

変性条件下におけるジスルフィド結合形成の確率的解析

黒田研究室

学籍番号:22261024

金子海青

[背景] 大腸菌発現系では、沈殿画分に回収されやすいタンパク質に対して、化学変性条件下で可溶化・再フォールディングする手法が用いられる。しかしこの手法では、非ネイティブなシステインペア間でジスルフィド結合 (SS 結合) が形成され、ミスフォールディングが生じて収量が大きく低下することがある。これは、生体内とは異なる変性環境下においてタンパク質の構造的無秩序性が増大し、SS 結合形成における残基間の空間的制御が弱まるためと考えられる。このような条件下では、残基間の空間的接近確率は配列距離に依存すると考えられる。そこで本研究では、変性条件下における SS 結合形成の決定因子として、システイン間の配列距離に着目し、距離に基づく解析を行うことで SS 結合形成の選択性の理解を目的とする。

[手法] 当研究室において発現および巻き戻しを行っている 4 種類のタンパク質を対象に解析を行った。まず、配列距離に基づき SS 結合形成確率を計算するランダムコイルモデル(図 1)と、同モデルに体積排除効果を組み込んだ分子動力学 (MD) シミュレーションにより算出された形成確率を比較した。これにより、体積排除効果の有無が確率算出に与える影響を検討した。次に、ランダムコイルモデルにより算出されたネイティブ SS 結合ペアの形成確率と、RP-HPLC のピーク面積比から求めた天然構造体の含有割合を、ピアソン相関およびスピアマン相関により比較した。これにより、ランダムコイルモデルが実験結果をどの程度説明できるかを評価した。

[結果・考察] ランダムコイルモデルとMDシミュレーションの比較では比較的高い相関が認められた。この結果から、ランダムコイルモデルにおいて、体積排除効果の有無は確率の算出に影響しないことが示唆された。一方、ランダムコイルモデルと実験により得られた天然構造体の割合との比較では、ピアソン相関およびスピアマン相関のいずれにおいても有意な相関が認められなかった (図 2)。この要因として、実際の系ではアミノ酸側鎖の体積排除効果により特定のシステインペアの接近が拒否され、相対的にネイティブ S S 結合ペアの割合が変化している可能性が考えられる。また、RP-HPLCではすべての非ネイティブSS結合ペアを検出できないことも、理論値との乖離の一因であると考えられる。

[結論・展望] 化学変性条件下における SS 結合形成は、システイン間の配列距離のみでは十分に説明できず、他の因子が支配的である可能性が示唆された。今後はアミノ酸側鎖の体積効果を考慮した確率計算モデルを構築し、変性条件下における SS 結合形成機構の理解をさらに深めることを目指す。

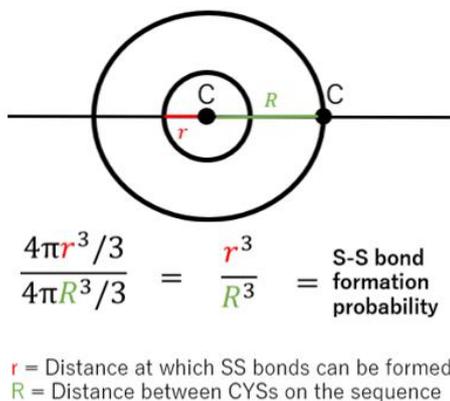


図 1 : ランダムコイルモデルによる SS 結合形成確率算出

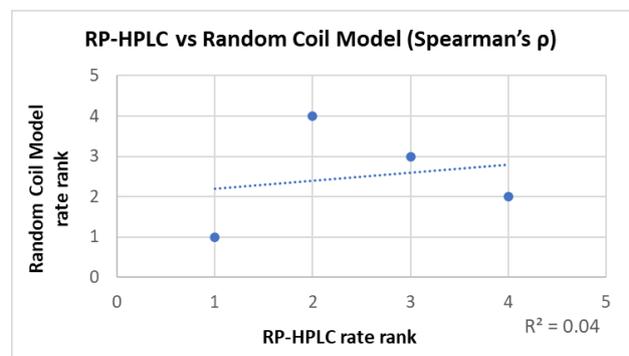


図 2 : RP-HPLC とランダムコイルモデルのスピアマン相関