

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

SATテクノロジー・ショーケース2026

■はじめに

β シート構造はタンパク質の立体構造の安定性に寄与していることが、シミュレーションなどで明らかにされている。例えばタンパク質分解酵素であるペプシンは、 β シートを豊富に含んでいるため自己分解しにくいと考えられている。しかし、 β シート構造がタンパク質の分解耐性に寄与しているかについて、生化学的な研究は報告されていない。この仮説を検証するために我々は、酵素を用いて基質の β シート構造の違いによって引き起こされる分解速度の影響を明らかにすることを目的として研究を行った。分解活性を定量化するには、SDS-PAGEを行うことなどが一般的である。しかし、我々は、高校でも安価で簡単に調べることができるBradford法を応用した。具体的には、酵素をペプシン、基質をBSA(β シート構造が0本)とナットウキナーゼ(β シート構造が7本)を用いた。酸性条件下(立体構造が崩れた状態)と、中性条件下(立体構造が崩れていない状態)の酵素の触媒効率をそれぞれ測定し、アミノ酸配列による分解耐性の違いを標準化した値(中性/酸性)を比較した。

■活動内容

1. 実験方法

反応系

反応系(300 μ L):McIlvaine buffer (pH2.2 または pH7.0)、基質タンパク質(BSA またはナットウキナーゼ)、ペプシン。基質タンパク質の濃度は、BSA が600 μ g/mL、900 μ g/mL、ナットウキナーゼが12,000 μ g/mL、36,000 μ g/mLとした。

Bradford法

反応系にペプシンを入れた瞬間から0、40秒後に反応系を15 μ L取り、750 μ LのBradford試薬に入れて12分間静置した。その後、595 nmで吸光度を測定し、記録した。

2. 結果

我々は、 β シート構造が0本のBSAと7本のナットウキナーゼが、ペプシンにより分解される触媒効率が異なることを調べるために、0~40秒間の酵素反応をおこなった後、反応系の一部をBradford法により、吸光度測定をおこなった。この試薬は、小さいアミノ酸になると吸着しにくくなるため、反応が進むと吸光度は減少する。したがって、吸光度の減少量を基質濃度の残存量とみなすことができると考えた。以上より、測定データをもとに結果を解析し、触媒活性を比較した。統合ミカエリス-メンテン式によるフィッティング

を用いて解析を行い、酵素の触媒効率 V_{max}/K_m を算出した。

基質濃度: S 、反応時間: t 、酵素反応速度の最大値: V_{max} 、1分子の酵素が行う反応の回数: K_{cat} 、酵素濃度: E 、 K_m : $1/2V_{max}$ の基質濃度とする。通常のミカエリス-メンテンの微分方程式、 $-dS/dt = V_{max}S/K_m + S$ 、 $V_{max} = K_{cat}[E]_0$ において、基質濃度 S が変数より、変数分離して $t = 0$ 、 $S = S_0$ の条件で積分することで時間 t の吸光度 $S(t)$ についての式を求めることができる。求めた式を $S(t)/K_m$ について解くとLambert Wを用いた閉形式 $S(t)/K_m = W(S_0/K_m \exp(S_0/K_m - V_{max}/K_m t))$ となり、その式でフィッティングをし、触媒効率 V_{max}/K_m を算出した。酸性、中性のそれぞれの条件下で V_{max}/K_m を測定し、その比を算出した。その結果、Table 1に示すように、ナットウキナーゼに対してBSAの方が、非常に高い触媒活性を示した。

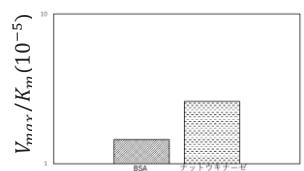


Figure 1 酸性条件下

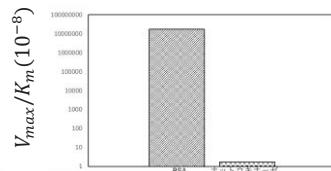


Figure 2 中性条件下

Table 1 V_{max}/K_m の比(N:中性、A:酸性)

| | BSA | ナットウキナーゼ |
|---|--------------------|-----------------------|
| $\frac{N(V_{max}/K_m)}{A(V_{max}/K_m)}$ | 1.17×10^4 | 6.47×10^{-4} |

Expasy Peptide Cutter

Expasy Peptide Cutterの予測により、タンパク質全長に対する切断サイトの割合が、BSAが0.264、ナットウキナーゼが0.194と算出された。このことから、ペプシンの特異性には、大きな違いがないと言える。この結果は、Table 1の結果と一致している。

3. 考察

Bradford法による吸光度は、色素の吸着特性の影響がノイズとして検出されてしまうため、SDS-PAGEを行い、基質が断片化していることを確認する必要があると考えている。また、 β シート構造が異なる基質(ラクトフェリンなど)を用いて同様の検証を行う予定である。

■キーワード:

- (1)タンパク質の安定性
- (2) β シート構造
- (3)統合ミカエリス-メンテン式

■共同研究者:

西村美玖[†]
[†]茨城県立日立第一高等学校