

高分子電解質/酵素複合体の構造の解明に関する研究IV

和泉 剛・高橋 大輔 (応用分子化学科)

1. 緒言

これまでの水溶性高分子とタンパク質との研究[1-3]より、静電的相互作用に基づく複合体形成において3段階の領域があることが判明した。また、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た。更に、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を主要因として得られた複合体の酵素活性が低下し、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、酵素の高次構造への複合体形成の影響は、酵素を失活させる程に大きくないことが示唆された。

そこで本研究では、昨年度までの研究に引き続き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(以下 PLG と略記、公称分子量 31,700 (vis), Mw/Mn 比 1.2)とニワトリ卵白リゾチーム(以下 Lyz と表記, EC.3.2.1.17)との複合体形成を検討するため、温度に対する複合体の形態変化について追究した。

また、古くから学問的興味より行われてきた高分子-低分子間複合体に関する研究は、近年では、集合化により高度な機能を発現するタンパク質などの生体分子を模倣した新たな材料系の構築へ向けた生体高分子-低分子間複合体に関する研究[4-7]が盛んに行われている。そのような中で生化学の分野で広く研究されてきたタンパク質と界面活性剤の相互作用はポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)、生体膜中に存在する不溶タンパク質の可溶化などのみならず、近年凝集タンパク質の再生時における分子シャペロン

としても研究されている。しかしながら、界面活性剤は個々のタンパク質により構造変化の様相を異にするため十分に相互作用の本質を解明するまでにいたっておらず、生体高分子を利用した新たな材料系の構築に当たっては、複合体形成機構の理解が必要不可欠となっている。

そこで、本研究では界面活性剤試料としてドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を用い、Lyz の構造および機能への SDS 添加の影響を検討した。

更に、ICD を伴う高分子-低分子間複合体の形成とその形成機構の理解を目指し、タンパク質を構成する3つの基本構造(random構造, Sheet構造, Helix構造)のすべてを取り得る特異なポリペプチドである Poly-L-lysine hydrobromide (以下 PLL と略記)、と種々のアゾベンゼン誘導体(Methyl Orange(MO)および Ethyl Orange(EO), Alizarin Yellow R (AYr), Alizarin Yellow GG (AYg))との相互作用を検討した。

測定には、種々の光学的、電気化学的手法に加えて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。

2. 実験

2-1. 温度に対する Lyz/PLG 複合体の形態変化
種々の濃度の Lyz 溶液に濃度 $0.2\text{g}/\text{cm}^3$ の PLG 溶液 0.25cm^3 を添加し、PLG-Lyz 混合溶液を調整した。実験は、 25°C において異なる PLG 濃度の複合体の形態および $20\sim 90^\circ\text{C}$ での複合体の形態を吸光度、CD 測定を用いて測定し、複合体形成による Lyz の形態への影響について検討した。

2-2. SDS 添加系における Lyz の構造変化

Lyz, SDS 溶液はリン酸緩衝液(pH 6.5, $I=0.01$)およびグリシン-塩酸緩衝液(pH 3.0, $I=0.01$)で調

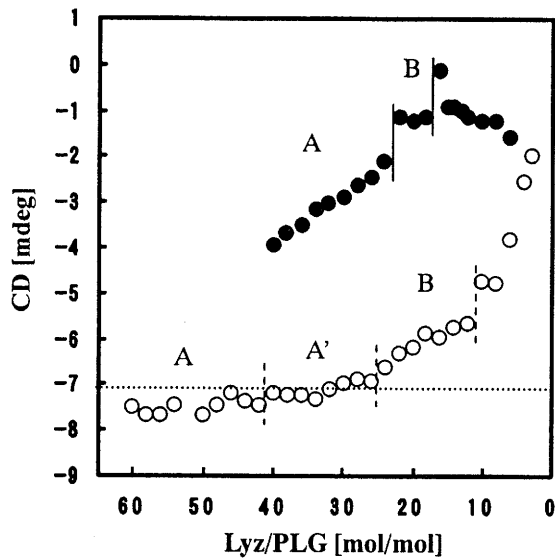


Fig.1 Changes in θ_{222} values of Lyz/PLG complexes with the amount of PLG

○ : pH4.1 ● : pH6.5

製した。一連の実験を通して Lyz 濃度 1.4×10^{-5} mol/dm³ と一定とした。残存 Lyz 濃度測定, 円二色性(CD)スペクトル測定, 活性測定, 蛍光測定により構造と機能の相関の検討を行った。

2-3. PLL-アゾ系色素間におけるキラル複合体の形成とその形成機構

PLL は, 小角散乱平均分子量 94,600 の試料を使用し, 2.5mmol/dm³ のポリビニル硫酸カリウム標準溶液を用いた濁度滴定より PLL 溶液の濃度を決定した。

複合体溶液の調製は, あらかじめ 2.5×10^{-4} mol/dm³ に調製した PLL 溶液と色素溶液を混合し, 適宜希釈することにより行った。また, 塩およびアルコール添加効果を考察するにあたり, KCl, Methanol, Ethanol, 1-Propanol を使用した。

3. 結果および考察

3-1. 温度に対する Lyz/PLG 複合体の形態変化

Fig.1 に PLG 濃度に対する Lyz/PLG 複合体溶液の CD 値の変化を示す。Fig.1 より, pH4.1 で複合体は, 3 領域 (Region A, Region A', Region B), pH6.5 で 2 領域 (Region A, Region B) の形成領域があることがわかった。蛍光測定からも同様の結果が得られた。これまでのタンパク質/高分子強電解質複合体の結果より, Region A では分子内複合

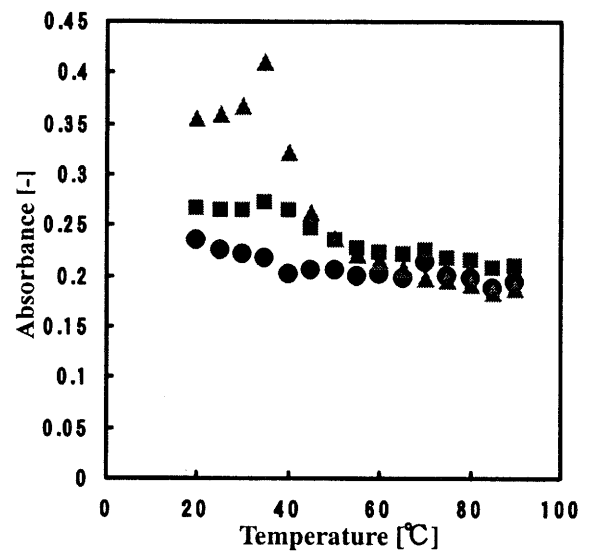


Fig.2 Changes in absorbances of 280nm of Native Lyz and Lyz/PLG complexes with temperature at pH4.1

● Native Lyz ■ Region A ▲ Region B

体, Region B では分子間複合体が形成されていると考えられる。pH4.1 の Region A' は, CD 値が Native Lyz とほとんど変わらないことから, 複合体の形成と崩壊が平衡状態にある領域と考えられる。

pH4.1 の 280nm における吸光度測定の結果を Fig.2 に示した。Fig.2 より, 複合体の吸光度は, 35°C で増加したが, 35°C 以上で吸光度は低下し続け, やがて Native Lyz とほとんど等しい値となった。35°C での吸光度の増加は, 複合体を形成する疎水結合が強まったため吸光度が増加したと考えられる。35°C を越えた後の吸光度の低下は, 複合体が崩壊し, Lyz と PLG がそれぞれ遊離になったためと考えられる。pH6.5 においては, 35°C で起こったような増加が見られず, Region A の複合体は 40°C 以降, Region B の複合体は 35°C 以降で吸光度が低下した。これらは, 複合体が崩壊し, Lyz と PLG が遊離になったためと考えられる。280nm における CD 測定より, 複合体は 2 度, 転移を起こしていることがわかった。40°C 付近での転移は, 吸光度変化と同様なことが起こったためと考えられる。70°C 付近での転移は, Native Lyz の転移に近いことから複合体が崩壊した際に遊

離になった Lyz の転移であると考えられる。70℃ 付近の複合体の転移温度が Native Lyz に比べ低く現れたのは、複合体から Lyz が解離する際に Lyz 自身の形態が変化したためだと考えられる。

3-2. SDS 添加系における Lyz の構造変化
 <残存 Lyz 濃度測定> pH 6.5 において Lyz は SDS と結合し SDS 濃度約 1.0mmol/dm³ 以下で水不溶性の複合体を形成する。その時に生じた沈殿物をメンブランフィルターでろ過した。280nm におけるろ液の吸光度を測定し、複合体形成に参与した Lyz 濃度を算出した (Fig.3)。これは Lyz の正電荷を帯びた解離基(Lys, Arg, His)と SDS の極性部(ドデシル硫酸イオン)が静電的に相互作用し電氣的に中和されるためだと考えられる。その後、Lyz 表面に結合した SDS が疎水性相互作用し、再分散を起こすと考えられる。

pH 6.5 における遠紫外領域(200~250nm)の Lyz および SDS 添加(SDS 濃度 8.0mmol/dm³)時の Lyz の CD スペクトルより、SDS の添加により Lyz 構造中の α -helix 含量が増加し、 β -sheet 含量が減少することが明らかとなった。また、Lyz-SDS 複合体形成における Lyz の実効電荷の影響を調べるために、pH 3.0 においても同様の実験を行った。Fig.4 に α -helix に由来するピークである 222nm における CD 値 $[\theta]_{222}$ の SDS 添加量依存性を示した。Lyz は塩基性タンパク質(等電点 pH 11.0)であるので、pH 6.5 より pH 3.0 の方が実効電荷は多い。にもかかわらず、沈殿形成領域は 2.0mmol/dm³ 付近までへと上昇したが、形成される α -helix 含量に pH 3.0 と pH 6.5 の間に大きな違いは見られなかった。このことは、SDS 溶液中において α -helix は解離基数(すなわち pH)に依存せず同じ部位で形成されていると考えられる。

3-3. PLL-アゾ系色素間におけるキラル複合体の形成とその形成機構

MO は、水溶液中において 464nm に $\pi-\pi^*$ による最大吸収波長を持つ。また、PLL との複合体形成時には、短波長側の 374nm に PLL と結合した MO による新たなピークを発現することがわ

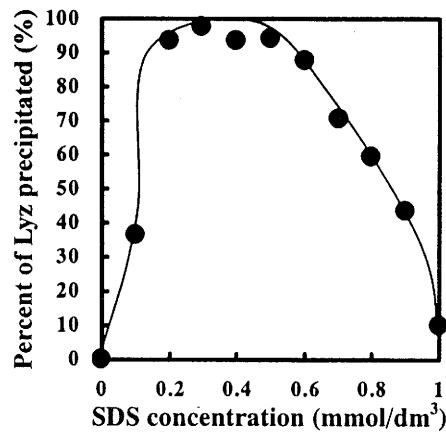


Fig.3 Precipitation curve of Lyz-SDS Complex at pH 6.5
 Lyz concentration : 1.4×10^{-5} mol/dm³

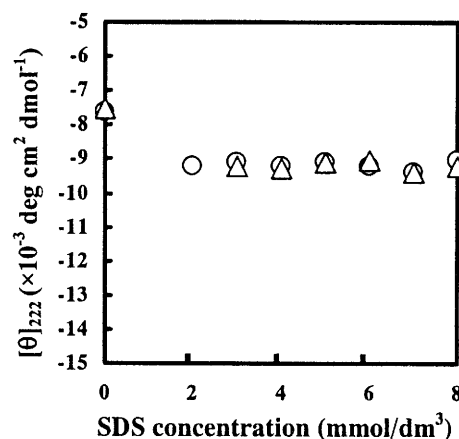


Fig.4 Changes in $[\theta]_{222}$ values of Lyz-SDS Complex with SDS concentration
 Lyz concentration : 1.4×10^{-5} mol/dm³
 ○ pH 6.5 △ pH 3.0

かった。PLL 濃度を 2.0×10^{-5} mol/dm³ に固定し、MO 濃度を 0 から 8.0×10^{-5} mol/dm³ としたときの MO 単量体と複合体の濃度と吸光度の関係は MO と PLL 繰り返し単位のモル比が 1 となる濃度を境に、MO 濃度 2.0×10^{-5} mol/dm³ 以上では、複合体のピークは、直線的に上昇しているにもかかわらず、単量体の吸光度は変化していない。一方、 2.0×10^{-5} mol/dm³ 以下では、両者とも吸光度の急激な変化がみられた。

このことから、MO 濃度が 2.0×10^{-5} mol/dm³ までは、MO が PLL に Stacking し、それ以上の濃度では、PLL への更なる MO の結合は起こっていないものの、複合体間あるいは複体内相互作用により、MO がより安定な構造へと再配列しているものと考えられる。つまり、複合体は、

MOのスルホン基とPLLのアミノ基による静電的な1:1の結合であることがわかる。

このとき、CDスペクトルは、MOが $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ 以下では正の Cotton 効果を、 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ 以上では負の Cotton 効果を色素発色団に帰属する領域に示した (Fig.5)。この誘起円二色性 (ICD) は、複合体形成時にのみ観察されたことから、PLLに結合したMOのStackingによるものと考えられる。

KCl・種々のアルコール添加系およびEO, AYr, AygとPLLとの複合体形成について検討した結果、(1)MOのような強電解質とPLL間の複合体は、静電的相互作用による1:1の結合によって始まり、疎水的相互作用を伴う複合体間相互作用によって安定化する、(2)色素濃度変化に伴い、PLL主鎖は疎水性の強いSheet構造あるいは、Helix構造へと変化する、(3)MOは、EOに比べ側鎖の立体障害が小さいことから、MO主導の複合体形成が進行する、(4)AYrのような弱電解質との複合体形成では、低分子側の電荷の状態は不安定であることから、PLL主導の複合体形成が進むとの結論を得た。更に以上の結果を考慮して、複合体形成モデル (Fig.6) を提案することができた。

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

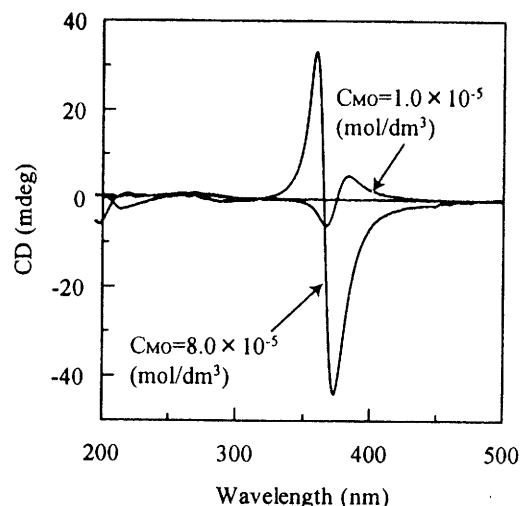


Fig.5 CD spectra of MO-PLL complex

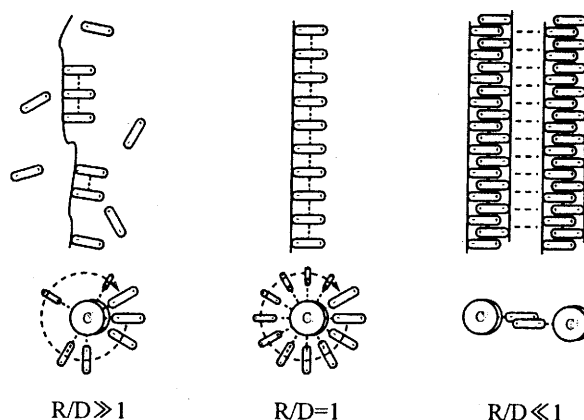


Fig.6 Schematic representation of MO-PLL complex

- Polyelectrolytes in an Aqueous Salt-Free System: The ACS Journal of Surfaces and Colloids *Langmuir*, 16, 7, 3133(2000)
- 4.M.V.R.Rao, M.Atreyi, M.R.Rajeawari, *Int.J.Peptide Protein Res*, 17, 205 (1981)
 - 5.Y.Moriyama, K.Hirano, K.Takeda, *Colloid Polym Sci*, 278, 979 (2000)
 - 6.L. Stryer and E. R. Blout : Journal of the American Chemical Society, 83(1961), 1411-1418
 - 7.H. Yamamoto. and A. Nakazawa : Bulletin of the Chemical Society of Japan, 56(1983), 2535-2536