

効率的なジスルフィド結合形成によるシトクロム b_{562} 多量体の調製

(阪大院工) ○栗原 花怜・Julian Wong Soon・大洞 光司・林 高史

Preparation of cytochrome b_{562} oligomer by efficient disulfide bond formation (*Graduate School of Engineering, Osaka University*) ○Karen Kurihara, Julian Wong Soon, Koji Oohora, Takashi Hayashi

Inspired by natural protein assembling systems, artificial protein assemblies have been created using supramolecular interactions and/or dynamic covalent bonds.¹ Especially, a disulfide bond is useful due to its stable and reversible properties, whereas the formation of an interprotein disulfide bond is generally inefficient and uncontrollable, requiring the specific conditions such as crystal states.² In this work, an interprotein disulfide bond-exchange reaction of pyridyl sulfide-modified cysteine with a reactive thiol group (Fig. 1). Cytochrome b_{562} (Cyt), an electron transfer hemoprotein, was employed as a building block and the Asn80 residue was replaced with cysteine. The N80C mutant was reacted with 2,2'-dipyridyl disulfide to provide the pyridyl sulfide-modified protein. The obtained protein was further reacted with the N80C mutant quantitatively to form the disulfide dimer. The dimer was characterized by electrophoresis and mass spectrometry. When this strategy was applied to the double mutant of Cyt possessing two cysteine residues, the formation of the disulfide-linked oligomer was observed by electrophoresis.

Keywords : Hemoprotein; Biomaterials; Disulfide Bond; Protein Assembly

新しいタイプの生体材料を指向して、超分子相互作用や動的共有結合により連なった人工的なタンパク質集合体が報告されている¹。特にジスルフィド結合はその安定性と可逆性を両立したユニークな特性から、有用なタンパク質間相互作用である。しかし、タンパク質間におけるジスルフィド結合形成は非効率で制御が困難であり、結晶のような特殊な条件を必要とする²。そこで本研究では、ピリジルジスルフィドとシステイン間のジスルフィド結合と活性なチオールとの交換反応を利用して、効率的なタンパク質間ジスルフィド結合形成法の確立を試みた (Fig. 1)。

素材となるタンパク質として、単純な構造のヘムタンパク質であるシトクロム b_{562} (Cyt)を選択した。Asn80をシステインに変異した N80C 変異体を調製し、2,2'-ジピリジルジスルフィドと反応させると、ピリジルジスルフィドが結合した N80C 変異体が得られた。このタンパク質を単離し、N80C 変異体を反応させると、ジスルフィド二量体の定量的な形成が電気泳動と質量分析から示唆された。さらに、二つのシステインを有する Cyt の二重変異体を用いると、多量体が形成することを確認した。



Fig. 1. Disulfide dimer of cytochrome b_{562} via the reaction with 2,2'-dipyridyl disulfide.

1) J. Liu *et al.* *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 13571. 2) T. Ueno, *et al.* *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 1046.