

1 及び 2 残基置換における熱安定化 BPTI の実験的解析

黒田研究室

学籍番号：06251026

小林 慶

〔背景・目的〕

タンパク質の安定性の向上は工学的に重要な研究分野のひとつである。従来から、スクリーニングなどの手法を用いて、酵素における熱や変性剤に対する安定性を向上させた例がいくつも報告されているが、タンパク質の安定化及び不安定化のメカニズムは未だ明らかにされていない。本研究でモデルタンパクとして用いる BPTI[5,55]Ala においては 14 及び 38 番目のアミノ酸を置換した変異体に熱安定化したものが報告されている。その結果、置換周辺におけるアミノ酸側鎖の衝突がタンパク質全体の熱安定性を低下させていると考えられた。そこで、本研究では、タンパク質の熱安定性を残基衝突の観点から系統的に解析することで両者の関係を解明することを目的とする。

〔実験方法〕

BPTI[5,55]Ala の 14 及び 38 番目の残基をそれぞれ、側鎖に水素原子しか持たないグリシン (以下 G)、最も小さい側鎖を持つアラニン (以下 A)、2 番目に小さい炭化水素基を持つバリン (以下 V) の 3 種類に置換し、合計 9 種類の変異体を作成した。これらの変異体に対し、円偏光二色性分光法 (CD)、CD による熱変性曲線及び活性測定を行なった。



Fig.1 BPTI の 14、38 番目の残基をそれぞれ赤、緑で示す。

〔結果・考察〕

残基衝突の観点から、熱安定性が下がると考えられていた、A14V/A38V (以下 VV) が新たに作成した 5 種類の変異体の中で最も高い熱安定性を示し、A14G/A38G (以下 GG) が二番目に高い熱安定性を示した (Table. 1)。この結果から、残基を V に置換すると 2 本のループ間の距離が広がり、立体障害を減少させたことによって安定化していると推測できる。GG に関しては、側鎖が水素原子だけなので立体障害が減少し、安定化につながっていると考えられる。全体として 14 番目の残基は G、V、A の順に、38 番目の残基は V、A、G の順に高い熱安定性を示した。38 番目の残基の側鎖は大きいほうが熱安定性的に優れていることが示唆された。これは先行研究において、38 番目を A から V に置換した際に ΔS が減少したことにより熱安定化が生じた結果と一致する。また、以下に示した活性測定の結果より、すべての変異体においてある程度のトリプシン阻害活性が見られたことから、変異体が BPTI の構造を維持していることが示唆された (Fig.2)。14 番目に V を持つ変異体が他の変異体と比べて活性が低下しているのは、上記で説明したようにループ構造が広がったことによるものだと推測される。

以上より、残基の衝突が、タンパク質の熱安定性の低下に寄与していると断定することはできなかった。これは、仮説において主鎖構造を固定して残基衝突の予測を行なっていたために、正確に定量化することができなかったためであると考えられる。これにより置換した残基の立体障害を、既存の結晶構造からは正確に予測することができないことが示唆された。しかしながら、立体障害を引き起こすようなアミノ酸の置換は、タンパク質の立体構造に小さな変化を引き起こすものの、分子内においては安定性を大きく減少させるような結果とはならないことが示唆された。今後、熱安定性の向上がどのようなメカニズムによるものであるのか、さらに解析を進める必要がある。

14 \ 38	G	A	V
A	40.2	40.0	46.0
V	43.1	44.4	50.9
G	48.5	52.6	55.1

Table.1 熱変性中間温度結果 (°C)
縦に 14 番目、横に 38 番目の残基を示す。

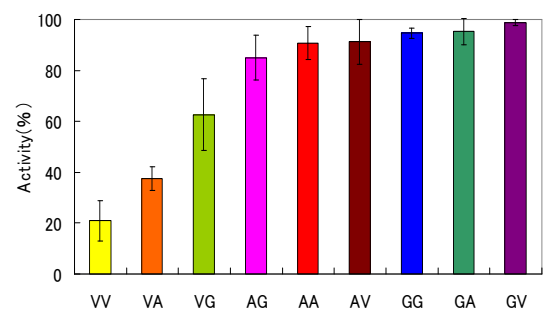


Fig.2 活性測定結果
略称は順に 14 番目、38 番目のアミノ酸を示す。