

講義2：蛋白質の機能構造研究

分子細胞情報学：岩田 想

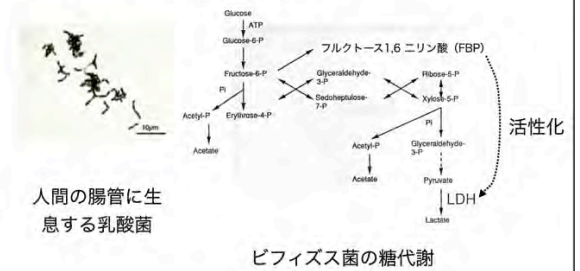
講義の狙い

- 蛋白質の機能／構造研究に必要な技術について学習する

学習項目

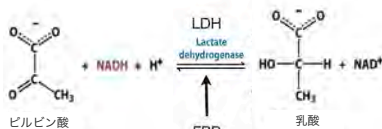
- 蛋白質の精製方法／純度の検定方法
- 蛋白質のアミノ酸組成／配列決定方法
- 蛋白質の三次元構造決定法

モデル蛋白質：ビフィズス菌 L-乳酸脱水素酵素 (LDH)



僕の博士論文のテーマ

- 細菌のLDHはFBPで制御を受けるが、ほ乳類のLDHは受けない→細菌は環境の変化に適応する必要がある。
- LDHのフルクトース 1,6 ニリン酸 (FBP) による活性化の分子機構を決定する



ピルビン酸を補酵素NADHを用いて乳酸に還元する。糖代謝中間体のFBPで活性化を受ける。

1.精製

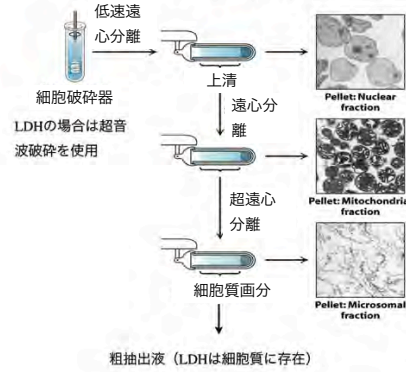
- 蛋白質を単分離する
- 純度を検定する

精製表

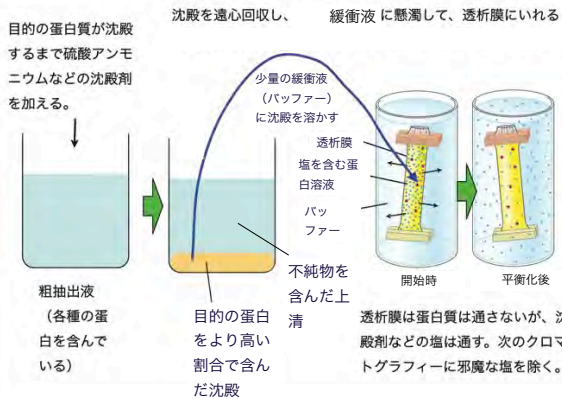
	全活性 (U)	全蛋白質 (mg)	比活性 (U/mg)	収率 (%)	精製度
細胞破碎/遠心分離	粗抽出液 12,300	3,180	3.87	100	1.00
塩析	硫酸沈澱 11,500	2,360	4.88	98.4	1.25
疎水クロマトグラフィー/透析	2'-(β-D-3'-OH)-β-D-xylofuranose 8,110	300	27.0	66.0	6.87
アフィニティークロマトグラフィー	AMP-セルロース 6,700	13.3	504	54.4	130
イオン交換クロマトグラフィー	Mono Q 6,370	7.69	828	51.8	218

全部で1分間に何μmolのNADをNADに酸化する能力があるかを、340nmの吸収を用いて測定(アッセイ)した結果
 蛋白質の量をブラッドフォード法で検定した結果。
 全活性/全蛋白質:値が高いほど純粋
 最初を100としてどれだけの活性が回収されたか
 比活性がどれだけ向上したか

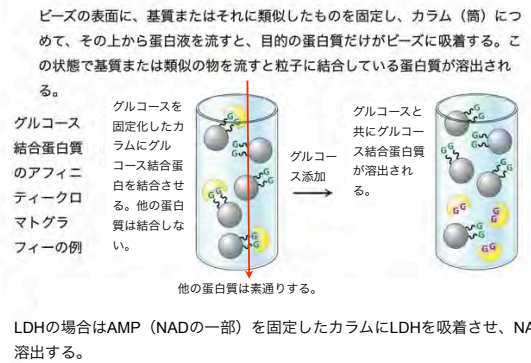
破碎及び遠心分離



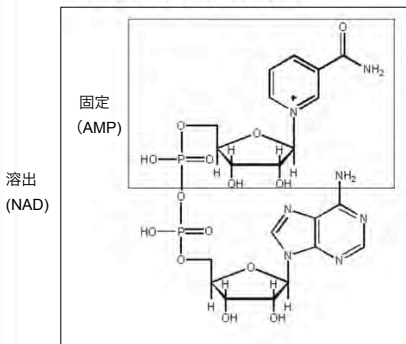
塩析および透析



アフィニティークロマトグラフィー



NAD (ニコチンアミド、アデニンジヌクレオチド) の構造

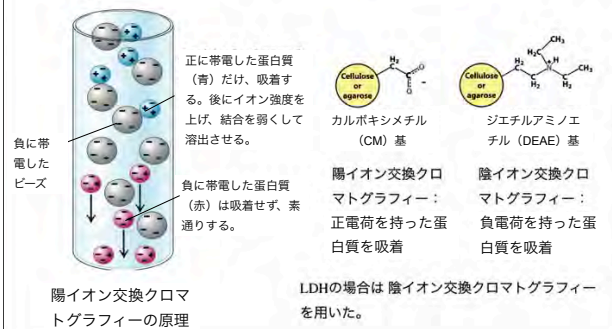


AMPの部分の方がNADより安定でビーズに固定するのに適しているが、より親和性、特異性の高いNADの方がより、容易にかつ選択的にLDHを要出する。

AMPに結合する蛋白質は全てカラムに着くことに留意。したがって他の分離方法も組み合わせる必要がある。

イオン交換クロマトグラフィー

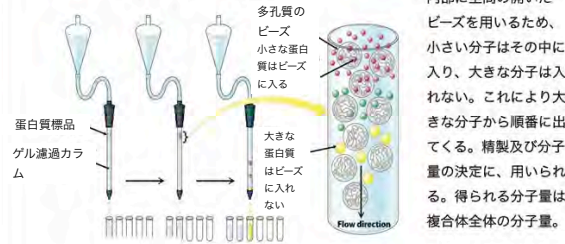
異なる蛋白質が、異なる電荷を持っていることを利用し、蛋白質を分離する。(pHによっても蛋白質の持っている電荷は異なる事に留意。後述)



2. 純度の検定

- ゲル濾過により、複合体全体の分子量を決定する。
- SDS変性下ゲル電気泳動で、サブユニットの分子量を決定できる。
- それ以外の検定方法

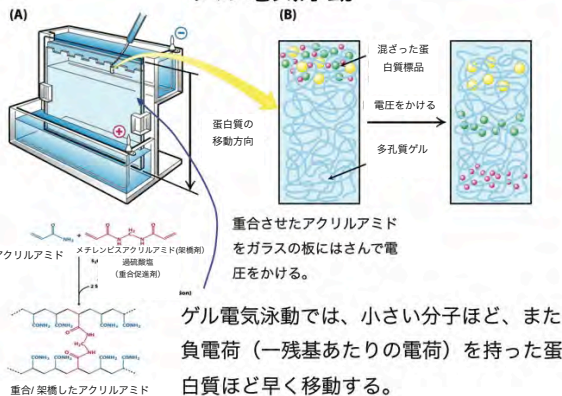
ゲル濾過 (分子ふるい) クロマトグラフィー



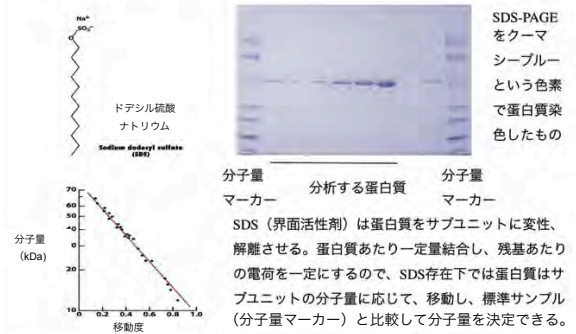
内部に空間の開いたビーズを用いるため、小さい分子はその中に入り、大きな分子は入れない。これにより大きな分子から順番に出てくる。精製及び分子量の決定に、用いられる。得られる分子量は複合体全体の分子量。

標準蛋白質と比較した結果、LDHの全体の分子量は16万2000程度と判明。

ゲル電気泳動



ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いた変性条件下のゲル電気泳動(SDS-PAGE)



SDS-PAGEをクーマシーブルーという色素で蛋白質染色したものの

分子重量 マーカー 分析する蛋白質 分子重量 マーカー

SDS (界面活性剤) は蛋白質をサブユニットに変性、解離させる。蛋白質あたり一定量結合し、残基あたりの電荷を一定にするので、SDS存在下では蛋白質はサブユニットの分子量に応じて、移動し、標準サンプル (分子重量マーカー) と比較して分子量を決定できる。

LDHの四次構造の推定

ゲル濾過 (未変性) から得られた全体分子量は約16万2千

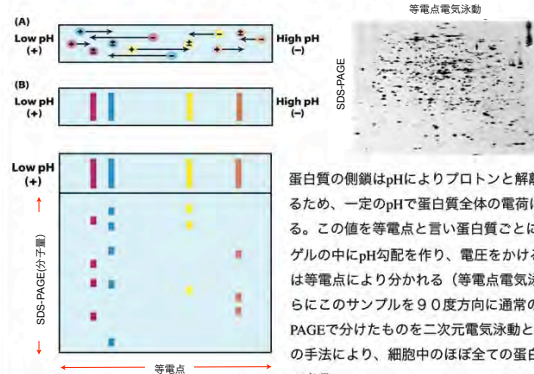
SDS-PAGE (変性) では約4万3千の分子量のバンドが一本だけえられた。



この結果からLDHは分子量4万3千のサブユニットからなる四量体と推定できる。(実験誤差により正確に4倍にはならない。)

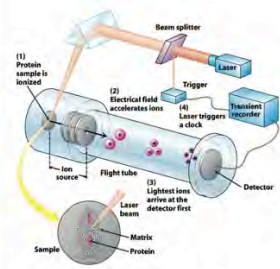
17

等電点電気泳動と二次元電気泳動

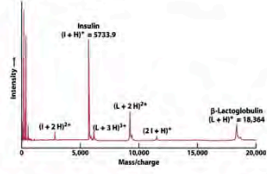


蛋白質の側鎖はpHによりプロトンと解離、結合するため、一定のpHで蛋白質全体の電荷は0になる。この値を等電点と言い蛋白質ごとに異なる。ゲルの中にpH勾配を作り、電圧をかけると蛋白質は等電点により分かれる (等電点電気泳動)。さらにこのサンプルを90度方向に通常のSDS-PAGEで分けたものを二次元電気泳動という。この手法により、細胞中のほぼ全ての蛋白質を同定できる。

質量分析計を用いた蛋白質/ペプチドの分子量の同定



MALDI-TOF(Time of Fly)質量分析計：蛋白質を特殊なマトリックスの中に埋設し、レーザーを当てることにより安定にイオン化できる。生成したイオンは電場の中での加速度によって分離される。



質量分析計は蛋白質に適応することは難しかったが、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) やエレクトロスプレー分析法により、蛋白質/ペプチドにも適応可能となった。

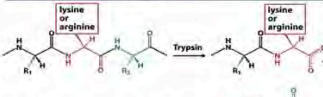
3.アミノ酸組成/配列の決定

- アミノ酸のペプチドフラグメント化
- アミノ酸組成の決定
- アミノ酸配列の決定
- ゲノム配列を用いたアミノ酸配列の同定

蛋白質のペプチドフラグメント化

Table 3.3 Specific cleavage of polypeptides

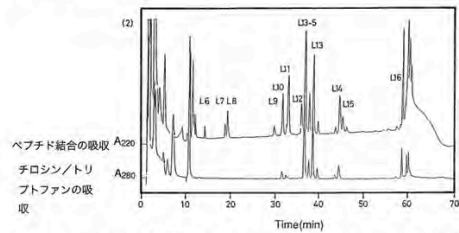
Reagent	Cleavage site
Chemical cleavage	
Cyanogen bromide	Carboxyl side of methionine residues
D-iodoacetic acid	Carboxyl side of tryptophan residues
Hydrofluoric acid	Asparagine-glycine bonds
2-Mercapto-5-thioisobenzofuran	Amino side of cysteine residues
Enzymatic cleavage	
Trypsin	Carboxyl side of lysine and arginine residues
Cleavagin	Carboxyl side of arginine residues
Staphylococcal protease	Carboxyl side of aspartate and glutamate residues (glutamate only under certain conditions)
Thrombin	Carboxyl side of arginine
Chymotrypsin	Carboxyl side of tyrosine, tryptophan, phenylalanine, leucine, and methionine
Carboxypeptidase A	Amino side of C-terminal amino acid (not arginine, lysine, or proline)



リジン、又はアルギニンのC末端側でペプチドを切断するトリプシンは最も良く使われる。

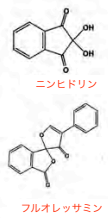
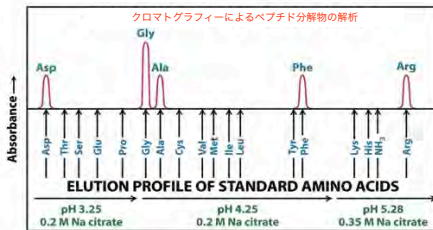
蛋白質全体は大きすぎて、アミノ酸配列、組成をきめるのは困難なため、化学的及び酵素的手法を用いて蛋白質を短いペプチドフラグメントにする。

LDHはリシルエンドペプチダーゼで16個のフラグメントに分離される。



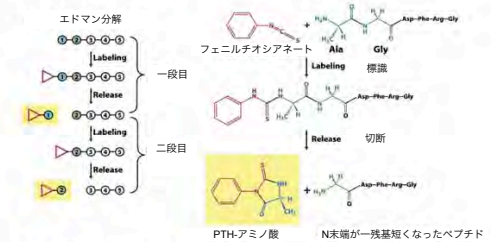
リシルエンドペプチダーゼはトリプシンに似た酵素だが、リジンのC末端だけでペプチドを切断し、アルギニンは認識しない。分解したペプチドフラグメントを(逆相)クロマトグラフィーで分離。

アミノ酸(組成)分析



ペプチドを6N塩酸中で、110°C、24時間処理することにより、完全にアミノ酸に加水分解できる。この分解物をクロマトグラフィーで分析し、ニンヒドリン(低感度だが正確)またはフルオレッサミン(高感度)で染色することにより、そのピークの面積から、含まれるアミノ酸の数がわかる。上の例ではAsp, 2xGly, Ala, Phe及びArgであることが分かる。

アミノ酸配列決定(エドマン分解法)



ペプチドをフェニルイソシアネート (PTC) で処理し、緩い酸性条件下で切り出すと、N末端のアミノ酸だけがPTHアミノ酸として、遊離する。このとき新しいペプチドのN末端は二番目のアミノ酸になり、エドマン分解を繰り返すことにより、PTHアミノ酸が配列通りに順々と遊離する。これをアミノ酸分析同様にクロマトグラフィーで分析、同定することにより、N末端から最大50残基程度のアミノ酸配列を決定できる。

LDHの9個のペプチドのアミノ酸組成と8個のペプチドの部分配列が決定された

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
L1	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)
L2	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)
L3	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)
L4	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)
L5	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)
L6	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)
L7	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)
L8	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)
L9	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)	1.41 (1)

799'部分	配列
L1	NAATY
L2	AEITVPEYK
L3	ETAAQPFK
L4	DFRHSI(C)MSVPTLLNRQYKNTIN...
L5	LTGLPENQIFGSGTND...
L6	VAPNAIYMLITNRYDIATRYAKE
L7	LAVIGAGAVG...
L8	GATNTAIGMSQVDIIEAVLHDTNRILPFSSM

アミノ酸配列

アミノ酸組成

組み換えDNA技術及びゲノム科学の進歩により、アミノ酸配列はDNA塩基配列から決定されるようになった。

DNA sequence GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC ACT ATG GGC GCA

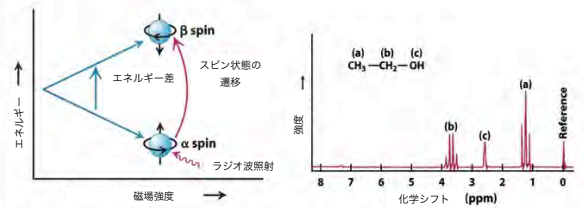
Amino acid sequence Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala

蛋白質の部分配列をもとに、それに対応した塩基配列を含む遺伝子DNAをクローニングし、その塩基配列から全アミノ酸配列を決定できる様になった。またその生物の全ゲノム配列が解析されている場合は、目的の蛋白質のアミノ酸配列をゲノムデータベースの中から直接見つけることができる。

3.蛋白質の三次元構造の決定

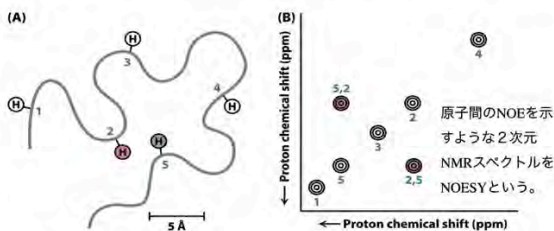
- 核磁気共鳴法
- X線結晶構造解析法

核磁気共鳴分光法 (NMR)を使った構造解析



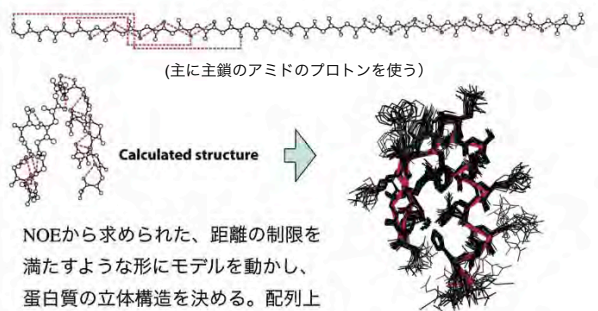
強力な磁場の中では電子のスピンのレベルが分裂し、ラジオ波を吸収するようになる(NMR)。この吸収波長は原子の置かれた環境によって異なる。蛋白質研究では主に水素のNMRを用いる。

核オーバーハウザー効果 (NOE)を用いた近接原子の同定



一つの水素の吸収波長の電磁波を照射しながら、NMRスペクトルをはかると、他の原子のピークの高さが影響をうけることがある。これを核オーバーハウザー効果 (NOE)といい、それらの原子が5Å以内にある時のみにおこる。

原子間の距離の制約を用いて構造を決める



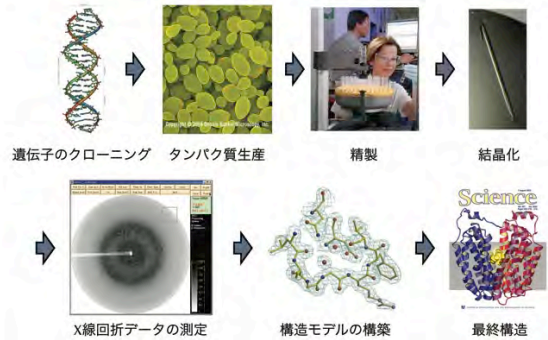
NOEから求められた、距離の制限を満たすような形にモデルを動かし、蛋白質の立体構造を決める。配列上離れた部分に対する制約が、全体の構造を決めるのに有効。

NMRを用いた構造解析の長所及び欠点

- 長所
 - 溶液中の構造を決定できる
 - 結晶を必要としない
 - ドメイン/モチーフなどの構造を決めるのに向いている
- 欠点
 - 大きな蛋白質（50残基以上）の構造を決めるのが難しい
 - 側鎖の構造等に誤差が大きい

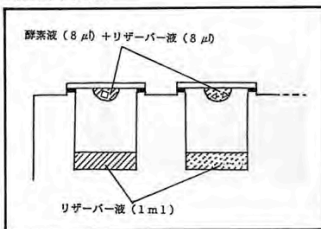
32

X線回折を用いた構造解析の手順

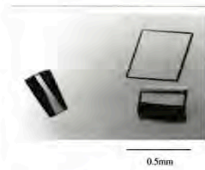


蛋白質の結晶化

蒸気平衡法



リザーバー液：ポリエチレングリコールなど、蛋白質の溶解度を下げる物質が入っている。
蛋白質液と混ぜてカバーガラスに吊ると、蒸気平衡により、ドロップのサイズが小さくなると共に蛋白質の溶解度が減少し、結晶になる。



LDHの結晶
写真 (10°C-蛋白質は熱に不安定)

34

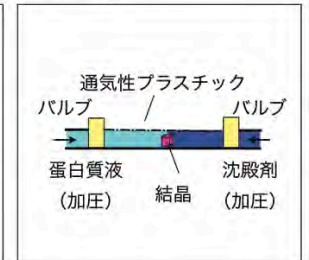
微量サンプルのロボットによる結晶化

ナノドロップ法

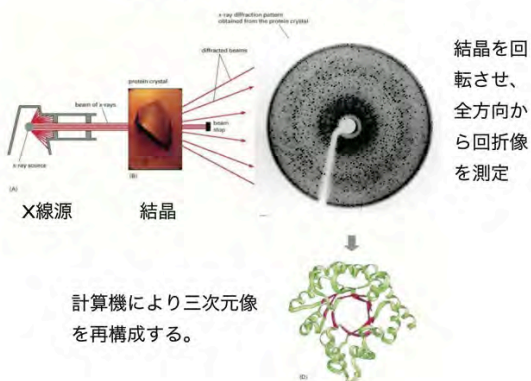
~50 nl (2000条件/mg、旧来法の20倍)

サブナノ自由界面拡散法

~0.7 nl (143,000条件/mg、旧来法の1500倍)。



X線回折データの測定



ストーンヘンジの写真を全方向から撮る



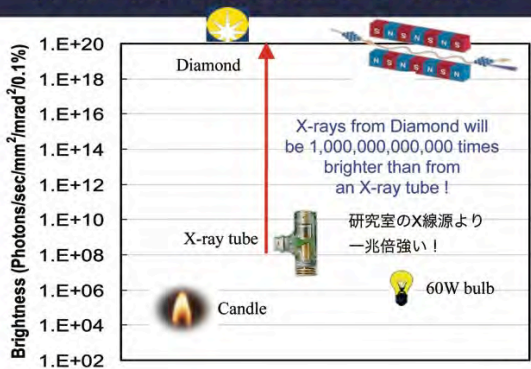
ストーンヘンジの3次元再構成



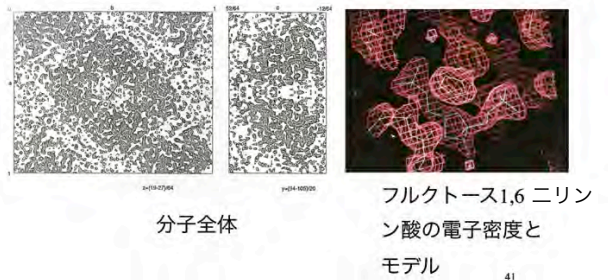
放射光実験施設



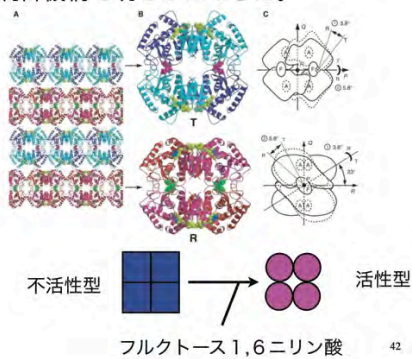
非常に強いX線を発生させる装置



LDHの電子密度図及びモデルの作成



LDHの活性型と不活性型の構造を決定しその制御機構を明らかにできた。



X線回折を用いた構造解析の長所及び欠点

- 長所
 - 大きな蛋白質（ウイルス、リボソームなど）でも構造解析可能
 - 精密な側鎖、リガンドの構造を得られる
- 欠点
 - 結晶化することが必要
 - 結晶構造は必ずしも溶液構造と同じではない