

研究ノート

両親媒性環境下の疎水性蛋白質の分子集合状態の特性評価

渡邊 康[§], 猪子 洋二*

Characterization of the Molecular Assembly of a Hydrophobic Integral Membrane Protein under Amphiphilic Conditions

Yasushi Watanabe[§] and Yoji Inoko*[§] National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

* Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-8531

Abstract

Protein characterization is indispensable in the various fields including life and food science. In this study, the preliminary results will be reported about the molecular assembly of a hydrophobic integral membrane protein sarcoplasmic reticulum CaATPase in the presence of surfactant/lipid mixed micelles, by using solution scattering methods such as the low-angle laser light scattering photometry combined with high performance gel chromatography, and synchrotron radiation solution X-ray scattering measurements. The results suggested that protein assemblies may play an important role in the function of this hydrophobic protein.

食品科学および食品産業において、蛋白質の特性解析は重要な課題の一つである。蛋白質、脂質などの生体分子は、生命現象を担うばかりでなく食品構成成分としても重要な素材である。それらは多くの場合は、相互に作用しあってその機能を発現している。蛋白質の研究はその扱いやすさから水溶性蛋白質を中心に展開されてきたが、疎水性蛋白質の構造研究も近年注目されつつあり、生命科学分野だけでなく周辺の研究分野でも基礎的基盤の側面から発展させる意義がある。疎水性蛋白質は、単独では水に不溶性であるため水に可溶化する方法として界面活性剤の利用がある。一方、界面活性剤や種々の塩成分などを含んだ多様な溶媒条件で蛋白質の構造解析ができる手法の一つに 溶液散乱法があげられる^{1)~5)}。

本研究では、疎水性蛋白質として多様な生物種に存在している P 型 ATPase の一つである 骨格筋小胞体 CaATPase を対象にした。本蛋白質は生体膜 ATP 加水分解

酵素であり、994 アミノ酸残基から構成され、分子量 11 万である⁶⁾。また、単量体の X 線結晶構造が豊島らにより報告されている⁷⁾。本蛋白質は蛋白質に対して変性作用を示さない非イオン性界面活性剤ミセル中では、単量体が大部分の機能反応論的性質を担っていると報告されている⁸⁾。しかし、脂質ベシクルへの再構成酵素標品では二量体以上の凝集体が形成しているとの報告があり、その生理的意義は不明である⁹⁾。本研究では、このような疎水性蛋白質の機能構造を解析する予備的実験として、脂質と非イオン性界面活性剤混合ミセル中での低角レーザー光散乱測定^{4), 5)}と溶液 X 線散乱測定^{1)~3)}を検討した。その結果、本蛋白質の機能発現には高次会合体形成が重要であることが示唆された。また、これら溶液散乱法による疎水性蛋白質の構造解析を通して、広く食品関連生体高分子素材の溶液構造の解析に資する研究手法の提示も目的とした。

2006年 11月26日受付, 2006年 12月28日受理

[§] 連絡先 (Corresponding author)

実験方法

CaATPaseは、ウサギ骨格筋から精製した¹⁰⁾。ウシ血清アルブミンおよびオクタエチレングリコールドデシルエーテル (C₁₂E₈) は、ナカライテスク (株) から購入した。

クロマトグラフィーの試料は、精製蛋白質の4.5倍量のC₁₂E₈で可溶化後、遠心 (200,000×g, 15分, 3℃) 上清を得た。その試料溶液を溶出溶媒 (0.1 M KCl, 10 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, 0.05 mg/ml フォスファチジルコリン (PC), 0.3 mg/ml C₁₂E₈, 20 mM MOPS緩衝液, pH 6.9) で24℃において平衡化したカラムに添加し、ゲルクロマトグラフィーの検出器として低角レーザー光散乱計 (東ソー (株), LS8000), 示差屈折計 (昭和電工 (株), RI-SE-61) および紫外吸光度計 (島津 (株), UV SPD-10A) を接続したシステムで検出した。ゲル濾過クロマトグラフィーカラムは、Superdex200 (300 mm×26mm, GEヘルスケア (株)) を2本連結して使用した。

蛋白質の分子量は、光散乱計、屈折計および紫外吸光度計のピーク出力の値 (順にLS, RI, UVと表現する) と蛋白質の吸光係数Aから評価できる^{4), 5)}。光散乱強度LSと示差屈折率RIは、dn/dcを比屈折率増分、cを蛋白質濃度、Mを分子量、k₁とk₂を装置定数とすると以下の関係式が与えられる。

$$LS = k_1 \cdot (dn/dc)^2 \cdot M \cdot c \quad \text{--- (1)}$$

$$RI = k_2 \cdot (dn/dc) \cdot c \quad \text{--- (2)}$$

上記2式より、分子量Mは以下のように表現できる。

$$M = k_3 \cdot (dn/dc)^{-1} \cdot LS \cdot RI^{-1} \quad \text{--- (3)}$$

k₃は装置定数である。さらに、比屈折率増分dn/dcはk₄を装置定数として次のように表現できる。

$$dn/dc = k_4 \cdot A \cdot RI \cdot UV^{-1} \quad \text{--- (4)}$$

(3), (4) 式より、分子量Mは以下の様に表現できる。

$$M = k_5 \cdot A^{-1} \cdot LS \cdot UV \cdot RI^{-2} \quad \text{--- (5)}$$

装置定数k₅は、吸光係数A (280nm) と分子量Mの既知試料を測定条件においてカラムに供することにより決定できる。本研究では以下の蛋白質を標準試料として、ウシ血清アルブミンBSA (M:66,700/A:0.678 mg⁻¹・ml・cm⁻¹)¹¹⁾、乳酸脱水素酵素LDH (M:142,000/A:1.38 mg⁻¹・ml・cm⁻¹)¹¹⁾ およびグルタミン酸脱水素酵素GDH (M:297,000/A:1.27 mg⁻¹・ml・cm⁻¹)¹¹⁾ を利用した。CaATPaseの280nmにおける吸光係数は1.2 mg⁻¹・ml・cm⁻¹である¹²⁾。一方、蛋白質界面活性剤複合体の比屈折率増分 (dn/dc)_c は、界面活性剤脂質混合ミセルと蛋白質

のそれぞれの比屈折率増分の値 (界面活性剤とP C混合ミセル, 0.134 ml/g, 蛋白質:0.187 ml/g¹¹⁾) と蛋白質グラム当たりの界面活性剤脂質混合ミセルの結合量 δp (g/g protein) に対しては次の関係式が与えられる。

$$(dn/dc)_c = 0.187 + 0.134 \cdot \delta p \quad \text{--- (6)}$$

従って、界面活性剤脂質混合ミセルの蛋白質への結合量は、ゲルクロマトグラフィーで溶媒と透析平衡条件下で示差屈折計を利用することにより、式 (4) より求めた可溶性蛋白質の比屈折率増分の値と式 (6) の関係式から求めた。

複合体のサイズの評価は小角X線散乱測定により評価した。放射光溶液X線散乱測定は、高エネルギー加速器研究機構放射光施設ビームライン10Cに設置された小角溶液X線散乱測定装置 (酵素回折計) を使用した^{1)~3)}。検出器は一次元位置敏感比例係数装置を用い、X線の波長は0.1488 nm, 試料検出器間距離は900mmとした。試料セルはステンレス製で、厚み1 mm, 縦3 mm, 横15 mmの穴の両面に石英板 (厚み20 μm, 縦6 mm, 横20 mm) を窓材として貼った。得られた散乱データは、試料直前のイオンチェンバーの出力により入射X線強度の減衰補正をした。鶏の腱から精製したコラーゲンを標準物質として、検出器のチャンネルを散乱ベクトルq (= (4 π/λ) sin θ, λはX線波長, 2θは散乱角) に変換した。

実験結果と考察

疎水性蛋白質試料としては、P型ATPaseの一つであるウサギ骨格筋CaATPaseを対象にした。本蛋白質はATP加水分解生体膜酵素であり、994アミノ酸残基から構成され、分子量11万である⁶⁾。単独では水に不溶性であるため水に可溶化するために界面活性剤を利用する必要がある。本研究では、蛋白質に対して変性作用を示さない非イオン性界面活性剤としてオクタエチレングリコールドデシルエーテル (C₁₂E₈) を利用した。本蛋白質は、このような界面活性剤ミセル中で単量体として活性を維持して可溶化されていることは知られている⁸⁾。そこで、より生体膜環境に近いC₁₂E₈と脂質 (フォスファチジルコリンPC:50 μg/ml) 共存下での低角レーザー光散乱法による分子量評価を検討した。

図1にC₁₂E₈/PC存在下のゲルクロマトグラムの一例を示した。上段から紫外吸光度 (280 nm), 示差屈折率および低角レーザー光散乱強度のシグナルを示している。実線で示した約0.5mg (約2 mg/ml溶液を0.25 ml) の蛋白質をカラムに添加したクロマトグラムからは、主要蛋白質成分はすべての検出器で検出されている約50分に頂

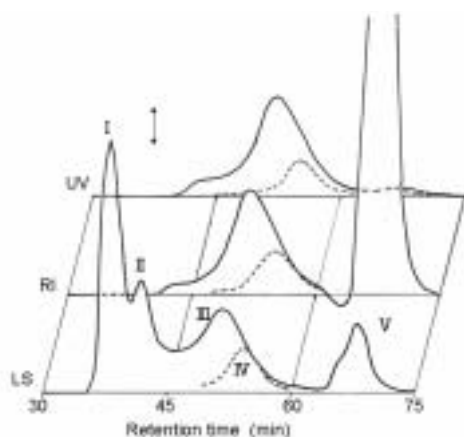


図1 界面活性剤と脂質存在下のクロマトグラム
実線と点線は、蛋白質添加量が0.5 mgと0.2 mgの場合を示す。紫外吸収 (UV) のクロマト上の矢付棒の長さは、吸光度で0.1を示す。

点をもつピーク (Ⅲ) として溶出した。光散乱の約38分のピーク (Ⅰ) は、他の2つの検出器でほとんど検出されていないことから極微量の蛋白質でない巨大分子 (筋小胞体膜の界面活性剤に可溶化された成分) であることがわかる。一方、光散乱の約42分のピーク (Ⅱ) は他の2つの検出器で検出されているので蛋白質の高次会合体と考えられる。光散乱と示差屈折率の約68分のピーク (Ⅴ) は可溶化時に蛋白質に結合しなかった界面活性剤脂質混合ミセルである。この溶媒条件における分子量の校正曲線を図2に示した。この直線性は、本手法の疎水性蛋白質の分子量評価における信頼性を示している。この条件では、本蛋白質 (CaATPase) の分子量は $224,000 \pm 6,700$ ($n=3$) であった。

一方、蛋白質試料の添加量が約0.2mgの結果を点線で示した。蛋白質成分は52分 (ピークⅣ) に溶出している。その蛋白質の分子量は、図2にプロットしたように $118,000 \pm 3,500$ ($n=3$) と評価された。これらの結果は、添加量の多い場合は2量体で、添加量の少ない後者で単量体であることを示している。つまり、蛋白質試料濃度により蛋白質の分子集合状態 (4次構造) が変化することを示している。一方、同条件においてのBSA 2量体 (分子量132,600) の溶出位置は約65分であったので、ゲルクロマトグラフィーによる水溶性球状蛋白質の溶出位置から界面活性剤脂質混合ミセル中で可溶化した疎水性蛋白質の分子量を議論できない。界面活性剤脂質混合ミセルの蛋白質グラムあたりの結合量は、0.5 mgの添加時で約0.5 g、0.2 mgの添加時では約0.7 gと評価できた。2量体蛋白質への界面活性剤脂質ミセルの結合量が単量体のそれより小さいのは、蛋白質どうしの相互作用の

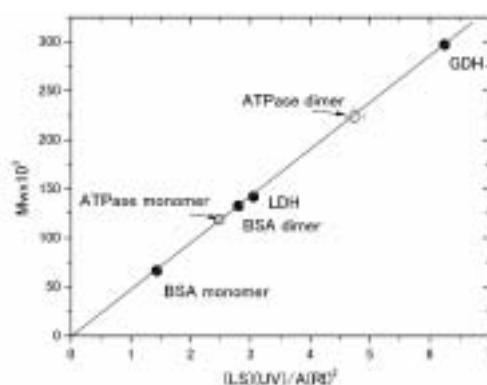


図2 分子量評価のための校正曲線
標準蛋白質から得られた校正曲線に、ATPaseのデータをプロット (○) した。

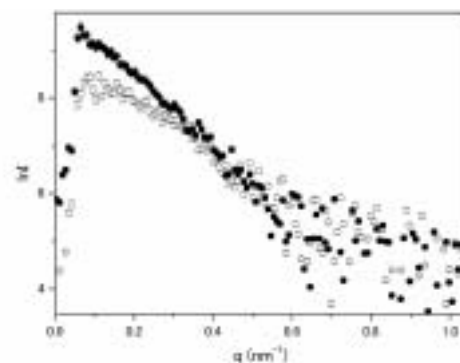


図3 X線溶液散乱パターンの一例
ATP (4 mM) の添加の有 (○) 無 (●) の比較をした。蛋白質濃度は0.3mg/ml、試料セルは5℃で、5分間の測定結果である。散乱ベクトル q が約 0.07 nm^{-1} 以下の散乱強度減少は、ビームストッパー (試料を通り抜けた入射X線が検出器にあたることを防ぐ鉛板) によるものである。

ためと考えられる。

次の実験として、ATPを溶離溶媒に添加してクロマトグラフィーによる解析を検討した。ATPには紫外吸収があるため、蛋白質定量のための紫外吸光度計が利用できないので示差屈折計を利用した。その結果、蛋白質の溶出が確認できなかった。しかし、これはATP加水分解時に蛋白質に何らかの物性変化あることが示唆される結果と考えられたため、その原因を考察するため放射光X線溶液散乱測定を行った。

溶液X線散乱法は低分解能ではあるが溶液中の蛋白質の構造情報を得られる手法である^{1)~3)}。近年の放射光の発展により¹³⁾、比較的低濃度の試料での溶液散乱実験が可能となった^{1),2)}。しかしながら、本蛋白質の場合、放射能ダメージとデータのばらつきを考慮すると少なくとも0.3 mg/ml程度の蛋白質濃度が必要であった。図3

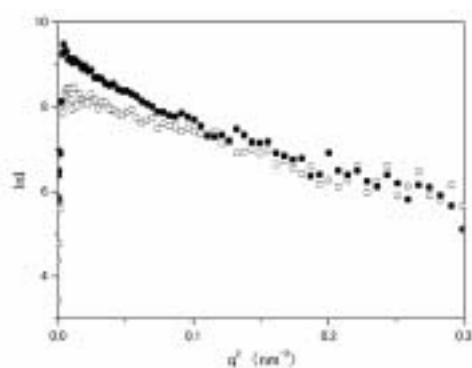


図4 X線溶液散乱データのギニエプロットの一
例
条件は図3と同じ。

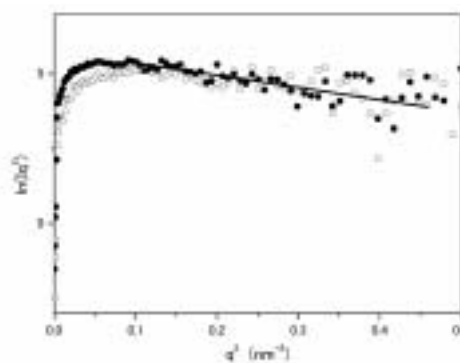


図5 X線溶液散乱データの厚みプロットの一
例
条件は図3と同じ。直線は厚み計算に利用した中
角領域データの直線近似により求めた。

は、ゲルクロマトグラフィーより主要蛋白質ピークの溶出液を分取し、ATPの添加の有無での放射光X線溶液散乱パターン（散乱ベクトル $q = (4\pi/\lambda) \sin \theta$, λ はX線波長, 2θ は散乱角）に対する散乱強度を示した。

図4に、上記のようにして得られた散乱データの散乱ベクトルの2乗に対する散乱強度の対数のプロット（ギニエプロット）を示した。小角散乱領域では、散乱強度 I は $I(0) \exp(-q^2 \cdot R_g^2/3)$ と表現できる。ここで、 R_g は回転半径、 $I(0)$ は角度ゼロにおける散乱強度である。この関係からギニエプロットの小角領域（ $q \cdot R_g < 1$ ）の直線の傾きと切片から、 R_g と $I(0)$ が評価できる³⁾。

その結果、ATPを添加しない時の R_g は 5.5 ± 2.0 nmで、ATPを添加すると R_g は 7.3 ± 1.5 nmとなった。一方、角度ゼロにおける散乱強度 $I(0)$ の値は、蛋白質の分子量に比例する値である。その $I(0)$ は、ATPを添加すると明らかに大きくなっている。概略的には、 $I(0)$ の値はATPの添加によりATP無添加時の $I(0)$ の約2.3倍の大きさであった。図1の光散乱測定の結果から、X線測定濃度域（約0.3mg/ml）では2量体であり、ATPの添加により4量体あるいはそれ以上の会合体形成が推定できる。

一方、散乱ベクトルの2乗に対する散乱強度と散乱ベクトルの2乗の積の対数の厚みプロット³⁾を図5に示した。これらの値は散乱ベクトル 0.1 nm^{-1} から 0.45 nm^{-1} の中角領域でよい直線性を示し、この傾きは円盤状粒子の厚さの回転半径 R_t の2乗に等しい。この結果からATPの添加の有無に関係なく示した領域ではほぼ同じ傾きを示すことがわかった。その傾きから、円盤の厚みは R_t の $\sqrt{2}$ 倍であるので、 7.0 ± 2.0 nmと計算できる。この値は、本蛋白質の単量体結晶構造⁷⁾から得られる本蛋白質の膜に垂直な方向の大きさにほぼ対応する大きさである。これらの結果は、ATPの添加で加水分解反応が始まり、

高次の会合体が平板状に形成されていることが示唆される。この高次構造形成が、ATP存在下のクロマトグラフィー解析を困難にしていると思われる。本蛋白質の活性構造については機能反応機構がきわめて複雑である¹⁰⁾ので、慎重に溶媒条件や解析手法をさらに検討する必要がある。

NMRは蛋白質の溶液構造を原子レベルで解析できる手法である¹⁴⁾。しかし、蛋白質の分子量が大きくても数万、通常は2万以下のものが主な対象となる。分子量十万以上の蛋白質の解析や相互作用により会合体を形成する場合などの分子論的な解析は、蛋白質の有効利用のためには不可欠な課題である。溶液散乱の長所は、生理的な条件ばかりでなく種々の溶媒条件での測定が可能である点である。従って、溶液散乱法は、蛋白質会合状態やゲル化初期過程あるいは分子間相互作用による超分子構造の解明に効果的に利用されることが期待される。さらに、蛋白質ばかりでなく多糖などの生体高分子についても本手法を適用することにより食品分野での生体分子素材の特性解明への貢献が期待できる。今後、より低濃度の試料を測定するには、さらに高輝度のX線を照射するか高効率検出器を導入するなど種々の観点から継続的な生体分子の測定を意識したX線溶液散乱測定装置の改良開発が必要であり、本研究の様なレーザー光散乱法の相補的な利用も有効であると考えられる。

謝 辞

研究予算の一部は、農林水産省プロジェクト研究予算の援助を受けた。溶液X線散乱測定は、放射光共同利用実験課題（番号03G139および05G084）として行った。

要 約

蛋白質の関連する多様な分野において、蛋白質の特性解析は蛋白質の素材としての有効利用に資することが期待される。対象となる蛋白質は必ずしも水溶性でなく、水に単独では溶けない疎水性である場合もあり、このような蛋白質の構造研究は蛋白質の新たな物性の探索にも必要と思われる。本研究では、疎水性蛋白質として骨格筋小胞体膜蛋白質CaATPaseを対象に、非イオン性界面活性剤と脂質共存下の可溶性蛋白質の溶液散乱測定を試みた。その結果、本疎水性蛋白質の機能発現には高次会合体形成が重要であることが示唆された。

文 献

- 1) 渡邊 康, 猪子洋二, 小林克巳, タンパク質の放射光溶液X線散乱測定におけるX線透過率の同時評価, 食品総合研究所研究報告, **69**, pp19-22 (2005).
- 2) 渡邊 康, 猪子洋二, タンパク質のクロマトグラフィー検出手段としての溶液X線散乱測定, 食品総合研究所研究報告, **70**, pp1-5 (2006).
- 3) Pilz, I., Proteins. In "Small angle X-ray scattering", eds. Glatter, O. and Kratky, O., Academic Press, pp239-293 (1982).
- 4) Y. Watanabe, Characterization of the refolding and reassembly of an integral membrane protein OmpF porin by low-angle laser light scattering photometry coupled with high-performance gel chromatography, *J. Chromatogr. A*, **961**, 137-146 (2002).
- 5) Y. Watanabe and Y. Inoko, Physicochemical characterization of the reassembled dimer of an integral membrane protein OmpF porin, *The Protein Journal*, **24**, 167-174 (2005).
- 6) C.J. Brandl, S. deLeon, D. R. Martin and H. MacLennan, Adult forms of the Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* **262**, 3768-3774 (1987).
- 7) C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura and H. Ogawa, Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution, *Nature*, **405**, 647-655 (2000).
- 8) D. W. Martin, C. Tanford and J. A. Reynolds, Monomeric solubilized sarcoplasmic reticulum Ca pump protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6623-6626 (1984).
- 9) M. H. Fagan and T. G. Dewey, Resonance Energy transfer study of membrane-bound aggregates of the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase, *J. Biol. Chem.* **261**, 3654-3660 (1986).
- 10) M. Shigekawa, S. Wakabayashi and H. Nakamura, Reaction mechanism of Ca^{2+} -dependent adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* **258**, 8698-8707 (1983).
- 11) G. D. Fasman, Handbook of biochemistry and molecular biology, Vol.2, CRC Press, Cleveland, OH, (1976).
- 12) N. M. Green and P.M.D. Hardwicke, The Effect of Delipidation on the adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.* **42**, 183-193 (1974).
- 13) 菊田惺志, 放射光光源, 「X線回折・散乱技術(上)」, 初版 (東京大学出版会, 東京), pp176-200 (1997).
- 14) K. Wüthrich, NMR of proteins and nucleic acids, John Wiley & Sons (1986).

