〔特集：最新の電気泳動技術〕

タンパク質中のチオール基の酸化還元状態を可視化・定量する DNA マレイミドの開発

原 怜¹・久堀 徹^{1, 2, *}

¹ 東京工業大学資源化学研究所, ² JST CREST

Development of DNA-based maleimide compound for titration of thiols in a protein.

Hara Satoshi, Hisabori Toru*

*Corresponding Author

E-mail: thisabor@res.titech.ac.jp

(受付 2014 年 6 月 12 日, 受理 2014 年 6 月 19 日)

はじめに

生物は、様々な環境変化に対して恒常性を維持するメカニズムをもっている。例えば、遺伝子の転写・発現によるタンパク質の量的な制御や、翻訳後修飾のようなタンパク質の質的な変化を伴うものなどである。タンパク質のレドックス制御は、翻訳後修飾の1つとして生理的に重要である。タンパク質のレドックス制御の主役の1つは、タンパク質中システイン残基の側鎖である反応性の高いチオール基である。

チオール基は、生体内のレドックス環境に応じて、様々な翻訳後修飾を受ける。その代表が、酸化によるジスルフィド結合の形成である。タンパク質構造中で近傍に存在する2つのチオール基は、ジスルフィド結合を形成できるので、複合体形成やタンパク質の安定化などに関与している。さらに、ジスルフィド結合の形成とその還元によって機能性タンパク質自身の活性のオンオフや、機能の変化が起こることさえある。このようなタンパク質機能のレドックス制御は、特に光合成生物において、光化学系の反応とそれに続く代謝系の反応の同期に必須である。また、チオール基のレドックス修飾には、1つのチオール基に対してグルタチオンや一酸化窒素の結合、過酸化などの様々な修飾がある。これらも生体内での重要なレドックス制御であり、その重要性が明らかになりつつある。近年プロテオミクス手法が著しく発展し、チオール修飾の網羅的な解析が行われるようになった。その結果、チオール修飾を受けているタンパク質が非常に多いことが分かってきた。これらのタンパク質のレドックス制御を明らかにするためには、個々のタンパク質のレドックス状態を検出し、そのレドックス状態とタンパク質の活性や機能との関係を調べる生化学研究、そして、そのレドク

ス制御がどのように生理現象に結びついているのかを調べる生理学的な研究が必要である。

従来法とその問題点

個々のタンパク質のレドックス制御を明らかにするには、そのタンパク質のレドックス状態と、活性・機能の関係を解析する必要がある。そこで、チオール基を何らかの化合物で標識し、電気泳動によって移動度変化を調べる手法が以前から用いられてきた。標識試薬としては、チオール基と特異的に結合するマレイミド試薬が用いられる。マレイミド試薬はタンパク質の還元型チオール基とのみ反応するので、酸化的修飾を受けているタンパク質と修飾を受けていないタンパク質では、結合するマレイミドの分子の数が異なる。この数に違いを電気泳動の移動度の違いとして検出する(図1)。

一般に、マレイミド試薬として、4-acetamido-4-maleimidylstilbene-2, 2-disulfonic acid (AMS)やポリエチレングリコールマレイミド(PEG-Mal)が用いられる^{2), 3)}。しかし、AMSは分子量が小さいために、修飾による移動度変化が小さい。従って、小さなタンパク質にしか適用できず、また、結合したマレイミドの数を正確に見積ることも困難である。一方、PEG-Malとしては、分子量が2000または5000のものが通常使われる。しかし、PEG-Mal自体の分子量分布が広いため、修飾後の電気泳動バンドがブロードになってしまう。さらに、PEG-Malで標識されたタンパク質の移動度変化は、PEG-Malの結合数に依存しない。それどころか、SDS-PAGEのアクリルアミド濃度を変えただけで、標識タンパク質のみかけの分子量が変わってしまうなどの欠点があるため、移動度変化からは標識されたチオール基の数の情報を得ることはできな

い。

チオール基のレドックス修飾では、例えば複数のジスルフィド結合の形成やグルタチオン化とジスルフィド結合の形成が複合的に起こることがある。そのため、マレイミド試薬と結合できる還元型チオール基の数の情報を直接得られないことは、翻訳後修飾の解析に不便であった。このため、複合的なレドックス修飾の解析には、変異体や質量分析などを必要としていた。

図1 マレイミド試薬によるチオール基のレドックス状態の検出法の原理(A)と実験例(B)

(A) マレイミドの分子が結合した数の分だけ移動度が変化する。(B) 様々な光強度下での植物中のフルクトース 1, 6 ビスリン酸フォスファターゼ(FBPase)のレドックス状態を、AMS を用いて可視化した¹⁾。

DNA-Mal とは

PEG-Mal がチオール基の数を決定できない要因の1つは、上述の通り分子量分布が不均一なためである。また、PEG 部分は親水性であり SDS との疎水的結合ができないと予想される。そのため、PEG が結合した正味の分子量に対する負電荷と SDS-PAGE の移動度の直線性のズレが大きくなり、結果的にチオール基の数を決定できないことが予想された。従って、チオール基の数を決定できる新規マレイミド試薬に必要な条件は、以下の通りである。

1. 付加できる分子量が十分に大きいこと。
2. 分子量分布が均一であること。
3. 適度な負電荷をもっていること。

これらの条件を満たすものとして、我々は一本鎖 DNA を採用した。一本鎖 DNA は固相合成で用意できるので、

分子量の設定は自在であり、分子量が均一である。さらに、一本鎖DNAはリン酸基に由来する負電荷をもつ。修飾効率と移動度の変化量を勘案して、我々は 24 塩基の DNA の 5' 末端にマレイミド基を導入した DNA マレイミド (DNA-Mal)を開発した⁴⁾。

DNA-Mal によるレドックス状態の検出

我々が作製した DNA-Mal は、低分子マレイミドである AMS に比較して、大きな移動度変化を示した(図2A)。また、この移動度変化はシステイン残基の数に対して直線性を示した。その直線性の良さは、高分子マレイミドである PEG-Mal と比較すると一目瞭然である(図2B)。この実験では、条件の異なる3種類のアクリルアミドゲル濃度で電気泳動を行った。PEG-Mal の場合、ゲル濃度に依存してその移動度が変化してしまうが、DNA-Mal ではそ

図2 DNA-Mal によるチオール基の修飾⁴⁾

(A)1-3 個のシステインをもつ分子量 12000 程度のタンパク質を AMS, DNA-Mal で修飾し、電気泳動した。(B) DNA-Mal(Open)と PEG-Mal(Close)で修飾したタンパク質の移動度変化。(C) 様々なタンパク質種の電気泳動条件の違いによる移動度変化。

のような傾向は見られない。DNA-Mal によって付加される移動度変化の直線性は、ゲルの濃度やタンパク質の種類によらず、少なくともシステイン残基の数が6個になるまでは非常に良い直線性を示した(図2C)。すなわち、一般的な分子量マーカーを用いて標識後の分子量を見積もるだけで、得られた移動度の変化から何分子の DNA-Mal で標識されたか、すなわち何個のチオール基がレドックス修飾を受けているのかを決定することができる。

応用・展望

DNA-Mal は、DNA の長さを変えることで様々な大きさのタンパク質に適用可能であり、レドックス制御の分子レベルでの解明に有用なツールである。また、DNA-Mal はタンパク質と結合した後も DNA としての機能は損なわれていないと予想されるため、ハイブリダイゼーションを利用した他のアプリケーションへの応用も可能である⁵⁾。さらに、ビオチンスイッチ法によるチオール基のニトロソ化を検出する方法等と組み合わせれば、タンパク質がどのような修飾をうけ、それがどの程度なのかという、より詳細な解析も可能になると思われる。このように、この新規マレイミド試薬は、汎用性と応用性を併せもつたチオール修飾剤としてレドックス研究に役立つと期待している。

文 献

- 1) Yoshida K, Matsuoka Y, Hara S *et al.* Distinct Redox Behaviors of Chloroplast Thiol Enzymes and their Relationships with Photosynthetic Electron Transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell physiol.*, 2014; 55 (8): 1415-1425.
- 2) Kobayashi T, Kishigami S, Sone M *et al.* Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94 (22): 11857-11862.
- 3) Kojima K, Oshita M, Nanjo Y *et al.* Oxidation of elongation factor G inhibits the synthesis of the D1 protein of photosystem II. *Mol Microbiol.* 2007; 65 (4): 936-65947
- 4) Hara S, Nojima T, Seio K *et al.* DNA-maleimide: an improved maleimide compound for

electrophoresis- based titration of reactive thiols in a specific protein. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830 (4): 3077-3081

- 5) Nojima T, Konno H, Kodera N *et al.* Nano-scale alignment of proteins on a flexible DNA backbone. *PLoS One*, 2012; 7(12) :e52534