

タグ配列の付加がタンパク質の溶解度に及ぼす影響の研究		
黒田研究室	学籍番号： 04251018	太田 勇輝

【背景・目的】

タンパク質の溶解性は、凝集形成を左右する重要な性質である。従来から、アフィニティータグである Glutathione S-transferase (GST) タグや Maltose Binding Protein (MBP) タグが凝集形成を防ぎタンパク質の溶解性を向上させるとの報告がある。このようにタンパク質の溶解性はタグの付加により変動するという事が確認されているにもかかわらず、タグの配列が溶解性に与える影響はあまり理解されていない。また、本研究室で Arg や Lys を連続させた 5 残基の短いタグ配列を付加することによってタンパク質の溶解度が向上することが確認されている。本研究では、7 種のアミノ酸からなるタグ配列がタンパク質の溶解性に与える効果を系統的に解析した。

【方法】

モデルタンパク質としてウシ膵臓トリプシン阻害物質 (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor: BPTI) の変異体であり疎水性が高い BPTI-21WM を用いた。その C 末端に、正電荷を持つ Arg と Lys と His、負電荷を持つ Asp、疎水性の Ile、親水性の Asn と Ser の 7 種のアミノ酸をタグ配列として 1、3、5 残基付加させた (Fig. 1)。緩衝液中で凝集現象が見られたサンプルを遠心分離して、上清画分の濃度を溶解度と定めた。アミノ酸を付加していない BPTI-21WM の溶解度を 1 と定め、それに対する各変異体の溶解度の比から溶解度指数を算出した。また、タグ配列がモデルタンパク質の機能や構造に与える影響を調べるために、活性測定及び Circular Dichroism (CD) による熱安定性測定を行った。

アミノ酸の付加数

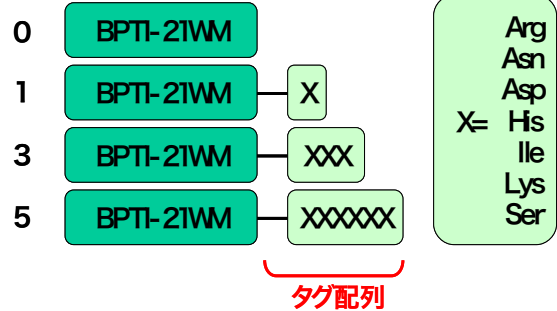


Fig. 1 タグ配列を付加した BPTI-21WM

【結果・考察】

Arg、Lys、His タグ配列を付加した変異体はアミノ酸付加数に応じた溶解度の向上が見られた。一方で、Asp タグ配列を付加した変異体の溶解度は 100 分の 1 まで減少した。他のアミノ酸からなるタグ配列においては溶解度が少し減少した (Fig. 2)。His タグ配列を付加した変異体は Arg や Lys に比べ正電荷による溶解度向上効果が少なく、His の pK 値が中性付近であることが起因しているものと考えられる。また、Asp タグ配列自身は負電荷を帯びているので、塩基性タンパク質である BPTI 変異体の表面にある正電荷アミノ酸と静電相互作用を起しやすくなったために、表面電荷が失われ、溶解度の低下に繋がったと考えられる。さらに、Asp タグ配列は熱安定性においても低下が見られた。これは、温度を上げていく際にも、同様の力が働き、構造が崩れやすくなってしまったものと考えられる。

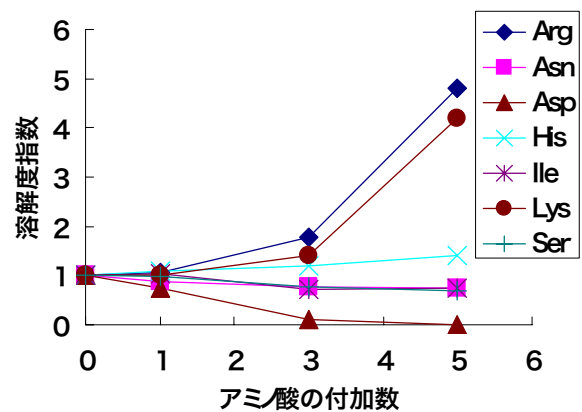


Fig. 2 溶解度測定結果