

ヒトガレクチン1の酸化構造変化の時間分解計測

¹東北大院薬, ²台湾交通大学○黒井 邦巧¹, 黒田 剛¹, 平松 弘嗣², 中林 孝和¹

Time-resolved study of the oxidative structural change of human galectin-1

○Kunisato Kuroi¹, Tsuyoshi Kurota¹, Hirotsugu Hiramatsu², Takakazu Nakabayashi¹¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan.²National Chiao Tung University, Taiwan

【Abstract】 Proteins are often subjected to an oxidative modification in vivo to form inter- or intramolecular disulfide bonds to regulate their structure. Although this process is a fundamental event for proteins, the structural change due to these disulfide linkages has not been studied from the view point of the dynamics. In this study, we investigated the conformational change of human galectin-1 (hGal-1) by the formation of its intra-molecular disulfide bonds in a time-resolved manner using FTIR spectroscopy. The formation of disulfide bonds were caused by light with utilizing the modification of cysteine residues of hGal-1 by a nitric oxide (NO) and its photo-dissociation reaction. From the light-induced different IR spectra after the photoexcitation of hGal-1, we succeeded in observing the dynamics of the structural change of hGal-1 caused by its intramolecular disulfide linkages.

【序】 タンパク質分子の多くは、ジスルフィド結合形成によって、分子内または分子間架橋による修飾を受ける。しかしながら、ジスルフィド結合形成によるタンパク質分子の構造変化が、どのような反応ダイナミクスで起こるのかについて、これまであまり研究されてこなかった。我々の研究グループでは、最近、一酸化窒素(NO)の光解離を用いて、光を用いてジスルフィド結合を形成させる研究を行っている。すなわち、まず、システイン残基のチオール部(-SH)に NO を付加して、ニトロソ体(-SNO)とする。さらに、340 nm 付近の紫外光の照射によって、NO を光解離させることで、硫黄ラジカル(-S·)同士の結合を介してジスルフィド結合が形成される。この技術を用いれば、酸化剤などと混合することなく、非接触で光をトリガーとしてジスルフィド結合形成を引き起こすことができ、ジスルフィド結合形成に伴う分子構造変化の分光計測が容易に可能である。

ヒトガレクチン 1(hGal-1)は、糖結合タンパク質の1つであり、**Fig. 1**のように主にβシートからなる球状タンパク質である。このタンパク質はダイマーを形成し、各サブユニットのそれぞれに、ラクトースなどの糖を結合する部位を持つ。この hGal-1 は、分子内に6つのシステイン残基を持つ。酸化的環境では、これらは3組のジスルフィド結合を形成し、hGal-1 は構造変化を起こして糖結合活性を失うことが、これまでの研究から知られている。本研究では、上述のジスルフィド結合の光形成技術により、この hGal-1 の構造変化を光で起こして、赤外分光法から構造変化のダイナミクス計測を行った。

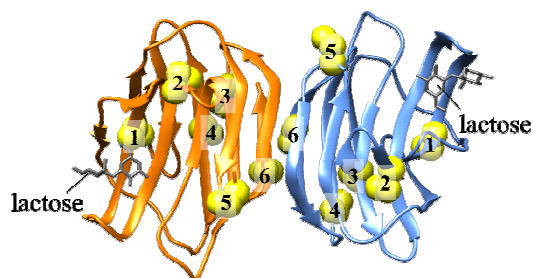


Fig. 1 The dimer structure of the human galectin-1 (hGal-1). Each subunit is shown by blue and orange colors. Yellow numbered spheres (1-6) show six cysteine residues, and bound sugar molecules are shown by gray stick model.

【方法 (実験・理論)】 hGal-1 は既報に従い、大腸菌内で発現させて精製した。hGal-1 のシステイン残基への NO の付加は、hGal-1 のシステイン残基(R-SH)と他のニトロソ基を持つ化合物(R'-SNO)との間の置換反応によって行うことが可能である。すなわち、 $R-SH + R'-SNO \rightarrow R-SNO + R'-SH$ というように、NO がシステイン残基間で移動する。ここでは、R'としてメタロチオネイン(MT)という、分子内にシステイン残基を 20 個持つ小タンパク質を用いて効率的に置換反応を行った。MT は強酸性でも安定なタンパク質であり、MT 自身への NO の付加は亜硝酸ナトリウムを用いて直接的に行える。NO を付加した hGal-1 は純水に溶解させ、赤外光の窓材であるフッ化カルシウム板上に滴下して、フィルム状に乾燥させた。さらにフィルム周囲に、30%グリセロールの液滴を滴下して密閉することで、適度な水和環境を保った。このようにして作成したものを、赤外分光測定用の試料セルとした。

赤外分光測定には、Bruker Optics 社製の真空型の赤外分光器を用い、NO を付加した hGal-1 の光励起には、Nd-YAG レーザーの 3 倍波 (355 nm) を用いた。試料の温度は、試料セルのセルホルダー内部に水を循環させることで、室温に保った。後述するように、NO の光解離とそれに伴う hGal-1 の構造変化は、量子収率が低く、反応速度も遅かったため、1 励起パルスごとの光誘起赤外差スペクトルを積算することは困難であった。そこで、本研究では 10 Hz で励起パルスを 5 分間照射した後、光誘起赤外差スペクトルの時間変化を追跡することで、この困難の解決を図った。このようにして得られるスペクトルの時間変化は、各励起パルスによる光反応に由来する信号変化が、0.1 秒ごとに遅れて多数重なったものになる。しかし、観測される速度は、各光反応のものと同様に近似的に等しくなることが分かっている。

【結果・考察】 Fig. 2(a)に 5 分間の光照射後の赤外差スペクトル、およびその光照射後の時間変化を示す。Fig. 2(a)の amide I の領域において、 1628 cm^{-1} の負のピークは β シート構造に由来し、 1665 cm^{-1} はターン構造に由来すると考えられる。ジスルフィド結合形成により、 β シート構造が失われることは、これまでの先行研究からも言われており、Fig. 2(a)の差スペクトルはガレクチンの酸化的構造変化に由来すると考えられる。Fig. 2(b)には amide I 領域における正と負の特徴的な波数における強度の時間変化を示しており、構造変化が 10 分程度の時定数で起きていることが分かる。このように本研究で、hGal-1 のジスルフィド結合形成による構造変化を時間分解で捉えることに初めて成功した。討論会においては、より詳細に結果の検討を行う。

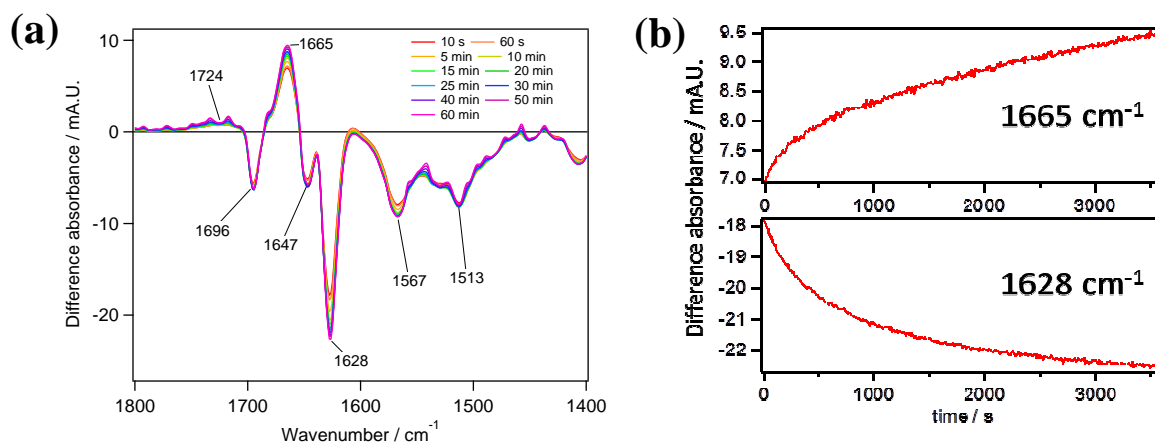


Fig. 2(a) Time dependence of the light-minus-dark difference IR spectra of hGal-1 after the 5 min irradiation of the UV light. Each time (s or min) corresponds to the time after the irradiation. **(b)** Time development of the difference IR intensity at 1665 cm^{-1} and 1628 cm^{-1} in (a).