

4P071

ミオグロビンの 2 状態転移に対する
ポリエチレングリコールの分子量特異的吸着とその効果
(九大院理) ○安富 翔太, 迫田 憲治, 関谷 博

The effect of molecular-weight dependent adsorption of polyethylene glycol
on two-state transition of myoglobin

(Kyushu Univ.) ○Shota Yasutomi, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya

【諸言】

ミオグロビン(Mb)は、初めて立体構造が解明されたタンパク質として有名である。Mb 中に存在するヘムはポルフィリンの鉄錯体であり、酸素分子はヘム中の鉄に結合することができる。これまで、ヘムに対する酸素分子の結合やそれが引き起こすタンパク質の構造変化などが詳しく調べられてきた。

タンパク質の X 線立体構造解析を行うには、タンパク質の結晶が必要となる。ポリエチレングリコール (PEG) はタンパク質の結晶を得るための沈殿剤としてよく利用されている。また、工業的にタンパク質を大量に発現させた場合、しばしば不活性の凝集体が混入する。PEG は変性したタンパク質を天然構造に再生させるためのリフォールディング剤としても利用されている。このように PEG はタンパク質に対する添加剤として様々な用途で用いられてきたが、実際に PEG を添加剤として使用する際には、適切な分子量の選択などに多くの時間を要し、期待通りの効果が得られないことも多い。PEG を添加剤として効果的に利用するには、PEG がタンパク質の立体構造安定性に与える効果と分子量の関係性を理解することが必要不可欠である。そこで本研究では、Mb の天然状態と変性状態間の 2 状態転移に対する PEG の添加効果とその分子量依存性に関して研究を行った。

【実験手法】

Mb 2.0 mg/ml, PEG 0~16.0 mg/ml の 9 種類の溶液を調整し、Mb の 409.4 nm における吸光度の温度変化を測定することで各溶液における Mb の転移温度曲線を測定した。PEG の分子量には、6000, 10000, 20000, 35000 の 4 種類を用いた。

【結果及び考察】

各溶液における Mb の転移温度曲線を測定すると、Mb 溶液は 81°C 付近で 1 段階の転移を示すのに対して、分子量 6000 もしくは 10000 の PEG を添加した溶液では 2 段階の転移が見られた (図 1)。一方で、分子量 20000 もしくは 35000 の PEG を添加した溶液における転移温度曲線は、Mb 溶液のものと非常に類似しており、81°C 付近で 1 段階の転移を示した (図 2)。図 1 の実験データに対して天然状態と変性状態の間の 2 状態転移を仮定して解析を行うと、高温側に観測される 2 段階目の転移温度 T_{m2} は、

Mb 溶液での転移温度とほぼ一致することがわかった(図3). よって, T_{m2} はフリーの Mb (PEG が吸着していない Mb) の構造転移に対応すると考えられる. 一方, 1 段階目の転移温度 T_{m1} は, PEG の濃度に依存して変化することが分かった. 図4に示されるように, T_{m1} を PEG の濃度に対してプロットすると以下の式で再現できることが分かった.

$$T_{m1} = T_m + B_{\max} K_A [\text{PEG}] / (1 + K_A [\text{PEG}]) \quad (1)$$

ここで, K_A は Mb と PEG の結合定数, B_{\max} は PEG の吸着率を転移温度変化に変換する係数, $[\text{PEG}]$ は PEG の濃度である. 式(1)の右辺第2項はラングミュア型の吸着式と同じ形をしている. 図4の実験データがラングミュア型の吸着式によって上手く説明できることから, 1 段階目の転移は, PEG が Mb に吸着することによって引き起こされると考えられる.

PEG 6000, 10000 を添加したときには Mb が 2 段階で構造転移したこと, および T_{m1} , T_{m2} はそれぞれ PEG が吸着した Mb, フリーの Mb の変性温度を表していることから, Mb と PEG の挙動は次のように考えられる. まず, T_{m1} 以下の温度においては Mb の変性はまだ起こらず, 天然状態の Mb が PEG と吸脱着の平衡にある. 一方 T_{m2} 以上の温度では変性状態の Mb が PEG と吸着平衡にある. $T_{m1} < T < T_{m2}$ の温度範囲では, PEG が Mb に吸着すると Mb は変性するが, PEG が脱着すると再び適切な立体構造に自発的に折り畳まれると考えられる. よって, Mb に対する PEG の吸脱着と Mb の構造転移は相互に関連しており, 動的な平衡状態にあることがわかった.

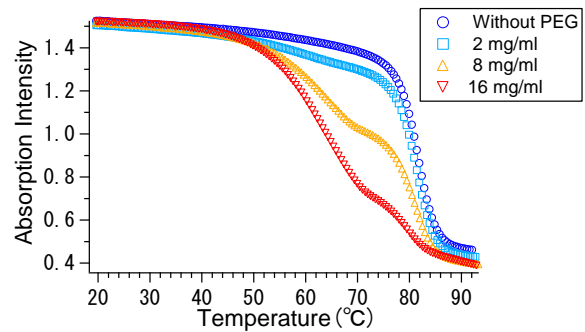


図1. Mb+PEG 6000 溶液の転移温度曲線

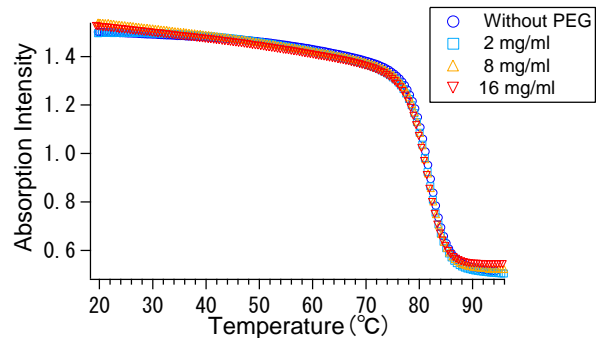


図2. Mb+PEG 20000 溶液の転移温度曲線

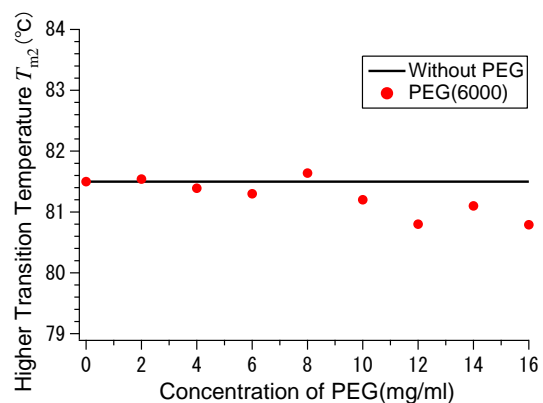


図3. Mb+PEG 6000 溶液の転移温度 T_{m2}

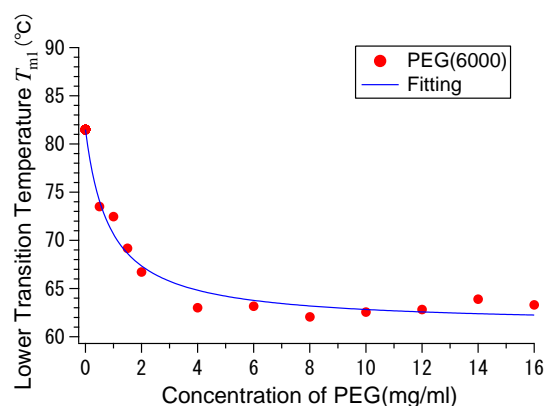


図4. Mb+PEG 6000 溶液の転移温度 T_{m1}