

2P104

リボヌクレアーゼ A の安定性に対する電解質と分子混み合いの複合効果

(九大院理¹, 大阪市大院理²) ○大内仁¹, 関谷博¹, 迫田憲治²

The synergetic effect of adding electrolytes and molecular crowders on the stability of ribonuclease A

(Kyushu Univ.¹, Osaka City Univ.²)○Hitoshi Ouchi¹, Hiroshi Sekiya¹, Kenji Sakota²

【序】溶液中のタンパク質の安定性については、過去に多くの研究が報告されているが、それらの多くは、水溶液中または希薄な緩衝溶液中に低濃度のタンパク質が溶存した条件で行われている。しかし、実際にタンパク質が機能を発現する細胞内に目を向けると、タンパク質の他にも非常に多くの天然高分子が共存しており、その周囲には電荷を帯びた電解質が存在している。これらの溶存物質がタンパク質に対して与える影響について理解することは、生理環境におけるタンパク質の安定性のメカニズムを知る上で重要な課題の1つである。

タンパク質水溶液に対する電解質の影響については、古くからホフマイスター系列が知られている。タンパク質を塩析させる能力の大きな塩はコスモトロープと呼ばれ、逆にタンパク質を塩溶させる能力の大きな塩はカオトロープと呼ばれている。ホフマイスター系列はタンパク質の安定性に対する電解質の添加効果の系列として見出されたが、その後の研究によって、溶質分子が示す様々な物性や機能の変化に対しても同様の系列が成り立つことが明らかにされている。一方、高分子が高濃度に存在する溶液中では、生化学反応の速度や平衡に大きな変化が見られることがあり、この現象は分子混み合い効果として知られている。この分子混み合い効果に注目してタンパク質の安定性を調査した研究も近年行われるようになってきている。

生理環境にあるタンパク質は、電解質と混み合い分子が共存する溶液中に存在している。このような系におけるタンパク質の安定性は、電解質と混み合い分子の両者から影響を受けていることが予想される。しかしながら、タンパク質の安定性に対して、電解質と混み合い分子がそれぞれ独立に効果を及ぼすのか、あるいは両者が複合的に効果を及ぼすのかに関しては未だ解明されていない部分が多い。そこで、本研究ではリボヌクレアーゼ A (RNaseA) の水溶液に対する塩および混み合い分子の添加効果を調査し、両者の複合効果に注目して研究を行った。

【実験】286 nm における RNaseA 水溶液の吸光度を測定しながら温度を変化させると、構造転移温度において吸光度が減少する。このことを利用して、RNaseA 水溶液に混み合い分子 (ポリエチレングリコール[PEG]), NaF, NaCl, および NaSCN を添加したときの構造転移温度を測定した。

【結果と考察】RNaseA 水溶液の吸光度の温度変化の測定から転移温度曲線を作成し、天然-変性状態間の 2 状態転移モデルを適用して解析を行ったところ、63.5°C で構造転移が観測された (図 1)。この 63.5°C を基準に、塩および PEG を添加したときの転移温度変化 ΔT を求めた。

まず、RNaseA 水溶液の構造転移温度に対する塩および PEG 単体での添加効果を調べた。コスモトロープの NaF, カオトロープの NaSCN, ホフマイスター系列の中間付近に位置する NaCl の 3 種類の塩を添加した結果、塩の種類によって ΔT が大きく変化したが (図 2 の白抜きのプロット), PEG については分子量と添加濃度を変化させても転移温度はほとんど変化しなかった。次に、分子量 10000 の PEG を 100 mg/mL 添加した RNaseA 水溶液において、NaF, NaCl, NaSCN の

添加濃度を変化させることで、塩と混み合い分子が共存する場合について調査した。RNaseA 水溶液に PEG のみを加えても転移温度はほとんど変化しないにもかかわらず、PEG の有無によって、RNaseA の転移温度に対する塩の添加効果に変化が現れた (図 2)。このことは、電解質と混み合い分子が RNaseA の安定性に対して複合的に効果を及ぼしていることを表している。

ここで、電解質の添加と分子混み合いの複合効果について考察するため、ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM) 水溶液に関する先行研究との比較を行う[1]。PNIPAM は溶液中でランダムコイル-グロビュール転移を起こすため、タンパク質の構造転移モデルの 1 つとして扱われており、PNIPAM 水溶液の転移温度変化はラングミュア型吸着式に線形項を加えた式で再現できることが明らかにされている。これと同じ以下の式(1)で、図 2 のプロットがよく再現できることが分かった (図 2 の実線および点線)。

$$\Delta T = m[M] + B_{\max}K_D[M]/(1 + K_D[M]) \quad (1)$$

[M]は塩濃度、 m は塩の水和エントロピーに依存する係数、 B_{\max} は塩の吸着率を転移温度変化に変換する係数、 K_D は RNaseA と塩の解離定数である。右辺の第一項は線形項、第二項は非線形項でラングミュア型の吸着式と同じ形をしている。RNaseA 水溶液と PNIPAM 水溶液における NaSCN の添加効果について比較を行うと、両者とも混み合い分子との複合効果が観測されているが、RNaseA では PEG の有無による転移温度の違いが小さい (複合効果が小さい、図 2) のに対して、PNIPAM では PEG の有無による転移温度の違いが大きい (複合効果が大きい)。複合効果の小さい RNaseA 水溶液では、式(1)の第一項による寄与が大きいため、転移温度が塩の添加濃度に対して線形的に変化する効果が大きく、塩の吸着による影響 (式(1)の第二項) は小さい。逆に、複合効果の大きい PNIPAM では、式(1)の第二項による寄与が大きく、転移温度に対する塩の吸着の効果が大きいことが分かっている。さらに、今回測定した NaF と NaCl の場合でも、RNaseA の転移温度に対する塩の吸着の効果は小さく、混み合い分子との複合効果も小さい。これらのことから、高分子の構造転移温度の変化に対する塩添加と分子混み合いの複合効果は、高分子に対する塩の吸着に支配されており、複合効果の大小と塩の吸着の大小には正の相関があることが示唆された。

[1] K. Sakota, *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 10334-10340, (2015).

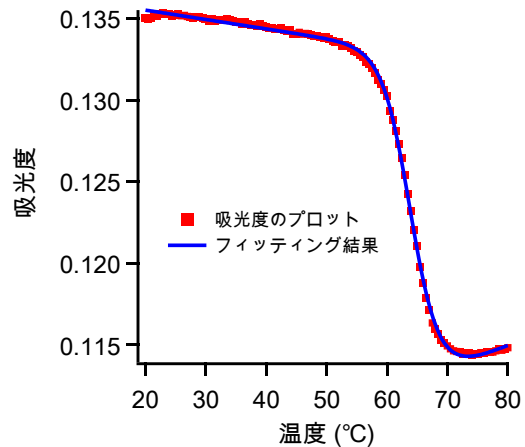


図 1. RNaseA 水溶液の構造転移温度曲線。

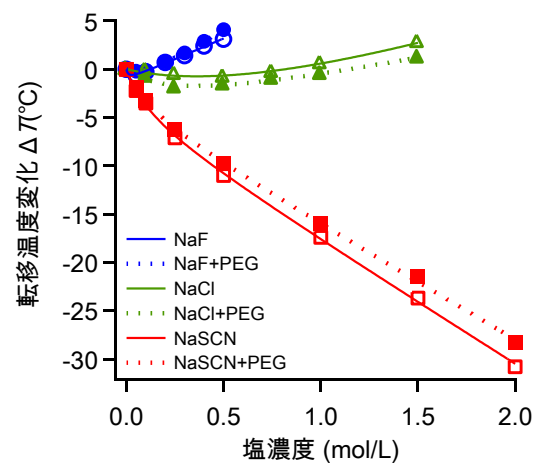


図 2. RNaseA 水溶液における構造転移温度の塩濃度依存性。