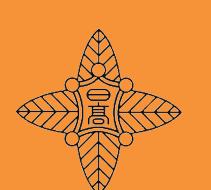


基質タンパク質の β シート構造が分解耐性に及ぼす影響



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

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

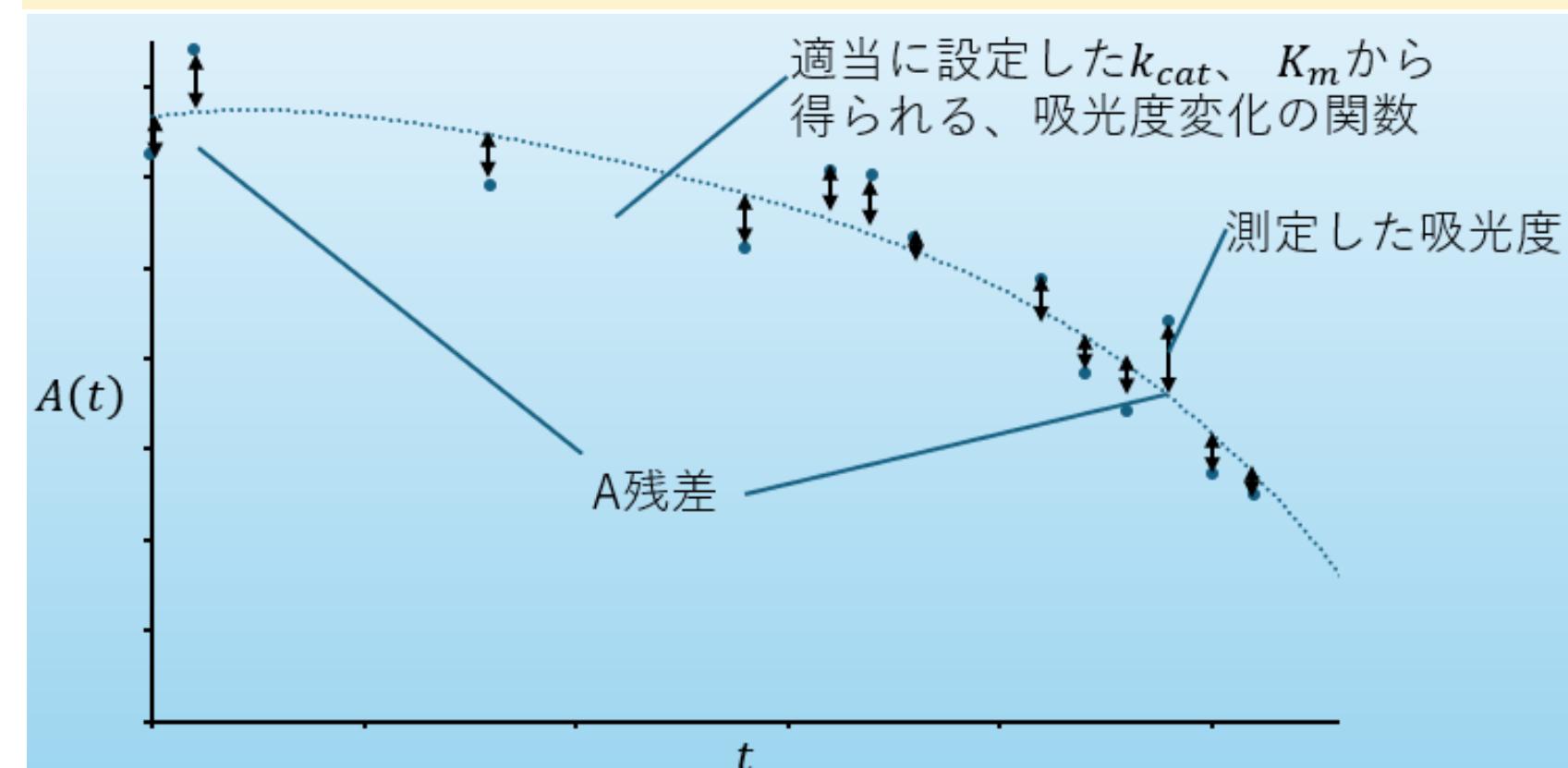
$$\frac{S(t)}{K_m} = W \left(\frac{S_0}{K_m} \exp \left(\frac{S_0}{K_m} - \frac{k_{cat}}{K_m} [E]_{tot} t \right) \right)$$

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。

フィッティング方法



- ①k_{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 μ g/mL)、NK(36000 μ g/mL)
 - ・ペプシン(4.5 μ g/mL)
- 反応系全体の体積は300 μ Lとした。
反応は39°C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試薬を入れた。
 - 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

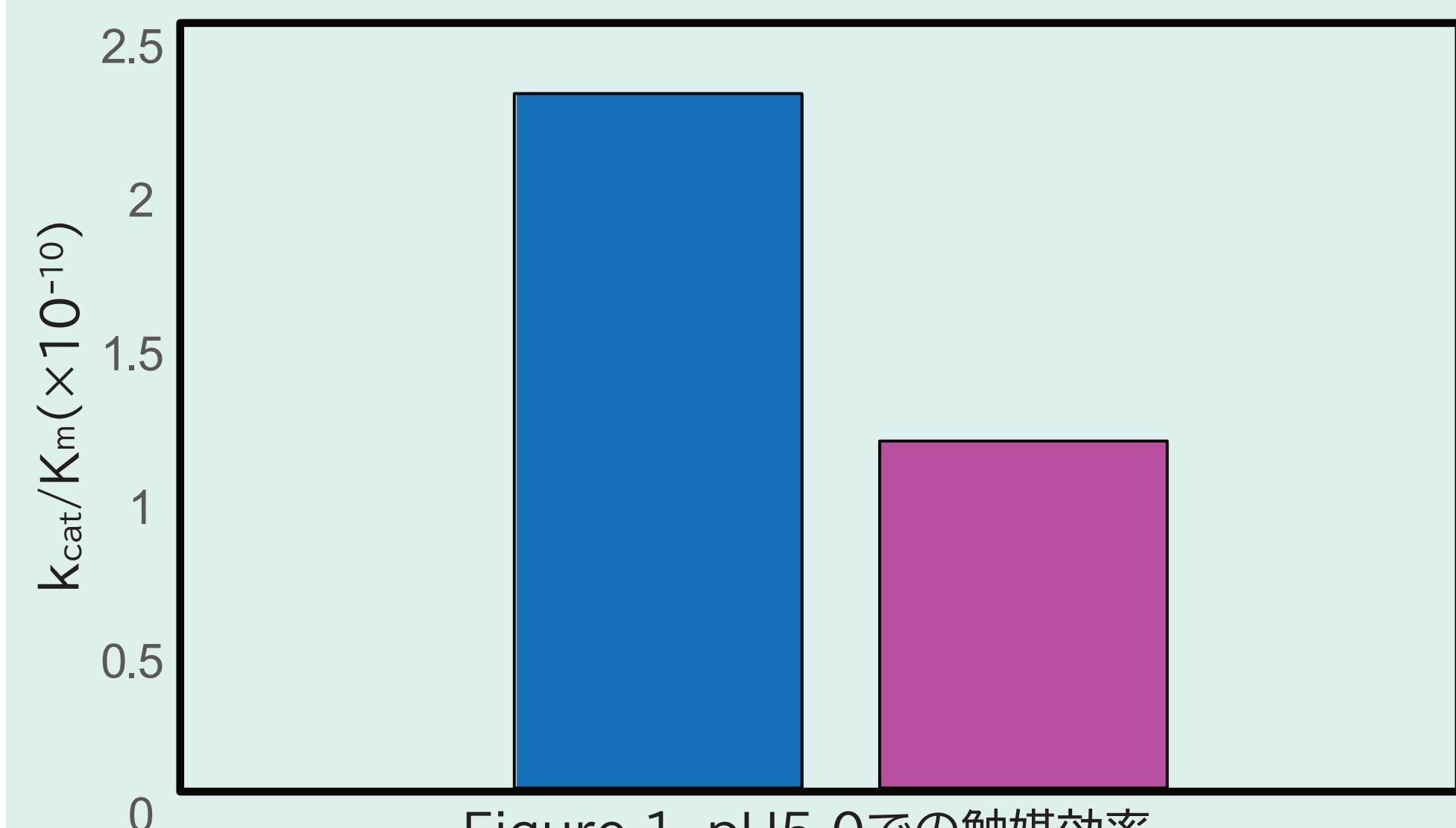
②基質表面にあるペプシン切断サイト数の比較

Exasy 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



- ・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倍高くなつた。

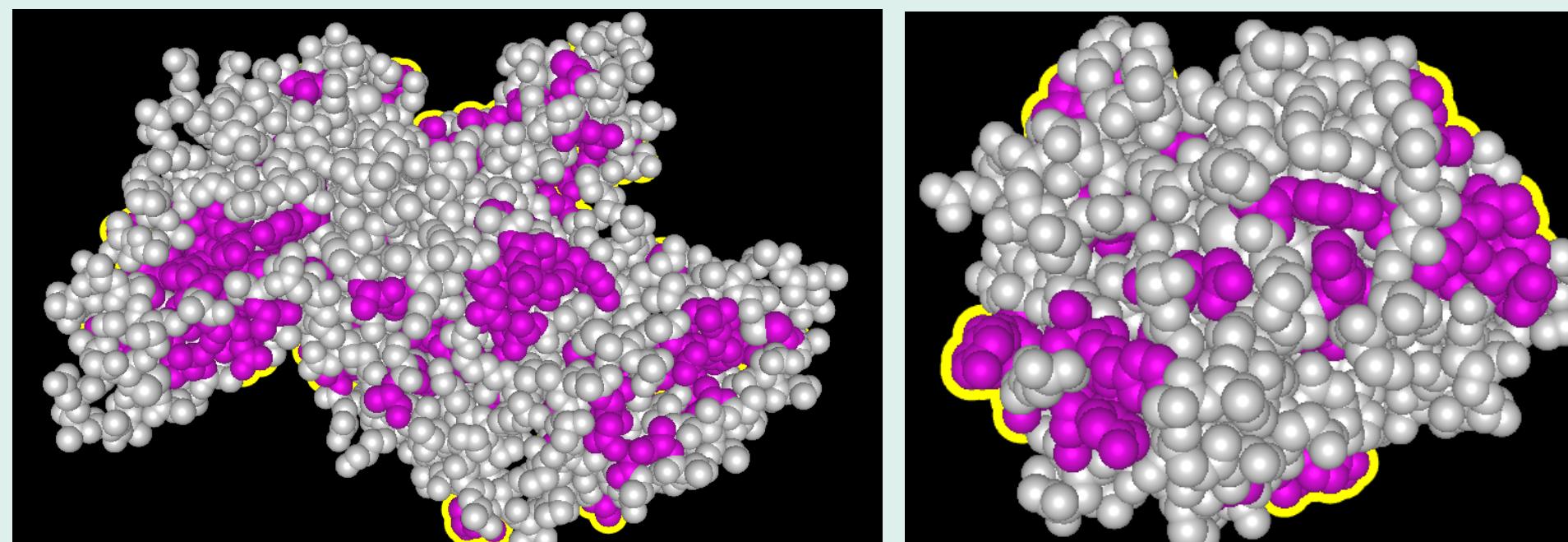


Figure 2 基質表面のペプシン切断サイト
(左:BSA、右:NK) (黄色表示が切断サイト)

・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。

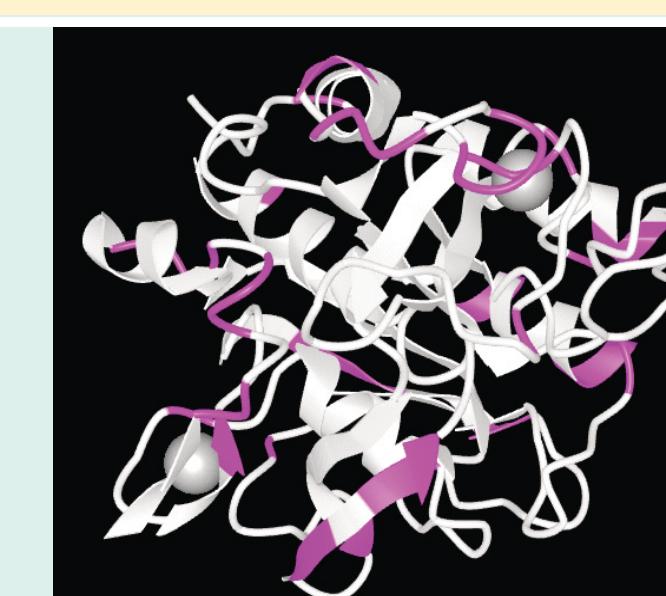


Figure 3 NKの β シート構造上のペプシン切断サイト
(マゼンタ表示が切断サイト)

・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	27,000	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

○NK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)

- ① β 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)

- ③ β 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)