

L1211-12	アミノ酸配列を単純化した BPTI 変異体タンパク質の熱力学的安定性					
	氏名	山田 宗高	主査	黒田	副査	朝倉・中村(徳)・長澤・中村(史)

【はじめに】タンパク質立体構造はアミノ酸配列に指定されるが、配列中の全アミノ酸残基が立体構造形成に等しく関与するわけではなく、アミノ酸配列中には置換しても構造形成に全く影響しない残基が存在することは周知の事実である。タンパク質の折れたたみ研究によく用いられるウシ膵臓トリプシン阻害タンパク質 (BPTI) においては、58 アミノ酸残基のうち 21、22、26 と 27 箇所にアラニン残基を有する単純化 BPTI 変異体タンパク質 (以下、BPTI-21、-22、-26、-27) も、標準型 BPTI (BPTI-[5,55]: 野生型 BPTI において 3 組存在するジスルフィド結合のうち 1 組のみを持つ還元型の BPTI。BPTI-[5,55]の立体構造とトリプシン阻害活性は野生型 BPTI と等しい。)と同じ構造 (主鎖構造) を維持していることが、2 次元 NMR により示されている。また、熱安定性においても BPTI-21、-22 は BPTI-[5,55]と同じ変性中点温度 (T_m) であり、BPTI-26、-27 の T_m は 20 低いと報告されている。本研究では、BPTI-[5,55] を標準型とし、変性過程に伴うエンタルピー変化 ($\Delta_N^U H$)、エントロピー変化 ($\Delta_N^U S$) から単純化 BPTI タンパク質との構造安定化要因の相違について熱力学的な知見を得ることを目的とする。

【方法】BPTI 変異体タンパク質を大腸菌で発現させ、精製を行った。その後、高感度示差走査型熱量計 (DSC) を用いて熱測定を行い、各々の変異体タンパク質の T_m と $\Delta_N^U H_{cal}$ を測定した。また、pH3.3~6.0 の異なる pH での測定により、各々の変異体タンパク質の変性過程に伴う熱容量変化 ($\Delta_N^U C_p$) を求めた。その値を用いて、熱力学関数 $\Delta_N^U H(T)$ 、 $\Delta_N^U S(T)$ 、 $\Delta_N^U G(T)$ を算出して、解析を行った。

【結果および考察】まず、熱測定で観測した $\Delta_N^U H_{cal}$ と変性過程を二状態転移と仮定して算出した $\Delta_N^U H_{vh}$ の比が、1.0 に近いことから、単純化 BPTI 変異体タンパク質の変性過程は、多くの天然タンパク質と同様に中間状態の存在しない二状態転移であることを明らかにした。DSC 測定から BPTI-[5,55]と-21 及び-22 の変性中点温度 (T_m) が 2 程度しか変わらないことが示されたが、エンタルピー差 ($\Delta_N^U H_{cal}$) は、BPTI-[5,55]より BPTI-21、-22 の方が明らかに大きかった (Fig. 1)。さらに、熱容量変化 ($\Delta_N^U C_p$) を求め、熱力学関数を計算した結果、BPTI-21 及び-22 の $\Delta_N^U H_{25}$ と $T \cdot \Delta_N^U S_{25}$ が BPTI-[5,55]に比べて、大きくなっていることが示された (Fig. 2)。このことは、BPTI-21、-22 の自由エネルギー差 ($\Delta_N^U G(T) = \Delta_N^U H(T) - T \cdot \Delta_N^U S(T)$) において、安定化に働く ΔH 項と不安定化に働く $T\Delta S$ 項がともに大きく、エンタルピー項エントロピー項補償により、 T_m が等しいことが示された。一般的には、アミノ酸を置換することでエンタルピー的に不安定化され、エントロピー的に安定化されることが多いが、本研究において、単純化した BPTI-21 と-22 では、その逆現象が起きていることが明らかになった。今後、この天然配列では珍しい構造安定化機構について、側鎖構造を含む詳細な構造解析を基に研究する必要がある。

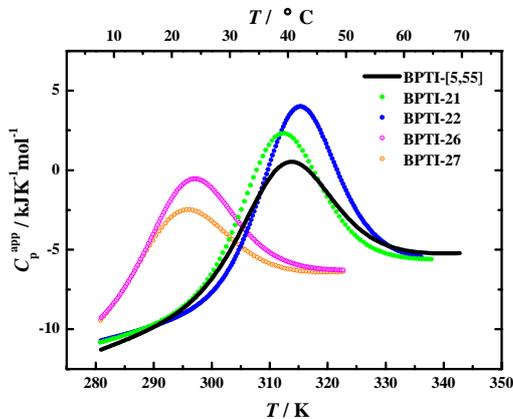


Fig. 1
Thermal unfolding of BPTI and simplified BPTI mutants monitored by DSC. DSC measurements were carried out in a 20 mM acetate buffer (pH 4.7).

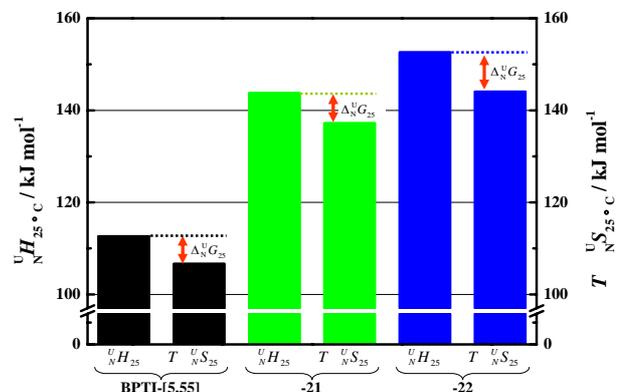


Fig. 2
Enthalpy and entropy ($T \cdot S$) on unfolding of BPTI-[5,55], -21 and -22 at 25 °C. Those values are calculated by $\Delta H(T)$ and $\Delta S(T)$.