

BPTI 変異体の温度変性による可逆的な会合体形成の生物物理学的解析		
黒田研究室	学籍番号： 09251082	和智 友香

【背景・目的】

タンパク質は不要になるとすぐに不活性化できるように、天然状態と変性状態のエネルギー差が非常に小さい。そのため温度や pH などの外的環境の些細な変化によって容易に変性する。変性したタンパク質は、不可逆的に凝集しやすく、タンパク質を扱う上で大きな障害となっており、近年では複数の疾患の原因であることが明らかになっている。凝集は主に変性したタンパク質の露出した疎水性残基同士の相互作用によることが知られているが、タンパク質の多様性から、普遍的で詳細な機構は未だに解明されていない。凝集を人工的に制御するために、凝集時にタンパク質がどのように相互作用しているのかについて、多くの知見を蓄える必要がある。本研究では、末端にイソロイシン残基（タグ）を数個付加した BPTI-19 をモデル球状タンパク質用に用いて、付加した疎水性のタグ配列が凝集に及ぼす影響を、円偏光二色性分光法（CD）および示差走査型熱量測定（DSC）で解析した。

【研究方法】

BPTI-19 の C 末端にグリシン 2 残基（リンカー）を付加した変異体（C2G）を基準タンパク質に用いた。リンカーに続いてイソロイシンを 1,3,5 残基、付加した変異体（C1I, C3I, C5I）を大腸菌で発現し、逆相 HPLC で精製した。その後 MALDI-TOF により各変異体の純度を確認した。CD と DSC を用いて、変異体の二次構造含量と熱安定性を測定した。

【結果及び考察】

4 つの変異体で、BPTI-19 C2G が最も熱安定性が高く、付加したイソロイシンの数が増加するにつれて不安定化した（図 A）。タグと BPTI 本体との間に相互作用はないので、これは疎水性相互作用によるものと考えられる。複数の濃度で CD スペクトルを測定したところ、BPTI-19 C5I では濃度の増加とともに二次構造含量が減少した（図 B）。スペクトルの形を維持したままシグナル強度だけが減少するのは、会合体を形成して見かけの濃度が減少するためだと考えられる。この現象は他の変異体には見られなかった。同一サンプルの濃度を変化させて測定することで、可逆的な反応であることを確認した。

DSC 測定ではさらに高濃度での変性に伴う熱容量変化の測定を行い、BPTI-19 C5I にのみ、可逆的な熱変性の濃度依存性を確認した。これらの結果より、BPTI-19 C5I は、変性状態で不可逆的に凝集するのではなく、 $nN \rightleftharpoons D_n$ のような基本モデルに従って可逆的に会合することが示された。このような高温・変性状態での可逆的な会合が観測されたのは初めてであり、タンパク質の凝集に対する理解を深める一助となるだろう。

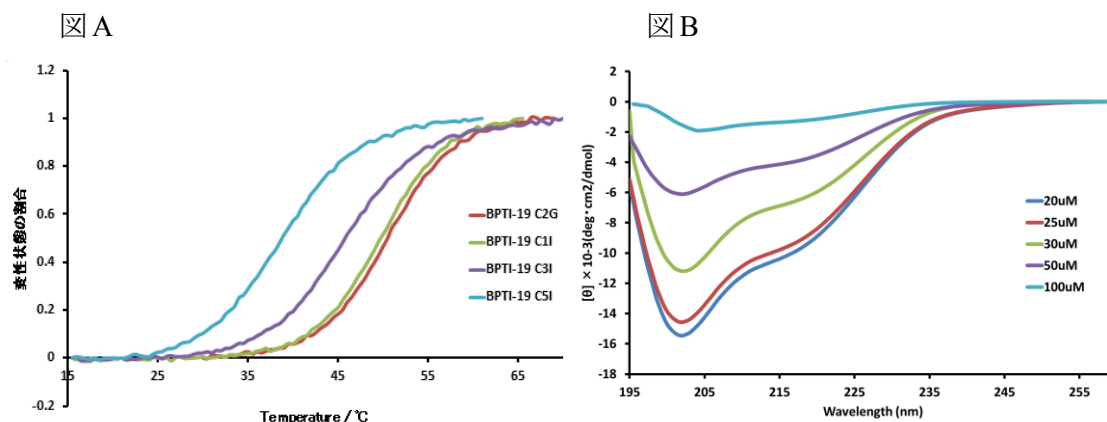


図 A：5 つの変異体の熱変性曲線を示す。BPTI-19 の Tm は 52.7°C、BPTI-19 C5I の Tm は 37.6°C であった。図 B：BPTI-19 C5I の 20~100μM での CD スペクトルを示す。濃度が上昇するに伴い、シグナル強度が減少している。