

高分子電解質/酵素複合体の構造の解明に関する研究 II

和泉 剛・高橋 大輔(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(四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-高分子からなる固定化酵素やハイブリッド化などの分子設計へ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)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示している。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、種々の光学的手法と円二色性(Circular Dichroism: CD)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、酵素活性測定の結果との比較より酵素の構造およびその活性への複合体形成の影響について分子レベルで追究することを目的とした。

2. 原理

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現れる。したがって、種々の条件下での測定により光学活性物質の高次構造が推測される。

3. 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なニワトリ卵白由来のライソザイム(以下 Lyz と表記, SIGMA 社製, EC.3.2.1.17)およびブタ胃液由来のペプシン(SIGMA 社製, EC.3.4.23.1)を使用した。また、水溶性高分子には、ポリ-L-グルタミン酸(以下 PLG と表記, SIGMA 社製, 公称分子量 31,700 (vis), Mw/Mn 比 1.2)を用いた。

【実験】種々の濃度および pH に調製した Lyz および PLG 水溶液の CD スペクトルを 190-350nm の範囲において測定した。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。また、0.1g/dm³ ペプシン溶液(イオン強度 0.001 g/dm³)の CD スペクトルを測定し、温度および pH に

よるペプシンの二次構造変化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)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。

4. 結果および考察

(i) PLG/Lyz 複合体系

X 線解析などにより高次構造やアミノ酸配列が既知であるタンパク質やポリペプチドの CD スペクトルの測定は、生体高分子の構造と機能を明確にする観点から種々の条件下で行われている。pH4.5~6.5 の範囲における Lyz の CD スペクトルを図 1 に、また、PLG の CD スペクトルを図 2 に示す。Lyz では、測定した pH 範囲において特に変化は見られなかった。しかしながら、図 2 より明らかなように、PLG においては pH が 6.0 以上になると 200nm 付近および 210~225nm 付近に顕著な差が観察された。また、pH4.5~5.5 においては 222nm に α -ヘリックスの存在を示す特徴的な極値が現れ、pH の上昇に対して 222nm の旋光強度が低下した。更に、Lyz の至適 pH 付近である pH7.0 において、PLG は完全にランダムな構造をしていることが分かった。これらの結果は、Holzwarth と Duty の結果と良好に一致している[4]。高分子弱電解質である PLG の解離状態や形態は pH に依存することから、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(表 1)、水素イオン滴定曲線および電気泳動光散乱(ELS)測定の結果と比較した。その結果、低 pH 領域(pH4.5 以下)では α -ヘリックスを、そして pH5.0 以上ではランダム構造を形成していることが確認された。したがって、PLG の解離状態も考慮にいと、pH の上昇に対して PLG 中のカルボキシル基が解離し、その結果カルボキシレートイオン間の静電的相互作用により α -ヘリックス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。

Lyz の CD スペクトルの詳細な調査から、290nm 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 CD 値(CD_{294})には基質との結合に関与する Trp-62 に起因していることが明らかとされている[4]。また、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し、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ことから、種々の条件下における CD_{222} および CD_{294} 値を詳細に調べること

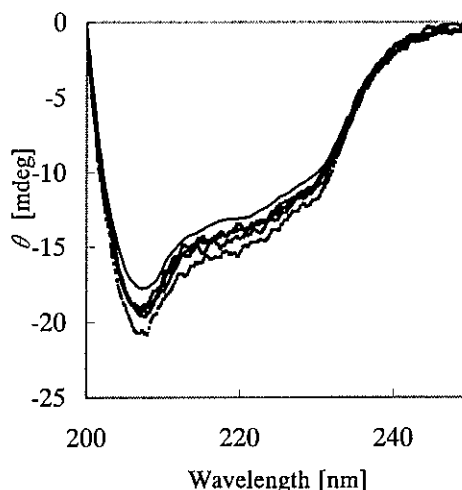


図 1 種々の pH における Lyz の CD スペクトル (pH4.5~6.5)

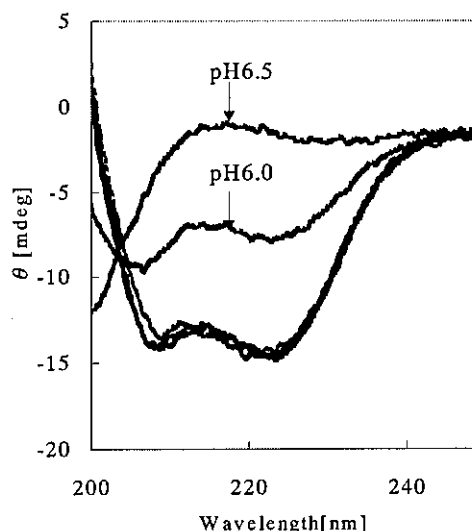


図 2 種々の pH における PLG の CD スペクトル (pH4.5~6.5)

表 1 種々の pH における PLG 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

により、複合体中の酵素の構造や酵素と基質との相互作用における酵素分子への影響を検討することができると考えられる。

PLG添加量に対するPLG-Lyz混合溶液の CD_{222} 値および CD_{294} 値の変化を図3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。pHの上昇に対して222nmの旋光強度が低下した。これは、pHの変化に対して α -helix含有量が低下していることを示しており、図1より明らかなようにLyzはpH変化に対してCDスペクトルに変化は見られないことから、PLGの形態変化に依存していると言える。また、PLGの添加量に対しては、低添加領域においてはあまりCD値の変化は見られないのに対して、PLGの添加量が多くなるとCD値は低下した。このようなPLG高添加領域の変化は、計算より求めた CD_{222} [cal.]の変化と一致することからも、複合体形成に関与しないPLGに由来する変化と考えることができる。以上の結果より、PLGとLyz間ではpHやPLG添加量の違いにより、分子内複合体と分子間複合体が形成される領域があることが明らかとなった。これらの結果は、Klotzの式から求められた結合定数や、解離状態から推測される結合数からも明らかとなった。また、CD値に変化が見られたPLG添加量と化学量論性が成立すると仮定した添加量が一致することから、複合体形成における量論性が成立していると考えられる。このことはELS測定による移動度のpH変化からも支持される。

次に、PLG添加量の増加に対する CD_{294} 値の変化について見てみると、 CD_{222} 値の変化に比べて殆ど変化しなかった。pH4.5における CD_{294} 値の変化は、 CD_{294} [cal.]と同様の変化を示したことから、遊離なPLGに起因するCDスペクトルの影響によると考えられる。LyzのCDスペクトルのpH依存性より、長波長付近におけるCD帯にTyr残基やTrp残基が寄与し、特に294nmにおける CD_{294} 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が明らかとなっていることから[5-9]、Lyzの活性部位周囲への複合体形成の影響が少ないことが示唆された。このことは、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(ポリエチレングリコール/ペプシン複合体)の酵素活性がNativeとほぼ同等であること[10]からも支持される。またpH6.5においても、 CD_{294} [cal.]と CD_{294} [exp.]はほぼ同様の変化をしており、静電的な相互作用を介して複合体においても活性部位周囲への影響は小さく、高活性を保持した状態で酵素を固定化することができ

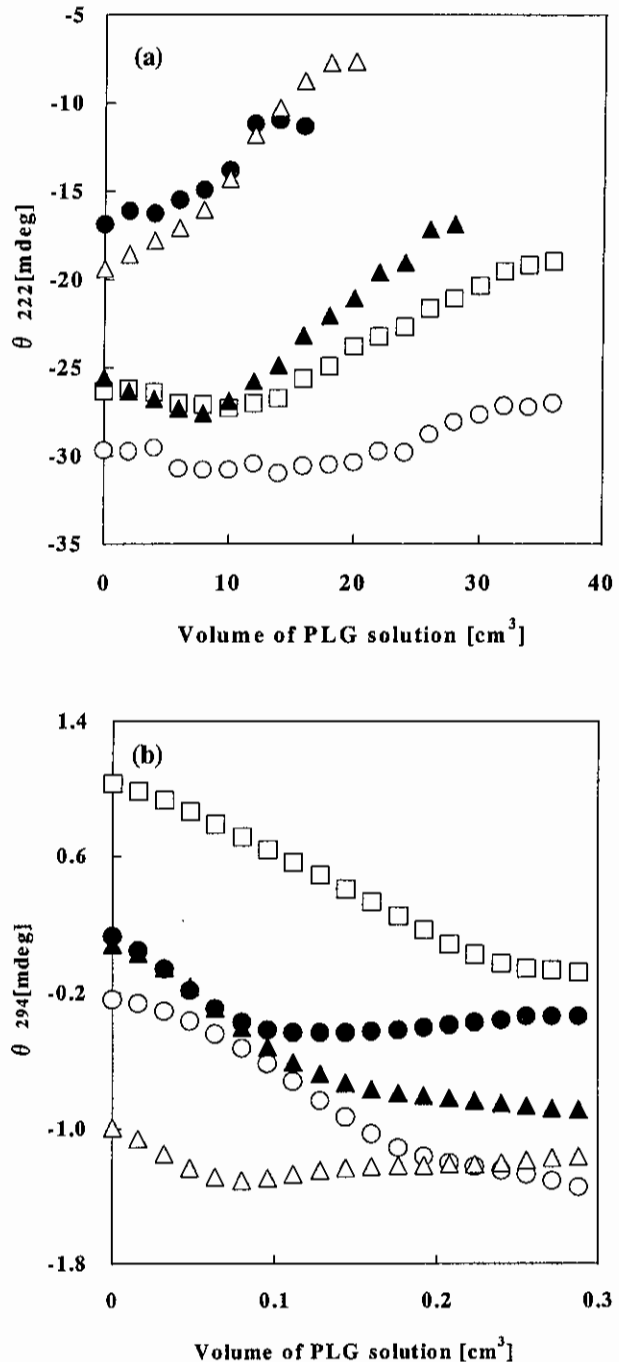


図3 種々のpHにおけるPLG添加量に対するPLG-Lyz混合溶液の(a) CD_{222} および(b) CD_{294} 値の変化
○pH4.5, □pH5.0, ▲pH5.5, ●pH6.0, △pH6.5

ることが示唆される。これらの結果は、PLG/Lyz 複合体の pH 活性曲線からも支持された（結果は未掲載）。

(i) 高分子電解質/ペプシン複合体系

pH2.5（至適 pH）における温度に対するペプシン溶液の CD スペクトルの変化を図 4 に示す。その結果、ペプシンの変性温度は 65°C であることが示唆された。また、Yang の式を用いて、二次構造解析を行った結果を図 6 に示す。図 5 より温度の上昇によるペプシンの二次構造の変化は、 β -sheet および α -helix が減少し、Random および Turn が増加し、特に β -sheet と Random の変化量が大いことが観測された。また、ペプシンの活性部位である Asp32 および Asp215 は、ともに β -sheet の構造をとっていることが X 線解析（プロテインデータバンク）より明らかとなっており、CD スペクトルにより算出した二次構造と一致した。これらの結果、ペプシンの温度による変性は、 β -sheet の減少によって起こることが示唆された。

pH2.5 における温度に対するヘモグロビンに対するペプシンの活性（イオン強度 0.1mol/dm³）の変化と比較したところ、ペプシンの活性は 65 C 付近から大きく低下することが明らかとなったことから、温度の上昇によるペプシンの活性の低下は、ペプシンの β -sheet の減少に関係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., B167,378(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)

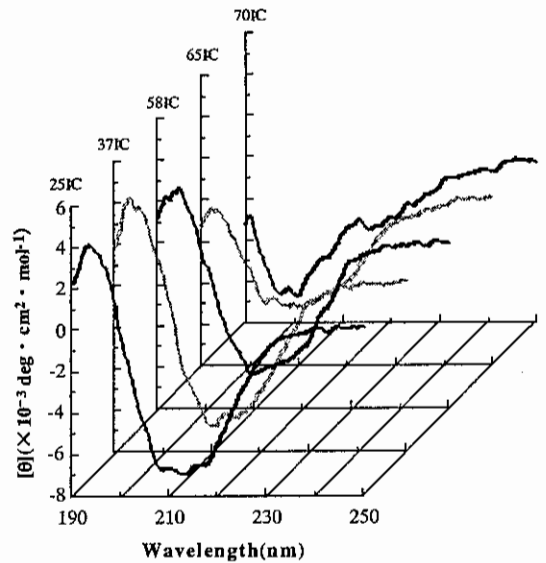


図 4 pH2.5 におけるペプシン (0.1g/dm³) の CD スペクトル (25°C~70°C)

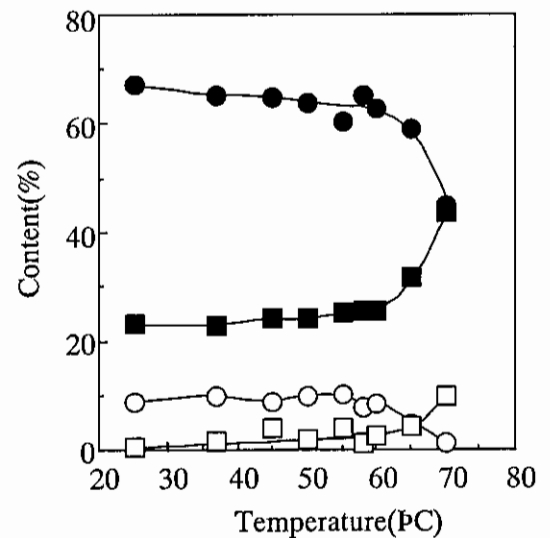


図 5 pH2.5 におけるペプシンの二次構造解析結果
○ α -helix, ● β -sheet, □turn, ■random