

円偏光二色性測定と示差走査蛍光定量法を用いた BPTI 変異体の熱安定性評価

黒田研究室

学籍番号：10251019

小須田 慧司

[背景・目的]

プロテオミクス研究において多数の蛋白質を迅速に解析することが求められているなか、最近開発された示差走査蛍光定量法 (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) は、低コストかつ多数の蛋白質の熱安定性を評価するのに適した手法である。一方、DSF で測定される熱力学安定性の正確さは保証されていないことが短所として挙げられる。そこで、本研究では DSF による熱安定性評価の正確性を検討するため、熱安定性測定に従来から用いられている円偏光二色性 (CD) 測定と、新規手法である DSF との結果を比較した。モデル蛋白質として、当研究室で長く研究されてきた BPTI 変異体を用いた。

[研究方法]

BPTI-19 の C 末端にリンカーとしてグリシン 2 残基を付加した変異体 (C2G)、リンカーに続いてアラニン、リシン、スレオニン、バリン、イソロイシンをそれぞれ 5 残基付加した変異体 (C5A, C5K, C5T, C5V, C5I) を測定対象とした。C5A, C5T, C5V は QuikChange により既存変異体遺伝子に変異を入れて作製した。全変異体を大腸菌に発現させ、HPLC で精製した。CD 測定では 光路長 1cm のセルを用いて 1.5 mL の試料 (20 μM) を用いて温度変性を測定した。DSF では、96 ウェルプレートを用いて、1 ウェルにつき 20 μL の試料 (20 ~ 160 μM) に対し温度変性を測定した。それぞれの測定から変性中点温度を算出し、熱安定の指標とした。

[結果・考察]

CD 測定・DSF の両方で得られた各変異体の変性中点温度 (T_m) を比較したところ、CD 測定と DSF で同様の値を得られた (表 1)。また、CD 測定では測定できない 50 ~ 180 μM の高蛋白質濃度の熱安定性を DSF によって測定した結果、C5I の T_m が高蛋白質濃度で低下していた。これは先行研究による C5I の示差走査熱量測定 (DSC) の結果と一致しており (図 1)、これらの結果から、DSF による熱安定性評価は信頼できると判断した。さらに DSF において、昇温時の変性曲線と降温時の変性曲線の比較から、BPTI 変異体の変性が可逆であることが示された (図 2)。このときヒステリシスが観測されたことから、変性反応よりもフォールディング反応のほうが遅いことが確認された。この結果と濃度依存的な変性温度の低下から、BPTI 変異体は高温変性状態で不可逆な凝集をするのではなく、可逆的に会合していることが強く示唆され、DSC 測定で示されているとおり、C5I が nN ↔ Dn のような熱力学的平衡モデルに従っていると考えられる。DSF によって変性の可逆性を検証した報告例はなく、本研究により、今後 DSF を熱安定性評価のみならず蛋白質安定性の熱力学的解析にも応用できると期待される。

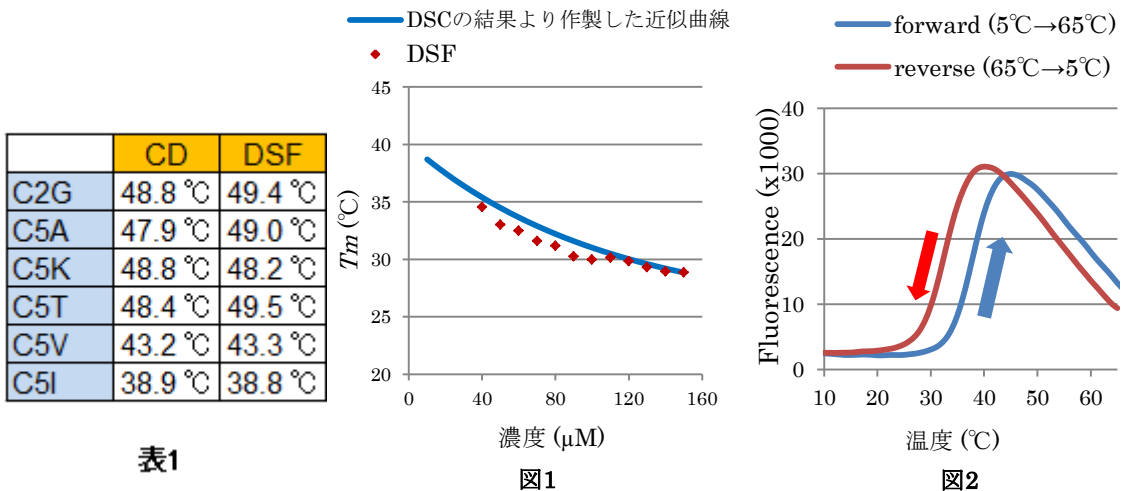


表1

図1

図2

表 1 : CD 測定と DSF によって得られた 各変異体の T_m の比較。 図 1 : C5I における T_m の濃度依存的変化 (DSC の結果より近似曲線を作製)と DSF によって得られた T_m との比較。 図 2 : DSF による C5I 変性の可逆性。