

中性子散乱および動的光散乱による β -ラクトグロブリンの構造と運動に対するアルコールの影響

(福岡大理*, 東大物性研**) 吉田 亨次*, 山口 敏男*, 遠藤 仁**, 柴山 充弘**

【序】多くのタンパク質は変性すると会合し、一部はゲル化する。これまでに、タンパク質の熱変性や圧力変性に伴う会合やゲル化は広く研究されているが、共溶媒の効果による会合やゲル化は比較的知られていない。発表者らは、モノマー状態のペプチドやタンパク質のアルコール添加による α -ヘリックス構造安定化の機構を分子動力学法などにより明らかにしてきた[1, 2]。本研究はその延長線上に位置し、タンパク質分子同士の相互作用に対するアルコール添加効果を調べた。

β -ラクトグロブリン (β -LG) は、熱・圧力・アルコール添加により変性し、ゲル化することが知られている[3]。タンパク質の変性から会合に至る過程を研究することは、プリオン病の原因となるアミロイド線維形成の機構を調べる上で有用である。

本研究では、 β -LG の構造とダイナミクスに対するアルコール濃度依存性を円二色性測定 (CD)、中性子小角散乱 (SANS)、中性子スピンエコー (NSE)、動的光散乱 (DLS) によって明らかにした。中性子と光を相補的に用いることにより、異なる時空間スケールの情報を得た。

【実験】中性子散乱実験では、重水中での凍結乾燥により、 β -LG の置換可能な水素を重水素に置換した。そして、エタノール-水およびトリフルオロエタノール (TFE)-水混合溶媒に溶解した。 β -LG 濃度は 10 および 20 mg/ml である。いずれの溶液についても重水素化塩化水素を 100 mM 添加した。動的光散乱実験では、試料は 0.2 ミクロンのフィルターでろ過を行った。1 分ごとの時分割測定を行った。

【結果および考察】図 1 にエタノール濃度を変化させた SANS プロファイルを示した。エタノール濃度が 20 体積%までは β -LG はモノマーで存在しているが、ゲル化が生じる 30 体積%を超えると β -LG は会合していることが示された。これは、円二色性スペクトルから調べられた、アルコール-水混合溶媒中で β -LG の二次構造が α -ヘリックスを多く含んだ構造に変化するエタノール組成と一致

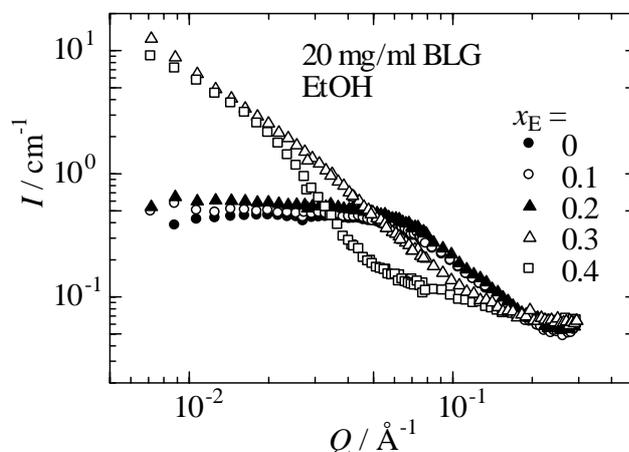


図 1 . エタノール水溶液中の β -LG の中性子小角散乱曲線

した[4]。また、TFE についても同様に、TFE10 体積%までは β -LG はモノマーで存在しているが、20 体積%を超えると β -LG は会合し、会合状態と二次構造変化の間でよい相関が得られた。ゲル化した後のプロファイルはエタノール、TFE 系ともほぼ同じで、アルコール種類によらず似た構造をしていることがわかった。

次にモノマー状態における、 β -LG の拡散係数を NSE および DLS から求めた。NSE の中間散乱関数、および DLS の散乱強度の時間相関関数を図 2 に示した。緩和速度から計算された β -LG の拡散係数は純水、TFE 水溶液(10 体積%)、エタノール水溶液(20 体積%)中での順で小さくなり、溶液の粘度と逆の相関があった。そして、Stokes-Einstein の関係式を用いて、Stokes 半径を求めた。DLS から得られた Stokes 半径はアルコールの種類と濃度によらず、一定であったが、一方、NSE から得られた Stokes 半径は、アルコール中のほうが水中よりも 10%程度大きな値を示した。これらのアルコール濃度では純粋中に比べ、 α -ヘリックス構造の割合が増加しているため、 β -LG 構成原子の運動が水中に比べ遅くなっていると考えられる。

さらにアルコールを添加し、ゲル化が生じるアルコール組成では、 β -LG の運動は急激に遅くなった。これはゲル化すると強固な β -LG のネットワーク構造が形成されることを示している。

熱変性によるゲル化と同様にゲル化点では散乱強度の急激な増大(非エルゴード成分の出現)が顕著に見られ、熱揺らぎ(動的揺らぎ)と、構造の不均一性に伴う静的揺らぎが生じていることがわかった。時分割 DLS 測定から、アルコール変性ゲルのゲル化時間は β -LG の濃度、アルコールの疎水基の大きさ(=ヘリックス構造の安定化効果の大きさ)および、アルコール濃度に大きく影響を受けることが示された。熱変性ゲルに比べて、ほとんどのアルコール変性ゲルは短時間で低い β -LG 濃度で形成されることが明らかになった。

[1] K.Yoshida, et al., Chem. Phys. Lett. **412**, 280 (2005). [2] K. Yoshida, et al., Pure Appl. Chem. **80**, 1337 (2008). [3] S. Takata, et al., Macromolecules **33**, 5470 (2000). [4] D. Hong, et al., J. Am. Chem. Soc. **121**, 8427 (1999).

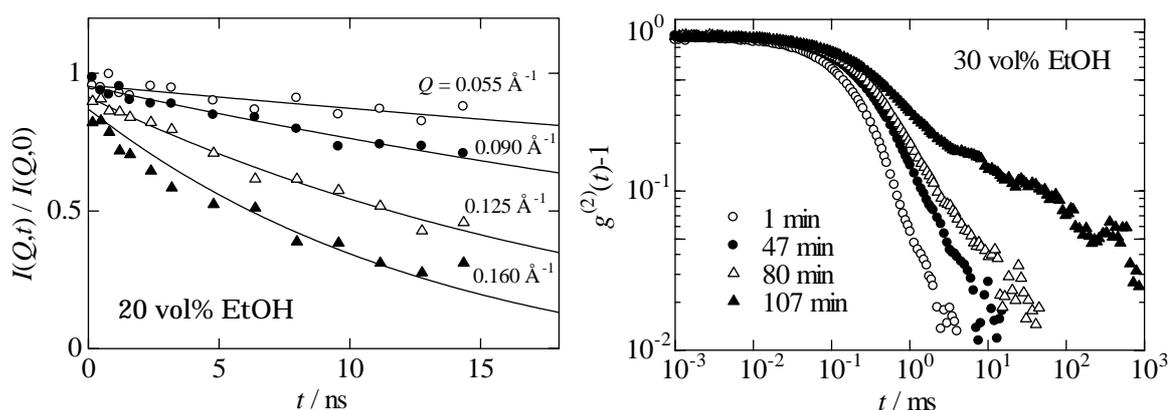


図 2 . NSE 測定(左)および DLS 測定(右)から得られた β -LG のエタノール水溶液の中間散乱関数(左)と散乱強度の時間相関関数(右)