

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 平成 22 年度入学 学籍番号 10831109 氏名 Mohammed Monsur Alam Khan 印
主指導教員氏名	黒田 裕
論文題目	Biophysical analysis of protein solubility and aggregation using short amino acid peptide tag (短いペプチド系タグを用いたタンパク質の溶解性及び凝集の生物物理学的解析)
<p>論文要旨 (2000 字程度)</p> <p>凝集は、分子の濃度が溶解限界濃度 (以下、溶解度) 以上になると起きる現象であり、タンパク質やペプチドの凝集は産業利用においてしばしば問題となるほか (Frokjaer S et al, <i>Nat Rev D.D.</i> 2005)、種々の神経変性疾患の病因であると考えられている (Ross CA, <i>Nature Med</i> 2004)。現在、ペプチドやタンパク質の溶解度は構成アミノ酸の親水性・疎水性で決まるというのが定説であるが、本来このモデルは、水溶液及び非極性の有機溶媒に対する相対的な「溶けやすさ」を示す理論であり、水溶液中での溶解度を解析するための理論ではない。また、高濃度の分子の溶解度を正確、かつ再現性よく測定することが極めて困難であるため、疎水性・親水性の代わりとなるアミノ酸の「溶解性」の真の指標はまだ開発されていない。本博士論文では、高濃度では測定が難しいアミノ酸の溶解度そのものを測定するのではなく、変異体解析によって、アミノ酸の水溶液中での相対的な「溶解性」(以下、溶解傾向性) を測定する手法を開発している。</p> <p>第 1 章「緒論」では、タンパク質の溶解性及び凝集に関する研究の背景を説明した。溶解性に関する物理化学的な研究、親水性・疎水性と溶解性との関係に関して詳しく述べ、本研究で対象とした溶解傾向性の定義を行った。さらに、タンパク質の凝集に関連する研究を概説し、現在までに開発されている、物理化学的な視点による研究を紹介した。次に、様々な変異体解析においてタンパク質科学で一般的に用いられるホストゲスト法や置換の効果の加算性について説明を行った。最後に、アミノ酸置換によるタンパク質の溶解性変化の予測を行うことの意義について述べ、各章の意義と目的について述べた。</p> <p>大 2 章では、20 種類中 Arg、Ile、Lys、Ser、Asp、Asn、Gln、Glu、Pro、His の 10 種類のアミノ酸の溶解傾向性の測定とその結果を説明した。溶解傾向性の測定では、解析対象となるアミノ酸を、「基準ペプチド」に 5 個付加した変異体を構築し、溶解度を遠心分離法を用いて測定した (アミノ酸を 5 個付加するのは、現在までの研究で 1、3、5 個のアミノ酸と付加した結果、5 個の時が溶解度変化の測定が最も容易であったためである)。溶解傾向性は、変異体ペプチドと基準ペプチドの溶解性比と規定した。遠心分離法は、白濁が少々見られる状態のサンプルを 20,000g で 30 分間遠心し、可溶性画分に残るペプチド濃度をト</p>	

リプトファンの吸光度から測定し、その値をペプチドの溶解性と規定する。本研究では、溶解傾向性を pH4.7 と 8.7 の 2 つの pH で測定したことで、親水性・疎水性モデルでは考慮されていなかった pH 依存性をアミノ酸の溶解傾向性に初めて取り入れた。

第 3 章では、凝集形成の速度を調べた。凝集形成速度は、前章で説明した遠心分離法を用いた手順で、サンプルを溶解して 0 分～96 時間経過したのちに溶解性を測定した。その結果、ペプチド濃度があるしきい値より低い場合は、凝集は見られず、溶解性は変化しなかった。一方、ペプチド濃度がしきい値以上のサンプルの溶解度は時間が経過するにつれて、低下し、最終的にはしきい値以下の濃度に落ち着いた。さらに、しきい値は付加したアミノ酸種によって異なり、前章で求めた各アミノ酸の溶解傾向性と相関が高いことを明らかにした。以上のことから、タンパク質を高濃度で可溶化する際には、そのタンパク質特有のしきい値濃度以下に調整することで、溶解した状態を長期に保てることが明らかとなった。その為、それぞれのタンパク質のしきい値濃度が長期保管に於いて、重要な指標である。さらに、理論的な観点からは、しきい値濃度の存在は、凝集形成には核の形成が必須であることを強く示唆している。凝集は Oosawa & Kasai (1962) が提唱した Helical Polymerization Model に従って成長すると、第一次近似的に考えられる。

第 4 章では、2 章と 3 章で説明した結果を総括した。今後、全 20 種類のアミノ酸の溶解傾向性を測定することで、任意のアミノ酸配列からなるペプチドの溶解性を pH 依存的に予測することが可能となると結論付けた。

TITLE	Analysis of protein aggregation kinetics using short amino acid peptide tag
NAME	Mohammed Monsur Alam Khan
<p style="text-align: center;">ABSTRACT</p> <p>Understanding protein solubility, and consequently protein aggregation, is an important issue both from an academic and a biotechnological application viewpoint. Here we report the effects of 10 representative amino acids on the aggregation kinetics of proteins (A, L, R, K). This effect was determined by measuring the solubility of a simplified bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) variant, to which a short artificial tags containing the amino acid of interest was added at its C-terminus. We first confirmed that the tags remained independent of the structure, thermal stability, and biochemical activity of the host protein. Then we determined the solubility as a function of incubation time (20 minutes to 48hours) and initial protein concentration ranging from 10ugr/ml to 100mgr/ml at higher (7.7) and lower 4.7) pH. The influence of peptide tags on model protein solubility is attributable to the hydrophobicity of tagged amino acid. We observed, as anticipated, that proteins precipitated promptly when the initial concentration exceeded some critical value. However, when initial protein concentration was higher, the apparent solubility reached a concentration higher than the above critical value and decreased upon increasing incubation period. It has also been reported that there is a strong correlation in between the said critical solubility value and the apparently maximum solubility. The rate of protein aggregation was dependent on the type of amino acid composing the tags. The precipitation formation rate was quickest for C5Q and slowest for C5D. These observations were confirmed using a wild type lysozyme., and they clearly demonstrated that initial protein concentration and equilibrium time need to be considered while defining protein solubility and short poly amino acid tags can be an effective toll to gain insight into the complex phenomenon of protein aggregation.</p>	