

DTT 添加によるブタ PDI-P5 の X 線照射ダメージの軽減

Decrease in radiation damage of porcine PDI-P5 by DTT

太田賢志、木村雄大、佐藤祐透、米澤直人*

千葉大学大学院理学研究科, 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33

Satoshi Ohta, Yudai Kimura, Yuto Sato, Naoto Yonezawa*

Graduate School of Science, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522

1. 緒言

PDI (protein disulfide isomerase)-family はジスルフィド結合の形成・切断並びに異性化を通じてタンパク質の構造の安定化や品質管理、機能調節を担う酵素のグループであり、現在 20 種類以上のメンバーが同定されている。P5 はそのうちの一つであり、酵素活性を担う a, a'ドメインと不活性の b ドメインからなる [1]。我々は P5 の構造情報を得るべく小角 X 線散乱(SAXS)を用いたが、X 線照射前後で P5 のゲルろ過クロマトグラフィーでの挙動が変化することから、X 線照射によって P5 が変性している可能性が考えられた。そこで本研究では変性・凝集を防ぐべく、X 線照射のダメージを軽減する報告のあるジチオトレイトール (DTT) [2]を試料溶液中に添加し SAXS 測定を行った。

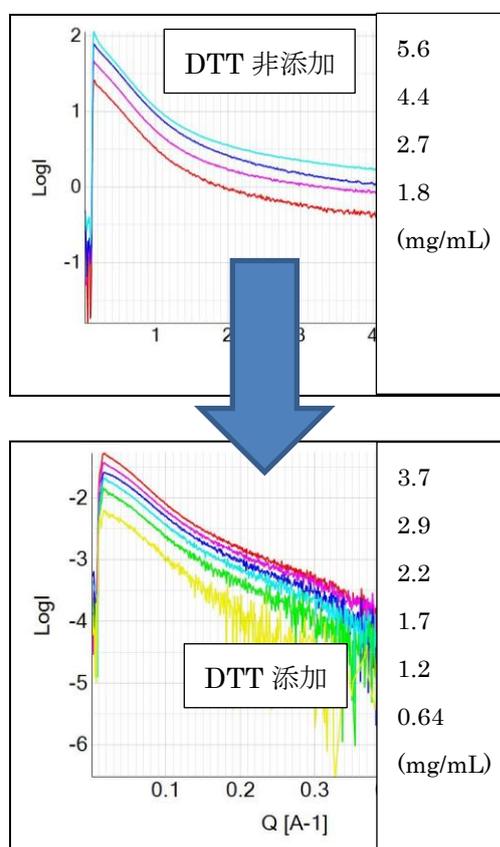
2. 実験方法

pET30a(+)および BL21(DE3)を用いた大腸菌発現系によって作製した His タグ融合ブタ P5 全長を、硫酸アンモニウムによる塩析と疎水性クロマトグラフィー、Ni-NTA 樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーを経て精製した[1]。精製標品から更に Superdex 200 で凝集体を除き、Vivaspin 20 を用いて濃縮した。ゲルろ過溶離液には 20 mM HEPES, 100 mM KCl, 10%

glycerol, pH 7.5 を用いた。得られた精製標品を Vivaspin 4 turbo を用いて濃縮し、ろ液とタンパク溶液へ DTT を終濃度 1 mM となるように添加した。SAXS 測定は 25°C で行い、SAngher 並びに ATSAS software を用いて解析を行った。

3. 結果と考察

DTT を添加していないサンプルは微小角領域に upper curve が見られ、凝集しているといえる。一方 DTT を添加した場合、凝集パターンは検出されなかった。更に、ゲルろ過クロマトグラフィーにおける挙動も



照射前後で変化していなかったことから、DTTの添加によってX線照射のダメージを大きく軽減させることが出来たと考えられる。しかし、PDI-P5は酸化還元活性を有しており、この測定条件では還元型のPDI-P5の分子像しか得られない。酸化条件下でのPDI-P5の分子像を得るためには別のダメージ軽減条件が必要になると考えられる。

4. 謝辞

測定に際しまして、ご協力くださりましたPFスタッフの皆さまにこの場をお借りして感謝致します。

5. 参考文献

[1] Miyakawa M., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* (2015) 1854, 485-491

[2] Jeffries Cy M., *et al.*, *Nat. Protoc.* (2016) 11, 2122–2153

*nyoneza@faculty.chiba-u.jp