

ジスルフィド結合を形成するシステインの特徴についての解析		
黒田研究室	05251014	大原 拓也

タンパク質工学の分野において、より安定であるタンパク質を設計することは一つの大きな目標であり、実際に変異導入によるジスルフィド結合(以下、SS結合)のタンパク質への組み込みによって安定性向上を目指す試みが為されている。例えば、システインを含まないファージ T4 リソザイムはSS結合導入による安定性向上を示した(Matsumura et al, 1989)。しかしSS結合を導入する際、単に立体構造上で近い距離にある残基対をシステインに置き換えたとしても、確実に架橋するとは言えないものと考えられる。この際、SS結合を形成するシステインと、フリーなシステインの双方に於ける周辺環境に差があるものと考えられるため、本研究では、タンパク質の安定性向上を可能とするSS結合導入法への知見とするべく、システイン残基周辺環境の詳細な分析を行った。

本研究では、タンパク質の立体構造情報データベースである Protein Data Bank(PDB)から4278個(1046623残基)の代表配列を獲得し、分析対象とした。そして溶媒露出表面積、主鎖回転角(PHI, PSI)、隣接残基に於けるアミノ酸出現頻度を周辺環境として分析を行った。

分析の対象としたタンパク質配列のうち760個(約17.8%)にSS結合が含まれていた。SS結合を形成しているシステイン残基(以下、Half Cys)は3882個、一方、SS結合を形成していないシステイン(以下、Free Cys)は9982個存在した。

配列上システインに隣接するアミノ酸についてHalf CysとFree Cysに分類したところ、選択的にHalf Cysの近くに配置する残基としては主にアルギニンやグルタミンといった親水性アミノ酸が検知された(表1)。また、溶媒露出面積についての調査の結果では、Free Cysの方がより疎水性環境にあることも分かった。これは極めて空気酸化を受けやすいFree Cysが酸化されるのを避けるためにタンパク質内部に埋め込まれているからだと推測される。また、Half Cysに隣接したHalf CysとFree Cysの割合ではHalf Cysが圧倒的に大きかったことから、近傍にあるシステイン同士がSS結合を形成する確率は非常に高いと推測できる。同じくシステインの前後の残基のうち、SS結合によるタンパク質の折りたたみによって互いに接近するアミノ酸の組み合わせでは、グリシンを筆頭に、バリン、アラニンの存在が目立った(表2)が、これらは全て分子量の小さいアミノ酸であるから、SS結合による折りたたみには立体障害が関与すると言える。そして、Half Cysから5残基離れたところではHalf Cys同士の組み合わせが突出していた。以上のHalf Cysの配列的な周辺残基の分析から、SS結合は二つのシステインが近接し、さらに片方だけでなく両方のシステインの近くに分子量の小さなアミノ酸が位置している時、あるいは片方のシステイン親水性残基が隣接している時に起こりやすいと考えられる。Half CysとFree Cysやそれぞれの前後5残基のラマチャンドラプロットを作って配列上相対的に同じ位置の残基同士比較した結果、各比較の全てにおいて大きな差はなかったため、SS結合の形成に主鎖のコンホメーションの関与はないと考えられる。システインが属する二次構造の比較では、Mariaらの研究と同様に、Free Cysが $\alpha$ -ヘリックスに含まれる確率はHalf Cysのその約2倍だった(表3)。

順	AA	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	HP
1	HC	223	503	404	556	571	895	394	325	90	405	25
2	K	1.44	1.33	1.32	1.55	1.57	1.35	1.32	1.53	1.33	1.15	-1.3
3	V	1.45	1.26	1.59	1.32	1.5	1.29	1.3	1.48	1.39	1.19	42
4	Q	1.23	1.42	1.36	1.3	1.18	1.63	1.27	1.41	1.46	1.3	-35
5	R	1.29	1.42	1.38	1.29	1.24	1.54	1.4	1.36	1.09	1.2	-45

左:表1 Half Cysの前後の残基における残基分布に対する各残基の割合の、Free Cysの前後の残基分布における各残基の割合の比率(数字はシステインとの残基番号の差)

順	組	1	2	3	4	5
1	GV	49	55	49	52	40
2	GK	41	54	35	51	36
3	AV	44	40	44	38	48
4	AG	44	58	39	39	32
5	GN	38	43	32	37	39

左:表2 システインの前後の残基のうち、SS結合によるタンパク質の折りたたみによって互いに接近するアミノ酸の組み合わせ。数字は頻度

下:表3 Half CysとFree Cysの所属するタンパク質二次構造の割合。判例はH: $\alpha$ -ヘリックス、B: $\beta$ 架橋、E: $\beta$ シート、G:3-10ヘリックス、I: $\pi$ ヘリックス、T:水素結合ターン、S:屈曲、nan:所属二次構造無し

	H	B	E	G	I	T	S	nan
HC	17%	3%	31%	5%	0%	8%	8%	29%
FC	31%	2%	28%	3%	0%	8%	7%	22%