

平成 16 年 3 月 1 日

氏名 山口 哲志



21世紀COEプログラム

拠点：大学院工学系研究科
応用化学専攻、化学システム工学専攻、
化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成15年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	やまぐち さとし 山口 哲志	生 年 月 日
所属機関名	東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻	
所在地	〒113-8658 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学工学部 5号館	
申請時点での 学 年	博士課程 3年	
研究題目	リフォールディング中間体の凝集抑制に関する研究	
指導教官の所属・氏名	東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 長棟 輝行 教授	

I 研究の成果 (1000字程度)

【背景】近年、医学や生化学をはじめとした広い研究分野において、アミロイドタンパク質などの凝集性変性タンパク質が注目されている。このようなタンパク質の凝集反応は、タンパク質の局所的な疎水性表面間の相互作用が主な原因となっている場合が多い。そのため、凝集性変性タンパク質の表面疎水性を定量的に評価することは、凝集反応のメカニズムを解明する上で大変重要である。しかしながら、これらのタンパク質は、溶液中で迅速に凝集し、表面が埋没してしまうため、その表面疎水性を定量することが困難である。そこで、本研究では、タンパク質を固相上に固定化することによって凝集を完全に抑制し、その上でタンパク質の表面疎水性を定量する手法の開発を試みた。

【実験方法】疎水性プローブの吸着量を測定することにより、固定化タンパク質の表面疎水性を定量した。吸着量は、表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用したセンサーを用いて測定した。SPRセンサーは、センサー表面近傍の屈折率変化を高感度に測定することが可能であり、センサー表面に固定化した生体高分子と化合物との相互作用の測定に広く用いられている。また、疎水性プローブには、タンパク質の立体構造にほとんど影響を与えずに、その疎水性表面に吸着することが報告されている非イオン性界面活性剤 Triton X-100 (TX) を用いた。

【結果・考察】まず、表面疎水性の異なる5種類のタンパク質をセンサー表面に固定化し、0.25~10 mM TX水溶液を流した際のSPRシグナルの変化量 ($\Delta S_{\text{protein}}$) をそれぞれ測定した。次に、BETの吸着等温式を用いて $\Delta S_{\text{protein}}$ を解析し、単位固定化量の固定化タンパク質表面へのTXの第一層吸着量を反映するシグナル変化量 (Δa_m) を得た。溶液中のタンパク質の局所的な表面疎水性を定量した文献値 (LH) および一般的な疎水性プローブ法 (ANS法) の結果と Δa_m とを比較したところ、高い相関が見られた (図)。これより、本測定方法および解析方法によって、固定化タンパク質の表面疎水性が定量できることが示された。

次に、センサー表面に固定化した天然型 lysozyme に対して変性還元操作を施し、その前後で $\Delta S_{\text{protein}}$ を測定した。得られた結果から Δa_m を算出したところ、変性還元操作によって Δa_m が大きく増加した (0 → 0.038 RU/RU)。一方、溶液中で同様の変性還元操作を施すと、lysozyme は凝集性変性タンパク質となることが光散乱測定および CD 測定によって確認された。また、同様の結果が、 α -glucosidase についても獲られた。以上の結果より、本研究で開発した TX 吸着量測定法により、固定化タンパク質が凝集性変性状態へ構造変化する際の表面疎水性の増加を追跡できることが示された。

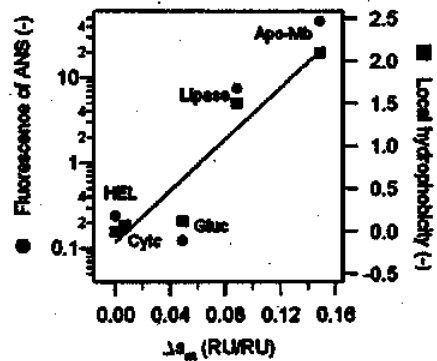


図 蛍光プローブ (ANS) が各タンパク質の疎水性表面へ吸着した際の蛍光強度 (●) および各タンパク質の局所的な表面疎水性の文献値 (■) と TX 吸着量測定法により測定した Δa_m との関係。

タンパク質は、apomyoglobin (Apo-Mb), lipase, α -glucosidase (Gluc), hen egg lysozyme (HEL), cytochrome c (Cyt c)。

II (1) 学術雑誌等に発表した論文A (掲載を決定されたものを含む.)

共著の場合、申請者の役割を記載すること。

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

1. S. Yamaguchi, T. Mannen, T. Zako, N. Kamiya, T. Nagamune,
Measuring adsorption of a hydrophobic probe with a surface plasmon resonance sensor to monitor conformational changes in immobilized proteins.
Biotechnology Progress 2003, 19, 1348-1354.
2. S. Yamaguchi, H. Chai, T. Mannen, T. Nagamune.
Solid-phase artificial chaperone-assisted refolding using insoluble β -cyclodextrin-acrylamide copolymer beads.
submitted.
3. S. Yamaguchi, T. Mannen, T. Nagamune.
Evaluation method for the surface hydrophobicity of immobilized protein with a surface plasmon resonance sensor.
submitted.

氏 名 山口 哲志

II (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文

(共同研究者(全員の氏名)、題名、発表した学会名、場所、年月を記載)

(国際学会)

1. S. Yamaguchi, T. Mannen, T. Nagamune,
Solid-phase artificial chaperone-assisted refolding using insoluble β -cyclodextrin-acrylamide copolymer beads.
13th Biochemical Engineering, Boulder, USA, 2003.7.19-23.
2. S. Yamaguchi, S. Tsukiji, T. Mannen, T. Nagamune,
Solid-phase artificial chaperone-assisted refolding using insoluble β -cyclodextrin-acrylamide copolymer beads.
1* International symposium of Biomolecular Chemistry, Awaji, Japan, 2003.12.2-4.

(国内学会)

3. 山口哲志, 萬年輝久, 長棟輝行,
界面活性剤吸着量測定法を用いた固相上タンパク質の構造変化の追跡
化学工学会第 68 年会, 東京, 東京大学本郷キャンパス, 2003.3.22
4. 山口哲志, 萬年輝久, 長棟輝行,
シクロデキストリンヒドロゲルビーズを用いた固相人工シャペロン法の開発
化学工学会第 34 回秋季大会, 仙台, 東北大学キャンパス, 2003.9.19