

アミノ酸配列を単純化した変異体タンパク質の熱力学的な安定性評価		
黒田研究室	02251072	村上さおり

【背景・目的】

最近の研究から、タンパク質のアミノ酸配列中の特定の残基をスペーサー役アミノ酸に置換し、配列を単純化することが可能であると示された。当研究室でも、仔牛すい臓トリプシンインヒビター(BPTI)を用いて、そのアミノ酸配列を約半分のスペーサー役の Ala で表記し、野生型 BPTI と同じ活性と構造を有することを示した。その結果、配列中に Ala を 21 コ含む単純型 BPTI (BPTI21) が得られた。しかし、その熱安定性は低く更なる物理化学的解析には安定性の向上が求められる。なお、BPTI21 は野生型 BPTI と比較して 100%トリプシン阻害活性を保持している。

そこで、本研究では、BPTI21 の安定性をA14G/A38Vの置換で向上させることを試みた。A14G及びA38Vの置換は、BPTI-[5,55] (5 残基と 55 残基のS-S結合のみを保持した変異体) で安定性が向上した研究をもとにしている¹⁾。さらに、BPTI21-A14G/A38Vの安定化機構を探るため、BPTI21-A14G、BPTI21-A38Vの解析も行った。

【方法】

当研究室で保持しているBPTI21 発現ベクターに目的の点変異をPCRで導入した。目的の変異体タンパク質は大腸菌で発現させHPLCで精製し、TOF-MSで確認した。DSC(示差走査型熱量測定)での熱変曲線から T_m 値や熱変性に伴う ΔH_{cal} を得た。これらの熱力学的パラメーターを用いて、熱安定性について解析・評価を行った。さらに、トリプシン阻害活性測定も行った。

【結果と考察】

トリプシン阻害活性測定より、全ての変異体タンパク質が阻害活性を持っていたので野生型BPTIと同様の構造を形成していると考えられる。熱測定からは、変異体BPTIは熱変性過程に中間体を持たない二状態転移をすることを ΔH_{cal} と ΔH_{vH} の比較から明らかにした。また、BPTI21 へA14G/A38Vの置換を行うことで T_m 値が 13.8°C、 ΔH_{cal} が 74kJ/mol と非常に上昇したことが確認された(Fig 1, Fig 2)。この結果は、BPTI21 A14G/A38Vの安定性向上の原因が ΔH_{cal} であると示唆され、BPTI-[5,55] で得られている実験結果と同様であった。さらに、BPTI21-A14Gの置換がBPTI21-A14G/A38Vの安定性を大きく向上させたことがわかる (Fig 2)。

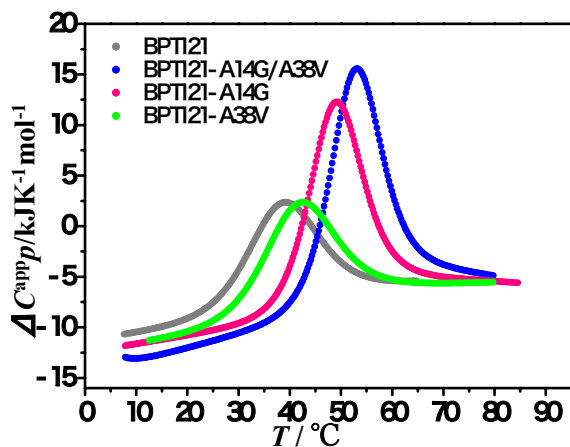


Fig 1 : DSC による変異体 BPTI の熱変性曲線

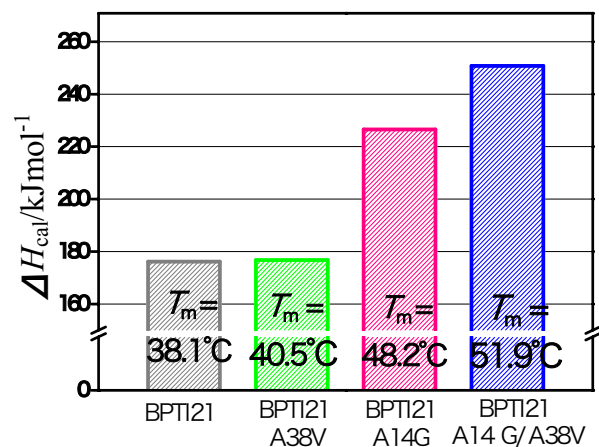


Fig 2 : DSC による変異体BPTIの ΔH_{cal} と T_m 値

1) Hagihara, Y., et al., *J. Biol. Chem.*, **277**(52), 51043-8. (2002).