

高分子電解質/酵素複合体の構造の解明に関する研究III

和泉 剛・高橋 大輔 (応用分子化学科)

1. 緒言

球状のタンパク質と柔軟な水溶性高分子鎖との複合体(Protein-Polyelectrolyte Complexes; PPCs)形成に関する研究は、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。一方で、PPCsの酵素活性の保持は、水溶性高分子を用いたタンパク質分離工程の設計やタンパク質-高分子からなる固定化酵素などの分子設計への応用が期待されており、興味を持たれている。

これまで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、生体内反応を意識した系として合成ポリペプチドで弱電解質でもあるポリ-L-グルタミン酸とニワトリ卵白リゾチームとの複合体形成とその酵素活性について検討を行った。また、複合体形成を利用した固定化生体触媒の一モデルとして高分子強電解質のポリビニルアルコール硫酸カリウムからなるフィルムへのリゾチームの固定化とその酵素活性についても検討した。本研究の遂行にあたっては、従来用いてきた種々の光学的手法に加えて円偏光二色性(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酵素の高次構造への複合体形成の影響について追究した。

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、高分子電解質供試料には、ポリ-L-グルタミン酸(Poly-L- Glutamic Acid Sodium Salt; 以下 PLG と略記, SIGMA 社製, 公称分子量 31,700 (vis), Mw/Mn 比 1.2)およびポリビニルアルコール硫酸カリウム(以下 KPVS と表記,和光純薬(株)製)を使用した。KPVS は、Lyz 固定化用担体とするため、キャスト法およびホルマール化により厚さ 2 μ m 以下のフィルムを調製した。

【実験】

種々の濃度の Lyz 溶液に濃度 0.2g/cm³の PLG 溶液 0.25cm³を添加し、PLG-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。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

これまでの研究より、高分子弱電解質である PLG の解離状態や形態が pH に依存することが分かっている。一方、両性電解質である Lyz も pH に対してその解離状態が変化する (Lyz の等電点 pH11.0~11.4)。そこで、PLG と Lyz との複合体の形成機構の検討にあたり、Lyz と PLG との複合体形成における化学量論性について、20°C における 460[nm]の吸光度 A_{460} を指標として検討した (Fig.1)。Fig.1 より、pH4.1 では Lyz/PLG [mol/mol] (以下、 m_r と表記する) 値 10.1 で、pH6.5 では m_r 値 17.7 で Lyz と PLG は反応終点を迎えることが分かった。これらの結果を Lyz と PLG の解離基数から求めた理論結合数の結果 (Table1) と比較すると、実験より得られた結合数は静電的な相互作用を考慮して解離基数から求めた計算値よりも多くなった。このことは、複合体形成の結合駆動力が静電的相互作用のみではないことを示唆している。ただし、pH6.5 では、違いが少なかったため、静電的相互作用支配的であると考えられる。

次に、複合体形成過程および複合体中の Lyz のマイクロ環境変化について蛍光および CD スペクトル測定より検討を行った (蛍光の結果に関しては未掲載)。PLG 溶液の添加に対して pH6.5 および pH4.1 における Lyz/PLG 複合体の蛍光極大波長 (F_{max}) は、両方ともに Native Lyz の F_{max} よりブルーシフトした。これは Lyz に PLG が結合した結果、Lyz の芳香族アミノ酸残基 (Trp, Tyr, Phe) 周辺が疎水環境に変化したためと考えられる。pH4.1 では PLG の添加とともに F_{max} が減少した後、一定となり、Lyz/PLG の混合モ

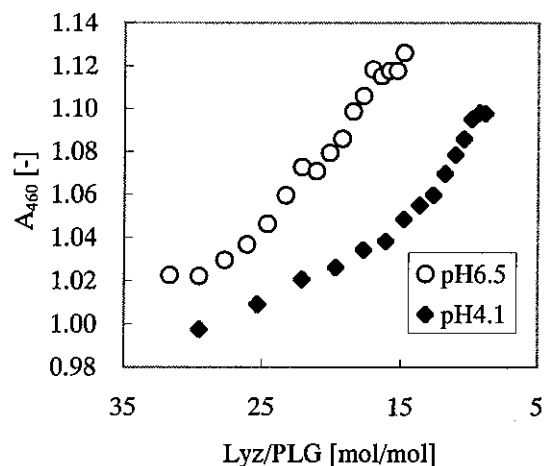


Fig.1 Turbidimetric titration curves of Lyz/PLG complexes

Table 1 The number of Lyz bound to a PLG chain

pH	4.1	6.5
Exp.	10.1	17.7
Cal.	4.49	14.8

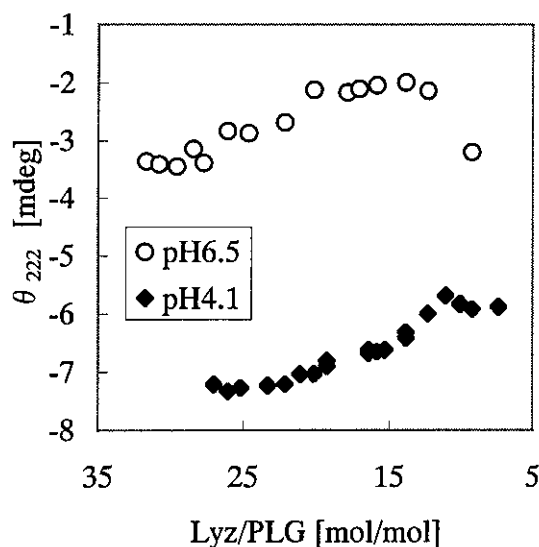


Fig.2 Changes in θ_{222} values of Lyz/PLG with the amounts of PLG

ル比 (以下 m_r 値と表記する) 10.1 付近で再び減少した。加えて、pH6.5 においては F_{max} 値の変化量が m_r 値 28.4 および 17.8 で異なっていた。このことから、pH の違いのみならず PLG の添加量の違いにより、Lyz の芳香族アミノ酸残基周辺の環境が異なる複合

体を形成していることが示唆された。同様の傾向が、ヘリックス含量に由来する 222[nm]における円二色性 (θ_{222}) の PLG 添加量依存性からも得られた (Fig.2)。pH 6.5 において θ_{222} は m_r 値 26.1 で変化量が変わり、 m_r 値 17.9 で反応終点を迎えた。この結果は F_{max} の結果と同様に、Lyz/PLG 複合体の形成過程において、異なる二つの形態の複合体の存在を示唆している。一方、pH4.1 において、 θ_{222} は PLG 添加量の増加に伴って m_r 値 19.3 までは、若干増加した。その後は m_r 値 15.8 までほとんど変化はなく、 m_r 値 15.8 から m_r 値 11.1 で大きく増加した。このことから、PLG の添加に対して、複合体形成過程に三つの領域が存在することが推定できる。蛍光および CD 測定の結果を踏まえ、pH6.5 では m_r 値 28.4 までを領域 A、 m_r 値 28.4 から m_r 値 17.8 を領域 B として、pH4.1 では、 m_r 値 17.9 までを領域 A、 m_r 値 17.9 から 10.1 の間は領域 A' (領域 A と F_{max} 値がほぼ同じことから、同じ形態の複合体が形成されていると考えられる) として m_r 値 10.1 以降を領域 B とし、複合体の形成機構について検討した。

温度 37°C での Native Lyz の値を 100% としたときの、Lyz/PLG 複合体の最大速度 V_{max} とミカエリス定数 K_m の相対値を溶菌法により求めた (Table2)。Native Lyz に比べ Lyz/PLG 集合体の V_{max} は上昇していた。これは、集合化することにより $M.I.$ と同時に多点で結合できるようになったためと考えられる。Native Lyz に比べ Lyz/PLG 複合体の K_m は pH6.5 では上昇し、pH4.1 では減少していた。これは、pH6.5 の PLG がランダム構造をとっているため、複合体化した際、Lyz を取り囲むようにマスクするのに対し、pH4.1 の PLG はヘリックス構造をとっているため、PLG 上に Lyz が配列するためと推測される。Hill Plot より Hill 係数を算出した結果を Table 3 に示す。Native Lyz および pH6.5 における Lyz/PLG 複合体の Hill 係数は 1 となり協同性は示さなかった。それに対し、pH4.1 の Hill 係数は約 0.79 となり負の協同性を持っていることが分かった。

以上の結果より、Lyz/PLG 複合体の形成に関して以下のことが明らかとなった。pH6.5 においては

Table 2 Relative values of V_{max} and K_m for Lyz/PLG complexes to $M.I.$

	pH6.5		pH4.1	
	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m
region A	140	144	111	81
region B	127	127	113	79

Table 3 Hill coefficient of Lyz and Lyz/PLG complexes in the A and B region to $M.I.$

	Lyz	region A	region B
pH6.5	1.00	0.951	0.952
pH4.1	1.01	0.798	0.783

Lyz/PLG 複合体は PLG がランダム構造の形態を取りながら、Lyz が分子内で結合した分子内集合体を形成している。さらに、PLG の添加量が多くなると、Lyz 分子間および分子内複合体間に相互作用が強くなり、分子間複合体が形成される。一方、pH4.1 における PLG はヘリックス構造の形態を取りながら、Lyz が分子内複合体を形成しているが、PLG の添加量の増加とともに、分子内複合体の形成と崩壊が平衡状態にある領域を経て、分子間複合体が形成される。

また、pH6.5 では Fig.3(a) のように、PLG が flexible でランダム構造をとっているため、基質との結合に際し Lyz の構造変化が起きても、近傍の PLG 構造の変化にとどまり、Lyz と PLG の結合部分に影響を与えていないと考えられる。pH4.1 においては、Fig.3 (b) のように PLG がヘリックス構造をとっているため、Lyz と基質の複合体化により、Lyz の構造変化とともに PLG のヘリックス構造も変化し、それが隣接する Lyz の構造変化を引き起こしているため負の協同性を示したといえる。したがって、PLG の添加量と pH の調節により、形態と機能が異なる Lyz/PLG 複合体を形成させることが可能であることが分かった。

更に、KPVS フィルムに固定化した Lyz の構造とその生物化学的機能について検討した結果、固定化による Native Lyz の至適 pH のアルカリ側へのシフトおよび酵素活性の低下 (Native Lyz に対して 29%) が観察された。CD スペクトルより Lyz の活性部

位に存在する Trp や高次構造への影響があまり強くないことが示されており、また蛍光スペクトルの結果からは、Fmax のブルーシフトが見られたことから、複合体の活性低下は Lyz が KPVS フィルムに覆われることにより、Lyz と基質との接触頻度が起こったためであり、Lyz 固定化層における KPVS の負電荷が多いために H⁺ を引き寄せ pH がバルク層に比べ見かけ上低下したためにアルカリ側へシフトしたと考えられる。

4. 参考文献

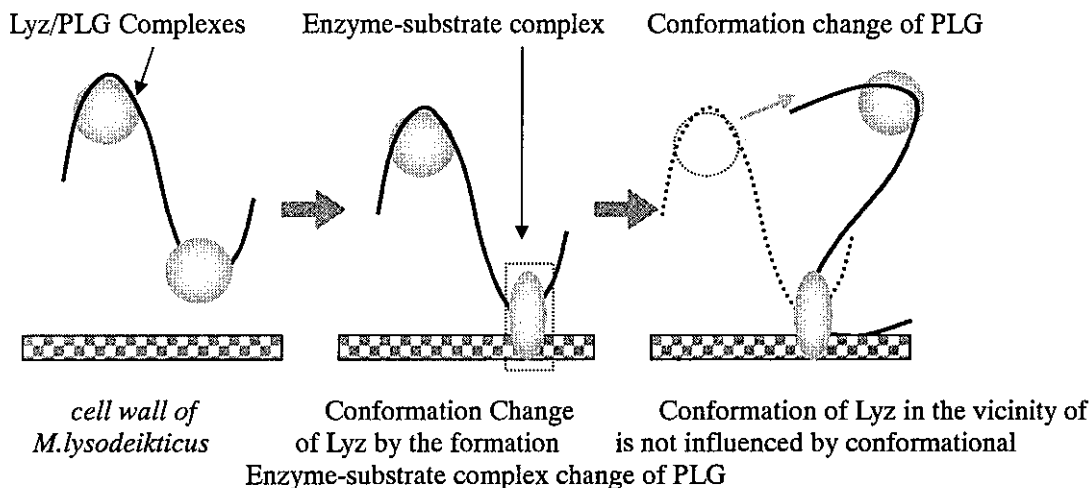
1.A.Tsuboi, T.Izumi, M.Hirata, J. Xia, P. L.Dubin, E. Kokufuta: Complexation of Proteins with a Strong Polyanion in an Aqueous Salt-free System:The ACS

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)

(a) pH6.5



(b) pH4.1

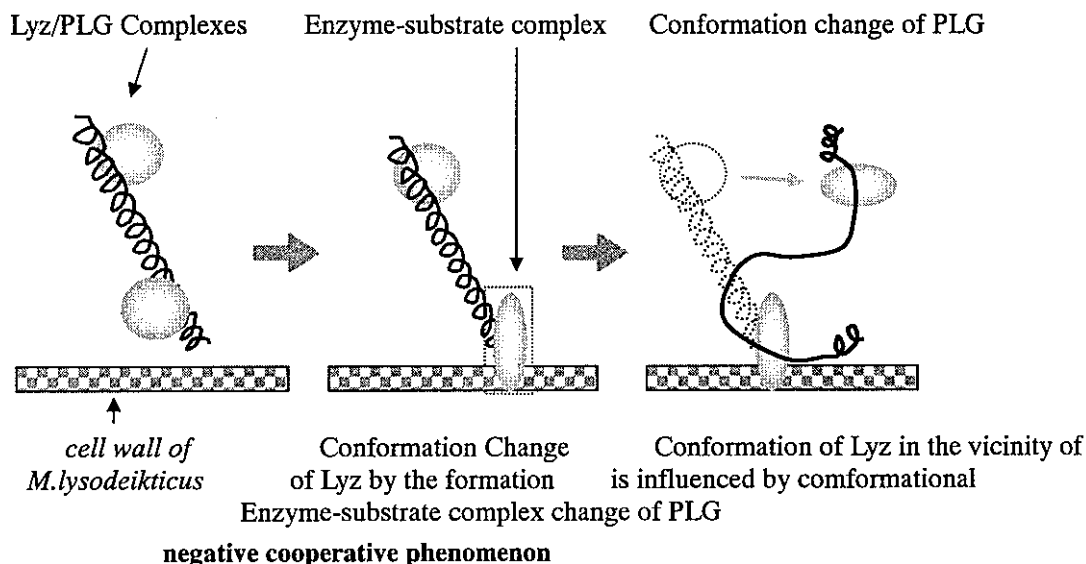


Fig.3 Schematic illustration of negative cooperativity