

タンパク質溶解性の解明を目的としたペプチドの溶解度測定		
黒田研究室	学籍番号:08251051	雙田 健太郎

《背景・目的》

タンパク質の凝集形成及び溶解度の解明は、学術的かつ工業的に重要な意味を持っている。本研究室では、タンパク質の溶解度向上を目的とした SEP タグの開発を進めている。溶解度測定モデルとして、C 末端に SEP タグを付加した 19 残基の電荷を持たないペプチドを用い、その溶解度を比較する事で、SEP タグ内のアミノ酸が与える溶解度への影響を調査してきた。しかし従来の溶解度測定方法では、再現性は観測されなかった。これはサンプル溶液の pH が一定に保たれておらず、溶解度の時間依存性も考慮されていなかったためであると考えられる。そこで本研究では、新規溶解度測定法を開発し、各 SEP タグ付加ペプチドの溶解度を測定し、時間依存性や電荷の影響などを考察した。

《研究方法》

SEP タグの溶解度への影響を調べるため、モデルペプチド Pep19 : Nt (WSCNNFASAASAGAACAAA) の C 末端に 2 つのグリシンと n 個 (n=1~3) の単一アスパラギン酸、アルギニン、イソロイシンからなる SEP タグを付加した変異体 CnD、CnR、CnI を用いた。

新規測定法では前処理として、NaOH を用いて試料の pH を 7.5 に調整し、透析によって脱塩処理した。透析後の試料は、初期濃度に合わせて分注した状態で凍結乾燥した。この試料に 20 μl のトリス緩衝液 (pH 7.5) を加え、20 分後に遠心分離を行い、上清濃度を測定した。同様の手順を 6 時間後、24 時間後、48 時間後に繰り返し行い、初期濃度 (20 μl 中に溶解していると仮定した際の濃度) と上清濃度の相関関係を調べた。

《結果・考察》

先行研究では、HPLC 後の試料内に残存するトリフルオロ酢酸が考慮されておらず、測定 pH が大きくずれていた事が判明した。そこで NaOH を用いて測定 pH に中和する事で、サンプル pH が一定に保たれていることを確認した。

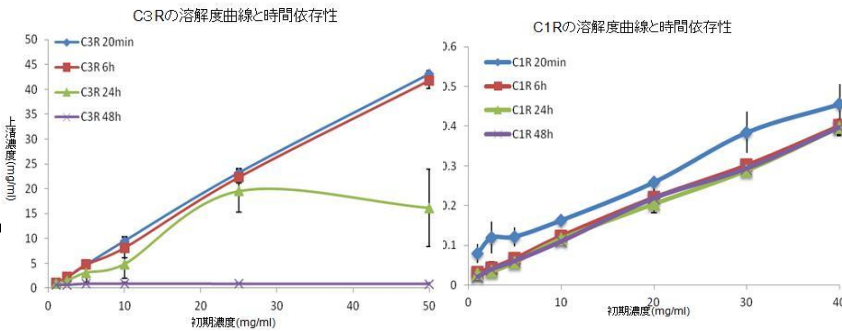


図 1.a pH 7.5 における C3R の溶解度 b pH 7.5 における C1R の溶解度

また図 1.a より、上清濃度は時間と共に減少し、タンパク質の溶解性には時間依存性がある事が示唆された。ペプチドやタンパク質の凝集メカニズムは、一般的に核が形成される事で凝集が引き起こされ、増加すると考えられている。C3R は、核が 6 時間以降に形成され、48 時間後までに急激に凝集が進み、溶解度が減少する事が観測された。先行研究では、20 分後の上清濃度を溶解度と定義していたが、いくつかの変異体では凝集形成過程にあるために、誤差範囲が大きく再現性を取る事が困難であったと考えられる。全ての変異体において 48 時間後と 72 時間後の上清濃度が一致したため、新規溶解度測定法ではこの上清濃度を溶解度と定義した。48 時間後の溶解度の誤差範囲は全ての変異体において小さく、実験再現性は高いと考えられる。

本実験で観測した、SEP タグが 48 時間後の溶解度に与える影響は総じて小さかった。図 2 では、Nt の溶解度が最大であり、SEP タグを付加した変異体を上回っている。凝集存在下では SEP タグの溶解度向上能は失われる事が示唆された。また SEP タグを付加した変異体は 48 時間以内に多くが凝集する一方で、C3R と C3D の 20 分後の溶解度はそれぞれ最大 96(mg/ml)、2(mg/ml) が観測され、荷電アミノ酸数が大きな変異体は溶解度を大きく向上する事が確認された。また、C1R (図 1a) は溶解後 20 分以内に溶解していたペプチドが沈澱する一方で、C3R は凝集に達するまでに 24 時間以上かかる事から、電荷が大きいほど安定するまでに時間を要する事が示唆された。一定期間の溶解性の向上と溶解度の維持が SEP タグの効果として明らかになった。

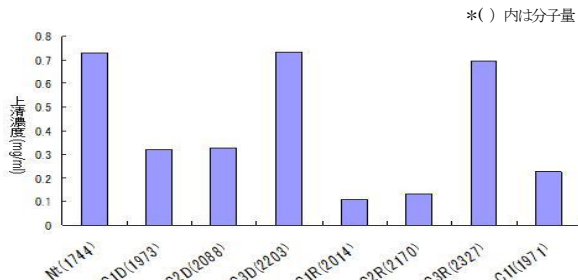


図 2. 48 時間後の初期濃度 10(mg/ml) における溶解度