

研究ノート

界面活性剤で可溶化された生体膜タンパク質の熱処理特性の評価

渡邊 康*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Characterization of heat-treatment properties of a membrane protein solubilized in the presence of a surfactant

Yasushi Watanabe*

NARO, National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

In order to understand the structural properties of a food-related hydrophobic protein, the heat-induced denaturation of an integral membrane protein OmpF porin in the presence of an anionic surfactant, sodium dodecyl sulfate, was characterized by circular dichroism spectroscopy and gel electrophoresis. The cooperative irreversible transition of the mean residue ellipticity of OmpF porin was observed between 60 °C and 80 °C at pH 7. The native β -structure of OmpF porin trimer is converted to an α -helix-like structure of the denatured monomer upon heating. The denatured protein in the presence of sodium dodecyl sulfate has no transition upon heating as followed by circular dichroism spectroscopy. This property will be the same as that of protein polypeptides derived from water-soluble proteins in complex with the surfactant micelles.

Keywords: membrane protein, sodium dodecyl sulfate, circular dichroism, protein solution property

緒言

食品の製造や開発において、タンパク質の構造物性の特性評価は重要な課題の一つである。タンパク質は生命現象の一端を担う重要な生体高分子であるばかりでなく食品関係分野においても重要な素材であり機能性成分である。タンパク質の研究やその有効利用はそ

の扱いやすさから水溶性タンパク質を中心に展開されてきた。しかし、生体膜タンパク質は、受容体やその存在状態など水溶性タンパク質にない特性を持つものとして注目されているがその研究は立ち遅れている¹⁾。生体膜タンパク質の研究は、生命科学分野だけでなく農業や食品などのタンパク質の係わる多くの分野において基盤的側面から発展させて開発応用に資する意義がある。生体膜タンパク質は単独では水

* 連絡先 (Corresponding author), yasuw@affrc.go.jp

に不溶であるため、水に可溶化する主要な方法としては界面活性剤の利用が考えられる。可溶化することにより、タンパク質の溶液物性特性を評価する事ができる^{2)~6)}。

本研究では、食品分野に関係する水に不溶性の生体膜タンパク質の構造物性特性の知見を得るため、陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で可溶化された大腸菌外膜タンパク質OmpF ポーリン (外膜に内在して分子量600以下の親水性小分子に対する孔を形成する。ファージの受容体としても注目されている。)^{7), 8)}の熱処理による構造変化を円偏光二色性スペクトル測定による2次構造を指標として評価した。SDSはタンパク質に対して変性作用をもつ界面活性剤であり、ゲル電気泳動法として、食品関係分野をはじめタンパク質に関係する分野において常法として広範囲に利用されている。また、大腸菌外膜生体膜タンパク質OmpF ポーリンのこの界面活性剤による可溶化状態は室温付近では天然構造を維持した3量体として存在することが知られている^{2)~4), 6)~8)}。本研究では、これまで十分に知見のない本タンパク質の熱処理による構造変化およびSDS存在下で変性したタンパク質の構造特性について報告する。

実験方法

OmpF ポーリンは、大腸菌 (*E. coli* B) から精製した^{2), 3)}。SDSはBDH Chemicals から購入した。ウシ炭酸脱水酵素とウシ血清アルブミンは、それぞれシグマおよび千葉畜産工業 (株) から購入した。

精製標品を1.0 mg/mLのSDS, 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) で平衡化したゲル濾過クロマトグラフィーカラム (ガードカラム TSK-GCSWXL (ϕ 6 × 40 mm) および主カラム TSK-G3000SWXL (ϕ 7.8 × 300 mm), 東ソー (株)) に供することにより、3量体のシングルピークの分画溶液を分取し基準試料溶液とした。タンパク質濃度は、測定用のセルに注入する直前に上記カラム平衡化緩衝液で希釈することにより0.1 mg/mLに調整した。タンパク質濃度は280 nmにおける吸光係数値1.41 mL/(mg · cm) を利用して決定した⁷⁾。

ウシ炭酸脱水酵素とウシ血清アルブミンの熱処理変性タンパク質溶液は、2.0 mg/mLのSDS, 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) にタンパク質濃度が0.5 mg/mLになるように調製した。ウシ血清アルブミン溶液には1.0 mg/mLのジチオトレイトールをさらに

添加しジスルフィド結合を還元切断した。その各試料溶液をキャップ付きガラス試験管に入れ、95 °Cの湯中に5分間投入し変性試料溶液を調製した。その試料溶液を室温に冷却してから、0.45 μ mのメンブレンフィルター (日本ミリポア (株), HV) にて濾過後に1.0 mg/mLのSDS, 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) で平衡化した上記ゲル濾過カラムに添加して、主タンパク質のピーク溶出液を分取した。その後、タンパク質濃度が0.1 mg/mLになるようにカラム平衡化緩衝液で調製直後にスペクトルを測定した。ウシ炭酸脱水酵素とウシ血清アルブミンのタンパク質濃度は280 nmにおける吸光係数値、それぞれ1.90および0.678 mL/(mg · cm), を利用して決定した⁹⁾。

円偏光二色性スペクトル測定には、円二色性分散計 (日本分光 (株), J-720) を使用した。厚さ (光路長) 1 mmの石英セルを用いて、恒温槽の水を循環させたセルブロックの温度をデジタル温度計 (安立計器 (株), HL-200) によってモニターした。各測定温度で10分間静置した後にその温度でスペクトル測定した。測定条件は、波長250 nmから200 nmまで、スキャンスピード50 nm/min, 感度50 mdeg, 積算回数20回, 他の条件は装置の取扱説明書に記載された設定で行った。溶質からのスペクトルはタンパク質以外の成分を含む溶媒の測定データを差し引いた。平均残基モル楕円率 $[\theta]$ (deg · cm²/dmol) は各タンパク質の平均残基分子質量, OmpF ポーリン; 109 g/mol^{10), 11)}, ウシ炭酸脱水酵素とウシ血清アルブミン; 110 g/mol⁹⁾, を使用して計算した。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、試料溶液を各温度で10分間処理した後室温に冷却後にLaemmliの方法¹²⁾に従い、厚さ1 mm, 長さ70 mmの12.5%ゲルを用いて20 mA定電流で約80分間泳動した。泳動後のゲル中のタンパク質バンドはクマシーブリリアントブルー R250で染色した。

実験結果および考察

生体膜タンパク質は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ため、本研究ではタンパク質に対して変性作用を示す陰イオン界面活性剤SDSを使用した。また、試料溶媒中のSDSの濃度は1.0 mg/mL (3.5 mM) で、本研究と同様溶媒条件の臨界ミセル濃度は1.4 mMである¹³⁾のでSDSはミセルを形成してタンパク質可溶化に十分な濃度である。大腸菌外膜タンパク質OmpFポー

リンは、室温付近においてはこの界面活性剤ミセル中で β バレル構造からなる単量体で形成される3量体として可溶化されていることは知られている^{2),3),7),8)}。

図1に本タンパク質のSDSで可溶化された条件下の遠紫外部(200 nm-250 nm)の円偏光二色性スペクトルを示す。遠紫外部の円偏光二色性スペクトルはタンパク質の二次構造を反映する¹⁴⁾。25℃においては、 β 構造に特徴のある217 nm付近の平均残基モル楕円率 $[\theta]$ の極小値と、206 nm付近の $[\theta]$ のゼロ値との交点がみられる。65℃においては、217 nm付近の $[\theta]$ の極小値の値が25℃の値より約1割小さくなっているものの、206 nm付近の $[\theta]$ のゼロ値との交点は存在し、 β 構造に特徴的なスペクトルがみられる。75℃においては、217 nm付近の $[\theta]$ の極小値はあるが、206 nm付近の $[\theta]$ のゼロ値との交点は存在しない。さらに、95℃においては205 nm付近ではデータに乱れがあるが、217 nm付近の $[\theta]$ の極小値と206 nm付近の $[\theta]$ のゼロ値との交点は存在しない。図1には、95℃まで処理して測定した後25℃に冷却してから25℃で測定した円偏光二色性スペクトルも示している。このスペクトルは207 nm付近の極小値と220 nm付近の負のシグナルを示し、これはランダムコイルと α ヘリックス様の構造が混在す

る事を示す¹⁴⁾。

図2に、本タンパク質の25℃の円偏光二色性スペクトルで特徴のあった217.5 nmと207 nmの $[\theta]$ の温度依存性を示す。217.5 nmの $[\theta]$ の絶対値は約70℃までは徐々に直線的に減少し、70℃から80℃の間に構造が一気に崩壊する協同的な変化が認められる。さらに、80℃以上ではわずかな変化はあるものの顕著な変化はない。一方、207 nmの $[\theta]$ の変化は約60℃まではほとんど変化はなく、60℃から80℃の間に協同的な変化が認められる。80℃以上では217.5 nmと同様に顕著な変化はない。転移温度が波長により差があるのは、それぞれの波長に反映する構造特性が異なるためかもしれない。一方、昇温後に冷却した場合の変化は、それぞれの波長の $[\theta]$ の絶対値は徐々に直線的に増大し、昇温時の協同的な変化は観察されなかった。この結果は、SDS存在下の本タンパク質の熱変性は不可逆的な現象であることを示す。図3は、本タンパク質溶液を熱処理後にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動した結果であり、熱処理により3量体が単量体に解離していることがわかる。円偏光二色性データとの関係では、3量体は β 構造を維持していて単量体は天然構造と異なる変性状態であると考えられる。この変性と解離が同期する結果は、

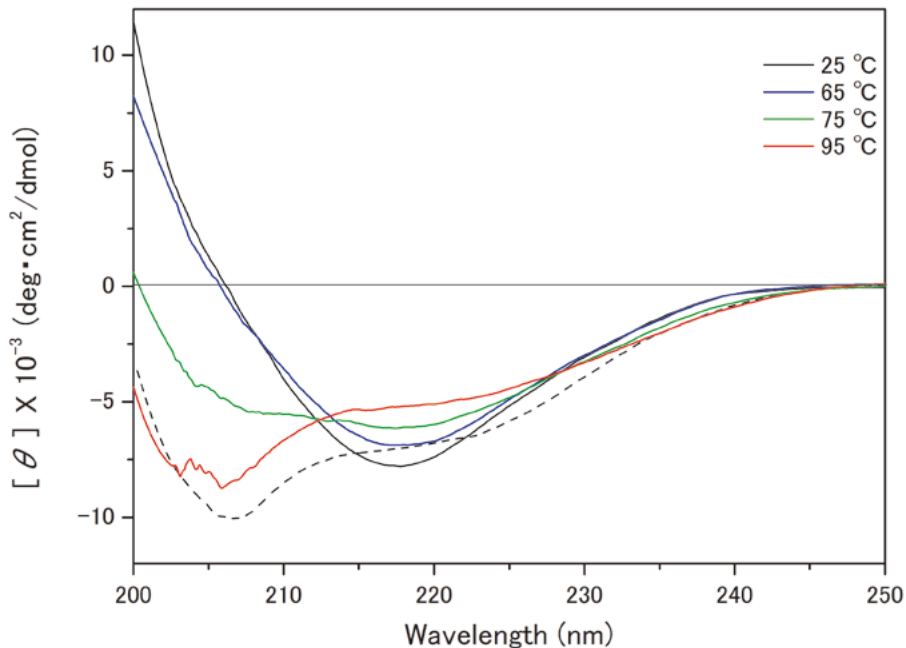


図1. OmpF ポーリンの円偏光二色性スペクトル

各温度は図中に示した。破線は95℃処理後25℃に冷却してから25℃で測定したスペクトルである。

これまでの本タンパク質の熱変性実験の結果⁶⁾と一致するものの、変性温度は50℃と70℃の間との報告⁶⁾であり、本研究の結果(図2と図3)の方が高温域(60℃から80℃)であった。この結果の違いは実験条件(pH 8.3, 昇温速度90℃/時間など)が異なるためと考えられるが、この変性が不可逆反応のため熱力学的解析ができないので本研究ではこれ以上の実験条件の精査はしなかった。

つぎに、SDS存在下で変性したタンパク質の構造特性をさらに調べるため、SDS-PAGEの分子量マーカーとして利用されている2種の水溶性タンパク質(ウシ炭酸脱水酵素とウシ血清アルブミン)について円偏光二色性スペクトルを測定した。図4は、それらSDS存在下で変性したタンパク質の25℃と95℃の円偏光二色性スペクトルを示している。明らかに、OmpFポリーンの変性状態のスペクトル(図2)と同様にそれらすべてのスペクトルの形状が $[\theta]$ の極小値の違いはあるものの相互に似ている。つまり、ランダムコイルと α ヘリックス様の構造が混在する構造であり、SDS存在下の変性タンパク質に共通する構造特性であることが示唆される。しかし、この α ヘリックス様の二次構造が天然構造の一部と一致するものか不明である。

また、図4の挿入図には α ヘリックス様の構造を示すスペクトルに特徴のある220 nmと207 nm付近の $[\theta]$ の温度依存性を示して、測定した25℃と95℃の範囲内では協同的変化はみられない。この

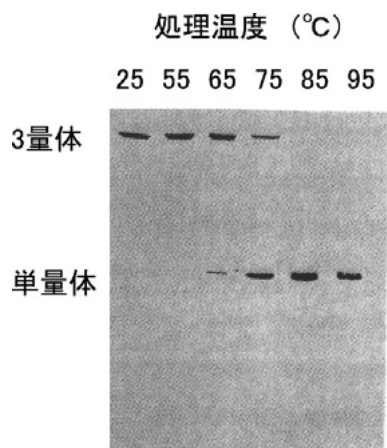


図3. 熱処理後のOmpFポリーンのSDSゲル電気泳動のパターン

処理温度は図中に示した。

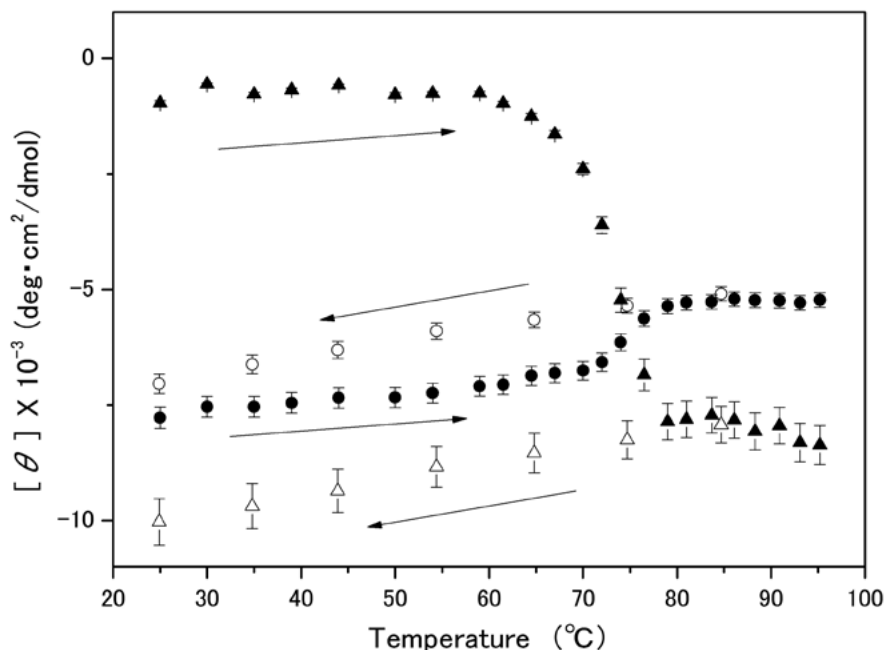


図2. 平均残基モル楕円率 $[\theta]$ の温度依存性

●は217.5 nm昇温, ○は217 nm降温条件で, ▲は207 nm昇温, ▲は207 nm降温条件のデータを示す。矢印は温度変化の方向を示した。

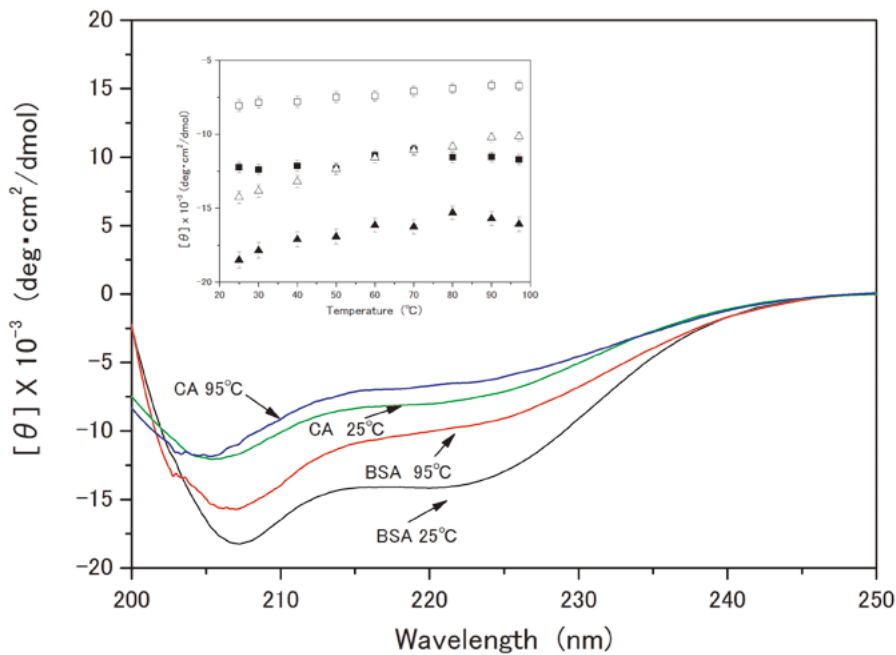


図4. SDS存在下で熱処理したタンパク質の円偏光二色性スペクトル

BSAはウシ血清アルブミン、CAは炭酸脱水酵素を示している。挿入図は、BSA (▲ 207 nm, △ 220 nm) と CA (■ 206 nm, □ 220 nm) について、平均残基モル楕円率 $[\theta]$ の昇温依存性を示した。

結果はSDS存在下の変性タンパク質は天然構造を維持している水素結合をはじめとする種々の相互作用ネットワークが壊れていることを示し、SDS存在下の変性タンパク質に共通する構造特性であることが示唆される。我々はOmpFポアリンの変性単量体へのSDS結合量はタンパク質グラムあたり1.6gであり、同溶媒条件下で変性した水溶性タンパク質へのSDS結合量と同程度であることを報告している¹⁵⁾。この結果はこれら変性タンパク質の単位長さ当たりの荷電量がほぼ一定であることを示している。これら共通の構造物性特性が、SDS-PAGEが分子量の違いで変性タンパク質を分離する方法として利用されている物理化学的な根拠の一つと考えられる。このような溶液中のタンパク質分子の構造物性の知見の蓄積は、今後のタンパク質が関与する食品バイオテクノロジーの発展に寄与することが期待できるので多様な対象について試験研究することが今後も必要と考えられる。

要約

食品分野に関係する水に不溶性の生体膜タンパク質の構造特性の知見を得るため、陰イオン界面活性剤で

あるSDSによる可溶化状態の大腸菌外膜タンパク質OmpFポアリンの円偏光二色性スペクトル測定およびゲル電気泳動法により、pH7における構造特性の温度依存性を評価した。本タンパク質は60℃付近まではβ構造をもつ3量体として可溶化しており、60℃から80℃の間に協同的な構造転移がみられ、αヘリックス様の構造をもった変性単量体へ不可逆的に解離する。このSDS存在下の変性タンパク質の平均残基モル楕円率の温度依存性は、25℃と95℃の範囲内では協同的な変化は観察されなかった。この結果はSDS存在下の変性タンパク質に共通する構造特性であることが示唆された。

文献

- 1) 岩田 想, 「膜タンパク質構造研究」, 第1版 (化学同人, 京都) (2013).
- 2) Watanabe, Y., 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).

- 3) Watanabe, Y. and Inoko, Y., Physicochemical characterization of the reassembled dimer of an integral membrane protein OmpF porin, *Protein J.*, **24**, 167-174 (2005).
- 4) 渡邊 康, 猪子洋二, 生体膜蛋白質の溶液中の集合状態の特性評価, 食品総合研究所研究報告, **73**, 53-57 (2009).
- 5) 渡邊 康, 猪子洋二, 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, 食品総合研究所研究報告, **71**, 33-37 (2007).
- 6) Markovic-Housley, Z. and Garavito, M., Effect of temperature and low pH on structure and stability of matrix porin in micellar detergent solutions, *Biochim. Biophys. Acta*, **869**, 158-170 (1986).
- 7) Rosenbusch, J. P., Characterization of the Major Envelope Protein from *Escherichia coli*. , *J. Biol. Chem.*, **249**, 8019-8029 (1974).
- 8) Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. and Rosenbusch, J. P., Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins, *Nature* **358**, 727-733 (1992).
- 9) Fasman, G.D., "Handbook of biochemistry and molecular biology", Vol.2, CRC Press, Cleveland, OH, (1976).
- 10) Chen, R., Krämer, C., Schmidmayr, W., Chen-Schmeisser, U. and Henning, U., Primary structure of major outer-membrane protein I (*ompF* protein, porin) of *Escherichia coli* B/r, *Biochem. J.* **203**, 33-43 (1982).
- 11) Inokuchi, K., Mutoh, N., Matsuyama, S. and Mizushima, S., Primary structure of the *ompF* gene that codes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12, *Nucleic Acids Res.* **10**, 6957-6968 (1982).
- 12) Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 13) Kratochvil, J.P., Comments on some novel approaches for the determination of micellar aggregation numbers, *J. Coll. Int. Sci.*, **75**, 271-275 (1980).
- 14) Greenfield, N.J. and Fasman, G.D., Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry*, **8**, 4108-4116 (1969).
- 15) Watanabe, Y., Okuno, T., Ishigaki, K. and Takagi, T., Assessment study on the high-performance liquid chromatography-type hydroxyapatite chromatography in the presence of sodium dodecyl sulfate, *Anal. Biochem.*, **202**, 268-274 (1992).