

配列を単純化した BPTI 蛋白質の熱力学的解析		
黒田研究室	学籍番号:01251068	古川ひとみ

【緒言】

蛋白質の立体構造形成に必要な情報がアミノ酸配列中にあり、機能はその高次構造から生じるということは、周知の事実である。この立体構造形成や機能発現に必要な情報がアミノ酸配列中にどのように示されているかは不明であるが、蛋白質を構成する全アミノ酸が等しく構造形成に関与してはおらず、自然界に存在する蛋白質（野生型）のアミノ酸配列をより単純化したアミノ酸からなる蛋白質が野生型と非常に類似した立体構造を形成し蛋白活性を保持しているという報告が、最近されてきた。我々の研究グループでも、BPTI(仔ウシ膵臓トリプシン阻害タンパク質)を用いた実験で、アミノ酸配列においてスペーサーの役割以外に立体構造形成に関与していないと提唱される残基をアラニンに置換し、配列を単純化した。実験の結果、BPTI の 58 残基中 10,21,22,26,個のアラニンを含む BPTI 変異体 (それぞれ BPTI5-55,BPTI21、BPTI22、BPTI26 とする)の構造及び活性が野生型 BPTI と同等であることを確認してきた。本研究では、単純化された配列が、BPTI 構造を安定化する物理化学的メカニズムを解明する目的で、PTI5-55~BPTI26 の熱力学解析を行った。

【実験】

各 BPTI 変異体が大腸菌で発現し、ニッケルレジソ及び HPLC で精製し、TOF-MS で分子量を確認した。それらの変異 BPTI の 222nmでの CD 値 (円偏光二色性)を 5°C~65°Cの温度領域の温度変化測定を行った。そこで得られたシグナルは 2 次構造含量に相当し、変性蛋白質の割合を表す。その変性曲線を次のように熱力学的に解析することから構造安定性の定量的評価を行った。熱変性が可逆的な 2 状態変異である場合は各温度の平衡定数からファントホッフの式(#)によって、各温度における変性のエンタルピー変化 ΔH と変性の中点 (T_m) を求めることができる。

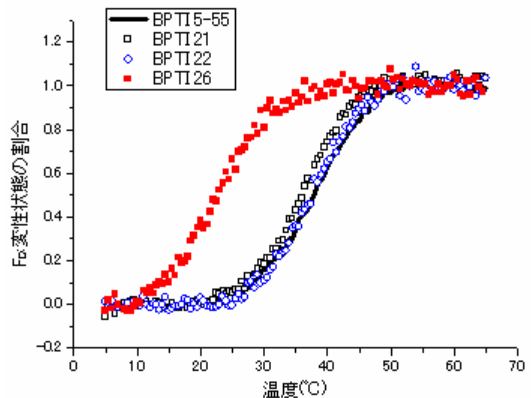


Fig1. 各 BPTI 変異体での 222nm の CD 値による温度依存性.

$$\ln K(T) = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta S}{R} \dots\dots\dots(\#)$$

【結果と考察】

BPTI5-55、BPTI21、BPTI22 の変性曲線はほとんど重なり、変性中間温度(T_m)も、BPTI5-55 と BPTI21 の差は 1.2°C、BPTI5-55 と BPTI22 で 0.8°C と BPTI5-55 との間に大きな差は見られなかった。その一方で、BPTI26 では $T_m=22.5^\circ\text{C}$ とかなり不安定であった。今回得られたエンタルピー変化にはばらつきがあり、正当性に欠けてしまうが、今後の熱測定実験で正確な値を求めるための基礎データとして使用する。エンタルピー値のばらつきの主な要因は測定値の傾き (微分値) から求めるためとされる。この点は、熱測定実験に於いては改善されると考えられる。また、21、22 個アラニンを含む変異体の構造安定性が 10 個含むものとほとんど変わらないことは興味深い結果と考えた。

Table1. 各 BPTI 変異体の T_m と ΔH

	BPTI5-55	BPTI 21	BPTI 22	BPTI 26
$T_m(^\circ\text{C})$	38.4	37.2	37.6	22.5
$\Delta H(\text{kJ/mol})$	-81.5	-112.7	-79.3	-84.6