

L1113-02	タンパク質溶解性の解明を目的としたペプチドの溶解度測定プロトコルの開発				
	氏名	島田広海	主査	黒田裕	副査

《背景・目的》

タンパク質の凝集形成及び溶解度の解明は、学術的にも生命工学的観点からも重要な意味を持っている。本研究室では、モデルとなるタンパク質・ペプチドのC末端に単一のアミノ酸からなるタグ配列を付加し、その溶解度を測定、比較することで、各アミノ酸の溶解度への影響を調べるといった研究が行われてきた。しかし、BPTIの変異体であるBPTI21WMをモデルとして用いた場合、このタンパク質が塩基性であったため、酸性アミノ酸タグを付加した際に溶解度が低下し、真のアミノ酸の影響は調べられなかった。この結果を受けて、電荷を持たないなどの条件を満たすよう設計されたペプチドをモデルとして同様の実験を行った。しかし新たに用いたペプチドは、不可逆性のゲルを形成する、測定値に再現性が無いという問題が生じたため、正しい溶解度を測定することができなかった。

そこで本研究では、ゲルを形成するペプチドの溶解度測定法の開発を目的とし、新しい測定法を用いて各アミノ酸タグを付加した変異体の溶解度を測定し、再現性などの検討を行った。

《研究方法》

各アミノ酸の影響を調べるため、モデルとなる19残基の短いペプチドPep19(WSCNNFASAASAGAACA AA)のC末端にn個(n=1~3)のアスパラギン酸を付加した変異体Pep19CnD、同様にアルギニンを付加した変異体Pep19CnR、イソロイシンを付加した変異体Pep19CnIを作成した。

これまでの研究では、緩衝液に大量のサンプルを溶解させた後遠心分離を行い、上清画分の濃度を溶解度と定義していた。新しい測定法では、ゲル化するまでの濃度変化を追跡できるように、少量のサンプルペプチドを段階的に溶解させた。手順としては、まず少量のペプチドを緩衝液に溶解させ、濃度を測定した。次に遠心分離を行い、上清画分をフィルターに通してから濃度測定を行った。その後、上清に再び少量のペプチドを溶解させ、濃度の測定、遠心分離、フィルター、濃度の測定という手順を繰り返した。最終的に、得られた遠心分離前の濃度とフィルター後の濃度の相関関係を調べた。

《結果・考察》

フィルター後のサンプル濃度は溶かす量に比例して上昇するが、一定の値まで到達するとそれ以上増えなくなり、その後ゲルを形成したため下降した(Figure 1.)。そこで、ゲルを形成する前の最も高い位置の濃度を溶解度と定義した。この溶解度の再現性を検証したところ、ある程度の誤差が見られるものの再現性が得られることが分かった。この誤差は、サンプルを段階的に溶解させる際、ゲル形成の直前の濃度までどれだけ近づけることができるかという違いに起因するものと推測される。そのため、より正確な溶解度を求めるためには、溶解度の概算値を出した後に、その付近で細かく濃度を振って再度測定を行う必要がある。

この測定法によって各変異体の溶解度の測定を行ったところ、Dタグ変異体の溶解度は、タグが長くなるにつれて溶解度が高くなった(Table 1.)。また、Rタグ変異体の溶解度でも同様に、タグの長さに比例して溶解度が上昇したが、上昇の度合いはDタグ変異体よりも大きかった。

これらの結果から、この方法で不可逆的なゲルを形成するペプチドの溶解度を測定することは可能であると考えられる。また、同じ荷電アミノ酸でも、アスパラギン酸とアルギニンでは溶解度を上昇させる度合いが異なることが示された。今後は、他のアミノ酸タグを付加した変異体に対しても溶解度の測定を行い、各アミノ酸の影響を明らかにすることが望まれる。

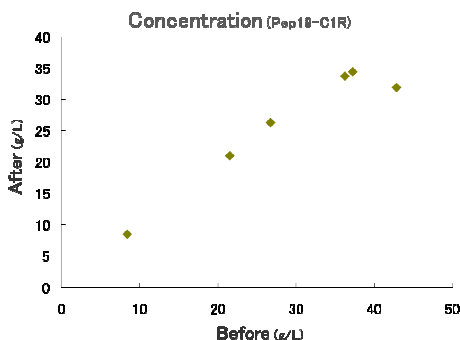


Figure 1. 濃度の相関関係

Table 1. pH7.5における溶解度

Sample name	Solubility 1st (g/L)	Solubility 2nd (g/L)
Pep19NoTag	1.0	-
Pep19-C1D	2.1	2.3
Pep19-C2D	2.6	-
Pep19-C3D	3.6	-
Pep19-C1R	24	-
Pep19-C2R	33	-
Pep19-C3R	54+	-