

Title	タンパク質アグリゲーションを抑制する小分子の探索
Author(s)	工藤, 基徳
Citation	
Issue Date	2003-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3010
Rights	
Description	Supervisor:高木 昌宏, 材料科学研究科, 修士

タンパク質アグリゲーションを抑制する小分子の探索

工藤 基徳 (高木研究室)

【背景および目的】タンパク質は、熱に不安定なものが多く、しばしば不活性なアグリゲーションを生じる。現在まで、アグリゲーションを抑制する多くの方法が開発されてきた。その中でも小分子であるアルギニンの添加は最もよく用いられている。しかし、高濃度 (500 mM 程度) の添加が必要なことや、限られた種類のタンパク質にのみ効果があるなど欠点も残る。そこで本研究では、凝集抑制効果の高い新たな小分子の探索を目的とした。

【方法】ニワトリリゾチームをモデルタンパク質に用いた。0.2 mg/ml リゾチームに 50 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) と任意の濃度の小分子を添加した溶液を 98 °C に加熱してアグリゲーションを形成させた (熱処理法)。その後、遠心上清のタンパク質量および残存活性を調べた。添加剤として、15 種類のアミノ酸およびアミノ酸エステル類、ポリアミン類、有機溶媒、変性剤、塩を用いた。

【結果・考察】熱処理法を用いて既知の抑制剤の添加剤を比較したところ、アルギニンの抑制効果が最も高く、400 mM の添加量で凝集を 100 % 抑制した。15 種類のアミノ酸の抑制効果は塩基性 > 酸性 > 中性の順であった。

次に、アルギニンのカルボキシル基をエステル化したアルギニンメチルエステルの抑制効果を調べたところ 30 mM の添加量で 100 % 抑制した。残存活性でも顕著な効果が見られた。残存活性 1 % 以下までに低下する加熱条件に 100 mM のアルギニンメチルエステルを添加すると 90 % 活性が残った。グリシンエチルエステルも同程度の抑制効果を示したので、アグリゲーション抑制にはエステル基とアミノ基が重要だと考えた。

次に、アミノ基とアルキル基を骨格に持つポリアミンを添加し、凝集抑制効果を調べた。ポリアミン類であるプトレスシンおよびスペルミジン、スペルミンは、100 mM の添加量でそれぞれ 68 % および、100 %、100 % 抑制し、活性はそれぞれ 13 % および、33 %、28 % 残った。スペルミジンとスペルミンの抑制効果や残存活性はほぼ等しかった。また、アルギニンによる凝集抑制効果はプトレスシンとほぼ等しかったが、残存活性で比べるとアルギニンは 1/3 程度であった。

見出した抑制剤の分子構造は、アミノ基とエステル基やアルキル基が共通して含まれるので、正電荷と疎水基の両方の部位が分子内に存在することが重要であると考えた。また、アミノ酸エステル類は側鎖によらず高い効果を示したこと、およびポリアミン類はアルキル基の長さやアミノ基の数に明確な傾向がみられなかった。そのため、抑制剤の最適化には、電荷の数や疎水基の長さだけでなく、分子内のアミノ基と疎水基の配置やバランスも重要だろう。

見出した抑制剤は、アルギニンの 1/4-1/10 という少ない添加量で、アルギニンを上回る効果があるので、高い応用の可能性を秘めていると考えられる。