3P001

アルギニンを用いた新規蛋白質可溶化法とその機構解明

○梅津 光央²、津本 浩平¹、新田 茂輝¹、阿尻 雅文²、熊谷 泉¹ (¹東北大・院工・バイオ工、²東北大・多元研)

大腸菌発現系において、蛋白質が不活性な不溶性顆粒として沈殿してしまうことは、基礎・応用双方から深刻な問題である。通常、その不溶性顆粒からの活性回復は、高濃度の変性剤を用いて完全変性させた後巻き戻し操作を行うが、そのフォールディング過程は非常に複雑である。近年我々は、不溶性顆粒中には天然型と関連のある構造が存在していることを見出し、可溶化剤としてアルギニン(L-Arg)を用いることによって、完全変性状態を経由せず不溶性顆粒中のコンフォメーションを利用した再活性が可能であることを示している。本研究では、 β 2ミクログロブリン(β 2m)が形成する不溶性顆粒を用いて、L-Argの蛋白質可溶化・再活性機構を解析した。

まず、不溶性顆粒を赤外吸収スペクトルで解析したところ、 β 2mは天然型と同じ β 構造比率を持つことがわかった。その不溶性顆粒から2 M L-Arg水溶液で β 2mの可溶化を試みたところ、天然型類似なトリプトファン蛍光特性を持つ状態で可溶化された。しかし、可溶化時の温度を増加させたところ、可溶化蛋白質量も増加したが50℃以上で可溶化した β 2mにはランダム構造が観測され始めた。

次に、各温度で可溶化した β 2mから透析によりL-Argを除去したところ、すべてにおいて不溶性の凝集体は観測されなかった。しかし、50℃以下での可溶化から調製した β 2mは天然構造と類似した単量体であったのに対し、60℃以上での可溶化から調製したものは多量体として存在していた。これは、L-Argによる可溶化状態にランダム構造が含まれている場合に多量体が形成されていることから、L-Argが β 2mの巻き戻りを直接促進するのではなく、不溶性の凝集体形成を抑制することにより、天然型類似構造を持つ状態で可溶化された β 2mが天然型構造へ再構成されていると考えられる。

M. Umetsu, K. Tsumoto, S. Nitta, T. Adschiri and I. Kumagai : How L-arginine solubilize and renature recombinant protein from inclusion bodies

3P003

テラヘルツ時間領域分光法を用いたアラニルアラニン分子結晶における構造変化の観測

○山口 真理子、山本 晃司、谷 正彦、萩行 正憲(阪大レーザー研)

タンパク質の柔軟性は、ペプチドにおける2次構造の多様性や温度依存性などから調べられてきた。ペプチドの2次構造は、水素結合、ファンデアワールス力、あるいは疎水相互作用など弱い相互作用により安定化している。弱い相互作用が関係した非局所的な振動モードは、基準振動解析からテラヘルツ(THz)領域に存在することが示唆されるため、THz領域のスペクトルからペプチドの2次構造の柔軟性について調べることができる。そこで我々は、THz時間領域分光法を用いて結晶状態のアラニルアラニン(Ala-Ala)の2次構造や結晶構造の温度依存性を測定した。図1の吸収スペクトルに示すように、8 Kにおいて観測される3つのバンド(34.7, 38.7, 46.0 cm^{-1})は室温では消滅し、あらたにブロードなバンド(42.7 cm^{-1})が現れる。一方、THz領域の連続的な吸収帯は、温度の上昇とともに増加する。これらの結果から、Ala-Ala分子結晶は8-50 Kにおいて二状態間の転移を示し、50 K以上ではそれとは異なる変化をすると考えられる。講演では他のペプチドについても示し、THz領域のスペクトルから推測されるペプチドの柔軟性について議論する。

M. Yamaguchi, K. Yamamoto, M. Tani, and M. Hangyo : Observation of the Structural Changes of Alanine-alanine crystal studied by terahertz time-domain spectroscopy

3P002

解離基の付加による蛋白質の溶解度向上法の開発

○加藤 淳¹、黒田 裕²、曾田 邦嗣¹ (¹長岡技科大・生物系、²東京農工大・生命工学)

蛋白質の構造・物性・機能を解析したり、工業的に利用したりする上で、溶解度は、立体構造安定性と並んで重要な要素である。例えば、NMR法による蛋白質の構造解析では、数100 μ M～数mMという高い溶解度が必須である。従って、溶解度の低い蛋白質の測定や解析には、大きな困難を伴う。蛋白質の溶解度は、構造安定性と同様に、静電相互作用や疎水相互作用などの物理的効果で決っているが、未だ構造安定性ほど研究が進んでいない。一般に蛋白質の溶解度を向上させるためには、溶媒条件を変えることが多い：例えば、高濃度のアルギニンを溶媒に加えると、蛋白質の溶解度が数倍上がることは良く知られており、溶解度の低い蛋白質の精製過程でよく用いられる手法である。しかし溶媒条件を変えることは、蛋白質の活性・構造に影響を及ぼすことが多い。そこで本研究の目的は、蛋白質に荷電アミノ酸を付加することにより、溶媒条件を変えることなく、溶解度を向上させることである。

我々は、蛋白フォールディングの研究対象として頻用されている、58残基のBPTI(牛脾臓トリプシンインヒビター)とその変異体を用いて、蛋白質の荷電量がその溶解度にどのように影響するかを調べた。具体的には、BPTIのC末端またはN末端に、2個のGly残基を介して1個、3個、5個のArg残基とLys残基を付加することにより、蛋白質分子の荷電量を変えた。溶解度は、溶液中の蛋白質濃度を徐々に上げて行き、沈殿の生成が観測された溶液を遠心(2,000 $\times$ g)し、上清の蛋白質濃度を測定して決めた。その結果、荷電アミノ酸を5個付加したBPTI変異体と付加していないものの溶解度を比較すると、最大で5～6倍上昇することが確認された。本研究の結果は、多様な蛋白質の溶解度を、短いタグの付加によって向上させる一般的な手法の開発の可能性を期待させるものである。

A.Kato, Y.Kuroda, K.Soda : Enhancement of Protein Solubility by Adding Charged Amino Acids

3P004

ACミクロカロリーメトリーによる蛋白質の熱変性における熱容量の測定 I. Pepsinogen

○八尾 晴彦、江間 健司(東工大院・理工・物性物理)

蛋白質の熱変性における過剰熱容量の測定には断熱型示差走査熱量計(DSC)が用いられているが、蛋白質の熱力学的安定性を評価するには熱容量の測定精度が十分でないのが現状である。この問題を克服するために、我々はこれまでにACカロリーメトリー(交流法)というDSCとは異なる原理に基づく、蛋白質の希薄溶液を測定できる高感度な熱容量測定装置を開発し、試料量10 μ lの蛋白質希薄溶液の熱容量を $\pm 0.001\%$ の精度で測定することができるようになった。これまでにこの装置を用いて lysozyme の熱変性における熱容量を測定した結果、変性前後の熱容量差 $\Delta C_{p,d}$ はDSCの結果と変わらないが、過剰熱容量の大きさは、DSCの結果の6割程度と小さく測定されることがわかった。これは、交流法が試料の温度を適当な周波数(このときは0.05 Hz)で振って測定する方法であるため、熱変性の緩和時間が測定周波数より遅いと温度変化に追従できずに過剰熱容量が小さく観測されたためと考えられる。そのため、交流法で測定される過剰熱容量の大きさから、熱変性の緩和時間に関する情報が得られると期待される。今回は2つの過剰熱容量ピークを示すことが報告されている pepsinogen の熱変性における過剰熱容量の測定を試みたので、その結果について報告する。

H.Yao and K.Ema : AC calorimetric heat-capacity measurement on thermal denaturation in proteins I. Pepsinogen