

1C12 蛋白質の構造と拡散係数の関係

(京大院理・化) ○永徳 文, 寺嶋 正秀

【序】

これまで多くの蛋白質について、構造変化に伴って拡散係数が大きく変化するという現象が確認されている。例えば Cytochrome c では Native 状態に比べて Unfold 状態では拡散係数は約半分になる。しかし、この劇的な拡散係数変化が何に由来するのか、という問題は明らかではない。例えば拡散係数と慣性半径の関係を見積もる経験式が提案され、多くの Native 状態の蛋白質がこの式に従うことを明らかにされている⁽¹⁾が、これは Unfold 状態、Molten Globule 状態といった構造変化には適用できない。これらの典型的な状態と拡散係数がどのような関係であるかを明らかにすることができれば、こうした相関を利用して拡散係数の観点から構造情報を得る事ができるであろう。こうした事が可能になれば、例えば CDなどを測定するのが困難である高圧条件下での構造についても、拡散係数という物理量から明らかにすることができると考えられ、有力な手法として用いられるであろう。

【方法】

溶液条件を変えることで、Native 状態 (β -sheet rich)、Non-native helical state (α -helix rich)、変性状態 (Unfold) という3状態を取ることが出来る β -Lactoglobulin について動的光散乱法 (DLS) を用いてそれぞれの状態の拡散係数を求めた。また、二次構造を調べるために、円二色性光度計で CD スペクトルを測定し、K2D などの解析ソフトウェアを用いて解析を行った。

【結果と考察】

動的光散乱法で得られる蛋白質溶液の自己相関関数は Fig.1 のようなものであった。一般的にはヒストグラム法や Contin 法を用いて有限個の拡散成分、或いは拡散係数の分散を求めるが、今回の場合、1つか2つの成分が拡散していると考えて解析式を立てること

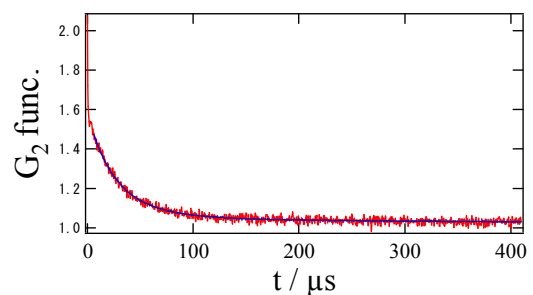


Fig.1 蛋白質溶液の DLS 信号

で十分な解析を得ることができた。

β -Lactoglobulin は Native 状態では β シートの多い (35%) 構造をしており、変性剤 (グアニジン塩酸塩, GdnHCl) 存在下では二次構造を失うが、トリフルオロエタノール (TFE) 存在下では α ヘリックスが大部分を占める構造になることが知られている⁽²⁾。まず拡散係数がどのように変性剤濃度に依存しているかを調べたところ、3 M 付近で二状態転移的に拡散係数が $10 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ から $6 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ (粘度補正後) にまで大きく変化することがわかった。ヘリックスの多い Cytochrome c のような場合には Native 状態に対して変性剤下 (GdnHCl) では拡散係数が約半分になることがわかっているが、シート構造が多いような場合であってもその傾向は同じであることがわかった。

一方、TFE の濃度変化に対しては、CD で二次構造を見ると二状態転移的にシート構造から α ヘリックス構造へと変化することが知られており、この詳細な量を調べるために CD スペクトルの解析を行った (Fig.2) これより、TFE を約 15% 入れると、二状態転移的に、シート構造が失われ、50-60% が α ヘリックス構造になることがわかった。

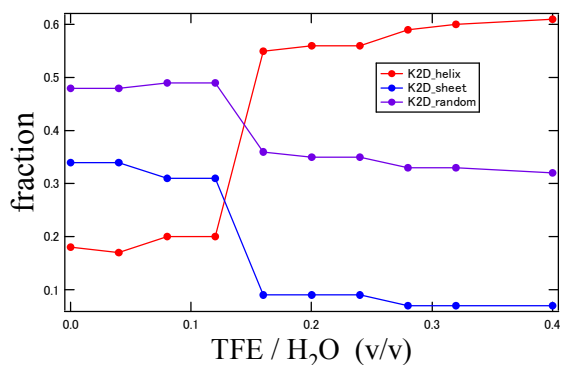


Fig.2 二次構造の TFE 依存性

TFE を入れた時の拡散係数の様子を調べたのが Fig.3 である。拡散係数が濃度に対してほぼ直線状に減少している。しかし TFE を加えることで、溶液の粘度が変化するので、この溶液粘度変化を補正する必要がある。ストークスアインシュタインの式に基づいて粘度補正した拡散係数を TFE に対してプロットしたものが Fig.4 である。

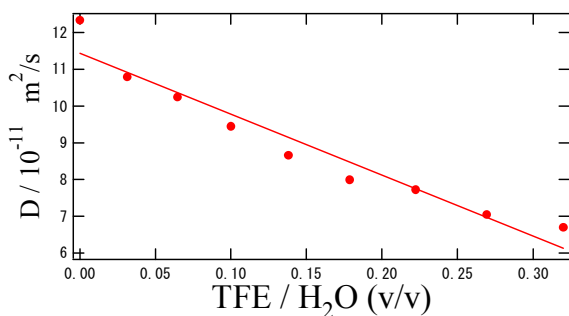


Fig 3 拡散係数の TFE 依存性

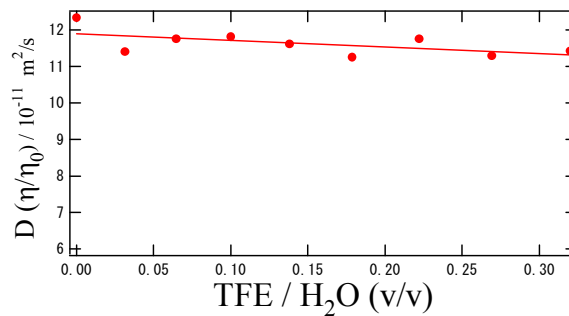


Fig. 4 粘度補正後の拡散係数

この結果からわかるように、拡散係数の直線状の減少は、ほぼ完全に粘度によるものであり、TFE 濃度を高くして β シート構造から α ヘリックス構造に変えても補正後の拡散係数は (わずかに小さくなるが) ほとんど変化しないことがわかった。

TFE の共溶媒の効果としては一般的には、蛋白質内部の水素結合を強くし、周囲の水分子の構造を壊し、内部にまで共溶媒分子が入り込んで選択的溶媒和をする、といったことが知られている。粘度補正した拡散係数がほとんど変わっていない点を見ると、TFE 下における Molten Globule と呼ばれる状態は、内部の水素結合が共溶媒によって強くなった結果、巨視的には Native 状態と同じくらいコンパクトな構造になっていると考えられる。

ほかにも、このようにヘリックス・シート・ランダム の 3 状態を取りうる例として、poly-L-lysine などがよく知られている。これらについても同様に調べることで、ヘリックス構造、シート構造、ランダム構造といった二次構造が拡散係数とどう関係しているかについて報告する予定である。

【参考文献】

- (1) Lizhong He, and Bernd Niemeyer. *Biotechnol. Prog.* (2003), **19**, 544-548
- (2) Hamada Daizo, and Goto Yuji. *J. Mol. Biol.* (1997), **269**, 479-487