

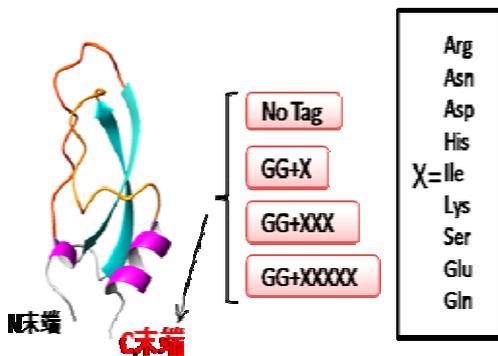
アミノ酸タグ付加がタンパク質の溶解度に及ぼす影響の解析		
黒田研究室	学籍番号： 04251039	下野 智弘

**【背景・目的】**

NMR や X 線結晶構造解析を使ってタンパク質の立体構造を解析するには、高い溶解度と単一な立体構造を形成する事が必要である。溶解度の低いタンパク質において、SEP タグ、Glutathione S-transferase (GST) タグや Maltose Binding Protein (MBP) タグなどの溶解タグを解析対象タンパク質に付加させる事で凝集形成を防ぎ、タンパク質の溶解性を向上させるという機能が知られており、タグの配列と特性がタンパク質の溶解性に与える影響を解析するのは重要な課題である。本研究室では今まで、7 種のアミノ酸タグがタンパク質の溶解性に与える効果を系統的に解析してきた。今回は pH7.0 での溶解度の低下が見られた Asp タグの pH 4.7 での溶解度と、更に 2 種のアミノ酸タグ (Gln, Glu) の pH 7.0 での溶解度の解析を行った。

**【方法】**

モデルタンパク質としてウシ膵臓トリプシン阻害物質 (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor: BPTI) の変異体であり疎水性が高い BPTI-21WM を用いた。その C 末端に 2 残基の Gly をリンカーとして付け、正電荷を持つ負電荷を持つ Glu、親水性の Gln の種のアミノ酸を新たにタグ配列として 1、3、5 残基付加させた (Fig. 1)。

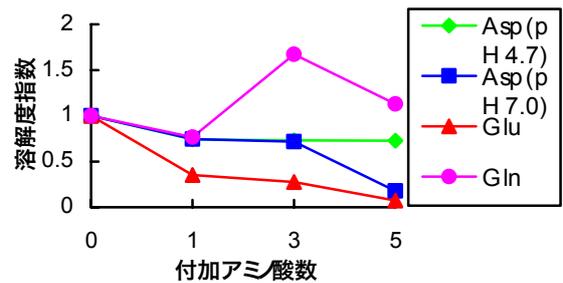


(Fig 1) タグ配列を付加した BPTI21-WM

Asp タグ付加タンパク質では 50mM Na-Acetate Buffer pH 4.7 での溶解度を、Glu、Gln タグ付加タンパク質では 50mM Phosphate Buffer pH7.0 での溶解度を測定した。従来の溶解度測定法では緩衝液で透析し凍結乾燥させたサンプルに MilliQ を加え遠心分離して上精画分の濃度を溶解度と定めたが、凍結乾燥時に緩衝液の塩が残ってしまい測定時の pH がずれるといった問題が見られたため、今回は Milli-Q で透析し緩衝液で遠心して測定を行った。アミノ酸を付加していない BPTI-21WM の溶解度を 1 と定め、それに対する各変異体の溶解度の比から溶解度指数を算出した。

**【結果・考察】**

pH4.7 における Asp の溶解度は pH7.0 での溶解度より高くなったが、残基が付加されるにつれ少しずつ低下した。Glu タグでは残基が付加されるにつれ溶解度の低下が見られた。Gln タグは 3 残基付加で溶解度が下がり、3 残基で上がり、5 残基で下がる結果となった。(Fig 2) Asp タグにおいて、タグ無し BPTI-21WM と Asp タグを付加した BPTI-21WM とでは、pH7.0 で、タグ無し >1>3>5 残基の順で総電荷が下がり、5 残基ではほぼ電荷を持たない。その為タンパク質分子間の反発が少なくなり、付加されるアミノ酸数に応じて溶解度が低下したと考えられる。一方 pH4.7 では、タグ付加 BPTI-21WM の総電荷がそれぞれ増えたことでタンパク質分子間の反発が増え、それにより溶解度が上がったと考えられる。Glu タグは、pH7.0 で Asp タグと同じ総電荷を各付加残基数において持つ為 Asp と同じ様な結果が予測されたが、Glu が Asp より疎水性が強いために溶解度指数が低くなったと考えられる。Gln タグを付加した BPTI-21WM は、タグ無し、1、3、5 残基付加で総電荷に相違はないので、タグ無しの溶解度とほとんど変わらない事が期待されたが、3 残基で溶解度が上がった事を考えると、総電荷の影響だけではなくタンパク質分子とタグ、またはタンパク質分子同士が微細構造で何らかの相互作用を起こしたのではないかと示唆される。X 線結晶構造解析などで分子がどのような状態にあるのか明らかにしたい。



(Fig 2) Asp・Glu・Gln タグによる溶解度変化