

リゾチームの気液界面アンフォールディング現象の観測

(立命館 SLLS¹, JASRI SPring-8²)矢野 陽子¹, 宇留賀 朋哉², 谷田 肇², 豊川 秀訓², 高垣 昌史², 寺田 靖子²

タンパク質は、水中では疎水性のアミノ酸残基を内側に、親水基を外側に向けた構造をとることから、気液界面では疎水基を気相側に向けた構造に変性することが予測される。よって、タンパク質の気液界面への吸着過程での構造変化をリアルタイムで観測することができれば、新しい角度からフォールディング機構の解明を目指すことができると思われる。本研究では球状タンパク質リゾチームの気液界面吸着過程を X 線反射率測定によって追跡した。

INTRODUCTION

タンパク質の立体構造はその機能と密接な関係がある。そのため、現在、結晶構造解析が精力的に行われている。それゆえタンパク質の折り畳み(フォールディング)機構を研究することは、立体構造を予測するための大きな手助けとなる。現在フォールディング機構の研究はそのほとんどが溶液中で行われているが、本研究では、タンパク質が気液界面でアンフォールドすることに着目し、何故アンフォールドするのかを明らかにすることによってフォールディング機構の解明に迫る。

1. タンパク質の界面吸着

タンパク質の気液界面への吸着過程は、動的表面張力の測定により、かなり古くから観測されてきた。その結果、表面張力が平衡状態に到達するまでの時間は、タンパク質によって様々であり、数秒から数日に渡ることがわかってきた。ところが、吸着速度は、タンパク質の溶液内における拡散速度によって支配されているというわけではない。図1は同じ濃度(混合後の濃度は0.07mM)の球状の3つのタンパク質(LSZ: lysozyme, BSA: bovine serum albumin, β -LG: β -lactogloblin)の表面圧の変化を示したものであるが、分子量の一番小さなリゾチームが、

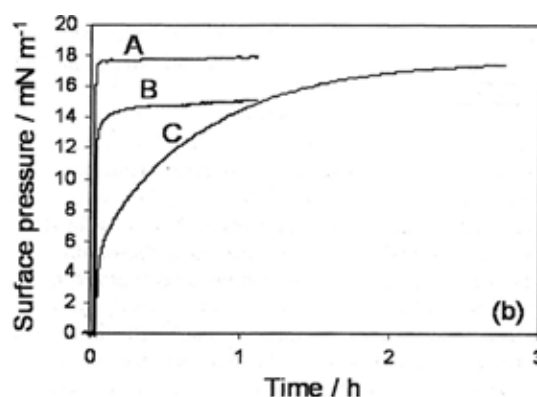


図1 表面圧の時間変化[1]

 β -LG (A), BSA(B), LSZ(C)

最も吸着速度が遅い結果となっている¹。

近年、分光法により、界面にいるタンパク質のコンフォメーションを知ることができるようになってきた。2006年にLadらは、全反射IR測定の結果、図1のLSZはヘリックスの大部分がシートに変化したアンフォールド状態にあるのに対し、BSAと β -LGはネイティブの状態のままであることを示した¹。一方、同じく2006年にWierengらはelipsometry測定の結果、 β -LGの濃度を低濃度にするると吸着速度が遅くなること、表面圧の値とelipsometryから求めた吸着量が濃度によって異なることから、低濃度では β -LGもアンフォールドしていることを示し、タンパク質が界面でアンフォールドする

かどうかは、吸着速度とアンフォールド速度の兼ね合いで決まるだろうと結論付けている²。

II. X線反射率測定

X線反射率(XR)測定は、X線を界面すれすれに入射することで、界面への侵入深さをせいぜい数ナノメートルとし、反射X線強度の入射角依存性から界面深さ方向の構造情報を得る手法である。AFMなどの界面構造解析法が表面一層のみの構造情報しか得られないのに対し、深さ方向の密度分布すなわち - 埋もれた界面 - の構造を知ることができるのが最大のメリットである。我々はこの測定法により、アルコール水溶液の気液界面についての研究を行い、液体表面と液体内部の構造には密接な相関があることを見出した^{3,4}。すなわち両親媒性分子であるアルコールは、濃度および温度に応じて水中で様々な会合体を形成するが、転移点では溶液表面の構造も変化しており、表面の構造を観測することが、バルクの溶液構造研究のいわゆる聴診器の役目をするようになるのである。この考えに基づき、これまで溶液内で観測されていたタンパク質のフォールディング機構を液体表面への吸着過程を観測することによって探ろうというのが本研究の目的である。タンパク質が気液界面に吸着し、表面圧が平衡値に達するのに数分から数時間かかるため、その間の構造変化を時分割XR測定で追跡する。

EXPERIMENTAL METHOD

実験は、SPring-8、BL37XUの溶液界面反射率計を用いて行った。ラングミュアトラフに入れたpH7.0のリン酸緩衝溶液にリゾチーム水溶液をピペットを用いて注入し、注入後の表面圧とXRプロファイルの変化を同時に時分割測定した。

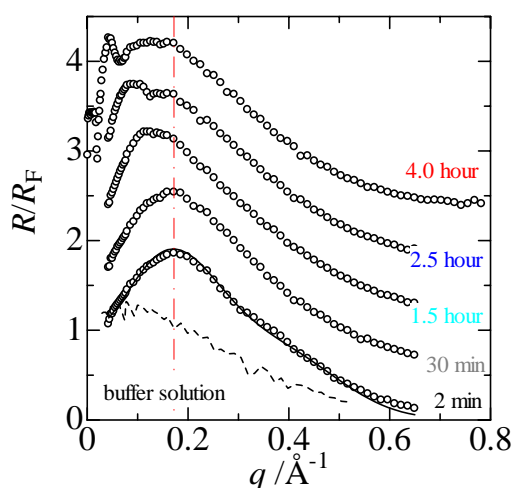


図2 気液界面に吸着したリゾチームのX線反射率

RESULTS & DISCUSSION

図2はX線反射率プロファイルの時間変化である。吸着過程において大きく変化していることがわかる。ここから引き出される構造変化については当日議論する。

¹ M. D. Lad, F. Birembaut, J. M. Matthew, R. A. Frazier and R. J. Green, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 2179-2186 (2006)

² P.A. Wierenga, M. R. Egmond, A.G.J. Voragen, H. H.J. de Jongh, *J. Colloid Interface Sci.*, **299**, 850-857 (2006).

³ Yohko F. Yano, *J. Chem. Phys.*, **116**, 8093-8096 (2002).

⁴ Y. F. Yano, *J. Colloid Interface Sci.*, **284**, 255 (2005).