

アルギニンタグ付加による蛋白質会合体形成阻止の研究

黒田研究室

02251010

蝦名 鉄平

[背景・目的]

NMRを用いたタンパク質構造解析および種々の物理化学的計測では数百 μM ~数 mM の高い試料濃度が必要とされる。しかし、高濃度のタンパク質溶液では、溶質であるタンパク質が会合体を形成してしまうため、測定が不可能な場合もある。会合体形成の起こる濃度は試料タンパク質の持つ様々な性質により異なるが、一般に、親水性アミノ酸の少ないタンパク質では会合体の形成が起こり易いと考えられている。当研究室では、溶解度の低いタンパク質として、BPTI(Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor 牛膵臓トリプシン阻害タンパク質)の全 58 残基のアミノ酸の内 22 残基をアラニンに置き換えた変異体を使用し、溶媒条件を変えずに難溶性タンパク質の溶解性を向上させる一般的な手法の開発を進めて来た。

これまでの研究から、BPTI22の C 末端または N 末端に Lys または Arg を 3~5 残基付加する事でその溶解度が向上する事がわかっている。特に C 末端に Arg を 5 残基付加した物の溶解度向上の割合が大きく、付加していないものに比べて約 5 倍の溶解度を持つことが明らかにされている。そこで、本研究では BPTI 変異体の溶解度をさらに向上させるため、BPTI 変異体の C 末端に Arg を 6 残基付加したタンパク質を作製し、その溶解度を測定した。

[方法]

最終的な精製は HPLC により行った。HPLC により精製された BPTI 変異体において TOF- MS による分子量同定を行い、アミノ酸配列から求めた分子量と実測値との間の誤差が 0.1% 程度に収まっていることを確認した。精製後のサンプルは凍結乾燥を行い、 -80°C で保管した。溶解度測定の際には凍結乾燥済の BPTI 変異体を 20mM 酢酸緩衝液 (pH 4.7) により 10mM 以上の濃度になるように溶かし、生じた沈澱を 20,000 \times g、 4°C で 1 時間の遠心分離により取り除いた後で 280nm の吸光度を基に試量濃度を算出した。

[結果および考察]

C 末端に 6 残基の Arg を付加した BPTI22-C6R の溶解度は 1059mM Arg を付加していないものの約 6 倍)であった。しかし、1~5 残基付加した BPTI 変異体の溶解度向上度から予測し BPTI22-C6R の溶解度は約 16mM になっており、これに比べると実測値はかなり低くなっている。この原因として、1059mM (約 706mg/ml) の高密度条件下では BPTI 間に低濃度のモデルで考慮する要因とは別の分子間相互作用(分子クラウディング)が増加するためだと考えられる。次に 120 μM 、50 μM 、20 μM の各試量濃度の BPTI 変異体について、フィルターろ過による損失量を測定した。その結果、アルギニンタグを付加したものについて損失量の低下が認められた。この結果から、アルギニンタグによる溶解度向上に会合体形成阻止効果が伴うことが示唆された。

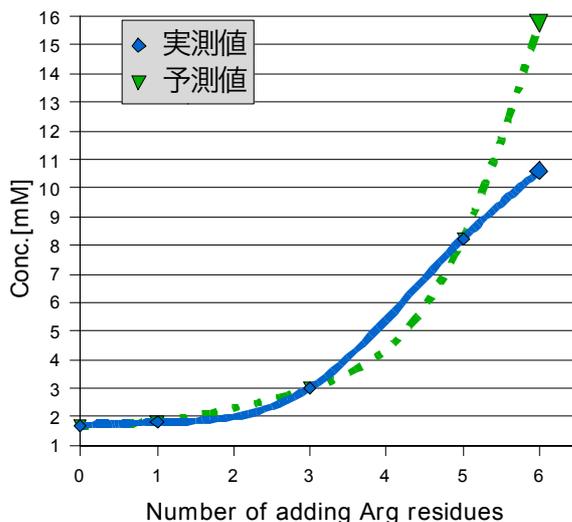


Fig- 1
アルギニンタグ付加による溶解度の変化

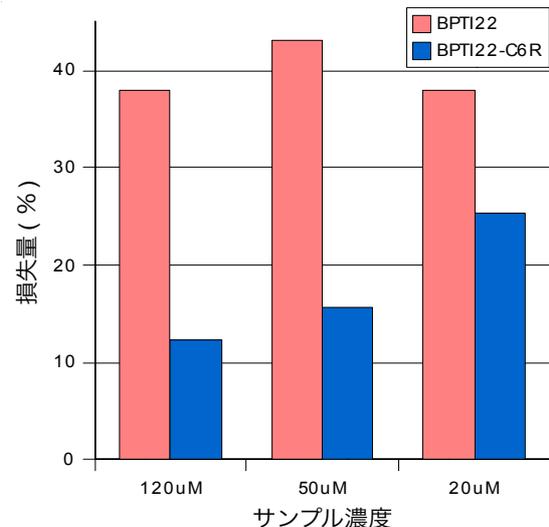


Fig- 2
フィルターろ過による損失量の比較