血漿アポリポタンパクの水溶液中での挙動の解析*

横山 信治** 田島 正二** 川井 善子**
山本 章**

I. はじめに

血漿アポリポタンパクは脂質との親和性をもつことが重要な特徴であり、これがおのおののアポリポタンパクの機能と重要な関わりを持つことから、各種界面とアポリポタンパクの相互作用の定量的観察が重要となる。しかし、この脂質親和性のため、水溶液中でのアポリポタンパクは複雑な挙動を示すことが多く、界面との相互作用の解析をより困難にしている。したがってアポリポタンパクの水溶液の研究はアポリポタンパク表面でのその挙動を知る上での第一歩といてよく、従来、沈降平衡、CD スペクトルを用いて apo A グループ、C グループの一部について研究が行われてきた。いずれの場合も共通して得られている結論は溶液中での多重体形成平衡とそれによる高次構造 (α -helix) の誘導である¹⁻⁶⁾。

われわれは、分子ふるい型的高速液体クロマト (HPLC) カラムを用い、apo A-I, C-II の水溶液を解析し、併せて CD スペクトル、沈降平衡を行ってこれらの水溶液中での挙動について新たな情報を得たので報告する。

II. 実験方法

apo A-I はヒト血漿を HDL エタノール・エーテルにて脱脂、6 M urea 中で Sephadex G-200 カラムにて単離した。タンパクは凍結乾燥後 -20°C に保存、0.01 M phosphate -0.15 M NaCl, pH 7.4 緩衝液に 4°C にて overnight で溶解して用いた。apo C-II は、ヒト血漿 VLDL を tetrametylurea, アセトン・エタノールにて脱脂、6 M urea 中で Sephadex G-200, DEAE-cellulose によって単離し

た。タンパクは凍結乾燥後 4 M 塩酸グアニジン中で保存、緩衝液に透析して用いた。HPLC は、Varian 5000 LC に東洋曹達の G 3000 SW (60 cm) を装置し、0.05 ml/min から 3 ml/min、通常 1 ml/min を用い OD₂₈₀ をモニターした。沈降平衡は、Beckman の Airfuge を用いた簡便法⁷⁾、阪大蛋白研垣内先生の御好意による Beckman Model E を用いた通常の方法で行った。遠紫外部 CD スペクトルは日本分光 J 500 を用いて観察した。

III. 結果および考察

HPLC による溶出ピークは、溶解後の apoA-I において2つみられ、みかけ上の分子量はそれぞれ四重体と二重体、ないし stokes 半径がそれぞれ 40 Å と 31 Å にあたる。しかし、この 40 Å のピークは加温により速やかに著減し、その分だけ 31 Å のピークが増加する。この減少は一次反応であり、温度に依存する。この rate constant の Arrhenius plot は直線を示し、その勾配より反応の活性化エネルギーは -120 Kcal/mol となる。この変化の前後における CD スペクトルの変化を観察すると、605 $\mu\text{g/ml}$ で 222 nm の残基楕円率は 18,100 deg $\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ から 17,500、70 $\mu\text{g/ml}$ で 16,350 から 15,150であり、HPLC における両ピーク面積の比 (1 : 4) より求めた 40 Å ピークの残基楕円率はいずれも 20,000 となり、濃度依存性をもつその他の部分とは異なって一定である。したがってこの加温による変化は、非可逆的な高次構造の変化と考えられ、溶解過程における中間ステップと考えられる。しかし、その半減期は室温では 140 日以上であり、apo A-I を取り扱う上で十分な注意が必要である。超遠心による沈降平衡では濃度に依存して単量体から多重体への分子量の変化がみとめられ、また HPLC の 31 Å ピーク

* 1981年 5月、第13回日本動脈硬化学会において発表

** 国立循環器病センター研究所

は urea, SDS, DTT, 有機溶媒処理, 熱処理によってもそれ以上の分割はできないことから単量体のそれと考えられる。CD スペクトルの濃度による変化と併せ考えれば、最終的に溶解した apo A-I は多重体形成平衡にあり、多重体においては高次構造が誘導されていると考えられるが、HPLC による 3 分以内の溶出でも多重体はみとめられず、解離・会合はきわめて迅速であると考えられる。また、stokes 半径よりみて apo A-I 単量体は α -helix に豊んではいるが球状タンパクではない。

apo C-II は HPLC でみかけ上の三重体分子量付近、stokes 半径 24 Å の位置に単一ピークとして溶出される。数日放置すると exclude される巨大分子が出現するが超遠心によって除かれ、低温で安定である。この状態での CD スペクトルは 222 nm の残基楕円率 4,600 と浅く、ランダム構造かむしろ β -sheet 構造を示し、有機溶媒や界面により誘導される α -helix に豊んだ構造とは異なる。この CD スペクトルは濃度 50~500 $\mu\text{g/ml}$ の

間で変化せず、A-I と異なり高次構造の誘導はみられない。沈降平衡の結果は Arituge による方法での分子量、9,000, Model E を用いた方法で約 10,000 とおおよそ単量体のそれを示し、apo C-II は水溶液中で単量体として存在して多重体形成平衡の存在は少なくとも明日ではない。この単量体はランダム構造が優位であって、Stokes 半径よりみて球状構造はとっていない。

文 献

- 1) Vitello, L. B. and Scanu, A. M.: J. B. C., **251**: 1131 (1976).
- 2) Stone, W. L. and Reynolds, J. A.: J. B. C., **250**: 8045 (1975).
- 3) Osborne, J. C. et al.: Biochemistry, **15**: 317 (1976).
- 4) Vitello, L. B. and Scanu, A. M.: Biochemistry, **15**: 1161 (1979).
- 5) Mantulin, W. W. et al.: J. B. C., **255**: 8185 (1980).
- 6) Osborne, J. C. and Brewer, H. B.: Adv. Prot. Chem., **31**: 253 (1977).
- 7) Bothwell, M. A. et al.: J. B. C., **253**: 2073 (1978).

Summary

Apo A-I and Apo C-II in Aqueous Solution

Shinji YOKOYAMA, Shoji TAJIMA, Yoshiko KAWAI and Akira YAMAMOTO

Research Institute, National Cardiovascular Center, 5-125 Fujishiro-Dai Suita, Osaka 565

Behavior of apoA-I and apoC-II in aqueous solution was studied by using high performance liquid chromatography (HPLC), sedimentation equilibrium (SE) and circular dichroism (CD). ApoC-II is dominantly monomeric with rather randomized structure in solution. This has been indicated, by the monomeric molecular weight obtained by ultracentrifugal SE using Beckman Airfuge and Model E, by molecular seive type HPLC showing single peak at the position of larger molecular weight than its monomer, and by CD spectra with residual ellipticity at 222 nm of 4600 deg.cm²/dmol that showed little change depending on the concentration of the protein.

ApoA-I, when its lyophilized specimen was solubilized in aqueous buffer, showed two peaks in HPLC with apparent molecular weights of tetra- and dimer. The first peak disappeared irreversibly with reciprocal increase of the second peak when

the solution was heated. The kinetics of the disappearance of the first peak was the first order and the rate constant showed a straight line in Arrhenius plot, giving the activating energy = -120 kcal/mol. The second peak could not be broken down any further by heating or by treating with chloroform: methanol, SDS, urea and DTT. SE resulted in compatible observation to the previous ones that apparent molecular weight increased from monomeric to oligomeric as the concentration increased. CD study revealed its highly helical structure but the decrease in helicity as the first peak in HPLC disappeared and as the solution was diluted. Consequently, one must consider a rapid oligomerization equilibrium of apoA-I in aqueous solution but there are another type of oligomers which is the intermediate step in solubilizing apoA-I.

Key words: apoA-I, apoC-II, solution property.