

高分子電解質/酵素複合体の構造の解明に関する研究Ⅴ

和泉 剛・高橋 大輔（応用分子化学科）

1. 緒 言

近年、アルツハイマー病やクロイツヤコブ病などの様々な病気が生体内におけるタンパク質の形態変化が要因で引き起こされている。したがって、タンパク質の形態変化の機構やそれに伴う生物化学的機能への影響に関する基礎知見の集積は、生体内の反応の理解のみならず、病気の予防方法の確立や高活性を有する固定化生体触媒の調製などの応用分野につながることを期待される。生体内で起こる反応の多くは、タンパク質間やタンパク質/多糖類間の複雑な高分子反応であり、様々な外的因子（pH、イオン濃度、温度）により影響・調節されている。しかしながら、弱電解質であるこれらの高分子間の相互作用や形態への影響を検討することは難しい。

本研究は、様々な条件下において高分子電解質とタンパク質間の相互作用や得られた複合体の構造および機能を検討することを目的とし、従来用いてきた種々の光学的手法（動的・静的・電気泳動光散乱法、蛍光分光法、吸光分光法）に加えて、アミノ酸やタンパク質など光学活性物質の形態（二次構造）変化を検討することができる円偏光二色性分散計を用いて追究した。

これまでの研究[1-3]では、主に高分子強電解質とタンパク質から成る系の形成機構とその酵素活性について検討を行ってきたが、本研究では生体内反応に主眼をおいてポリペプチドなどの高分子弱電解質とタンパク質やタンパク質間凝集体系について検討を行った。また、これらの高分子の形態変化などを検討する

ために、種々の色素や界面活性剤との相互作用および色素凝集体の形成についても併せて追究した。

2. 実 験

試料として、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)をはじめとする種々の合成ポリペプチドとニワトリ卵白リゾチーム(以下 Lyz と表記、EC.3.2.1.17)を使用した。

また、低分子試料には界面活性剤試料としてドデシル硫酸ナトリウム(SDS)やカチオン性、両イオン性、ノニオン性界面活性剤(CTAB, SB 3-16, Brij 58)を使用した。

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), Congo Red (CR)やポルフィリン、シアニン色素などを使用した。

測定には、これまで用いてきた光学的手法に加えて日本分光(株)製の円偏光二色性分散計 (Circular Dichroism: CD, J-820)を使用した。

3. 結果および考察

3-1. 高分子間複合体の形成機構と酵素活性

PLG と Lysozyme との複合体形成について pH4.1 と pH6.5 において検討した結果、複合体形成に伴う Lysozyme の高次構造変化は見られなかった。このことは高分子強電解質との複合

体や水素結合性複合体の結果とも一致した。しかしながら、pH4.1とpH6.5ではともに複合体形成における反対電荷間の静電的な中和に伴う1:1の化学量論性は成立せず、特にpH4.1では結合定数にも大きな違いが見られた。これはpHによるPLGAのカルボキシル基の解離状態やそれに伴う形態(pH4.1: α -helix, pH6.5: random coil)の変化により複合体形成における駆動力が静電的結合および水素結合を主としたためである。また、蛍光極大波長 F_{max} や α -helix 構造に起因するCD値の変化から、複合体中のLysozymeの環境がpHのみならずPLGA添加量に伴い変化していることが分かった。さらに、pH4.1ではこれまでの高分子強電解質/タンパク質系で確認された分子内複合体および分子間複合体の形成に加えて分子内複合体の形成と崩壊が定常状態にある領域が新たに観察された。

PLGA/Lysozyme 複合体の酵素活性について、温度37°Cにおいて溶菌法によって検討した結果、最大反応速度 v_{max} はpHによらずNative Lysozymeに比べて増加した。これは複合化により基質 *M. l.* と多点で結合できるようになったためと考えられた。一方、ミカエリス定数 K_m はpH6.5では上昇し、pH4.1では減少した。pH6.5では静電的な結合により複合体形成においてPLGAがLysozymeの活性部位をマスクングしてしまい、立体障害の影響により酵素-基質複合体の形成を阻害してしまうのに対し、pH4.1ではLysozymeがPLGAのhelix構造に対して配向して複合体を形成しているためと考えられた。さらに、Hill plot からHill係数を求めた結果、pH4.1で負の協同性を示す値(0.79)が得られた。以上の検討から、PLGA/Lysozyme 複合体の形成機構とその活性能に関してモデルの提案を行うことができた。pH6.5では基質の結合に際しLysozymeの構造変化が起きてもPLGがflexibleでランダムな構造を取っているために近傍のPLG構造の変

化に留まり、LysozymeとPLGの結合部分に影響を与えないでいる。一方、pH4.1においてはPLGがhelix構造を取っているために、基質との結合に際しLysozymeの構造変化とともにPLGの構造も変化し、さらに隣接するLysozymeの構造変化を引き起こし負の協同性を示したと言える。

高分子弱電解質の直鎖ポリエチレンジイミン(LPEI)とペプシンとの複合体形成について検討した結果から、温度上昇に伴うペプシンの活性能の低下がペプシンの β -sheet構造の含有量の減少と相関があることを明らかとした。また、LPEIとの複合化により熱に対する安定性が向上することも明らかとなった。

また、ポリビニルアルコール硫酸カリウムフィルムに対するLysozymeの固定化では、従来の固定化酵素と同様に活性能の低下と至適pHのアルカリ側へのシフトが観察された。しかしながら、CDスペクトルより活性部位残基であるTrpや高次構造への影響が大きいものではないことが示されており、調製方法の改善(フィルムへの固定化方法)により高活性能を保持させることは可能であることが伺えた。

3-2. 種々の界面活性剤とLyzとの相互作用およびリフォールディング

古くから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、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[4-6]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電気泳動法、不溶タンパク質の可溶化、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。

Lysozyme と界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)との相互作用の検討からは、pH6.5において形成される複合体が Lysozyme 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)との静電的に相互作用により、それに伴い活性が低下すること、および複合体形成において SDS との相互作用によって Lysozyme の α -helix 含量が増加し、 β -sheet 構造の含有量が減少することが明らかとなった。

Lysozyme/イオン性界面活性剤(CTAB, SB 3-16)複合体では、はじめに静電的な相互作用により、Lysozyme 表面に存在する解離基(酸性および塩基性アミノ酸残基)と界面活性剤の極性基が結合する。次に、疎水性相互作用により、Lysozyme の疎水性クレフトと界面活性剤の炭化水素鎖が結合する。この際、Lysozyme の芳香族アミノ酸残基周辺の環境変化、二次構造変化、活性低下が起こる。全ての変化が急激に起こっていることから、Lysozyme の疎水性クレフトと界面活性剤の結合は協同的に起こっていることが示唆される。すなわち、界面活性剤は Lysozyme の疎水性クレフトでミセルのような集合体を形成している可能性が示唆される。

Lysozyme/ノニオン性界面活性剤(Brij 58)複合体では、疎水性相互作用により、Lysozyme の疎水性クレフトと界面活性剤の炭化水素鎖が結合する。また、水素結合により、Lysozyme の酸性基と界面活性剤のエーテル基が結合する。したがって、この複合体も界面活性剤はミセルのような集合体を形成している可能性はある。比較的弱い相互作用により形成される複合体なので、Lysozyme の芳香族アミノ酸残基周辺の環境、二次構造および活性はあまり変化しない。

さらにシクロデキストリンと界面活性剤を分子シャペロンとして用いた Lysozyme のリフォ

ールディングにおいては、1) イオン性界面活性剤を添加した後、シクロデキストリンを添加することにより、変性還元 Lysozyme の高収率なリフォールディング(80%以上)を達成できる、2) リフォールディング率はタンパク質間の凝集を防止する界面活性剤の変性還元 Lysozyme に対する分散能および界面活性剤と糖類間の複合体の安定性に支配される、3) 人工シャペロンはリフォールディング反応の律速段階には影響しないということが明らかとなり、人工シャペロン(界面活性剤およびシクロデキストリン)を用いることにより、従来難しいとされてきたタンパク質高濃度条件下においても、変性還元 Lysozyme の高収率なリフォールディングを達成できることから、本手法は新しいリフォールディングシステムとして期待できることが分かった。

3-3. ポリペプチドと色素との複合体形成と分光特性評価

PLL と種々のアゾ系色素との複合体の形成とその形成機構に関して検討した。PLL との複合体形成により、M0 の $\pi - \pi^*$ に起因する吸収帯(464nm)よりも短波長側の374nmにPLLと結合したM0による新たなピークが見られた。また、色素濃度依存性の検討から、ある濃度を境に、PLLへの更なるM0の結合は起こらず、複合体間あるいは複体内相互作用によってより安定な構造へとM0が再配列していることが分かった。さらに、複合体形成時にのみM0の発色団に帰属する領域に観察された誘起円二色性(ICD)が、色素濃度に依存して正から負のCotton効果へと変化した。このICDはPLLに結合したM0のStackingによるものと考えられたが、これまでのポリペプチド/色素間のICDに関する研究ではこのような報告は行われておらず、材料化に関して興味深い結果である。種々の色素に対する更なる検討により、(1)メチルオレンジ(MO)やエチルオレンジ(EO)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)M0 は、E0 に比べ側鎖の立体障害効果が小さいことから、M0 主導の複合体形成が進行する、(4)弱電解質色素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。また、シアニン色素を用いた系からは、1)PLL との複合体形成において dimer が選択的に反応し、J 凝集体[7]様の複合体を形成する、2)ICD の発現に PLL 鎖の形態変化とそれに伴う色素分子間の相互作用が重要な役割を果たしていることがわかった。

3-4. Lysozyme の形態変化とアミロイド線維の形成

無機塩存在下におけるアルコール水溶液中の Lysozyme の構造について検討した結果、Lysozyme の変性および凝集に対して、アゾ系色素のコンゴーレッド (CR) が反応し特異的な吸収帯を示した。Random coil, α -helix および β -sheet 構造の PLL と CR の系において、 β -sheet 構造の PLL の系で Lysozyme と同様の特異的な吸収帯が見られたことから、Lysozyme および PLL はアミロイド線維状の形態をとっていることが示唆された。また、アルコール、無機塩添加系において、CD スペクトル、原子間力顕微鏡測定および CR、チオフラビン溶液の吸収スペクトル測定から Lyz の β -sheet 構造への変性とともにアミロイド線維の形成が観察された (図 1)。以上の結果は、複合化による活性能の保持では高分子鎖の形態が、またタンパク質分子自身の変性・失活や凝集・安定性には β -sheet 構造が関与していることが明らかとなった。

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

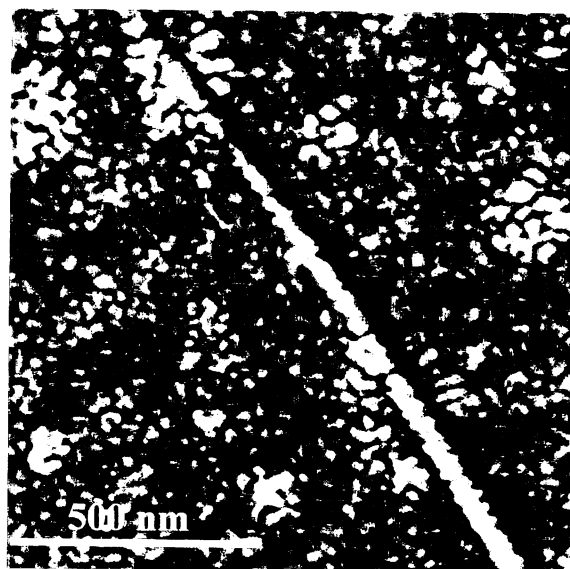


図 1. Lysozyme のアミロイド線維の形成(原子間力顕微鏡写真)

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.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.D. Takahashi, H. Oda, T. Izumi, R. Hirohashi, Substituent effects on aggregation phenomena in aqueous solution of thiocarbocyanine dyes, *Dyes and Pigments*, Vol. 66, 1-6 (2005)