

モデル蛋白質による β シート末端の構造評価 Structural evaluation of β -sheet edge by using a model protein

真壁幸樹,* 志賀翔多

山形大学大学院理工学研究科, 〒992-0057 山形県米沢市城南 4-3-16

Koki MAKABE,* and Shota SHIGA

Yamagata University, 4-3-16 Jyonan, Yonezawa, Yamagata 992-8510, Japan

1 はじめに

蛋白質やペプチドは本来の天然構造が壊れ、分子間会合した凝集体を形成する。それらの中で β シート構造に富んだアミロイドは様々な病気との関連から、広く研究が進められている。

我々はこれまで、このアミロイドのような β シートに富んだ凝集体を可溶性蛋白質中に模倣したモデル蛋白質 Peptide self-assembly mimic (PSAM) を作製し、評価を行ってきた^[1]。この PSAM では分子の真ん中に単層 β シート領域があり、その両末端側がドメインでキャップされた構造を持っている (図 1)。 β シートの末端は非特異的に他のペプチド鎖と会合しやすいため、両末端のキャップは必須の要素であると我々は考えていた。一方で、アミロイドなどの β シート凝集体は線維の末端で分子間相互作用し、伸長していく。このため β シートの末端の分子構造を評価することは重要である。

本研究では、我々がこれまで研究に用いてきた PSAM の末端ドメインを欠失させ、その結晶構造から β シート末端の構造特性を評価した^[2]。

2 実験

以前に構築した PSAM の発現ベクターから、C 末端ドメインの遺伝子を欠失させた。大腸菌発現系により生合成し、Ni-NTA カラム精製、His タグの連結部位に導入してあるプロテアーゼ認識配列を用いて、プロテアーゼ消化で His タグを除去した。

精製された目的蛋白質を結晶化し、PF の BL5A にて回折データを収集した。既知の PSAM 結晶構造の C 末端ドメインを欠失させたモデル構造を用いて分子置換法によって位相を決定し、構造の精密化を行い、最終分子モデル構造を構築した。

3 結果および考察

PSAM から C 末端ドメインを欠失させた変異体を PSAM-edge と命名した。サイズ排除クロマトグラフィーの結果から単量体として存在していることがわかった。このことは分子間の凝集が起きていないことを示している。CD を用いた尿素変性による安定性測定から 2 状態モデルでよくフィットされる転移曲線が得られた。この結果から、単層 β シート領域と N 末端ドメインは協同的に unfold していることが示された。

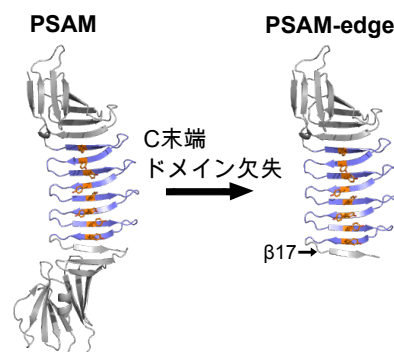


図 1 : モデル蛋白質 PSAM と本研究で作り出した PSAM-edge

結晶構造を分解能 2.2Å で決定した。図 2 に示す mol A では Thr217 まで電子密度マップが観察でき、C 末端の 3 残基の電子密度マップは観察できなかった。このことから末端の 3 残基程度を除いて、最後の $\beta 17$ ストランドの残基は安定に構造を形成していることがわかった。また分子動力学シミュレーションを行ったところ、結晶構造と一致して、最後の 4 残基のみ構造ゆらぎが大きく、 $\beta 17$ は構造を維持していた。

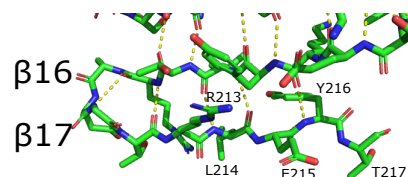


図 2 : 結晶構造中(Mol A)の末端 β ヘアピンの構造

4 まとめ

β シートの末端を溶媒に露出させたモデル蛋白質 PSAM-edge の作製に成功し、その結晶構造を決定した。サイズ排除クロマトグラフィーの結果から、会合せずに単量体であることがわかり、結晶構造から末端の β ストランドまで構造形成していることが明らかになった。

参考文献

[1] K. Makabe, et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 103(47), 17753 (2006)

[2] S. Shiga and K. Makabe, Proteins, 89(7), 845. (2021)

* makabe@yz.yamagata-u.ac.jp