

BPTI をモデルタンパク質に用いた疎水性ペプチドタグの付加による細胞毒性の検証

黒田研究室

学籍番号：15251064

前田 華子

【 背景・目的 】

タンパク質の凝集には、規則的に並んだアミロイドや、無秩序に形成されたアモルファスな凝集など、いくつかの種類が存在する。近年、単量体では細胞毒性を持たないタンパク質が、会合体形成・アミロイド凝集により細胞毒性を持つことがあると報告されている。例えば、アミロイドβタンパク質は単量体では無害であるのに対して、アミロイド前駆体もしくはアミロイドが形成されると、細胞毒性を示す。しかし、アモルファスな会合体の形成による細胞毒性の有無はあまり研究されていない。また、当研究室の先行研究より、タンパク質に短いペプチド(SCP; Solubility Controlling Peptide)タグを付加することで、タンパク質の機能を変えずに溶解性の制御・向上およびアモルファスな会合体の形成を行うことができることが明らかになった。

本研究では SCP タグを用いてアモルファスな会合体を形成させ、その会合体が細胞毒性を示すかどうかを検証する。

【 手法 】

モデルタンパク質としてウシ膵臓トリプシン阻害タンパク質(BPTI)を用い、BPTI のアミノ酸配列を単純化した変異体(BPTI-19A)と、そのC末端にGly2残基をリンカーとして付加した上SCPタグとしてIle5残基(C5I)を付加した変異体(BPTI-C5I)を使用した。各変異体をHeLa細胞に加え、細胞増殖/生存アッセイの1種であるMTTアッセイにより細胞残存率を測定することで細胞毒性の有無を評価した。また、動的光散乱(DLS)測定(37°C, 5 mM リン酸バッファー(pH 7.4))を用いて各変異体の会合体形成を調べた。すべての実験はタンパク質濃度 25 μM, 50 μMで行った。

【 結果・考察 】

DLS測定結果(図1)より、BPTI-19Aが単量体で存在するのに対して、BPTI-C5Iは会合体を形成していることが確認できた。

また、MTTアッセイにより細胞残存率を比較したところ(図2)、BPTI-19AおよびBPTI-C5Iを添加した細胞はHeLa細胞のみを培養したControlより細胞残存率が低かった。また、各タンパク質濃度におけるBPTI-19AとBPTI-C5Iの細胞残存率を比較すると、25 μM、50 μMどちらにおいてもBPTI-19AよりBPTI-C5Iの方が低いことが確認できた。このことから、疎水性タグの付加によってより強い細胞毒性を示すと推測することができる。また、各変異体において、タンパク質濃度の増加に伴い細胞残存率が減少していることから、タンパク質濃度に依存して細胞毒性が増すと考えられる。

以上より、疎水性タグの付加によりアモルファスな会合体が形成されたことが分かり、会合体形成による細胞毒性の増加が示唆された。また、タンパク質濃度の増加により細胞毒性が増加すると考えられる。

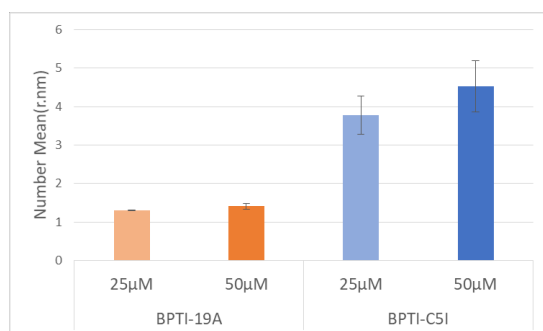


図1: DLS測定結果

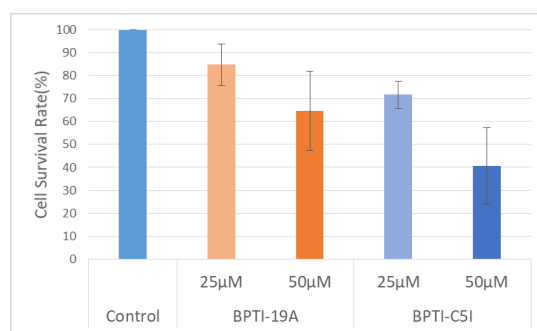


図2: MTTアッセイによる細胞残存率