

# コレステロール-プルラン分子集合体と牛血清アルブミンとの相互作用に関する熱的研究

三井佳和\*, 児玉美智子\*, 西川雄大\*\*, 秋吉一成\*\*, 砂本順三\*\*

(平成7年2月20日受理)

## Thermodynamic Characterization of Interaction between Self-Aggregates of Cholesterol-bearing Pullulan and Bovine Serum Albumin

Yoshikazu Mitsui\*, Michiko Kodama\*, Takehiro Nishikawa\*\*, Kazunari Akiyoshi\*\* and Junzo Sunamoto\*\*

(Received February 20, 1995)

Based on the fact that a self-aggregate of hydrophobized pullulan containing 1.7 cholesterol groups per 100 glucose units (CHP) incorporates water-soluble proteins into its hydrogel core in aqueous medium<sup>1-3)</sup>, the interaction between the CHP self-aggregate and bovine serum albumin (BSA) was investigated by high-sensitivity differential scanning calorimetry, high-sensitivity isothermal titration calorimetry and circular dichroism spectroscopy. The isothermal calorimetric technique at 25 °C showed that an incorporation of BSA into the CHP aggregate is exothermic, characterized by the enthalpy change ( $\Delta H_b$ ) of  $-98 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  of BSA, the binding constant of  $8.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  and the saturation stoichiometry equivalent of 1 BSA molecule for every 11 CHP molecules constructing one self-aggregate. Additional techniques indicated that the incorporated BSA shows a decrease of helix content by about 10% and no thermal N-D transition on heating up to 100 °C. These results suggested that the present reaction is due to an enthalpic contribution (negative value of  $\Delta H_b$ ) associated with a conformational change of the CHP aggregate as a host on incorporating the guest BSA, mostly likely in a way such as a formation of intermolecular hydrogen bonding between the CHP polysaccharide chains and the hydrophilic protein. As a result, hydrogen bonded BSA was considered to be thermally stabilized at least up to 100 °C.

### 1. 緒 言

生体は、多糖類、タンパク質、核酸および脂質などの生体

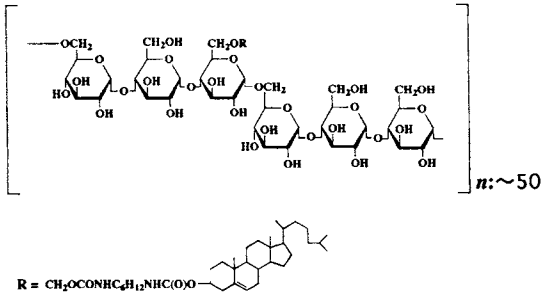
高分子から構成されている。これらの高分子の主鎖や側鎖に官能基や金属イオンなどを導入してつくられる機能性高分子が、医薬分野の材料として、今日、大変注目を集めている

\* 岡山理科大学理学部生物化学科：〒700 岡山市理大町1-1

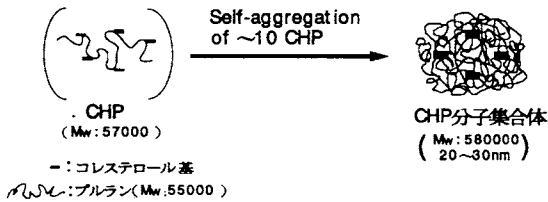
Department of Biochemistry, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Okayama 700, Japan

\*\* 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学教室：〒606-01 京都市左京区吉田本町

Division of Synthetic Chemistry & Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan



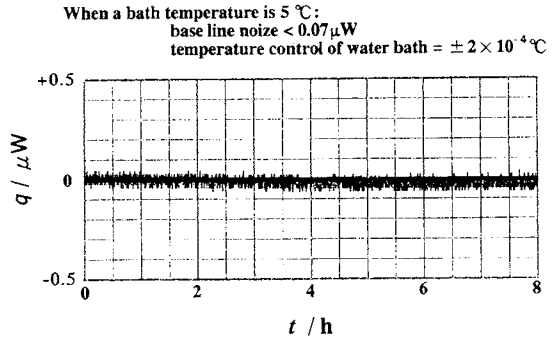
**Fig.1** Structure of cholesterol-bearing pullulan (CHP).  $n$  indicates the number of a repeated saccharide-chain unit shown by [ ].



**Fig.2** Schematic illustration showing a formation of CHP self-aggregates in aqueous medium.

る<sup>1)</sup>。これに関連して砂本らのグループ(京都大学・工学部)は、天然多糖プルラン(重量平均分子量: ~55000,  $n \sim 50$ )の水酸基部分に疎水基-コレステロール基を導入したコレステロール置換プルラン誘導体(Fig.1参照、以後CHPと略す)を開発した<sup>2)</sup>。彼等らは、このCHPを水溶液中に懸濁すると約10分子が会合して粒径20~30nmの分子集合体(会合体分子量: ~58万)を形成することを明らかにしている(Fig.2参照)<sup>2)</sup>。さらに、彼等はこのCHP分子集合体が種々の水溶性タンパク質(牛血清アルブミン、 $\alpha$ -キモトリプシンなど)を内部に選択的に取り込む(包接する)特性を有することも明らかにしている<sup>3)</sup>。

本研究においては、このCHP分子集合体がタンパク質を取り込む機構や、取り込まれた後のタンパク質の構造変化・安定性を化学熱力学的立場から解明するために、高感度恒温滴定型熱量測定および高感度示差走査熱量測定を行った。タンパク質としては、牛血清アルブミンを用いたが、このタンパク質の構造的知見を得るために円偏光二色性スペクトル測定も行った。



**Fig.3** Base-line noise of TAM measured at 5°C over 8 hours with stirring at 30 rpm.

## 2. 実験

### 2.1 コレステロール置換プルラン誘導体 (CHP) 溶液の調製

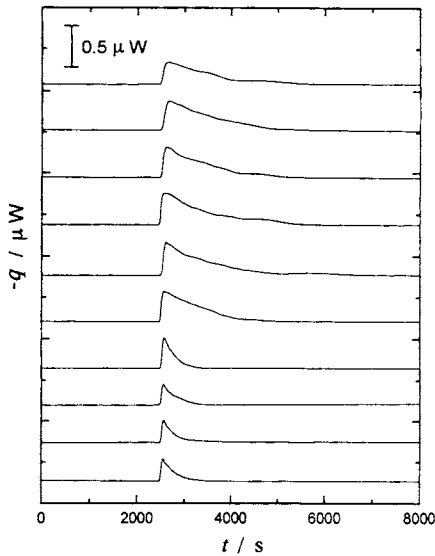
本研究においては100単糖当たり1.7個のコレステロール基を含むCHPを用いたが、これは、砂本らによって合成された<sup>2)</sup>。このCHPを10mMリン酸Na塩緩衝溶液(pH=7.00)に温度50°Cで12時間膨潤させた後、プローブ型ソニケーター(TOMY,UR-200P)を用いて出力40Wの超音波照射を20分間施すことでCHP分子集合体溶液を調製した<sup>2)</sup>。また、CHP濃度はフェノール硫酸法によって決定した<sup>4)</sup>。

### 2.2 牛血清アルブミン (BSA) 溶液の調製

牛血清アルブミン(Code No.250010 Lot No.86)はMiles社から購入した。このBSA内に1つ存在するシステイン残基(-SH基)は、BSA分子間のS-S結合をつくりやすい。そこで、この反応を阻止するために、ヨードアセトアミド(ナカライテスク,SH基蛋白質研究用試薬)を用いて-SH基を-SCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>に置換した<sup>5)</sup>。次に、このBSA溶液をPharmacia LKB社製Sephacryl S-200HRカラム(2.5×100cm)を用いてゲルろ過し、単量体BSAのみを分取した。さらに、この試料を全自動水平型電気泳動システム(Phast System,Pharmacia LKB社製)を用いて電気泳動し、単量体BSAであることを再確認した<sup>5)</sup>。本研究においては、この単量体BSAを用いた。また、BSA濃度は、280 nmの吸光度から吸光度係数 $A^{1\text{mol}}_{1\text{cm}} = 44.500$  ( $A^{1\text{g}}_{1\text{cm}} = 6.67$ )を用いて算出した<sup>6)</sup>。

### 2.3 高感度恒温滴定型熱量測定

高感度恒温滴定型熱量測定はThermoMetric社製の高感度恒温熱量計(TAM)を滴定モードで使用することで行った<sup>7)</sup>。Fig.3に示すように、この装置の基線のノイズレベルは温度5°Cにおいて<0.07 μWである。また、この測定に際しての試料の注入操作、データの取り込みおよび解析は



**Fig.4** Calorimetric record from the titration of CHP self-aggregates with BSA. 20  $\mu$ l BSA solution (3.3 nmol) was injected in each step. The amount of CHP in the calorimetric cell is 0.21  $\mu$ mol.

すべてIBM コンピューターの制御下で行った。

**2.4 高感度示差走査熱量測定**

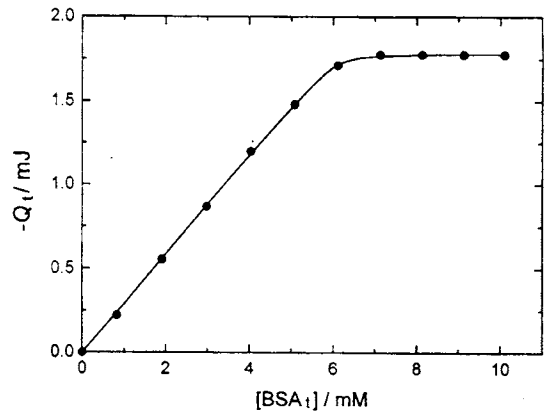
高感度示差走査熱量測定 (DSC) は, Microcal 社製 (U.S.A.) MC-2 型高感度示差走査熱量計を用いて行った。この測定でのデータの取り込み, 解析および熱量計の制御は, A/D-converter (Data Translation DT-2801) 内蔵の IBM-PS2 computer の制御下で行った。また, 測定に用いた昇温速度は 45  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}^{-1}$  である。

**2.5 円偏光二色性 (CD) スペクトル測定**

円偏光二色性スペクトル測定は日本分光社製 J-720 を用いて温度 25  $^{\circ}\text{C}$  で行った。

**3. 結果と考察**

**Fig.4** は温度 25  $^{\circ}\text{C}$  で行った高感度恒温滴定型熱量測定の結果を示す。本実験においては, CHP 分子集合体溶液 (CHP 濃度: 68.9  $\mu\text{M}$ , 全量 3 ml) を含む熱量計セル中に専用のシリンジ (HAMILTON, 250  $\mu$ l) を用いて, BSA 溶液 (BSA 濃度: 165.4  $\mu\text{M}$ ) を以下の条件で計 10 回注入した; 注入量: 20  $\mu$ l, 注入間隔: 2 時間, 注入速度: 0.5  $\mu$ l/s。 **Fig.4** は 1 回から 10 回の注入毎の熱量変化 ( $-q/\mu\text{W}$ ) を上から順に示す。BSA を注入すると長時間 ( $\sim$ 1 時間) に渡っての発熱ピークが観察された。注入毎の測定熱量 ( $Q_{\text{cal}}/\mu\text{J}$ ) は, 注入回数が増大に伴って次第に減少し, 8 回目からの注入ではほぼ一定値を示した。そこで, (1) 式に



**Fig.5** The sum of experimental heat quantities,  $Q_1$ , associated with incorporation of BSA into CHP self-aggregates as a function of the total BSA concentration,  $[\text{BSA}_1]$ . The solid line is the best-fitted curve to eq (6).

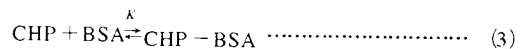
したがって目的とする注入毎での CHP-BSA の反応熱 ( $Q_{r,i}$ ) を求め, 次に (2) 式にしたがって累積熱 ( $Q_1$ ) を算出した<sup>9)</sup>。

$$Q_{r,i} = Q_i^{\text{cal}} - (Q_{d,i} + Q_{m,i}) \dots\dots\dots (1)$$

$$Q_1 = \sum_i Q_{r,i} \dots\dots\dots (2)$$

ここで  $Q_i^{\text{cal}}$ : 注入毎での測定熱量,  $Q_{r,i}$ : 注入毎での CHP と BSA の反応熱,  $Q_{d,i}$ : 注入毎での CHP および BSA の希釈熱,  $Q_{m,i}$ : 注入毎での BSA の注入に伴う機械的な熱,  $Q_1$ : CHP と BSA の累積反応熱を示す。

**Fig.5** は, この累積熱 ( $Q_1$ ) を熱量計セル中の BSA の全濃度  $[\text{BSA}_1]$  に対してプロットした結果を示す。これらの実測値を結んだ曲線は Ligand 結合等温曲線の形状を示し, この結果は, CHP と BSA との間に (3) 式および (4) 式で示す結合平衡が成立することを示唆する。この平衡が成立すると仮定すると, 累積熱 ( $Q_1$ ) は (5) 式および (6) 式で表わされる<sup>9, 10)</sup>。



$$K = \frac{[\text{CHP-BSA}]}{[\text{CHP}_f][\text{BSA}_f]} \dots\dots\dots (4)$$

ここで  $K$ : 結合定数,  $[\text{CHP}_f]$ : 遊離の CHP 濃度,  $[\text{BSA}_f]$ : 遊離の BSA 濃度,  $[\text{CHP-BSA}]$ : CHP-BSA 複合体濃度を示す。

$$Q_i = \Delta H_b [BSA_b] V \dots\dots\dots (5)$$

$$Q_i = \frac{B+C[BSA_i] - \{(B+C[BSA_i])^2 - D[BSA_i]\}^{1/2}}{A}$$

$$A = \frac{2K}{V\Delta H_b}, B = 1 + [CHP_1]nK, C = K, D = 4[CHP_1]nK^2 \dots\dots\dots (6)$$

ここでの  $Q_i$  : 累積反応熱,  $\Delta H_b$  : 結合エンタルピー (BSA 1mol 当たり),  $V$  : 反応体積,  $[BSA_b]$  : 結合している BSA 濃度,  $n$  : CHP の結合サイト数,  $[CHP_1]$  : 全 CHP 濃度,  $[BSA_i]$  : 全 BSA 濃度を示す。

(6) 式に示す累積熱 ( $Q_i$ ) は  $K, n$  および  $\Delta H_b$  の 3 種の未知数を含んでいるけれども, BSA の全濃度  $[BSA_i]$  の関数として表わされている。したがって, Fig.3 の実測値を結んだ曲線は (6) 式で表示されることになる。そこで, (6) 式を用いて Fig.5 の実測値に対する最適化曲線をコンピューターによる非線形最小二乗法から求めた<sup>11)</sup>。得られた最適化曲線を Fig.5 に実線で示す。この曲線から未知数である  $K, n$ , および  $\Delta H_b$  を算出し, 次に, (7) 式および (8) 式を用いて, この反応での標準自由エネルギー変化量 ( $\Delta G^\circ$ ) ならびに標準エントロピー変化量 ( $\Delta S^\circ$ ) を求めた<sup>12)</sup>。

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \dots\dots\dots (7)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H_b + T\Delta S^\circ \dots\dots\dots (8)$$

得られた  $K, n$  および熱力学量を一括して Table 1 に示す。 $n$  値からは, CHP の ~11 分子に対して BSA の 1 分子が結合することが示される。1 つの CHP 分子集合体が約 10 分子の CHP から構成されていることを考慮すると<sup>2)</sup>, CHP 分子集合体にはほぼ 1 分子の BSA が取り込まれていることが示唆される。また, 高い  $K$  値からは, CHP と BSA の結合が強固であることが示唆される。 $\Delta H_b, \Delta G^\circ$  および  $\Delta S^\circ$  値を比較すると, CHP 分子集合体への BSA の取り込み機構は, 負値の  $\Delta H_b$  がもたらすエンタルピー効果に基づくことが明らかにされる。

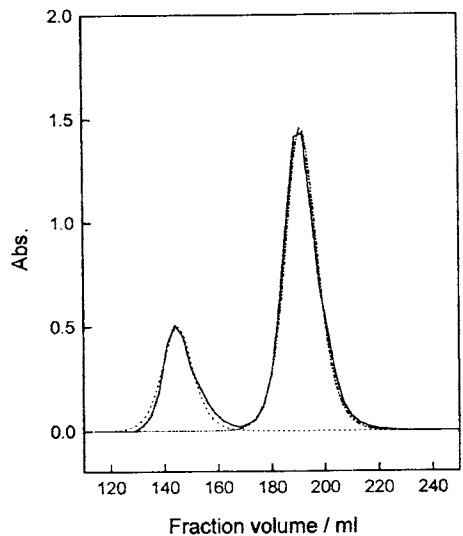
本研究に用いた恒温型および走査型の 2 種の高感度熱量計は, 感度的に約 1 オーダーの違いがある。そこで, CHP 分子集合体に取り込まれた BSA の熱構造転移を高感度示差走査熱量測定から検討するために, この測定に見合うより

**Table 1** Thermodynamics of incorporation of BSA into CHP self-aggregates (25 °C, phosphate buffer, pH 7.0) .

$\frac{K}{M^{-1}}$	$n$	$\frac{\Delta H_b}{kJ mol^{-1}}$	$\frac{\Delta G^\circ}{kJ mol^{-1}}$	$\frac{\Delta S^\circ}{kJ K^{-1} mol^{-1}}$
$8.5 \times 10^7$	0.088	-98.3	-45.3	-0.18

濃度の高い CHP 分子集合体-BSA 複合体試料を以下の方法にしたがって調製した: (2.1) で調製した CHP 分子集合体溶液 (CHP 濃度: 22  $\mu M$ , 7 ml) に (2.2) で調製した BSA 溶液 (172  $\mu M$ , 3.2 ml) を加え 25 °C で 12 時間攪拌した。その後, Sephacryl S-200HR カラム (2.5  $\times$  100 cm) によるゲルろ過によって, CHP 分子集合体-BSA 複合体のみを分取した。上述のゲルろ過の結果を Fig.6 に示すが, BSA の分画試料の吸光度 (Abs.) を溶出量 (ml) に対してプロットする。この図に示すように吸光度 (Abs.) vs. 溶出量 (ml) 曲線は CHP 分子集合体-BSA 複合体 (120 ~ 165 ml) と単量体 BSA (165 ~ 230 ml) の 2 つのピークに分離される。そこで, このゲルろ過によって単離された CHP 分子集合体-BSA 複合体溶液を限外濾過法 (Grace 社製, ULTRAFILTRATION) によって濃縮し, 目的濃度の CHP 分子集合体-BSA 複合体溶液を作成した。得られた複合体のみを含む溶液中での BSA 濃度は  $4.03 \sim 4.09 \times 10^{-6} M$  である

上述の方法にしたがって調製された CHP 分子集合体-BSA 複合体試料 (a) の高感度示差走査熱量測定の結果を単量体 BSA (b) との比較において Fig.7 に示す。単量体 BSA は熱構造転移 (天然状態から熱変性状態) に基づく吸熱ピークを示すが<sup>8)</sup>, CHP 分子集合体-BSA 複合体においては, この転移ピークはまったく検出されない。この結果をもたす原因として 2 つのことがあげられる。1 つは, BSA が CHP 分子集合体内部に取り込まれることによって, そのタンパク質の立体構造が壊されることである。もう 1



**Fig.6** Gel filtration of the CHP-BSA complex by a Sephacryl S-200HR in phosphate buffer solution (pH 7.0) .

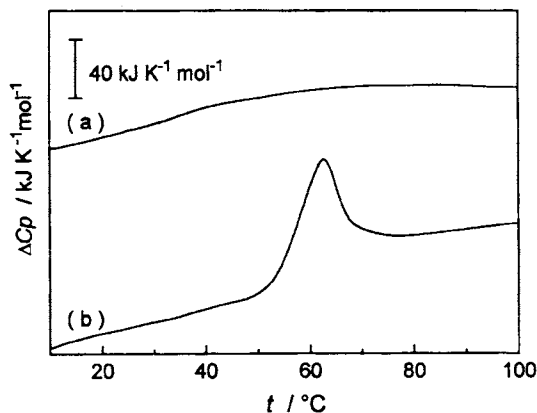


Fig.7 Excess heat capacity,  $\Delta C_p$ , versus temperature,  $t$ , curves of the CHP-BSA complex (a) and free BSA (b) in phosphate buffer solution (pH 7.0).

つは、CHPの糖鎖水酸基がプロトン供容体として作用することで、BSAとの間に直接あるいは水を介した水素結合を形成し、その結果、このタンパク質が熱的に著しく安定化(熱運動が制限)されることである。この二者択一の問題には、CHP分子集合体内部に取り込まれたBSAの構造が大きく関わる。そこで、CHP分子集合体内部に取り込まれたBSAの構造的知見を得るために、CDスペクトル測定を行った。

Fig.8は単量体BSA (a)、DSC前(高温を経験していない試料)のCHP分子集合体-BSA複合体(b)およびDSC後(高温を経験した試料)のCHP分子集合体-BSA複合体(c)の遠紫外領域(200~250 nm)でのCDスペクトルを示す。単量体BSA (a)は206~208 nmと222 nmに大きな負の精円率を示し、これは $\alpha$ -ヘリックス構造を有するタンパク質に特有のスペクトルである<sup>13)</sup>。このスペクトルから見積もられた単量体BSAの $\alpha$ -ヘリックス含量は約60%であり<sup>14)</sup>、実際、X線構造解析からは、このタンパク質が分子内に18個の $\alpha$ -ヘリックス構造を形成していることが報告されている<sup>15)</sup>。一方、CHP分子集合体-BSA複合体スペクトル(b)から見積もられたBSAの $\alpha$ -ヘリックス含量は約50%であり、したがって、CHP分子集合体内部に取り込まれたBSAの二次構造は多少(約10%程度)ではあるが壊れていることが示唆される。また、DSC前と後でのCHP分子集合体-BSA複合体のCDスペクトルを比較すると、両者は、似かよったスペクトルを示す。以上のCDスペクトルの結果からは、CHP分子集合体に取り込まれたBSAの立体構造はわずかしか壊れていないこと、また、100℃という高温を経験したにもかかわらず、その構造はほとんど変化しないことが明らかにされる。したがって、CHP分子

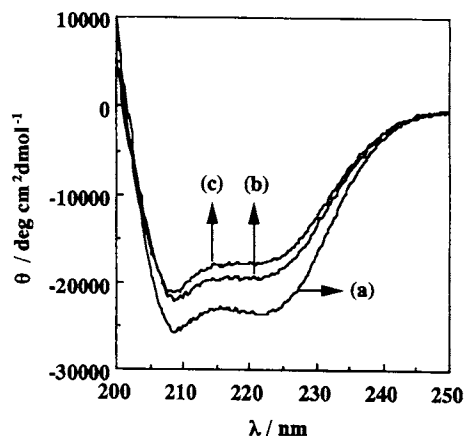


Fig.8 CD spectra of free BSA (a) and CHP-BSA complex (b) in phosphate buffer solution (pH 7.0) at 25 °C. Spectrum (c) shows the result at 25 °C for a sample of the CHP-BSA complex after DSC up to 100 °C.

集合体に取り込まれたBSAは、上述したような方法で形成される水素結合によって熱的に安定化されると考えられる。

最後に、以上の結果をもとにして高感度恒温滴定型熱量測定で得られたCHP分子集合体とBSAとの負の反応熱( $\Delta H_b$ ; Table 1参照)を考察する。CHP分子集合体内部に取り込まれたBSAの二次構造は多少しか壊れていないという結果を考慮すると、取り込まれることによるこのタンパク質の構造変化の $\Delta H_b$ への寄与は小さいと考えられる。したがって、 $\Delta H_b$ の負の値には、CHPの糖鎖とBSA間での水素結合形成が大きく寄与するのであろう。この方向からは、BSAを取り込むことによって、CHP自体の構造安定化がもたらされることも考えられる。この構造安定化は、負の反応熱を伴うであろう。したがって、本研究の負の反応熱は、取り込まれたゲストBSAではなく、取り込む側すなわちホストCHP分子集合体の構造変化が大きく関与することが示唆される。また、Table 1に示す負の標準エントロピー変化量( $\Delta S^\circ$ )は、BSAを取り込むことによって、水素結合形成に直接関与するCHP糖鎖の自由度が減少することが起因していると考えられる。

## 文 献

- 1) K. Akiyoshi and J. Sunamoto, "Organized Solutions Surfactants in Science and Technology", (S. E. Friberg, B. Lindman, ed.), Marcel Dekker, Inc., (1992), p.290.

- 2) K. Akiyoshi, S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi and J. Sunamoto, *Macromolecules* **26**, 3062 (1993) .
- 3) T. Nishikawa, K. Akiyoshi and J. Sunamoto, *Macromolecules* **27**, 7654 (1994) .
- 4) M. Dubois, K. Gilles, K.J. Hamilton, A.P. Rebers and F. Smith, *Anal. Chem.* **28**, 350 (1956) .
- 5) M. Kodama, S. Takebayashi, S. Kidokoro and H. Uedaira, *Netsu Sokutei* **19**, 163 (1992) .
- 6) H.A. Sober and R.A. Harte, (Eds.) , "Handbook of Biochemistry (Selected Date for Molecular Biology)" ,2nd ed., p.C-71.CRC Press, Cleveland, OH, (1973) .
- 7) M.G Nordmark, J. Laynez, A. Schon, J. Suurkuusk and I. Wadsö, *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 187 (1984) .
- 8) G. Ramsay, R. Prabhu and E. Freire, *Biochemistry* **25**, 2265 (1986) .
- 9) E. Freire, O.L. Mayorga and M. Straume, *Anal. Chem.* **62**, 950 (1990) .
- 10) M. Myers, O.L. Mayorga, J. Emtage and E. Freire, *Biochemistry* **26**, 4309 (1987) .
- 11) J.A. Nelder and R. Mead, *Comput. J.* **7**, 308 (1965) .
- 12) A. Chen and I. Wadso, *J. Biochem. Biophys. Methods* **6**, 30 (1982) .
- 13) G. Holzwarth and P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 218 (1965) .
- 14) K. Takeda, M. Shigeta and K. Aoki, *J. Colloid Interface Sci.* **1**, 117 (1987) .

- 15) J.R. Brown, *Fed. Proc.* **34**, 591 (1975) .

## 要 旨

天然多糖プルランの100単糖当りに1.7個のコレステロール基を導入した疎水化プルラン (CHP) は、水溶液中で分子集合体を形成し、そのヒドロゲル状中心部に水溶性タンパク質を取り込むことが明らかにされている<sup>1)~3)</sup>。これに基づいて、本研究においては、CHP分子集合体と牛血清アルブミン (BSA) との相互作用を高感度恒温滴定型熱量測定、高感度示差走査熱量測定および円偏光二色性スペクトル測定から検討した。測定温度25℃での恒温熱量測定からは、CHP分子集合体へのBSAの取り込みは発熱現象を伴い、それはBSA1モル当たり-98 kJのエンタルピー変化量 ( $\Delta H_b$ )、 $8.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の結合定数、11分子のCHPから構成された1つのCHP分子集合体に対してBSA1分子の飽和化学量論的当量によって特性化されることが示された。その他の測定からは、CHP分子集合体に取り込まれたBSAは、10%程度のヘリックス構造の減少を示し、100℃までの昇温においても熱構造転移を示さないことが明らかにされた。これらの結果より、本研究の反応はエンタルピー効果に基づき、これにはゲストBSAを取り込むことによってホストとしてのCHP分子集合体の構造変化が関係し、おそらくCHP糖鎖とこの親水性タンパク質との間での分子間水素結合形成が関与していることが示唆された。その結果、水素結合されたBSAは少なくとも温度100℃までに渡って熱的に安定化されることが考察された。