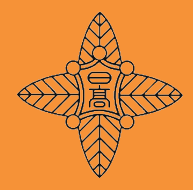


基質タンパク質のβシート構造が分解耐性に及ぼす影響



茨城県立日立第一高等学校 生物部 2年 鈴木幸音、西村美玖

βシート構造がタンパク質の安定性に及ぼす影響

- ・タンパク質のβシート構造は、立体構造を安定化させる。(シミュレーション)
- ・ペプシンはβシート構造を豊富に持っているため、自己分解しにくいとされる。

タンパク質分解酵素の活性において、基質のβシート構造が自身の分解耐性にどのような影響を与えるか検証した研究はない。

今回の研究の目的

基質タンパク質のβシート構造が酵素の触媒効率に与える影響を明らかにする。

触媒効率 k_{cat}/K_m の測定

ミカエリスメンテンの微分方程式

$$-\frac{dS}{dt} = V = \frac{V_{max}S}{K_m + S} \quad \text{から、次の式が導かれることが知られている。}$$

$$\frac{S(t)}{K_m} = W \left(\frac{S_0}{K_m} \exp \left(\frac{S_0}{K_m} - \frac{k_{cat}}{K_m} [E]_{ot} \right) \right)$$

基質濃度: S、反応時間: t、酵素反応速度の最大値: V_{max} 、酵素濃度: E、
1分子の酵素が行う反応の回数: k_{cat} 、 $1/2V_{max}$ 反応のときの基質濃度: K_m

→反応の時間経過による基質残存濃度の変化S(t)を調べ、
フィッティングを行うことで、触媒効率 k_{cat}/K_m を算出できる。

研究ストラテジー

βシート構造の異なる基質が、酵素による分解への耐性の違いを
酵素の触媒効率(k_{cat}/K_m)で比較する。

酵素: ペプシン

基質: ウシ血清アルブミン(BSA)、ナットウキナーゼ(NK)

Table 1 触媒効率の仮説

	βシート構造の本数	ペプシンの k_{cat}/K_m
BSA	0	大きくなる
NK	7	小さくなる

基質残存濃度S(t)の定量

○Bradford法による基質残存濃度S(t)の定量

・Commassie brilliant blue G-250という色素

・塩基性アミノ酸残基、N末端アミン、芳香族アミノ酸と結合

→光の吸収極大が465 nmから595 nm(青色)へと変化する

・断片化されたタンパク質ほど吸着しにくくなる

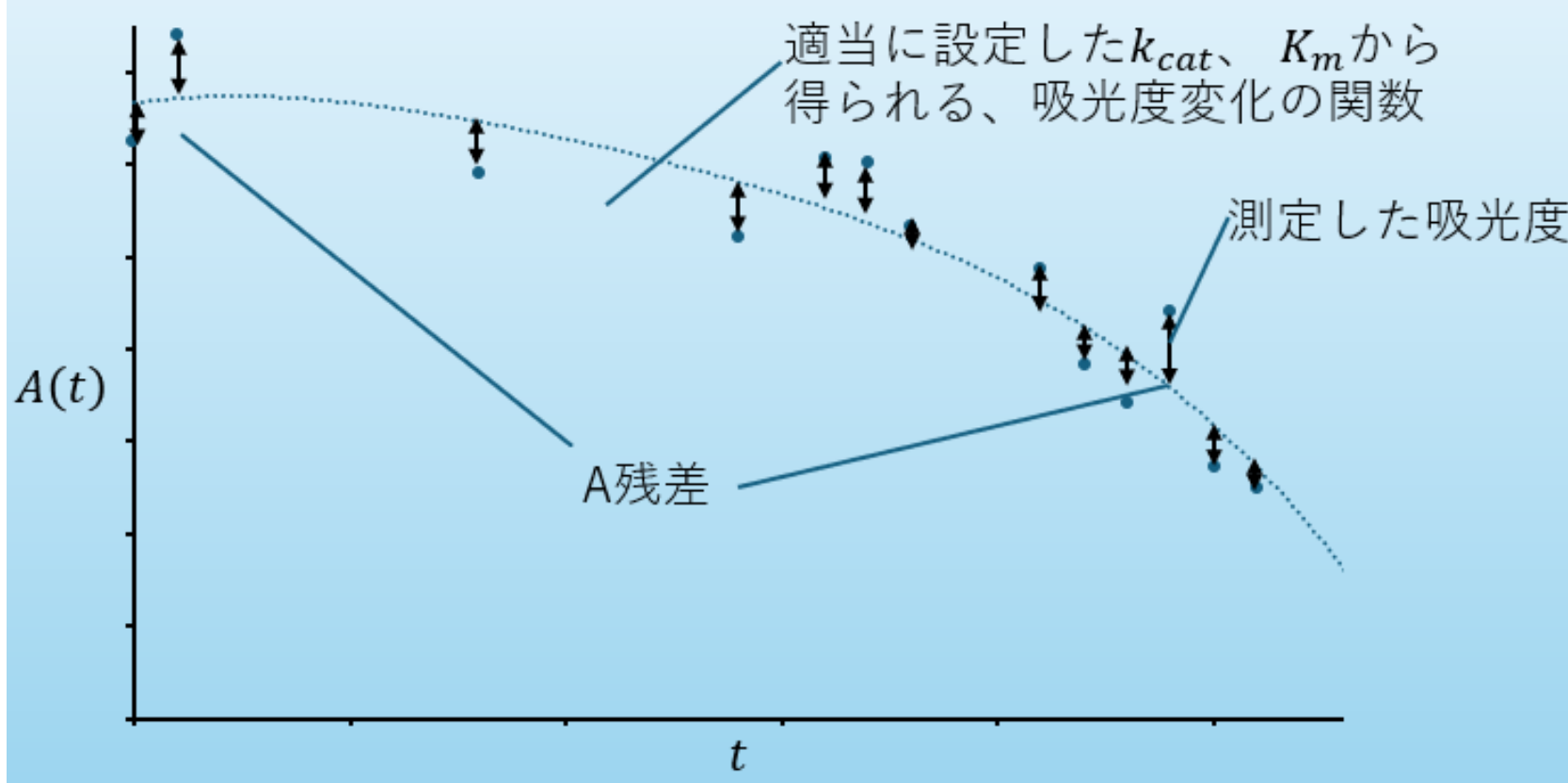
(※疎水性ポケットへのファンデルワールス力により結合するため)

↓

酵素分解が進むと基質の断片が増え、595nmの吸光度が減少する

→ある時間の吸光度A(t)を分解されていない基質残存濃度S(t)とみなせる
(吸光度 $A \propto$ 基質濃度S)

フィッティング方法



- ① k_{cat} , K_m を適当な値に設定した。
- ②実際に測定した吸光度を代入した。
- ③ある時間tに測定した吸光度A(t)と理論値の
差の二乗和が最小になる k_{cat} , K_m を求めた。

反応系と測定方法

(1)反応系

- ・McIlvaine buffer(pH5.0)
- ・BSA(1200 $\mu\text{g/mL}$)、NK(36000 $\mu\text{g/mL}$)
- ・ペプシン(4.5 $\mu\text{g/mL}$)

反応系全体の体積は300 μL とした。

反応は39℃で行った。

それぞれの基質で2回ずつ行い、14回のデータを得た

(2)Bradford法

- ①酵素反応を30分間行い、
5分ごとにBradford試薬に入れた。
- ②分光光度計で595nm吸光度を測定、記録した。

比較方法

① 触媒効率の算出

pH5.0における触媒効率をフィッティング解析により算出した。
・pH5.0は、基質の立体構造が崩れず、ペプシンの活性がある

②基質表面にあるペプシン切断サイト数の比較

Expsy peptide cutterによって、基質のアミノ酸配列から
ペプシン切断サイトを予測した。i3n3Dで基質の立体構造を表示し、
表面にあるペプシン切断サイトを調べた。

③立体構造におけるペプシン切断サイトの配置

βシート上にペプシン切断サイトがどのくらいあるかを調べた。

結果

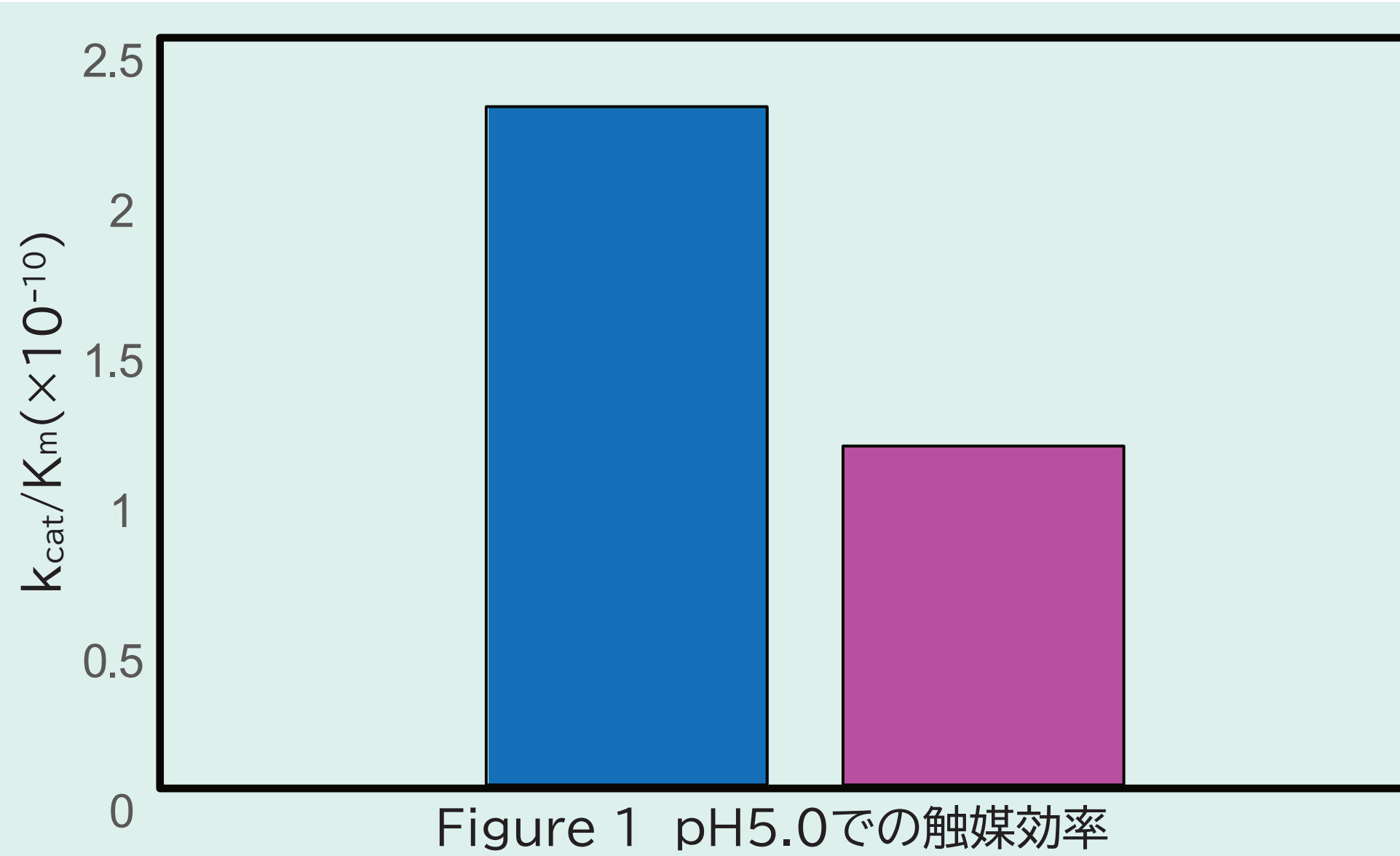


Figure 1 pH5.0での触媒効率

・触媒効率を算出したところ、
BSAは 2.26×10^{-10} 、NKは 1.13×10^{-10} となり、
ペプシンの触媒効率は
NKに対してBSAの方が約1.8倍高くなった。

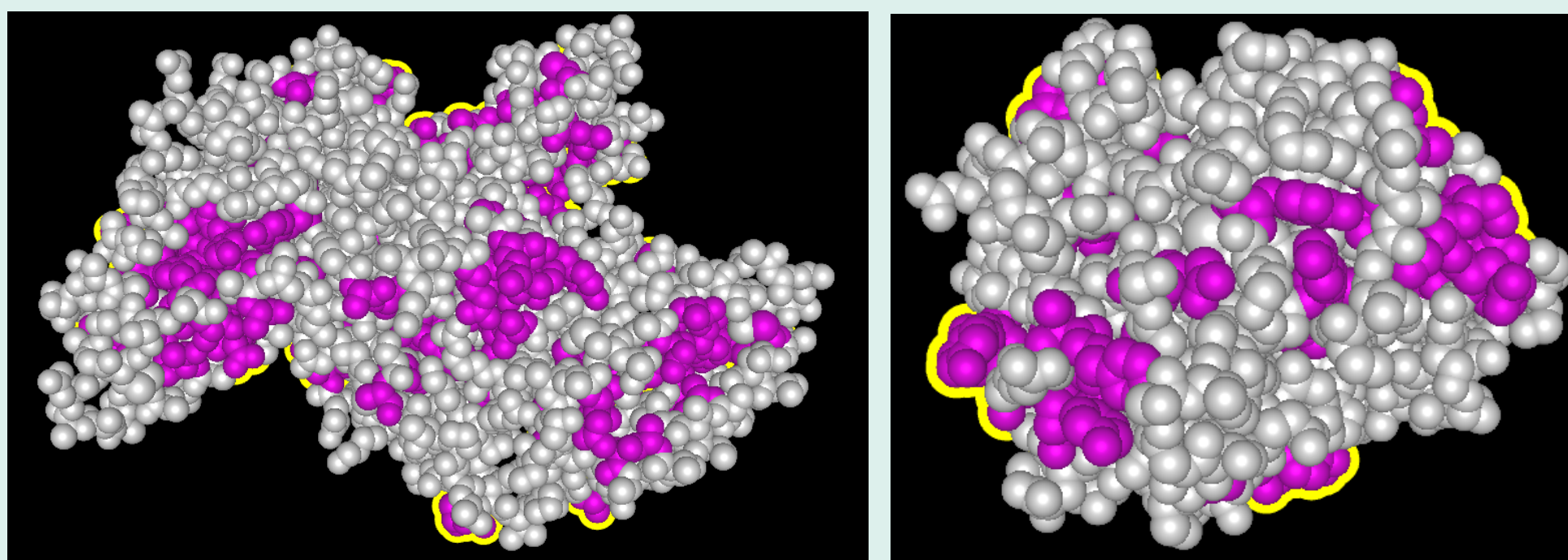


Figure 2 基質表面のペプシン切断サイト
(左:BSA、右:NK) (黄色表示が切断サイト)

・基質表面にあるペプシン切断サイト数の比較

Table 2 分子量あたりの表面にあるペプシン切断サイト

	A:表面の切断 サイト数	B:分子量 (∞ 溶媒露出表面積)	A/B
BSA	82	66,463	1.23×10^{-3}
NK	48	27,000	1.73×10^{-3}

NKはBSAに比べて、約1.4倍多く表面に切断サイトがある。

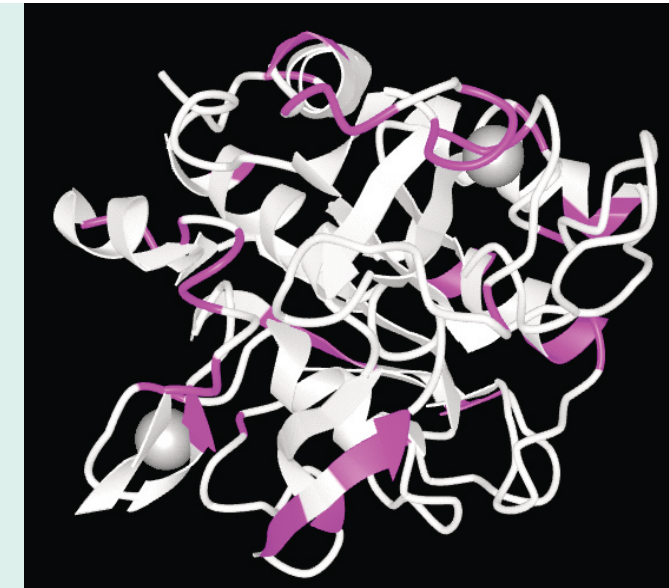


Figure 3 NKのβシート構造上のペプシン切断サイト
(マゼンタ表示が切断サイト)

・立体構造におけるペプシン切断サイトの配置

Table 3 分子量あたりの表面にあるペプシン切断サイト

	A:表面の切断 サイト数	B:分子量 (∞ 溶媒露出表面積)	A/B
BSA	82	66,463	1.23×10^{-3}
NK (βシート上以外)	33	27,700	1.19×10^{-3}

βシート構造上以外のペプシン切断サイト数は、
BSA表面の切断サイト数とほとんど変わらない。

考察

ONKのβシート構造が、酵素による分解を阻害している(Figure 1、Table 2)

①βシート構造は、BSAは0本、NKは7本

②ペプシン切断サイトの切断サイトの配置を調べると、NKはBSAに対して約1.4倍多くの切断サイトが表面に存在した。
→NKは分解されやすいと考えられるが、BSAの方がNKに比べて約1.8倍高い触媒効率を示した。

→すなわち、NKはβシート構造によって分解が阻害されていると考えられる。

○βシート構造が、立体構造を安定化させている(Figure 1、Table 3)

③βシート構造が分解を阻害する理由として考えられるものは、次の2つ。

(1)βシート構造上に存在するペプシン切断サイトが切断されにくくなる。

(2)βシート構造が基質の立体構造全体の安定性に寄与する。

ここで、(1)が正しいと仮定したとき、βシート構造上のペプシン切断サイトは切断サイトとして見なされない。

そこで、NKのβシート上以外の切断サイト数を調べたところ、Table 2に示すようにBSAの切断サイト数とほぼ同じになった。

→触媒効率はNKとBSAでほぼ同値であるはずだが、今回の結果では、BSAの方がNKに比べて約1.8倍高い触媒効率を示した。

→したがって、(1)が正しいとは言えない。

→これらのことは、NKのβシート構造が立体構造の安定性を高めていることを強く示唆していると考えられる。

結論

βシート構造は、立体構造の安定性と分解耐性を
高めることが生化学的に強く示唆された。

今後の展望

- ・SDS-PAGEを行い、ペプシンによって基質が
断片化しているかを確認する。
- ・ラクトフェリン(βシート構造12本)を用いて
触媒効率を比較する。

参考文献

・A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein using
different protein standards and protein isolated from the
marine diatom Thalassiosira pseudonana, John A. Berges, Anne
E. Fisher, Paul J. Harrison (1992)
・Chitosan/casein based microparticles with a bilayer shell-core
structure for oral delivery of nattokinase, Zhang, X. Lyu, X.
Tong, Y. Wang, J. Ye, J. Yang, R. (2020)