

ペプチド系タグが蛋白質の活性・熱安定性・溶解度に及ぼす影響の研究		
黒田研究室	03251005	石井麻菜美

【背景・目的】

溶解度の低い蛋白質は高濃度のサンプルが必要とされる NMR や X 線結晶構造解析で測定が行えないという問題がある。本研究室の研究により、蛋白質の溶解度向上法として、塩基性アミノ酸のアルギニン (Arg) 数残基からなるペプチド系タグ付加の方法が開発され、その結果、Arg 5 残基付加により溶解度を向上させた。この Arg 残基の付加による溶解度の向上は、正電荷を持つ Arg 残基の付加による蛋白質 (塩基性蛋白質) の総電荷量の増加が、蛋白質分子間の静電相互作用を高め、蛋白質分子同士の会合形成を抑制したためと考えた。

そこで本研究では、ペプチド系タグ付加が蛋白質の溶解度・活性・熱安定性に与える影響の系統的解析 (I:塩基性残基付加による総電荷量増加、II:酸性残基付加による総電荷量減少、III:疎水性残基付加による総電荷量変化なし) によりペプチド系タグが溶解度変化に及ぼす影響の解明を目的とする。付加残基による電荷の影響を調べるためのペプチド系タグとして、酸性残基としてアスパラギン酸 (Asp)、疎水性残基としてイソロイシン (Ile) を用いた。

【方法】

BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor :ウシ膵臓トリプシン阻害蛋白質) の変異型である BPTI21-A14G/A38V を標準蛋白質とし、その C 末端に Arg, Asp, Ile の 3 種類のアミノ酸を、それぞれ 1, 3, 5 残基付加した変異体について、CD による熱安定性の測定、トリプシン阻害活性の測定、溶解度測定を行った。溶解度の測定は、以下の手順で行った。①凍結乾燥後の BPTI 変異体を 15mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で溶解。②サンプルを、Microcon YM-3 フィルターを用いて数回濃縮を行う。③サンプルに白濁が見られたところで回収し、20,000×g, 4°C で 1 時間遠心分離を行う。④上精濃度を UV 測定。この際の上精濃度を各変異体の溶解度と考えた。

【結果および考察】

本研究の溶解度測定においても以前の研究と同様、Arg 残基を 5 つ付加したことによって、溶解度が向上した。蛋白質への Asp と Ile 残基の付加については、若干溶解度の減少が見られた。

(Fig. 1) これは、塩基性蛋白質である BPTI21-A14G/A38V に酸性および疎水性アミノ酸を付加したことで、その総電荷量が減少したためと考える。よって蛋白質の溶解度は、ペプチド系タグ付加による蛋白質の総電荷の変化により決定されることが分かった。また、これらペプチド系タグの付加は、蛋白質の活性や熱安定性に影響しなかった。(Fig. 2, 3) しかしながら、Ile 残基を付加した蛋白質については、熱安定性が最大で約 14.5 度低下した。本研究で、蛋白質の総電荷と溶解度との関係が明らかになったことは、ペプチド系タグ付加による蛋白質の溶解度向上法の研究、さらには、蛋白質の溶解度および凝集現象を解明する上で重要な知見となると考えられる。

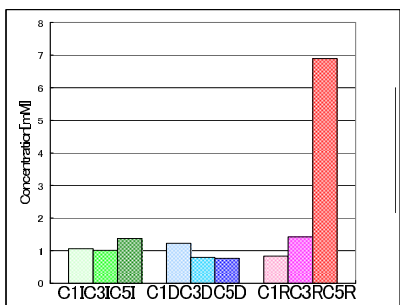


Fig.1 溶解度測定の結果

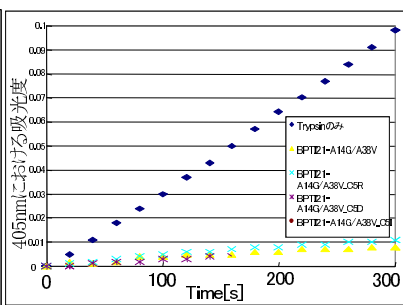


Fig.2 活性測定の結果

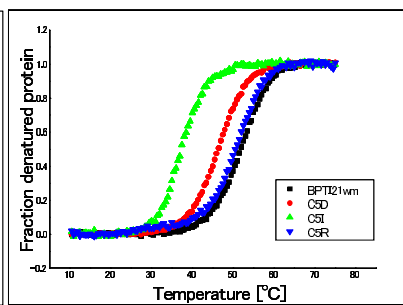


Fig.3 熱変性曲線