

## ブタプロテインジスルフィドイソメラーゼ P5 の高次構造 SAXS analysis of higher order structure of porcine protein disulfide isomerase-P5

佐藤祐透、太田賢志、木村雄大、副島龍之介、森田剛、米澤直人\*

千葉大学大学院融合理工学府, 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33

Yuto SATO, Satoshi OHTA, Yudai KIMURA, Ryunosuke SOEJIMA, Tsuyoshi MORITA, Naoto YONEZAWA\*

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

### 1 はじめに

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折りたたみの補助や品質管理、機能調節を担う酵素群であり、哺乳類において現在 20 種類以上のメンバーが同定されている。PDI-P5 はそのうちの一つであり、酵素活性を担う a, a' ドメインと不活性領域の b ドメインで構成される [1]。我々は PDI-P5 の構造情報を得るべく小角 X 線散乱 (SAXS) を行った。以前の研究において PDI-P5 溶液にジチオトレイトール (DTT) を添加することで X 線照射のダメージを軽減できることを見出した [2]。本研究においてもこの DTT を PDI-P5 溶液に添加し、SAXS 測定を行った。

### 2 実験

発現用プラスミド pET30a (+) および大腸菌 BL21 (DE3) を用いた大腸菌発現系によって His タグ融合ブタ PDI-P5 全長と b ドメインを発現させ、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。精製標品から更に PDI-P5 全長は Superdex 200、b ドメインは Superdex 75 を用いて凝集体を取り除いた。ゲルろ過クロマトグラフィー溶離液には 20 mM HEPES, 100 mM KCl, 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、ろ液とタンパク質溶液に終濃度 1 mM の DTT と 5% グリセロールを添加した。SAXS 測定は、25°C で行った。カメラ長は 2 m、波長は 1.5 Å、検出器は PILATUS を用いた。SAnGler 並びに ATSAS software を用いて解析した。

### 3 結果および考察

各タンパク質溶液について得られた散乱パターンを解析したところ凝集は検出されなかった。さらに、各タンパク質溶液についての Guinier plot と Kratky plot から、原点散乱強度、慣性半径 (Rg)、分子の最大長 (Dmax) を得た。得られた分子質量について各タンパク質の計算分子質量 (PDI-P5 : 51 kDa、b ドメイン : 23 kDa) と照らし合わせた結果、それぞれ二量体と単量体に相当するものであった。よって、溶液中において PDI-P5 全長は二量体、b ドメインは単量体で存在することが示された。

また、これまでの研究においてゲル濾過クロマトグラフィーにおける見かけの分子質量と SAXS の測定結果において違いが生じており、この違いの原因の一つとして X 線照射によるダメージでサブユニットが解離した可能性を考えていた。そこで、本研究で X 線照射時間ごとの散乱パターンを比較し、X 線照射によるダメージの有無を調べた (図 1)。その結果、時間ごとの散乱パターンには変化が見られず、X 線照射によるダメージがないことがわかった。ゲル濾過クロマトグラフィーと SAXS の測定結果における違いは、各タンパク質が球状ではなく伸びた形を有するために生じたと考えられる。

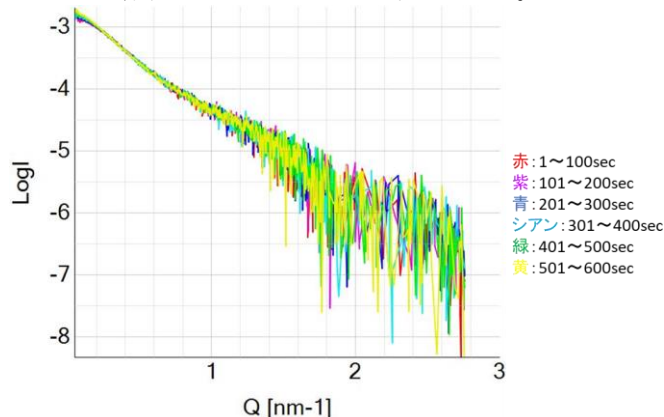


図 1 : ブタ PDI-P5 の X 線照射時間ごとの散乱パターン

### 4 まとめ

ブタ PDI-P5 の高次構造はグリセロールと DTT を添加することにより X 線照射によるダメージが少ない状態で解析できることがわかった。

### 謝辞

測定に際しまして、ご協力いただきました 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。

### 参考文献

- [1] Miyakawa M., *et al.*, Biochim. Biophys. Acta (2015) 1854, 485-491
- [2] Ohta S. *et al.*, Photon Factory Activity Report 2017 #35 (2018)

\* nyoneza@faculty.chiba-u.jp