

Trypsin Oligomer の調製およびその特性評価

日大生産工 (院) ○矢野 慎吾

日大生産工 高橋 大輔, 和泉 剛

【緒論】

神経変性疾患に関する最近の知見から発症の原因は構造異常を起こしたタンパク質(ミスフォールドタンパク質)の過剰な蓄積であるとの考え方が有力になってきている。このミスフォールドタンパク質の蓄積と神経変性との関連性においてユビキチン・プロテアソーム系が重要な役割を担っている。

まず、標的タンパク質に対し3つの酵素, ユビキチン活性化酵素(E1), ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ(E3)によってユビキチンの付加が行われる。さらに複数のユビキチンが付加し, ポリユビキチン鎖となる。そしてポリユビキチンがシグナル分子となり, 巨大なタンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームによって分解される。プロテアソームのタンパク質分解実行ユニットは 20S プロテアソームである。20S プロテアソームとは, 各々7種類のサブユニットがリング状に集まり α リングと β リングが $\alpha\beta\beta\alpha$ の順で会合した円筒型粒子である。そしてその触媒活性中心は β 1, β 2, β 5 にありそれぞれ酸性, 塩基性, 疎水性アミノ酸のカルボキシル基側のペプチド結合を切断する Caspase, Trypsin, Chymotrypsin 様活性を有する。

そこで, 本実験ではプロテアソームを模倣したタンパク質分解酵素複合体を形成することを目的とし, モデルタンパク質として Trypsin を選択した。そして二価性架橋試薬であるジメチルスベルイミデート二塩酸塩(DMS)による Trypsin Oligomer の調製を行った。さらに生成量の反応時間依存性および構造, 酵素活性に及ぼす DMS 添加量の影響について検討することを目的とした。

【実験方法】

Trypsin の架橋は, 以下のように行った。25mg のウシ膵臓由来 Trypsin(分子量 23,300)を 5cm³ のリン酸緩衝液(pH 10, $I=0.5M$)に溶解し濃度を 215 μ M とした。つぎに DMS を Trypsin に対し 2~8mol/mol になるように添加した。攪拌下において反応を 5~30 分間行い, DMS に対して 20 当量の 0.2M の酢酸アンモニウムを加えて停止させた¹⁾。

架橋による Oligomer 形成の確認はサイズ排除クロマトグラフィーにより行った。溶離液として酢酸緩衝液(pH 5.0, $I=0.1M$)を用いた。架橋反応後の Trypsin(Cross-linked Trypsin : 以下 C-Trypsin)は溶離液と同じ緩衝液で希釈し, 濃度 43M とした。調製した溶液を 0.22 μ m のシリンジフィルターに通した後, インジェクターに 100 μ l セットした。流速 0.20cm³/min, 温度 25 $^{\circ}$ C, UV 検出波長 280nm, 測定時間 90min の条件でクロマトグラフィーを行った。

Native および C-Trypsin の活性測定には基質として *N* α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide hydrochloride (BANA)を用いた。反応溶液中でそれぞれの Trypsin 濃度は 2 μ M, BANA は 100~300 μ M になるように調製した。溶媒として Tris-HCl(pH7.8, $I=0.1M$)緩衝液を用いた。そして温度 25 $^{\circ}$ C, 波長 410nm における吸光度を測定することにより *p*-ニトロアニリンの生成量を求め, 動力学定数を算出した。

架橋前後の Trypsin の構造について検討するため, 円二色性(CD)および蛍光スペクトル測定を行った。CD 測定は Native および C-Trypsin を 5 μ M になるように Tris-HCl 緩衝液(pH 7.8, $I=0.01M$)で調製し, 温度 25 $^{\circ}$ C, 波長 200~250nm で行った。蛍光測定は CD 測定時と同じ緩衝液

で 26 μ M になるように調製し、温度 25 $^{\circ}$ C、波長 250~500nm の範囲で蛍光スペクトル測定を行った。

【結果および考察】

架橋反応開始約 10 分後に試料が濁り始め、反応時間終了後、酢酸アンモニウムを添加した際にはさらに多くの白濁が見られた。Trypsin の等電点が 10.1~10.8 であることから、Oligomer の形成に伴う分子量の増加により溶解度が減少し不溶化したためと考えられる。反応終了後の試料は 0.22 μ m のシリンジフィルターにより不溶化した Oligomer を除去した。そして 280nm における吸光度測定により濃度を決定し種々の測定に用いた。

サイズ排除クロマトグラフィーの結果を Fig.1 に示した。Trypsin Monomer のピークである 48 分に対し、44 分に Oligomer のピークがみられた。架橋時間に伴い 30 分までは経時的に Oligomer の生成量は増加しその含有率は約 10% となったが、30 分以降は一定となった。以上のことから、約 30 分間で DMS を消費し Oligomer が形成されたことが明らかとなった。

活性測定の結果、DMS を過剰量となるように添加した場合、C-Trypsin の活性は反応時間に従って低下した。そして 30 分後には Native Trypsin の活性と比較して約 14% となった。しかし、モル比 2 となるよう添加した場合は Native Trypsin の活性に対し、 K_m (基質親和性)は増加し V_{max} は同等の値を示した(Fig.2)。一方、CD 測定の結果から架橋による二次構造変化はほとんどみられなかった。そのため過剰量の架橋試薬の添加はポリアミン型の化合物を生成し、活性を阻害すると考えられる。

蛍光測定の結果、反応時間に伴い蛍光極大波長(F_{max})はブルーシフトした(Fig.3)。これは Trypsin の架橋により Trp 残基が周辺の水分子から遮蔽されたためであると思われる。一方、レッドシフトがみられなかったため、変性は起こっていないことが示唆された。

【参考文献】

- 1) D.Wang, G.Wilson, and S.Moore, *Biochemistry*.660-665, (1976)

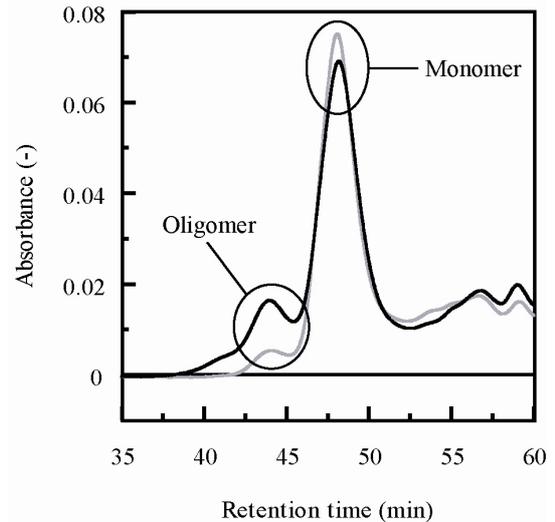


Fig.1 Elution pattern of Cross-linked Trypsin at various reaction time.
(—) 5min and (---) 30min.

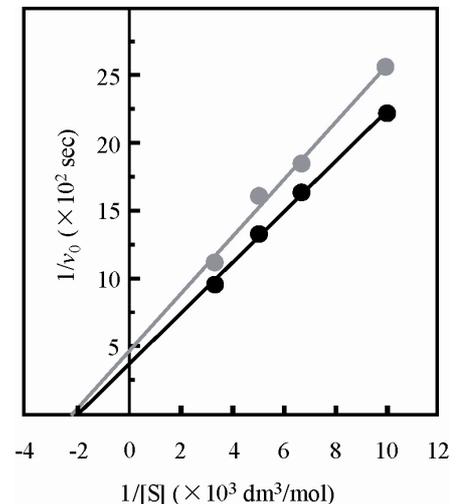


Fig.2 Lineweaver-Burk plots of (●) Native and (●) Cross-linked Trypsin.

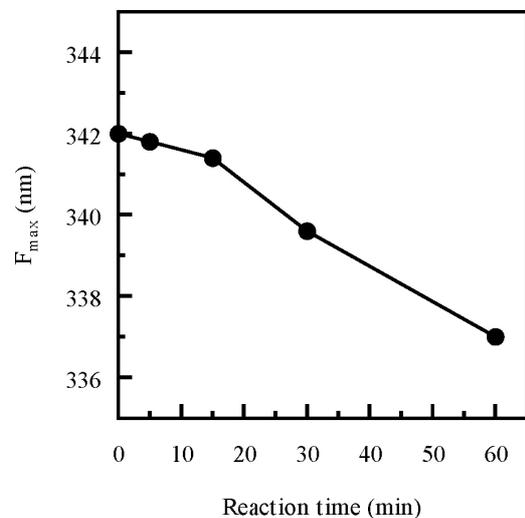


Fig.3 Changes in F_{max} of Cross-linked Trypsin with reaction time.