



リゾチーム2SS[6-127,64-80]変異体のS-S結合再生過程の研究

再生過程に対するグリセロールの影響

Effects of glycerol on disulfide regeneration processes of
2SS[6-127,64-80] variants of lysozyme.

- 岡本邦彦¹、野田康夫¹、橘 秀樹²、瀬川新一¹(¹関学大・理工、²神戸大・理)

Introduction



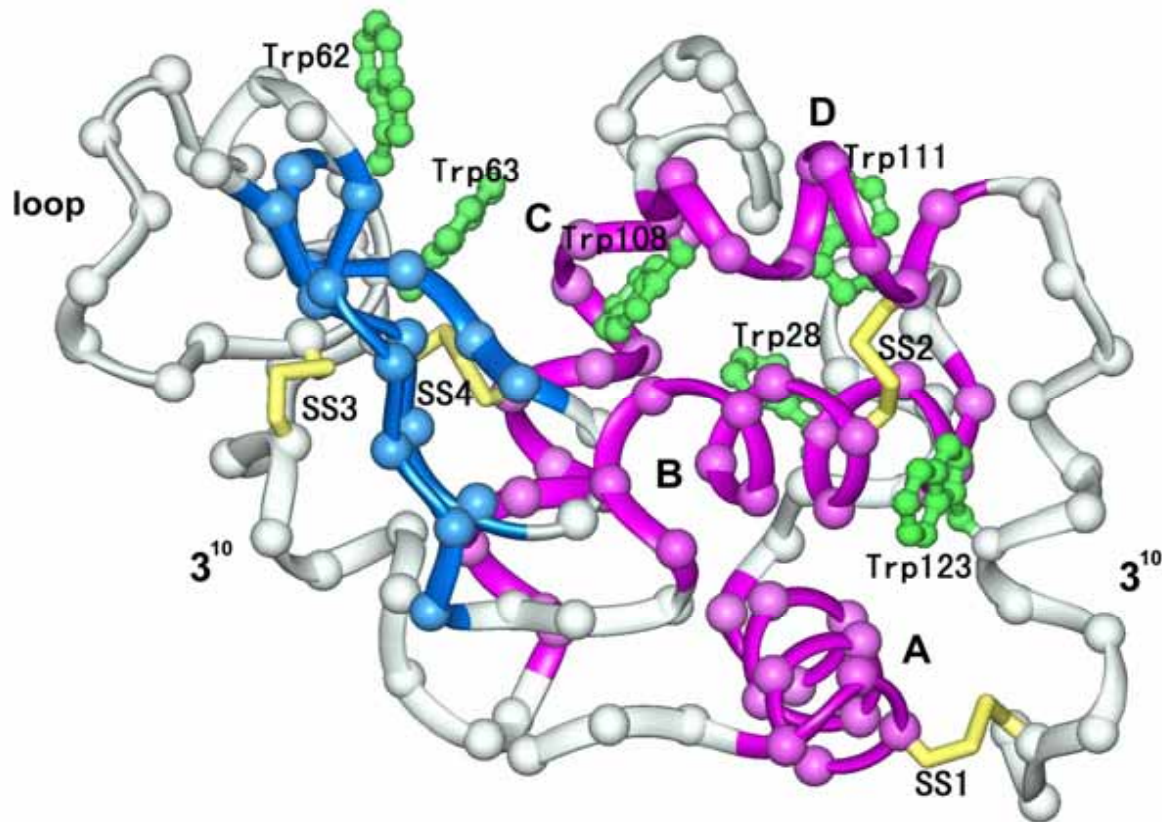
私たちはタンパク質の折りたたみを明らかにする為に、ニワトリ卵白のリゾチームの変異体を用いて研究を行っている。今回私はタンパク質の折りたたみをS-S結合再生反応のプロセスから追跡した。

今までに、4本のS-S結合を持つ天然リゾチームのS-S結合再生過程は詳細に研究されているが、今回はC30-C115結合とC74-C96結合をAla置換によって欠損させた2SS[6-127,64-80]変異体を用いることで、再生反応途中に現れる非天然型S-S結合再生中間体の数を減少させて、反応径路を単純化させる工夫をした。

この2SS変異体は既にnear-UV CDやNMRスペクトルの測定によって、通常は3次構造を失っていることが分かっている。しかし、我々はこの変異体にグリセロールを加えると、3次構造が大きく回復するという実験結果を得ている。

従って、グリセロールが共存する場合としない場合で、S-S結合再生過程がどのように異なるのかを追及することがこの実験の目的である。

Ribbon diagram of Hen-Egg Lysozyme

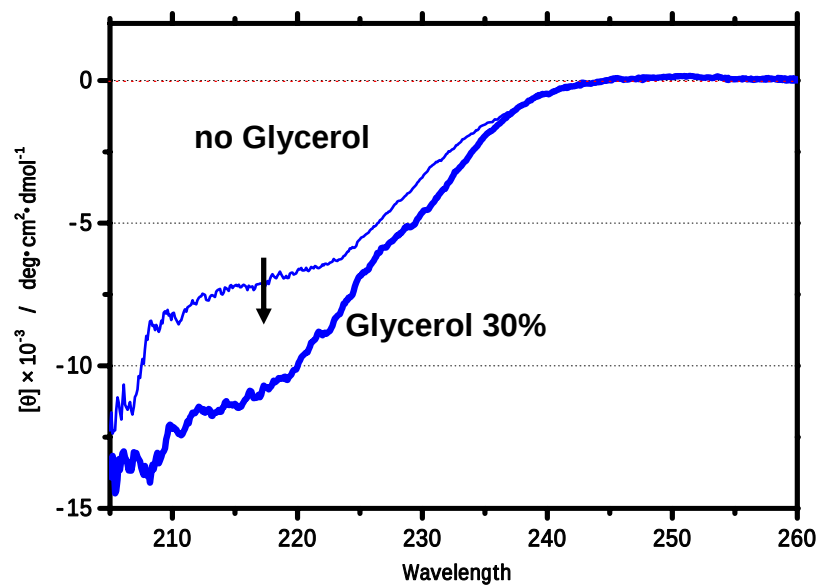


X線結晶解析により決定されたリゾチームの立体構造(PDB 6LYZ)。黄色のSS1からSS4は4本のS-S結合、緑の側鎖はリゾチームに存在するTrp残基である。ここで研究された2SS[6-127,64-80]変異体とは、上の図中のSS1結合とSS3結合が存在して、SS2結合とSS4結合が欠損したものである。

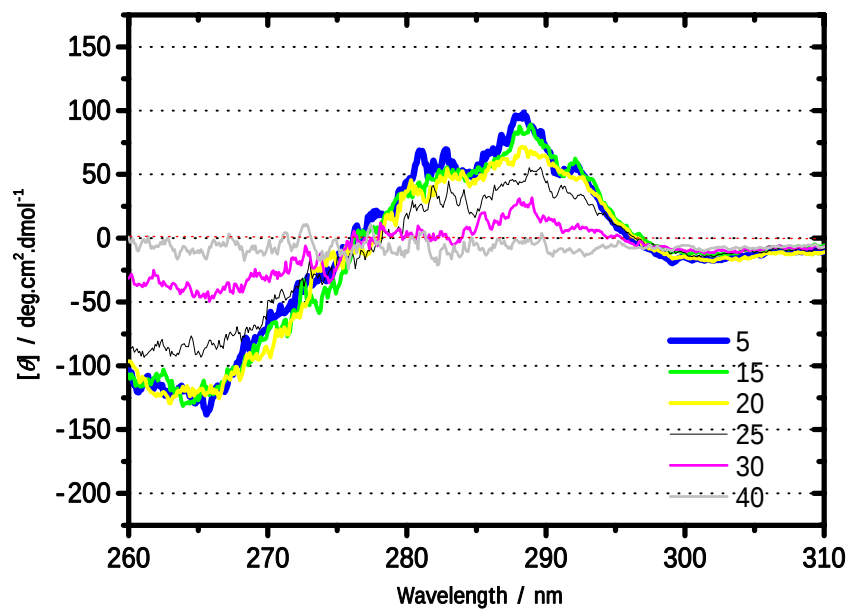
2SS(1+3) CD spectrum



2SS(1+3) Glycerol存在下での
far-UV CD スペクトル (pH3)



2SS(1+3) Glycerol存在下での
near-UV CD スペクトル (pH3)



MATERIALS and METHODS



再生反応後、HPLCで分離させる工程を入れる？

1. SS結合再生反応

分子内のSS結合を酸化型、還元型のグルタチオンを用いて回復させる。終了後、すぐにモノヨード酢酸でカルボキシメチル化

2. 酵素分解

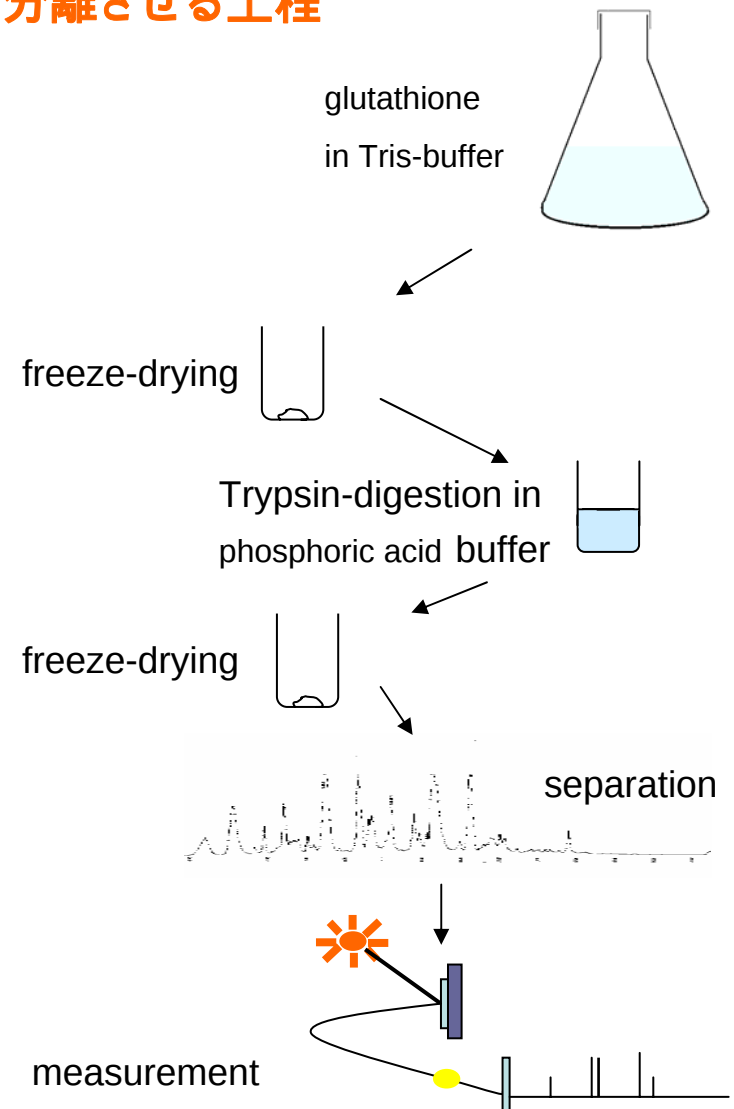
Trypsinでタンパク質を加水分解し、peptide断片状に切る
(sample:pepsin=100:1)

3. HPLC

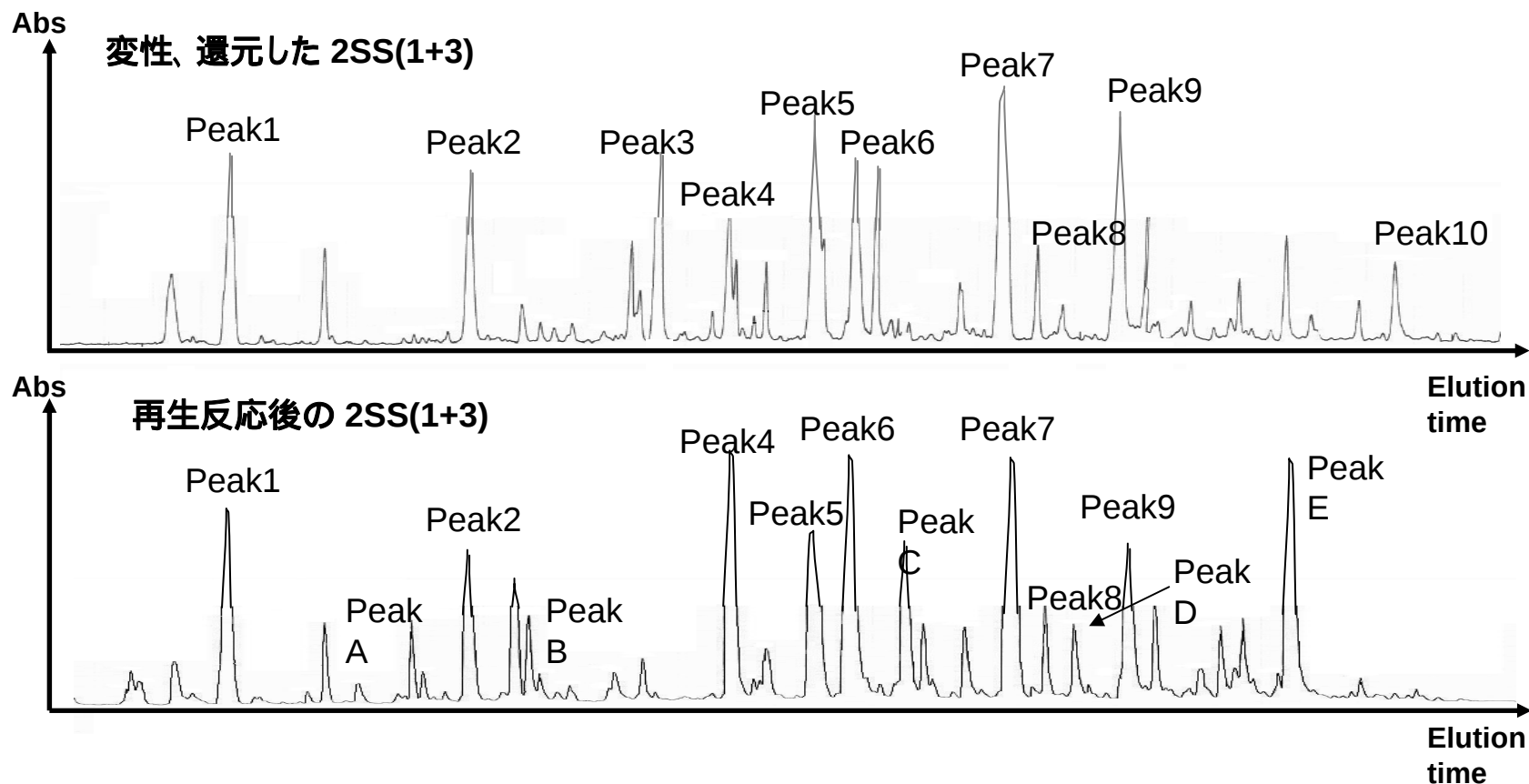
peptide断片のmixtureを1種ずつに単離する

4. MALDI-TOF-MS

分子量を測定し、理論値との比較からpeptide断片を同定する

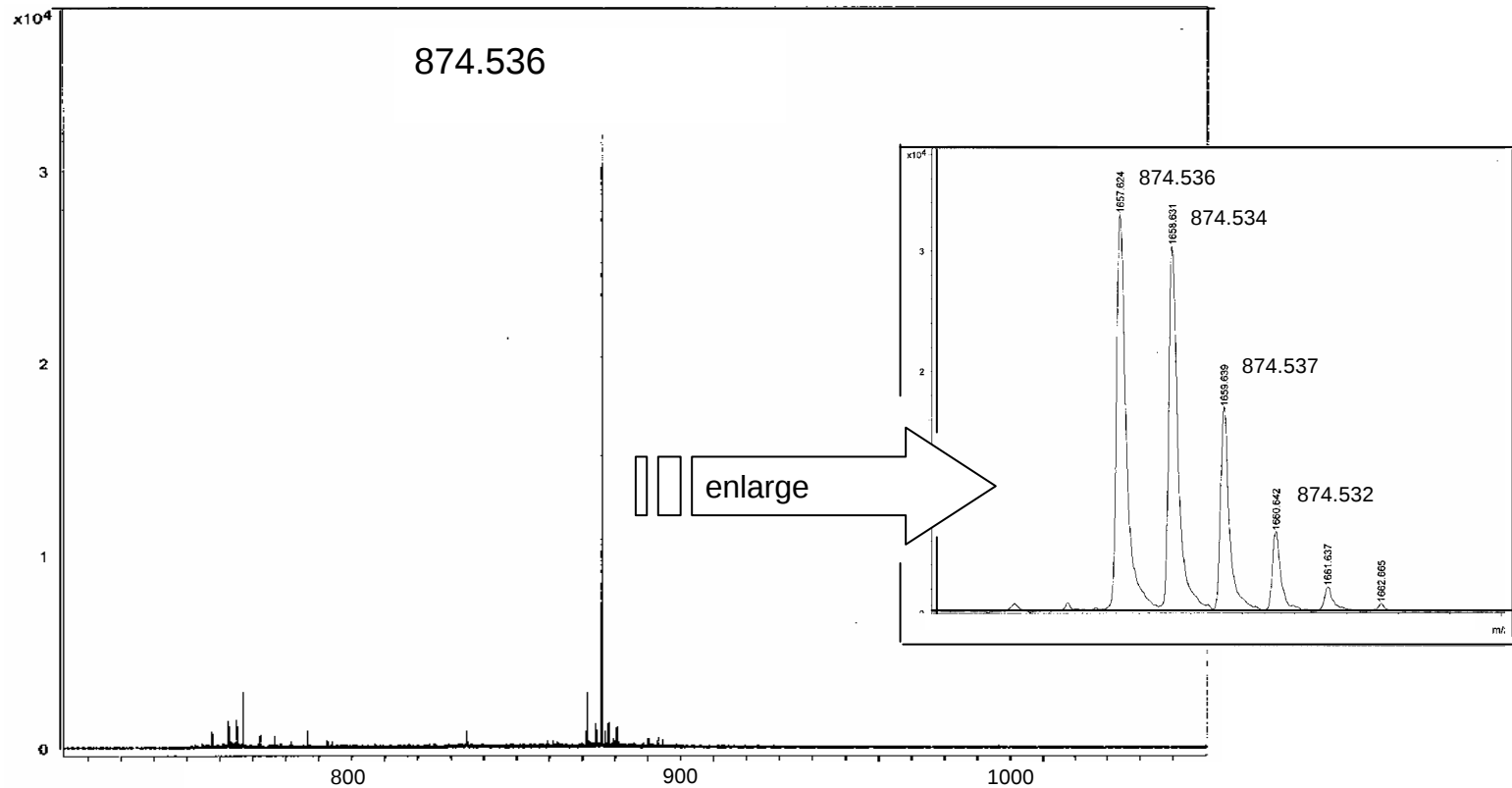


HPLC separation of tryptic digestion of regenerated lysozyme



図は2SS(1+3)変異体をTrypsin分解し逆相カラムで分離したときのelution patternである。上図は完全に変性した2SS(1+3)変異体で、下図は1mMGSSGを用いて再生反応を行った2SS(1+3)変異体である。2つを見比べるとSS結合が形成されたことを表すピークが新たに出現していることが分かる。

Mass-Spectrum Peak1



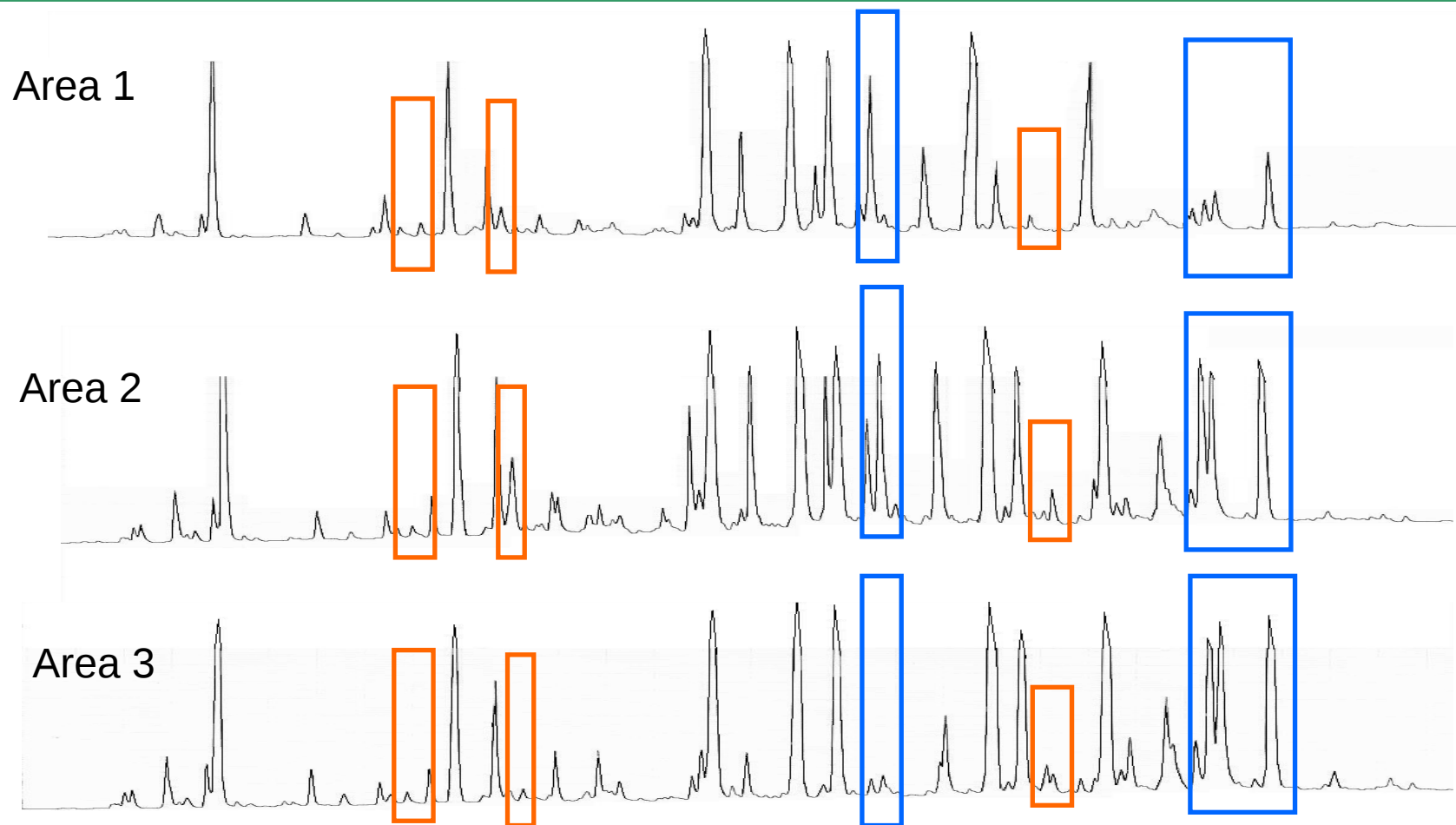
この図は、Peak 1を実際にMassで測定した際に得られたMass spectrumである。横軸は質量/電荷、縦軸はイオン強度である。MALDI-TOF-Massでは同位体由来のピークがいくつか出るが、peptideの同定にはMono-isotopic massを使用している。



Assignment of peptide fragments by mass spectra

	observed mass	theoretical value	Peptide fragment	SS-bond
1.	874.536	874.417	H15-R21	
2.	1428.642	1428.651	F34-R45	
3.	936.303	936.379	W62-R68	
4.	1244.747	1244.675	A115-R125	
5.	1045.767	1045.543	G117-R125	
6.	1753.832	1753.836	N46-R61	
7.	1236.653	1236.638	G22-K33	
8.	1803.830	1803.896	K97-R112	
9.	1675.875	1675.801	I98-R112	
10.	2273.134	2273.181	N74-K96	
Fragments including SS-bond				
A.	1268.402	1268.529	(W62-R68)+(G126-R128)	C64-C127
B.	1925.779	1925.881	(C6-R14)+(W62-R68)	C6-C64
C.	1627.758	1627.781	(V2-K13)+(G126-R128)	C6-C127
D.	2605.339	2605.331	(N74-K96)+(G126-R128)	C80-C127
E.	3206.668	3206.656	(W62-R68)+(N74-K96)	C64-C80

Peptide maps of tryptic digestions of lysozyme included in each area



これらの図は0.1mMGSSGで再生を行った後のHPLC elution pattern を3つのareaに分けてTrypsin分解したものを再びHPLCで分離したelution patternである。Areaによって形成されているSS結合に差があることが見て取れる。

Appearance of SS-bond in each area of HPLC elution pattern



	Area 1	Area 2	Area 3
C6-C127	○		×
C64-C80			
C6-C64		○	×
C6-C80	×	×	×
C64-C127		×	×
C80-C127			×

上の図はそれぞれのAreaでTrypsin分解した結果見つかったSS結合を表にしたものである。Area 3はC64-C80だけが強く現れており、SS3だけが架かった1SS体である。また、Area 2にはC6-C127、C64-C80が強く現れ、nativeな2SS体が存在すると思われる。それと同時に、C6-C64、C80-C127も発見されているので、これらの架け間違えたSS結合も形成されている。Area 1ではnativeな2SS体も混在しているが、存在比率がC64-C80に比べてC6-C127の方が多いことから2SS体のみであると断定することはできない。また、架け間違いのSS結合もわずかに発見されており、それらを含んだ1SS体、2SS体の存在も示唆する結果となっている。

Summary



ペプチドマップ上でSS結合の架け間違いを発見することができた。

0.1mMGSSGでの再生は、SS結合再生反応のごく初期の段階を調査することに対応する。再生が終了した時点で完全変性したタンパクは無くなっている。SS3(C64-C80)を多く見つけることができた。これは、この2つのCysが1次配列的に他のCysより非常に近いことから当然と考えられる。しかしながら、SS3が架かったもののうちの多くがSS1(C6-C127)が架かっていない1SS体の状態のまま残っている。これは再生反応のごく初期の段階で形成されるSS3はnativeな3次構造を形成するには相応しくない状態、つまりnativeな構造になりにくい状態でSS結合を形成していたことを表すものと思われる。

また、1SS体に比べて少量ながら、nativeな構造を持った2SS体(C6-C127,C64-C80)や架け間違えた2SS体(C6-C64,C80-C127),(C6-C80,C64-C127)を部分的に発見することができた。SS結合の架け替えが非常に起こりにくい環境においても正しいSS結合を形成するタンパクも存在するということである。