

1H4b イオントラップ型質量分析計を用いた Cytochrome P450 17 α -Cytochrome b₅複合体のトポロジー解析

(広島大院理・広島大 QuLis・広島大総科)

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,特にタンパク質の機能発現に直結する動的構造,例えばタンパク質の生体膜上でのトポロジー解析が注目されている。我々は、『化学修飾法』と『質量分析法』を組み合わせることにより,タンパク質 生体膜間の相互作用のトポロジー解析を行っている。本発表では,化学修飾剤として塩基性アミノ基間にクロスリンク結合するクロスリンカーを用い,ステロイド系ホルモンの生合成の鍵酵素である Cytochrome P450 17 α (以下 CYP17)の膜トポロジー,および CYP17 への電子伝達に参与するタンパク質である Cytochrome b₅(以下 Cyt b₅)の CYP17 とのタンパク質間相互作用に焦点をあてて報告する。

我々はこれまでホスファチジルコリンからなるリポソーム中に組み込んだ CYP17(guinea pig)-Cyt b₅ (human) 複合体のトポロジー解析を,化学修飾剤として塩基性アミノ酸同士をクロスリンク結合する親水性クロスリンカーである BS⁴ (Di-sulfosuccinimidyl sebacate) を用いて行ってきた。クロスリンク反応させたサンプルをトリプシン消化し, MALDI-TOF 質量分析計によりそれぞれの消化断片の質量を測定した。解析の結果, m/z 2690.4 のピークがそれぞれ計算によって得られた CYP17 と Cyt b₅ の間でクロスリンク結合した部分の分子量と一致した。このピークについて AXIMA QIT を使用して MS/MS 解析を行った結果, CYP17 の 246-251 番のと Cyt b₅の 10-23 番のトリプシン消化断片のアミノ酸配列が同定された。(図 1)またこれ以外に m/z 2987.3, 16569 のピークが CYP17 と Cyt b₅ 間でクロスリンク結合していることがわかった。

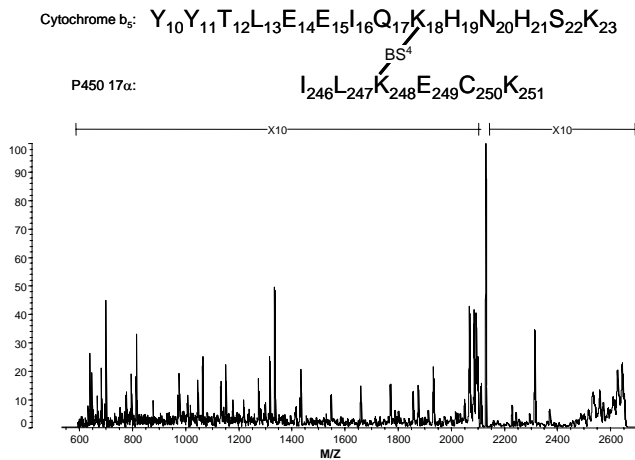


図1 m/z 2690.4のピークのMS/MSスペクトルと同定されたアミノ酸配列

これらの結果から, CYP17 の Lys245 と Cyt b₅ の Lys32, 同様に Lys248 と Lys 18, Lys290 と Lys23 の間でクロスリンク結合しており, CYP17-Cyt b₅ 複合体は図 2 のような形で膜の上に存在することが示唆された。

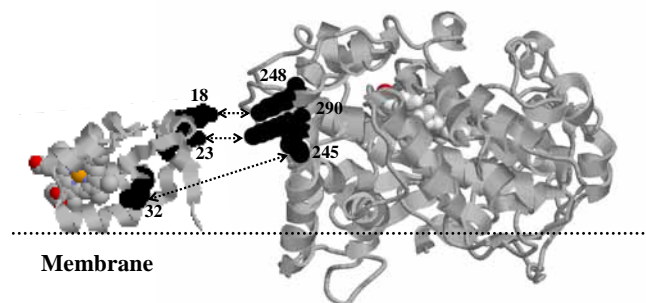


図2 P450 17 α -Cytochrome b₅複合体の膜内トポロジー解析結果