

分子シミュレーション及び実験による Anti-EGFR scfv の溶解性予測と評価		
黒田研究室	学籍番号：14251060	廣瀬 克彦

【背景・目的】

タンパク質機能・構造解析において、高濃度・高純度のタンパク質溶液が必要である。タンパク質の溶解条件はそれぞれ異なり、それを実験的に解析するには時間やコストの面で困難である。そこで、シミュレーションを用いたタンパク質の溶解性を予測する簡便な手法の開発が急務である。本研究では、タンパク質の溶解度を予測する新規手法を開発している。そのため、水分子を明示的に含み正確性の高い全原子分子動力学シミュレーション（以下：MD）により複数の立体構造を抽出、これを水中内での様々な立体構造と仮定し、タイムスケールが大きくタンパク質凝集解析に適したブラウン動力学シミュレーション（以下 BD）を組み合わせ、水中モデル内での挙動として解析を行う。今回用いる計算的手法とモデルタンパク質の溶解性実験との比較から、溶解性予測手法の評価を行った。

【手法】

本研究では、不溶性の Anti-EGFR scfv の野生型（以下 wt）と当研究室で用いられている G(GRRR)₃ から成る溶解性を向上させる C9R タグ(以下、タグ)を C 末端に付加した Anti-EGFR-C9R(以下、C9R)、先行研究によりリンカー領域にアルギニンを置換し、タグを付加した Anti-EGFR-2.2.2-C9R(以下 2.2.2-C9R)、Anti-EGFR-1.4.1-C9R（以下 1.4.1-C9R）とタグを付加していない Anti-EGFR-1.4.1（以下 1,4,1）、Anti-EGFR-2.2.2（以下 2.2.2）の 5 つの変異体をモデルとした。計算的手法として、MODELLER を用いて PDB データ（ID：5 KOV）を鋳型に、それぞれの立体構造を予測し、エネルギー極小化を行った。タグが付いた 3 つの変異体 1 分子の MD を 30ns 行い、0.1ns ごとに出力した 300 個の構造に対して構造の揺らぎを主成分分析し、3 ns ごとに 1 つの構造をランダムに選択し、合計 10 個の構造を選んだ。タグのない変異体は 10 構造の座標データからタグを削除し、作製した。各モデルタンパク質を 110 個、pH=7.0、イオン強度 150mM、温度 25°C、タンパク質濃度 20mg/ml で 500ns の BD を行い、0.5ns ごとに得られた 1000 個の構造を解析した。タンパク質同士が 3.6Å 以内にある場合をクラスターと定義した。10 個の構造すべて BD を行い、時間当たりの平均クラスターサイズ、200~500ns 間に形成される多量体の割合を解析した。

実験検証には、BL21(DE3)pLysS に各変異体を含む pET15b を発現させた。培養条件は 20,25,31,37 度、発現誘導後 2,4,6,8 時間のサンプルを分取し SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE の結果を Image J を用いて、解析を行った。

【結果・考察】

計算機実験の結果から、200~500ns 間に単量体として存在する割合は、wt と比較して 1.4.1-C9R、2.2.2-C9R で向上した。タグの付加のみ、またリンカー領域に変異を導入しただけの場合、単量体の割合の向上は見られず、両者を導入した場合に向上することが明らかとなった（図 1）。実験結果から、培養条件 25°C の発現誘導後 2 時間後の推定タンパク質濃度は wt と比較したところ、C9R、1.4.1-C9R、2.2.2-C9R は増加した。これは、変異を導入することで溶解性が向上したと考えられ、シミュレーションの結果と一致する。しかし、発現誘導後の経過時間によりシミュレーションとは異なる結果になる場合がある。この原因として、BD では静電的な相互作用が大きく影響することが挙げられる。以上より、部分的な溶解性予測が可能であった。

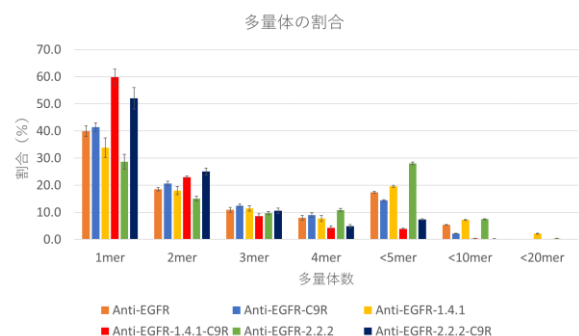


図 1、単量体の割合