

ウシ脳臓トリプシン阻害タンパク質と SEP タグ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：11251094	渡辺 和哉

【背景・目的】

タンパク質を産業的に利用する際、本来存在する生体内とは異なる環境下で利用するため、タンパク質が凝集体を形成することがある。そのため、タンパク質の溶解性を向上させ、凝集体の形成を防ぐことが産業利用の際に重要な課題のひとつである。本研究では、アミノ酸配列を単純化したウシ脳臓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 残基と同一種類のアミノ酸 5 残基からなる特殊なタグを付加 (図 1, 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) し、溶解性への影響を調べてきた。先行研究において、10 種類のアミノ酸における SEP タグによる BPTI の溶解性変化が確認された。本研究では、溶解性が未測定であるアミノ酸からなる SEP タグの影響を測定し、本研究と先行研究の値を比較する。

【研究方法】

大腸菌で発現させた各種 BPTI 変異体を CNBr 処理により発現タグを切断し、分取用逆相 HPLC を用いて BPTI を精製した。pH 4.7 および pH 7.7 の 2 条件下でタンパク質濃度を変えたサンプルを調整し、C5G, C5A, C5T, C5E の場合、終濃度 1.3 M の硫酸アンモニウムで凝集を促進させてインキュベーション (20min, 2h, 6h, 12h, 24h, 48h 25°C) し、遠心 (20min, 20000g, 25°C) した上清のタンパク質濃度を測定した。この上清濃度を各変異体の溶解性とした。C5I, C5L, C5V, C5Y の難溶性タグを付加した BPTI においては、既存の条件では全て沈殿してしまうため、1.3 M 硫酸アンモニウムの代わりに 300 mM 塩化ナトリウムを用いて、同測定を行った。なお、先行研究では溶解性を比較するにあたって、Transient Solubility (TS)、Aggregation Initiation



図 1 SEP タグ模式図

Concentration (AIC)、Long-term Solubility (LS) という 3 つの値に着目 (図 2) しており、今回の研究でも、これらの値を測定した。AIC とは、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のことである。LS とは、48 時間インキュベーションした後、上清のタンパク濃度が一番低い濃度のことである。TS とは、20min での測定で最も上清タンパク質濃度が高い濃度のことである。

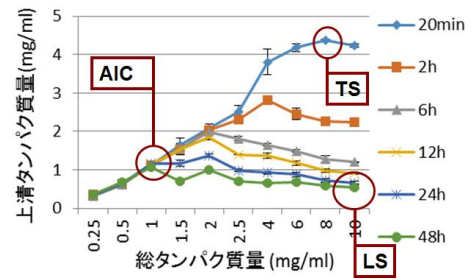


図 2 AIC, TS, LS について

【結果及び考察】

以下の図 3 に、どの SEP タグがどのような溶解性の変化をタンパク質に与えるかを示した。1.3M 硫酸アンモニウム条件下で AIC と LS の値は、側鎖の炭素鎖の数が強く値に反映されることが推測された。C5N と C5Q を見ると、その差が非常に顕著であることがわかる。炭素鎖が多くなることで疎水性相互作用が強まり、凝集が促進されたことが示唆された。また、C5S と C5T から、水酸基の有無はタンパク質の溶解性に大きな影響を与えないことが分かった。水酸基は電離せず、電荷を持たないために寄与が小さいと示唆された。難溶性タグについては、pH 4.7 で C5L, C5I, C5V の間に LS の序列が出来ていた。Hydropathy や Hydrophobicity 等も L<sub>I</sub>V 間でずれが出ているが、それらとは一致せず、SEP タグという状態ではこれまでの疎水性の指標とは異なる傾向が見られた。今回の研究で、20 種類中 16 種類のアミノ酸からなる SEP タグの影響を確認できた。

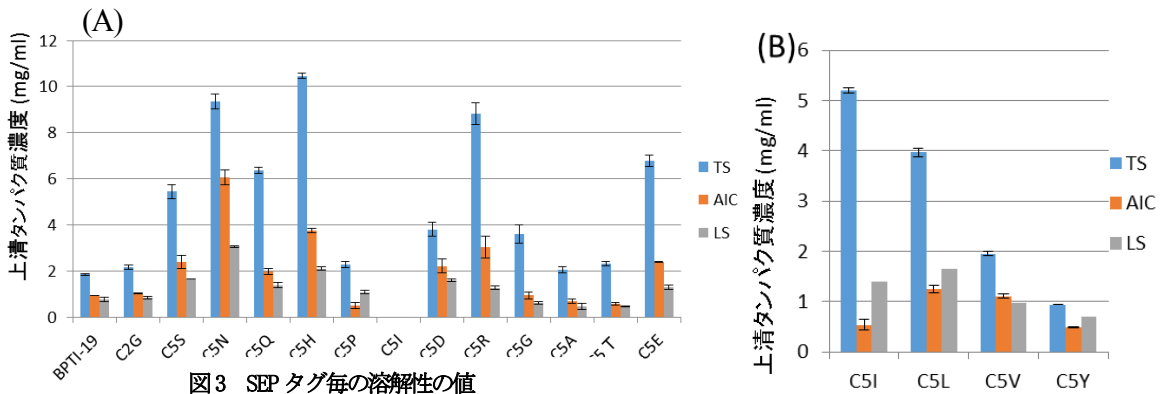


図 3 SEP タグ毎の溶解性の値

(A) : pH 4.7 (B) : pH 7.7 難溶性タグ