

BPTI 変異体を用いたアミノ酸の溶解傾向性の測定		
黒田研究室	学籍番号：12251017	岡本 紳太郎

【背景・目的】

タンパク質の産業的利用でしばしば問題となるのが凝集体の形成である。本研究室では、単純化したウシ脚蔵トリプシン阻害タンパク質 (BPTI) 変異体のC末端に、SEP タグと呼ばれる、グリシン2残基を同一種類のアミノ酸5残基とつなげたタグ(あるアミノ酸Xを用いたSEP タグを付加したBPTIをC5Xと呼ぶ)を付加し、溶解性への影響を調べてきた。先行研究において、塩析を起こさせるために硫酸アンモニウムを用いて16種類の異なるアミノ酸によるSEP タグ付加によるBPTIの溶解性変化が測定されたが先行研究ではC5I、C5L、C5V、C5Yなどの難溶性タグはほとんど沈殿してしまった。そこで本研究ではより塩析の強さが低いとされている塩化ナトリウムを用いることで難溶性タグの影響を中心に解析した。

【研究方法】

BPTI変異体をpH4.7およびpH7.7の2つの条件下でタンパク質濃度を変えたサンプルをそれぞれ調整した。C5I、C5L、C5V、C5Y、C5H、C5P、C5D、C5R、そしてタグを付加していないC2Gを終濃度300mMのNaClで凝集を促進させて25°Cで一定時間静置し、遠心分離(20min, 20000g, 25°C)した後の上清のタンパク質濃度を測定した。なお、静置時間は20分、2時間、6時間、12時間、24時間、48時間で行った。そして測定した上清濃度を各変異体の溶解性とした。先行研究の結果と比較するため、Transient Solubility (TS)、Aggregation Initiation Concentration (AIC)、Long-term Solubility (LS)測定した。AICは、48時間静置した後沈殿が見られない最も高いタンパク質濃度で、LSは48時間静置した後上清のタンパク濃度が一番低い濃度のことである。TSは、20minでの測定で上清画分のタンパク質濃度が最も高い濃度のことである。

【結果及び考察】

先行研究ではすべて沈殿してしまい差が見られなかった難溶性タグについては、時間経過により凝集が観測された(上清画分のタンパク質濃度の低下が見られた)ので図1にTS、AIC、LSの値をそれぞれ示した。難溶性タグ以外を付加したタンパク質の溶解性は時間経過により凝集が観測されなかった。TS、AIC、LSの値を定めることができなかつたので図2に48時間後の上清濃度の値を示した。図1からpH7.7においてC5V、C5Y、C5L、C5IでTS、AIC、LSにおいて差が出ている。C5L、C5Iと比べてC5V、C5Yは上清濃度が高かったが、炭素鎖が短くC5Vは疎水性相互作用の働きが弱いこと、またC5YはOH基があつて水素結合を形成しやすいことが影響していると示唆された。また、図2からC5R、C5P、C5H、C2G、C5Dの順に溶解性が高く、先行研究における、pH7.7 1.3M Ammonium Sulfate 下のLSの順番はC5R、C5D、C2G、C5P、C5Hであり、C5Dにおいて大きな違いが見られた。C5Dについては、低イオン強度では遮蔽効果が小さくなるので、静電相互作用の影響が疎水性相互作用の影響よりも強くなったためタグの負電荷とBPTI表面の正電荷が引き合い凝集したと考えられた。今回の研究で、先行研究ではできなかつた難溶性タグについてのSEPタグの影響の測定、そして低イオン強度で測定することで先行研究よりも生理条件に近い状態でのSEPタグの影響を解析できた。

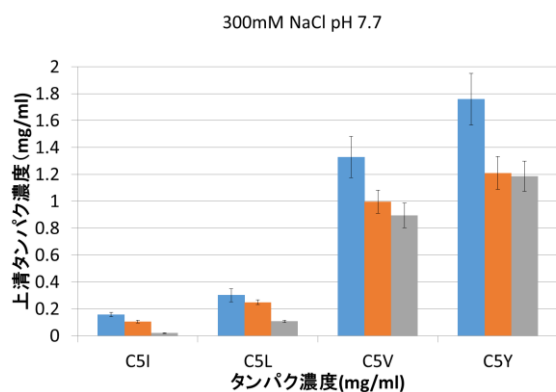


図1

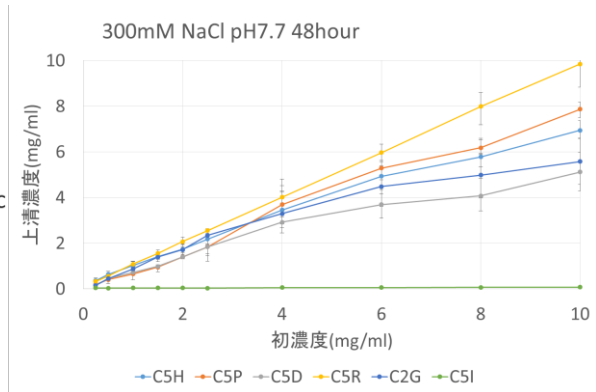


図2