

# Cholesterol の修飾によるタンパク質の酵素活性への影響

日大生産工 ○高橋 大輔・和泉 剛

## 1. 緒 論

これまでの研究では、タンパク質への化学修飾は、タンパク質の構造（距離や空間配置）や機能に關与する残基を特定・理解するために用いられてきた。しかしながら、最近の研究ではタンパク質オリゴマーに高活性や新機能の発現が報告されるなど、構造や機能の特定や糖タンパク質といった生体物質の理解のための基礎知見の集積のみならず高機能性タンパク質の開発にも興味を持たれている。さらに、Polyethylene glycol (PEG)や多糖類を化学修飾することによるタンパク質の化学的安定性、溶解性、血中滞留性などの改善や熱安定性の向上を受け、PEG 化ヘモグロビンを用いた人工血液などの実用化に向けた開発・臨床試験が欧米各国を中心として進められている<sup>1)</sup>。また、Pullulan や Poly-L-lysine(PLL)への Cholesterol の化学修飾により自己組織的に会合したナノゲル(粒径 20~30nm)の形成、Cholesterol 導入率による二次構造の制御および分子シャペロン類似の機能などが報告<sup>2), 3)</sup>されるなど、水溶性高分子への疎水性基の導入による機能性の向上や新機能の付加も期待されている。

そこで、本研究では、3 種類のタンパク質への Cholesterol の導入による酵素活性およびその構造への影響について検討を行った。

## 2. 実 験

DMSO 中において *N,N*-カルボニルジイミダゾール (CDI)を用いて鶏卵白由来リゾチーム (Lysozyme), 牛臍臓由来リボヌクレアーゼ A (RNase)および牛臍臓由来リパーゼ (Lipase)に Cholesterol を導入し、Cholesterol 修飾タンパク質(Cholesterol-bearing protein, CHP)を調

製した。各タンパク質への Cholesterol の導入を <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR および IR スペクトル測定より確認し、Cholesterol 結合量を MALDI-TOF-MS, SDS-PAGE および吸光度 (酵素法) 測定より求めた。得られた CHP の熱安定性を DSC, 構造を CD および蛍光, 凝集性を DLS および QCM 測定より検討した。また、生化学的機能を *Micrococcus lysodeikticus* (M.I.) , Cytidine-2',3'-cyclic monophosphate およびラウリン酸 *p*-ニトロフェニルを基質とした酵素活性測定より評価した。

## 3. 結果および考察

<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR および IR スペクトル測定よりタンパク質への Cholesterol の導入を確認した。また、MALDI-TOF-MS, SDS-PAGE および吸光度測定より、タンパク質 1mol に対して 1-2mol の Cholesterol が結合されていることが確認された。調製した CHP の中でも特に Lipaseを用いた CHLipaseに顕著な溶解性の減少が見られた。

PLLに Cholesterol を導入した秋吉らの結果<sup>3)</sup>と同様に、調製した 3 種類の CHP においても凝集体形成による粒径の増大が観察された (DLS および QCM 測定)。また、蛍光プローブである 8-Anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS)を用いた蛍光スペクトルより蛍光極大波長およびその強度について検討した結果、疎水性領域に ANS が包接されていることから CHPが Cholesterol を架橋点とした凝集体を形成していることが示唆された。Cholesterol や Trp などの疎水性アミノ酸を包接するβシクロデキストリン(CyD)を添加した系における DLS, QCM, 蛍光測定からも凝集体形成を

示唆する結果が得られた。

図 1 に Cholesterol 修飾 Lysozyme (CHLysozyme)の相対活性の経時変化を示す。CHLysozyme の相対活性は 90%以上を示し、2 日目以降は 100%以上と高い値を示した。Lineweaver-Burk plot から CHLysozyme の動力学定数(Michaelis 定数  $K_m$  および最大反応速度  $V_{max}$ )を算出した結果, Lysozyme に対して  $V_{max}$  値の低下が見られたものの CHLysozyme と *M.l.*の親和性の増大( $K_m$  値が減少)が示唆された。したがって, CHLysozyme の酵素活性は Lysozyme と同様に経時的に減少するものの凝集体の形成により酵素-基質複合体の形成が容易になったためと考えられる。しかしながら, CHRNase では RNase よりも大きな活性の低下と  $K_m$  および  $V_{max}$  値の減少が観察された。CHRNase においても凝集体の形成や疎水性領域の増大が見られ, さらに CyD の添加による凝集体の崩壊と活性の回復が見られたことから, CHRNase の活性変化は凝集体形成による活性部位への基質結合の立体障害が主要因と考えられる。

CHLysozyme の CD スペクトルの経時変化を図 2 に示す。図 2 より CHLysozyme では Lysozyme では見られなかった  $\alpha$ -helix 含有量の経時的な増加(208 および 222nm 付近の CD 値の低下) が観察された。秋吉ら<sup>3)</sup>も Cholesterol の導入による PLL の  $\alpha$ -helix 含有量の増加を指摘しているものの, 経時的な増加についての報告は行っていない。一般に, 溶液中においてタンパク質の構造は不安定であり, 変性に伴い random 構造の含有量が増加することが知られている。しかしながら, Lysozyme においては自発的なリフォールディングも報告されていることから, Cholesterol の結合による構造の安定化が  $\alpha$ -helix 含有量の増加や高活性の保持に関与していると考えられる。また, DSC 測定からは PEG 修飾タンパク質と同様の熱安定性の向上

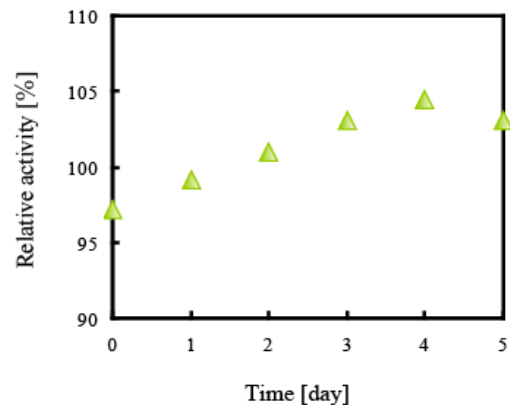


Figure 1. Relative activity of CHLysozyme for *M.l.* in pH6.5 phosphate buffer solution at 25°C. CHLysozyme concn. [g/dm<sup>3</sup>]: 0.2; *M.l.* concn. [g/dm<sup>3</sup>]: 0.16

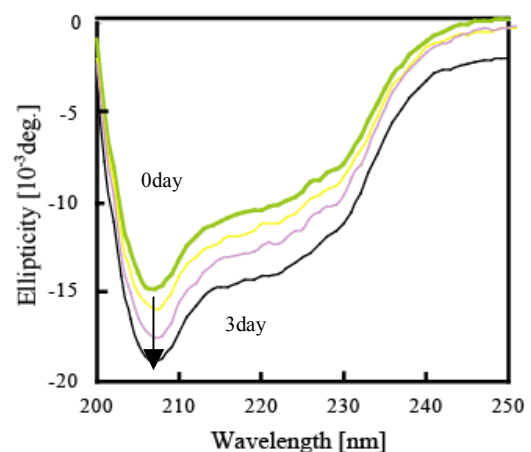


Figure 2 CD spectra of CHLysozyme in phosphate buffer solution (pH6.5) at 25°C. CHLysozyme concentration [g/dm<sup>3</sup>]: 0.2

も確認された。本講演では, CHLipase を含め調製した 3 種類の CHP の酵素活性能への影響について発表する。

#### 4.参考文献

- 1) 稲田祐二, 谷本剛, 続医薬品の開発 バイオコンジュゲート医薬品, 廣川出版, 1993,3-17
- 2) Y.Nomura, Y.Sasaki, M.Takagi, T.Narita, Y.Aoyama, K.Akiyoshi, *Biomacromolecules*, 6, 2005, 447-452
- 3) K.Akiyoshi, A.Ueminami, S.Kurumada, Y.Nomura, *Macromolecules*, 33, 2000, 6752-6756