界面活性剤によるタンパク質の高次構造の変化

岡山理科大学工学部応用化学科 竹田 邦雄

In a surfactant solution, many proteins adopt conformations different from their native states. Such conformational changes are reviewed in terms of the changes in the relative proportions of secondary structures, especially on the bovine serum albumin, intact and disulfide bridges-cleaved, and the domain sized fragments of the same protein.

protein/secondary structure/protein conformation/CD/surfactant/SDS

1. はじめに

膜タンパク質やシグナルポリペプチドが脂質生体膜中できれいにヘリックスをまいている絵をよく目にする。しかし、果たしてそうだろうか。脂質はタンパク質の構造変化をそれほどドラスティックにはおこさないようである。それで、両親媒性物質によって作られる疎水性環境下でタンパク質の構造変化はどこまで達成できるかみようとすると、sodium dodecyl sulfate (SDS) のような界面活性剤による構造変化を追跡することになる。

さて、界面活性剤によるタンパク質の構造変化の研究は決して新しくはない。ヘリックス構造が増えたとか減ったとかはかなり以前から報告されてきている。しかし、これらの構造が実際のどの程度、どれ位の速度で変わるかは、ごく最近までほとんどわかっていなかったと言って過言ではない。まして、タンパク質中のどの部分（セグメント）の構造が界面活性剤によって形成されたり壊されたりするかというような議論はされていなかった。

この種の研究も含め溶液状態のタンパク質構造の研究は大部分円偏光二色性（CD）測定に頼っている。 α -ヘリックス構造とランダムコイルのCDスペクトルはそれなりの強度をもっているが、 β -構造のスペクトルはこれらに比べあきらかに弱く、ヘリックスのそれにどの波長でも埋もれてしまう。しかし、CDスペクトルをシミュレーションしてカーブフィッティッ

ング¹⁾させることによって、 β -構造含量もこの構造をある程度含むタンパク質に対してはX線解析によるものとほぼ一致するように見積ることができる。さらに、X線で測定される結晶状態とは全く異なる二次構造を溶液状態をとるタンパク質も見つかりつつあり、特にこのようなタンパク質の溶液状態における構造の研究にCDはますます有用な方法として現在活用されつつある。

この小稿では、界面活性剤によるタンパク質とホモポリペプチドのヘリックス構造のみならず β -構造の変化についても定量的に追ってみた^{2, 3}の例を紹介する。

2. タンパク質の場合

タンパク質と界面活性剤の相互作用の研究において最もよく用いられているタンパク質は牛血清アルブミン（BSA）であろう。BSAは3つのドメインからなり、そのドメインは大小のループ構造をとっている²⁾。ループを作っている部分とドメイン間やループ間のつなぎの部分は大体 α -ヘリックス構造を形成している²⁾。天然のBSAのヘリックス含量は66%である³⁾。図1にみられるように、BSAのヘリックス含量は界面活性剤溶液中で50%前後まで減少する。この約15%の減少分のヘリックス構造含量はドメイン間とループ間のつなぎの部分およびBSAのC-末端のヘリックスの崩壊に相当する³⁾。BSAのペプシン分解によるフラグメントの二次構造変化からも、界面活性剤によってこのつなぎの部分のヘリックスが壊されやすいことがわかる⁴⁾。また、2番目のドメインにちょうど相当するフラグメント（BSAのArg¹⁹²-Tyr³⁶⁸）のSDS溶液中の二次構造変化はBSAの場合と同じように2段階に進み⁴⁾、このような大きさのフラグメントへのSDSの結

Conformational Changes in Proteins Caused by Surfactants

Kunio TAKEDA

Department of Applied Chemistry, Okayama University of Science

図1. BSAのヘリックス含量の変化.

SDS: sodium dodecyl sulfate, SDeS: sodium decyl sulfate, HTAB: hexadecyltrimethylammonium bromide, TTAB: tetradecyltrimethylammonium bromide, DoTAB: dodecyltrimethylammonium bromide, DeTAB: decyltrimethylammonium bromide.

合も飽和結合量がそれ相応に小さいだけでBSAの場合と非常によく似たパターンを示す⁵¹⁾. これらの結果はBSAがドメイン単位で小さなBSAとしての構造や機能をもつことを示唆している. 一方, BSAは3前後の軸比の楕円体とされている. このタンパク質に蛍光プローブをくっつけた蛍光異方性から得られる回転相関時間はSDS共存下で急激に長くなり, SDSの結合によってその全体の体積がかなり大きくなることを示している⁵¹⁾.

界面活性剤によってヘリックス構造が増加するタンパク質もある. α -キモトリプシン (α CT)⁵¹⁾などがその例である. α CTは前駆体であるキモトリプシノーゲン (CTN) から2つのジペプチドがとれて, 3つのポリペプチド, Cys¹-Leu¹³, Ile¹⁶-Tyr⁴⁶, Ala¹⁰-Asn²⁶ (数字はCTNの残基番号) がS-S架橋によってつながった状態にある. 天然の α CT, CTN共にC-末端にヘリックス構造をわずかにもっているが, 単離したポリペプチド149-245にはヘリックス構造はみられない. その代わり, 単離した16-146にわずかにヘリックス構造がみられる. 尿素, グアニジン変性に対するヘリックスの安定性はCTN, α CT, 16-146の順に小さくなる. ポリペプチドが断片になるに従ってその構造は不安定になっている. 一方, SDS溶液中でCTN, α CT, 16-146のヘリックス形成は促進され, その含量は30%位まで(16-146のみ15%まで)増加する. SDS溶液中では149-245もヘリックス構造を形成するようになり, しかも30%のヘリックス含量に他より低いSDS濃度で到達する.

β -構造を多く含むタンパク質, β -ラクトグロブリン

ン (β LG)⁶¹⁾とリボヌクレアーゼA (RNaseA)⁷¹⁾は共にこの構造を約40%もともと含んでいる. β LGの β -構造は尿素やグアニジン変性では全く壊れず, RNaseAのそれもこれら変性剤の高濃度まで壊れない. しかし, これらのタンパク質の β -構造含量は低い濃度のSDS溶液中で半分位まで減少する. 一方, β LGの α -ヘリックスの含量は β -構造が壊れるSDS濃度で20%から40%に増加するが, RNaseAのヘリックス含量はSDS溶液中ではほとんど変化しない.

3. S-S架橋を還元したタンパク質の場合

BSAは17組のS-S架橋をもっている. この架橋が先に述べたBSAの大小のループを閉じるように存在しているためか, S-S架橋をすべて切断すると66%あったこのタンパク質のヘリックス含量は25%まで減少する⁸¹⁾. RNaseA⁷¹⁾の場合, この架橋の還元によってヘリックスの含量は約20%からその半分に, β -構造は約40%からその半分以下に減少する. S-S架橋が二次構造の形成維持に明らかに関与していることがうかがえる. しかし, SDS溶液中におけるこれらS-S架橋を還元したタンパク質のヘリックスおよび β -構造含量は, それぞれの還元していないものが同じ界面活性剤溶液中でとる含量にほぼ等しい. つまり, SDS溶液中ではS-S架橋の有無にかかわらずほぼ同じ二次構造含量をもち, 架橋構造が二次構造に影響しないことを示す.

4. ホモポリペプチドの場合

これまでタンパク質についての結果を述べてきた. なぜこうなるか, 少なくともこの分野の研究者は知りたいと思っている. しかし, 解らないことが多い. 少しでも何かつかめないと, 単純なホモポリペプチドについても色々検討されてきている.

通常, poly-L-lysine (PLL), poly-L-ornithine (PLO), poly-L-glutamic acid (PLGA)が対象になっている⁹¹⁾. PLLは陰イオン性界面活性剤溶液中で研究され¹⁰¹⁾, 疎水基の炭素数8の界面活性剤のある限られた濃度で最高50%程度のヘリックス構造を形成し, その濃度を越えたと大部分 β -構造をとる. SDS溶液中ではヘリックス構造は全くとらず, コイルから β -構造への転移だけがほぼ完全におこる. PLOは図2に示すようにSDS溶液中で複雑な構造変化をする¹¹¹⁾. SDS/PLOの混合比 (mol/mol: ポリペプチドは残基濃度) が1近辺のとき, PLOは不安定なヘリックスを50%程度まで形成するが, これは β -構造に分オーダーですべて

図2. SDS 溶液中における(混合直後の)P.L.O.の二次構造含量。P.L.O. 残基濃度: $9.2 \times 10^{-5} \text{M}$ 。α, β, Rはα-ヘリックス, β-構造, ランダムコイルをそれぞれ示す。

転移する。混合比が3から5にかけて、P.L.O.は100%β-構造をとり、5を越えると安定なα-ヘリックス構造を最高70%程度形成する。さらにSDSの割合が大きくなるとヘリックスとランダムコイルだけになる。一方、PLLやP.L.O.とは反対荷電をもつPLGAは陽イオン性界面活性剤 dodecyltrimethylammonium bromide などの溶液中で構造変化を起こす⁹⁾。例えば、この界面活性剤とPLGAとの混合比1付近で、50%前後のヘリックス含量をもつが、それ以上あるいはそれ以下の混合比ではほぼランダムコイルの状態にあり、またβ-構造をとることはない。

このようなコンフォメーション変化はこれらホモポリペプチドの荷電が反対荷電をもつ界面活性剤で中和されることによって引き起こされるとまず考えられるが、この3種類の場合だけでも3者3様の变化をしている。また、β-構造は条件によっては100%誘起されるが、α-ヘリックス構造は必ず他の構造と混在した状態にある。

界面活性剤によるこれらポリペプチドのコンフォメーション変化においては、ポリペプチドに結合した界面活性剤の疎水基同士の相互作用のあり方が大きな問題のように思える。β-構造をとったポリペプチドに結合した界面活性剤の疎水基はいわゆるβシートの上下に並ぶことによって、ある種のミセル状の集合状態を容易にとると考えられる。これに対し、α-ヘリックス構造をとった場合、状況を異にする。ポリペプチドのヘリックス構造の骨格部分の直径は約0.44nmと推定されるが、例えばP.L.O.の側鎖とそれに結合したドデシルサルフェート部分の長さの和は大体2.3nm位になる。よく知られているように、ポリペプチドがヘリックス構造を形成すると側鎖はその外側に位置する。つまり、側鎖に結合した界面活性剤のかなり長い疎水

基がらせん状の円筒の周囲に突き出た形になり、これは疎水基がミセル的相互作用をするためにはヘリックス構造をとっていない部分がある程度必要であることを示唆している。

5. タンパク質のコンフォメーション変化の速度論的側面

タンパク質への界面活性剤の結合そのものは測定された例はないが、ミセル形成の速度論的研究結果からしてミリ秒以下と思われる。界面活性剤溶液中におけるタンパク質などのコンフォメーション変化の多くは秒前後のタイムスケールでおこり^{9),11)~13)}、温度やpHの変化によって生じるヘリックス-コイル転移の速度に比べ非常に遅い。これはコンフォメーション変化と同時にポリペプチドに一旦結合した界面活性剤イオン同士の相互作用が変わる——界面活性剤の再配列^{11)~13)}——過程に時間を要するためと考えられる。この実験をしていると、筆者にはタンパク質がまるで“手かせ足かせをはめられて”それを引きずりながら構造変化をしているように思えてくる。一般に、これらの速度は規則構造が壊れるときよりも規則構造を形成するときの方がさらに遅い。また、この系の構造変化の特徴として、ある界面活性剤濃度におけるタンパク質やホモポリペプチドの構造変化はそれ以下の濃度で形成される構造を中間体とせずにおこるようである^{11)~13)}。つまり、構造変化のメカニズム自身が界面活性剤濃度と共に変わっていると考えられる。

文 献

- 1) Yang, J. T., Wu, C.-S. C., and Martinez, H. M. (1986) *Methods Enzymol.* **130**, 208-269.
- 2) Brown, J. R. (1977) *Albumin Structure, Function and Uses* (Rosenoer, V. M., Oratz, M., and Rothschild, M.A., ed.), pp.27-51, Pergamon, Oxford.
- 3) Takeda, K., Shigeta, M., and Aoki, K. (1987) *J. Colloid Interface Sci.* **117**, 120-126.
- 4) Takeda, K., Wada, A., Nishimura, T., Ueki, T., and Aoki, K. (1989) *J. Colloid Interface Sci.*, in press.
- 5) Takeda, K. et al. 投稿中(その後印刷中もあり)
- 6) Takeda, K. and Moriyama, Y. (1989) *J. Protein Chem.* **8**, 489-496.
- 7) Takeda, K., Sasa, K., Nagao, M., and Batra, P.P. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **957**, 340-344.
- 8) Takeda, K., Sasa, K., Kawamoto, K., and Wada, A. (1988) *J. Colloid Interface Sci.* **124**, 284-288.
- 9) 竹田邦雄 (1985) 表面 **23**, 351-368.
- 10) Takeda, K. (1985) *Bull. Chem. Soc. Japan* **58**, 1210-1214.

11) Takeda, K. (1985) *Biopolymers* **24**, 683-694.*Japan* **54**, 1793-1796.12) Takeda, K., Iba, A., and Shirahama, K. (1981) *Bull. Chem. Soc.*13) Takeda, K. (1983) *Bull. Chem. Soc. Japan* **56**, 1037-1040.

たけだ くにお

岡山理科大学工学部教授。広島県向原町出身。昭和51年広島大学大学院博士課程修了，理学博士。その後1年間学振の奨励研究員をして現在の大学へ。大学院時代安永研でSDSのミセル形成の高速反応にたずさわった因縁で，いまだにSDSから足を洗えずにいる。趣味は特にないが，子供（今は三男坊）が所属するスポーツ少年団の父兄チームでは1番，ショートを人にゆずらない。

☎0862-52-3161 内線4626

“The Two Cultures: Chemistry and Biology”

A. Kornberg, *Biochemistry* **26**, 6888-6891 (1987)

あの Kornberg が生物学と化学の乖離を憂い，生物過程の理解に対する化学の復権を迫る。化学者は生体高分子の複雑さから逃れて，単純な低分子の微細構造にのめり込み，分子生物学者は現象論に幻惑されて，これも個別の構造にしか興味を示さない。特異的残基置換ですべてが解決されるであろうという潮流の中で化学は無用になったのか？化学は悪いことしかしていないという大衆の認識の中で *Biochemistry* 誌上にこのような文章がのったことは全く異例であるが，設問は重要である。

(高橋 敏)