

天然変性タンパク質の溶解度、水和ならびに塩析抵抗性に関する研究

廣明 秀一¹, 松本 篤幸², 天野 剛志¹, 清水 佳奈³, 中倉 由香子¹

¹名古屋大学大学院創薬科学研究科, ²神戸大学大学院医学研究科,
³産業技術総合研究所生命情報工学研究センター

概要 近年、天然変性タンパク質という新たな概念が提案され、注目を集めている。通常のタンパク質が、フォールディングにより一次構造に規定された立体構造を形成し、その構造に基づいた特異的機能を発現するのに対し、天然変性タンパク質は、生理的条件下で、単独では特定の立体構造を持たない。ゲノムプロジェクトは、こうした天然変性タンパク質と考えられる配列が、ゲノム中に多数ふくまれることを示した。ゲノム情報からの予測によると、細菌よりも高等真核生物に多く、また、脳神経細胞や細胞核内タンパク質など、タンパク質機能の高次の制御が必要とされる細胞・オルガネラに多いことから、その生理機能の解明が急がれている。天然変性タンパク質には、配列中に親水性のアミノ酸残基が多く含まれることから、通常のタンパク質よりも溶解度が高く、塩析に対しても抵抗性を示すことが予測された。そこで、いくつかの天然変性タンパク質について、塩存在下ならびに非存在下で、溶解度を比較すると同時に、塩存在下・非存在下で¹H-¹⁵N 2D-NMR を測定し比較することで、天然変性タンパク質に特徴的な塩との相互作用が見られるかどうかを観察した。

今回、天然変性タンパク質試料の調製法として、N¹⁵ 自己プロテアーゼ融合タンパク質発現系を用いて、精製条件を改良することで、NMR 測定に十分な量の¹⁵N 標識された天然変性タンパク質を得ることができた。試料の溶解度を調べた結果、天然変性タンパク質の多くが、必ずしも高い溶解度を示すわけではないことがわかった。特に、一部の天然変性タンパク質は、アミノ酸組成に荷電アミノ酸を多く含むにもかかわらず、また、精製途中は溶解していたにもかかわらず、溶液条件の変化により中性付近の緩衝液にまったく溶けないなど、特異な挙動を示した。天然変性タンパク質の¹H-¹⁵N 2D-NMR スペクトルは、塩を添加することで、ほとんどの残基が低磁場化学シフト変化を示した。しかし、塩の添加による α ヘリックス構造の誘起などは見られなかった。多くの残基では¹⁵N 化学シフトは変化せず、¹Hのみが変化を示した。また、その変化量は立体構造を持っているタンパク質よりも大きかった。一部の残基に、¹⁵N が大きな化学シフト変化を示すものがあった。

1. 研究目的

生物を構成する主成分の一つであるタンパク質は、高濃度の塩の存在下では、溶解度が低下し、塩析して沈殿する。従って、好塩性・耐塩性生物においては、高濃度の塩によってもタンパク質の溶解度が低下しにくいような特別なしくみが存在しているのではないかと考えた。

一方で、近年、天然変性タンパク質という新たな概念が提案され、注目を集めている。通常のタンパク質が、フォールディングにより一次構造に規定された立体構造を形

成し、その構造に基づいた特異的機能を発現するのに対し、天然変性タンパク質は、生理的条件下で、単独では特定の立体構造を持たない。ゲノムプロジェクトは、こうした天然変性タンパク質と考えられる配列が、ゲノム中に多数ふくまれることを示した。ゲノム情報からの予測によると、細菌よりも高等真核生物に多く、また、脳神経細胞や細胞核内タンパク質など、タンパク質機能の高次の制御が必要とされる細胞・オルガネラに多いことから、その生理機能の解明が急がれている。

申請者はこれまでに、バイオインフォマティクス研究者（清水佳奈博士、産総研）と密接な共同研究を行い、ランダムにデータベースから選択した 50 種類の天然変性タンパク質の半網羅的な物性研究を目指して、タンパク質発現系を構築した（論文投稿準備中）。これまでに、25 種類の天然変性タンパク質の NMR スペクトルを測定し、その物理化学的性質、とくにペプチド鎖の柔軟性に関して分類を行った。研究の過程で、天然変性タンパク質の中に、高い溶解度を持つものがあることを見出した。これらの天然変性タンパク質は塩析に対して抵抗性を示すことが予想される。本研究では、それらのタンパク質試料を利用して、(1) 通常のタンパク質と天然変性タンパク質において塩析されやすさに違いがあるか、(2) 天然変性タンパク質の水和状態はどのようになっているのか、(3) 通常タンパク質に天然変性タンパク質を連結した融合タンパク質が、塩析抵抗性を持つか、(4) 好塩性・耐塩性生物ゲノム中に、溶解度の高い天然変性タンパク質が、有意に多く含まれているかどうか、について調べることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 タンパク質試料の調製

(1) 発現系の作成

既に同定済みのヒトゲノム由来機能未知天然変性タンパク質 5 種、および好熱菌 *Hef* およびヒト遺伝子修復因子 FANCM 由来天然変性領域 2 種について、大腸菌を用いてタンパク質を発現するためのベクターを作成した。天然変性タンパク質の大腸菌発現系は、オートプロテアーゼ融合発現系を利用して構築した。本実験で使用したオートプロテアーゼ融合発現系は、オーストリア生物薬学研究所のアウアー博士らが開発した、ブタコレラウイルス N 末端オートプロテアーゼ N^{PRO} のアウアー博士らによる改変体 N^{PRO}(EDDIE) をコードした人工遺伝子を、T7 プロモーター下流につないだ発現ベクター（自作）を用いた¹。表 1 に示したアミノ酸をコードする人工遺伝子を、N^{PRO}(EDDIE) 遺伝子の直後に接続し、融合タンパク質とした。コントロールとなる立体構造を有するタンパク質としてヒト Vps4b-MIT ドメイン、マウス ZO1-PDZ1 ドメイン、ユビキチン、WW ドメインを利用し、それらとの融合タンパク質の発現系を構築した（表 2）。なお天然変性タンパク質のリストは、共同研究者、清水佳奈博士（産総研）が作成した天然変性タンパク質領域予測ソフト poodle によって決定された²。

表 1. 今回発現系を作成した IDP のアミノ酸配列ならびに諸性質

protein name (region)	sequence	length	molecular weight	pl
Hef (495-597)	AIKKIARELEKLQRARIKAQGEEGKIHAGVEKSKGSVDVSKGKIAPLDAFLKPKKVENTEIRESKAV GKAAPQASEEKSAEKPKETTEELPIKPIFVVRKPKGIVV	105	11465	9.82
FANCM (1501-1600)	QSHLKHVARKFLDDEAEELSEEDAAYVSSDENDESENEQDSSLDFLNDETQLSQAINDESEMRAIY MKSLRSPMMNNKYKMIHKTHKNINIFSQIPEQDET	100	11710	4.48
FANCM (1586-1685)	KNINIFSQIPEQDETYLESFCVDEEESCKGQSSEEEVCVDFNLIITDDCFANSKKYKTRRAVMLKE MMEQNCASHKSKLSRIILPDDSSSEENNVDKRE	100	11662	4.54
FANCM (1653-1824)	MEQNCASHKSKLSRIILPDDSSSEENNVDKRESNIAVNPSTVKKNKQDHCNLSVPSGSSAQ5 KVRSTPRVNPLAKQSKQTSNLKDTISEVDFKPKQNHNEVQSTTPPFVTVDSQKDCRKFVVPQKD GSALEDSSTSGASCSSRPHLAGHTSLRPLQEGKGTCLVGG	172	18653	8.99
B3; Thymosin beta 10 (1-44)	MADKPDMEGIEIASFDKAKLKTETQEKNTLPTKETIEQEKRSEIS	44	5025	5.31
B4; CstF-77 (1-44)	MSGDGATEQAAEYVPEKVKKAEKLEENPYDLDAWSILIREAQV	44	4951	4.53
C1 ; WVOX, isoform3 (1-36)	MAALRYAGLDDTSEDELPPGWEERTTKDGVVYYAK	36	4150	4.16
D10; TNFRSF11B (24-62)	FPPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKQHCTAKWKTVC	39	4610	7.87
E1; Cortactin Q (305-341)	GFGGKYGVQKDRMDKNASTFEDVTQVSSAYQKTPVPE	37	4068	6.26

表 2. 今回コントロールとして使用したフォールドを持つタンパク質ドメイン試料のアミノ酸配列とその立体構造

protein name (region)	PDB ID	sequence	length	molecular weight	pI
C9; Transcription elongation regulator1, WW domain	2YSI	PTEEIWVENKTPDGKVYYNARTRESAWTKPDG	33	3989	5.05
ZO1 PDZ1	2RRM	IWEQHTVTLHRAPGFGFGIAISGGRDNPHFQSGETSIVISDVLKGGPAEGQLQENDRV AMVNGVSMNDNVEHAFVQQLRKSGKNAKITIRRK	93	10136	9.69
Vps4b MIT	1WRO	MSSTSPNLQKAIDLASKAAQEDKAGNYEEALQLYQHAVQYFLHVVKYEAQGDKAKQ SIRAKCTEYLDRAEKLEKEYLK	77	8795	7.82
Ubiquitin	1UBQ	MQIFVKLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYIN IQKESTLHLVLRLLRGG	76	8564	6.56

(2) タンパク質試料の調製

天然変性タンパク質(非融合型)試料は、後述する NMR 解析に用いるために ^{15}N 標識を行った。当研究室において、天然変性タンパク質の大量培養生成に最適化した培養精製プロトコルに従い、天然変性タンパク質を発現し精製した。具体的には、 ^{15}N NH_4Cl を単一の窒素源とする M9 最少培地を用いて、大腸菌を培養し、IPTG 添加によるタンパク質発現誘導後、7~13 時間後に集菌した。菌体を緩衝液(20 mM Na-phosphate pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA)中で破碎後、遠心分離を行い、上清を除去後、沈殿をさらに緩衝液(20 mM Na-phosphate pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% Triton X-100)で洗浄した。その後、沈殿に変性溶液(8 M Urea, 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 25 mM DTT) 10 ml を加え、軽く懸濁した後、4°Cで攪拌しながら1~3日かけて完全に溶解した。溶け残りを遠心分離で除去し、上清を、DTTを含まない変性溶液で5倍に希釈(DTT終濃度5 mM)し、Ni カラム(5 ml)に通すことで N^{PRO} -IDP 融合タンパク質を結合させた。8 M Urea 存在下で融合タンパク質をアフィニティー精製したあと、Npro-IDP が溶出した画分を refolding buffer (1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM DTT 5% Glycerol, pH 7.5)

に約3日間透析し、それをさらに20 mM Tris-HCl pH 7.5 に透析することで、 N^{PRO} による自己切断反応を完結させた。最終的に、逆相 HPLC で IDP に相当する試料を分取し、 ^{15}N 標識の IDP 試料を得た。

2.2 各種物性の評価

(1) 通常のタンパク質と天然変性タンパク質の塩析されやすさの評価

天然変性タンパク質(非融合型)試料を凍結乾燥し、緩衝液(20 mM Na-phosphate pH 8.0)中の塩濃度(硫酸アンモニウム, KCl, NaCl)を変化させて試料(タンパク質)を溶解したのち、チューブを遠心分離し、上清と沈殿のタンパク質量を SDS 電気泳動による分析することで見積もった。

(2) 天然変性タンパク質の水和状態

^{15}N 標識天然変性タンパク質(非融合型)試料の NMR を測定し、 ^1H - ^{15}N 2D 化学シフト相関スペクトルの比較を行った。天然変性ペプチドの試料濃度は0.2 mM、測定温度を298 Kとし、試料を300 μL の20 mM リン酸緩衝液(pH 6.55) (塩なし、または0.5 M NaCl)に溶解してシゲミ社製 NMR 試料管(5 mm ϕ , 微量試料用, 生体試料用)に封入して測定を行った。測定は、筆者の前職である神戸大学医学研究科に設置してある600 MHz NMR 装置

(Bruker Avance III)を用いて行った。

3. 研究結果

3.1 ヒトゲノム由来天然変性タンパク質の NMR 解析のための試料調製法の確立

本研究の目的は、天然変性タンパク質の水和の状況やイオンとの相互作用を、溶液 NMR 法により詳細に解析することである。しかし、これまでに、生理活性的に特徴のある個別の天然変性タンパク質を NMR で解析された例はあるが、多品種の天然変性タンパク質の NMR 試料を統一されたプロトコルで合成・精製するためのシステムティックな方法論はなかった。一方、一般に、30~100 残基程度のペプチド~タンパク質ドメインと他の分子の相互作用を NMR 解析するためには、 ^{15}N 標識を導入して研究する戦略が一般的である。しかし、化学合成ペプチドに ^{15}N 標識アミノ酸を導入するのは極めてコストが高いため、通常は微生物による発現系、特に大腸菌によるタンパク質発現系の使用が好まれる。筆者らは、これまでも NMR 試料調製に特化した大腸菌発現系を複数開発してきたが^{3,4}、それ自体が立体構造を有しているタンパク質・タンパク質ドメインよりも、天然変性タンパク質は大腸菌の内在性プロテアーゼによる分解を特に受けやすいことが想定された。今回利用することとした N^{PRO} 発現系は、ほとんどのタンパク質を大腸菌の封入体として発現するという特徴がある。封

入体として発現された外来タンパク質は内在性プロテアーゼによる分解を受けにくい。 N^{PRO} 発現系を利用することにより、すべての試料につき、 ^{15}N 標識されたタンパク質試料を、NMR 測定に十分な純度と濃度で得ることができた(図 1)。

3.2 天然変性タンパク質と立体構造を有するタンパク質の塩析における差異

ついで筆者らは天然変性タンパク質と一般的なタンパク質の溶解度の差、あるいは、塩析に対する挙動に差があるかどうかを調べるために、塩析に一般的に用いられる硫酸アンモニウムの濃厚水溶液ならびに 2 M KCl、5 M NaCl を用いて、溶解度比較の実験を行った。まずはじめに KCl / NaCl を用いた塩析実験を行ったが、今回用意したいずれの試料(天然変性タンパク質もフォールドしているコントロールも含む)もそれらの高塩濃度溶液では良好な溶解性を示し、有意な塩析が見られなかった。そこで、タンパク質濃度をさらに上げることにして、凍結乾燥状態にした各タンパク質を濃厚硫酸アンモニウム溶液に溶かすという方向で、溶解度の評価を行った。その結果、実験に供した3種の天然変性タンパク質(B4, D10, E1)の中で、溶解度に有意な差が見られた(図 2)。具体的には、D10、E1 の溶解度は B4 よりも低い。ここで、この実験が行われた pH(5.5)とそれぞれの IDP の pI を比較してみると、この溶解度の差異は pI によるものではないことがわかる。ま

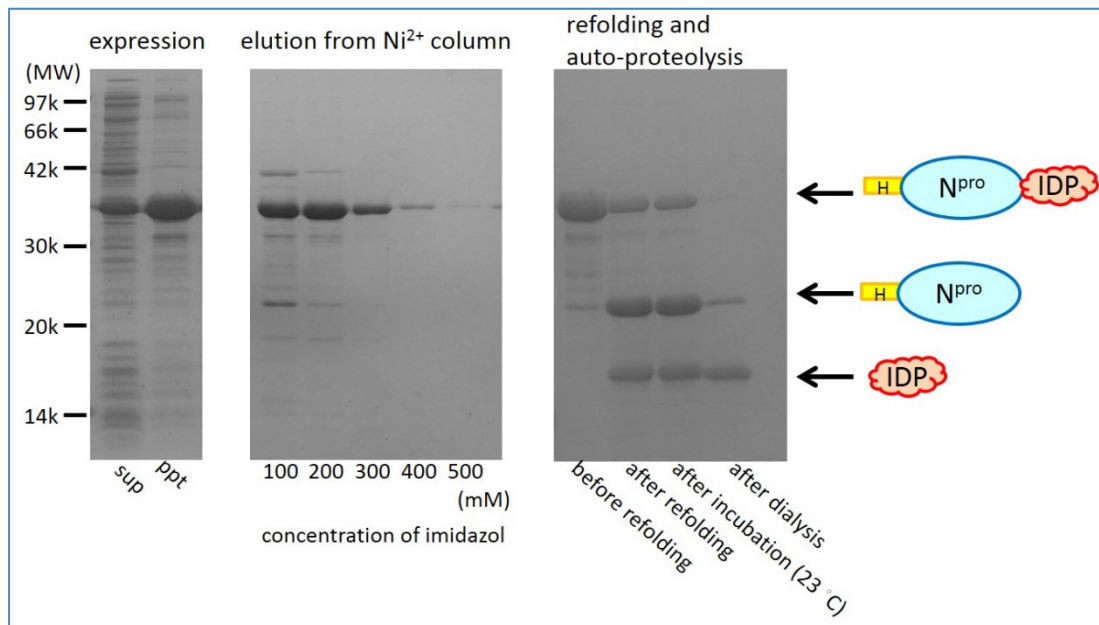
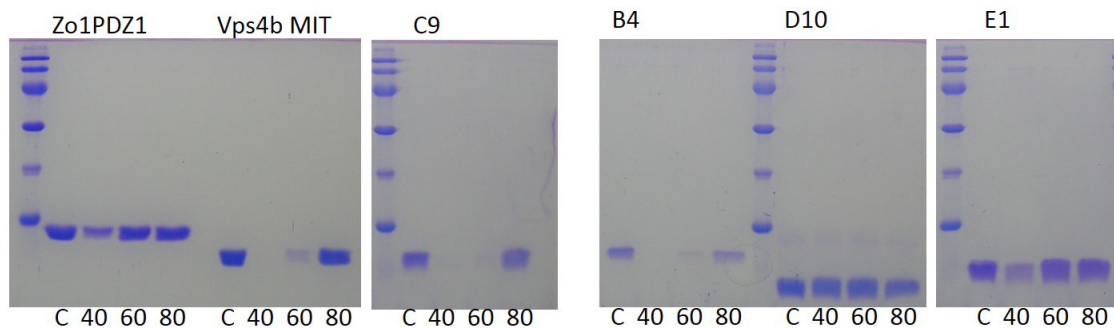


図 1. オートプロテアーゼ N^{PRO} 発現系を使用した IDP の精製例



C; control (0.1 mM protein)

40; precipitation when it was dissolved in 40 % saturated solution of ammonium sulfate

60; precipitation when it was dissolved in 60 % saturated solution of ammonium sulfate

80; precipitation when it was dissolved in 80 % saturated solution of ammonium sulfate

図 2. 構造を持つタンパク質と IDP の、塩析効果の比較

た、NaCl / KCl を用いた予備実験では天然変性タンパク質は塩析を示さないかもしれないと考えられたが、硫酸アンモニウムでは塩析するものがあることがわかった。一方、データは示さないが、よりアミノ酸残基の長い FANCM の天然変性領域については、そのアミノ酸組成に電荷の多いアミノ酸が相当数含まれているにもかかわらず、溶解度に関して異常な挙動を示すことが確認された。具体的には、実験の項に示したプロトコルによって精製を進めると、逆相 HPLC 直後のフラクション (0.1% TFA, アセトニトリルなどを含む) の状態で一度凍結乾燥を行い、揮発性成分を飛ばしたのち (したがって pH はほぼ中性、アセトニトリルも残存していない)、純水に溶かすとよく溶けるが、前述の緩衝液や他の緩衝液に溶かそうとするとまったく溶解しない、という現象が再現よく観察された。この現象に関して、文献調査を行ったところ、シンガポール大のソン博士による、これまで通常の緩衝液に対して難溶性を示すタンパク質試料の大部分が、“pure water” に対してのみ溶解すること、またその溶解した状態においては特定の立体構造をとっていない (=天然変性状態) という報告に行き着いた⁵。今回、我々はバイオインフォマティクス研究から出発して、得られた天然変性タンパク質の一部に、pure water にのみ溶解する可能性のある試料を得ることができた。FANCM はヒトの遺伝子修復因子であり、ゲノム安定性にかかわる因子であるため遺伝性悪性貧血の一つファンコニ貧血の原因遺伝子である。今後、更に、詳細に、FANCM の天然変性領域の溶解度にかかわる物性を調べていく必要があると考えられる。

3. 3 塩存在下・非存在下での天然変性タンパク質の NMR スペクトルの比較

最後に筆者らは、NMR スペクトルの比較を行った。アミド(NH)プロトンの ^1H - ^{15}N 化学シフト相関は、タンパク質の NMR 解析において、指紋領域とも呼ばれているスペクトル領域であり、タンパク質ひとつひとつで異なるスペクトルパターンを与える。プロリンを除くすべてのアミノ酸は一残基あたり一つの NH 基を持つ。従って、図に現れた交差ピークの点一つ一つが、それぞれの試料のいずれかのアミノ酸 1 残基に相当するのである。今回の研究では、まだ、どのシグナルがアミノ酸のどの残基の NH 基なのかの帰属同定 (配列特異的アサインメントという) を行っていないので、特徴的な変化を示すシグナルがどの残基なのかについて議論することはできない。しかし、変化が起こったかどうか、またその変化の全体の傾向などについて、定性的な情報を得ることができる。5 個の天然変性タンパク質試料と、ほぼ同じアミノ酸の長さの構造を持つタンパク質の NMR スペクトルについて、スペクトルを指標に塩の効果と比較することにより、いくつかの興味深い知見を得た (図 3)。すなわち、

1. 測定した 5 個の天然変性タンパク質試料においては、いずれも NMR スペクトルは立体構造を持たないタンパク質に典型的なスペクトルを示した。具体的には、NH のプロトン化学シフトの分散ぐあい、7.5~8.5 ppm に固まるという特徴である。すなわち、poodle によって予測された領域は、いずれも予測通りに天然変性であったということが実証された。

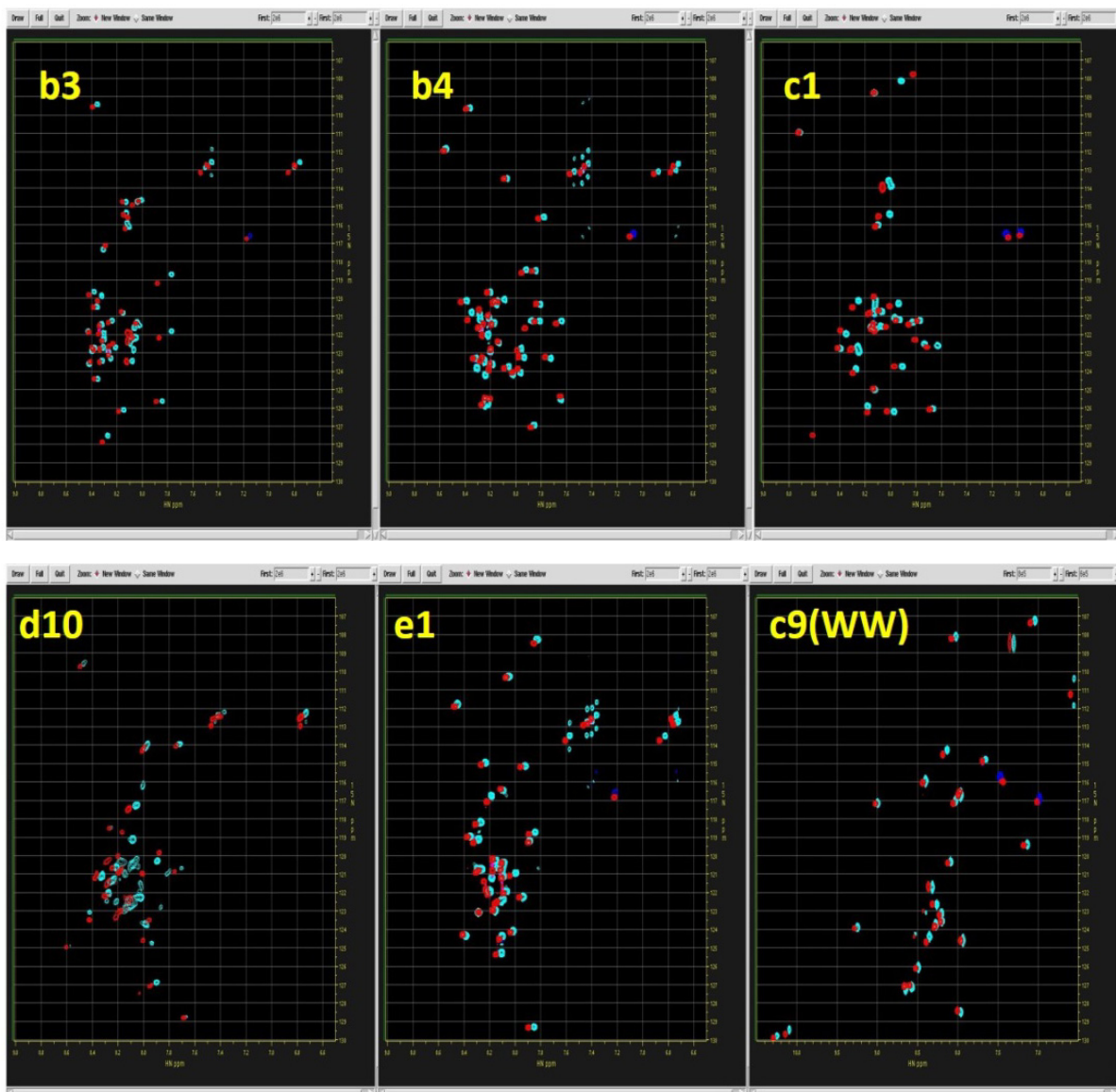


図3. 天然変性タンパク質とコントロールタンパク質のNMRスペクトルの塩濃度依存性 シアン:0 M NaCl 赤:0.5 M NaCl

2. ついで、0.5 M NaCl を添加すると、ほとんどすべてのアミドプロトンシグナルの¹H化学シフトは、低磁場側(図では左)にシフトした。

3. 立体構造を持っているタンパク質と、天然変性タンパク質を比較すると、天然変性タンパク質において大きな化学シフト変化を示す残基がある一方、立体構造を持っているタンパク質ではシグナル移動が少ない。

4. 同様に、立体構造を持っているタンパク質において¹⁵Nの化学シフトはほとんど変化しないため、スペクトルは平行移動したように見える。

5. 一方、天然変性タンパク質において¹⁵Nの化学シフト変化に規則性を持たない残基が散見される。そのため、

二次元 NMR のスペクトルのパターンが、塩の添加によって変化する個所がある。

6. これまで、立体構造を持たないペプチドの一部に、高塩濃度化で α -helixが誘起形成される例が知られている。また、多くのタンパク質で塩はタンパク質内部の疎水性相互作用を相対的に安定化するため、タンパク質の変性温度を高めることが知られている。しかし今回検証した天然変性タンパク質については、いずれも、塩の添加により何らかの立体構造が誘起されることはなかった。

3. 4 好塩性・耐塩性生物ゲノム中の天然変性タンパク質の探索

今回の研究(結果3. 2)において、アミノ酸配列的には

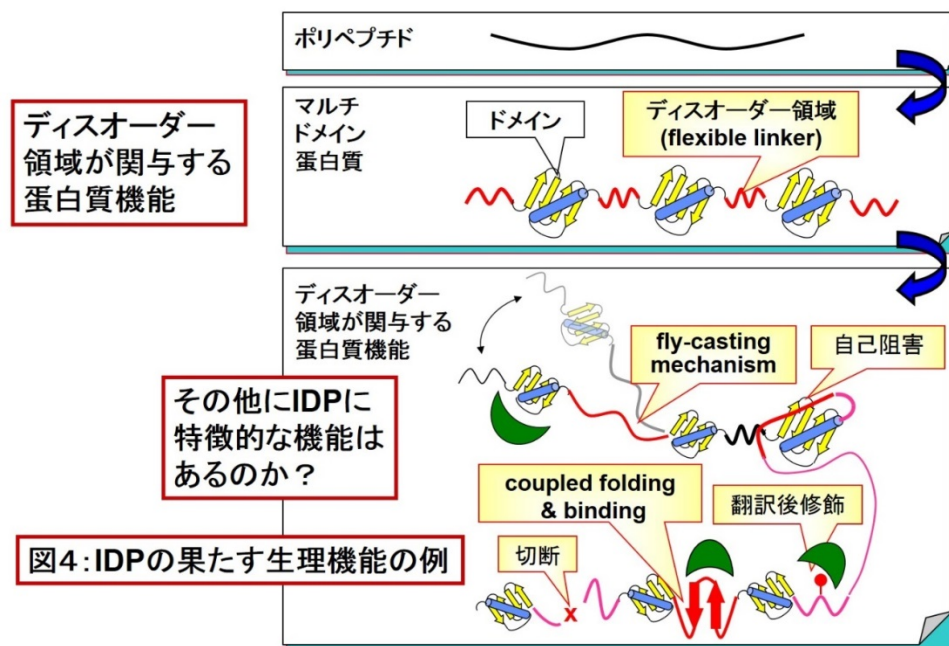
水溶性の高いアミノ酸が多数並んでいる天然変性タンパク質 FANCM 断片が、条件によっては全く水溶性を示さない、という、当初の予測とは正反対の結果が得られた。そのため、仮に、これまでのバイオインフォマティクス的方法で好塩性・耐塩性生物ゲノムを網羅的に解析したとしても、その結果を「タンパク質の溶解度と生物の好塩性・耐塩性とを結び付けて考察する」ことには無理があると考えた。したがって、研究計画には上記項目を挙げたが、その研究については実験を断念した。

4. 考察

今回、筆者らは、天然変性タンパク質の、巨視的な物性について統一的な性質を導き出すべく、天然変性タンパク質の汎用性のある試料調製法を確立することができた。また、それを利用して、8 種類の ^{15}N 標識した天然変性タンパク質試料を実際に作成し、その NMR スペクトルを得た。図 4 に示したように、マルチドメインタンパク質中の天然変性領域は、その部分が柔軟性に富むと考えられており、それによってタンパク質全体が動的に揺らぐことを保証するための部品として使われていると考えられている。と同時に、タンパク質翻訳後修飾やプロテアーゼ認識など、シグナル伝達における分子認識や複合体形成の際の核としての機能も予測されている(図 4)。

天然変性タンパク質は、その定義ないし前提として特定

の立体構造をとらない配列であると考えられている。これは実際には、その一連のアミノ酸配列が、さまざまなコンフォメーションを取りうるということであり、特定の二次構造を安定化する機能をもつアミノ酸残基が、一定個数以上連続しないという制限のもと、コンテキスト依存的に出現すると思われる。しかし、今回、塩の添加により大きくシグナルが動いたという現象は、特定のアミノ酸の近傍に塩の成分(アニオン・カチオン)が結合したから、と解釈すべきではない。立体構造を有するタンパク質試料におけるリガンド滴定実験から、NMR で観察される化学シフト変化は、その変化を示した原子近傍での分子間相互作用の結果である、と短絡しがちであるが、それには、「リガンド結合の前後での立体構造の変化が小さい時に限る」という前提条件が必須である。後述するように、IDP はこの条件を満たさない可能性が極めて高い。なぜなら、IDP の「構造」は「ランダムコイル」であると考えられているが、実際にはランダムコイルというのは特定のコンフォメーション状態を指すわけではなく、あくまで水溶液中で多くの異なる多型構造が動的に平衡状態にあるということに過ぎないからである。このとき、NMR で観測している IDP のスペクトルパターンというのは、溶液 NMR における化学交換 (chemical exchange) 現象に即して、無数にあるコンフォメーションから由来する複数のシグナルの時間平均であるということである。したがって、今回みられた化学シフト変化は、塩の



添加によって、天然変性タンパク質のコンフォメーション間の動的平衡がずれたことの結果であると解釈できる。一方、立体構造をもともと有するタンパク質の場合は、その立体構造が塩濃度によって大きく変化するわけではないので、塩の添加による化学シフト変化も小さかったと考えられる。更に、一部の残基において、塩の添加により他の残基とは異なる化学シフト変化が現れた個所があるが、その周辺の残基において、localな構造セグメントが誘起されたか、あるいはもともと低塩濃度化で存在していた local 構造セグメントが破壊されたなどの変化が起きた可能性がある。

5. 今後の課題

今回の研究は、特定の生理機能に着目することなく「無名の」天然変性タンパク質の物性の解明に着手した研究である。しかし、試料調製にかかる手間が多かったため、NMR を用いた十分なデータ収集ならびにその解釈までには至らなかった。しかし、塩濃度の変化にともない、すべての残基が統一的な挙動を示すのではなく、¹⁵N 化学シフトの変化や、¹H 化学シフトの変化量などにばらつきがみられることから、天然変性状態をとっているタンパク質においても、局所的な環境・構造動態には「個性」がある可能性が示された。今後、その個性が見られた試料につき、¹³C 標識を施してすべての残基を帰属して、解析を続けることで、天然変性タンパク質中に含まれる local structural element の存在について、より理解を深めていきたいと考

えている。

文献

1. Achmüller C, Kaar W, Ahrer K, Wechner P, Hahn R, Werther F, Schmidinger H, Cserjan-Puschmann M, Clementschitsch F, Striedner G, *et al.* (2007) N(pro) fusion technology to produce proteins with authentic N termini in *E. coli*. *Nature methods* 4: 1037-43.
2. Hirose S, Shimizu K, Noguchi T (2010) POODLE-I: disordered region prediction by integrating POODLE series and structural information predictors based on a workflow approach. *In silico biology* 10: 185-91.
3. Goda N, Tenno T, Takasu H, Hiroaki H, Shirakawa M (2004) The PRESAT-vector: asymmetric T-vector for high-throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics. *Protein science: a publication of the Protein Society* 13: 652-8.
4. Tenno T, Goda N, Tateishi Y, Tochio H, Mishima M, Hayashi H, Shirakawa M, Hiroaki H (2004) High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling. *Protein engineering, design & selection: PEDS* 17: 305-14.
5. Song J (2009) Insight into “insoluble proteins” with pure water. *FEBS letters* 583: 953-9.

Biophysical Study of Intrinsically Disordered Proteins: Their Solubility, Hydration and Resistance to Salting-Out

Hidekazu Hiroaki¹, Shigeyuki Matsumoto², Takeshi Tenno¹, Kana Shimizu³, Yukako Nakakura¹

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University

² Graduate School of Medicine, Kobe University

³ Computational Biology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Summary

In recent years, the new concept of intrinsically disordered protein (IDP) is proposed, which draws many attention of researchers. Usual proteins adopt into certain structures that are specified in their primary structures through folding processes. The specific functions of proteins are then exhibited based on their structures. IDP is believed to adopt into a specific structure under physiological conditions. The genome project showed that many IDP was found in genomes of higher-eukaryotes rather than prokaryotes. Especially, neuron-specific genes and nuclear-specific genes contain much more IDPs, the elucidation of the physiology function is hurried. Since many hydrophilic amino acid residues are contained, IDP's solubility was expected to be higher than the usual protein. Also, it was predicted that IDP may show resistance against salting-out. In this study, we examined whether a characteristic interaction with salt of IDP would be observed by measuring and comparing ¹H-¹⁵N 2D-NMR with and without high concentration salt. At the same time solubility of some IDP samples are also examined.

Herein, we succeeded in obtaining enough amount of ¹⁵N-labeled IDP samples for NMR measurement, by refining conditions of the N^{pro} autoprotease fusion protein expression system. As a result of solubility experiments, we revealed that many IDP's do not necessarily show high solubility. Although some certain IDPs contain many charged amino acids, some were never solved into the buffer solution at neutral buffer. The ¹H-¹⁵N 2D-NMR spectra of IDP with and without salt were measured. Almost all the residues showed downfield chemical shift changes. However, induction of the α -helical structure was not observed alpha by addition of salt. With many residues, ¹⁵N chemical shift did not change but only ¹H showed changes. Moreover, the amount of change was larger than folded proteins. Some of them also showed a relatively large chemical shift changes in ¹⁵N axis.