

SDS-induced oligomerization of Lys49-phospholipase A₂ from snake venom

Scientific Reports, 9, 2330 (2019)

Takashi Matsui, Shizuka Kamata, Kentaro Ishii, Takahiro Maruno, Nouran Ghanem, Susumu Uchiyama, Koichi Kato, Atsuo Suzuki, Naoko Oda-Ueda, Tomohisa Ogawa, and Yoshikazu Tanaka

Summary

ハブなどの毒ヘビの毒液 (venom) 中には多様な同成分が存在する。毒液中の主要な毒素蛋白質であるフォスホリパーゼA₂ (PLA₂) は溶血毒性、神経毒性、心毒性、抗凝血性、抗血小板凝集阻害を示す。PLA₂ は多数の分子内S-S結合を有する安定な構造を形成する蛋白質で、S-S結合の組み合わせによって2つのグループに分けられる。さらにグループIIはフォスホリパーゼ活性残基である49残基目のアミノ酸の違いでさらに複数のサブグループに分ける。

グループIIに属するLys49-PLA₂ はフォスホリパーゼ活性をほとんど示さないものの筋壊死活性を示す。Lys49-PLA₂ はこれまで結晶構造解析から分子間S-S結合を有さない二量体化状態で存在すると考えられていた。しかし、S-S結合を非還元または還元させた状態でのSDS-PAGEの結果から、Lys49-PLA₂ には分子間にS-S結合を要する泳動結果を示すことが知られていた。

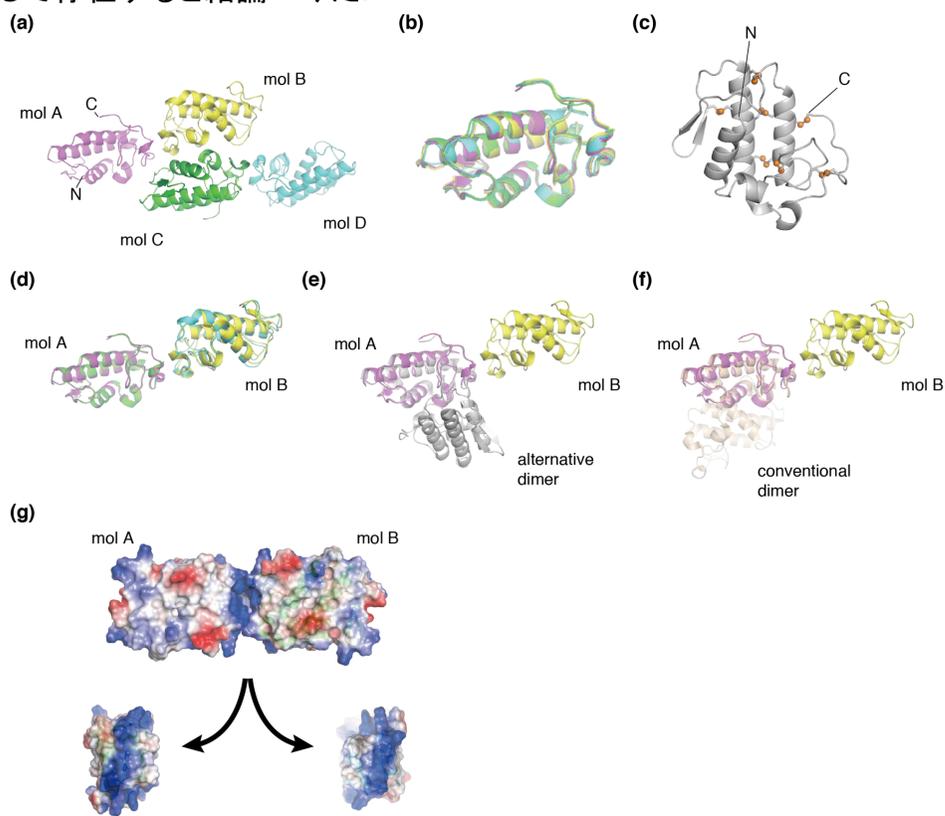
本研究では、この矛盾を解明するために *Protothirops flavoviridis* 由来Lys49-PLA₂ BPIIを用いてSDS-PAGEとX線結晶構造解析だけでなく、Native Massや分析用超遠心による包括的な物理化学的な解析を行った。その結果、Lys49-PLA₂ BPIIは溶液中および結晶中でも単量体として存在するものの、通常界面活性剤として蛋白質の変性に寄与するSDSによって多量体になることを明らかにした。

Lys49-PLA₂ BPIIの結晶構造

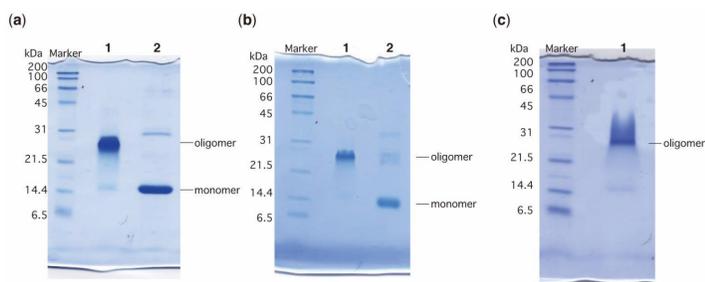
毒液から精製したLys49-PLA₂ BPIIは蒸気拡散法によって結晶を得ることに成功した。結晶中の非対称単位中には4分子のLys49-PLA₂ BPIIがほぼ同じ構造をとって存在していた。Lys49-PLA₂ BPIIに存在する、14個のCysはすべて分子内で7組のS-Sに結合を形成していた。また、非対称単位からは二量体が2組 (mol AとB, およびmol CとD) 存在するような配置が確認された。

既知の二量体構造とmol AとBについて構造を比較した結果、これまでに観測されている2分子間の相対配置とは異なる配置を取っていた。

しかし、mol AとB (またはmol CとD) の相互作用界面に注目すると、相互作用界面はともに正電荷に富んでおり、この相互作用は結晶化によるパッキングの影響であることが示唆され、結晶中のLys49 PLA₂ BPIIは単量体として存在すると結論づけた。



(a) 非対称単位中に存在する4分子のLys49-PLA₂ BPIIの結晶構造
(b) 非対称単位中の4分子の重ね合わせによる構造比較
(c) S-S結合 (硫黄原子をオレンジ色でボール表示)
(d) 分子A, BのペアとC, Dのペアの重ね合わせ
(e) 既知alternative dimer (PDB 2Q2J, 灰色)との重ね合わせ
(f) 既知conventional dimer (PDB 2Q2J, 小麦色)との重ね合わせ
(g) 分子AとB表面電荷分布及び接触界面の表面電荷分布 (赤で負電荷, 青で正電荷を示す)

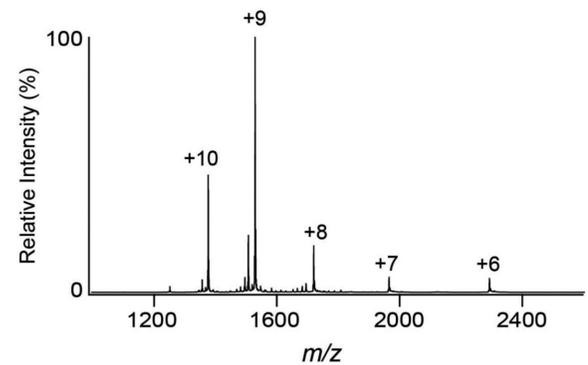


(a) 2-メルカプトエタノール未処理 (レーン1) と処理 (レーン2) での移動度
(b) 6 M尿素を加え非加熱 (レーン1) と加熱処理 (レーン2) での移動度
(c) 結晶を泳動した場合の移動度

溶液中でのLys49-PLA₂ BPIIの分子状態

結晶構造解析から、Lys49-PLA₂ BPIIは分子内S-S結合のみを持つ単量体として存在すると結論づけられたものの、SDS-PAGEでは分子間S-S結合を有する蛋白質に見られる泳動パターンを示した。また、Lys49-PLA₂ BPIIは変性剤である尿素に対しても非加熱状態では安定な構造を示した。また、結晶構造解析からは単量体として解析される結晶をSDS-PAGEで分析した結果、SDS-PAGEでは多量体として存在することが示唆され、結晶構造とSDS-PAGEには大きな矛盾が生じた。

そこで、Lys49-PLA₂ BPIIの溶液中での分子状態を確かめるため、Native massによる分子量の解析を行った。その結果、結晶構造同様にLys49-PLA₂ BPIIは単量体として溶液中でも存在することが明らかになった。したがって、SDS-PAGE によってLys49-PLA₂ BPIIが多量体化していることが示唆された。



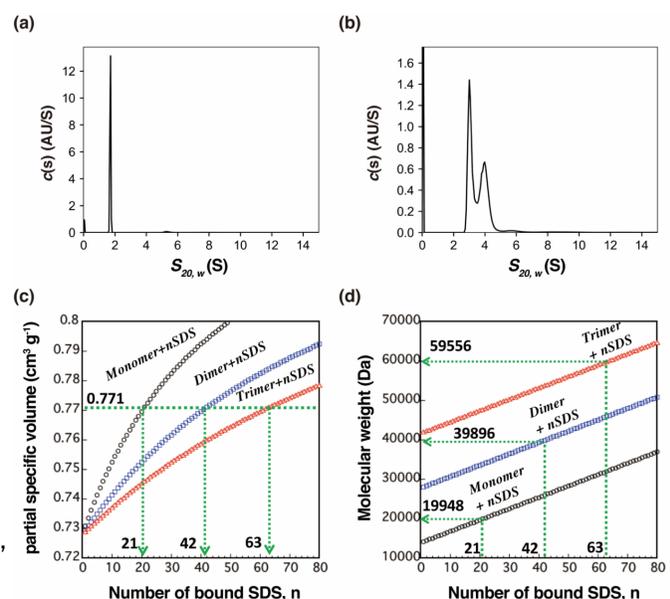
Lys49-PLA₂ BPIIのnative massスペクトル。ピーク上の数字は価数を示し、これらの価数から測定試料の分子量は13,753 Daであると推定された (単量体分子量は13,872 Da)

SDSによるLys49-PLA₂ BPIIの多量体化

SDSによるLys49-PLA₂ BPIIへの効果を調べるために、1% SDS有無で分析用超遠心による沈降係数を分析した。その結果、タンパク質変性剤の一種であるSDSによってLys49-PLA₂ BPIIが二量体または三量体として溶液中に存在することが明らかになった。

詳細な解析の結果、Lys49-PLA₂ BPII は SDS非存在下で単量体として存在するが、1% SDSにより二量体では42分子のSDSからなるミセルに、三量体では63分子のSDSからなるミセルと結合して存在した。

SDSはリン脂質のアナログであり、Lys49-PLA₂ BPIIは細胞膜へ結合することで筋壊死を引き起こすことから、このような多量体化が膜結合や金壊死に関与している可能性が示唆された。



Lys49-PLA₂ BPIIの (a) SDSなし、(b) SDSありでの沈降係数分布 SDS結合数における (c) 粒子比体積と (d) 分子量分布