

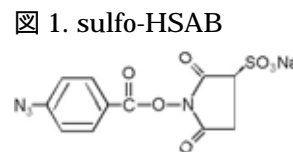
拡散係数から見たアポミオグロビンの酸変性

(京大院理) 馬殿直樹, 寺嶋正秀

【序】 多くの蛋白質の結晶構造が明らかになるにつれて、より生体内環境に近い、溶液中での蛋白質の構造やダイナミクスに興味を持たれ、円二色性(CD)測定、核磁気共鳴(NMR)法、蛍光、吸収やX線散乱法等、多くの実験手法により研究されてきている。それぞれの手法単独では蛋白質の限られた側面しかとらえることができないため、一つの蛋白質を完全に理解するためには、いくつかの手法を組み合わせる必要がある。たとえば、CD測定からは二次構造の含有量、NMRでは残基間の水素結合の強さなどがわかる。蛋白質を特徴付ける多くの物理量の中でも、拡散係数(D)は、蛋白質全体の形や大きさ、さらには溶媒との相互作用を反映するため、非常に重要である。しかし、従来のD測定法には多くの問題点があった。たとえば、動的散乱法やパルス磁場勾配NMR法では、十分なS/N比を得るために長時間積算したり、高濃度の試料が必要であったりする。また蛍光相関法では、蛍光分子でラベルされた蛋白質を合成しなければならない。電気泳動法や遠心法では、表面電荷の評価や低分子量蛋白質の測定が難しい。そこで、我々は、自発的に蛋白質にラベルされる光反応性分子と過渡回折格子(TG)法を組み合わせ、シンプルな試料調整、低濃度の試料で短時間のD測定が可能な手法を考案し、様々な蛋白質に適用可能であることを示した¹。

今回は、この手法を用いてアポミオグロビン(アポMb)の酸変性に伴うD変化を測定した。Mbは分子量18kDa、8本のヘリックスからなる球状蛋白質で、筋肉中において酸素貯蔵を担っている。ホロMbから酸素結合部位であるヘムを取り除いたアポMbは、pH5の天然状態(N)とpH2の変性状態(U)の間のpH4において中間体(I)をとる。このpH4中間体は、pHジャンプ法を用いたkineticな巻き戻り過程において、巻き戻り開始から数ms後に形成されるkineticな中間体と非常によく似た構造をしていることが知られている。さらに、pH4中間体は、モルテン・グロビュール(MG)の多くの特徴をもつ。よってこの変性状態のDを求めることは、蛋白質折りたたみ反応中間体の、溶媒との相互作用や蛋白質間相互作用を明らかにすることにもつながる意義を持つ。

【実験手法】 TG法では、まず光反応性分子を含む試料溶液中に2本の励起レーザー光(NdYAG; 355nm, 1Hz)によって光強度の干渉縞を作る。この光強度干渉縞によって励起分子と非励起分子との屈折率空間分布(干渉縞)が形成される。ここにプローブ光(780nm, CW)をブラッグ条件を満たすように入射すると、その回折光であるTG信号が観測される。その後信号は、分子拡散により減衰する。よって、得られたTG信号を指数関数フィットすることにより、その時定数から拡散係数Dがもとまる。ラベル化剤には、sulfo-HSAB (N-Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate : 図1)を用いた。Sulfo-HSABの大きさは蛋白質に比べて無視できるほど小さいため、得られるDは蛋白質拡散係数である。測定は室温(23℃)で行った。



【結果と考察】 Sulfo-HSABだけを含む溶液に、Mb(ホロMb)を徐々に加えた場合のTG信号の変化を図2に示す。その結果、sulfo-HSABと同濃度以上のMbを加えたとき、最も遅い時間領域で観測される山形TG信号の減衰が、蛋白質の拡散のみに由来することがわかった。そこで[ApoMb]=[HSAB]=50 μMの条件下、各pHで得られた、最も遅い時間領域の山形TG信号を2成分指数関数でフィットし、得られた遅いほうの時定数から蛋白質拡散係数を求めた(qは格子ベクトル)。

$$I_{TG}^{1/2} = \delta n_{fast} \exp(-D_{fast} q^2 t) + \delta n_{Mb} \exp(-D_{Mb} q^2 t)$$

図3bにアポMbのDとCD強度(222nm)のpH依存性を示した。また比較のために、ホロMbのpH

変性についても同様に図3aに示した。CD変化から分かるように、ホ口Mbの酸変性はヘムによる安定化のため、非常に協同的であり（アポMbはpH4で中間体を示す）また変性開始のpHもアポMb（pH=5）にくらべて低くpH=4であった。CD変化がアポMbとホ口Mbで異なる一方、D変化はどちらも非常によく似た挙動を示した。

まず、 $7 > \text{pH} > 5$ におけるpH増加に伴うDの減少は、ホ口Mb、アポMbともに、ダイマー形成によることが、濃度変化測定からわかった（図4）。 $\text{pH} < 5$ 以下では両Mbともモノマーである（天然状態MbのDの文献値は $0.9\text{--}1.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ）。また、アポMbのCD強度から明確なように、N(天然pH5) I(中間体pH4)では、二次構造が壊れているにもかかわらずDの変化が小さい。これまでX線散乱やNMRにより、Iは天然類似の疎水核（AGHヘリックス）を保持しており、球形に近いが、天然特異的な三次構造が乱れていることが分かっている。Dは、溶質の形、サイズと溶質 - 溶媒相互作用に依存する。回転半径 R_G からDを予測できる経験式²、

$$D = 6.85 \times 10^{-15} T / (\eta \cdot \sqrt{M^{1/3} \cdot R_G})$$

(T温度、粘度、M分子量)を用いると、NとIの R_G の報告値19.3、23.0 から、NとIのDはそれぞれ、 0.9 、 $0.82 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ となり、絶対値は少し異なるが、観測されたDの変化量は R_G の増加だけで説明できることがわかった。このことからIは形だけでなく、水との相互作用も天然類似であることを示す。

I(pH4) U(pH2)では拡散係数DはNの半分になった。Uの $R_G(29.7)$ から考えて、観測されたDはMbのサイズ(R_G)の変化だけでは説明できない。Mbの酸変性状態が糸まり状態であることから形によるDへの影響も小さいと考えられる。従って、pH2では、天然状態で蛋白質内に埋もれていた側鎖が溶媒に露出し、溶媒と強く相互作用していると考えられる。様々な塩によりMbはpH2で数種のMGを形成するが、その一因はこの強い蛋白質 - 溶媒相互作用のためであろう。

参考文献：

1. N.Baden and M.Terazima, *CPL*, **393**, 539 (2004),
2. L.He and B.Niemeyer, *Biotech. Prog.* **19** 544 (2003)

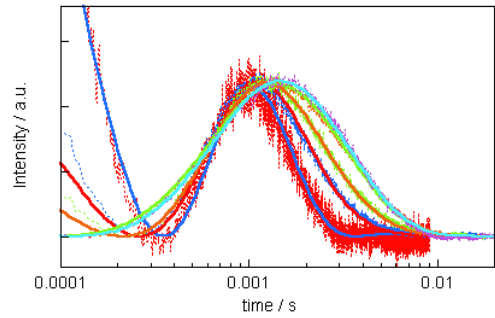


図2. [HSAB]=500 μM の溶液に、[Mb]=0,10,100,500,1000 μM 加えた場合のTG信号。[Mb]が高いほど信号が遅い時間領域に現れる。各信号はピーク強度で規格化した。

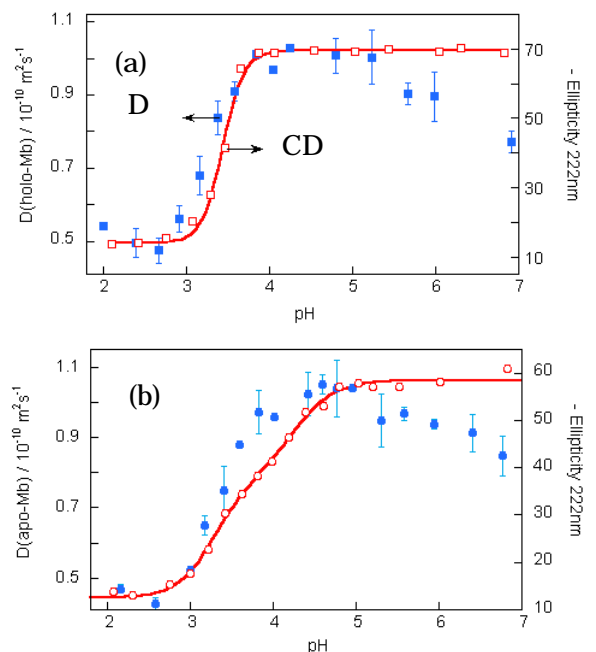


図3. (a)ホ口Mbと(b)アポMb(ともに50 μM)のDとCDのpH依存性。CDのフィットは、それぞれシングルとダブルシグモイド。

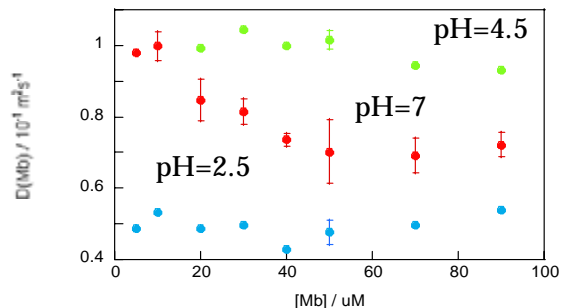


図4. pH=7,4.5,2.5におけるMbのDの濃度依存性