

β -ラクトグロブリンの会合状態に対するアルコールの影響

(福岡大理) 吉田亨次・山口敏男

Alcohol effect on aggregation of β -lactoglobulin

(Fukuoka University) Koji Yoshida, Toshio Yamaguchi

【はじめに】 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]。本研究では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に着目した。

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。Table 1 は β -LG 溶液 (20 mg/mL) に関するアルコール誘起ゲル形成の結果である。アルコールの疎水基が大きくなると、より低アルコール濃度でゲルが形成された。これは、低濃度(~ 0.1 mg/mL)の β -LG 溶液における円二色性測定 (CD) と良い相関がある。すなわち、ゲル形成が生じるアルコール濃度は α -ヘリックス構造が安定化するアルコール濃度とほぼ一致した[4]。しかし、疎水性の高いアルコールでは、CD 測定によると α -ヘリックス構造が安定化しているにもかかわらず、高アルコール濃度でゲルは生じない。本研究では、 β -LG のアルコール添加による会合機構を調べるために、 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中性子小角散乱 (SANS)、動的光散乱(DLS)、円二色性測定 (CD)、中性子準弾性散乱(QENS)によって明らかにした。

【実験】 β -ラクトグロブリンは SIGMA-ALDRICH から購入した。中性子散乱実験では重水中で凍結乾燥を繰り返すことにより、置換可能な水素原子を重水素原子に置換した。 β -LG 粉末をエタノールおよび TFE と水との混合溶液 (中性子散乱実験では全て重水素化溶媒) に溶解したものを試料とした。

SANS 測定 SANS-U (東大物性研) を使用した。厚さ 2 mm の石英製の平板セルに試料を封入し、 Q 範囲 $0.007 - 0.3 \text{ \AA}^{-1}$ で測定した。

Table 1. Alcohol-induced gelation of β -Lg as a function of alcohol concentration (vol%) for various alcohols. The circles indicate gel formation and the triangles viscous solutions.

vol%	10	20	30	40	50	60	70	80
methanol	-	-	-	○	○	○	○	○
ethanol	-	-	○	○	○	-	-	-
1-propanol	-	○	△	-	-	-	-	-
TFE	-	○	△	-	-	-	-	-

DLS 測定 22 mW の He-Ne レーザーを使い、ALV 社のゴニオシステムを使用した。試料は 0.2 μm のフィルターでろ過を行った。

CD 測定 J-805 (日本分光)を使用した。石英セルの光路長は 50 μm とした。

QENS 測定 飛行時間型分光器 (NEAT; ベルリンヘルムホルツセンター) を使用した。光路長 1 mm の二重円筒形のアリミニウムセルに試料を封入した。Q 範囲は 0.5-2.3 \AA^{-1} 、エネルギー分解能はバナジウム板の測定から ~100 μeV であった。

【結果】 Fig. 1 にエタノール濃度を変化させた β -LG の SANS プロファイルを示した。エタノール濃度が 20 vol% 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 vol% を超えると小角領域の散乱強度がべき関数で増大した。フラクタル次元は 1.4 であり、 β -LG ゲルは 2 次元の網目構造をしていることが示唆される。TFE についても同様に、TFE 10vol% までは β -LG はモノマーで存在しているが、20 vol% を超えると β -LG は会合した。ゲル化した後の SANS プロファイルはエタノール、TFE 系ともにほぼ同じで、アルコールの種類によらず似た構造をしていることがわかった。ゲルが生じない高 TFE 濃度 (> 40 vol%) では、散乱プロファイルはモノマー状態のものとは一致せず、網目構造とは異なる別の会合体が形成されていることがわかった。

DLS 測定では、ゲル化点で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。また、強度時間相関関数は 2 種類の時定数が異なる緩和関数の重ね合わせで表わされ、そのうち速い成分の時定数は 0.50 ms (ゲル試料)、0.05 ms (非ゲル試料) であった。

β -LG ゲル (10 mg/mL) の CD 測定は β -LG が β -シート構造を取っていることを示した。つまり、 β -LG はアルコール添加により、一旦、 α -ヘリックス構造が形成されるが、 β -LG が高濃度の場合には、 β -シート構造に転移し β -LG 同士が会合するというゲル化機構が示唆される。疎水性の高いアルコールが高濃度で存在すると α -ヘリックス構造が安定化し、 β -シート構造への転移が生じにくいため、 β -LG の網目構造が形成しないと考えられる。

QENS 測定では、分光器のエネルギー分解能を考慮すると、タンパク質内部の水素原子の運動が反映されていると考えられる。elastic incoherent structure factor の Q 依存性から、水素原子の運動半径は純水中の $2.1 \pm 0.2 \text{\AA}$ から 20 vol% TFE 中の $3.5 \pm 0.8 \text{\AA}$ に増加した。このことは、タンパク質が会合するとき、部分的にアンフォールドした molten globule 状態にあることを示唆している。

[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).

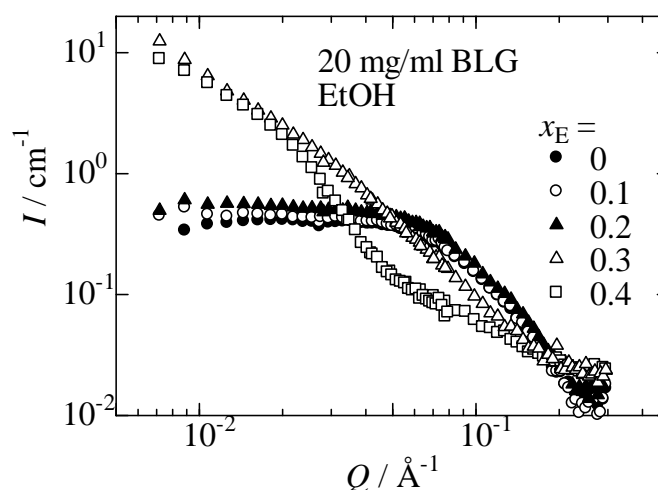


Fig. 1. SANS profiles of β -LG in ethanol-water mixtures at various ethanol mole fractions.