

L1111-08	分子シミュレーションを用いたタンパク質の溶解性評価				
	氏名	小須田慧司	主査	黒田	副査

【 背景・目的 】

タンパク質の活性を維持するためには凝集を防ぐ必要があり、それにはタンパク質凝集機構の物理化学的理解が必須である。先行研究において、ペプチド断片の凝集をシミュレーションによって観察し、ペプチドを構成するアミノ酸の種類によって凝集性に与える影響が異なることが明らかにされた。しかし、多くのアミノ酸から成るタンパク質の凝集メカニズムは、短いペプチドの凝集では再現しきれない複雑な側面を持つと考えられる。本研究は、タンパク質そのものの凝集を分子レベルで観察・解析することを目的として、当研究室で溶解性実験に用いられているタンパク質をシミュレーションの対象とした。

【 方法 】

BPTI タンパク質、抗 His-tag / 抗 EpCAM scFv 抗体を計算対象とした。Gly リンカーとそれ以外の単一アミノ酸 5 残基もしくは 9 残基をペプチドタグとして C 末端に付加したタンパク質の構造座標を作成した。各タンパク質モデルを 205 個配置し、イオン強度 300 mM, 5.2 M に設定した系について 500 ns のブラウン力学シミュレーションを行ない、0.5 ns 毎に出力された 1000 個の座標情報を解析した。タンパク質同士の原子間距離が 3.6 Å 以内にあるとき、それらのタンパク質をクラスターと定義した。**BPTI** 変異体のクラスター状態を解析し、溶解性測定結果と比較した。また、scFv についてはタンパク質間の接触面を解析し、溶解性を向上させるような変異について予測を行なった。

【 結果および考察 】

BPTI イオン強度 300mM において、Arg 5 残基から成るペプチドタグを付加した **BPTI** 変異体は、野生型 **BPTI** よりも単量体の割合が増えた。一方で、Asp や Ile から成るペプチドを付加した変異体では、野生型では見られないような 10 量体以上の大きなクラスター形成が見られた。タンパク質間接触面の解析により、タンパク質表面とペプチドタグ間での静電相互作用や、ペプチドタグ同士の疎水性相互作用がクラスター形成に大きく影響することが示された。イオン強度 5.2 M においては、静電相互作用による反発が損なわれ、ペプチドタグによる接触が増加したため、タグを持たない野生型 **BPTI** のほうが高い溶解性を示した。一方で、電荷を持つペプチドタグを付加してもあまり凝集せず、疎水性タグを付加した変異体では強い凝集が見られたという点で、実験結果と同様の傾向を示した (図 1)。以上より、ペプチドタグがタンパク質の溶解性に与える影響についてシミュレーションにおいても実験と同様に観察できることが示された。

scFv イオン強度 300 mM において、抗 His-tag 抗体では、9 残基の Arg を含むペプチドタグを付加し、正電荷を増やすことで、溶解性の向上が見られた。一方で、抗 EpCAM 抗体では 9 残基の Asp を付加し負電荷を増やしても、溶解性は向上しなかった。タンパク質間の接触面について解析したところ、ドメインリンカー領域で頻繁に接触が生じ、クラスターを形成していることが明らかになった。そこで、リンカー領域の一部を Asp 残基に置換したところ、溶解性が向上した (図 2)。以上のように、本手法を用いることでタンパク質の溶解性を向上させるような変異について予測した。

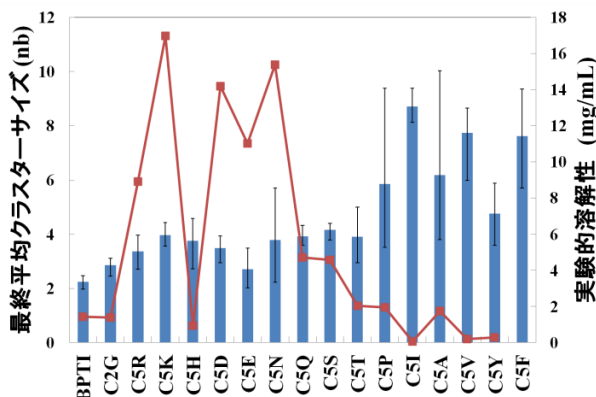


図 1. クラスター形成(青)と実験結果(赤)との比較

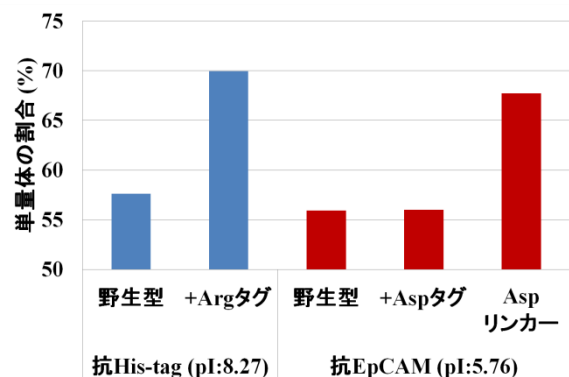


図 2. scFv 溶解性予測