

1P027

広帯域分光による水/ジメチルスルホキシド二成分液体中における
タンパク質の構造安定性

(神戸大院理*、神戸大分子フォト**)

○飯沼美紀*、山本直樹*、太田薫**、茶谷絵理*、富永圭介***

Structure stability of protein in water/DMSO binary mixtures studied by
broadband dielectric and vibrational spectroscopy

(Graduate School of Science* and Molecular Photoscience Research Center**, Kobe Univ.)

○Miki Inuma*, Naoki Yamamoto*, Kaoru Ohta**, Eri Chatani*, Keisuke Tominaga***

【序】タンパク質は、大別すると親水基と疎水基を持ち、タンパク質周辺の環境とこれらの官能基間の相互作用により、その構造安定性が決まる。二成分液体中では、構成分子によりタンパク質への親和性が異なるため、一方の液体分子がタンパク質に対して選択的な溶媒和を起こす。そのため、二成分液体は溶媒が与えるタンパク質の構造安定性への影響を、分子論的な視点でとらえるモデルとして注目され、熱力学的測定や分光学的測定など多くの研究が行われてきた。

タンパク質水溶液にジメチルスルホキシド(DMSO)を添加すると、溶媒となる水/DMSO 二成分液体の組成比の変化に伴い、タンパク質の構造安定性が変化することが知られる。モデルタンパク質としてリゾチームを用いた分光測定より、溶媒中の DMSO 組成比の増加に伴い、リゾチームが天然状態、中間状態、変性状態の順に変化すると考えられている[1]。また、熱力学的測定より、DMSO 分子が水分子との強い相互作用により、リゾチームと水分子との相互作用を阻害することで間接的に変性を引き起こしているという機構が提唱されている[2]。さらに、理論計算より、DMSO 低濃度領域では、DMSO 分子がリゾチームに選択的に結合していると考えられている[3]。

本研究では、二成分液体中におけるタンパク質の構造安定性の変化について、分子レベルでの機構を明らかにすることを目的とし、二成分液体(水/DMSO)とタンパク質溶液(水/DMSO/リゾチーム)に対してそれぞれ広帯域での分光測定を行った。

【実験】試料として、二成分液体とタンパク質溶液を調整した。まず、二成分液体についてその組成比を変化させ、詳細な分光測定を行うことで、水分子と DMSO 分子の持つバンドの同定や、二成分液体単独の性質の研究を行った。その後タンパク質溶液の測定を行い、観測される二成分液体とタンパク質溶液とのスペクトル変化から、タンパク質の構造安定性の変化とその機構について議論した。

二成分液体に対しては、200 MHz から 4000 cm^{-1} の領域で分光測定を行った。また、タンパク質溶液に対しては、30 cm^{-1} から 4000 cm^{-1} の領域と 310 nm から 260 nm の領域で分光測定を行った。

上記の領域において、それぞれ 200 MHz から 20 GHz のマイクロ波領域では、ネットワークアナライザーを用いた誘電緩和測定を行った。1 cm^{-1} から 20 cm^{-1} のサブテラヘルツ領域と、7 cm^{-1} から 100 cm^{-1} のテラヘルツ領域では、時間領域分光測定を行った。30 cm^{-1} から 700 cm^{-1} の遠赤外領域では透過型 FT-IR 測定を、500 cm^{-1} から 4000 cm^{-1} の中赤外領域では減衰全反射法(ATR法)による FT-IR 測定を行った。310 nm から 260 nm の近紫外領域では円偏光二色性測定を行った。

タンパク質の構造安定性の変化については、水/DMSO/リゾチーム三成分液体の近紫外領域円偏光二色性スペクトルと、中赤外領域アミド I バンド(タンパク質のペプチド結合における CO 伸

縮振動バンド) から推測する。

【結果と考察】水/DMSO 二成分液体中におけるタンパク質の構造安定性の変化の機構については、水分子と DMSO 分子が持つ固有の振動バンドの変化から推測した。図 1 に水/DMSO 二成分液体の DMSO 分子の SO 伸縮振動バンドを示す。DMSO モル分率(X_{DMSO})が変化すると、スペクトル形状が大きく変化する。 X_{DMSO} が小さいときは 1015 cm^{-1} 付近にバンドを示すが、 X_{DMSO} の増加に伴い、高波数側 ($1025 \text{ cm}^{-1} \sim 1065 \text{ cm}^{-1}$) にバンド構造が観測される。これは、低濃度では DMSO が水分子に溶媒和されているが、濃度増加により DMSO が会合しスルフィニル基周辺の微視的な環境に分布が生じるためであると考えられる。水/DMSO

二成分液体中にタンパク質を溶解すると、この SO 伸縮振動バンドが変化することを見出した。例えば、 $X_{\text{DMSO}} = 0.15$ のとき、振動バンドはタンパク質の濃度の増加により低波数側の強度が減少した。一方、 $X_{\text{DMSO}} = 0.45$ のときは、逆に高波数側の強度が減少した (図 2)。この現象を、リゾチームを溶かすことにより親水性環境下にあるスルフィニル基と疎水性環境下にあるスルフィニル基の比率が変化するために生じると考え、以下の解析を行った。まず、リゾチームの存在しない二成分液体系で、各 X_{DMSO} での SO 伸縮振動バンドを複数のガウス関数の和で解析し、その中で X_{DMSO} の増加に伴い減少するバンドを「親水性バンド(*phob*)」、増加するバンドを「疎水性バンド(*phil*)」とした。すなわち、振動バンドを

$$I^{SO}(\nu) = A_{\text{phil}} \cdot I_{\text{phil}}^{SO}(\nu) + A_{\text{phob}} \cdot I_{\text{phob}}^{SO}(\nu) \dots(1)$$

と表す。次に各溶媒でのリゾチーム濃度増加に伴う親水性バンドと疎水性バンドの強度 (A_{phil} と A_{phob}) の変化を調べ、その比を求めた (図 3)。DMSO 低濃度領域と高濃度領域で、リゾチームの添加に伴う、疎水性雰囲気下にある DMSO と親水性雰囲気下にあるその比の変化が逆であることがわかる。以上の結果から、DMSO 低濃度領域では水分子がリゾチームに選択的に結合しており、DMSO 高濃度領域では DMSO 分子がリゾチームに選択的に結合しているということが一つの可能性として考えられるが、発表では、他領域の測定結果も併せて、二成分液体中におけるタンパク質の構造安定性についてその変化と機構を詳細に議論する。

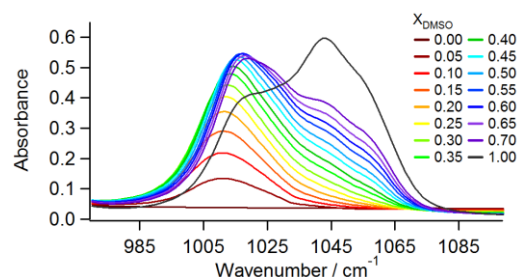


図 1. 水/DMSO 二成分液体の SO 伸縮振動バンド。

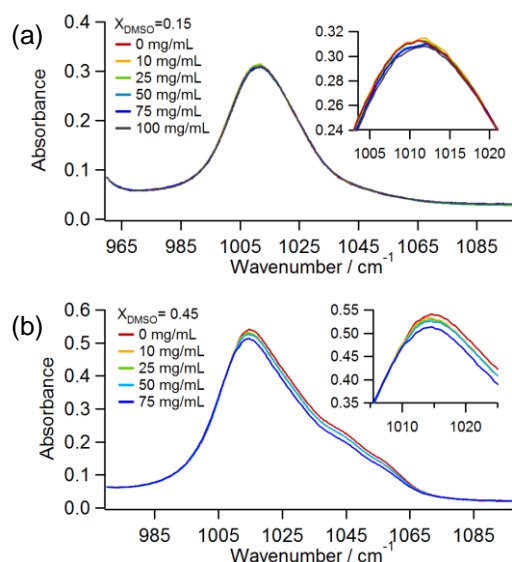


図 2. リゾチーム増加に伴う SO 伸縮振動バンドのシフト。(a) $X_{\text{DMSO}} = 0.15$ の場合、(b) $X_{\text{DMSO}} = 0.45$ の場合。挿入図はピーク付近の拡大図。

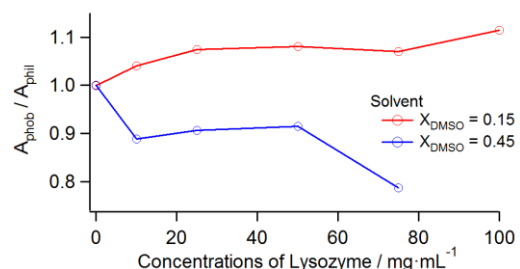


図 3. リゾチーム増加に伴う親水性バンドと疎水性バンドの強度変化の比。

[1] S. Bhattacharjya, P. Balaram, *PROTEINS*, **29**, 492 (1997).

[2] T. Kamiyama, H. L. Liu, T. Kimura, *J. Therm. Anal. Cal.*, **95**, 353 (2009).

[3] S. Roy, B. Jana, B. Bagchi, *J. Chem. Phys.*, **136**, 115103 (2012).