

2

タンパク質の性質は？

加藤広介

1 タンパク質の構造

タンパク質は20種類のアミノ酸がペプチド結合で連結された高分子化合物（ポリペプチド）である。タンパク質のアミノ酸配列は、タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列により直接決められており、これを一次構造と呼ぶ。この一次構造が、どのような高次構造へと折りたたまれていくかを決めている。次にポリペプチド鎖は、主として α ヘリックスか β シートのいずれかの構造をとり、二次構造と呼ばれる。 α ヘリックスおよび β シート、さらに二次構造をとらないループやターンが折りたたまれて三次構造が形成される。多くのタンパク質は折りたたまれた複数のポリペプチド鎖が会合して四次構造を形成する。ポリペプチド鎖がタンパク質として機能するためには、通常、生理的条

件下で安定な三次構造を形づくることが必要であり、ほとんどのタンパク質は球状になる。

アミノ酸は一般的に側鎖の極性に基づいて分類される（表1）。この分類法はタンパク質が折りたたまれて天然の構造を作り出す原理に基づいている。その原理は、疎水性の側鎖が水に触れないようにし、親水性の側鎖を水和させようとする力にある。20種類のアミノ酸は極性、酸性、塩基性、芳香族性、大きさ（分子量）、コンフォメーションの柔軟性、架橋性、水素結合能、化学反応性など、物理化学的性質がそれぞれ異なっており、①非極性側鎖をもつアミノ酸、②極性無電荷の側鎖をもつアミノ酸、③電荷をもつ極性側鎖のアミノ酸の3つに大別される。

表1 タンパク質を構成する主なアミノ酸

	名称	3 (1) 文字表記	側鎖の特徴・特記事項
非極性側鎖 アミノ酸	グリシン	Gly (G)	脂肪族
	アラニン	Ala (A)	脂肪族
	バリン	Val (V)	脂肪族
	ロイシン	Leu (L)	脂肪族
	イソロイシン	Ile (I)	脂肪族
	メチオニン	Met (M)	脂肪族・硫黄原子を含む
	プロリン	Pro (P)	イミノ酸
	フェニルアラニン	Phe (F)	芳香環
	トリプトファン	Trp (W)	芳香環
極性無電荷側鎖 アミノ酸	セリン	Ser (S)	水酸基
	スレオニン	Thr (T)	水酸基
	アスパラギン	Asn (N)	アミド基
	グルタミン	Gln (Q)	アミド基
	チロシン	Tyr (Y)	解離性の水酸基をもつ芳香環
	システイン	Cy (C)	ジスルフィド結合 (S-S) を形成
極性電荷側鎖 アミノ酸	リシン	Lys (K)	アミノ基 (pKa : 10.54)
	アルギニン	Arg (R)	アミノ基 (pKa : 12.48)
	ヒスチジン	His (H)	イミダゾール基 (pKa : 6.04)
	アスパラギン酸	Asp (D)	カルボキシル基 (pKa : 3.90)
	グルタミン酸	Glu (E)	カルボキシル基 (pKa : 4.07)

ペプチド骨格のアミド結合はタンパク質のアミノ酸残基を結び付けている唯一の共有結合である。分泌タンパク質や、細胞内部の還元性環境にさらされることのない細胞表面タンパク質の細胞外部分などでは、アミド結合以外の共有結合としてシステイン残基間のジスルフィド架橋が存在する。またタンパク質にみられるもう1つの一般的な架橋結合は、タンパク質側鎖への金属イオンの配位である。タンパク質の安定化に働く金属イオンは化学反応には関与せず、タンパク質の活性部位において生化学的機能を果たす金属イオンとは明確に異なる。しかしながら、折りたたまれたタンパク質の構造安定化に対し、共有結合の寄与はほとんど無いことが明らかとなっている。タンパク質の構造

安定化に寄与するのは、大部分がファンデルワールス相互作用、水素結合、静電的相互作用などの非共有結合性の弱い極性相互作用である。これら一つ一つの結合のエネルギー的な寄与は非常に弱いものだが、折りたたまれたタンパク質構造にはこういった相互作用が数百から数千も存在するので、そのエネルギー的な寄与は積算されて非常に大きなものとなる。このようにタンパク質は、化学的性質のきわめて異なる20種類のアミノ酸の組み合わせにより、それぞれに生化学的性質が大幅に異なったものとなる。このため、自分が解析の対象とするタンパク質の性質を知ることは、タンパク質の発現と精製のための重要な鍵となる。

2 タンパク質固有の性質を知る

1 分子量と等電点 (pI)

タンパク質の発現系を選ぶ際、分子量は1つの基準となる。例えば、大腸菌は100 kDaを超えるような大きな分子量のタンパク質の大量発現には適さない。また精製法の選択のうえでも、タンパク質の分子量は重要となる。例えば、タンパク質をその大きさや形状で分画するゲル濾過カラムクロマトグラフィーでは、タンパク質の分子量はカラムの担体を選択するうえで重要な要素の1つとなる。またタンパク質を検出するためにSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行う際にも、目的タンパク質の分子量を考慮して適切なゲル濃度を設定しなければならない。

タンパク質は多くの解離基および極性基をもっており、pHによってその荷電状態は異なる。正負の電荷の総和が0で、電気泳動的にプラス側にもマイナス側にも移動しないpH、すなわち**等電点 (isoelectric point : pI)**においては、**タンパク質分子間の引力が最も大きくなるために、タンパク質の溶解度は最小になる。**等電点沈殿法はこのようなタンパク質の性質を利用して、pHを等電点付近に調整することで目的タン

パク質を沈殿させて分離する方法である。pIは、タンパク質分子表面に存在する解離基および極性基の数と種類によって決まるので、無塩状態、あるいは非常に低いイオン強度下では、タンパク質の種類によって固有の値を示す。pIはタンパク質の安定性に非常に重要であり、緩衝液のpHの設定において指標となる値でもある (後述)。

2 タンパク質のドメイン構成

大部分のタンパク質は球状で、ポリペプチド鎖がらせんを形成し、ぎっしりと詰まった構造をとる。分子量がおおよそ20,000以下のタンパク質は、平均分子径が20~30Åの単一の球状構造をとることが多いが、それより大きなタンパク質では、通常は2つ以上の小さな球状構造、すなわち構造ドメインが集まったモジュール構成になっている。ドメインはタンパク質構造のうち最小単位であり、多くのタンパク質では一続きのアミノ酸配列によって構成されているが、なかには分散して存在しているアミノ酸配列が、三次構造上では集合して1つのドメインを形成する場合もある。

これらドメインの多くは、溶液中で単独で安定な折りたたみ構造をとるだけでなく、**もとの全長タンパク質が示す生化学的機能の一部を保持していることが多い**。タンパク質全体の機能は個々のドメインの特性の総和で決定される。多くのタンパク質は、それぞれがもつドメインによってファミリーに分類できる。このようなタンパク質のモジュール特性から、さまざまな改変タンパク質や、変異体を作り出すことが可能となる。例えば、多くの転写因子はDNA結合ドメインと、転写活性化ドメインの2つをもつ。このDNA結合ドメインだけを分離し、これに目的のタンパク質を融合した人工タンパク質を作ることで、目的タンパク質を強制的にDNAに結合させてその機能を検討することができる。また、あるタンパク質が多数のドメインをもつとき、特定のドメインだけを欠損した変異体を作製することで、標的タンパク質の特定の生化学的機能の寄与を検討する実験が可能となる。なお、ドメインは構造的に独立している場合が多く、欠失変異体をデザインする場合などは、ドメインで区切ると成功することが多い。このように目的タンパク質のドメイン構成を知ることによって、そのタンパク質の機能を推定することはもちろんのこと、実験の目的に応じてドメインだけを抽出することや、また変異体の作製などが可能となる。

3 複合体の有無

多くのタンパク質は単独ではなく、複数のタンパク質が集合して複合体を形成することで機能をもつことがある。この場合の複合体とは、同一あるいは異なるポリペプチドが複数会合して形成する多量体 (oligomer) の意味と、異なる機能を有する複数のタンパク質が集合して巨大な機能性複合体 (complex) を形成するという2通りの意味を含んでいる。多量体はそれを形成することではじめてタンパク質単体の機能をもち、機能性複合体は基本的にそれを構成する因子がそれぞれ単独でも機能をもつことが多い。

まず前者についてであるが、例えば、ヘモグロビンは

2本の α 鎖と2本の β 鎖を含み、2つのホモ二量体から構成されたヘテロ四量体である。このように1つのタンパク質の機能が、複数の異なるポリペプチド鎖から構成される場合には、それらすべての遺伝子を発現させなければ機能的タンパク質を形成できない場合がある。

次に後者のケースであるが、代表的な例としてヒトのRNAポリメラーゼII複合体などがある。ヒトRNAポリメラーゼIIは、12個のタンパク質が会合した500kDa以上の大きな複合体である。このような大きな複合体の各サブユニットタンパク質を個別に発現・精製し、再構成することは非常に労力のいる作業である。そこで、近年では構成サブユニットの1つにタグを融合してこれを細胞に発現させ、この細胞の抽出液からアフィニティー精製することで、**細胞内で再構成されたRNAポリメラーゼII複合体ごと精製する手法**が用いられている¹⁾。次節でも述べるが、哺乳動物細胞はタンパク質の取量では大腸菌に遠く及ばないが、このような大きな複合体の精製が可能である点では大きなアドバンテージをもつ。

このように目的とするタンパク質が単独で機能するのか、ヘテロ多量体として機能するのか、あるいは機能性複合体として精製する必要があるのか、といった目的に合わせてタンパク質発現系を選択する必要がある。

4 細胞毒性

タンパク質のなかには、発現することで細胞自身の生存を著しく脅かすタンパク質が存在し、このような性質は細胞毒性と呼ばれる。このようなタンパク質は、発現させると**細胞自身が増殖できないため、精製することが困難となるケースが多い**。

このようなタンパク質の一例として、大腸菌のコリシンがある。細菌が生産して別の細菌を殺す一連のタンパク質性毒素をバクテリオリシンといい、そのなかでもある大腸菌が生産して別の大腸菌を殺すものはコリシンと呼ばれる。コリシンはその毒性発現機序によっ

ていくつかのタイプに分類される。そのなかでDNAやRNAを切断するヌクレアーゼ型と呼ばれるものは、生産菌細胞内において潜在的に発現致死性が高いため、通常特異的阻害因子との強固な複合体として生産される²⁾。もし大腸菌発現系でこのようなコリシタンパク質を発現させ精製しようとするなら、阻害因子を共発現させた後、精製段階で阻害因子と分離するなどの工夫が必要となる。あるいはタンパク質自身の活性を必要としない場合なら、ヌクレアーゼドメインを欠損させた変異体として発現させることも可能である。コリシンの例は極端な例の1つであるが、標的タンパク質が細胞毒性をもつ場合には、生産細胞への影響をできるだけ緩和できる発現系を構築することが必要とされる。

5 修飾の有無

タンパク質の多くが翻訳後修飾を受けることが知られており、例えばヒトではタンパク質の約50~90%が翻訳後修飾を受けていると推定されている。共有結合性の翻訳後修飾によって細胞は、20種類の天然アミノ酸によって強いられる制限をはるかに越えた、広範囲のタンパク質の構造や機能をもつに至っている。代表的な共有結合性修飾としては、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化、糖鎖付加などがあり、限定加水分解も多くみられる。これ以外にもさまざまな共有結合性修飾が存在し、真核細胞においてはその数は40種類以上にのぼるとされている。

共有結合性修飾の大半は、タンパク質の局在、活性、他のタンパク質との相互作用などの変化に寄与する。リン酸化は、タンパク質の共有結合性修飾のなかでも広範にみられ、セリン、スレオニン、チロシン側鎖に可逆的に導入される。タンパク質はキナーゼ（リン酸化酵素）の作用によってリン酸化され、ホスファターゼ（脱リン酸化酵素）によって脱リン酸化される。近年、プロテオミクス解析技術の発展に伴って、リン酸化タンパク質のプロテオーム解析などが盛んに行われている。これには、細胞よりリン酸化状態を維持した

ままタンパク質を精製する必要がある。一般的にホスファターゼは活性が非常に強いいため、細胞からリン酸化タンパク質を精製するには、各種のホスファターゼ阻害剤を使用する必要がある。

リン酸化は細菌からヒトに至るすべての生物で見つがっているが、ヒトのタンパク質を大腸菌に発現させて、的確なリン酸化状態を検出することができるであろうか。原核生物のもつキナーゼのほとんどは、ヒスチジン残基とアスパラギン酸残基をリン酸化するものであり、真核生物のセリン/スレオニンキナーゼやチロシンキナーゼは一部の細菌で見つがっているのみである。すなわち、大腸菌のタンパク質発現系では、ヒトのタンパク質の正確なリン酸化修飾を導入することはできない。一方で、高等真核細胞である昆虫細胞を用いたバキュロウイルス発現系では、リン酸化修飾を維持したタンパク質の発現が可能である。このように、目的タンパク質の修飾が重要となる場合には、それに適したタンパク質発現系を選択することが必要となる。

6 細胞内局在

タンパク質は正確に機能するために、細胞内の特定の場所へ配置される。細胞内部におけるタンパク質の局在化は、タンパク質自体のアミノ酸配列、各種の翻訳後修飾、足場タンパク質という、主に3つの方法によって達成される。

核、小胞体、ゴルジ体などへの局在化は、通常タンパク質のアミノ酸配列にコードされている特定の局在化シグナルによって成し遂げられる。翻訳後修飾によるタンパク質の局在化の代表的なものとしては、リン酸化やグリコシル化（糖鎖付加）が挙げられる。真核細胞の分泌タンパク質や膜結合タンパク質のほとんどはグリコシル化され、小胞体からゴルジ体への輸送を介して目的の場所へ輸送される。タンパク質の局在と機能は密接に関係しているため、もし標的となるタンパク質を発現させたとき、正確な細胞内局在を反映できていなければ、タンパク質の正しい機能をみる実験にならない。外来タンパク質が本来の細胞内局在を反

映できない場合、発現量や、精製用のタグを融合している影響を考える必要がある。いずれにしても外来の

タンパク質を細胞に発現させる場合には、**正確な細胞内局在が反映されていることを確認する必要がある。**

3 タンパク質の安定性や溶解性に影響する要因

タンパク質の安定性とは、タンパク質が機能的な三次構造を維持する能力と言い換えることができる。タンパク質の構造は、弱い極性相互作用と、共有結合から形成されるが、これらの結合は外的なさまざまな要因によって変化し、場合によってはタンパク質の構造が壊れて本来の機能を失った状態（変性状態）となる。

また、タンパク質の水への溶解性もさまざまな要因によって影響され、タンパク質によっては、溶液成分の少しの変化によっても容易に析出して不溶性の沈殿となってしまうことがある。このようなタンパク質の不溶性化も、タンパク質の回収率を低下させ、また活性測定を困難にする一因となる（しかし逆に言えば、タンパク質の溶解度を利用して、目的タンパク質を分別・沈殿して回収することが可能である）。タンパク質の水に対する溶解度は、主にタンパク質分子の表面に局在するアミノ酸残基の種類と表面の構造に依存する。すなわち、中性のpH付近において正電荷をもつアルギニンやリシンなどの塩基性アミノ酸残基、あるいは負電荷をもつアスパラギン酸やグルタミン酸などの酸性アミノ酸残基を分子表面に多くもつタンパク質は、水中で水分子のもつ大きな誘電率と双極子モーメントのためにタンパク質分子間の静電的な相互作用が弱められる。また、これらの残基の解離基に水分子が結合（イオン水和）することによって水分子との親和性が増し、その結果、水によく溶けるようになる。セリンやスレオニンなどの極性アミノ酸残基を分子表面に多くもつタンパク質もこれらの残基の極性基（OH基など）と水分子間に水素結合が形成され、水によく溶けるようになる。これに反して、ロイシンやイソロイシンなどの疎水性の強いアミノ酸残基を分子表面に多くもつタンパク質は、水分子がこれら疎水性残基の周りに籠状の特殊な構造を作る（疎水性水和）ため、水から排

除されて水に溶けにくくなる。

タンパク質の安定性や水溶解性に影響を及ぼす要因としては、温度、pH、塩濃度、タンパク質自身の濃度、界面活性剤、カオトロピック塩などの各種変性剤、二価金属、プロテアーゼの共存などさまざまなものが挙げられる。以下にそれぞれの要因がタンパク質の安定性に及ぼす影響を概説する。

1 温度

タンパク質が高温にさらされると、タンパク質を機能的な構造に維持している弱い相互作用が切断され、最終的には変性状態となる。一般的にタンパク質の構造に関する性質は、狭い温度範囲で急速に変化し、このときの変化の midpoint の温度を固体の融解にならって融解温度（ T_m ）という。タンパク質の多くは融解温度が 100°C よりずっと低い。しかし、高熱菌のように 100°C に近い環境で生活するような生物では、タンパク質の融解温度はずっと高い。われわれがPCRで用いるような、熱耐性DNAポリメラーゼなどはその代表的な例であろう。一般的に、目的とするタンパク質の安定性が明らかでない場合には、**低温（氷冷あるいは 4°C ）でタンパク質を扱うのが普通である。**ただし、なかには少数ではあるが低温で不安定化する低温感受性タンパク質もあるため注意が必要である。

2 pH

タンパク質は多くの解離基および極性基をもっており、pHによってその荷電状態は異なる。各アミノ酸残基の荷電状態は、アミノ酸側鎖のpIと溶液のpHから決定され、溶液のpHによってタンパク質の溶解度、生

表2 代表的な緩衝液（バッファー）の性質

バッファー	pKa	使用可能な pH 範囲	特徴
Glycine-HCl	2.35	1.85～2.85 (±0.5)	
Acetate-NaOH	4.76	4.26～5.26 (±0.5)	
MES-NaOH	6.15	5.65～6.65 (±0.5)	比較的高価
PIPES-NaOH	6.80	6.30～7.30 (±0.5)	比較的高価
MOPS-NaOH	7.15	6.65～7.65 (±0.5)	比較的高価
Phosphate-NaOH	7.22	6.72～7.72 (±0.5)	Ca ²⁺ 、Mg ²⁺ などの多価陽イオンと不溶性の複合体を形成する濃度、バッファーのイオン組成の変化による pH の変動が大きい
HEPES-NaOH	7.55	7.05～8.05 (±0.5)	細胞毒性が低い
Tris-HCl	8.30	7.80～8.80 (±0.5)	細胞培養の際によく用いられる
Borate-NaOH	9.24	8.74～9.74 (±0.5)	Trisのアミノ基による電子伝達系の阻害、細胞毒性がある
Glycine-NaOH	9.57	9.07～10.07 (±0.5)	

理活性は大きく異なってくる。タンパク質を扱う際には、常に至適な pH を維持するための緩衝液（バッファー）を選択することが重要である。バッファーのもつ緩衝能はその pKa（解離定数の逆対数）で最大となり、そこから離れると低くなる。一般的には、**pKa±0.5 程度の pH 範囲で有効な緩衝作用が得られる**（表 2）。温度、緩衝剤の濃度、あるいはイオン組成などによって、pH は少し変動する。

3 塩濃度

一般に、適当に低い濃度の塩が共存すると、タンパク質のような高分子電解質の水に対する溶解度は増加する（塩溶）。この現象は、高分子電解質のもつ解離基と溶液に共存している塩イオンの間の静電的な相互作用に基づく。一方、塩濃度が高くなり過ぎると、逆に溶解度が減少する（塩析）。水を配位する程度がタンパク質のような高分子電解質よりも塩イオンのほうが高いため、高い塩濃度の水溶液中では大部分の自由水がイオンの配位水として奪われ、結果としてタンパク質間の相互作用が増すものと考えられる。これが、塩析の原理である。このようにタンパク質の水への溶解度や安定性は、使用する塩の種類（後述）と濃度によって大きく左右されるため、タンパク質を精製する際にそのタンパク質の性質を熟知し、適切な塩と塩濃度を選択する必要がある。一般に、**目的タンパク質の塩に対する可溶性が不明な場合は、生理的イオン強度で**

ある 0.1～0.2 M のナトリウム塩あるいはカリウム塩溶液を用いることが多い。裏を返せばこのようなタンパク質の塩に対する溶解度の違いを利用することでタンパク質の分離沈殿が可能となり、特に硫酸アンモニウムを利用した塩析がよく用いられている。

4 界面活性剤

界面活性剤は、他の方法では可溶化することが困難な非常に疎水性の強いタンパク質（膜タンパク質など）を可溶化するときなどに用いられることが多い。膜タンパク質の可溶化には、主に陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤およびステロイド骨格をもつコール酸やデオキシコール酸（胆汁酸）がよく利用されている（表 3）。

少量の界面活性剤を水に溶かすと、界面活性剤は、まずモノマー（単量体）の状態では溶解する。界面活性剤の濃度を上げていくと、ある濃度（臨界ミセル濃度）以上でモノマーが集合してミセルを形成し始める。ミセル中で界面活性剤は、その親水基をミセルの外側に、そして疎水基を内側に向けて存在しており、水溶液中ではミセル内部の疎水性領域に膜タンパク質などの疎水性領域を取り込むことでこれらを可溶化する。したがって、**タンパク質可溶化時の界面活性剤の濃度は臨界ミセル濃度以上を加える必要がある。**非イオン性界面活性剤は臨界ミセル濃度が低いので、一般的には 0.1～1%（w/v）で使用される。非イオン性界面活性剤

表3 主な界面活性剤

界面活性剤 (分子量)	ミセルの分子量	臨界ミセル濃度 (mM)	会合数
非イオン性			
Nonidet P-40 (602)	90,000	0.29	149
Triton X-100 (628)	90,000	0.24	140
Tween 20 (1,228)	—*	0.06	—*
両イオン性			
CHAPS (615)	6,150	8~10	10
陰イオン性			
SDS (288)	18,000	6~8	62
ステロイド骨格をもつ界面活性剤			
コール酸 (431)	1,800	13~15	4
デオキシコール酸 (415)	4,200	4~6	10

* ミセルの分子量は、界面活性剤の分子量とミセルに含まれる界面活性剤の数（会合数）の積で計算される。Tween20は、分子内に複数ある脂質鎖の長さが異なる（化学式自体は変化しないので分子量は一定）分子の混合物であり、それぞれにミセルの分子量と会合数が異なるため、値は表記しない

は、イオン性界面活性剤に比べてタンパク質に対する作用が温和であり、また可溶化したタンパク質を精製する際に、イオン交換クロマトグラフィーなどを用いることができるなどの利点がある。陰イオン性界面活性剤としては、SDS-PAGEに用いるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) が有名である。この界面活性剤は膜に存在するほとんどのタンパク質を可溶化できるが、タンパク質に対する変性効果が強いいため、タンパク質の機能を維持した状態での分離はほとんど不可能である。また、変性条件でよいとしても、ミセルの大きさのために透析で除去することなども難しく、通常の方法に用いるのには適していない。また一方で、界面活性剤はタンパク質間の非特異的相互作用を防ぐために用いられることもある。いずれにしても、界面活性剤は非極性アミノ酸残基に疎水的に結びつき、天然コンフォメーション形成の大きな力である疎水力を変えるものであるため、タンパク質の機能を維持する場合にはその濃度設定に十分に注意する必要がある。

5 変性剤

SDSは、先述したようにタンパク質を強力に変性させる効果をもつ。このようなタンパク質の変性剤は、タンパク質の構造を破壊してその機能を失わせるが、

その反面水溶性を高めるという利点があり、実験によっては非常に利用価値が高くなる場合もある。

代表的な変性剤はカオトロピック塩と呼ばれる一連の塩である。こちらも先述したが、塩はタンパク質の安定性に大きく影響し、その影響は塩の種類によって大きく異なる。一般的に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ や KH_2PO_4 はタンパク質の天然構造を安定化し (Tmを上げる)、KClやNaClはほとんど影響せず、KSCNやLiBrは不安定化させる (Tmを下げる)。塩がタンパク質を安定化する順番はタンパク質の種類にあまり関係せず、塩析性と平行している。この順番はHofmeister系列と呼ばれる。

陰イオン： $\text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$
 陽イオン： $\text{NH}_4^+, \text{Cs}^+, \text{K}^+, \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$

Hofmeister系列でタンパク質を変性させる性質の強いもの、 I^- , ClO_4^- , SCN^- , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} をカオトロピックであるという。さらにここに、グアニジウムイオン (Gu^+) とイオンではないが尿素もカオトロピック塩に加えられる。この2つは通常5~10Mの濃度で使い、最もよく用いられる変性剤である。例えば、大腸菌でのタンパク質発現系では、しばしば目

表4 主なプロテアーゼ阻害剤

プロテアーゼ阻害剤	阻害される主要なプロテアーゼ	使用濃度範囲 (推奨)
Benzamidine	セリンプロテアーゼ	0.5~5 mM (5 mM)
Phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF)	セリンプロテアーゼ	0.1~10 mM (1 mM)
Leupeptin	セリンプロテアーゼ システインプロテアーゼ	1~10 μ g/mL (3 μ g/mL)
Pepstatin A	アスパラギン酸プロテアーゼ	1~10 μ g/mL (3 μ g/mL)
Aprotinin	カリクレイン, トリプシン キモトリプシン	1~50 μ g/mL (5 μ g/mL)
EDTA	金属プロテアーゼ	1~10 mM (1 mM)

的タンパク質が封入体 (inclusion body) に取り込まれてしまうことがあるが、尿素やグアニジンはこれを可溶化するのに最も汎用されている。カオトロピック試薬には塩析作用がなく、非極性物質の水への溶解度を高める。したがって変性剤としての性質も疎水性相互作用を妨げることによると思われるが、その機構は明らかでない。一方、塩析作用をもつ塩は逆に疎水作用を強めることでタンパク質の天然の構造を安定化し、変性から守る効果が高い。硫酸アンモニウムが最もよい塩析剤として利用されるのは、塩析効果が高く、なおかつタンパク質を最も安定化させる塩であるからに他ならない。

6 二価金属と金属キレート試薬

金属イオン (特に二価金属) は主にタンパク質と配位共有結合を作ることでタンパク質の構造を安定化させる働きと、タンパク質の活性部位において生化学反応に関する働きをもっている。EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid: エチレンジアミン四酢酸) や EGTA [ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether) -N, N, N', N'-tetraacetic acid: エチレングリコールビス-N, N, N', N'-四酢酸] は金属イオンをキレートする試薬で、タンパク質から二価金属を奪う。タンパク質によっては二価金属が奪われることで、構造が不安定化して変性するものや、また活性部位から金属イオンが失われることで活性を失うものがある。特に酵素には二価金属要求性であるものが多く、これらのタ

ンパク質の活性を維持する場合には、二価金属とキレート試薬の濃度に十分に注意する必要がある。

7 プロテアーゼとプロテアーゼ阻害剤

タンパク質鎖を構成するペプチド結合は中性pHの水中ではきわめて安定であり、通常細胞内のペプチド結合の加水分解は、プロテアーゼと呼ばれる一連の酵素によって起こる。このためプロテアーゼによるタンパク質の分解や不活性化は、抽出からタンパク質精製初期の粗分画過程で起きることが多い。プロテアーゼにはセリンプロテアーゼや金属プロテアーゼなどさまざまな種類があり、それぞれに異なった阻害剤が使われる (表4)。

8 SH基保護剤, 酸化防止剤

ジスルフィド架橋は、タンパク質構造を安定化する共有結合の一種である。細胞内部の環境は高度に還元性であるため、大部分の細胞内タンパク質においてジスルフィド架橋はみられないが、細胞内の還元性環境から細胞外の酸化性環境へと分泌されるタンパク質には多くみられる。すなわち、細胞内タンパク質のほとんどのSH基は本来還元型として維持されてなければならない。これらの非特異的な酸化によるジスルフィド結合の形成はタンパク質の構造を破壊し、不活性化させる恐れがある。SH基を還元型に維持する保護剤とし

て、2-メルカプトエタノールやDTT (dithiothreitol) が一般的に使用される。反対に抗体などのようにジスルフィド結合が構造形成に重要であるタンパク質の場合には、SH基保護剤はこれらタンパク質を不活性化する要因となるので、注意が必要である。

9 その他のタンパク質安定化因子

グリセロール (使用濃度 20~30%) や多価水酸基化合物 (シヨ糖 : 使用濃度 10%) は熱変性や凍結による変性など、タンパク質のさまざまな変性条件対

してタンパク質の安定化効果を示す。安定化の詳細いメカニズムは明らかでない。凍結時の変性に対しては、これら以外にもポリエチレングリコールなどが安定化剤として使用できる。ただし、ポリエチレングリコールなどの高分子ポリマーは、タンパク質水溶液中にて、タンパク質の分子表面に結合している水分子を奪う。その結果、ポリマー分子中の酸素原子あるいは水酸基が、タンパク質分子表面の解離基および極性基と静電的相互作用あるいは水素結合し、ポリマーとタンパク質の複合体が形成され、タンパク質の水分子との相互作用が低下してタンパク質は沈殿してしまう。

4 未知タンパク質の性質を調べる方法

未知のタンパク質の性質はどのように調べればよいであろうか？ まず、最も重要なのはタンパク質の構造に関する情報であり、特にアミノ酸配列の決定は必須である。現在は多数の有用なデータベースがあるため、一部のアミノ酸配列から目的のタンパク質を同定することが可能である。タンパク質のアミノ酸配列を調べる方法としては、ペプチドシーケンス法や質量分析法がある。特に近年では質量分析法が急速に発展し、ハイスループットに未知タンパク質を同定することが可能となってきた。

次にタンパク質の二次構造や三次構造を調べる方法としては、円偏光2色性 (circular dichroism : CD) スペクトル解析や核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance : NMR) スペクトル解析、X線結晶構造解析などが挙げられる。また、チョウ・ファスマン (Chou-Fasman) の方法をはじめとする統計的手法により、完全ではないにしてもある程度の精度で二次構造は予測することが可能である。近年では、コンピュータだけを利用して、アミノ酸配列の情報に基づいて三次構造への折りたたみの正確な予測も多数試みられているが、まだ信頼できるレベルには達していない。

先述したように、タンパク質の機能はそのモジュール構成からある程度予測することができる。ドメイン

構造や機能、ファミリー化されたタンパク質について多数のデータベースが整備され、未知タンパク質アミノ酸配列中のドメイン構造をホモロジーから予測し、機能的に近縁と想定される既知タンパク質の情報が入手できる (次項参照)。ただし、**構造上は類似していても異なる機能をもつタンパク質の例も多い**ため、この手法もあくまで予測の範囲を出ることはなく、情報の扱い方には注意しなければならない。

タンパク質の構造以外の性質を知る手法としてはどのようなものがあるだろうか？ タンパク質の分子量は、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーやSDS-PAGEなどを用いて計測できる。pIは、等電点電気泳動などで測定可能である。タンパク質の修飾は、質量分析法により解析できるが、修飾基の種類によっては困難な場合もあり、現在も技術的な改善が進められている段階である。細胞内局在は抗体が利用できる場合は、間接蛍光抗体法により検討できる。しかし、この手法は細胞の固定法によっては実際の細胞内局在を正確に反映できない場合もある。これに対し、GFPなどの蛍光タンパク質との融合タンパク質は、生細胞で細胞内局在を観察できるという利点がある。しかし、蛍光タンパク質を融合することで本来のタンパク質の構造 (機能) が変化してしまい、正確な細胞内局在を反映でき

ない場合もあるため、十分な検討が必要である。

5 タンパク質のデータベースや解析ツール

現在は、タンパク質に関する大規模なデータベースや、構造や機能の予測プログラムを自分の机上からパソコン1つで利用できる時代となってきた。ここでは、アミノ酸配列からタンパク質に関するさまざまな情報を手に入れるために有用なウェブサイトについて、代表的なものを紹介する。

目的のタンパク質の全長あるいは部分的なアミノ酸配列だけがあるとき、最初にやるべきことはそのアミノ酸配列と相同性や類似性のあるタンパク質を、データベース上から検索することである。NCBIのBLASTは、このような相同性検索の最も代表的なサイトである。BLASTは高速で、選択できる検索フォーマットやオプションが多彩であるなど、非常に有用性が高い。アミノ酸配列の相同性や類似性からタンパク質を検出するには、protein BLAST (blastp) と呼ばれる検索エンジンを用いるのが標準である。最近では、その発展系として、PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) もよく用いられる。PSI-BLASTでは、アミノ酸配列の類似性検索を、条件を変えながら繰り返すことによって、類似配列の検出感度を高めることが可能である。

次に目的のタンパク質の機能を予測するために、一般的にはモチーフ検索が行われる。Pfamは代表的なタンパク質モチーフ検索エンジンであり、手元にあるタンパク質のアミノ酸配列について、そのドメイン構成とファミリー分類の結果を調べることができる。

タンパク質の細胞内局在は、機能に直結する性質の1つとして重要である。PSORTは、入力アミノ酸配列中に既知の細胞内局在化シグナルが存在するかどうかを調べ、その他の配列上の特徴も勘案して、そのタン

パク質の細胞内局在部位を総合的に予測するプログラムである。

また分子量やpI、プロテアーゼ切断部位など、そのタンパク質固有の性状も調べるべき重要な情報である。ExPASy (Expert Protein Analysis System) はSIB (Swiss Institute of Bioinformatics) 提供のタンパク質解析ツールの総合サイトであり、タンパク質の性状や構造解析を行うためのツール20数種類が公開されている。

タンパク質の性状と機能の予測ときて、最後に調べるべきは構造に関する情報である。タンパク質二次構造予測については、コロンビア大学のRostらにより開発されたThe Predict Protein serverが最も汎用されているサイトの1つである。タンパク質三次構造や複合体の構造については、PDB (Protein Data Bank) が最も代表的なサイトである。PDBではX線結晶構造解析やNMRなどの実験によって明らかにされた、約63,000個 (2010年2月現在) のタンパク質およびその複合体などの立体構造座標のデータベースをフリーで閲覧が可能である。

URL一覧 (2010年2月現在)

BLAST : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Pfam : <http://pfam.janelia.org/>

PSORT : <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>

ExPASy : <http://au.expasy.org/tools/>

PredictProtein : <http://www.predictprotein.org/>

PDB : <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

参考文献

- 1) Mohamed, G. et al. : Cell, 125 : 275-286, 2006
- 2) Miklos, de Z. & Richard, H. B. : Biochimie, 84 : 423-432, 2002