

4P-084

変性したプロテイン A の構造解析 : CW とパルス ESR 法

(東北大多元研¹⁾、東大院²⁾ 阿部 淳¹⁾、新井 宗仁²⁾、高橋 聡¹⁾、大庭 裕範¹⁾、山内 清語¹⁾

A Structural Analysis of Denatured Protein A: CW- and Pulsed ESR

(IMRAM, Tohoku Univ.¹⁾、Tokyo Univ.²⁾ Jun. Abe¹⁾、Munehito Arai²⁾、Satoshi Takahashi¹⁾、Yasunori Ohba¹⁾、Seigo Yamauchi¹⁾

【序】 タンパク質フォールディングの分子機構を理解することで、未知タンパク質の構造予測やフォールディング病の対策など多くの応用が期待できる。アミノ酸 100 残基以下の単一ドメインからなるタンパク質のフォールディングは、天然状態と変性状態の二状態の平衡で示される (図 1)。ここで、変性状態におけるタンパク質は、ランダムコイルの性質を持つと考えられていた[1]。しかし、近年になって変性状態における残余構造の存在を示唆する報告[2, 3]が多くなされるなど、ランダムコイル仮説に対する疑問も投げかけられている。このように変性状態の構造の解明はフォールディングの出発点を理解し、変性したタンパク質の精密なモデル化のために非常に重要である。本研究ではフォールディング機構が良く知られているプロテイン A の B ドメイン(BDPA) [4-6]を対象として、CW-ESR とパルス ESR (二量子コヒーレンス ESR) を用いて変性状態の構造研究を行った。

【実験】 BDPA の 1 ヶ所にシステイン変異を導入した Y15F/A55C 置換体と 2 か所にシステイン変異を導入した Y15F/N22C/A55C 置換体にスピンラベル剤を反応させて、シングルラベル体 (A55C) とダブルラベル体 (N22C/A55C) を作成した (図 1 に示した部位にラベル化)。このときシングルラベル体の BDPA 濃度は 15~35 μM 、ダブルラベル体の濃度は 42~70 μM と Bradford 法より定量した。変性剤濃度 0 M のタンパク質は 150 mM の NaCl を含む pH 7.0 の MOPS 緩衝溶液で測定し、変性タンパク質の測定には 0.5~5 M の変性剤 (塩酸グアニジウム塩、GdmCl) を加えた。変性剤を含んだ緩衝溶液への交換は Sephadex G-25 desalting column を用いてゲルろ過により交換した。CW-ESR スペクトルの測定には、JEOL の X バンド (9.5 GHz) CW-ESR 装置 (JES-FE2XGS) を用いて室温で測定した。また二量子コヒーレンス ESR の測定は、JEOL と共同で開発した Ku バンド (17.5 GHz) パルス ESR 装置を使用し、6 パルス系列で 64 ステップの位相サイクルを用いて 50 K で行った。

【結果と考察】 室温でのシングルラベル体の CW-ESR 測

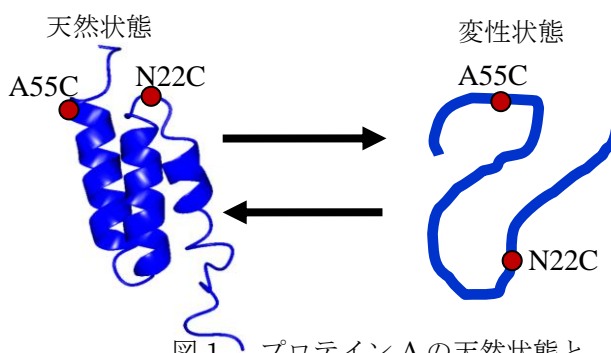


図 1 プロテイン A の天然状態と変性状態の二状態平衡

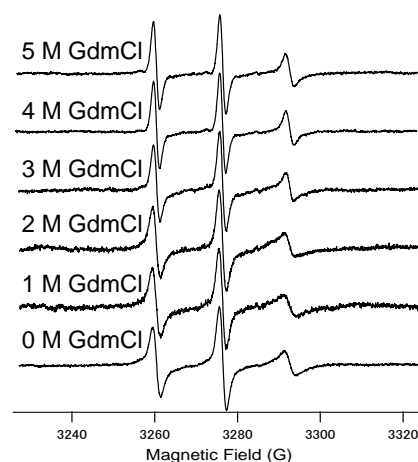


図 2 CW-ESR スペクトルの変性剤濃度依存性

定結果を図 2 に示す。CW-ESR の線幅解析から、GdmCl 0~2 M に比べて 4~5 M の線幅が小さくなり、この原因はタンパク質主鎖の運動性が大きくなったことに起因していると考えられる。また GdmCl 4~5 M の範囲で線幅に変化がなかった。スペクトルの線幅解析より変性剤濃度に対して線幅をプロットした結果は既報の円二色偏光の結果[5]と良い一致を示した。

ダブルラベル体での二量子コヒーレンス ESR (測定温度 50 K) の結果から GdmCl 0 M では、わずかに双極子相互作用による振動が見られた (図 3a)。一方で GdmCl 1~5 M では (図 3c) 明瞭な振動が見られなかった。これは、幅広い距離分布を持つことを示している。また GdmCl 1~5 M の間でほとんど変化がみられなかった。GdmCl 0.5 M では (図 3b) 早い成分と緩やかに減衰する成分の重ね合わせになっている。このことから GdmCl 0.5 M では GdmCl 0 M と 1~5 M での双極子変調の重ね合わせになっていると示唆される。二量子コヒーレンス ESR での変性中点は 0~1 M の間であり、既報の円二色偏光より得られた変性中点[4]に比べて小さくなっている。この原因は二量子コヒーレンス ESR では 50 K で測定を行うため試料を凍結する必要があり、それにより低温変性した可能性、あるいは凍結することにより変性剤濃度が局所的に増加した可能性が推測される。GdmCl 0 M で距離分布解析を行うと二つの距離成分が現われ、2つのガウス関数のフィッティングからそれぞれ平均距離が 1.51、2.18 nm であり、距離分布は 1.00、0.41 nm

であった。既報の NMR 構造[6]で主鎖の構造が異なる構造を基にしてスピンラベル側鎖だけを動かして計算した値との比較から、タンパク質の主鎖の構造の違いにより距離分布が二成分になると示された。GdmCl 5 M の実測と比較するために、ランダムコイルを仮定した距離分布での双極子変調を計算した。このとき計算した双極子変調は擬似永年項を入れた一次元の二量子コヒーレンス ESR のエコー信号である[7]。ランダムコイルモデルは理想鎖と非理想鎖の二つを考えた。理想鎖、非理想鎖を仮定した場合、共に実測よりも早い減衰となり、実測よりも短い距離の成分が多いことが示された。このことから GdmCl 5 M では理想鎖や非理想鎖とは異なる広がった構造を取っていることが示唆される。また GdmCl 0 M の距離分布関数が重なる領域が小さいため、変性状態は天然状態とは異なる構造であると考えられる。GdmCl 5 M と GdmCl 1~4 M では二量子コヒーレンス ESR の結果が同じであることから、この濃度領域で同様の構造を取っていることが推測される。

【参考文献】 [1] C. Tanford *et al* (1966) *JBC*, **241**, 1921, [2] D. Shortle *et al* (2001) *Science*, **293**,487, [3] E. Sherman and G. Haran (2006) *PNAS*, **103**, 11539, [4] F. Huang *et al* (2009) *Biochem.* **48**, 3468, [5] S. Sato *et al* (2006) *JMB*, **360**, 850, [6] S. Sato *et al* (2004) *PNAS*, **101**, 6952, [7] S. K. Misra *et al* (2009) *Appl. Magn. Reson.* **36**, 237,

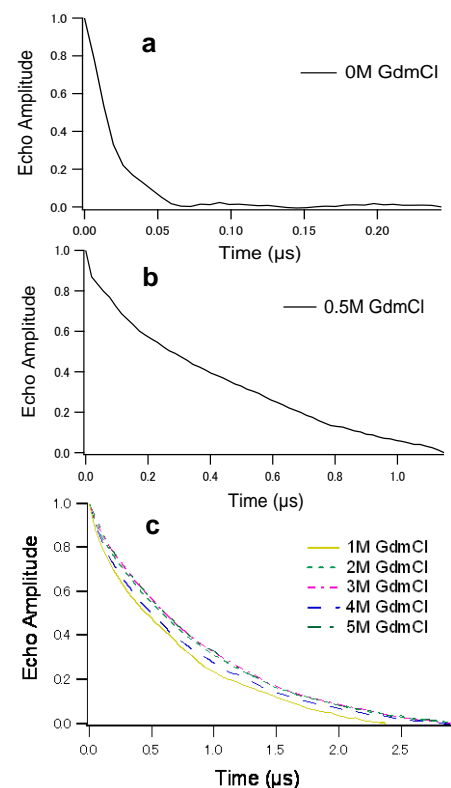


図 3 二量子コヒーレンス ESR の測定結果 ; a. 変性剤濃度 0 M ; b. 変性剤濃度 0.5 M ; c. 変性剤濃度 1~5 M