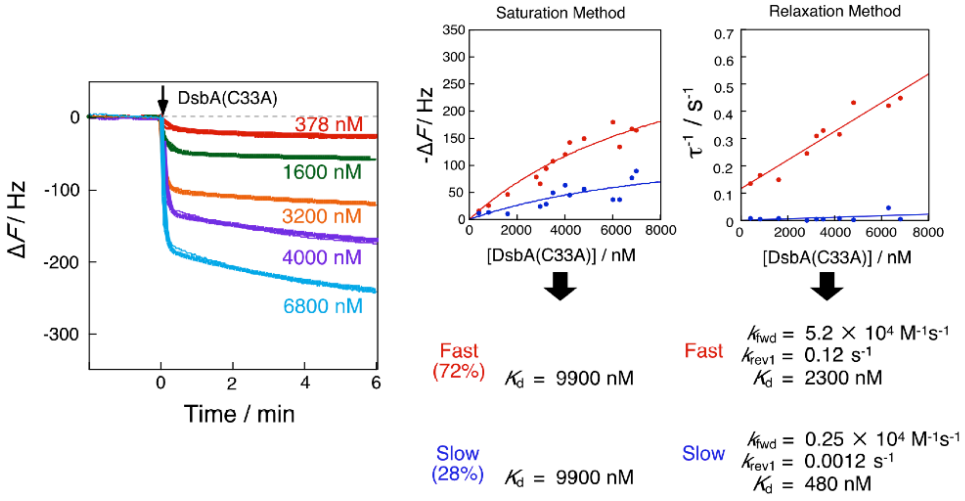


図 4-29：pH 6.0 での DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の動力学解析

50 mM Citrate buffer (pH 6.0), 100 mM NaCl at 25 °C.

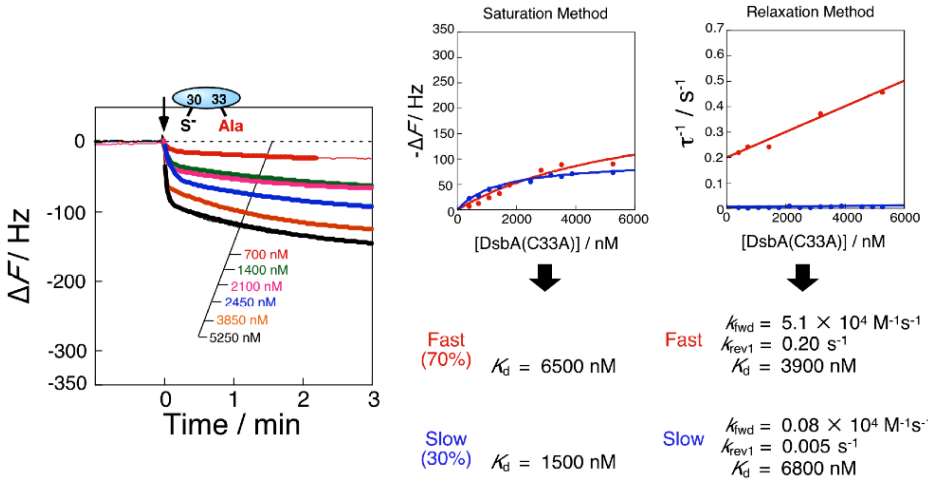


図 4-30：pH 6.5 での DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の動力学解析

50 mM MOPS-NaOH (pH 6.5), 100 mM NaCl at 25 °C.

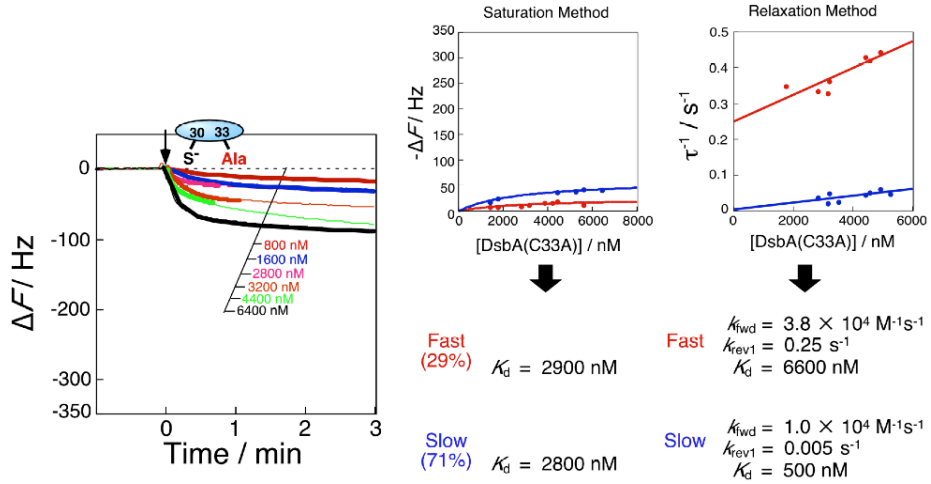


図 4-31：pH 7.0 での DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の動力学解析

50 mM MOPS-NaOH (pH 7.0), 100 mM NaCl at 25 °C.

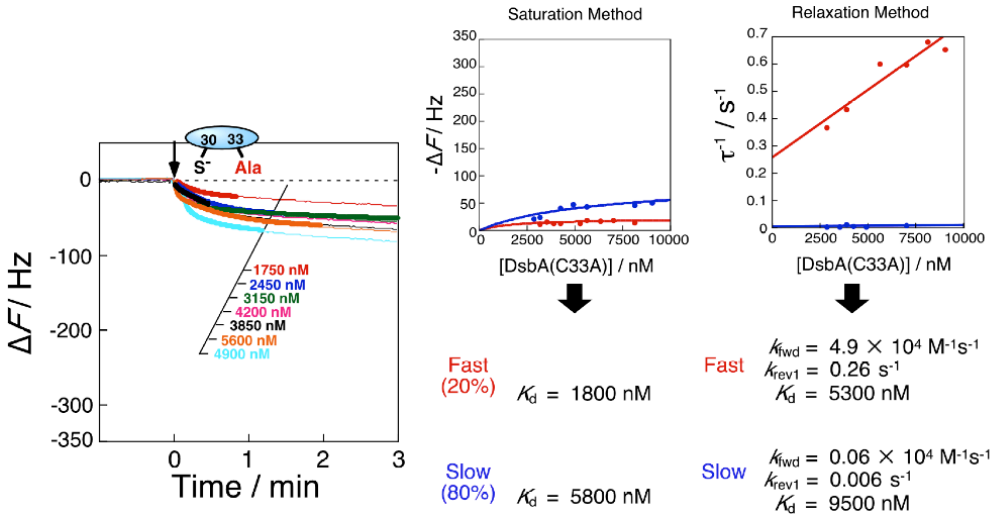


図 4-32：pH 7.5 での DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の動力学解析

50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 100 mM NaCl at 25 °C.

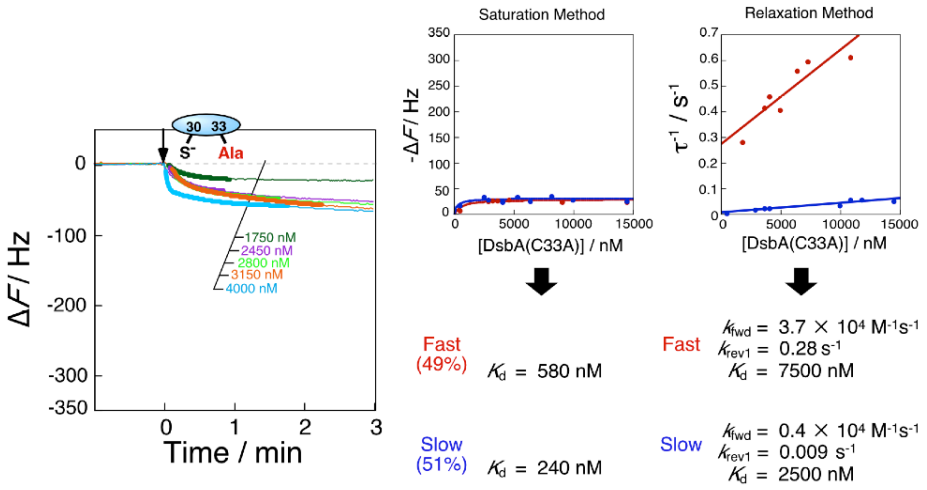


図 4-33：pH 8.0 での DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の動力学解析

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl at 25 °C.

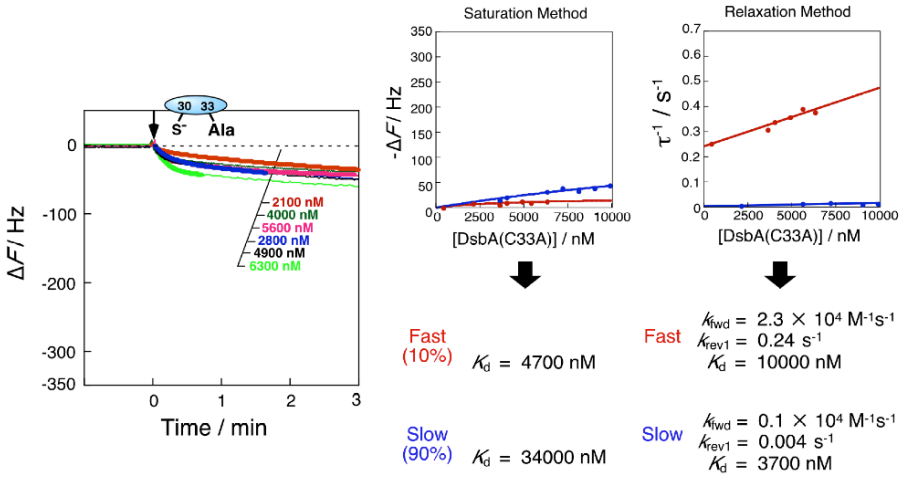


図 4-34：pH 9.0 での DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の動力学解析

50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 100 mM NaCl at 25 °C.

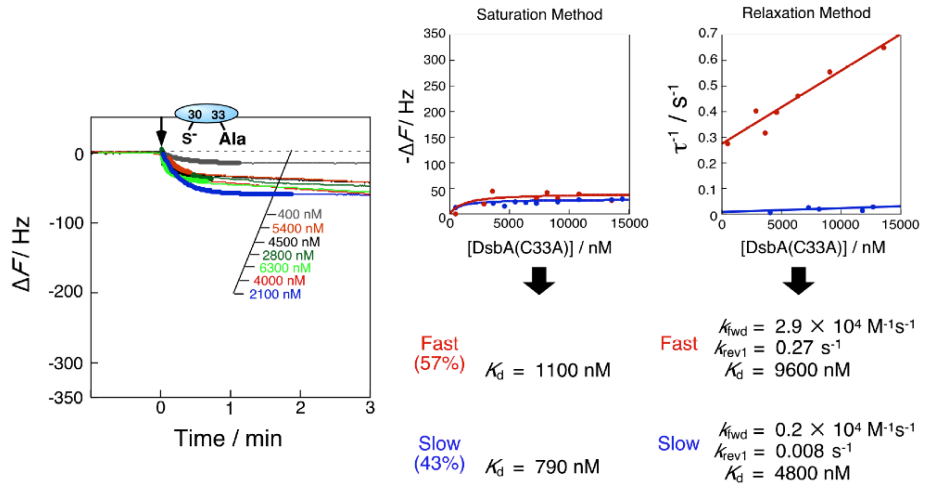


図 4-35：pH 10 での DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の動力学解析

50 mM Glycine-NaOH (pH 10.0), 100 mM NaCl at 25 °C.

pH 4 における DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合は、図 4-36 に示すように DsbB(C41A,C44A)が変性していると考えられる挙動が観察された。

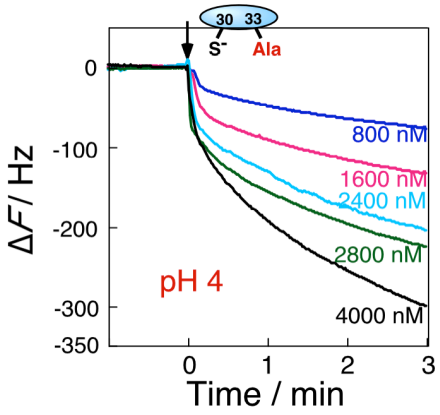


図 4-36：pH 4 の DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合反応の QCM チャート

50 mM Citrate buffer, pH 4, 100 mM NaCl at 25 °C.

DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の結合過程について各 pH 条件における動力学解析の結果、得られた k_{fwd} と k_{rev1} の pH-速度曲線を図 4-37 に示した。

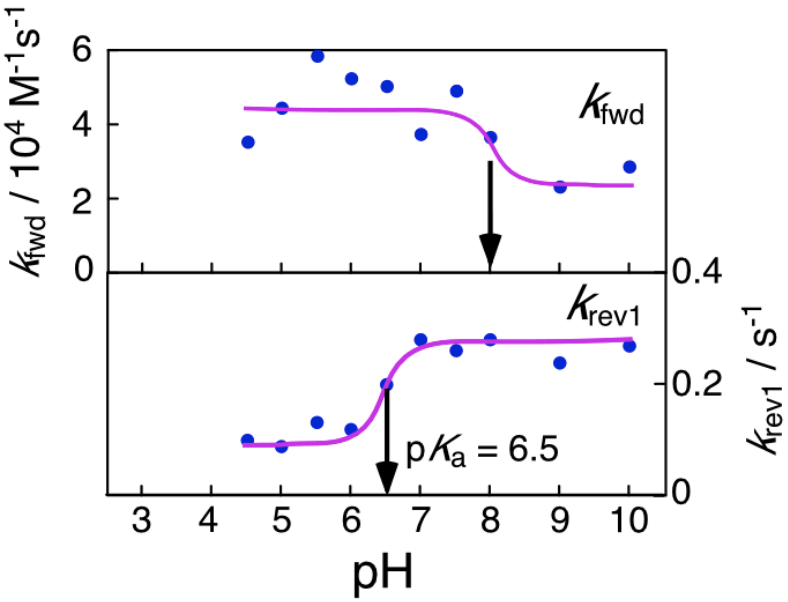


図 4-37：種々の pH 条件での QCM を用いた DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)の反応動力学パラメータの pH-rate profile の算出

pH 3.5 ~ pH 6.0 (50 mM citrate), pH 7.0(50 mM MOPS-NaOH), pH 7.5(50 mM HEPES-NaOH), pH 8.0, 9.0(50 mM Tris-HCl), pH 10.0(50 mM Glycine-NaOH), 25 °C.

k_{rev1} については pK_a が 6.5 付近に存在することが分かった。k_{fwd} はアルカリ性側で減少していくことが分かった。k_{rev1} は DsbB の Cys130 による Cys30(DsbA)–Cys104(DsbB)間のジスルフィド結合への求核攻撃により進行すると考えられ、DsbB の Cys130 の pK_a は 6.5 と予想される。

4-4-4　DsbA の Cys33 の pK_a の決定

DsbB による DsbA の酸化反応について、k_{cat} の pK_a は 4-4-1 節での動力学解析の結果、6 より大きい範囲に存在することは分かったが、pH が 7 より大きい範囲では QCM 測定での振動数減少を観察できなかったため、正確な値を決定するには至らなかった。そこで、別の手法で測定することにした。

(1)　QCM を用いた測定

以下の図 4-38 に示すように、QCM 上に酸化型 DsbA(native)を固定化し、還元型 DsbA(C33A)を高濃度で添加すると Cys30 どうしで S-S 結合が生成する。Cys33 の pK_a 以下の pH 領域では生成した S-S 結合は切断されないが、pK_a 以上の pH 領域では Cys33 のチオレートアニオンの求核攻撃により S-S 結合は見かけ上、生成しないと考えられる。このことから DsbA の Cys33 の pK_a の予測がつくと考えた。

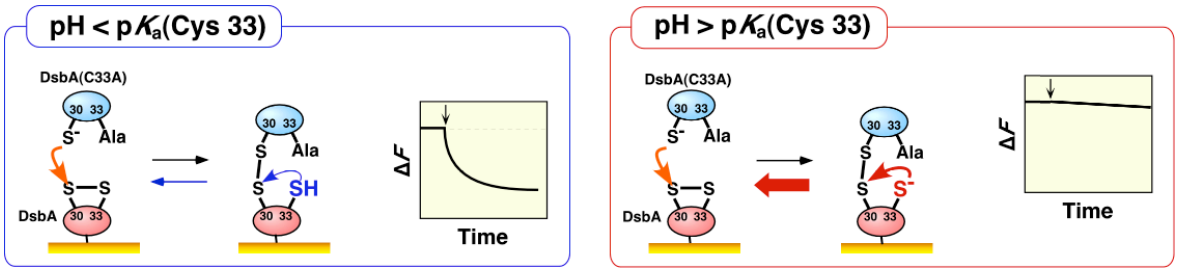


図 4-38：系内の pH に依存した DsbA(native)と DsbA(C33A)の結合挙動の違い

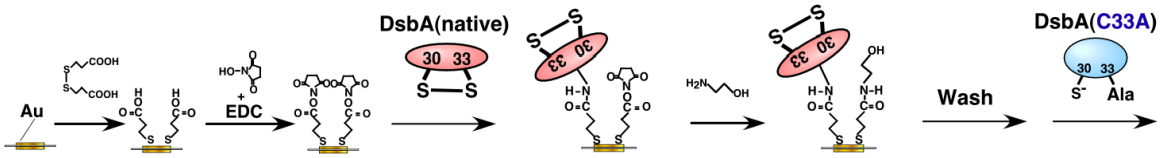


図 4-39：アミンカップリング法を利用した QCM 基板上への DsbA(native)の固定化と DsbA(C33A)との結合

図 4-39 に示したように QCM セルの金基板にジチオジプロピオン酸を固定化後、NHS と EDC によって、活性化エステル基板を用意した。HEPES buffer (50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl) 500 μL を QCM セルに添加した。QCM セルを発振させ、振動数変化が安定したところで、DsbA(native)を終濃度 1670 nM となるように添加し固定化した。QCM の振動数が安定したら、セル内を各 pH のバッファー(pH 3, 4, 5, 6 (50 mM Citrate), pH 7 (50 mM MOPS-NaOH), pH 7.5 (50 mM HEPES-NaOH), pH 8 および 9 (50 mM Tris-HCl), pH 10 (50 mM Glycine-NaOH), pH 11 (50 mM Na_2HPO_4 –NaOH), 100 mM NaCl)で洗浄操作(430 μL 除き 430 μL 加える操作を 4 回繰り返した)を行った。その後、振動数が安定したら、100 mM の緩衝成分を含む各種 pH バッファーを用いて、還元剤 TCEP 処理を 30 分行い、Zeba Desalt Spin Columns(Pierce)で脱塩処理した DsbA(C33A)を終濃度 5,400 nM となるように添加した。

QCM 基板上の DsbA(native)と DsbA(C33A)の反応チャートを図 4-40(a)に、30 分後の結合量Δ*F* と pH のプロファイルを図 4-40(b)に示した。図 4-40(a)よりアミンカップリング法で DsbA(native)を固定化したことにより–300 Hz 前後の振動数変化が生じた。続いてエタノールアミンを添加し、各 pH buffer でセル内を wash した後、振動数変化が安定化したところで、還元 DsbA(C33A)を添加した。その結果図 4-40(b)に示したように DsbA(C33A)の結合量は 3 つの pH 範囲で違いが見られた。

まず、pH < 5 では基板上に固定化した DsbA(native)より多くの DsbA(C33A)が結合した。5 < pH < 10 では、−100 Hz 程度の DsbA(C33A)の結合が観察された。pH > 10 では–50 Hz 程度の DsbA(C33A)の結合が観察された。

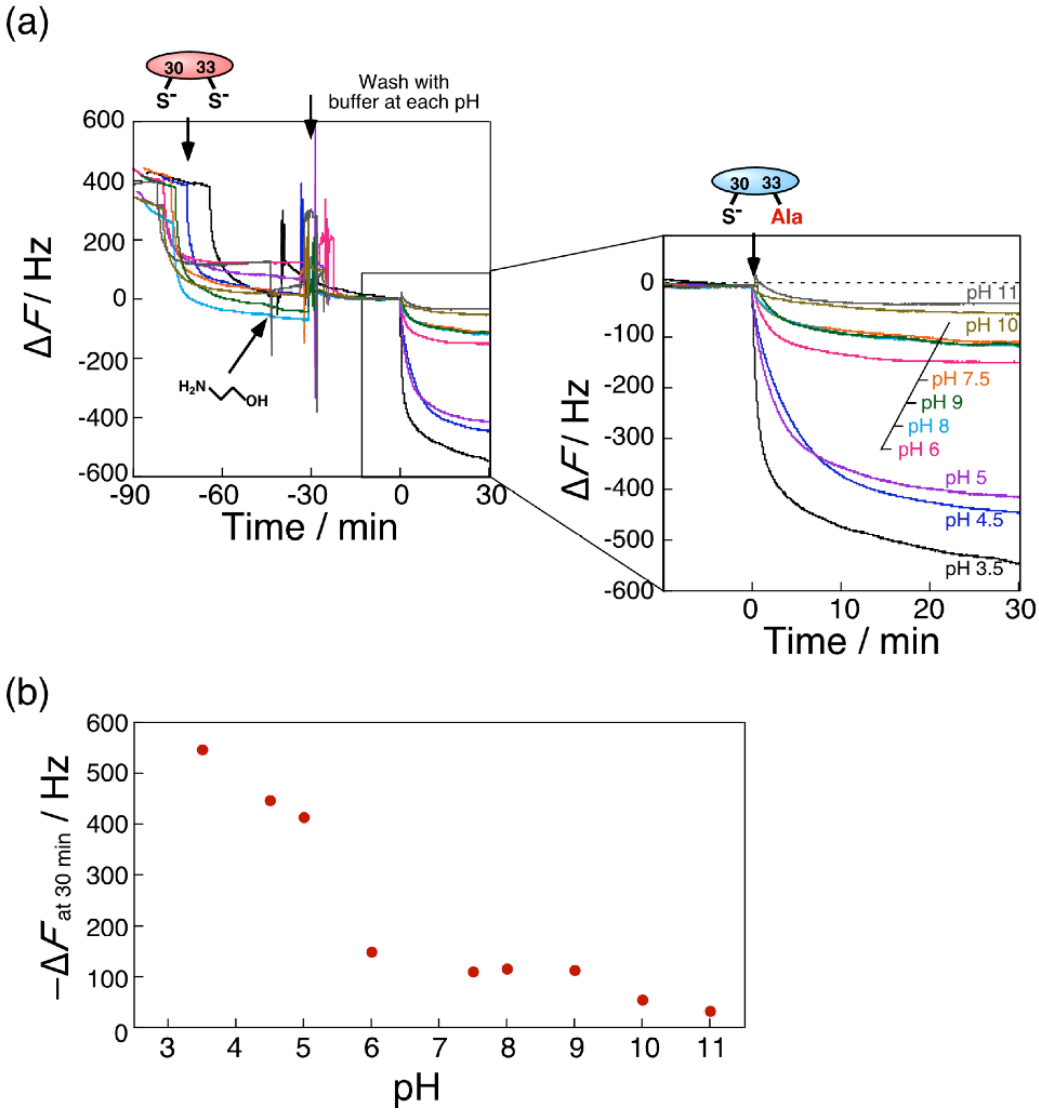


図 4-40：QCM 基板にアミンカップリング法で固定化した DsbA と DsbA(C33A)の(a)反応チャートと(b)30 分後の結合量Δ*F* と pH のプロファイル

25 °C, before washing : 50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl, after washing : pH 3.5 ~ pH 6.0(50 mM citrate), pH 7.0(50 mM MOPS-NaOH), pH 7.5(50 mM HEPES-NaOH), pH 8 ~ pH 9(50 mM Tris-HCl), pH 10(50 mM Glycine-NaOH), pH 11(50 mM Na_2HPO_4 –NaOH), 100 mM NaCl. DsbA(native)は終濃度 1670 nM で、DsbA(C33A)は終濃度 5400 nM で添加した。

以上の結果より、DsbA の Cys33 のチオール基の pK_a は 5.5 付近または 9.5 付近と考

えられるが、明確な pK_a 値は求められなかった。アミンカップリング法で DsbA を固定化したことにより DsbA が変性した可能性もあり、DsbA(C33A)と DsbA(native)の各 pH における結合を定量的に解析するのは困難であると思われる。

(2)SDS-PAGE を用いた測定

DsbA の Cys33 の pK_a を決定するため、SDS-PAGE を用いる手法を考えた。具体的には**図 4-41** に示したように、分子量 5,000 のマレイミド-ポリエチレングリコール試薬 (mal-PEG、日油商品名：SUNBRIGHT ME-050MA)を用いて各 pH 条件で DsbA の 2 つのシステイン残基(Cys30, Cys33)を修飾し、SDS-PAGE でのバンドのシフトから反応の可否を判断した。各チオール基はチオレートアニオン(–S$^-$)である場合に malPEG と反応するので、種々の pH 条件下での反応の可否から、DsbA の 2 つのシステインのそれぞれの pK_a がわかると考えられる。DsbA(native)および 2 種類の DsbA 変異体(C33A および C30A)、さらにトリクロロ酢酸と SDS 処理によって変性させた DsbA を用いて実験を行った。

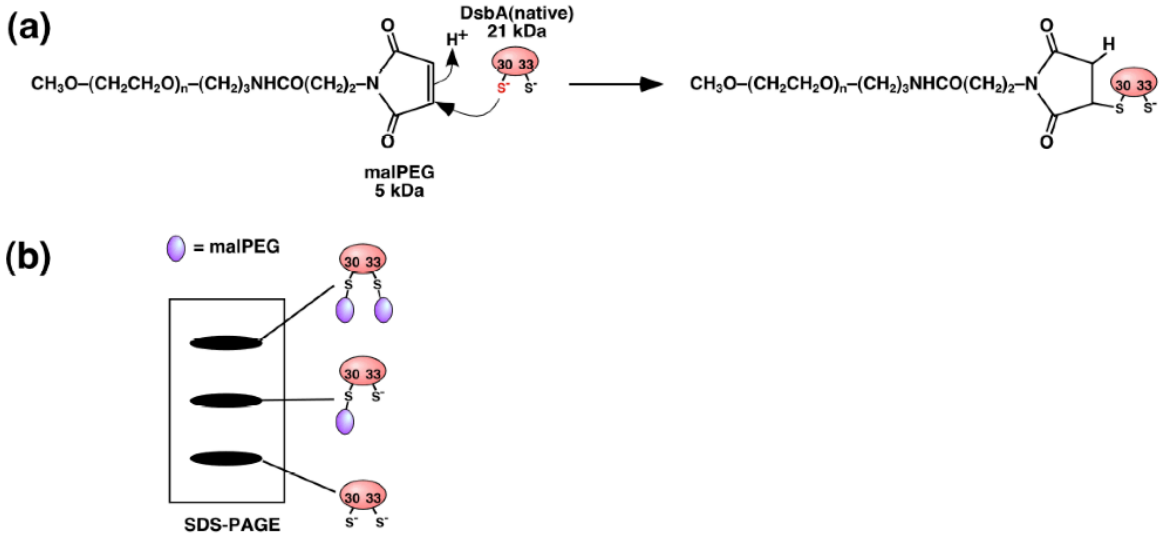


図 4-41 : (a)malPEG と DsbA のシステインチオール基との反応と(b)SDS-PAGE によるバンドのシフトの関係 [11]

1.5 mL チューブに 45 μM DsbA(native) 1 μL と各 pH バッファー(pH 3, 4, 5, 6(100 mM Citrate), pH 7(100 mM MOPS-NaOH), pH 8, 9(100 mM Tris-HCl), pH 10(100 mM Glycine-NaOH), pH 11(100 mM Na_2HPO_4–NaOH)) 7 μL を入れた。さらに 2 mM TCEP 1 μL (NaOH で中和済み) と 2 mM mal-PEG 1 μL を添加し、2 時間、室温で放置した(DsbA : TCEP : malPEG = 1: 44 : 44)。2 時間後、50% TCA を 10 μL 添加し、0 °C で 10 分間放置し、4 °C, 16,000×g, 10 分遠心し、TCA 沈殿を行った。ペレットを冷アセトン 200 μL で 2 回洗浄した。2 x sample buffer を 10 μL 添加し、還元 SDS-PAGE を行った。DsbA(C33A)と DsbA(C30A)についても同様に処理し、SDS-PAGE に供した。

変性 DsbA のサンプルについては、1.5 mL チューブに 606 μM の DsbA(native)ストック溶液(10 mM MOPS-NaOH, pH 7.0)を 4 μL とって、Milli-Q 水 20 μL と混合した。81 mM TCEP を 2 μL 添加し(DsbA : TCEP = 1 : 67)、室温で 30 分放置した。50% TCA を 26 μL 添加し、氷上で 10 分放置後、16,000×g で 10 分遠心し、アセトン洗浄を 2 回行った(アセトン洗浄の遠心条件は 16,000×g, 2 分を 2 回)。10% SDS 53.8 μL を添加し、ボルテックスミキサーおよびバス型超音波装置を利用して、ペレットを完全に溶解させた。変性後の DsbA(native) 1 μL と各 pH バッファー(pH 3, 4, 5, 6(100 mM Citrate), pH 7(100 mM MOPS-NaOH), pH 8, 9(100 mM Tris-HCl), pH 10(100 mM Glycine-NaOH), pH 11(100 mM Na_2HPO_4–NaOH)) 7 μL を混合しインキュベートした。さらに 2 mM TCEP 1 μL (NaOH で中和済み) と 2 mM malPEG 1 μL(dissolved in water)を添加し、2 時間、室温で放置した(DsbA : TCEP : malPEG = 1: 44 : 44)。その後、TCA 沈殿を行った。50% TCA を 10 μL 添加し、0 °C で 10 分間放置した。4 °C, 16,000×g, 10 分遠心した。ペレットを冷アセトン 200 μL で 2 回洗浄した。還元剤であるβメルカプトエタノール含有の 2 x sample buffer を 10 μL 添加し、よくボル

テックスしてペレットを溶解させた後、さらに Milli-Q 水を 10 μL 添加して、還元 SDS-PAGE を行った。

結果を**図 4-42** に示した。**図 4-42(a)**に示した DsbA(C30A)と mal-PEG の反応に着目すると、pH 8 よりアルカリ性側で Cys33 のチオール基が修飾されており、DsbA(C30A)の Cys33 の pK_a は 8.3 と考えられる。**図 4-42(b)**に示した DsbA(C33A)と mal-PEG の反応に着目すると、pH 3 ~ 11 で Cys30 のチオール基が修飾されており、DsbA(C33A)の Cys30 の pK_a は 3.5 付近であると考えられる。なお、pH 10, 11 では DsbA(C33A)と malPEG の反応生成物由来のバンドが pH 3 ~ 9 の場合と比べて小さくなっていた。この理由として pH 10, 11 付近では周囲のアミノ酸残基の影響により、DsbA の Cys30 の求核性が弱まったためと考えられる。**図 4-24** に示した QCM の結果においても同様に DsbA(C33A)と DsbB との結合反応で pH 10 付近では k_{fwd} が小さくなった結果が得られ、その時は DsbA と DsbB の静電的な相互作用による影響を考えていたが、**図 4-42(b)**に示した結果より、DsbA の相手が malPEG でも同様に pH 10 付近で求核性の低下が見られたので、DsbA の Cys30 付近の環境の変化によって Cys30 の求核性が低下したことがわかった。**図 4-42(c)**の DsbA(native)と DsbB の反応に着目すると、pH 6 よりアルカリ性側で DsbA と mal-PEG の反応生成物のバンドが小さくなっていた。これは DsbA の Cys33 による逆反応が進行したためであると考えられる。このことから、DsbA(native)の場合は Cys33 の pK_a が約 7.0 であると考えられる。なお、これまで DsbA の Cys33 の pK_a は 10 以上と予測されていた [6]。これは、Cys-Pro-His-Cys という DsbA の活性部位の配列を有するペプチドをリファレンスとして用いて、ヨードアセトアミドとチオール基が反応した場合、$\varepsilon_{265\,nm} = 390\ M^{-1}\ cm^{-1}$ が観察され、一方チオレートアニオンの場合だと $\varepsilon_{240\,nm} = 4000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ が観察され、S-S が形成されると 2 つとも消失することを利用し

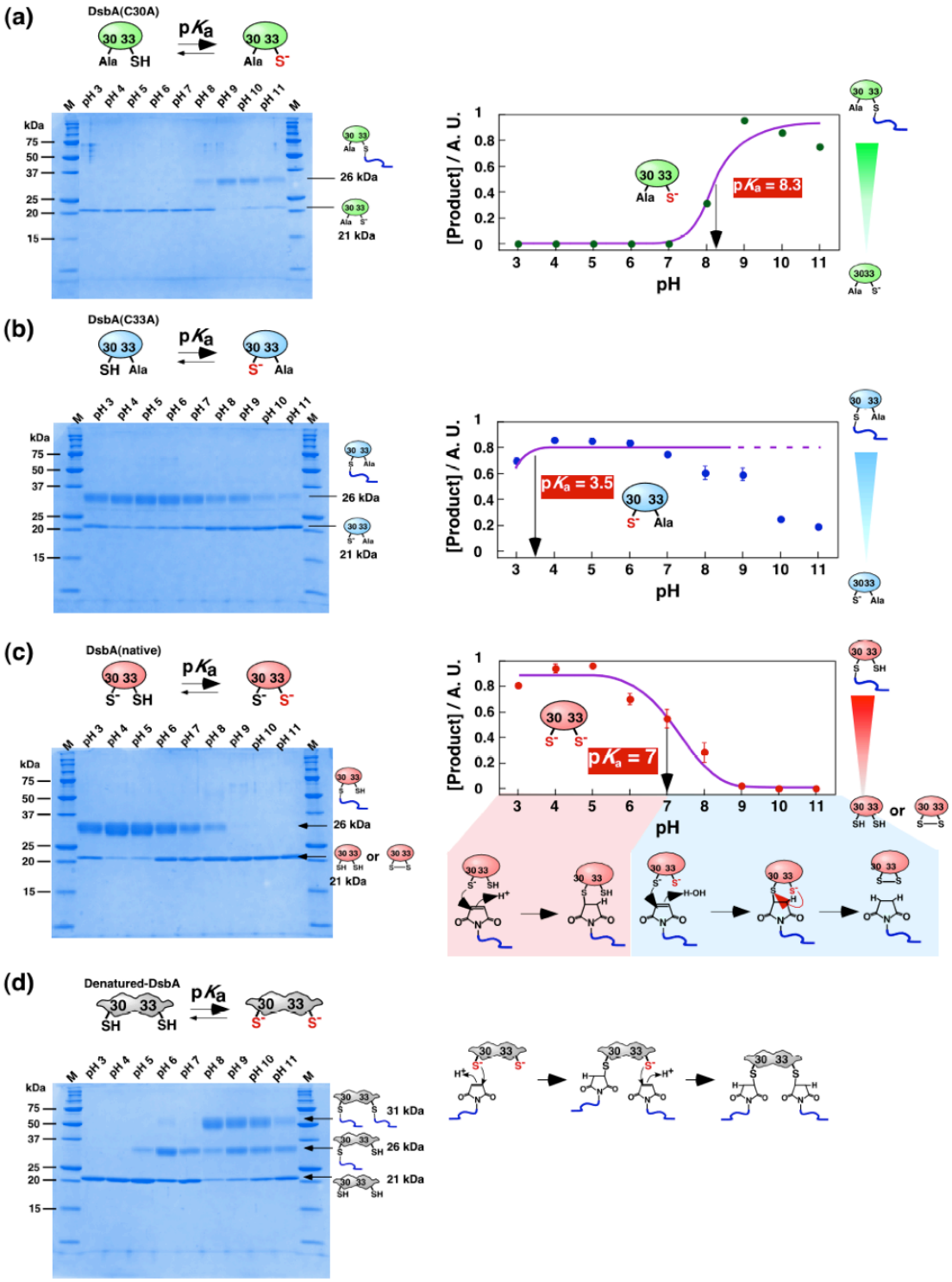


図 4-42：DsbA(native)とその変異体および変性 DsbA(native)を用いた malPEG との各種 pH における反応生成物の SDS-PAGE を用いた解析

pH 3, 4, 5, 6(100 mM Citrate), pH 7(100 mM MOPS-NaOH), pH 8, 9(100 mM Tris-HCl), pH 10(100 mM Glycine-NaOH), pH 11(100 mM Na_2HPO_4–NaOH), 25 °C.

DsbA(C33A)と malPEG の反応および DsbA(native)と malPEG の反応における[product]-pH のグラフは、それぞれ 5 回および 4 回の実験の平均値を示した。エラーバーは標準誤差を表す。

ていた。本実験で DsbA(C30A)の Cys33 のチオール基の pK_a は 8.3 付近と予想されたのに対し、DsbA(native)の場合には Cys33 のチオール基の pK_a が 7 付近になった理由として、DsbA の類縁タンパク質であるチオレドキシンが基質タンパク質と中間体を形成した際に C 末端側の Cys の pK_a が下がることが報告されており[12]、本実験の結果についても DsbA が mal-PEG との間で中間体を形成した際には Cys33 の pK_a が 8.3 から 7.0 に下がるものと考えられる。一方、**図 4-42(d)**の DsbA を変性させた場合、DsbA のシステイン残基が 2 つとも修飾されたことに由来する SDS-PAGE でのバンドが観察され、上記に述べた DsbA(native)とは様子が異なった。DsbA を変性させたことでコンフォメーションが変化し、Cys30 と Cys33 の DsbA 分子内での環境が変化したことで、両者のシステインの求核性という点での区別はなくなったと考えられる。両者の pK_a は約 8.5 となり、一般的なシステインチオール基の pK_a とほぼ同じになった。以上の結果より、DsbA のコンフォメーションに由来する環境の違いが、Cys30 と Cys33 の両者の反応性の違いをもたらしていることがわかった。

4-4-5　SDS-PAGE を用いた DsbB の Cys44 および Cys130 の pK_a 測定

4-4-4-(2)と同様にして SDS-PAGE を用いて、DsbB の Cys44 と Cys130 の pK_a 測定を行った。具体的には、チオール修飾試薬 mal-PEG と BCCP-DsbB(C41A)または BCCP-DsbB(C104A)を pH 4 から pH 9.5 の条件で反応させることで、それぞれ DsbB の Cys44 または Cys130 の pK_a を測定した。さらに、**3-5** にならってユビキノンが DsbB の Cys44 に及ぼす影響を考慮するため、水溶性ユビキノン-1 を過剰に添加した系と、レドックスバッファーを用いてユビキノンを還元状態にした系でも実験を行った。mal-PEG と DsbB の反応時間については、C41A 変異体については 37 °C

で 30 分、C104A 変異体については 37 °C で 2 時間反応させた。試行実験の結果、C104A 変異体は C41A 変異体に比べ、mal-PEG での修飾率が低かったため、反応時間を長めにした。C104A 変異体では、**図 4-43** に示したように、電子が Cys130 または Cys44 との間で非局在化しているため、システインのチオール基の求核性が Cys41 変異体に比べ、低下していると思われる。

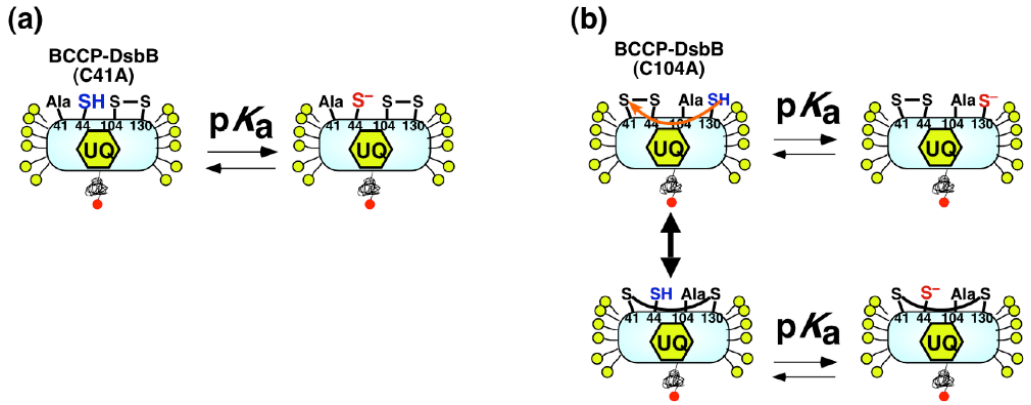


図 4-43：BCCP-DsbB の pK_a 前後におけるシステインのチオール基の解離状態

(a)BCCP-DsbB(C41A)の pK_a 前後での解離状態の変化。 (b)BCCP-DsbB(C104A)の pK_a 前後での解離状態の変化。Cys130 のチオール基がアニオンになると、Cys41-Cys44 間のジスルフィド結合を求核攻撃し、Cys44 に電子が移動する平衡が成り立つと考えられる。

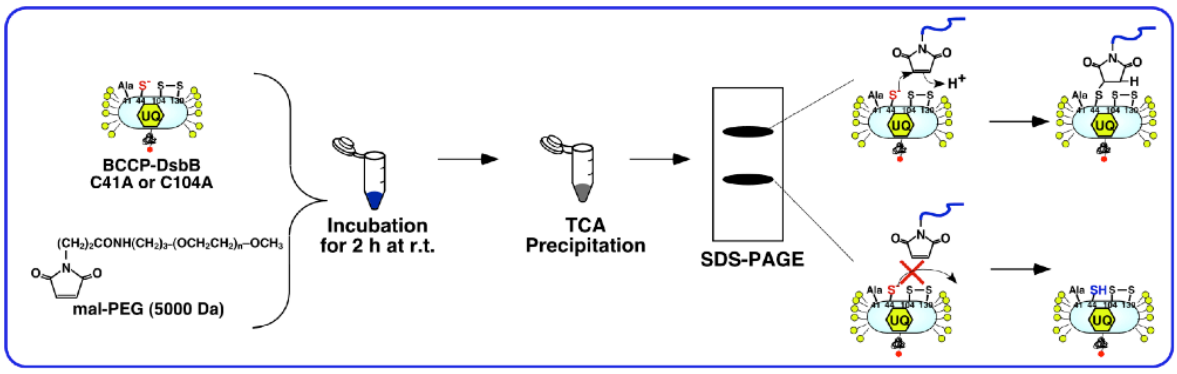


図 4-44：BCCP-DsbB と mal-PEG を用いた反応手法の概念図

1.5 mL チューブに 83 μM BCCP-DsbB(C41A) 1 μL と各 pH バッファー(pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0(100 mM Citrate, 0.1% DDM), pH 6.5, 7.0(100 mM MOPS-NaOH, 0.1% DDM), pH 7.5(100 mM HEPES, 0.1% DDM), pH 8.0, 8.5, 9.0(100 mM Tris-HCl, 0.1%

DDM), pH 9.5(100 mM Glycine-NaOH, 0.1% DDM)) 13 μL を入れた。さらに 2 mM mal-PEG 1.9 μL を添加し、37 °C で 30 分放置した (DsbA : malPEG = 1 : 44)。その後、100% TCA を 4 μL 添加し(終濃度 20%)、4 °C, 16,000 x g, 15 分遠心し、TCA 沈殿を行った。ペレットを冷アセトン 200 μL で 2 回洗浄した。2 x sample buffer を 10 μL 添加し、さらに MilliQ 水 10 μL を添加し、還元 SDS-PAGE を行った。

BCCP-DsbB(C104A)の場合は、mal-PEG と 37 °C で 2 時間反応させた後、C41A 変異体の場合と同様に処理し還元 PAGE を行った。

UQ1 を過剰に存在させた実験では、2.5 mM UQ1 ストック溶液(dissolved in 25 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.05% DDM, 50% EtOH)を DsbB に対し、29 当量添加した。

内在 UQ8 を還元化させる実験では、BCCP-DsbB を酸化 redox buffer(50 mM Phosphate, pH 8.0, 100 mM NaCl, 100 mM oxidized DTT, 1 μM reduced DTT, 0.1% DDM)中で室温 2 時間インキュベートした後、50 mM Phosphate, pH 6.0, 300 mM NaCl, 0.1% DDM のバッファーを用いて Zeba 脱塩カラム(Pierce 社製)で脱塩したものを実験に使用した。

結果を**図 4-45** に示した。BCCP-DsbB(C41A)と mal-PEG との各 pH での反応の SDS-PAGE の結果(a)～(c)について、ユビキノンが過剰または還元状態になった場合で定性的には違いが見られなかった。また、BCCP-DsbB(C104A)と mal-PEG との各 pH での反応の SDS-PAGE の結果(d)～(f)についてもユビキノンが過剰または還元状態になった場合で定性的には違いは見られなかった。(a)~(c) の BCCP-DsbB(C41A)の結果に比べ、(d)~(f)の BCCP-DsbB(C104A)ではより低 pH 側でも mal-PEG との反応率が高かった。これは、DsbB の Cys130 のチオール基の pK_a が Cys44 のチオール基の pK_a よりも低いためであると示唆された。

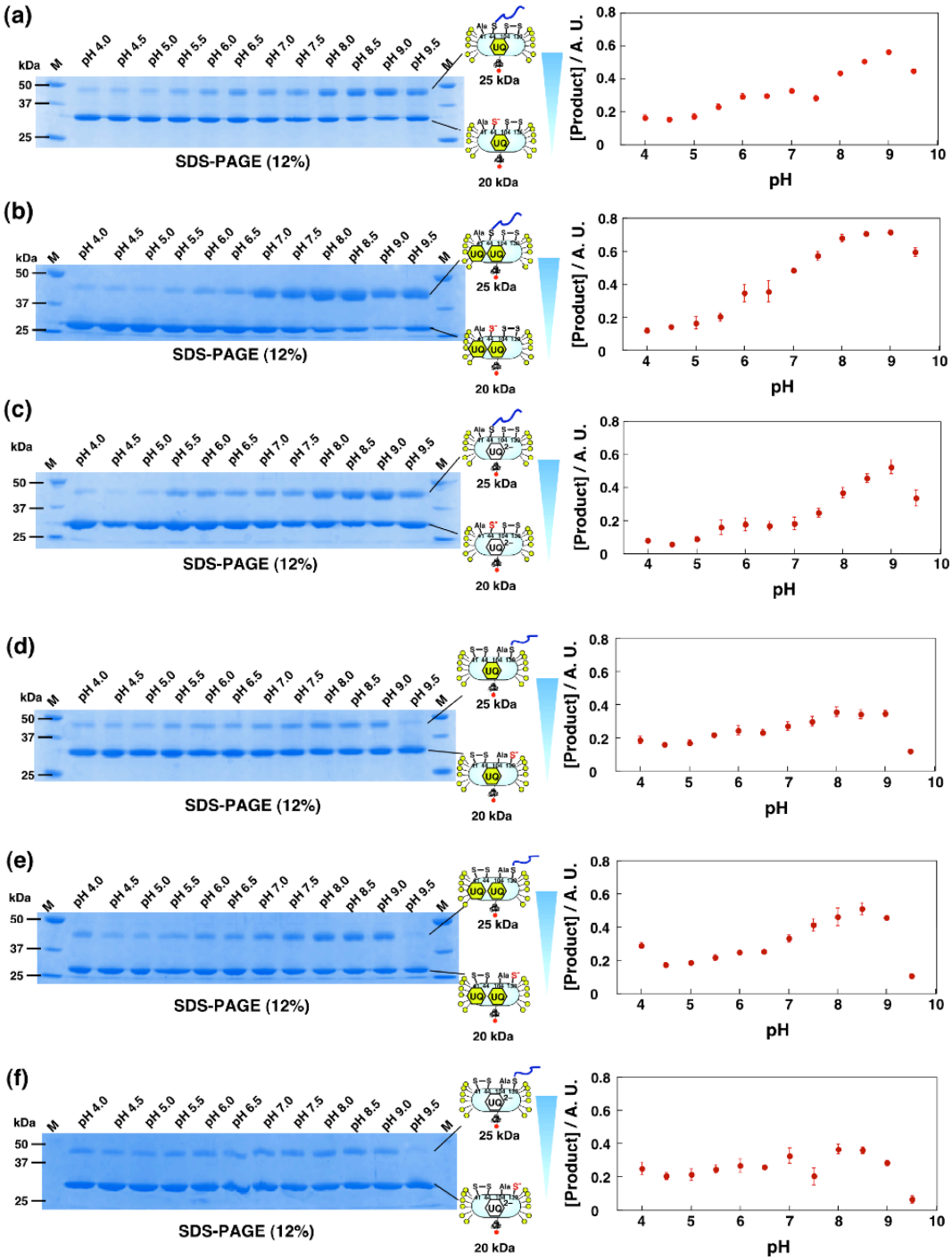


図 4-45：BCCP-DsbB 変異体と malPEG との各種 pH における反応生成物の SDS-PAGE を用いた解析

pH 4 ~ 6(100 mM Citrate), pH 6.5, 7.0(100 mM MOPS-NaOH), pH 7.5(100 mM HEPES-NaOH), pH 8 ~ 9(100 mM Tris-HCl), pH 9.5(100 mM Glycine-NaOH), 25 °C.

(a)~(c)に C41A 変異体、(d)~(f)に C104A 変異体の結果を示した。(a)および(d)が内在 UQ8 を有する場合、(b)および(e)が過剰の UQ1 を有する場合、(c)および(f)がユビキノンを還元状態にした場合。(a)については 4 回、(b)~(f)については 3 回の実験の平均値をエラーバーと共に示した。

4-5　種々の pH でのユビキノンの影響の評価

3-5 節においてユビキノンが DsbA と DsbB の反応動力学に与える影響を評価したが、そのときの pH 条件は 6 であった。稲葉らは量子化学シミュレーションの結果、DsbA と DsbB が中間複合体を形成する際に、DsbB の Cys44 のチオレートアニオンおよび Arg48 のグアニジニウムイオン、さらにはユビキノンの三者の間で電荷移動錯体を形成することに伴う安定化が起こることを予測していた [10]。図 4-46 に示したように DsbB の Cys44 の pK_a は 6.6 であることが提唱されており [8, 13]、3-5 節において pH 6 の条件でユビキノンの影響を評価した際には Cys44 の大部分がチオール基になっており、電荷移動錯体の形成が起こっていなかったことも考えられる。本項では、DsbB の Cys44 がチオレートアニオンである状態の pH 条件で、ユビキノンが DsbA と DsbB の反応動力学に与える影響について評価した。

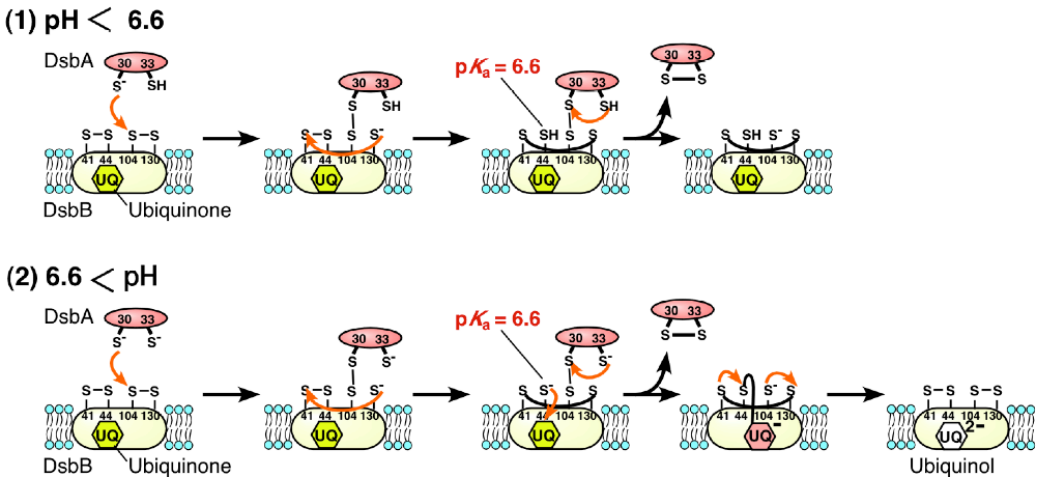


図 4-46：DsbB の Cys44 のイオン化状態とユビキノンとの想定される相互作用

図 4-47 に示すように pH 9 で DsbA(C33A)と DsbB の反応を大過剰のユビキノン-10 の存在下あるいは還元型ユビキノールの状態で行っても、反応速度は変化しなかった。このことからアルカリ性条件下においても、ユビキノンが DsbA と DsbB

の反応動力学に与える影響はほとんどないことが定性的に示唆された。pH 7.5 および pH 9 におけるユビキノン失活またはユビキノン過剰条件における DsbA(C33A)と DsbB の結合反応の動力学解析の結果を**図 4-48** から**図 4-51** に示した。さらに、pH 6, pH 7.5, pH 9 における緩和法解析の結果を**図 4-52** にまとめた。**図 4-52** における y 切片は解離速度定数 k_{rev1} または k_{rev2} の値を示しており、**図 4-52** の(b)~(d)よりユビキノンの有無に関わらず、k_{rev2} の値はほぼ同じになった。これに対し、DsbB の Cys41 と Cys44 の欠損は、DsbA と DsbB の k_{rev} を大きくすることがわかった。これらの結果よりアルカリ性条件であっても DsbA と DsbB の反応動力学にユビキノンは影響を与えないと考えられる。ユビキノンは膜内在性の補酵素として DsbA-DsbB システムとは独立して DsbB の再酸化を行っているものと思われる。DsbA と DsbB の反応動力学に影響を与えているのは DsbB の Cys44 と相互作用する DsbB の Arg48 であると考えられる [10]。

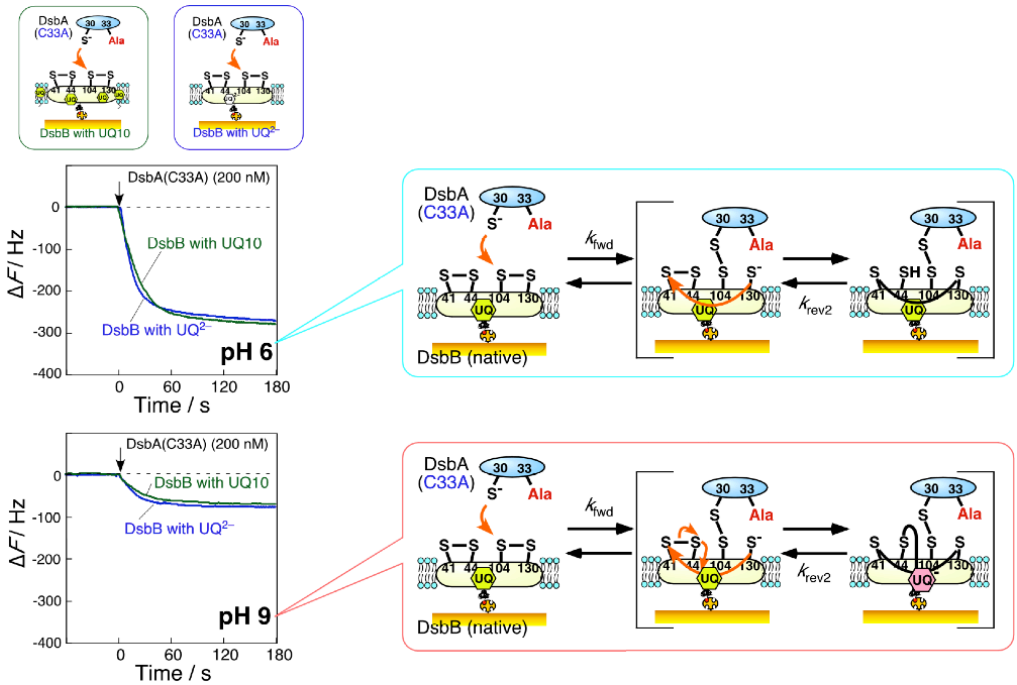


図 4-47：pH 6 および pH 9 でのユビキノン過剰またはユビキノン失活条件における QCM を用いた DsbA(C33A)と DsbB(native)の結合反応の比較

25 °C, pH 6.0(50 mM citrate), pH 9.0(50 mM Tris-HCl), 100 mM NaCl.

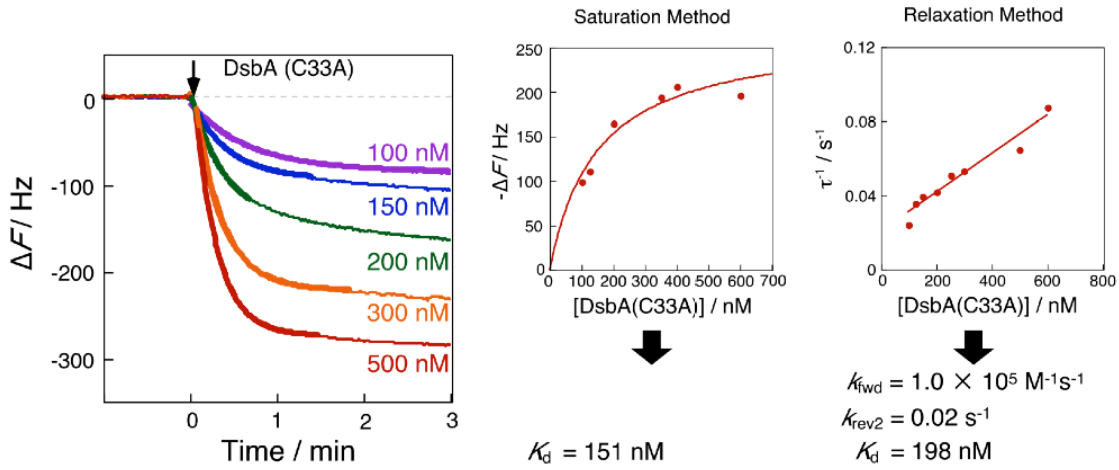


図 4-48：pH 7.5 のユビキノン失活条件における DsbA(C33A)と DsbB の結合反応

25 °C, 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.5), 100 mM NaCl.

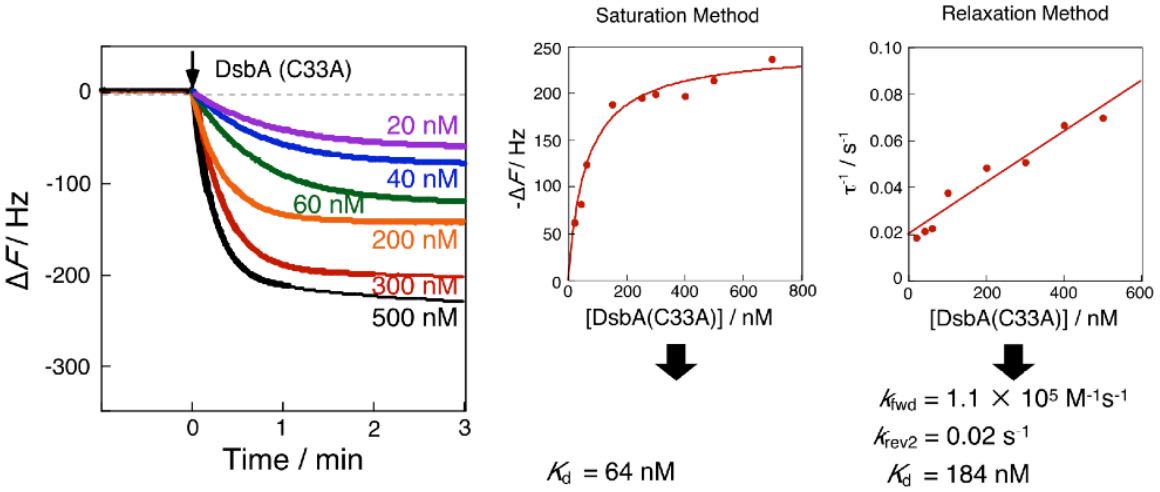


図 4-49：pH 7.5 のユビキノン過剰条件における DsbA(C33A)と DsbB の結合反応

25 °C, 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.5), 100 mM NaCl.

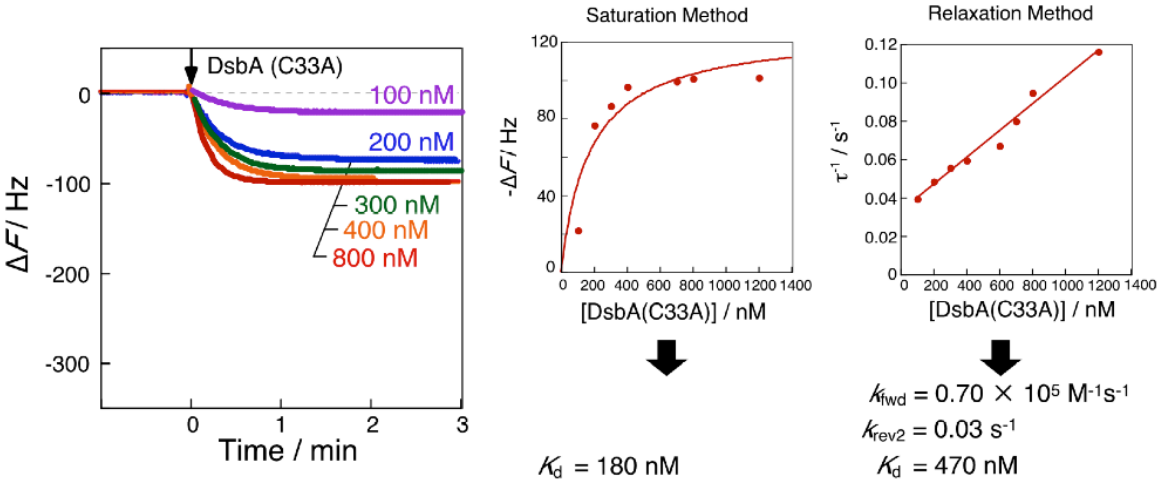


図 4-50：pH 9.0 のユビキノン失活条件における DsbA(C33A)と DsbB の結合反応

25 °C, 50 mM Tris-HCl(pH 9.0), 100 mM NaCl.

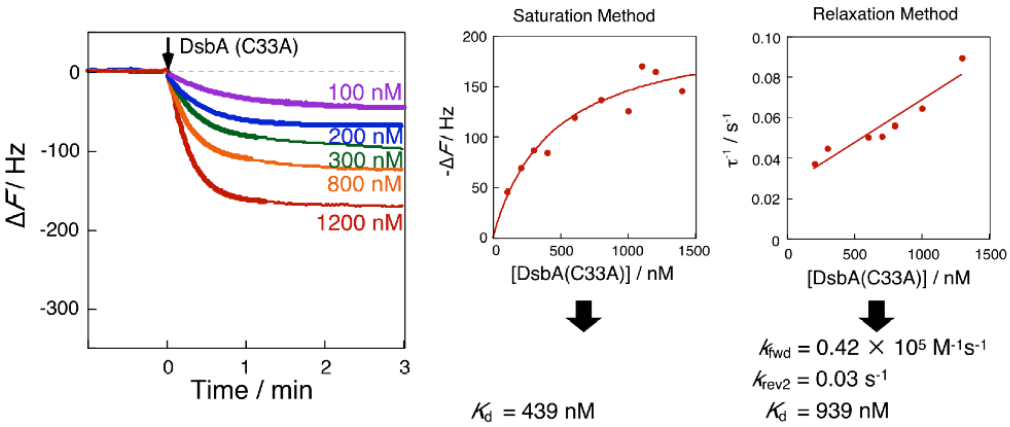


図 4-51：　pH 9.0 のユビキノン過剰条件における DsbA(C33A)と DsbB の結合反応

25 °C, 50 mM Tris-HCl(pH 9.0), 100 mM NaCl.

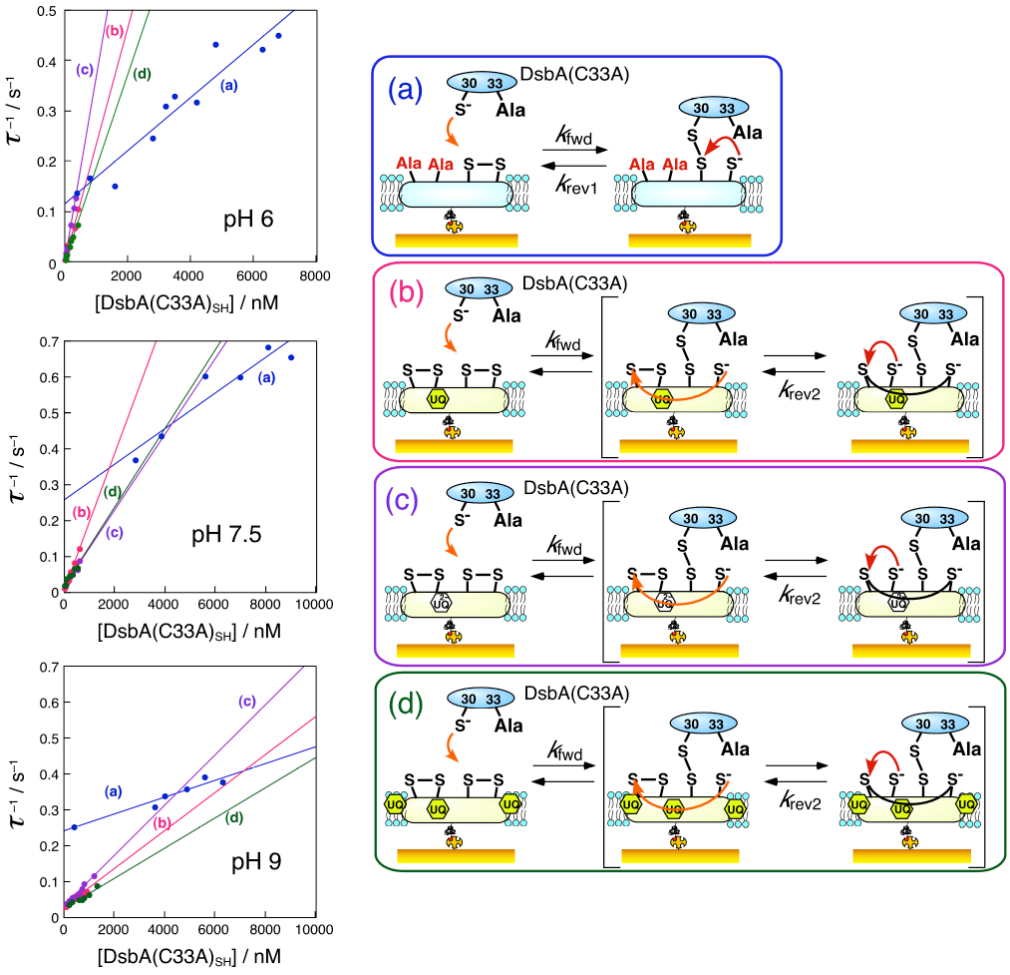


図 4-52：　pH 6.0, pH 7.5 および pH 9.0 におけるユビキノン過剰時および失活時における QCM を用いた DsbA と DsbB の結合反応の緩和法解析の比較

(a)DsbA(C33A)と DsbB(C41A,C44A)、(b)DsbA(C33A)と DsbB、(c)DsbA(C33A)と DsbB(UQ^{2-})、(d)DsbA(C33A)と DsbB(UQ 過剰), 50 mM Tris-HCl(pH 9.0), 100 mM NaCl, 25 °C.

4-6　DsbA と DsbB の酸化反応の pH 依存性のまとめ

4-6-1　DsbB による DsbA 酸化反応の動力学定数の pH 速度曲線と酸化量の相関

DsbB による DsbA 酸化反応についての動力学パラメータの pH-速度曲線を**図 4-53** にまとめた。**図 4-53** には SDS-PAGE で求めた酸化された DsbA の生成量の pH 依存性も示した。DsbB(native)を用いたときには pH 3 から pH 8 の広い領域で DsbA の酸化が特に効率良く進むことがわかる。一方、DsbB(C41A,C44A)を用いたときには pH > 7 の領域では中間体が不安定化し、DsbA の酸化は pH 3 から pH 6 の領域で起こる。pH が 3.5 より小さいときは、DsbA の Cys30 による求核反応が起こりにくいため、DsbA と DsbB の結合が進行しない。3.5 < pH < 6.5 の領域では、k_{fwd} が大きく、k_{rev1}、k_{rev2} 共に小さいため、DsbA と DsbB の反応途上で複合体が安定に形成されるため、DsbA の酸化が進行すると考えられる。6.5 < pH < 8 の領域では、k_{fwd} が大きく、k_{rev2} は小さいが、DsbB の Cys130 による逆反応に由来する k_{rev1} が促進され、安定複合体の形成は起こりにくくなるものの、DsbA の Cys33 による分子内求核反応が促進されるため、DsbA の酸化が進行すると考えられる。8 < pH < 11 の領域では、k_{fwd} が小さくなったことから最初の求核反応に重要な DsbA の Cys30 の周囲のアミノ酸の電荷に変化が生じたと考えられ、さらに DsbB の Cys130 による逆反応に加え、DsbB の Cys44 による逆反応も進行し安定複合体の形成はさらに起こりにくくなるが、DsbA の Cys33 による求核反応が速やかに進行し、DsbA の酸化はなんとか維持されると考えられる。このように、大腸菌のタンパク質ジスルフィド結合形成因子 DsbA と DsbB は、計 6 つのシステインを協奏的に反応させることで pH に対する柔軟性を獲得したと考えられる。

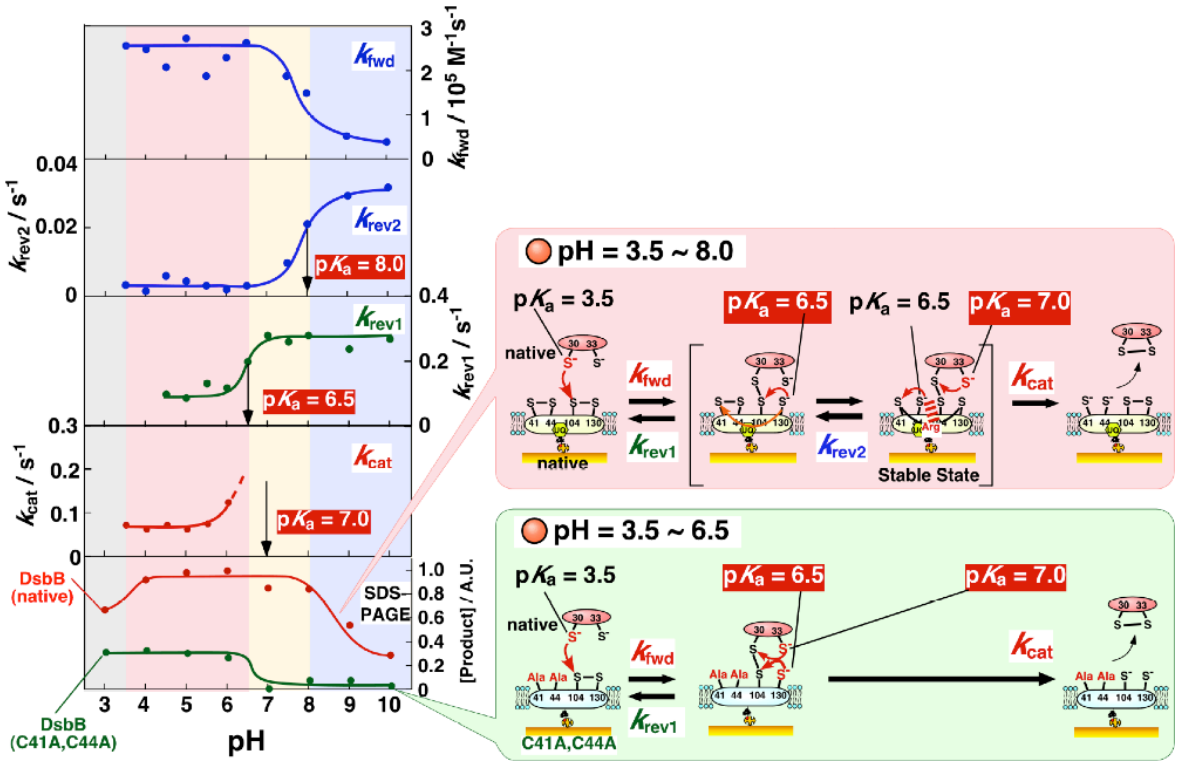


図 4-53：DsbB による DsbA 酸化反応の各 pH 条件下でのキネティクスのまとめ

pH 3 ~ pH 6 (50 mM citrate buffer), pH 6.5, 7 (50 mM MOPS-NaOH), pH 7.5 (50 mM HEPES-NaOH), pH 8 ~ 9 (50 mM Tris-HCl), pH 10 (50 mM glycine-NaOH), 100 mM NaCl at 25 °C.

4-6-2　pH 条件に依存した DsbB による DsbA 酸化反応経路

第 3 章では DsbA と DsbB の反応の最適 pH 条件である pH 6 においての動力学解析を行うことで、これまで提唱されてきた 2 つの Pathway のうち、 Pathway II が主に起こっていることを示した。しかしながら、本章で種々の pH 条件において DsbA と DsbB の反応を行った結果、酸性条件下(pH 3 ~ pH 6)と塩基性条件下(pH 7 ~ pH 10)においては Pathway I と Pathway II の比率が異なることが示唆された。**図 4-54** に示すように Pathway I は安定複合体を経由しない経路であり DsbB の 1 組のジスルフィド結合(Cys104-Cys130)のみ必要とする。一方、Pathway II は安定複合体を経由した反応経路であり DsbB の 2 組のジスルフィド結合(Cys41-Cys44、Cys104-Cys130)を必要とする。そこで Pathway I の寄与は、DsbB(C41A,C44A)と DsbA

との反応で再現することができると考えられる。一方、DsbB(native)と DsbA の反応は Pathway I と Pathway II を合わせたものと考えられる。

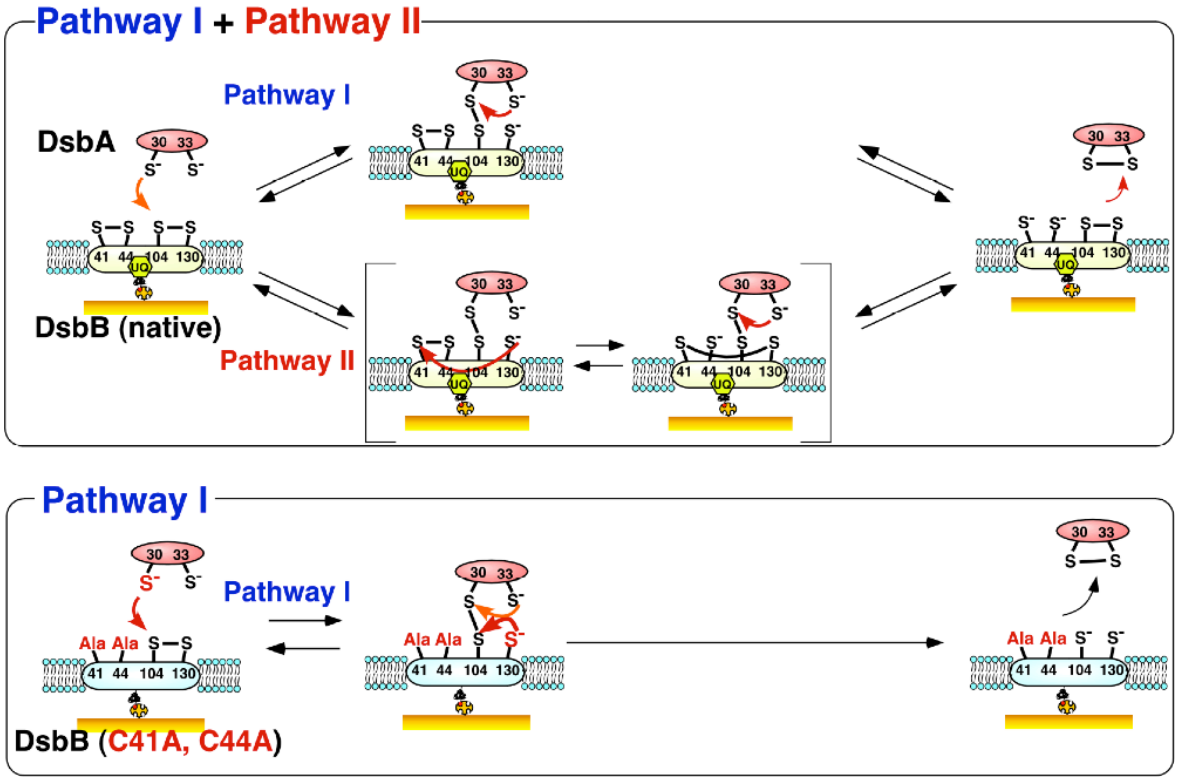


図 4-54：DsbB(native)および DsbB(C41A,C44A)変異体の DsbA 酸化経路とこれまで提唱された Pathway の対応関係

SDS-PAGE 解析による DsbA 酸化量の pH 依存性の結果(**図 4-5**)より、各 pH 条件における Pathway I と Pathway II の進行割合を算出し、**図 4-55** に示した。酸性条件(pH 3 から pH 6.5)では Pathway I の寄与も見られるのに対し、アルカリ性条件(pH 6.5 から pH 10)では Pathway I の寄与はほとんど見られないことがわかった。以上の結果をふまえて、DsbB による DsbA の酸化反応機構を pH 6 の酸性条件と pH 8 のアルカリ性条件を例として、動力学定数と共に**図 4-56** に示した。これまで DsbB による DsbA の酸化が Pathway I と Pathway II のどちらで進行するのか議論になっていたが、酸性・塩基性条件のどちらも Pathway II が主であるが、酸性条件下におい

ては Pathway I も少し進行し(pH 6 で Pathway I : Pathway II = 27 : 73)、塩基性条件では Pathway I はほとんど進行しない(pH 8 で Pathway I : Pathway II = 9 : 91)ことがわかった。これは、酸性条件下では DsbA と DsbB が結合後、DsbB の Cys130 がプロトン化されており、Cys130 が Cys30(DsbA)と Cys104(DsbB)間のジスルフィド結合を攻撃することで起こる逆反応、および、Cys130 が Cys41(DsbB)と Cys44(DsbB)間のジスルフィド結合を攻撃することで起こる安定複合体形成反応が抑えられているため、DsbA の Cys33 による分子内求核反応が速やかに起こり DsbA の酸化が達成されると考えられる。一方、塩基性条件下では DsbB の Cys130 のチオレートアニオンによる逆反応が大きくなり、Cys130 が Cys41(DsbB)と Cys44(DsbB)間のジスルフィド結合を攻撃することで起こる安定複合体形成を経由することが必要であることがわかった。

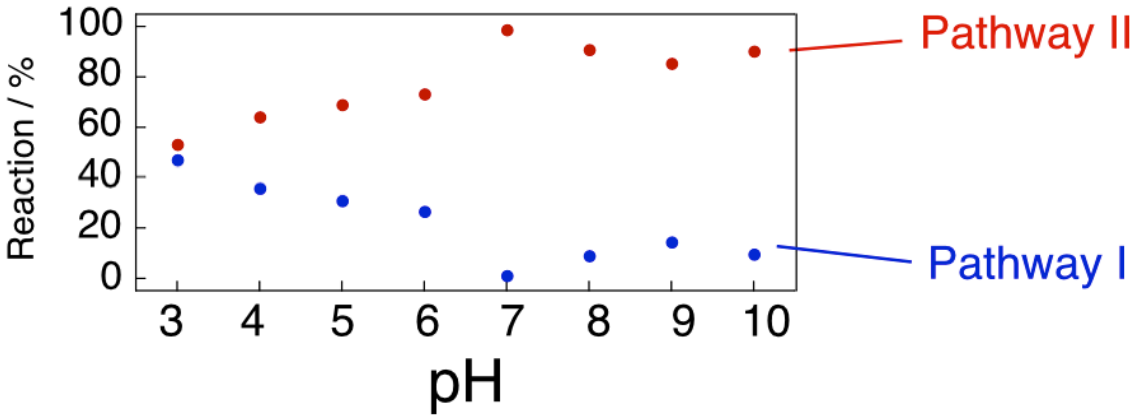


図 4-55：DsbB による DsbA 酸化反応における各 pH 条件による反応経路の割合

pH 3 ~ pH 6(50 mM citrate buffer), pH 6.5, 7.0(50 mM MOPS-NaOH), pH 7.5(50 mM HEPES-NaOH), pH 8 ~ 9(50 mM Tris-HCl), pH 10(50 mM glycine-NaOH), 100 mM NaCl at 25 °C.

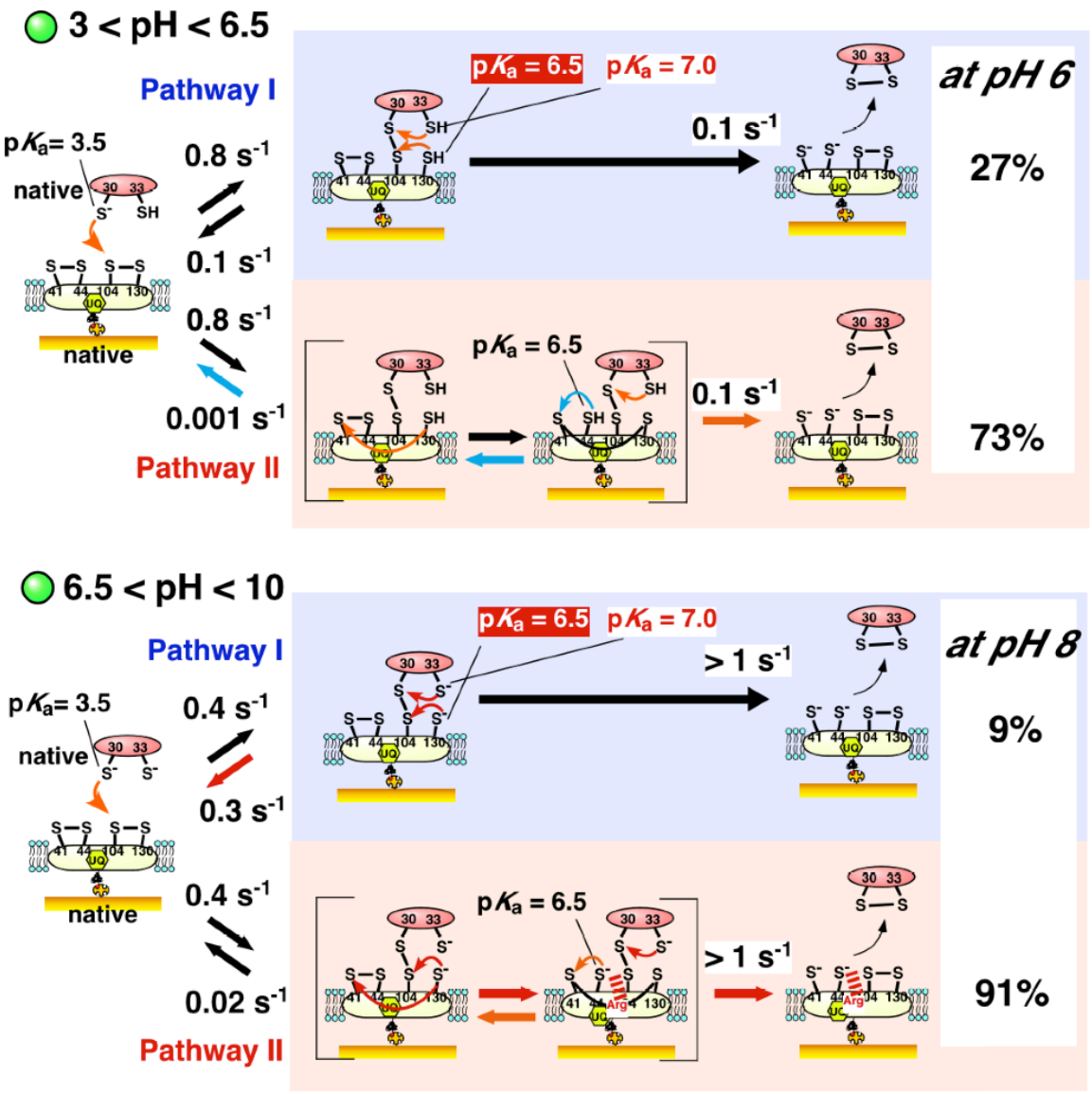


図 4-56：DsbB による DsbA 酸化反応の酸性条件とアルカリ性条件での反応機構

pH 3 ~ pH 6(50 mM citrate buffer), pH 6.5, 7.0(50 mM MOPS-NaOH), pH 7.5(50 mM HEPES-NaOH), pH 8 ~ 9(50 mM Tris-HCl), pH 10(50 mM glycine-NaOH), 100 mM NaCl at 25 °C.

4-7　結言

本章では、大腸菌の生育可能な pH 4 ~ pH 9 の範囲で、外界の環境に応じて pH が変化するペリプラズム空間で進行する DsbB による DsbA の酸化反応が、一般的には塩基性条件で進行しやすいチオール-ジスルフィド結合交換反応であるにも関わらず、広い pH 条件で進行する機構を解明することを目的とした。SDS-PAGE 解析法によって DsbB(native)と DsbB(C41A,C44A)の DsbA の酸化量を比較した結果、DsbB にジスルフィド結合が 1 組しかない場合は pH 3 から pH 6 までの範囲でしか DsbA の酸化が起こらない一方で、DsbB がジスルフィド結合を 2 組有する場合は pH 3 から pH 8 まで DsbA の酸化が達成できることがわかり、全ての pH 範囲において、DsbA の酸化効率が大きく向上していることが示された。その詳しいメカニズムを明らかにするため、QCM 法を利用して、DsbA と DsbB の反応動力学解析を行った。野生型 DsbB と DsbA(native)との反応から k_{cat} について、野生型 DsbB と DsbA(C33A)との反応から k_{fwd} と k_{rev2} について、DsbB(C41A,C44A)と DsbA(C33A)との反応から k_{rev1} についての pH-rate profile を求めた。その結果、DsbB はシステインを 4 つ有することで DsbA との安定複合体を形成することが可能になり、安定複合体を形成しない場合と比較して、全ての pH において DsbA の酸化効率を大きく向上させたことが分かり、より塩基性の pH 領域でも反応可能になったことがわかった。これまで、DsbB による DsbA の酸化経路について、DsbA と DsbB が結合後すぐに DsbA の分子内求核反応によって DsbA の酸化が起こる Pathway I と、安定複合体を経由して反応が進行する Pathway II が議論されてきたが、pH 3~6 の条件では、およそ 3 割程度 Pathway I が進行し、pH 7~pH 10 の範囲においては Pathway I の寄与は小さく、安定複合体の形成が不可欠であることがわかった。さらに、本章

ではユビキノンが特に塩基性条件において、DsbB の Cys44 のチオレートアニオンおよび DsbB の Arg48 のグアニジニウムイオンとの間で電荷移動錯体を形成するという以前に提唱された予測に基づき、ユビキノンが DsbA と DsbB の反応動力学に与える影響を評価した。その結果、ユビキノンは pH 6 の場合同様、DsbA と DsbB の反応動力学に影響を与えておらず、独立して DsbB の酸化を行っていることが分かった。

第 4 章　参考文献

1) H. Gilbert, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **63**, 69-172 (1990).

2) M. Bader, W. Muse, T. Zander, and J. Bardwell, *J. Biol. Chem*., **273**, 10302–10307 (1998).

3) L. Stancik, D. Stancik, B. Schmidt, D. Barnhart, Y. Yoncheva, and J. Slonczewski, *J. Bacteriol.,* **184**, 4246–4258 (2002).

4) J. Wilks and J. Slonczewski, *J. Bacteriol.*, **189**, 5601-5607 (2007).

5) U. Grauschopf, J. Winther, P. Korber, T. Zander, P. Dallinger, and J. Bardwell, *Cell*, **83**, 947–955 (1995).

6) J. Nelson and T. Creighton, *Biochemistry*, **33**, 5974-5983 (1994).

7) U. Grauschopf, A. Fritz, and R. Glockshuber, *EMBO J*., **22**, 3503– 3513 (2003).

8) M. Tang, L. Sperling, D. Berthold, A. Nesbitt, R. Gennis, and C. Rienstra, *J. Am. Chem. Soc.,* **133**, 4359–4366 (2011).

9) H. Kadokura, M. Bader, H. Tian, J.C. Bardwell, and J. Beckwith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 10884–10889 (2000).

10) K. Inaba, Y. Takahashi, K. Ito, and S. Hayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **280**, 287–292 (2006).

11) K. Inaba, S. Murakami, A. Nakagawa, H. Iida, M. Kinjo, K. Ito, and M. Suzuki, *EMBO J*, **28**, 779–791 (2009).

12) G. Roos, N. Foloppe, K. Van Laer, L. Wyns, L. Nilsson, P. Geerlings, and J. Messens, *PLoS Comput Biol.,* **8**, e1000461 (2009).

13) K. Inaba, Y. Takahashi, N. Fujieda, K. Kano, H. Miyoshi, and K. Ito, *J. Biol. Chem.*, **279**, 6761–6768 (2004).

第 5 章　DsbA によるタンパク質の酸化反応観察の試み

5-1　緒言

ジスルフィド結合は多くの分泌タンパク質中に見い出される分子内架橋構造であり、タンパク質の立体構造形成や活性発現に重要である[1]。近年の大腸菌ペリプラズムにおける研究から、Sec や Tat などのトランスロコンを通過する分泌タンパク質に効率良くジスルフィド結合を導入するためには、様々な酵素や低分子物質の働きが必要であることが明らかになってきた。しかし、それらの因子が触媒する個々の反応メカニズムについては、未だに多くのことが不明である。大腸菌ペリプラズムに存在するジスルフィド結合導入酵素 DsbA が分泌タンパク質にジスルフィド結合を導入する過程では、**図 5-1** に示すように DsbA と分泌タンパク質とのあいだに共有結合中間体が形成された後、分泌タンパク質内で起こる分子内求核反応によって、分泌タンパク質にジスルフィド結合が形成される。

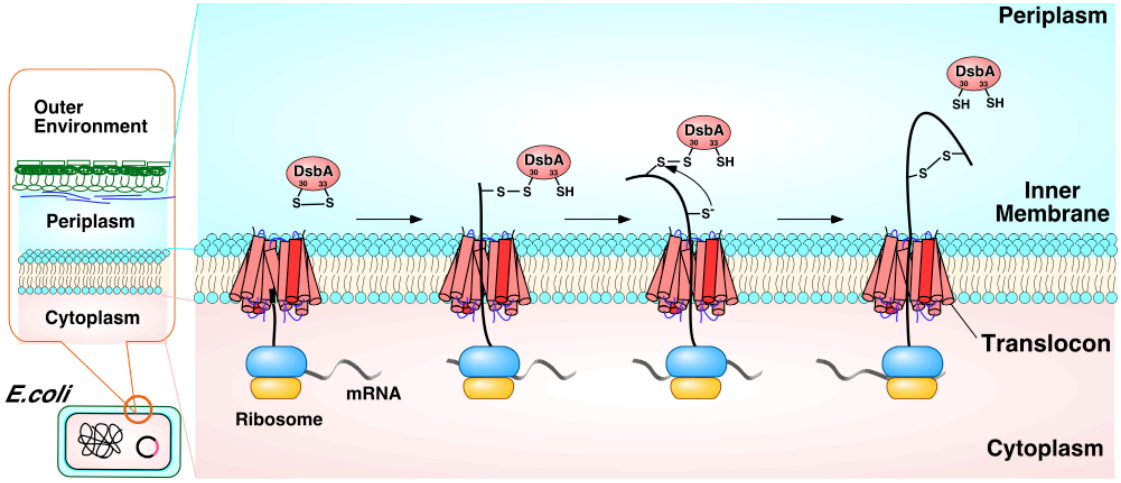


図 5-1：大腸菌の新生タンパク質への DsbA によるジスルフィド結合形成システム

本章では、図 5-2 に示すように水晶発振子マイクロバランスを用いて、DsbA による分泌タンパク質へのジスルフィド結合導入過程を質量変化として観察することを目的とした。DsbA と分泌タンパク質との間に形成された共有結合中間体を振動数減少として検出できると考えられる。DsbA は BCCP（Biotin carboxyl carrier protein）タグとの融合タンパク質とし、ビオチンを付加させた状態で調製し、基板上の NeutrAvidin に配向固定化した。ジスルフィド結合を 1 つ有する分子量 29 kDa のペリプラズムタンパク質である TEM1 β-lactamase をモデル基質として用い、QCM 上で DsbA との反応および SDS-PAGE での生成物の確認実験を行った。

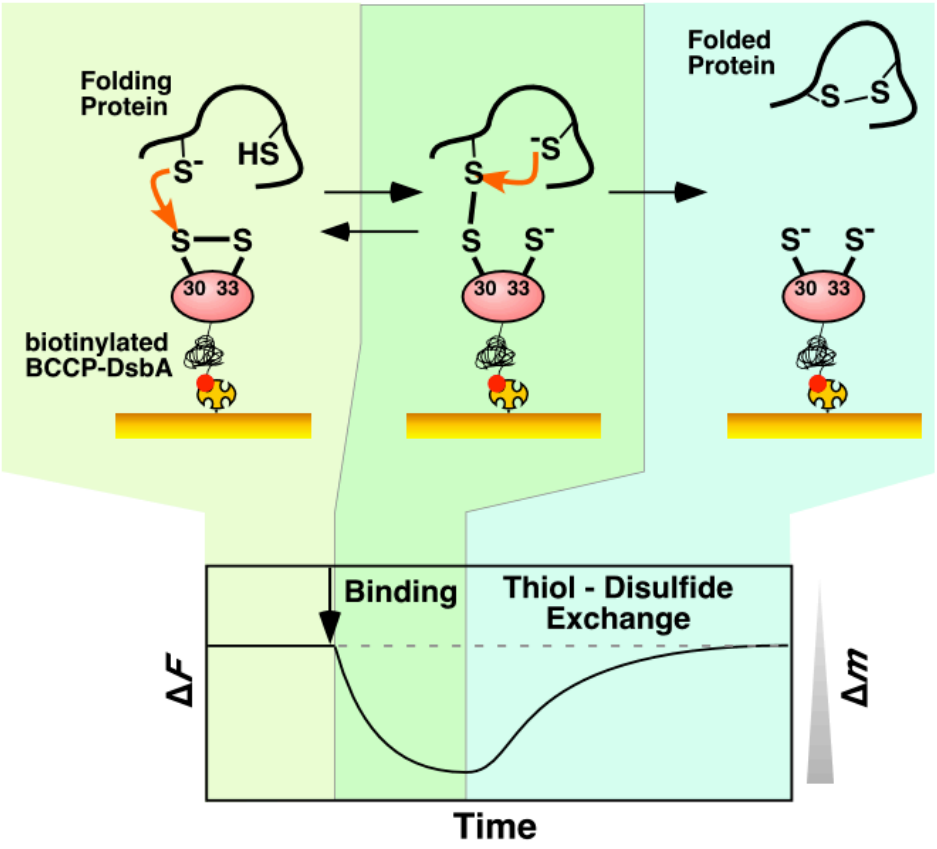


図 5-2：QCM を用いた基質タンパク質への DsbA による S-S 結合導入観察

5-2　実験方法

グルタチオンは和光純薬より購入した。pBR322 はタカラバイオより購入した。CUGA 7 in vitro Transcription Kit はニッポンジーンより購入した。pET26b(+)は Merck より購入した。ホルムアルデヒド、ホルムアミド、エチジウムブロマイドはナカライテスクより購入した。

5-2-1　BCCP-DsbA と 3 種類の変異体の調製

(1)　プラスミド設計

第 2 章において、DsbA 発現ベクターである pET22b-DsbA と BCCP-DsbB 発現ベクターの pET22b-BCCP-DsbB を作製した。**図 5-3** に示すように pET22b-BCCP-DsbB から DsbB 部分を制限酵素で除いてベクターとし、一方、pET22b-DsbA から DsbA 部分を PCR で増幅させインサートとし、それらのベクターとインサートをライゲーションさせて BCCP-DsbA 発現ベクターを作製した。操作は DsbA の場合を参考にした。

また、リファレンスとして BCCP-DsbA の Cys30 または Cys33 をアラニンに変異させた BCCP-DsbA(C30A)および BCCP-DsbA(C33A)を作製した。さらに、DsbA の 151 番目のプロリンをトレオニンに変異させた場合、基質タンパク質と DsbA との複合体形成後の解離が抑えられることが知られており [3]、BCCP-DsbA(P151T)を作製した。

(2)　ベクターの調製

pET22b-BCCP をベクターとして使用するため、2-2 節で調製した

pET22b-BCCP-DsbB(native)プラスミドを NdeI と EcoRI で切断した。反応液を以下のように調製し、37 °C で 3 時間反応させた。

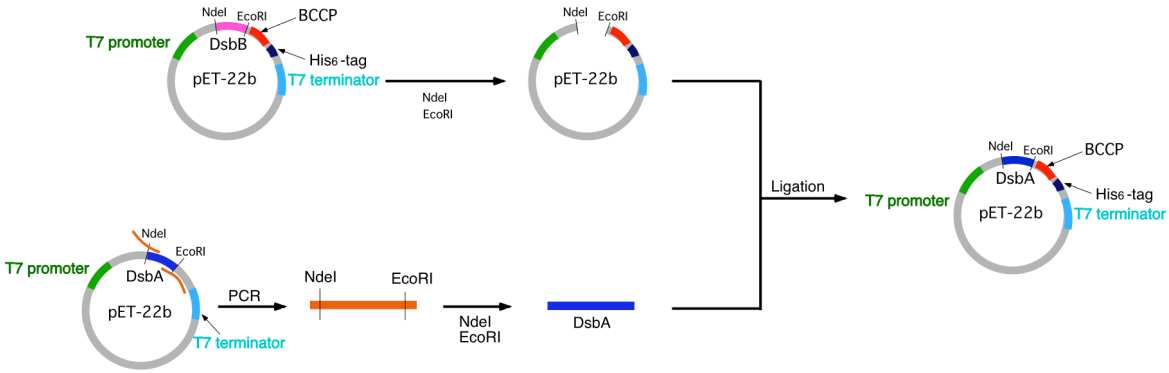


図 5-3：pET22b-BCCP-DsbA ベクターの作製手順

DsbA のストップコドンはアラニンに変異させた

Milli-Q 水	10.5 µL
10 x H buffer	2.5 µL
pET22b-BCCP-DsbB(native)(109 ng/µL)	10 µL(1090 ng)
NdeI	1 µL
EcoRI	1 µL
Total	25 µL

反応後、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)を用いて精製を行った。ベクター内でのセルフライゲーションを防ぐため、以下のような反応液を調製し、37 °C で 3 時間反応させ、pET22b-BCCP ベクターの BAP 処理による脱リン酸化操作を行った。

Milli-Q 水	38.5 µL
10 x BAP buffer	10 µL
制限酵素処理、精製後 pET22b-BCCP ベクター	50 µL
BAP(0.6 units/µL)	1.5 µL
Total	100 µL

BAP 処理後、アガロースゲル切り出し精製を行った。吸光度測定を行い、収量を確認したところ 3.0 ng/μL のベクターを 90 ng 得た。

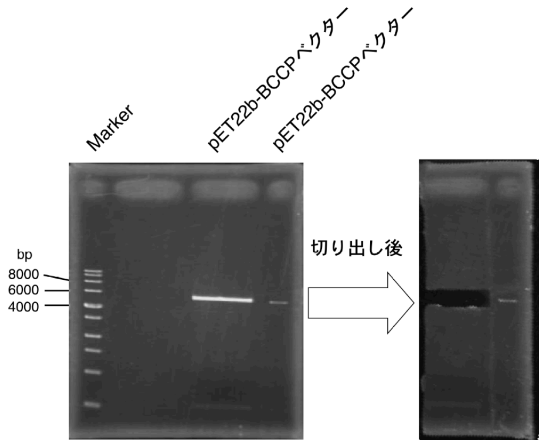


図 5-4：pET22b-BCCP ベクターのアガロース切り出し精製

1% SeaKemGTG アガロース, EtBr 染色, Perfect DNA Markers 0.5~12 kbp

大きいレーンには BAP 処理後のベクター反応液 95 μL に 10 x loading buffer 11 μL を加えて泳動させた。小さいレーンには BAP 処理後のベクター反応液 5 μL に Milli-Q 水 4 μL と 10 x loading buffer 1 μL を加えて泳動させた。

(3)　3 種類の DsbA インサート(BCCP-DsbA(native), BCCP-DsbA(C30A)変異体, BCCP-DsbA(C33A)変異体)の調製

DsbA(native)インサートを調製するため、pET22b-DsbA プラスミドから、以下のような PCR 反応液を調製した。変異体についても同様に調製した。

Milli-Q 水	25 μL
10×buffer for KOD ver2	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
25 mM $MgSO_4$	3 μL
DsbA fwd primer（10 μM）	1.5 μL
5’ GGAGATATACATATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTG 3’	
DsbA stop del rev primer（10 μM）	1.5 μL
5’ GAGCTCGAATTCGCTTTTTTCTCGG 3’	

pET22b-DsbA(native)	8 μL(50 ng 分)
KOD-Plus	1 μL
Total	50 μL

上記の反応液について、

94 °C, 2 min 加熱後、

98 °C, 10 sec→60 °C, 30 sec→68 °C, 45 sec を 25 サイクル繰り返し、

4 °C で放置

というプログラムで PCR を行った。反応後、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製を行った。その後、NdeI, EcoRI 処理を 37 °C で 3 時間行った。

Milli-Q 水	38 μL
10 x H buffer	10 μL
DsbA インサート	50 μL
NdeI	1 μL
EcoRI	1 μL
Total	100 μL

アガロースゲル切り出し精製を行った。吸光度測定を行った。

濃度は 3.0 ng/μL(native), 7.0 ng/μL(C30A), 7.5 ng/μL(C33A)となり、収量は 90 ng(native), 210 ng(C30A), 225 ng(C33A)となった。

(4) ライゲーション反応

3 種類の DsbA インサートと pET22b-BCCP ベクターをライゲーションし、プラスミド保存用を兼ねたタンパク質発現用菌体 JM109(DE3)を Heat shock 法で形質転換した。ライゲーション反応は、Ligation Convenience Kit (ニッポン・ジーン社)を使用して行った。 Kit に付属の 2×Ligation mix を氷上で完全に融解後、ピペッテ

ィングで良く混ぜておいた。3 種類の 1.5 mL チューブに 2×Ligation mix 5 μL, pET22b-BCCP ベクター2.5 μL を添加後、DsbA(native)インサート 2.5 μL を添加した。変異体についても同様に作製した。インサートを添加せず、Milli-Q 水で代替したコントロール(self ligation の影響の評価)も作製した。16 ℃ で 5 分間インキュベートした後、JM109(DE3)を形質転換した。

BCCP-DsbA(native)の場合、40 個、C30A 変異体では 15 個、C33A 変異体では 14 個のコロニーが観察された。コントロールプレート（pET22b-BCCP プラスミドのセルフライゲーションの影響を評価）には 1 個のコロニーが生じていた。これらのコロニーから菌体をピックアップして培養し、プラスミド抽出を行い、pET upper primer (5’ TGTGGCGCCGGTGATGCCG 3’), DsbA fwd primer, T7 teminator rev primer (5’ GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3’), BCCP-DsbB rev primer (5’ GTGGTGGTGCTCGAGACCTTCGATGAG CTCGAGATCC 3’)の 4 種類のプライマーを利用してシークエンス解読を行い、3 種類の BCCP-DsbA の配列が正しいことを確認した。

(5)　BCCP-DsbA(P151T)発現用ベクターの調製

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene 社製)を用いて、**2-4 節**と同様に、pET22b-BCCP-DsbA(native)から変異型である pET22b-BCCP-DsbA(P151T)を PCR で作製した。プライマーは以下の 2 種類を使用した。

QC DsbA P151T fwd primer (39 base)

5’ C GTG CAA TTG CGT GGC GTT ACG GCG ATG TTT GTT AAC GG 3’

QC DsbA P151T fwd primer (39 base)

5’ CC GTT AAC AAA CAT CGC CGT AAC GCC ACG CAA TTG CAC G 3’

シークエンス解読により、目的のプラスミドを作製したことを確認した。

(6)　大腸菌 JM109（DE3）を用いた BCCP-DsbA 野生型および 3 種類の変異体 C30A, C33A, P151T の大量発現

1 L の LB 液体培地(native 体は羽付三角フラスコ 4 本に 250 mL ずつ分注した。変異体については 2 L 三角フラスコを使用した)に、アンピシリンを終濃度 100 μg/mL となるように添加した。さらに 1 mM ビオチンを 2 mL 添加した(終濃度 2 μM)。前日から培養していた JM109 (DE3)-BCCPDsbA-pET22b の Full growth 培養液を添加し、その後、大型シェーカーで 140 rpm、26 °C で振とう培養した。OD_{600} が 0.73(native), 0.63(C30A), 0.41(C33A)となったところで、培養液に対し、IPTG を終濃度 1 mM となるように加えた後、18 時間(native の場合), または 16 時間(C30A および C33A の場合)培養した。

SDS-PAGE の結果、**図 5-5** に示すように IPTG 添加、非添加に関わらず、DsbA が過剰発現していることが分かった。同様の漏れ出し現象は、BCCP タグを融合していない DsbA を発現させたときにも観察された。この原因として、発現菌体として JM109(DE3)を使用していることが原因と考えている(以前 DsbA を BL 株で発現させたときは、漏れ出しが起こらなかった)。しかしながら、BCCP-DsbA が過剰に発現しても、濁度の値から判断して菌体の生育に大きな影響は及ぼさなかったのでこのまま調製を続けた。

(7)　BCCP-DsbA を発現した JM109(DE3)の EDTA 処理でのスフェロプラスト化[2]

DsbA は内膜と外膜の間のペリプラズム画分に存在する分泌タンパク質であり、このようなペリプラズムタンパク質は大腸菌を EDTA 処理して外膜を不安定化さ

せ、スフェロプラスト化（外膜がいくらか失われて球状になった状態）することで、細胞外に漏れ出す画分として分離することができる。そこで、BCCP-DsbA を発現した JM109（DE3）を EDTA 含有バッファーで処理し、スフェロプラスト化させた。

低温室内にて集菌後のペレット(LB 培地 1 L 培養分)について、氷冷 BBS/EDTA buffer（200 mM ホウ酸/NaOH, pH 8.0、160 mM NaCl、5 mM EDTA）を 20 mL 加えて懸濁させた。懸濁液を 20 分おき程度に軽く振り混ぜながら 2 時間放置した。するとペレットはどろどろとした状態となっており、見た目ではいかにも、ペリプラズム画分が溶出した様子を呈した。その後、48,000×g、4 °C で 30 分間 超遠心した。上清を 2 L の 10 mM MOPS/NaOH（pH 7.0）で 3 時間透析し、もう一度繰り返した(この透析処理は EDTA を除去する点で重要である。Ni-NTA カラムの Ni は EDTA によって溶出されてしまうからである)。透析後のサンプルについて、Ni-NTA カラム精製を行った。

(8)　BCCP-DsbA の Ni-NTA カラムによる精製

BCCP-DsbA の C 末端側の His-tag を利用して、Ni-NTA カラム精製を行った。メソッドは以下の通りである。native と変異体を作製する場合で Elution の初期ステップのみ異なっている。

BCCP-DsbA の Ni-NTA カラム精製メソッド
Column：HisTrap HP 1 mL
A buffer：10 mM MOPS-NaOH, pH 7.0, 500 mM NaCl
B buffer：10 mM MOPS-NaOH, pH 7.0, 500 mM NaCl, 1 M imidazole
Flow rate：1.0 mL/min　　Fraction Size：2.0 mL
Elution：2% B：10 CV　　2→100% B(linear gradient)：40 CV　　100% B：5 CV
（＊CV = Column Volume）

図 5-5 に示した ÄKTA のチャートおよび SDS-PAGE の結果から判断して、BCCP-DsbA(MW:38 kDa)に由来すると思われるバンドが確認された。しかしながら、純度を考えると、若干不純物が残存していると言える。イオン交換カラムやゲルろ過カラムなどを組み合わせると、さらなる精製が期待できるが、それには条件検討など時間を要するので、今回は行わなかった。

BCCP-DsbA(native)については、A8, A9, A10, A11, A12 を回収した。

(9)　BCCP-DsbA サンプルの透析、濃縮、定量

精製後回収したサンプルに対して、10 mM MOPS/NaOH（pH 7.0）を 2 L 用いて 2 回透析を行った。その後、アミコンウルトラ-15 限外濾過膜（Millipire, 分画分子量：10,000）を使用して 5,000×g で遠心することで濃縮を行った。

透析後の BCCP-DsbA サンプル溶液を回収した。吸光度測定を行い、紫外吸光法により BCCP-DsbA サンプル溶液の濃度、収量を確認した（BCCP-DsbA はチロシンを 9 残基、トリプトファンを 3 残基有しており、280 nm におけるモル吸光係数は、$\varepsilon_{280\ nm}$ = 29910 $M^{-1}cm^{-1}$ である）。濃度は 131 μM(native), 135 μM(C30A), 42 μM(C33A), 193 μM(P151T)であった。収量は、1 L の LB 培地スケールあたり 10.0 mg(native), 6.7 mg(C30A), 5.1 mg(C33A), 3.6 mg(P151T)であった。

調製した 3 種類の BCCP-DsbA についてアビジンとの特異結合を確認するために、NeutrAvidin 固定化 QCM 金基板に対し BCCP-DsbA を添加し、結合を確認した。反応条件は 25 °C であり、使用バッファーは 50 mM Hepes-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl である。膜タンパク質である BCCP-DsbB の場合とは異なり、界面活性剤の添加は不要である。**図 5-6** に示すように、アビジンと BCCP-DsbA の特異結合が観察された。

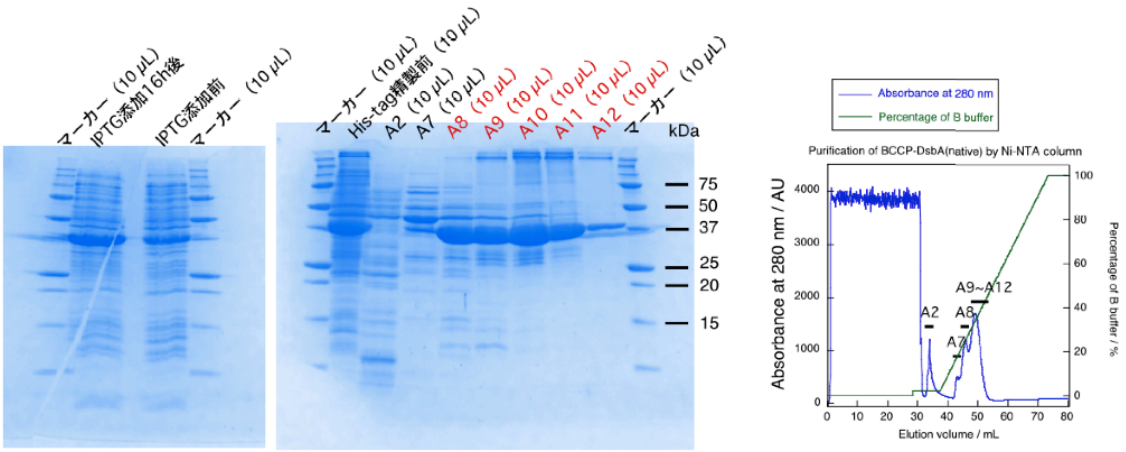


図 5-5：大腸菌 JM109（DE3）を用いた BCCP-DsbA(native)および C30A, C33A 変異体の発現誘導確認と Ni-NTA カラム精製時の SDS-PAGE

BCCP-DsbA の分子量は 38033(native), 38001(C30A, C33A)である。（アクリルアミド 15%）マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）赤字で示した fraction を回収した。

5-2-2　TEM1 β-lactamase と 2 種類の変異体の調製

普段、大腸菌でタンパク質発現を行う際に添加する抗生物質の一つにアンピシリンがある。アンピシリンはβラクタム系抗生物質の一種であり、細菌の細胞壁合成を阻害する機能がある。このアンピシリンに含まれるラクタム環を加水分解する酵素が、β-lactamase である。β-lactamase はジスルフィド結合を 1 つ有する蛋白質であるので、本実験ではβ-lactamase を DsbA によるジスルフィド結合導入反応をモニタリングするための基質モデルとした。リファレンスとして、β-lactamase(C123A), β-lactamase(C77A, C123A)を調製した。β-lactamase を精製するために文献 [2] を参考に陰イオン交換カラムを用いた。β-lactamase の等電点は約 5.6 であり、サンプルバッファーの pH を 7.0 に設定した場合、タンパク質表面が負に帯電していると考えられる。一方、DEAE(ジエチルアミノエチル基)の pK_a=11.5 であり、pH 7.0 ではアミノ基が正に帯電しており、静電的相互作用によりβ-lactamase はカラムの担体と結合すると考えられる。

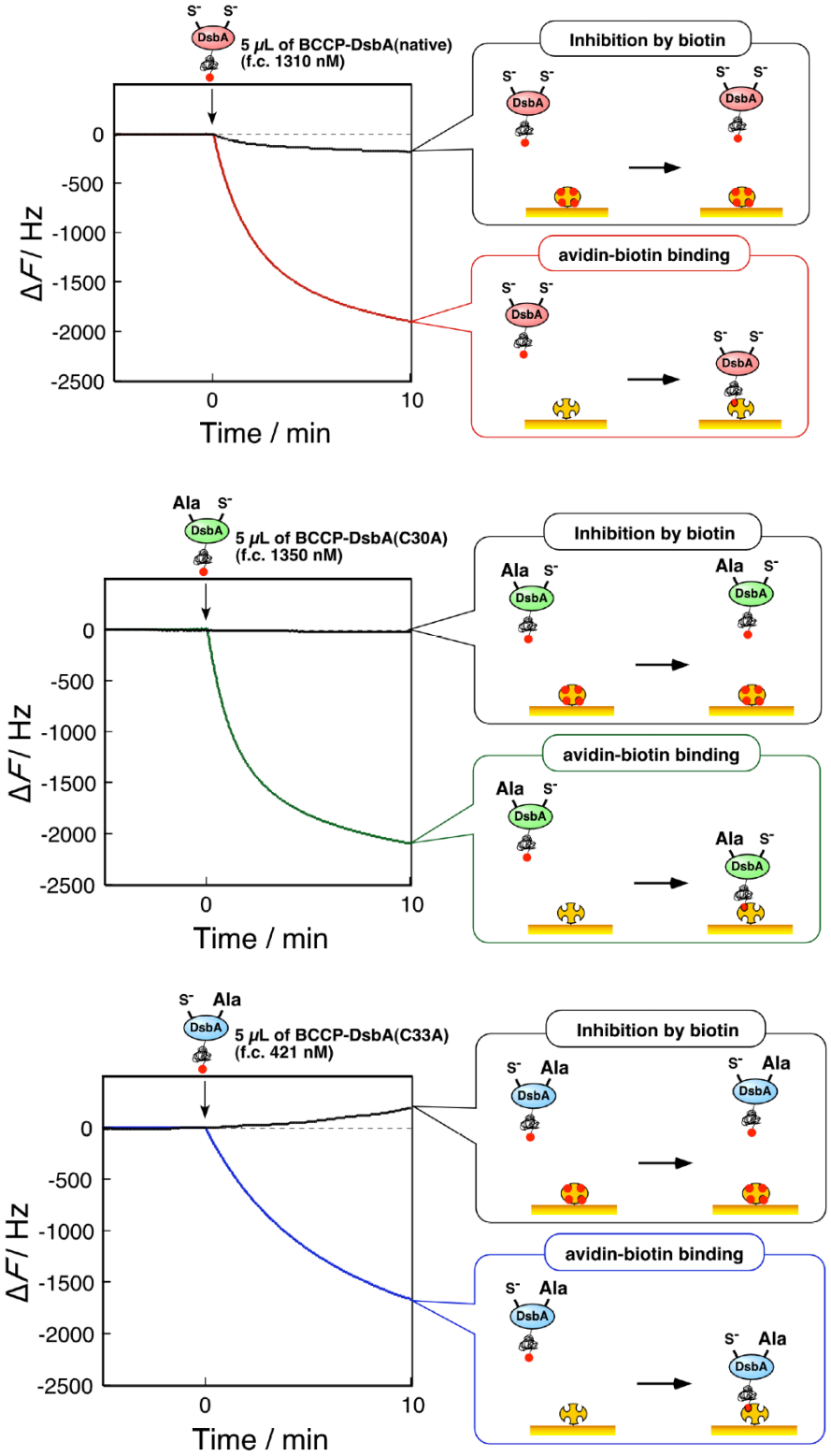


図 5-6：調製した 3 種類の biotin-BCCP-DsbA のアビジン基板への特異結合の確認

ビオチン阻害を行ったセルには 1 mM biotin を 5 μL 予め添加した。

(1)　ベクターの調製

［実験操作］

pET26b(+)をベクターとして使用するため、NdeI と EcoRI で切断後、脱リン酸化処理の操作を 5-2-1 節と同様にして行った。

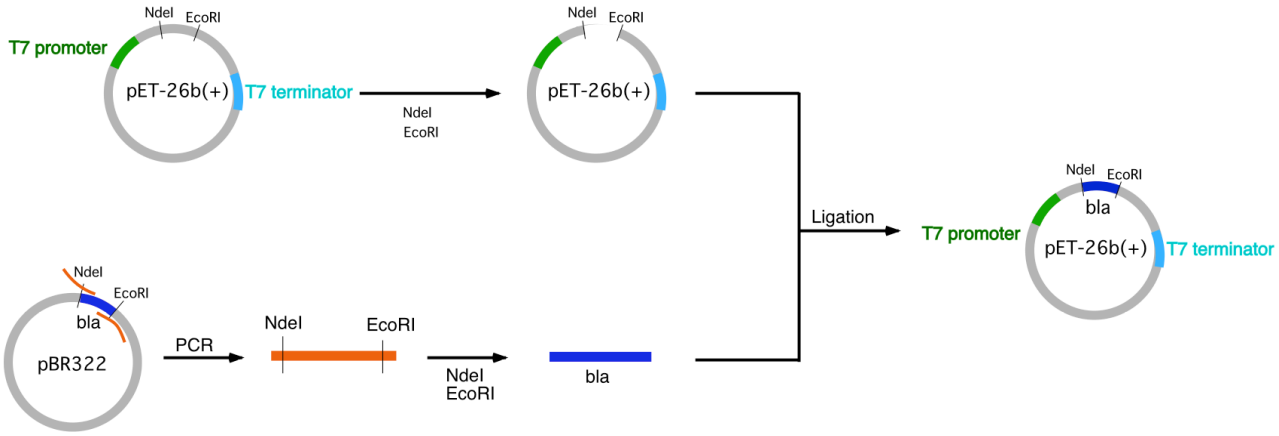


図 5-7：pET26b(+)-β lactamase ベクターの作製手順

(2)　β–lactamase インサートの調製

［実験操作］

β–lactamase インサートを調製するため、pBR322 プラスミドから、以下のような PCR 反応液を調製した。

Milli-Q 水	28 µL
10×buffer for KOD ver2	5 µL
2 mM dNTPs	5 µL
25 mM $MgSO_4$	3 µL
β–lactamase fwd primer（10 µM）35 bp	1.5 µL
5’ agatatacatatgagtattcaacatttccgtgtcg 3’	
β–lactamase rev primer（10 µM）35 bp	1.5 µL
5’ agc tcgaattcttaccaatgcttaatcagtgaggc 3’	
pBR322 plasmid	5 µL(49 ng 分)
KOD-Plus	1 µL
Total	50 µL

上記の反応液について、

94 °C, 2 min 加熱後、

98 °C, 10 sec→55 °C, 30 sec→68 °C, 60 sec を 25 サイクル繰り返し、

4 °C で放置

というプログラムで PCR を行った。反応後、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製を行った。その後、NdeI, EcoRI 処理を 37 °C で 3 時間行った。アガロースゲル切り出し精製を行った。

β–lactamase インサートと pET26b(+)ベクターをライゲーションし、プラスミド保存用菌体 JM109 を Heat shock 法で形質転換した。プラスミド抽出を行い、シークエンス解読によって、pET26b(+)-β lactamase (native)の配列が正しいことを確認した。

(3)　β-lactamase (C123A)およびβ-lactamase(C77A, C123A)発現用ベクター作製

QuikChange 法によって 2-2 と同様に変異導入を行った。用いたプライマーは以下の通りである。まず最初に C123A の変異導入を行った。その後、C123A 変異導入後のプラスミドに対し、C77A の変異導入を行った。

BlaC123A fwd primer
5’-CA GTA AGA GAA TTA GCC AGT GCT GCC ATA ACC-3’
Bla C123A rev primer
5’-GGT TAT GGC AGC ACT GGC TAA TTC TCT TAC TG-3’
BlaC77Afwd primer
5’-GCA CTT TTA AAG TTC TGC TAG CTG GCG CGG TAT TAT CC-3’
BlaC77Arev primer
5’-GGA TAA TAC CGC GCC AGC TAG CAG AAC TTT AAA AGT GC-3’

シーケンスを解読し目的の変異が入っていること、およびβ-lactamase(C123A)およびβ-lactamase(C77A,C123A)をコードする開始コドンから終止コドンまでの配列が

正しいことを確認した。

(4)　大腸菌 BL21（DE3）を用いたβ-lactamase の大量発現

作製したβ-lactamase 発現用プラスミドでタンパク質発現菌体 BL21(DE3)をエレクトロポレーション法により形質転換した。

3 L の LB 培地を用いて、β-lactamase を大量発現させた。2 種類の変異体については 1 L の培地で発現させた。カナマイシンを終濃度 25 μg/mL となるように添加した。前日から培養していた BL21(DE3) - pET26b(+) - β lactamase の培養液を添加し、その後、大型シェーカーで 140 rpm、37 °C で振とう培養した。OD_{600} が 0.6 となったところで､IPTG 非添加リファレンスとして 2 mL を別の試験管に移した後、残りの培養液に対し IPTG を終濃度 1 mM となるように加えた後、26 °C で培養を続けた。13 時間後には OD_{600}=2.68 となった。集菌し、100 mL の BBS/EDTA buffer で懸濁後、40,000 x g で超遠心を行い、上清を透析(2 L x 2 回)した。限外濾過を行い、サンプルの量を 11 mL 程度まで濃縮した後、透析(2 L x 1 回)を行った。

(5)　β-lactamase の陰イオンカラム精製

陰イオンカラム精製時のクロマトグラムを示した。

β-lactamase の陰イオンカラム精製メソッド
Column：Hi Trap DEAE FF 5 mL
A buffer：10 mM MOPS-NaOH, pH 7.0
B buffer：10 mM MOPS-NaOH, pH 7.0, 500 mM NaCl
Flow rate：4.0 mL/min(native の場合)　2.0 mL/min(2 種類の変異体の場合)
Fraction Size：2.0 mL
Elution：0% B：5 CV　　0→50% B(linear gradient)：20 CV　　100% B：5 CV

（＊CV = Column Volume）

SDS-PAGE の結果、**図 5-8** に示すように IPTG 添加により 30 kDa 付近にβ-lactamase が発現誘導されていることが分かった (IPTG で発現誘導したことに伴い 31 kDa 付近に大きなバンドが現れているが、これはシグナル配列が付加したβ–lactamase と考えられる。後で陰イオンカラム精製した際に、より低分子量側にβ-lactamase のバンドが生じた)。

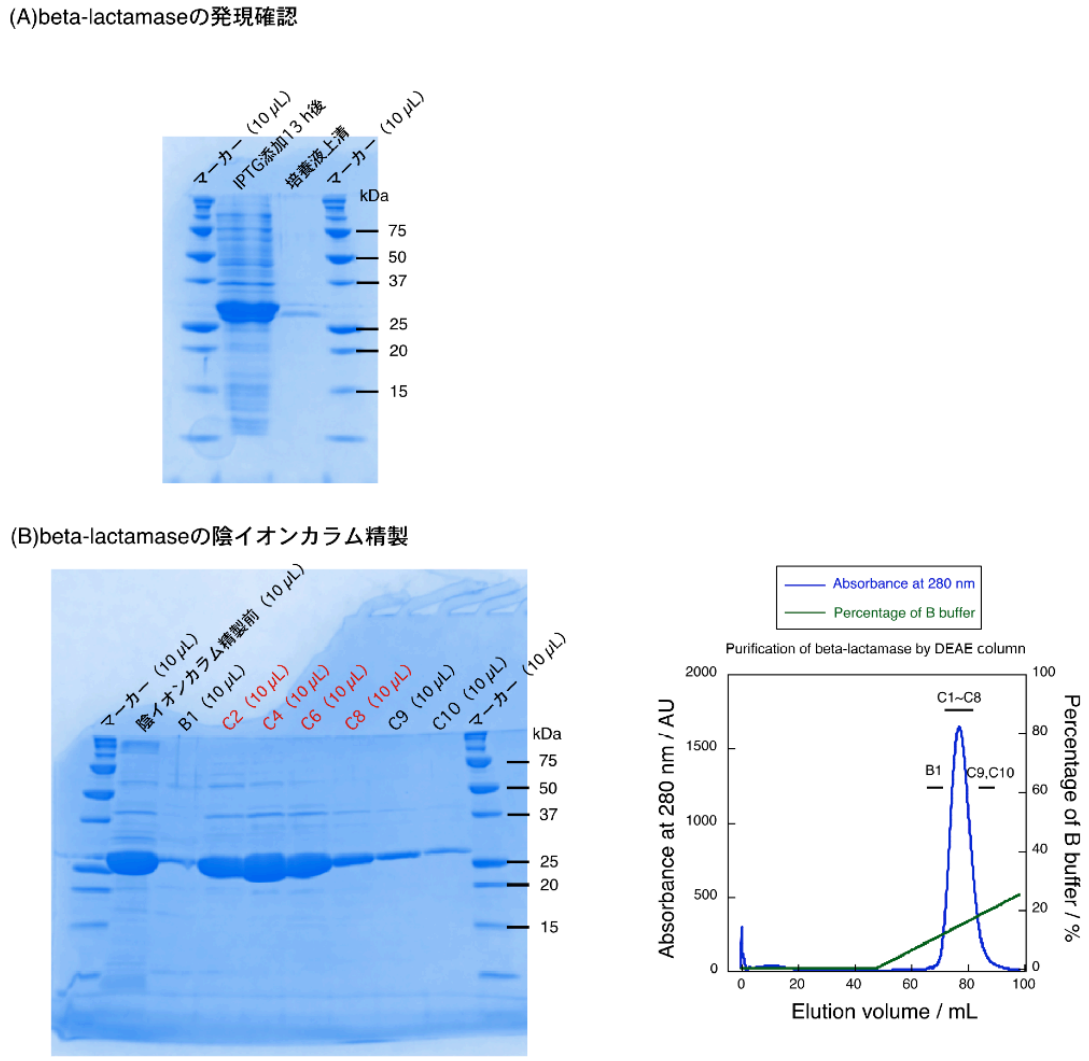


図 5-8：β-lactamase の陰イオンカラム精製時の SDS-PAGE

β-lactamase の分子量は 31500(シグナル配列有り), 28900(シグナル配列無し)である。（アクリルアミド 15%）マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）赤字で示した C2 から C8 フラクションを回収した。

(6)　陰イオンカラム精製後のβ-lactamase サンプルの透析、濃縮、定量

精製後回収したサンプルに対して、10 mM MOPS/NaOH（pH 7.0）を 2 L 用いて 1 回透析を行った。その後、アミコンウルトラ-15 限外濾過膜（Millipore, 分画分子量：10,000）を使用して 5,000×g で遠心することで濃縮を行った。透析後の β-lactamase サンプル溶液を回収した。吸光度測定を行い、紫外吸光法により β-lactamase サンプル溶液の濃度、収量を確認した（β-lactamase はチロシンを 4 残基、トリプトファンを 4 残基有しており、280 nm におけるモル吸光係数は、$\varepsilon_{280\,nm}$ = 30,000 $M^{-1}cm^{-1}$ である [1]）。濃度は、β-lactamase(native)、β-lactamase(C123A)、β-lactamase(C77A,C123A)について、それぞれ 287 μM, 63 μM, 56 μM となり、収量は LB 培地 1 L スケールあたりそれぞれ 3.7 mg, 1.4 mg, 1.7 mg 得られた。

5-3　SDS-PAGE での BCCP-DsbA によるβ-lactamase の酸化反応の確認

5-3-1　BCCP-DsbA とβ-lactamase の反応

調製した biotin-BCCP-DsbA(native)がβ-lactamase を酸化するかどうか、SDS-PAGE を利用して確認した。実験の概要を図 5-9 に示した。還元β-lactamase が BCCP-DsbA によって酸化された場合は、分子量 0.5 kDa のチオール修飾剤と反応しないので、バンドが低分子量側に検出されることを利用した。

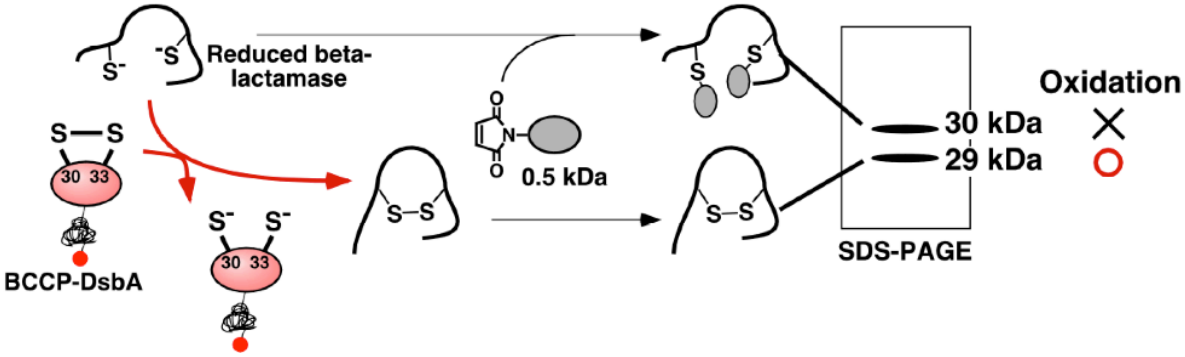


図 5-9 : SDS-PAGE を用いた BCCP-DsbA によるβ-lactamase 酸化活性確認の概要

実験スキームを以下図 5-10 に示した。β-lactamase は変性剤である塩酸グアニジンの濃度によって「native」と「intermediate」と「unfold」の 3 状態に推移することが知られている[2]。最初にβ-lactamase を 6 M 塩酸グアニジン存在下の変性条件で還元を行った (この状態ではβ-lactamase は「unfold」の状態)。脱塩後、BCCP-DsbA と 1.2 M 塩酸グアニジン存在下で反応させる (この場合β-lactamase は「intermediate」の状態が多くを占める)。TCA 沈殿後、マレイミド基を有するチオール修飾剤と反応させ、非還元 PAGE を行った。

試行錯誤の結果、以下の 3 つのことがわかった。

1）1.2 M 塩酸グアニジン中ではβ-lactamase に対し 150 当量の還元剤を添加してもβ-lactamase は還元されない。β-lactamase を還元するには 6 M の塩酸グアニジン存在下で行う必要がある。

2）β-lactamase を還元するための還元剤 TCEP は必要最低限(β-lactamase 1 当量に対して 30 当量)にする。還元剤を多く使用すると、後で脱塩する際に、少量溶出して DsbA を還元するためである。

3）脱塩カラムの置換バッファーには 1.2 M 塩酸グアニジンを添加する。6 M 塩酸グアニジンで置換しないのは、溶出液(6 M 塩酸グアニジンで変性したβ-lactamase を含む)を DsbA と反応させる際に DsbA が変性してしまうからである。ちなみにβ-lactamase と DsbA を塩酸グアニジン非存在下で反応させると、全く反応は起きない。これは**図 5-11** のようにβ-lactamase が「native」の状態になり、β-lactamase のシステインが内部に埋め込まれてしまい、DsbA がアクセスできないからである。

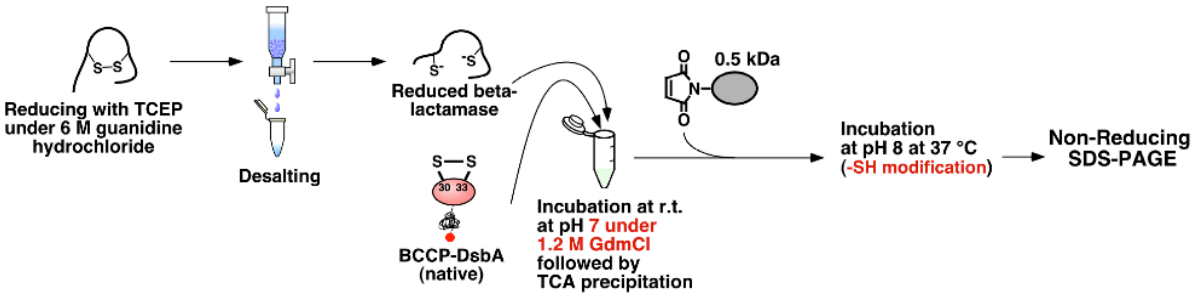
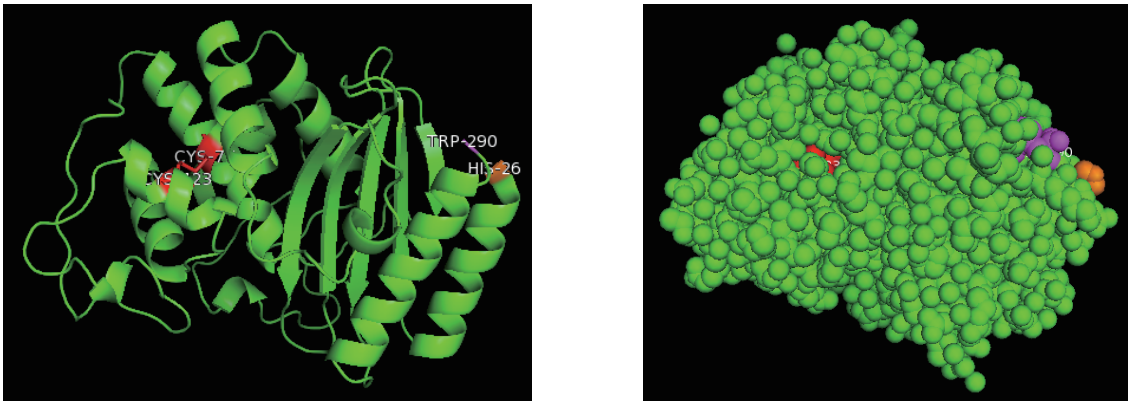


図 5-10：BCCP-DsbA によるβ-lactamase の酸化の SDS-PAGE 確認実験スキーム

（1）還元剤処理および未処理の BCCP-DsbA の調製

2 つの 1.5 mL チューブに 100 mM MOPS, pH 7 を 10 µL 添加した。40 µM BCCP-DsbA を 2 つのチューブに 1 µL 添加した(終濃度 2 µM)。2 つのうち一方には 3 mM TCEP を 9 µL 添加し(終濃度 1350 µM)、もう一方には Milli-Q を 9 µL 添加した。37 °C で 2 時間反応させた。その後、100% TCA を 2 µL 添加して (終濃度 10%)

TCA 沈殿した。Modification buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% SDS, 20 mM AMS) 10 μL で溶解し、37 °C で 10 分以上反応させた。非還元用の SDS-PAGE サンプルバッファーを 10 μL 添加し、37 °C で 5 分反応し、PAGE 用のサンプルとした。



Cartoon 表示　　Sphere 表示

図 5-11：β-lactamase(native)の立体構造とジスルフィド結合の位置(赤:システイン残基、オレンジ:N 末端、ピンク:C 末端)

2 つのシステイン残基はβ-lactamase の内部に埋め込まれて存在する。

（2）BCCP-DsbA と未反応のβ-lactamase の調製

1.5 mL チューブに、408 μM のβ-lactamase を 2 μL（終濃度 2.1 μM)、pH 7 の 1 M バッファーを 26 μL 入れた。これに 100 mM の EDTA を 7.8 μL 添加し(終濃度 2 mM)、8 M 塩酸グアニジン水溶液を 292.5 μL 添加した(終濃度 6 M)。さらに 3 mM TCEP を 8.6 μL(終濃度 66 μM) 添加し、MilliQ 水を 53.1 μL 添加した。37 ° C で 2 時間反応させた。3 本の Zeba Desalt Spin Columns (100 mM MOPS, pH 7.0, 2 mM EDTA, 1.2 M 塩酸グアニジンで置換済み)で脱塩後、40 μL を 4 本の 1.5 mL チューブに移し、それぞれ 1 分、5 分、20 分、60 分後に 100% TCA を 4.7 μL 加えて TCA 沈殿した。

（3）BCCP-DsbA とβ-lactamase の反応

脱塩処理後のβ-lactamase 40 μL を 4 本の 1.5 mL チューブに移し、4 μL の BCCP-DsbA を添加し、インキュベートした(β-lactamase : DsbA = 2.1 : 4)。室温で 1 分、5 分、20 分、60 分反応させた。その後、100 % TCA を 4.7 μL 添加し(終濃度 10%)、4 °C, 16,000 x g, 10 分遠心した。ペレットを冷アセトンで 2 回洗浄した。Modification buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% SDS, 20 mM AMS) 10 μL で溶解し、37 °C で 30 分以上反応させた。非還元用の SDS-PAGE サンプルバッファーを 10 μL 添加し、37 °C で 5 分反応し、PAGE 用サンプルとした。

（4）SDS-PAGE による評価

結果を**図 5-12** に示した。BCCP-DsbA(native)によってβ-lactamase が酸化されることが分かった。β-lactamase の酸化が完全には進行していないのは、1.2 M 塩酸グアニジン存在下では「native」の状態のβ-lactamase がいくらか存在し、システインが分子内部に存在しているため、DsbA がアクセスできず、酸化が進行しなかったと考えられる。この DsbA と反応しなかったβ-lactamase が 0.5 kDa の AMS と反応し、高分子量側にバンドが検出されたと思われる。

5-3-2　BCCP-DsbA(P151T)とβ-lactamase の反応

DsbA の 151 番目のプロリンをトレオニンに変異させた場合、基質タンパク質との複合体が多く検出されたことが報告されている[3]。そこで、次に BCCP-DsbA(P151T)を用いて実験した。QCM での実験を行う前に、SDS-PAGE によって BCCP-DsbA(P151T)がβ-lactamase を酸化するかどうか確認した。

結果を**図 5-13** に示した。BCCP-DsbA(P151T)によって、β-lactamase が酸化されていないことが分かった。P151T の変異はβ-lactamase の分子内で起こる求核反応、

すなわち k_{cat} の項を小さくしてしまうと考えられる。

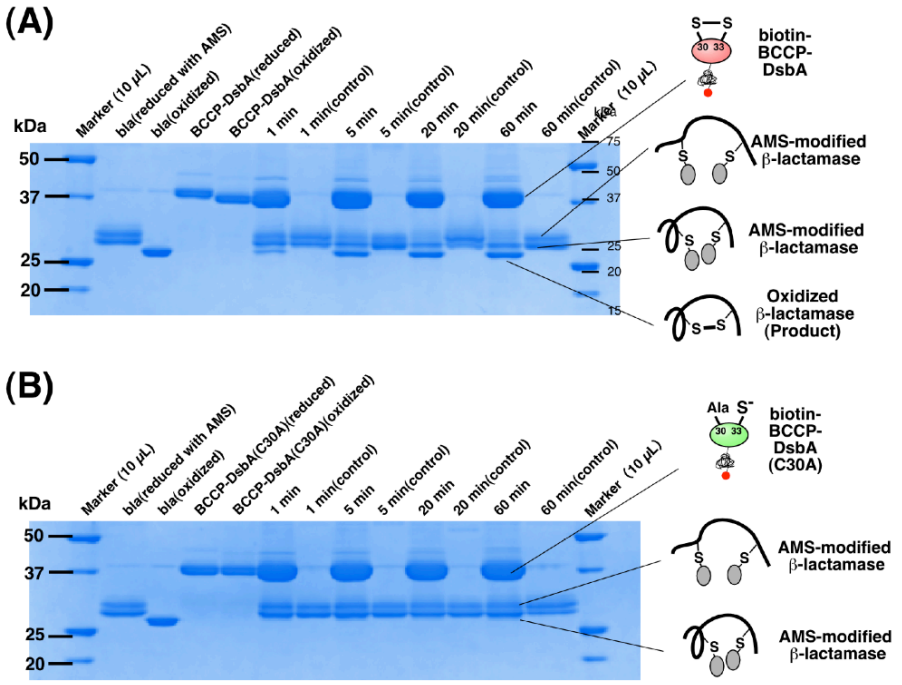


図 5-12：BCCP-DsbA の野生型および C30A 変異体によるβ-lactamase の酸化活性確認のための 12% SDS-PAGE

(A)biotin-BCCP-DsbA(native)とβ-lactamase の反応、(B) biotin-BCCP-DsbA(C30A)とβ-lactamase の反応. β-lactamase の分子量は 28,900(シグナル配列無し)、BCCP-DsbA の分子量は 38,000 である。（アクリルアミド 12%）マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）

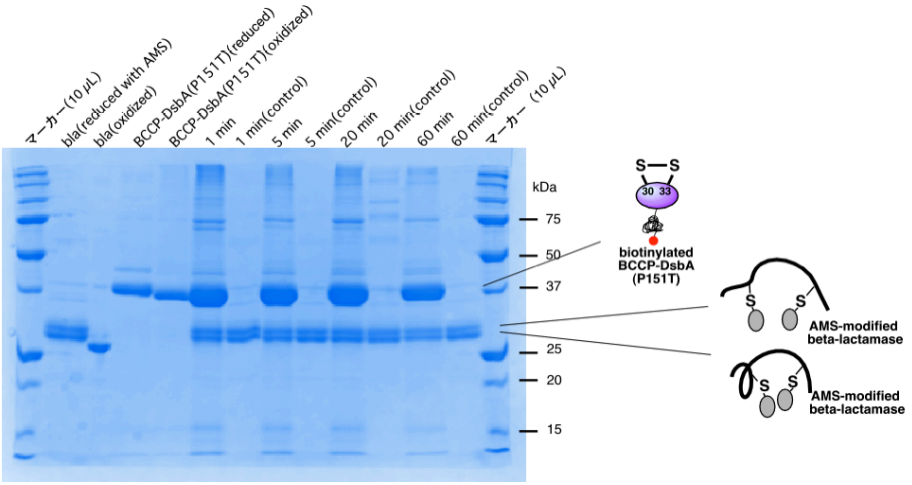


図 5-13：BCCP-DsbA(P151T)変異体によるβ-lactamase の酸化活性確認のための 12% SDS-PAGE

β-lactamase の分子量は 28,900(シグナル配列無し)、BCCP-DsbA の分子量は 38,000 である。（アクリルアミド 12%）マーカー：Precision Plus Protein Standards Unstained（Bio-Rad）

5-4　QCM を用いた BCCP-DsbA によるβ-lactamase の酸化観察の試み

SDS-PAGE の結果から BCCP-DsbA はβ-lactamase を酸化することが確かめられたので、QCM を用いて反応を観察した。ただし、6 M 塩酸グアニジン溶液を QCM に添加するのは大きなシグナルノイズになるので、脱塩カラムを 6 M 塩酸グアニジンで置換するのは避けるように注意した。一方、カラムを 1.2 M 塩酸グアニジンで置換した場合、β-lactamase の溶出後、沈殿してしまう(これは QCM に使用するβ-lactamase の濃度が大きいため、塩酸グアニジン濃度が 6 M から 1.2 M という環境変化のためにβ-lactamase が沈殿するものと考えられる)。そこで、3 M 塩酸グアニジンでカラムを置換しておくことにした。

（1）BCCP-DsbA 固定化基板の調製

NeutrAvidin をアミンカップリング法で固定化した QCM セル内を QCM buffer (50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl)で置換後 AFFINIX Q4 にセットし、安定化を待った後、BCCP-DsbA を添加し、振動数変化が–2000 Hz に到達したところでビオチンを添加した。その後 QCM セル内の溶液を 430 μL 除き Denature buffer(50 mM MOPS-NaOH, pH 7.0, 100 mM NaCl, 1.2 M GdmCl)を 430 μL 加えることを 4 回繰り返した。QCM チャートを**図 5-14(a)**に示した。

（2）β-lactamase の添加

1.5 mL チューブ中のβ-lactamase に対し、8 M 塩酸グアニジン溶液(dissolved in 100 mM MOPS buffer, pH 7)を終濃度 6 M となるように添加した。さらに TCEP をβ-lactamase に対して 30 当量添加した。37 ° C で 1 時間以上反応させた。Zeba Desalt

Spin Columns (100 mM MOPS, pH 7.0, 2 mM EDTA, 3 M 塩酸グアニジンで置換済み)で脱塩後、QCM セルに添加した。

図 5-14(b)のβ–lactamase と BCCP-DsbA(native)の反応チャートより、非特異結合と思われる挙動のみ観察された。pH 7 の条件ではβ–lactamase のシステインが-SH の状態になっているために求核能が小さい可能性もある。また、結合してもすぐに逆反応が起こって解離が起こる、またはβ–lactamase 分子内の求核反応が大変早く、QCM で複合体を検出できていない可能性もある。一方、pH を変化させても反応は観察できなかった(データは示していない)。さらに、**図 5-13(c)**の結果より、BCCP-DsbA(C30A)とβ–lactamase の結合はほとんど観察されず、非特異結合が小さいことも分かった。以上の結果よりβ–lactamase と BCCP-DsbA の中間体形成が起こらず、QCM で質量変化として検出できていないと思われる。

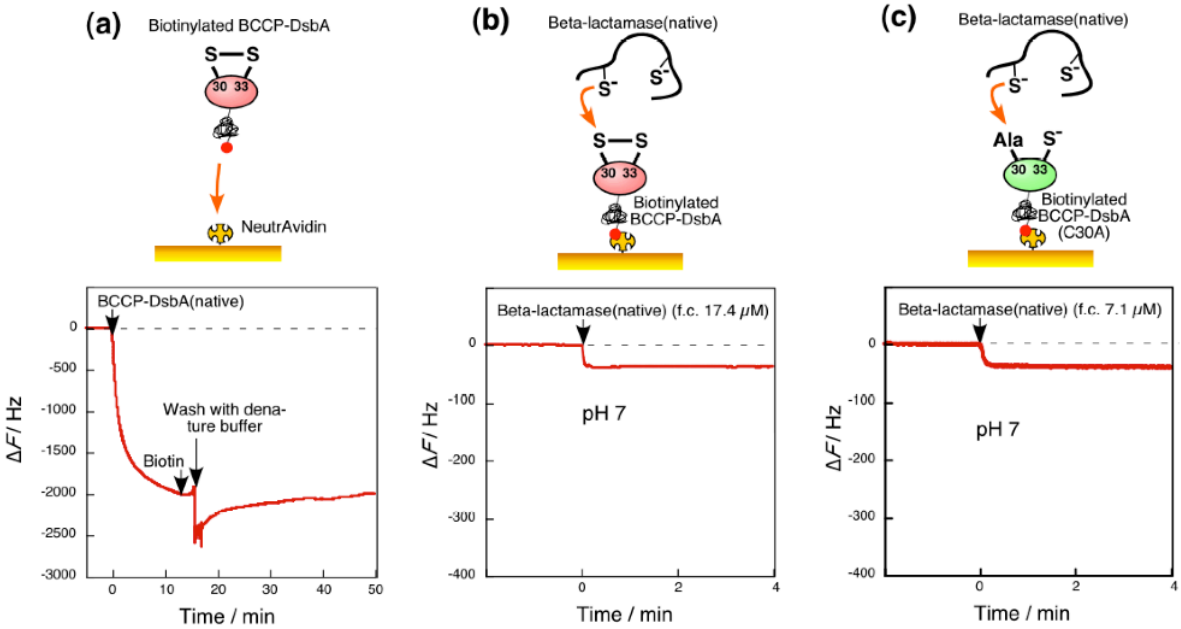


図 5-14：各反応における QCM チャート(25 °C)

(a) : NeutrAvidin 基板に対する BCCP-DsbA(native)の固定化チャート(wash 前：50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl　wash 後 ：50 mM MOPS-NaOH, pH 7.0, 100 mM NaCl, 1.2 M GdmCl)　(b) : BCCP-DsbA(native)に対するβ-lactamase(native)の反応(50 mM MOPS-NaOH, pH 7.0, 100 mM NaCl, 1.2 M GdmCl)　(c) : BCCP-DsbA(C30A)に対するβ-lactamase(native)の反応(50 mM MOPS-NaOH, pH 7, 100 mM NaCl, 1.2 M GdmCl).

5-5　PURESYSTEM で発現させたβ-lactamase への DsbA による S-S 結合形成の試み

5-5-1　β-lactamase を PURESYSTEM で発現させるための mRNA の調製

再構成型無細胞翻訳系である PURESYSTEM を利用して、β-lacatamase を発現させることで、**図 5-15** のように QCM 上で DsbA によってβ-lactamase にジスルフィド結合が形成される過程をリアルタイムで観察することを目的とした。β-lacatamase は本来ペリプラズムに存在するタンパク質であり、N 末端に存在するシグナル配列が内膜を通過する際のシグナルとなり、最終的には内膜に存在するシグナルペプチダーゼによってシグナル配列が切断されて成熟型となる。ところで、このシグナル配列はシステインを 1 つ含んでいる。そこで、今回、PURESYSTEM を利用してβ-lactamase を発現させるにあたり、シグナル配列を除いたβ-lactamase の発現遺伝子を新たに作製した。

(1) シグナル配列を除いたβ-lactamase の発現遺伝子の作製

In Fusion 反応を利用して、シグナル配列を除いたβ-lactamase の発現遺伝子を調製した。**2-2 節**の操作と同様に行った。簡潔には、以下のプライマー2 種類を使用し、pBR322 プラスミドから、シグナル配列を除いたβ-lactamase 遺伝子インサートを調製し、その後、NdeI と EcoRI で処理した pET26b(+)プラスミドベクターと In Fusion 反応を行った。

BlaDelSigFwd

(配列：5'…AAG GAG ATA TAC ATA TGC ACC CAG AAA CGC TGG TG-3')

BlaDelSigRev

(配列：5’…GAC GGA GCT CGA ATT CTT ACC AAT GCT TAA TCA GTG-3’)

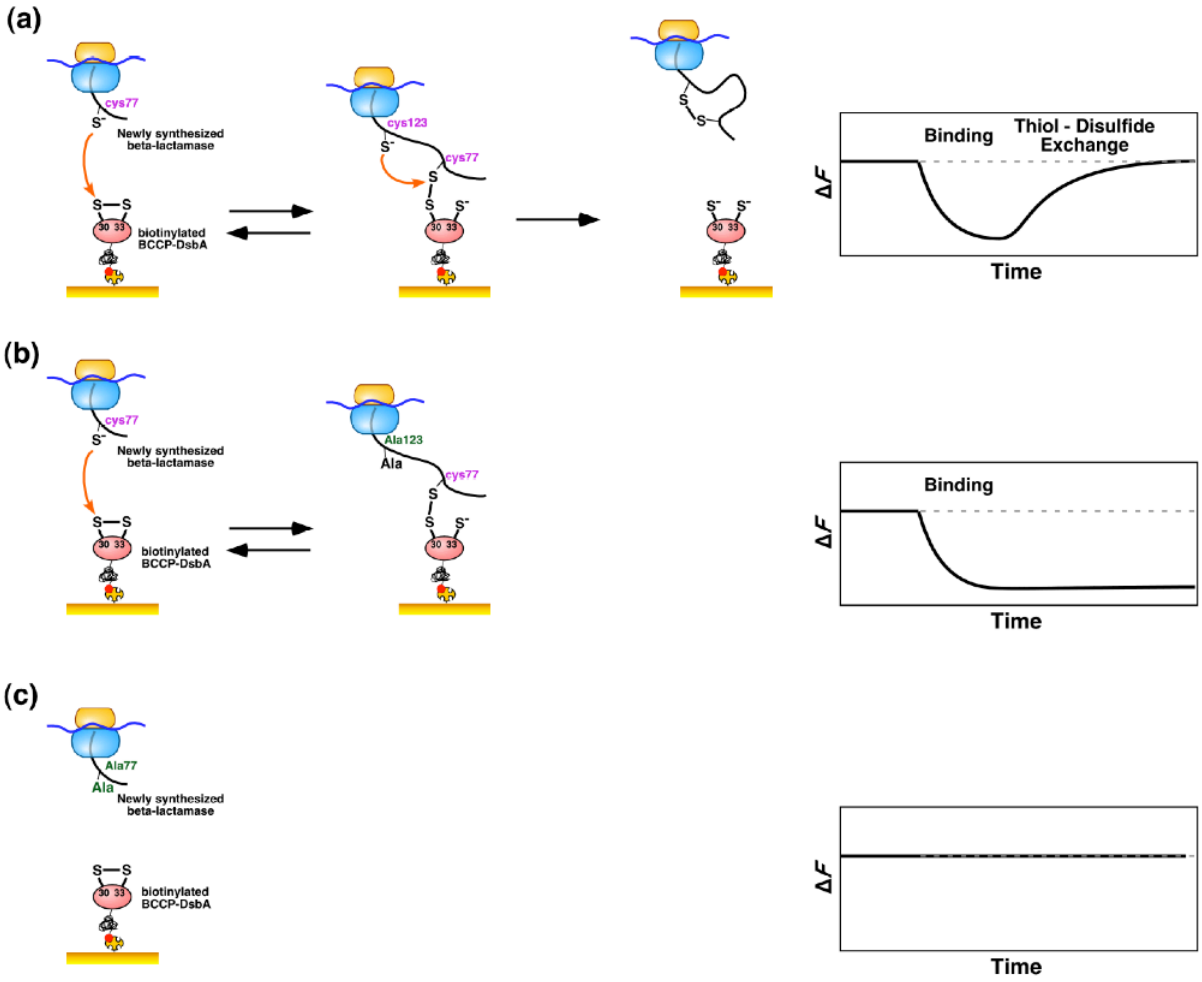


図 5-15 : PURESYSTEM を用いて発現させたβ-lactamase と QCM 金基板上に固定化した DsbA との予想される反応チャート

(a) : 野生型β-lactamase の場合、(b) : Cys123 を Ala に変異させた場合、(c)Cys77 と Cys123 を Ala に変異させた場合

さらに Cys123 を Ala にした変異体および Cys77 と Cys123 を共に Ala にした 2 変異体を QuikChange 法により作製した。QuikChange 法で使用したプライマーは、以下の通りである。

Bla C123A fwd primer

（配列：5’…CA GTA AGA GAA TTA GCC AGT GCT GCC ATA ACC…3’　）

Bla C123A rev primer

（配列：5’…GGT TAT GGC AGC ACT GGC TAA TTC TCT TAC TG…3’　）

Bla C77A fwd primer

（配列：5’…GC ACT TTT AAA GTT CTG CTA GCT GGC GCG GTA TTA TCC…3’　）

Bla C77A rev primer

（配列：5’…GGA TAA TAC CGC GCC AGC TAG CAG AAC TTT AAA AGT GC…3’　）

シークエンスを解読し、目的部位の変異が導入されていることおよび、不慮の変異が入っていないことを確認した。

(2) シグナル配列を持たないβ-lactamase の *in vitro* 転写用テンプレートの調製

以下の**図 5-16** のように PCR を行い、3 種類(native, C123A, C77AC123A)の *in vitro* 転写用のテンプレートを調製した。

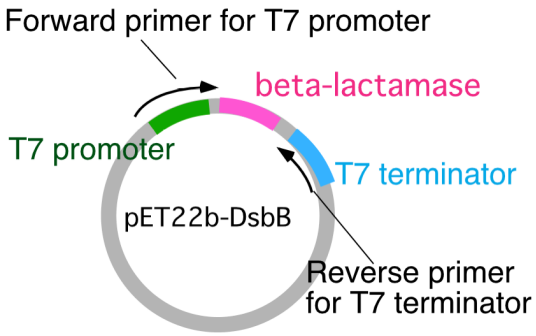


図 5-16：T7 promoter + β-lactamase 構造遺伝子領域の PCR 増幅

以下のような反応液を調製した。

Milli-Q 水	32 μL

10×buffer for KOD ver2	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
25 mM $MgSO_4$	3 μL
10 μM forward primer for T7 promoter （配列：5’–TAATACGACTCACTATAGGG–3’）	1.5 μL
10 μM reverse primer for T7 terminator （配列：5’–GCTAGTTATTGCTCAGCGG–3’）	1.5 μL
pET26b-β-lactamase(native)signal seq(–) plasmid（11.4 ng/μL）	1 μL
KOD-Plus	1 μL
Total	50 μL

上記の反応液について、

94 °C, 2 min 加熱後、

98 °C, 10 sec → 55 °C, 30 sec → 68 °C, 70 sec を 25 サイクル繰り返し、

4 °C で放置

というプログラムで PCR を行った。1%アガロースゲル電気泳動で PCR 産物を確認後、Qia quick PCR purification Kit (Qiagen)で精製し、吸光度測定を行い純度を確認した。

表 5-1 のように純度の高いテンプレート DNA が十分量回収できた。

表 5-1：T7 promoter + β-lactamase 構造遺伝子領域の PCR 産物の吸光度(20 倍希釈)

A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260} / A_{280}	A_{260} / A_{230}	収量
0.031	0.069	0.038	0	1.816	2.226	3450 ng

図 5-17 に示した 1%アガロースゲル電気泳動の結果から PCR 産物が確認できた。シグナル配列を持たないβ-lactamase(C123A)および(C77A, C123A)用のテンプレート DNA についても同様に作製した。

(3)　CUGA 7 *in vitro* Transcription Kit を用いた *in vitro* 転写反応

［実験操作］

CUGA *in vitro* Transcription Kit を用いて転写反応を行った。以下の組成で溶液を調製し、37 °C で 2 時間インキュベートした。その後 DNase Enzyme Solution を 2 μL 添加し、37 °C で 30 分反応させた。反応溶液を MilliQ 水で 50 μL にメスアップし、Microspin G-25 columns(GE 社製)を用いて精製した。得られたサンプルについて、吸光度測定を行い、1%アガロースゲル電気泳動を行った。

milliQ 水	6 μL
5 x Transcription Buffer	4 μL
0.1 M DTT	2 μ L
100 mM NTP	各 1.5 μL
pET26b-β lactamase (native) signal seq(–)	1 μL (0.21 pmol)
CUGA 7 Enzyme Solution	1 μL
計	20 μL

表 5-2 に吸光度測定結果を示した。純度の高い mRNA が PURESYSTEM での使用のために十分量得られた。

表 5-2：T7 promoter + β-lactamase 構造遺伝子の *in vitro* 転写後の吸光度(100 倍希釈)

A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260} / A_{280}	A_{260} / A_{230}	収量
0.203	0.420	0.206	0.006	2.070	2.102	83 μg

図 5-17 の 1%アガロースゲル電気泳動の結果より、バンドが 2 本観察された。RNA は高次構造をとりやすく、本来は変性アガロースゲル電気泳動を行うのが通常であるので、次に変性条件でのアガロースゲル電気泳動を行った。

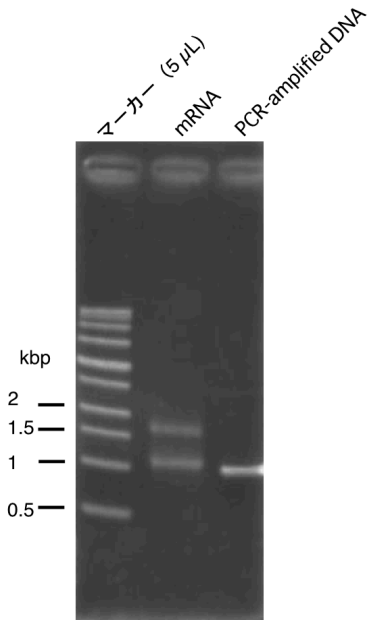


図 5-17：β-lactamase の *in vitro* 転写用テンプレートおよび転写後の 1%アガロースゲル電気泳動

EtBr 染色、Perfect DNA Markers 0.5~12 kbp(Novagen)を使用、mRNA とテンプレート DNA はそれぞれ 69 ng と 66 ng 分を泳動させた。

(4) 変性アガロースゲル電気泳動

2.2 M ホルムアルデヒド – 1%アガロースゲルの作製

0.5 g のアガロースと MilliQ 水 36 mL を三角フラスコに入れ、電子レンジで沸騰させた。三角フラスコにスターラーを入れ、穏やかに撹拌した。温度が 60 °C くらいになったところで、ドラフト内で、ホルムアルデヒド溶液 9 mL と 10 x MOPS buffer(200 mM MOPS-NaOH, pH 7.0, 20 mM NaOAc, 10 mM EDTA) 5 mL を添加した(温度が高い状態でホルマリンを加えると、ホルマリンが過剰に蒸発して危険なうえ、ホルマリンの実効濃度が下がってしまうので注意した)。そのまま撹拌を続けた。ドラフト内でゲルトレーに流し込み、固化させた。

RNA サンプルの調製

ゲルを固めているあいだに、PCR チューブで以下のサンプルを調製した。

10 x MOPS buffer	1 μL
ホルムアルデヒド溶液	2 μL
ホルムアミド	5 μL
mRNA	1 μL
0.2 mg/mL エチジウムブロマイド	1 μL

＊通常行うアガロースゲル電気泳動では、泳動した後にエチジウムブロマイドに浸漬(後染め)するが、変性アガロースゲル電気泳動の場合は普段行う後染めの方法では染色速度が大変遅かった(4 時間から 1 日要した)。そのため、上記のように、先染めする方が良いと思う。ただし、DNA 用の分子量マーカーは染色されにくい。

サーマルサイクラーで 55 °C, 30 分インキュベートした後、4 °C で 10 分冷却した。10 x RNA ローディングバッファー(50%グリセロール, 10 mM EDTA, 0.05 % BPB)を各チューブに 1 μL ずつ添加した。

電気泳動

10 x MOPS buffer を MilliQ 水で 1 x に希釈し、300 mL を泳動槽に満たした。ここに変性アガロースゲルをセットし、50 V の定電圧で 10 分プレ泳動させた。各サンプルをアプライした後、100 V の定電圧で泳動した。

図 5-18 に示したように変性条件でアガロースゲル電気泳動を行ったことで、β-lactamase 発現用 mRNA のバンドは 1 本になった。

5-5-2　PURESYSTEM で発現させたβ-lactamase の DsbA による S-S 結合形成の試み

PURESYSTEM の各因子には還元剤である DTT やβ-メルカプトエタノールを含んで調製されている。還元剤存在下では、β-lactamase と DsbA とのあいだにジスル

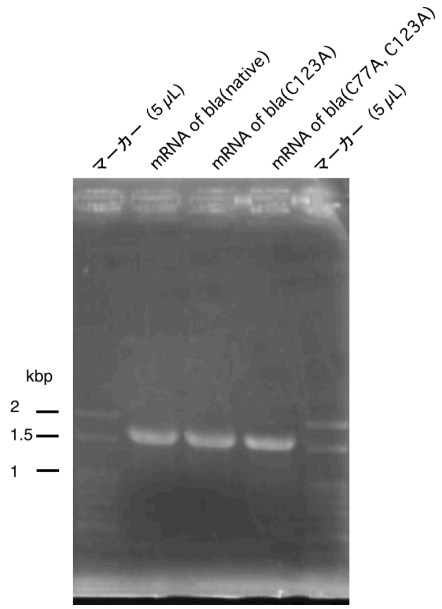


図 5-18：β-lactamase 発現用 mRNA の変性 1%アガロースゲル電気泳動

EtBr 染色、Gene Ladder100 (Nippon Gene)を使用、mRNA は native, (C123A), (C77A, C123A)でそれぞれ 2408 ng、2264 ng、2064 ng 分を泳動させた。

フィド結合が形成されても、直ぐに開裂してしまう恐れがあるが、今回は酸化型グルタチオンを共存させ、適度なレドックス環境になっていると”仮定”して実験を行った。

株式会社ジーンフロンティアから販売されている、ジスルフィド結合を有するタンパク質を PURESYSTEM で発現させるためのキット”PURE frex SS”には従来の還元剤 DTT を含んだ PURE 反応液に加えて、酸化的な環境を維持するための酸化型グルタチオンと、ジスルフィド結合の異性化に必要な DsbC が添加されている [4] ので、それを参考にした。反応は最初に、リボソームで翻訳されたβ-lactamase の Cys77 の S^-が DsbA の S-S を求核攻撃すると考えられるが、その際逆反応が起こると予想される。その逆反応の影響を抑えるために、反応は pH 6 で行った。

NeutrAvidin 固定化 QCM 基板に BCCP-DsbA(native)を 2000 Hz 分固定化した後の QCM セルを Q4 装置にセットした後、酸化型グルタチオン含有かつ DTT 非含有の

PURE Buffer (50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 6.0), 100 mM potassium glutamate, 13 mM magnesium acetate, 1.5 mM spermidine, 3 mM 酸化型グルタチオン) 430 μL で 3 回洗浄した。最後に 430 μL とって、400 μL 入れた。以下の溶液を調製した。

<Buffer Mix>		<Enzyme Mix>	
1 mM 19 amino acids	10.0 μL	IF1	1.1 μM
10 mM Cys	1.0 μL	IF2	0.14 μM
10×NTPs	10.0 μL	IF3	0.28 μM
PURE Buffer	12 μL	EF-Tu	2.5 μM
500 mM Creatin Phosphate	4 μL	EF-G	0.84 μM
1 μg/μL Folmyldonor	1.0 μL	EF-Ts	0.72 μM
tRNA Mix	11.2 OD/mL (数十 μM)	ARS	10-100 U
		Total	100 μL

＊Enzyme Mix 調製時には通常β-メルカプトエタノール入りの HT バッファーを使用するが、今回はβ-メルカプトエタノール非添加の HT バッファーを使用した。

Buffer Mix と Enzyme Mix を混合した。これらの組成の溶液のうち 50 μL をセルに添加した。残りの溶液には 12.3 μM の 70 S リボソームを 4.88 μL (終濃度 40 nM) 添加した。リボソームを加えた後、37 °C で 30 分間インキュベートした。セルに 50 μL 添加し、測定をスタートした。振動数変化が安定したところで、mRNA を終濃度が native については 36 nM, C123A については 34 nM, C77AC123A については 31 nM 添加した。

mRNA を添加しても反応に伴う振動数変化は観察されなかった。今回は pH 6 での結果を示したが、pH 7.6 の HEPES-KOH バッファー中で行っても振動数変化は観察されなかった(データは示していない)。今回の QCM の結果からだけでは、そもそも PURESYSTEM がきちんと機能しているかも分からないため、β-lactamase に対

する抗体を使用するなどして Western Blot を行い、β-lactamase が発現しているか確認することが必要と考えられる。また、mRNA が高次構造をとっているためリボソームとの複合体を生じにくいことも考えられる。mRNA を加熱後に急冷処理してから QCM セル内に添加するのも一案と思われる。

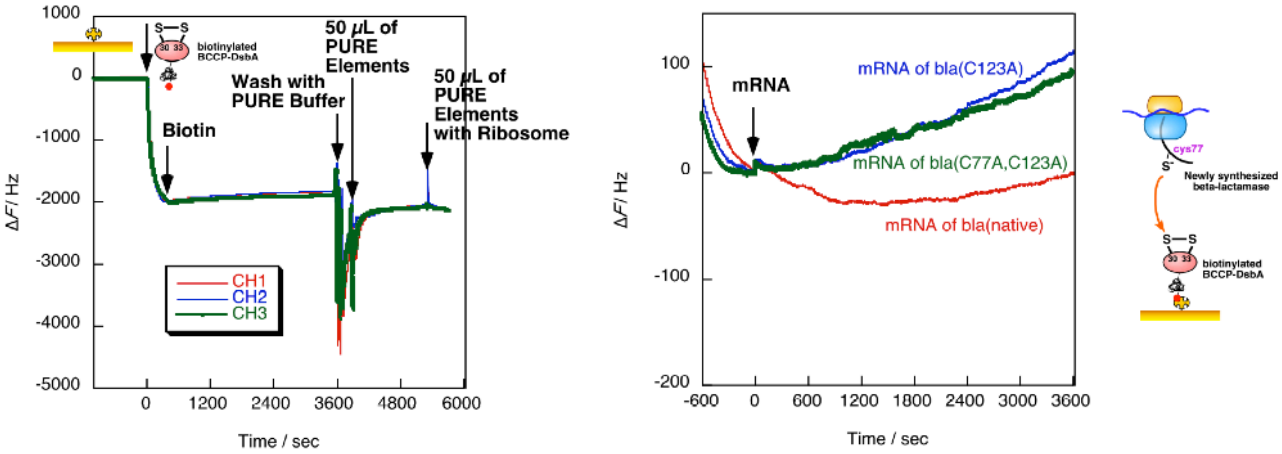


図 5-19 : BCCP-DsbA の QCM 基板への固定化(左)および PURESYSTEM を利用したβ-lactamase の発現(右)における QCM チャート

5-6　結言

本章では水晶発振子を用いて、DsbA による基質タンパク質への S-S 結合導入反応を観察することを目的とした。β–lactamase への DsbA による S-S 結合導入反応は、SDS-PAGE では確認できたものの、水晶発振子上で振動数変化として検出されず、β–lactamase が QCM 金基板に固定化した DsbA との結合した後の逆反応、もしくは β–lactamase の酸化反応速度が QCM のタイムスケール 1 秒 1 点よりも速いことが推察された。また、PURESYSTEM を利用して DsbA を翻訳させた場合にも QCM で振動数変化として検出されなかった。β-lactamase に対する抗体を使用して Western Blot を行い、β-lactamase が発現しているか確認することが必要と考えられる。PURESYSTEM 反応液に含まれるアミノ酸のシステインが還元剤として機能し、ジスルフィド結合形成を阻害していることも考えられる。PURESYSTEM 反応液に添加した 3 mM の GSSG は濃すぎることも考えられる。また、大腸菌細胞内では、リボソームによるタンパク質翻訳と DsbA による翻訳後修飾は内膜によって隔てられているので、これにならい、チューブ内で翻訳させたものを QCM セルに加えるのも良いと思われる。超遠心でリボソーム-mRNA 複合体単離することも可能である。

第 5 章 参考文献

1) 門倉 広、分泌タンパク質にジスルフィド結合を形成する仕組み、化学と生物 Vol.48, No.10 (2010).
2) C. Frech, M. Wunderlich, R. Glockshuber, and F. Schmid, *Biochemistry*, **35**, 11386-11395, (1996).
3) H. Kadokura, H. Tian, T. Zander, J. Bardwell, and J. Beckwith, *Science* **303**, 534–537 (2004).
4) PURE frex SS キット説明書, ジーンフロンティア (2012).

第 6 章　結論

本研究では、質量センサーである水晶発振子マイクロバランス(QCM)の基板上に膜タンパク質 DsbB を平面脂質二分子膜内に埋め込んだ形で配向固定化し、DsbA とのあいだで起こるチオール-ジスルフィド結合交換反応を質量変化で観察する実験系を構築した。また SDS-PAGE を用いて実際に生成する酸化型 DsbA の生成量も追跡した。DsbA および DsbB の変異体さらにはユビキノンを組み合わせて、DsbB による DsbA 酸化の各素過程についての動力学解析を行い、動力学パラメータの観点から反応機構の解明を行った。

第 1 章「序論」では、本研究の背景を概説し、目的を示した。

第 2 章 「水晶発振子に固定化した膜タンパク質 DsbB 上での DsbA との反応観察系の構築」では、QCM の基板上に膜タンパク質 DsbB を脂質二分子膜に埋め込んで配向固定化する方法を確立し、DsbA との反応観察を行ったことを示した。具体的には、DsbB の C 末端にビオチン化 BCCP タグを融合させることで、QCM 基板上に固定化した NeutrAvidin とアビジン-ビオチン相互作用で配向固定化を行った。さらに以前本研究室で検討された大腸菌脂質と界面活性剤の混合ミセルを用いた手法により DsbB の周囲を脂質膜で置換した。その後、DsbA との反応を観察し、動力学解析により結合、解離、酸化の各過程の速度パラメータを得る実験系を構築した。

第 3 章「DsbB による DsbA 酸化反応機構の解明」では、DsbA と DsbB の反応に伴い両者間で形成される中間体を QCM で質量変化として検出できる特性を利用し、

野生型 DsbB が DsbA と中間体を形成する場合と変異体 DsbB(C41A,C44A)が DsbA と中間体を形成できない場合の両者の反応動力学について比較した。その結果、DsbA と DsbB が安定な中間体を形成することで、形成しない場合と比べ、逆反応を約 60 倍防ぎ、DsbA 酸化の効率を大きく向上させていることが分かった。また、ユビキノンは DsbA と DsbB の反応動力学に影響を与えないことも分かった。

第 4 章「DsbB による DsbA 酸化反応の pH 耐性機構の解明」では、QCM を用いて DsbA と DsbB の反応時の pH 条件を種々に変化させて、動力学パラメータの pH-rate profile を求めた。さらに、SDS-PAGE を利用して酸化 DsbA の定量を各 pH 条件下で行った。その結果、DsbA と DsbB が安定複合体を形成することで、pH 3 から pH 10 までの pH にわたって DsbA の酸化効率を向上させ、さらに 1.5 pH 単位ほどアルカリ性側まで反応可能になったことが分かった。また、アルカリ性条件でもユビキノンは DsbA と DsbB の反応動力学に影響を与えないことも分かった。

第 5 章「DsbA によるタンパク質の酸化反応観察の試み」では、基質モデルとして S-S 結合を一つ有する TEM1 β-lactamase を用いて、QCM 上にアビジンを介して固定化した biotin-BCCP-DsbA との反応観察を行った。SDS-PAGE で DsbA による β-lactamase への S-S 導入反応を確認した後、QCM での観察を試みた結果、β-lactamase と DsbA の結合後に起こる逆反応および β-lactamase 分子内での求核反応が速く、β-lactamase と DsbA とのあいだで形成される中間体の滞在時間が短く、QCM での検出感度を超えていることが分かった。

DsbB による DsbA の酸化反応は酸化還元電位のパラドックスを含んでいることがこれまでに議論されてきた。DsbA は DsbB よりも酸化還元電位が高いにも関わらず、DsbB は DsbA を酸化するという事実は、両者の酸化還元電位からは説明で

きないものであった。これまで DsbB による DsbA の酸化反応機構では Pathway I と Pathway II の 2 つの経路が提唱されてきた。Pathway I は DsbA の Cys30 が DsbB の Cys104 を求核攻撃し、その後、DsbA の Cys33 の速やかな分子内求核反応により DsbA の酸化が達成される経路である。一方、Pathway II は DsbA の Cys30 による DsbB の Cys104 への求核攻撃の後、DsbB の Cys130 が DsbB の Cys41 を求核攻撃し、DsbB の Cys44 に電子が移動して、その後で DsbA の Cys33 による求核反応が進行する経路である。現在まで Pathway I または Pathway II のどちらで進行しているのか決着がついていない。これまでの多くの取り組みにも関わらず、反応機構を同定できない理由として 2 つ考えられる。1 つは DsbB を界面活性剤で可溶化した系で DsbA と反応させている点、2 つ目は SDS-PAGE や吸光度測定で解析がなされており、定量的な解析が難しいことである。本論文の第 3 章の QCM を利用した実験から、DsbB を界面活性剤で可溶化した場合は脂質二分子膜に埋め込んだ場合よりも DsbA との結合活性が 1/3 に低下することを確かめている。また、第 2 章において SDS-PAGE で DsbA と DsbB の結合活性の評価を行ったところ、DsbA 自身のダイマーや DsbA(C30A)と DsbB との結合などのアーチファクトが観察されたことから、SDS-PAGE では DsbA と DsbB のチオール基由来の特異的な結合を観察するのは困難と考えられる。また、従来の DsbA の酸化に伴う DsbA の Trp76 残基由来の蛍光の減少から反応を解析する手法では、DsbB 自身もトリプトファンを有しているため、DsbB を含む膜画分をそのまま使用する手法が採用されてきたが、界面活性剤中で行う実験系であり、また、DsbB の濃度を変化させることが困難であるため、動力学パラメータを求めることは困難であった。本研究では、膜タンパク質 DsbB を基板上に脂質二分子膜に埋め込んだ状態で配向固定化し、DsbA との反応中間体を質量変化としてリアルタイムで観察した。この技術はこれまでの膜タン

パク質研究で行われているミセルやベシクル系での解析に比べ、より *in vivo* に近く、定量的であり、膜タンパク質研究に貢献すると考えられる。結果として、DsbB による DsbA の酸化反応はこれまで議論されてきた Slow pathway が主で進行することが分かった。さらに、DsbB は自身が有する 4 つのシステイン残基を協奏的に反応させることで、逆反応を 60 倍抑制することで、DsbA の酸化を効率良く達成している機構が明らかとなった。

さらに本研究において、DsbB による DsbA の酸化反応が広い pH ロバストネスを実現していることのメカニズムを解明するため、QCM を用いて、DsbA と DsbB の安定複合体の形成と酸化された DsbA の解離を質量変化として観察し、得られたチャートの動力学解析から反応の動力学パラメータ k_{fwd}, k_{rev1}, k_{rev2}, k_{cat} を求め、pH-rate profile を描くことで各 pH における反応速度および対応する各システインの pK_a を求めた。その結果、DsbB は DsbA と結合後、自身の 4 つのシステイン間で相互にチオール-ジスルフィド結合交換させることで、DsbA との安定複合体を形成することが可能となり、逆反応を防ぐことで pH 3 から pH 10 の範囲で DsbA の酸化効率を向上させ、さらに逆反応の pK_a を 6.5 から 8.0 にシフトできたことで広い pH 応答性を実現していることが分かった。

近年 DsbB の結晶構造解析が多く得られており、DsbB 野生型の単独の結晶構造解析は未だ達成されていないが、DsbA や Fab 領域との複合体の形あるいは DsbA および DsbB の変異体を用いて達成されており、これらの構造的な知見は本研究の結果を支持している。DsbB の Cys130 はフレキシブルループ中に存在し、DsbA と結合後、速やかに DsbB の Cys41 の近くまで再配置することで逆反応を防いでいる可能性は稲葉らも言及している。また、DsbA の Cys30 と DsbB の Cys104 および DsbB の Cys130 と DsbB の Cys41 が共有結合でつながれた状態が安定なのは、DsbB

の Cys44 のチオレートアニオンと DsbB の Arg48 およびユビキノンとの電荷移動錯体の形成に起因することが提唱されてきた。本研究はこれまで構造的に明らかにされてきた DsbB による DsbA の酸化反応メカニズムに対し、動力学的な観点から反応機構をより確かなものにした。

DsbB による DsbA の反応機構については、pH の要素を考慮しなければいけなかった。第 4 章における SDS-PAGE の結果では、pH 3 ~ 10 の範囲において Slow pathway がメインで進行するが、酸性条件下においては Rapid pathway も少し進行し、塩基性条件下では Rapid pathway はほとんど進行しないことが分かった。

本研究では水晶発振子マイクロバランス法を用いて、動力学パラメータの観点から、DsbB による DsbA の酸化反応機構を解析した。平衡論的概念に加えて、動力学的概念が分かってこそ、正しく生体反応を理解することに近づけるのではないかと思われる。このような動力学パラメータに基づいた生体反応機構を考察する「動力学生物学(kinetic biology)」を提案したい。

本論文に関する発表論文

K. Yazawa, H. Furusawa, and Y. Okahata, **Mechanism of Thiol–Disulfide Exchange Reactions between DsbA and DsbB over a Wide pH Range.**, *Chem. Lett.,* **42**, 241-243 (2013).

その他の発表論文

S. Fornera, K. Yazawa, and P. Walde, **Spectrophotometric quantification of lactose in solution with a peroxidase-based enzymatic cascade reaction system,** *Anal. Bioanal. Chem.,* **401**, 2307–2310 (2011).

学会発表

本論文に関する学会発表

1) 矢澤 健二郎、古澤 宏幸、岡畑 恵雄
水晶発振子に固定化した膜タンパク質 DsbB 上でのジスルフィド結合交換反応の観察
第 90 回日本化学会春季年会 (近畿大学)、2010 年 3 月,口頭発表,*学生講演賞受賞*

2) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄
水晶発振子を用いた膜タンパク質 DsbB ジスルフィド結合交換反応の解析
第 25 回生体関連化学若手フォーラム, 2010 年 ポスター発表

3) Kenjiro Yazawa・Hiroyuki Furusawa・Yoshio Okahata
Molecular recognitions on membrane proteins-immobilized QCM
The Hong Kong University of Science and Technology William Mong Nano Seminar Series (2010) Oral

4) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄
水晶発振子を用いた膜タンパク質 DsbB ジスルフィド結合交換反応の解析
第 4 回バイオ関連シンポジウム, 2010 年, 口頭発表

5) Kenjiro Yazawa・Hiroyuki Furusawa・Yoshio Okahata
Direct monitoring of a disulfide-bond exchange reaction of DsbA on a DsbB-immobilized quartz-crystal microbalance,
Pacifichem2010, Oral

6) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄
水晶発振子を用いた大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成因子 DsbA-DsbB の pH 依存的反応機構
日本化学会年会, 2011 年 3 月, 口頭発表

7) Kenjiro Yazawa, Hiroyuki Furusawa, Yoshio Okahata
Kinetic Studies of Disulfide-bond Exchange Reactions on DsbB Membrane Proteins by Using QCM
EPFL-ETHZ-Tokyo Tech Joint Symposium, 2011 年 6 月, ポスター発表

8) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄
大腸菌タンパク質ジスルフィド結合導入システムの pH 依存的反応機構
第 21 回バイオ・高分子シンポジウム,2011 年 7 月, ポスター発表

9) Kenjiro Yazawa, Hiroyuki Furusawa, Yoshio Okahata
Monitoring of thiol-disulfide exchange reactions on DsbB membrane proteins immobilized on a QCM mass sensor
Global COE International Symposium 2011 Kyoto, 2011 年 7 月, ポスター発表

10) Kenjiro Yazawa, Hiroyuki Furusawa, Yoshio Okahata
Kinetic analysis of thiol-disulfide exchange reactions between DsbA and DsbB by using a mass sensor.
Summer School on “Biology up to frontiers with Chemistry and Physics” Strasbourg – France, 2011 年 8 月, 口頭発表

11) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄
水晶発振子を用いた大腸菌タンパク質ジスルフィド結合導入システムにおける動的な SS 結合交換反応機構の解明,
第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, ポスター発表, 2011 年 9 月

12) 古澤 宏幸・矢澤健二郎・岡畑 恵雄

大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成因子の活性評価(1)：反応機構の解明

第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月

13) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄

大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成因子の活性評価(2) : pH 変化に対する柔軟性

第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月

14) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄

水晶発振子基板上で膜タンパク質の反応を観察する

第 5 回 QCM 研究会, 2011 年 10 月

15) Kenjiro Yazawa, Hiroyuki Furusawa, Yoshio Okahata

Immobilization method of membrane proteins on biosensor for functional analysis

GCOE 国際シンポジウム, 2011 年 10 月

16) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄

DsbA と DsbB の間で起こるジスルフィド結合交換反応の pH 変化に対する柔軟性

第 34 回分子生物学会, 2011 年 12 月

17) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄

QCM の速度論解析に基づいた大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成システムの pH 柔軟性メカニズム

GCOE 成果発表会, 2012 年 1 月　*最優秀研究科長賞*

18) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄

大腸菌蛋白質ジスルフィド結合形成因子 DsbA の酸化還元反応機構

第 92 回春季年会, 2012 年 3 月

19) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄

膜タンパク質 DsbB 上の酸化反応の解析

QCM 研究会, 2012 年 8 月

20) Kenjiro Yazawa, Hiroyuki Furusawa, and Yoshio Okahata

Reconstitution of a DsbA-DsbB system introducing disulfide bonds to proteins in E.coli on a QCM mass sensor.

International Symposium on Advanced Biological Engineering (ISABE) 2012.10.25 ~ 29 Guilin, China　Poster　*This poster was selected as "Best Poster Award".*

21) 矢澤 健二郎・古澤 宏幸・岡畑 恵雄

大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成システムの電子伝達機構の解明

第 93 回春季年会, 2013 年 3 月　予定

その他の学会発表

22) 矢澤健二郎、与那嶺雄介、川崎剛美、岡畑恵雄

DNA 化学修飾をめざしたアジリジニウム誘導体によるリン酸のエステル化

第 88 回日本化学会春季年会 (立教大学)、2008 年 3 月

23) Kenjiro YAZAWA, Yusuke YONAMINE, Takayoshi KAWASAKI, and Yoshio OKAHATA

A covalent modification of DNA phosphate groups using cyclic quaternary ammonium cations

1st International Graduate Symposium on Biotechnology,Bioengineering and Biomedical Science（清華大学)、2009 年 3 月

謝辞

本研究を進めるにあたり、熱意あるご指導、ご鞭撻を賜りました東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻 岡畑 恵雄 先生、ならびに森 俊明先生に深く感謝致します。

論文審査にあたりまして、久堀徹先生、田口英樹先生、上野隆史先生、小倉俊一郎先生にご指導戴き、御礼申し上げます。

本研究において、直接のご指導、ご助言をいただきました同大学院生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻 古澤 宏幸 先生に深く感謝致します。

岡畑・森研究室での 6 年間は”実践の時”でした。学生に対し、自分の背中で示し、何事も「やってみろ！」という岡畑先生に指導して戴き、自由でした。9 時から 21 時まで厳しい研究室といわれながら、実際には、一番学生想いの研究室だったと感じます。

本実験で直接のご指導をして戴いた、古澤先生に感謝致します。博士論文としてまとめることができたのは古澤先生のおかげです。いつも優しく、実験の核心を冷静につかむところは、私自身もこれから努力し身につけたいです。

研究室の全ての皆様に感謝致します。

最後になりますが、いつも私を見守ってくれた大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成因子 DsbA と DsbB に感謝致します。

2013 年 3 月