

日大生産工(院) ○金谷 優一
日大生産工 高橋 大輔・和泉 剛

【緒論】

近年、生体内のメカニズムの理解や新薬の開発などの立場から多くの研究者によって生理現象の中心的な役割を果たしているタンパク質が研究されている。この数十年間で、タンパク質の化学構造や立体構造が解明された。また、生体内においてタンパク質は、同種および異種高分子と相互作用し、生物特有の構造や機能を発現していることがわかった。この複合化によるメカニズムなどをより詳細に解明することができれば、タンパク質の分離・回収および固定化酵素の分野において大いに貢献できると考えられる。

これまで、当研究室では、高分子電解質/タンパク質複合体に関する研究を行ってきた。その結果、複合体は、1対1の静電的相互作用により分子内複合体を形成することを明らかとした。そして、更に、その複合体同士が凝集し、一定の分子量・粒径をもった凝集体を形成する領域と、更なる高分子濃度の上昇に対して凝集した高次の凝集体(分子間複合体)を形成する領域をもつことを明らかとした¹⁾。

また、複合体の酵素活性能は高分子電解質の種類により、低下することを明らかとしてきた。

これまでの複合体の研究は、高分子電解質の物性(分子量、重合度、エステル化度、flexibility、側鎖の種類など)に着目し、研究されてきた。そこで、本研究では高分子電解質の形態に着目し、その形態がどのように複合体形成に影響するのかpH変化により形態変化を起こす高分子弱電解質を用いて検討した。

【実験】

高分子電解質にはPolyscience社製のPolyacrylic acid sodium salt (\overline{M}_v :15,000, n =160, 以下PAA) およびSIGMA社製の α -Poly-L-glutamic acid sodium salt (\overline{M}_w :31,700 n =210, 以下 α -PLG)、タンパク質にはSIGMA社製のChicken egg white Lysozyme (M_w :14,305)を用いた。高分子電解質の化学構造をFig.1に示した。酵素活性測定の際には、*Micrococcus lysodeikticus* (以下M.I.)を用いた。

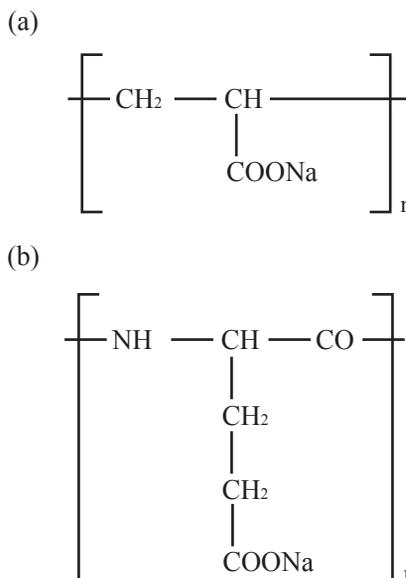


Fig.1 Chemical structures of (a) PAA and (b) α -PLG

溶媒として、酢酸緩衝液 (pH 4.1, $I = 0.05 \text{ mol/dm}^3$) リン酸緩衝溶液 (pH 6.5, $I = 0.05 \text{ mol/dm}^3$) を用いて高分子電解質/Lysozyme複合体を形成させ、その構造と機能を分光光学的的手法、酵素活性測定法を用いて検討した。

【結果・考察】

高分子電解質とLysozymeが複合体を形成する際の濁度を吸光度変化としてFig.2に示した。Fig.2より、PAA/Lysozyme複合体、 α -PLG/Lysozyme複合体はそれぞれ、モル比1.0, 1.5で一定の値となった。このことから、PAAとLysozymeの複合体形成における量論性は1対1であると考えられる。ゆえに、この複合体は静電的相互作用により形成されていると考えられる。そして、 α -PLGとLysozymeは、1対1で複合体を形成していないと考えられる。ゆえに、この複合体は静電的相互作用以外にも他の相互作用(疎水性相互作用、水素結合など)が関与していると考えられる。 α -PLG/Lysozyme複合体の吸光度がPAA/Lysozyme複合体の吸光度より高い値を示したのは、 α -PLGとPAAでは、分子量の異なる複合体を形成しているためだと考えられる。 ■

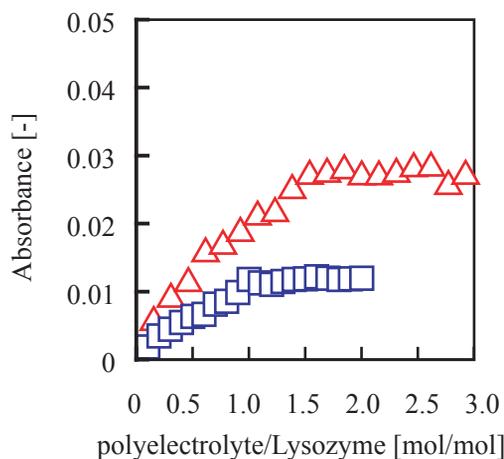


Fig.2 Changes in absorbance of α -PLG/Lysozyme complex (Δ) and PAA/Lysozyme complex (\square) at pH 6.5 and 25°C

Lysozyme concentration : 0.01 g/dm³

Wavelength : 450 nm

蛍光測定による結果をFig.3に示した。Fig.3より、複合体の蛍光極大波長はNative Lysozymeに比べ、短波長側にシフト（ブルーシフト）した。これは、Lysozyme表面にある発色団である芳香族アミノ酸残基（フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン）が高分子電解質により覆われ、Lysozymeの芳香族アミノ酸残基周辺の環境が親水性環境から疎水性環境へと変化したためだと考えられる。また、 α -PLG/Lysozyme複合体とPAA/Lysozyme複合体では、PAA/Lysozyme複合体の方がより蛍光極大波長がブルーシフトしていることがわかった。これは、 α -PLGとPAAでは、 α -PLGに比べてPAAの側鎖長が短い。そのため、PAAの方がLysozymeとの結合距離が短く、より水と接しにくくしていると考えられる。そのため、より疎水性環境になったと考えられる。また、蛍光極大波長の変化はPAA/Lysozyme複合体、 α -PLG/Lysozyme複合体それぞれでモル比1.0, 1.5で一定の値をとった。これは、Fig.2の吸光度変化と同様なことが考えられる。*

酵素活性測定による結果をLineweaver-Burk plotとしてFig.4に示し、Fig.4より求めた動力学定数をTable 1に示した。Table 1より、複合体の酵素活性（ V_{max} ）は、Native Lysozymeに比べて低下した。また、複合体の基質親和性（ K_m ）は増加した。これは、Fig.4のNative Lysozymeと複合体の直線関係から、高分子電解質がLysozymeに対して混合型阻害（不拮抗阻害と非拮抗阻害）を起こしているためだと考えられる。そして、 α -PLG/Lysozyme複合体とPAA/Lysozyme複合体では、PAA/Lysozyme複合体の方が酵素活性を低下させた。これは、上述したように、PAAの方が α -PLGより側鎖長が短いため、Lysozymeとより近い距離で結合し、基質を取り込みにくくしているためだと考えられる。

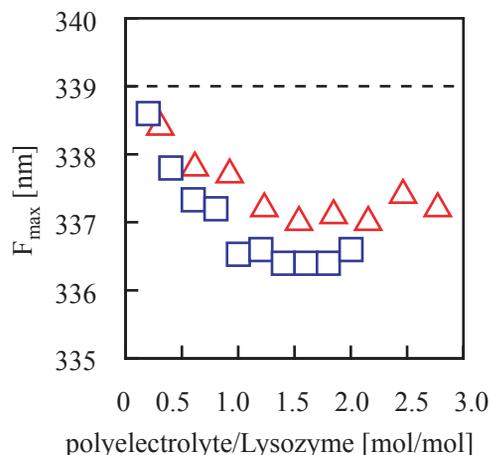


Fig.3 Changes in F_{max} of Native Lysozyme (.....), α -PLG/Lysozyme complex (Δ) and PAA/Lysozyme complex (\square) at pH 6.5 and 25°C

Lysozyme concentration : 0.01 g/dm³

Excited wavelength : 280 nm

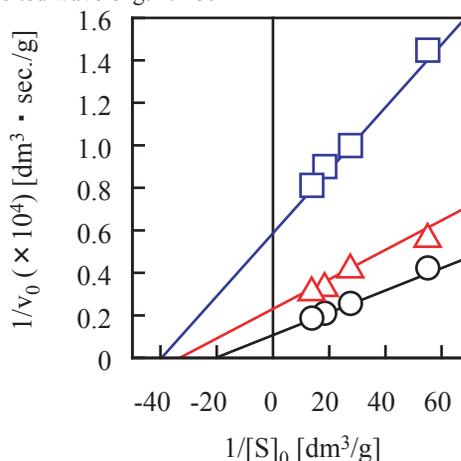


Fig.4 Lineweaver-Burk plots of Native Lysozyme (\circ), α -PLG/Lysozyme complex (Δ) and PAA/Lysozyme complex (\square) for *M.I.* as a substrate at pH 6.5 and 25°C

Lysozyme concentration : 0.01 g/dm³

M.I. concentration : 0.02 ~ 0.08 g/dm³

Table 1 Kinetic parameters of Native Lysozyme, α -PLG/Lysozyme complex and PAA/Lysozyme complex for *M.I.* at pH 6.5, 25°C

Lysozyme concentration : 0.01 g/dm³

M.I. concentration : 0.02 ~ 0.08 g/dm³

Sample	V_{max} ($\times 10^{-4}$) [g/dm ³ · sec.]	K_m ($\times 10^{-2}$) [g/dm ³]
Native Lysozyme	9.55 (100)	5.50
α -PLG/Lysozyme complex	4.44 (46)	2.73
PAA/Lysozyme complex	1.66 (17)	2.53

本講演会では、他の側鎖長の高分子電解質も用い、pH 4.1, 6.5のそれぞれにおける結果を発表する予定である。

【参考文献】

1) A.Tsuboi, T.Izumi, M.Hirata, J.Xia, P.L.Dubin and E.Kokufuta, *Langmuir*, 12, 6295-6303