

# タンパク質の末端に付加した少数残基が凝集体形成に及ぼす影響の解析

黒田研究室

学籍番号：10251032

如澤浩樹

## [背景・目的]

疾病の原因になり得るタンパク質凝集のメカニズムを理解することは、タンパク質工学や医学および創薬の分野にまたがる重要な研究テーマである。本研究では、モデルタンパク質として、ウシ膵臓トリプシン阻害タンパク質 (BPTI)の末端に付加したアミノ酸がタンパク質の塩依存的凝集体形成に及ぼす影響と、凝集体形成機構を解析することを目的とした。

## [研究方法]

BPTI の C 末端にグリシン 2 残基を付加した変異体 (C2G) と、その先に同一のアミノ酸を 5 個付加した変異体 (C5A (疎水性)、C5S (親水性)、C5D (負電荷)) を蛍光色素 (FAM) で標識したものをを用いた。これらの変異体は、先行研究により溶解性が異なることが示されている[1]。本研究では、動的光散乱測定 (DLS) と光散乱測定 (LS) および蛍光測定を行うことで、凝集体形成の NaCl 濃度依存性および時間依存性を解析し、変異体間で比較した。また、異なる蛍光色素 (FAM, Cy3) で標識した BPTI 変異体を用いた FRET 測定により、NaCl 非存在下の可溶性状態におけるタンパク質間の相互作用を調べた。

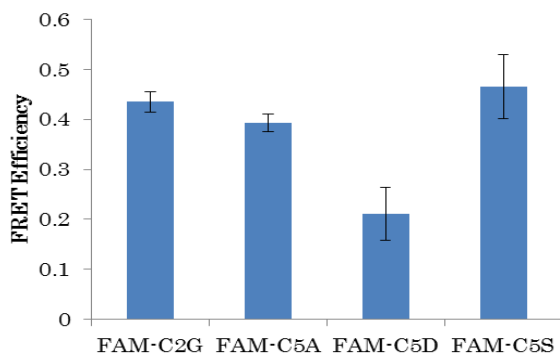
## [結果・考察]

まず、DLS、LS により凝集性の塩濃度依存性を調べたところ、各変異体はある塩濃度以上で凝集体の形成が始まり、塩濃度依存的に凝集量が増加し、最終的に 1500nm を超える巨大な凝集体を形成した。凝集のしやすさは、FAM-C2G > FAM-C5A = FAM-C5S > FAM-C5D となった。1.5M NaCl 存在下では、FAM-C2G、FAM-C5A および FAM-C5S の凝集量は同程度であったが、FAM-C5D は凝集しなかった。これは、アスパラギン酸の負電荷によるタンパク質同士の反発によるためであると考えられる。

次に、NaCl 非存在下の可溶性状態における FRET 測定を行うことで、溶液中での単量体タンパク質同士の相互作用の強さを調べた (図 1)。FAM-C2G、FAM-C5A および FAM-C5S の FRET 効率は FAM-C5D のそれよりも高かったことから、はじめの 3 つの変異体は、FAM-C5D よりも相互作用が強いことが分かった。このことは、溶液中での単量体タンパク質同士の相互作用の違いがタンパク質の塩存在下における凝集体形成に影響を与えることを示唆している。

さらに、1.5M NaCl 存在下での凝集体形成の初期における時間変化を蛍光測定 (図 2)、DLS、LS により調べたところ、凝集体形成過程には「会合体形成過程」と「凝集体成長過程」の 2 つが存在することが分かった。「会合体形成過程」とは、塩添加直後にタンパク質同士の相互作用が増加して会合体が形成される過程であり、開始 10 分後までの蛍光強度の低下によって観測された。「凝集体形成過程」は、これらの会合体が組み合わさることで 1500nm を超える巨大な凝集体を形成する過程である。会合体形成の段階で蛍光強度の低下が大きかった FAM-C2G は、非常に大きな会合体を形成していたため、その後の凝集体成長が早く進んだ。一方、蛍光強度低下が最も少なかった FAM-C5D に関しては、会合体形成は起きているがその会合体が小さかったため、凝集が進行しなかったと考えられる。

1. Khan, M.A., M.M. Islam, and Y. Kuroda, *Analysis of protein aggregation kinetics using short amino acid peptide tags*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2013. **1834**(10): p.



2107-2115.

