

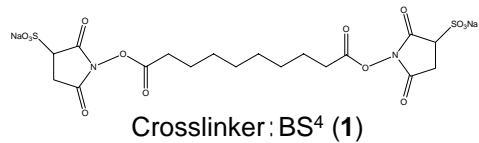
1B3b

クロスリンカーを用いた Cytochrome P450 17 α Cytochrome b₅ 複合体の質量分析によるトポロジー解析

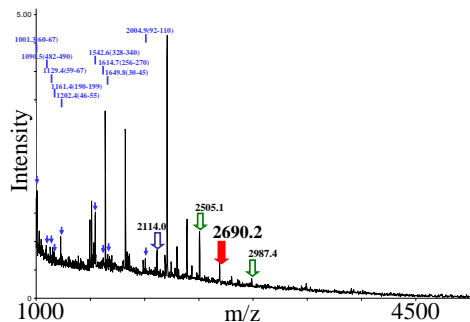
(広大院理・広大 QuLis・広大総科)

水野 初・泉 俊輔・山崎 岳・平田敏文・小南思郎

現在タンパク質の高次構造解析、特にタンパク質間やタンパク質 膜間相互作用などのトポロジー解析が注目されている。当研究室では、塩基性アミノ酸残基間に結合するクロスリンカーを使用してミクロソーム電子伝達系の膜タンパク質である Cytochrome P450 17 α (以下 P450 17 α) に化学修飾を行い、その質量変化を調べることで膜結合部位の解析を行っている。本研究では P450 17 α が基質代謝を行うときの電子伝達に関係する、膜タンパク質である Cytochrome b₅ が膜上でどのように P450 17 α 複合体を形成しているかを解析した。



大腸菌発現させた P450 17 α (guinea pig)、Cytochrome b₅ (human) をそれぞれ単離・精製し、コール酸透析法¹⁾によりホスファチジルコリンからなるリポソーム膜中に組み込んだ。P450 17 α Cytochrome b₅ 複合体中の塩基性アミノ酸であるリジンに親水性クロスリンカーである BS⁴ (Di-sulfosuccinimidyl sebacate (1)) をタンパク質モル量に対して 1000 倍を加え、クロスリンク反応



させた。反応溶液の CO 還元スペクトルを測定したところ、450 nm に P450 17 α 特有の吸収が見られたので、クロスリンク反応による P450 17 α の構造の変化は無いことが確認された。この反応溶液にアンモニア水を加えて反応を終了させ、トリプシンを加え、消化断片の質量を MALDI-TOF 質量分析計によって測定した。解析の結果、図 1 に示すように m/z 2690.2 , 8752 , 16569 のピークがそれぞれ P450 17 α と Cytochrome b₅ の間でクロスリンク結合していた。このことより P450 17 α の Lys248 と Cytochrome b₅ の Lys18、P450 17 α の Lys290 と Cytochrome b₅ の Lys23 の間でそれぞれクロスリンカーが結合していることがわかった。

これまでに P450 17 α はリポソーム膜上で P450 17 α 中のヘムを膜面に対して平行になるように存在していることがわかっている。これに今回の結果を考え合わせると、P450 17 α Cytochrome b₅ 複合体が図 2 のように膜中で存在していることがわかった。このモデルについて P450 17 α と Cytochrome b₅ の表面の電荷をみると、Cytochrome b₅ のクロスリンカーが結合した部位付近のリジン残基がちょうど P450 17 α のクロスリンカー結合部位付近の酸性アミノ酸残基の位置と対応していることがわかった。

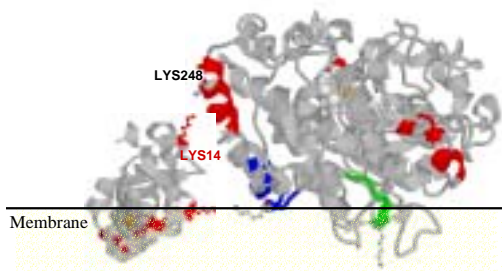


図2 P450 17 α Cytochrome b₅ 複合体の膜内トポロジー解析結果

1) Kominami, S., et al., *B.B.A.*, **985**, 293-299 (1989).