

高分子電解質/酵素複合体の構造の解明に関する研究

和泉 剛(応用分子化学科)

1. 緒 言

水溶性高分子とタンパク質との複合体形成に関する研究は、2つの観点から興味を持たれている。第1には、球状のタンパク質と柔軟な水溶性高分子鎖がどのようなメカニズムを通して複合体(Protein-Polyelectrolyte Complexes; PPCs)を形成しているかであり、このことに関する理解は生体内における高分子間の相互作用や複合体(4次構造などのタンパク質間の会合を含む)形成による機能発現を理解する上で重要である。第2点としては、形成された複合体が酵素活性をどの程度保持しているのかという点に関心があり、その成果は水溶性高分子を用いたタンパク質分離工程の設計や固定化酵素のようなタンパク質-高分子からなる系の分子設計などの応用が期待されている。

種々の水溶性高分子と酵素タンパク質に関する研究[1-3]より、(1)1本の高分子鎖に幾つかのタンパク質が化学量論的に結合した分子内複合体が形成される領域、(2)分子内複合体の凝集により、粒径および分子量が一定で電気的に中性な凝集体 AG₁ が形成される領域、そして(3)凝集体 AG₁ の凝集により高次の凝集体 AG₂ が形成される3領域があることが判明した。更に、種々の重合度とエステル化度のポリビニルアルコール硫酸カリウムとの複合体形成機構の検討から、(4)タンパク質の解離基(塩基性基)の分布状態が複合体の形成および安定性に寄与しているということを明らかにしている。また、得られた複合体の酵素活性の低下は、形成された複合体間の凝集に伴う酵素-基質間の接触頻度の低下と親和性の低下が主要因であり、その相対活性は高分子電解質の種類に依存しており、適切な高分子の選択により Native 酵素と同等の酵素活性を保持させることが可能であることも明らかとした。その結果、複合体形成による酵素の高次構造への影響は、酵素の失活をもたらす程に大きくないことが示唆された。

そこで本研究では、複合体形成による酵素の高次構造およびその生物化学的機能への影響について詳細に検討するために、円偏光二色性(Circular Dichroism: CD)スペクトル測定により Native 酵素と複合体中の酵素の高次構造を比較し追究した。

2. 実 験

【試 料】

酵素試料として、アミノ酸配列が既知で高次構造も明らかであるニワトリ卵白由来のリゾチーム(以下 Lyz と表記, EC.3.2.1.17, SIGMA 社製)を使用した。また、高分子電解質試料には、ポリ-L-グルタミン酸(Poly-L- Glutamic Acid Sodium Salt; 以下 PLGA と略記, SIGMA 社製, 公称分子量 31,700 (vis), Mw/Mn 比 1.2)を使用した。

【実 験】-円偏光二色性(Circular Dichroism: CD)スペクトルの測定による複合体中の酵素の高次構造の検討-

光学活性物質の吸収波長で平面偏光を通過させると、吸収波長領域で平面偏光が楕円偏光になり(円二色性)、その楕円長軸回転(旋光性)において旋光度の符号が逆転するコットン効果が起こる。円二色性は「光学活性吸収体において左右円偏光の吸収の度合いが異なる」という現象である。透過光は左右円偏光のベクトルの大きさが異なることから、合成したベクトルは楕円形を描く。楕円偏光の楕円率は、分子内における発色団の立体配置の仕方がスペクトルに反映するため、類似の発色団が類似の立体配置をとると似たスペクトルが出る。このことから、複合体のスペクトルと酵素単体のスペクトルを比較より複合体中の酵素の高次構造が推測される。

種々の濃度の Lyz 溶液に濃度 0.2g/cm³ の PLGA 溶液 0.25cm³ を添加し、PLGA-Lyz 混合溶液を調整した。

この混合溶液の CD スペクトルを測定し、複合体中の酵素の高次構造について検討を行った。CD スペクトルの測定には、日本分光株式会社製の円偏光二色性分散計(Circular Dichroism: CD, J-820)を使用した。尚、CD スペクトル測定は、測定精度の指標である High tension voltage (HT)値を考慮し 190-250nm では 1mm セル、250-350nm では 10mm セルを用いた。

3. 結果および考察

高分子弱電解質である PLGA の解離状態や形態は pH に依存することが知られている。図 1 に pH4.0 および 7.0 における PLGA の CD スペクトルを示す。pH4.0 と pH7.0 の CD スペクトルを比較すると 200nm 付近および 210~225nm 付近に顕著な差が観察された。これは、Holzwarth と Duty の結果と良好に一致した[4]。PLGA は、222nm 付近に α -ヘリックス構造の存在を示す特徴的な極値が現れること、pH の上昇に対して 222nm の旋光強度が低下したことから、 α -ヘリックス構造が他の構造へ変化していることを示唆している。そこで pH4~7 の範囲における二次構造含量を二次構造解析プログラムより解析した(表 1)。ここで二次構造含量は Yang のデータを基に算出した。その結果、PLGA は低 pH 領域 (pH4.5 以下) では α -ヘリックス構造を、pH5.0 以上ではランダム構造を形成することが確認された。また、Lyz の至適 pH である pH7.0 において、PLGA は完全にランダムな構造をしていることが分かった。これは、pH の上昇に対して PLGA 中のカルボキシ基(-COOH)が解離し、その結果としてカルボキシレートイオン (-COO⁻)間の静電的相互作用により α -ヘリックス構造を保持することができなくなったためであると考えられる。

図 2 および図 3 に pH4.5 および 6.5 における PLGA-Lyz 混合溶液の CD スペクトルを示す(図 2; 190-250nm, 図 3; 250-330nm)。PLGA/Lyz 複合体の CD スペクトルの波形は異なり、Lyz 濃度の増加に対して CD₂₂₂ 値は両 pH 共に低下する傾向を示した。Lyz の CD スペクトルは、pH4.0~7.0 の範囲において変化せず(結果は未表示)、また pH6.5 において PLGA は α -ヘリックス構造を形成していないことから CD₂₂₂ 値の違いは、PLGA-Lyz 溶液中の Lyz の濃度に起因すると考えられる。また、pH4.5 における CD₂₂₂ 値の違いは、PLGA/Lyz 複合体中の PLGA と Lyz の両者の CD スペクトルに由来していると考えられる。また、図 3 より pH6.5 においては 270nm 以上において Lyz 濃度の違いが顕著に観察され、正の CD 帯が見られた。一方、pH4.5 では、この領域の変化はほとんど見られなかった。池田らは、Lyz の CD スペクトルの pH 依存性を詳しく調べ、この波長付近における CD 帯に Tyr 残基や Trp 残基が寄与し、特に 294nm における CD₂₉₄ 値には基質との結合に関与する Trp-62 に起因していることを明らかにしている[5-9]。したがって、CD₂₉₄ 値を詳細に調べることで、酵素と基質との相互作用における酵素分子の構造への影響や酵素活性との関係を検討することができると考えられる。

Lyz 濃度に対する PLGA-Lyz 混合溶液の CD₂₂₂ 値および CD₂₉₄ 値の変化を図 4 に示す。一般に、混合に対して光学活性物質の構造が変化しない場合には、楕円率に加成性が成立することから、混合した溶質の CD 値の和と実測値を比較することにより構造変化を議論することができる。pH4.5 においては計算値

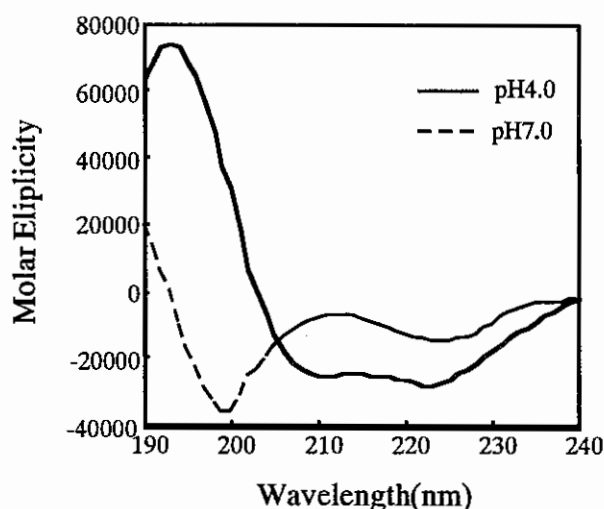


図1 pH4.0および7.0におけるPLGAのCDスペクトル

表 1 種々の pH における PLGA の二次構造含量

	pH				
	4.0	4.5	5.0	6.0	7.0
α -Helix	100.0	98.5	39.5	39.4	0
β -sheet	0	0	0	0	0
Turn	0	0	22.3	0	33.1
Random	0	1.5	38.2	60.6	66.9
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

CD₂₂₂[cal.]と実測値 CD₂₂₂[exp.]はほぼ一致した。この結果は、pH4.5 において複合体形成は Lyz の高次構造に影響を与えていないことを示している。しかしながら、pH6.5 においては、低濃度領域において CD₂₂₂[cal.]と CD₂₂₂[exp.]は一致したものの、8μM 以上の濃度で違いが現れた。PLGA の酸性基 (-COOH 基) と Lyz の塩基性基 (-NH₂ 基) のモル数を考慮すると 8μM において当量となることから、PLGA と Lyz の複合体形成において量論性が成立していることが判明した。また、8μM 以上の濃度では、CD₂₂₂[cal.]値は低下する傾向にあるのに対し、CD₂₂₂[exp.]はほぼ一定値を示した後 40μM 以上で CD₂₂₂[cal.]値と同様な低下傾向を示した。この変化は、複合体形成に関与していない遊離の Lyz の CD 値に起因していると考えられる。今後、複合体形成における量論性および複合体の電荷状態について詳細に検討する必要がある。

しかしながら、pH4.5 における CD₂₉₄ 値は、8μM まで CD₂₉₄[cal.]と CD₂₉₄[exp.]は同様の変化を示したが、8μM 以上の濃度で急激に低下した後、CD₂₉₄[cal.]値と同様な CD₂₉₄[exp.]値の増加傾向が見られた。この変化は PLGA と Lyz との複合体形成における遊離な Lyz に起因する CD スペクトルの影響によると考えられる。したがって、静電的な相互作用が殆ど関与しないと考えられる pH 領域においては、複合体形成による Lyz の高次構造への影響があまり見られず、先に国府田らによって報告された水素結合を介して形成された複合体中の酵素活性が Native とほぼ同等であること[10]が容易に理解される。また pH6.5 においては、CD₂₉₄[cal.]と CD₂₉₄[exp.]はほぼ同様の変化をしており、Lyz の活性部位周囲への複合体形成は小さいことを示している。この結果は、静電的な相互作用を介して形成された複合体においても高活性を保持した状態で酵素を固定化することができることを示唆している。

次に、ラングミュアの結合等温式を変形した Klotz の式から結合定数 K と自由エネルギーの変化量 ΔG を求めた。

$$\frac{1}{\Delta CD} = \frac{1}{CD_{\infty}K} \cdot \frac{1}{C} + \frac{1}{CD_{\infty}}$$

縦軸に 1/ΔCD₂₉₄ を、横軸に 1/C をとってプロットし、プロットの勾配から結合定数 K を、切片から CD_∞を求めた (表 2)。ここで、ΔCD₂₉₄ は複合体と酵素単体の差構円率 (mdeg) で、C は Lysozyme の

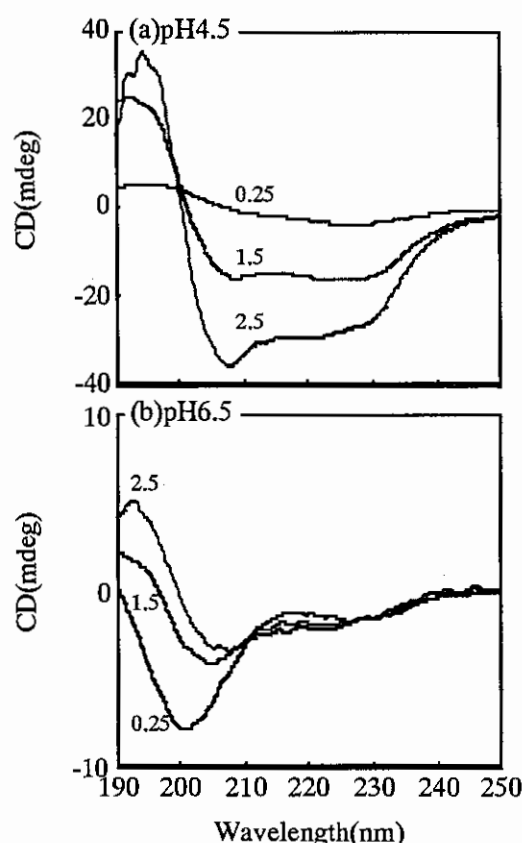


図2 種々のLyz濃度(0.25, 1.5, 2.5μM)における PLGA-Lyz溶液のCDスペクトル(190-250nm)

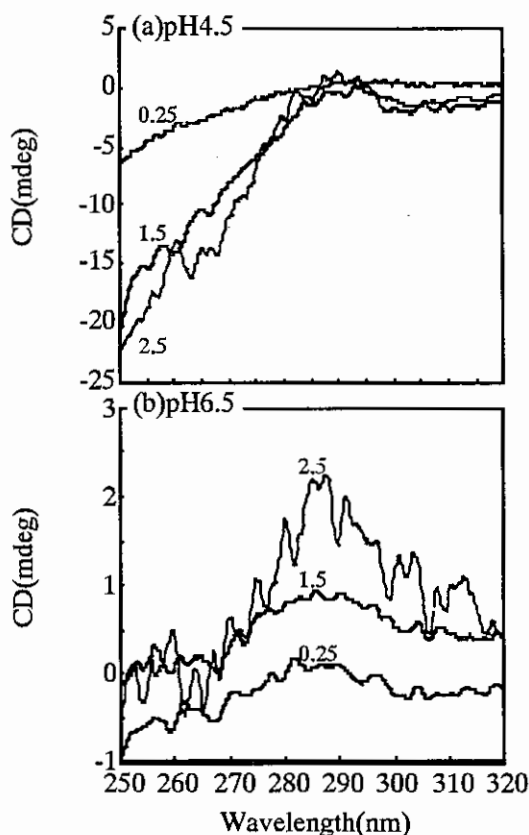


図3 種々のLyz濃度(0.25, 1.5, 2.5μM)における PLGA-Lyz溶液のCDスペクトル(250-320nm)

容量モル濃度 (μM) である。その結果、pH4.5 より pH6.5 における PLGA/Lyz 複合体の結合定数が大きかった。これは、pH6.5 において PLGA 中のカルボキシル基の解離により PLGA と Lyz 間の静電的な相互作用が強まったためであると考えられる。一方 pH4.5 においては、PLGA の COOH と Lyz の NH₂ 間での水素結合などの分子間相互作用により複合体が形成されていると考えられる。また、PLGA と Lyz の結合に伴う自由エネルギーの変化量 ΔG ($= -RT \ln K$) は、pH6.5 では負で、pH4.5 では正となった。今後、複合体形成における熱力学諸数値について示差走査熱量計(DSC)により検討を行っていく。以上のことから、PLGA の三次構造の違いにより Lyz との複合体形成機構および複合体中の Lyz の高次構造に違いが見られ、PLGA がランダム構造をとっている状態はヘリックス構造をとっている状態に比べて結合数が多く、熱力学的に安定していることが明らかとなった。

参考文献

- 1.A.Tsuboi, T.Izumi, M.Hirata, J. Xia, P. L.Dubin, E. Kokufuta: Complexation of Proteins with a Strong Polyanion in an Aqueous Salt-free System:The ACS Journal of Surfaces and Colloids *Langmuir*,12, 26, 6295(1996)
- 2.S. Azegami, A. Tsuboi, T. Izumi, M. Hirata, P. L. Dubin, B. Wang, E. Kokufuta: Formation of an Intrapolymer Complex from Human Serum Albumin and Poly(ethylene glycol):The ACS Journal of Surfaces and Colloids *Langmuir*,15, 4, 940(1999)
- 3.D. Takahashi, Y. Kubota, K. Kokai, T. Izumi, M. Hirata, E. Kokufuta: Effects of Surface Charge Distribution of Proteins in Their Complexation with Polyelectrolytes in an Aqueous Salt-Free System: The ACS Journal of Surfaces and Colloids *Langmuir*, 16, 7, 3133(2000)
4. Holzwarth, G. and Doty P., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 218(1965)
5. Ikeda, K., Hamaguchi, K., Imanishi, M. and Amano, T., *J. Biochem.*, 62, 315(1967)
6. Ikeda, K., Hamaguchi, K., *J. Biochem.*, 66, 513(1969)
7. Glazer, A.N., Simmons, N.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 2335(1966)
8. Blake C.C.F., Johnson, L.N., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C., Sarma, V.R., *Proc. Roy. Soc., B*167,378(1967b)
9. Hayashi, K., Imoto, T., Funatsu, M., *J. Biochem.*, 54, 381(1963)
10. E.Kokufuta, K., Imoto, T., Funatsu, M., *J. Biochem.*, 54, 381(1963)

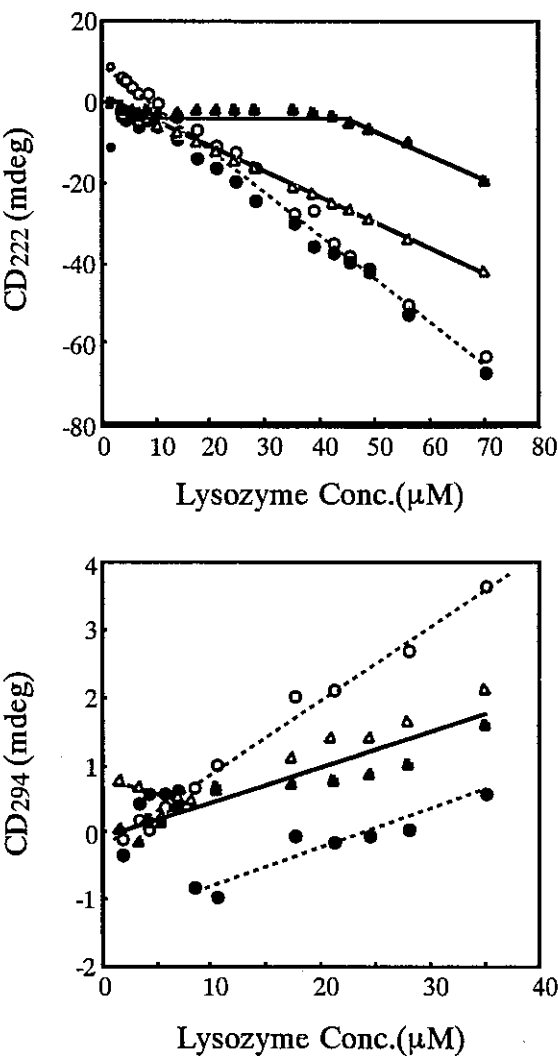


図4 Lyz濃度に対する PLGA-Lyz溶液の CD222値およびCD294値の変化
○; CD222 [cal.], ●; CD222 [exp.], △; CD294 [cal.], ▲; CD294[exp.]

表 2 pH4.5 及び 6.5 における PLGA/Lyz 複合体の結合定数 K 及び結合に伴う自由エネルギー変化量 ΔG

pH	CD _∞ (mdeg)	K(-)	ΔG (J/mol)
4.5	0.978	0.262	3.32×10^3
6.5	2.05	1.18	-4.10×10^2