

L-111215	ヘテロシーディング法を用いた少数残基置換BPTI変異体の解析				
	氏名	小林 慶	主査	黒田 裕	副査

[背景・目的]

タンパク質が高温で機能発現するための設計技術は産業的に有用な技術であると期待されているが、タンパク質の熱安定化メカニズムは未だに解明されていない。本研究では、1, 2残基置換によって生じる残基衝突がタンパク質の熱安定性に与える影響を走査型熱吸収計測 (DSC) と X 線結晶構造解析法を用いて調べることを目的とした。本研究では、わずかに、二残基の置換で熱安定性が約 13°C 変化する 58 残基から成る BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) [5,55] をモデルタンパク質 (図 1) に用い、置換基周辺における側鎖の衝突と熱安定性の関係を詳細に解析した。

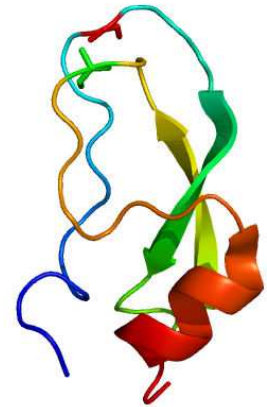


図1 BPTI [5,55]A14Gの結晶構造。
赤：14番目の残基
緑：38番目の残基

[実験方法]

BPTI[5,55]の14, 38番目の残基をそれぞれ、グリシン (以下G)、アラニン (A)、バリン (V) に置換した変異体を作製した。また14番目をG、38

番目をロイシン (L)、イソロイシン (I)、リシン (K) に置換し、合計で12種類の変異体を作製した。それぞれの変異体に対し、熱安定性 ($T_m, \Delta H$) と結晶構造を求めた。

[結果・考察]

熱測定の結果、14番目の残基はG、V、Aの順に、38番目の残基はV、A、Gの順に安定であった (表1)。また14番目がGに置換された6種類の変異体においては、38番目の残基がI、L、V、A、K、Gの順に安定であった。14番目がGの変異体が他の変異体と比べて熱安定性が高いのは、側鎖が小さくなったことで立体障害が減少したことによりエンタルピーが増加し (表1)、熱安定性が向上したと解釈ができる。一方、14と38番目にVを有する変異体は、側鎖構造のモデリングを基に原子間衝突が多く生じると予測されたにも関わらず熱安定性が高かった。この場合、エンタルピーは殆ど増加していないため (表1)、安定化の主な要因はエントロピーにあると示唆される。

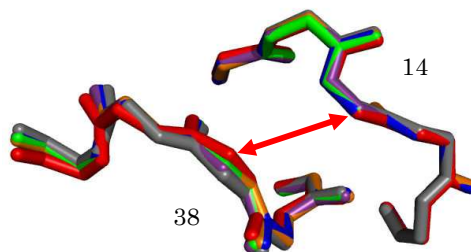
構造解析に於いて、全変異体の結晶化を試みたが結晶化条件が大きく変わる変異体も多く存在し、大量の時間と試料が必要となった。そこで本研究室で開発中のヘテロシーディング法を試みたところ、14番目にGを有する変異体の全ての結晶を得ることに成功し、結晶構造を決定できた。ヘテロシーディング法とは、結晶化に成功した変異体の結晶 (ここでは、G14A38 変異体) を目的の変異体のマイクロシードに用い、結晶化を促す手法である (本来、マイクロシードには同じタンパク質の微結晶を使用するのが定説である)。結晶化条件を探す手間がかからず高分解能の構造情報が得られるため、少数残基置換による機能と構造の変化を議論するのに適した手法である。熱安定性とエンタルピー変化が高い変異体が結晶化しやすいことも本研究から示唆された。従来にも同様の仮説はされていたが、この考えが系統的な解析に基づいて示唆されたのは初めてである。

さらに、上記6種類の変異体構造から14, 38番目の残基のC α 間距離に最大0.5Å (距離の10%) の差が生じていることが明らかになった。この結果は、側鎖の大きさと形に応じてループ間の距離が調節されていると解釈される (図2)。以上より、置換基の衝突を野生型の結晶構造から見積もり、熱安定性を予測することは難しいことが示唆された。原子間衝突が起きる変異体でも、側鎖原子の衝突を避けるように主鎖構造が小さく変化することが示唆されたためである。

表1 各変異体の T_m 値、 ΔH を示す。略称は順に14, 38番目の残基を示す。

略称	AG	AA	AV	VG	VA	VV	GG	GA	GV	GL	GI	GK
T_m	310.8	312.5	316.7	313.1	316.2	324.4	322.6	325.6	326.9	327.7	329.7	323.9
ΔH	146.5	152.2	160.8	153.0	153.4	194.2	201.6	217.8	227.3	234.4	241.8	227.4

- GG:青
- GA:緑
- GV:紫
- GL:赤
- GI:灰
- GK:橙



略称	C α 間距離(Å)
GG	5.08
GA	5.15
GV	5.26
GL	4.98
GI	5.48

図2 各変異体の結晶構造と14, 38番目の残基のC α 間の距離を示す。略称は順に14, 38番目の残基を示す。