

【背景及び目的】

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ことが多く、以前問題としてあるのが凝集体の形成である。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非常に重要である。当研究室では、アミノ酸配列を単純化したウシ膵臓トリプシン阻害タンパク質(BPTI)変異体のC末端に、Solubility Controlling Peptide(SCP)タグと呼ばれる短いペプチドタグを付加し、溶解性を向上させる研究が行われてきた。本研究では、17種類のSCPタグを付加したBPTI変異体の溶解傾向性(アミノ酸の溶解性の指標)を測定し、各値を比較することを目的とした。

【研究方法】

大腸菌で発現させたBPTI変異体をCNBr処理によりTrp leaderを切断し、逆相HPLCを用いて各変異体を精製し、MALDI-MASSで分子量を確認し、目的の変異体が精製できたことを確認した。pH4.7およびpH7.7の2つのpH条件下で、タンパク質をそれぞれの濃度で調整し、親水性アミノ酸を用いたタグについては終濃度1.3M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。疎水性アミノ酸を用いたタグについては、上記の条件では全て沈殿してしまうため、300mMの塩化ナトリウムを用いて、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、「過渡的溶解度」Transient Solubility (TS)、「凝集開始濃度」Aggregation Initiation Concentration (AIC)、「長期溶解度」Long-term Solubility (LS) という3つの値に着目(図1)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時間インキュベーション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時の一番低いタンパク質濃度のことである。TSとは、20分インキュベーションした時の上清タンパク質濃度のことである。

【結果及び考察】

本研究で得られた各変異体についての溶解傾向性をまとめた結果を以下図2に示す。今回の研究で、Cys、Met、Trpを除く17種類のタグについて溶解傾向性を測定することができた。まず、1.3Mの硫酸アンモニウム存在下で行った研究についてである。Lysは、本研究の濃度範囲では濃度降下が見られないほど高い溶解性を示した。TSについて、Argで高い値が得られ、側鎖の電荷の有無が大きく関与しているのではないかと考えた。また、親水性アミノ酸であれば、この傾向が強くなり、側鎖の組成を大きく反映した結果となった。そして、AIC、LSについて、これらもTSと同様に側鎖の組成を反映した傾向が得られた。さらに、AsnとGlnを比較すると、炭素数が一つ異なるだけで、AIC及びLSの値に大きな差が見られた。次に、疎水性のタグに対し、0.3Mの塩化ナトリウム存在下で行った研究についてである。側鎖の組成を反映するのであれば、Valが各パラメータにおいて他のアミノ酸よりも大きい値をとるかと思われたが、予想とは逆にIleやLeuの方が大きな値を取る結果となった。

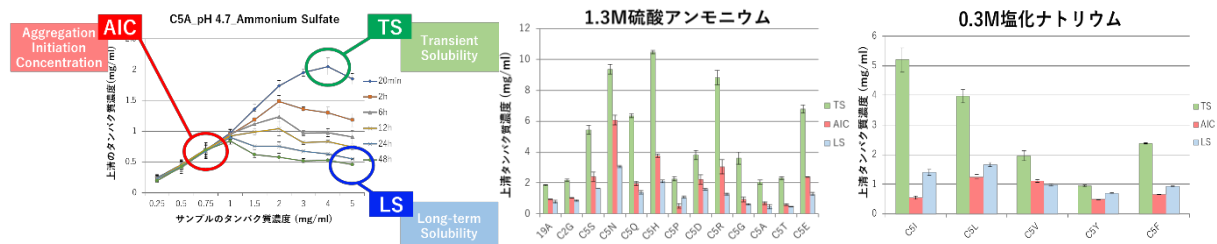
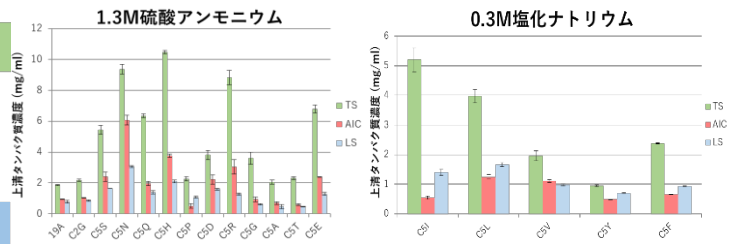


図1. 溶解傾向性の指標



※C5Kは、上清濃度の降下が見られなかったため、図には明記していない。

図2. 各変異体における溶解傾向性(pH4.7)