

論文

pHジャンプ法を用いた、ヌクレアーゼ再生反応に関する 速度パラメータと遷移相の熱力学諸量の評価

田中晶善*, 小川ひとみ**, 妹尾啓史*, 小畑 仁*

(受取日: 1999年7月13日, 受理日: 1999年7月30日)

Evaluation of the Kinetic and Transient Phase Thermodynamic Parameters for the Refolding of Staphylococcal Nuclease by pH-Jump Method

Akiyoshi Tanaka,* Hitomi Jimbo-Ogawa,** Keishi Senoo,* and Hitoshi Obata*

(Received July 13, 1999, Accepted July 30, 1999)

Refolding process of Staphylococcal nuclease was observed by the pH-jump stopped-flow method using fluorescence intensity increase of the protein as a probe. The refolding of the protein by the pH-jump from 1.6 to 6.7 was tri-phasic, and the values of three apparent rate constants, k_1 , k_2 , and k_3 were evaluated to be 9.5, 1.0, and 0.03 s^{-1} , respectively (25°C). The transient phase-thermodynamic parameters were evaluated from the temperature dependence of the kinetic constants. Small activation enthalpy and large entropy change accompanied the k_1 -phase. The values k_1 and k_2 decreased remarkably at acidic region but k_3 did not, the results indicating that the k_1 - and k_2 -phases reflect deprotonation processes.

1. 緒 言

黄色ブドウ球菌のヌクレアーゼ (Staphylococcal nuclease; SNase) はアミノ酸残基数149の小形球状タンパク質で、タンパク質高次構造の構築原理解明の好個のモデルとして、野生型タンパク質やアミノ酸置換タンパク質を用いた多くの研究がなされている¹⁻³⁾。本酵素は、熱、酸・アルカリ、変性剤、圧力など種々の変性要因による変性に関して可逆であることが知られている。

蛍光ストップフロー法による本酵素の変性・再生反応の観測は、Anfinsenら⁴⁾が行ったものを初めとして現在に至るまで詳細な研究がなされてきている (文献⁵⁻⁹⁾ および、そこで引用された文献参照)。また塩酸 Guanidinium 変性・再生の過程を円二色性 (CD) をプローブとして観測した研究例では、ストップフロー装置の不感時間内に終了する速い相の存在が報告され¹⁰⁾、またプロリンをグリシンに置換することで、野生型で観測された四相が三相になる¹¹⁾ などの報告がある。

* 三重大学生物資源学部, ** 三重大学教育学部: 〒514-8507 三重県津市上浜町1515

Faculty of Bioresources* and Faculty of Education,** Mie University, 1515 Kamihama, Tsu, Mie 514-8507, Japan

* 旧姓神保。現 (株)日立製作所

本研究では、遺伝子工学的手法を用いて調製した野生型 SNase を用い、分子中に一個含まれるトリプトファン残基 (Trp140) の蛍光を指標^{7, 12, 13}) として、酸変性からの再生反応をストップフロー法によって観測し、各相の反応速度定数と遷移相の熱力学量を評価することを試みた。

2. 実験

2.1 試料

野生型 SNase は、既報の方法¹⁴⁾ で調製した。タンパク質濃度は、280 nm におけるモル吸光係数 $\epsilon = 15,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて計算した。

2.2 蛍光スペクトル

蛍光スペクトルの観測には、日立製作所製蛍光分光光度計 650-60 型を用い、酸性から中性領域における種々の pH において、280, 290 または 295 nm の励起光による蛍光を 300-450 nm で観測した。

2.3 ストップフロー法

再生過程の追跡には、既報のマイクロストップフロー装置¹⁵⁾ を使用した。装置の不感時間は、アスコルビン酸と 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールの標準反応から、実験条件下で約 5 ms と推定した。pH 1.6 の 6 mM グリシン緩衝液に溶解した SNase (40 μM) と、100 mM の各種緩衝液 (pH 4.5 ~ 7 の酢酸またはリン酸緩衝液) の等量をストップフロー装置内ミキサーで高速混合し、295 nm の励起光による蛍光を、310 nm に半値幅を持つ片切りフィルターを通して観測した。各反応は、同一条件で 4 ~ 9 回の積算を行ったのちに記録した。再生反応の pH は、二種の緩衝液を同じ比率で混合し、混合後の pH を測定して推定すると共に、ドレインから排出された反応終了後の溶液の pH を実測した。両者は測定誤差範囲内で一致した。

3. 結果と考察

3.1 蛍光強度の pH 依存性

酸性から中性領域における、蛍光強度の pH 依存性を Fig.1 に示す (励起波長 295 nm, 測定波長 336 nm, 30 °C)。励起波長を 280 nm と 295 nm とし、また測定波長を 310, 332, 370 nm とし、計 6 種の組み合わせで蛍光強度変化を観測し、結果がいずれも Fig.1 とほぼ同じであることを確認した。酸変性によって蛍光強度が減少し、また 335 nm 付近にあったピークは、遊離のトリプトファン水溶液の場合と類似の 356 nm 付近へシフトした。このことは、分子内部にほとんど埋もれていた Trp140¹⁶⁾ が、変性によって溶媒にさらされた状態になったことを示す。

Fig.1 より、蛍光を指標とした場合*、SNase は pH 4.5 ~ 5 付近までは天然状態を保ち、pH 3 以下で変性が完結することがわかる。Fig.1 の結果に基づき、単純な二状態転移

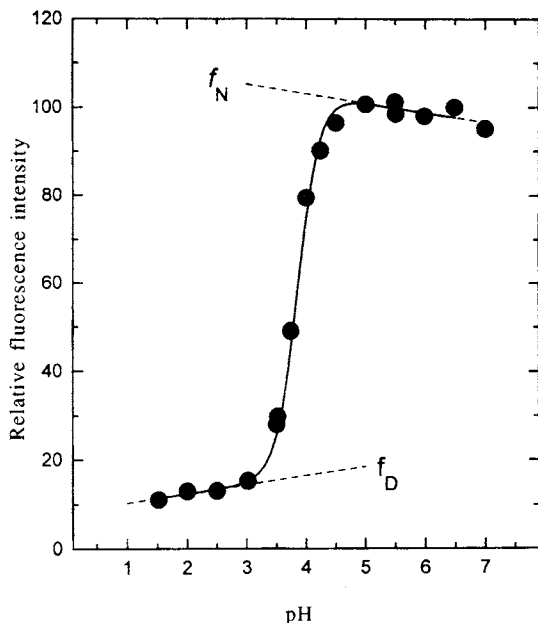


Fig.1 pH-Dependence of the fluorescence intensity of SNase at 336 nm (closed circles). Excitation wavelength was 295 nm. 30 °C. [SNase] = 1.3 μM . Solid line was drawn by assuming linear dependence of ΔG^0 of the denaturation on pH (see Fig.2).

$N \rightleftharpoons D$ (N は天然状態, D は変性状態を表す) を仮定して、見かけの平衡定数 K を次式によって得た。

$$K = (f_N - f) / (f - f_D) \quad (1)$$

*本酵素は α -ヘリックスからなる部分 (A サブドメイン) と β -バレルからなる部分 (B サブドメイン) の二つのサブドメインから形成され、これらは協同的に変性する¹⁷⁾。Carra¹⁸⁾ によれば、Trp140 の蛍光強度変化は A サブドメインの変性にのみ対応し、B サブドメインの変性を反映しない。この場合、蛍光を指標とすると、厳密には A サブドメインの変性を観測していることになる。

他方 SNase は、pH 2 以下、低温で塩濃度が高い場合、天然状態とは異なるが比較的コンパクトな構造を持った A-state (Acid-state) と呼ばれる構造をとることが知られている¹⁹⁾。A-state では、Trp140 の蛍光は天然状態に近い強度となる。Fig.1 および以下の実験では pH 1.6 での蛍光強度を観測しているが、実験条件が異なること、および Fig.1 で pH 1.6 付近の蛍光強度が pH 2 ~ 3 付近での値と変わらないことから、A-state の存在は考慮しない。

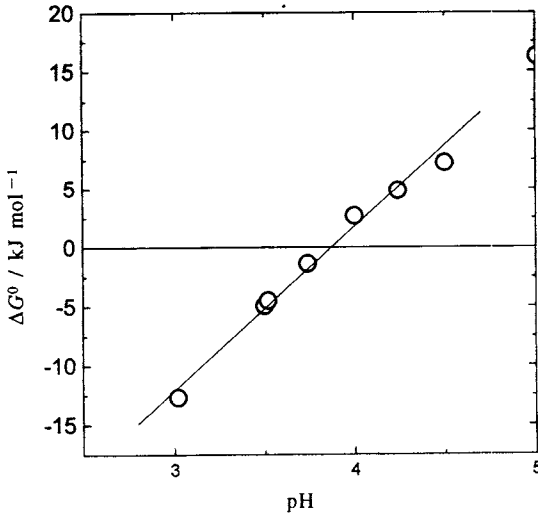


Fig.2 Dependence of ΔG^0 on pH (open circles) calculated by $\Delta G^0 = -RT \ln \{(f_N - f)/(f - f_D)\}$. The solid line represents $\Delta G_0 / \text{kJ mol}^{-1} = 13.9 \text{ pH} - 53.8$ ($\Delta G^0 = 0$ at pH 3.87).

f_N , f_D , および f はそれぞれ、天然状態、変性状態、および各pHで観測された蛍光強度を表す (Fig.1 参照)。この式に基づいて、変性の標準ギブズ自由エネルギー変化 $\Delta G_0 = -RT \ln K$ (R は気体定数, T は絶対温度) を求めpHに対してプロットした (Fig.2)。変性の中点 ($\Delta G_0 = 0$) のpHは約3.9と求められた。Fig.1の実線はこのプロットから得られた直線に基づく理論曲線である。Fig.1の結果をHenderson-Hasselbalchの式に基づいて解析し、変性に伴ってタンパク質分子に取り込まれるプロトンは約2個と評価された。プロトン化に関与するのはカルボキシル基であろう²⁰⁾。

酸性条件としたSNase溶液を中性付近に戻した場合、100%の蛍光強度の回復が見られ、酸変性が完全に可逆であることを確認した。

3.2 再生過程の観測

ストップフロー装置を用い、酸変性からの再生過程を、反応に伴う蛍光強度の増大を指標として観測した。Fig.3はpHジャンプ1.6→6.7の場合について、観測時間を変えて得た反応曲線の例である (25℃)。反応は単相ではなく、0.5秒程度で終了する速い反応と、これよりはるかに遅い反応を含む複数の緩和過程があることが明らかである。次式のような、単相の緩和過程の重ね合わせを仮定し、それぞれの相の見かけの反応速度定数を評価した。

$$f_t = A_0 + \sum_{i=1}^n A_i \exp(-k_i t) \quad (2)$$

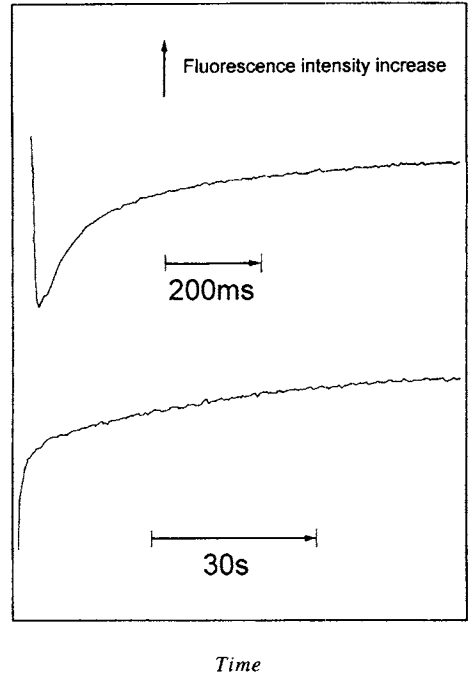


Fig.3 Time courses of the refolding of SNase by pH jump from 1.6 to 6.7. Excitation wavelength was 290 nm. 25℃. [SNase]=20 μM in the reaction mixture.

ここで f_t は反応開始後の時間 t における蛍光強度, A_i と k_i は i 番目の相のシグナル強度と速度定数, また n は観測されるすべての相の数をそれぞれ表す。

解析の結果、再生反応にはすくなくとも三相が存在 ($n = 3$)⁵⁻⁹⁾ することが示唆された。以下、反応速度定数の大きい相から順に1, 2, 3とし、各パラメータはこれらの添字で区別する。pH 1.6→6.7, 25℃における3つの反応速度定数は25℃においてそれぞれ、 $k_1 = 9.5 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 1.0 \text{ s}^{-1}$ および $k_3 = 0.03 \text{ s}^{-1}$ と評価された。

Chenらによると、天然状態と変性状態には次のような平衡 $D_3 \rightleftharpoons D_2 \rightleftharpoons D_1 \rightleftharpoons N$ が成り立っており、中性付近では天然状態 N がほぼ100%を占め、酸性領域では変性状態の分子種 $D_1 \sim D_3$ が一定の比で存在する。このモードに基づけば、観測された反応速度定数はかなり複雑な内容を持つことになる^{7, 8)}。(天然状態でもPro117のcis-trans異性化による二種²¹⁾ (cisが90%), または三種²²⁾の異性体が存在するとされる。)

3.2.1 反応速度定数の温度依存性と、熱力学諸量の評価

上記のような実験を種々の温度で行い、各温度における各反応速度定数の値をTable 1のように求めた。

Table 1 Rate constants for the refolding of SNase at various temperatures observed by stopped-flow pH-jump experiments.

Phase	T / °C									
	8.6	10.2	16.5	20.1	25.0	25.2	30.2	31.6	39.0	39.8
1	3.62	3.64	7.83	5.52	9.50	7.90	11.6	12.2	20.3	17.0
2	0.31	0.43	0.78	1.02	1.02	1.65	2.04	3.13	5.40	5.90
3	0.0080	0.0080	0.018	0.028	0.029	0.043	0.095	0.045	0.154	0.167

* Rate constants are in s⁻¹ unit. Obtained by pH-jump from pH 1.6 to 6.7.

Table 2 Apparent transient thermodynamic parameters for the refolding of SNase observed by stopped-flow pH-jump experiments.*

Phase	ΔG^\ddagger /kJ mol ⁻¹ **	ΔH^\ddagger /kJ mol ⁻¹ ***	ΔS^\ddagger /J K ⁻¹ mol ⁻¹ ****	$(-T\Delta S^\ddagger)$ /kJ mol ⁻¹ ****	E_a /kJ mol ⁻¹ *****
1	67.6	35.8 ± 3.6	-107	31.8	38.3 ± 3.6
2	71.9	63.5 ± 4.0	-28.2	8.4	66.0 ± 4.0
3	81.0	68.7 ± 5.8	-41.3	12.3	71.1 ± 5.8

* Values of pH before and after the pH-jump were 1.6 and 6.7.

** Calculated from the lines in Fig.4. at 298.15K (25 °C).

*** Obtained from the slope of the lines in Fig.4. Figures after ± are standard deviation.

**** Values at 25 °C calculated from $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ and the values in this table.

***** Obtained from the Arrhenius plot of the rate constants.

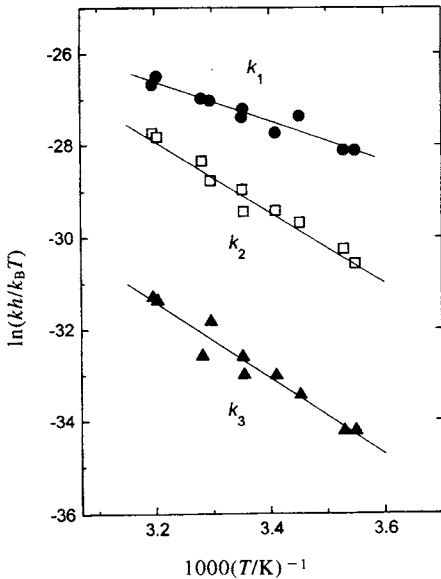


Fig.4 $\ln(kh/k_B T)$ vs. $1/T$ plot of the three rate constants of the refolding of SNase. For the detail, see text.

各温度における活性化自由エネルギー ΔG^\ddagger はEyringの式

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln(kh/k_B T) \quad (3)$$

から求められる。 $(R, T, k, h, \text{および } k_B \text{ はそれぞれ、気体定数、絶対温度、反応速度定数、プランク定数、およびボルツマン定数。})$ また活性化エンタルピー ΔH^\ddagger 、および活性化エントロピー ΔS^\ddagger との間に平衡状態の熱力学式と類似の次の関係が成り立つ。

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (4)$$

式 (3) と式 (4) から次式を得る。

$$\ln(kh/k_B T) = \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/RT \quad (5)$$

$\ln(kh/k_B T)$ を $1/T$ に対してプロットすることにより、傾きから ΔH^\ddagger を求めることができる。**Table 1**の値から得た当該プロットを**Fig.4**に示す。一般に再生過程の速度定数は、変性過程の場合と異なってこの種のプロットに対して複雑な挙動を示し、温度上昇と共に極大値を示すことが多い。SNaseの場合、今回測定した温度範囲内でおおよそ直線であったので、第一近似として直線を仮定し、各相について活性化熱力学諸量を**Table 2**のように得た。この表から、

Table 3 Rate constants for the refolding of SNase at 25 °C observed by stopped-flow pH-jump experiments.*

Phase	pH after pH-jump**				
	5.5	4.8	4.6	4.2	4.1
1	7.4	3.6	2.1	1.1	0.56
2	0.75	0.35	0.15	0.065	0.035
3	0.023	0.023	0.027	0.012	0.012

* Rate constants are in s⁻¹ unit.

** The value of pH before the pH-jump was 1.6.

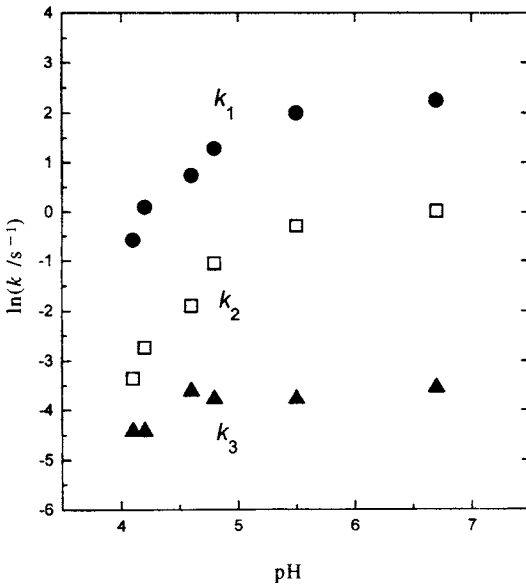


Fig.5 pH-Dependence of the three rate constants of the refolding of SNase.

最も速い相1が他の遅い相に比べて ΔH^\ddagger (および E_a)が小さく、逆に ΔS^\ddagger ($-\Delta\Delta S^\ddagger$)が大きいことが特徴的である。また遅い二つの相の ΔH^\ddagger はプロリンのcis-trans異性化過程の ΔH^\ddagger であるおよそ80 kJ mol⁻¹に近い値であった。

3.2.2 速度定数のpH依存性

再生反応用の緩衝液のpHを調整することにより、最終pHの値を種々変え、反応速度定数に対する効果を調べた。酸性領域では中性付近で再生させたときに比べて反応は遅くなった。

上記の方法と同様にして、3つの反応速度定数を求めた。その結果をTable 3に、また速度定数の自然対数をpHに対してプロットした結果をFig.5に示す。このように、速度定数 k_1 と k_2 はpH 5付近から急激に低下するが、 k_3 にはほと

んど変化がない。従って、再生に伴う脱プロトン化が関与するのは k_1 と k_2 に対応する過程である。

なお、 k_3 の大きさと、そのpH非依存性、および k_3 の温度依存性から求めた ΔH^\ddagger の値などは、プロリン異性化の特徴^{23, 24)}と矛盾しないが、Trp140の蛍光はプロリンの異性化過程には敏感ではないとされ⁶⁾、その内容は必ずしも明白ではない。

謝 辞

マイクロストップフロー装置を使わせていただいた、京都大学廣海啓太郎名誉教授、外村辨一郎名誉教授、井上國世教授、およびSNase調製をご指導いただいた米国Brookhaven National LaboratoryのDr. John M. Flanaganに深謝します。

文 献

- 1) D. Shortle, *Adv. Protein Chem.* **46**, 217-47 (1995).
- 2) A. P. Hinck, W. F. Walkenhorst, D. M. Truckses, and J. L. Markley, in *Biological NMR Spectroscopy* (J. L. Markley, and S. J. Opella Eds.) pp.133-160, Oxford University Press (1996).
- 3) D. Shortle, Y. Wang, J. R. Gillespie, and J. O. Wrabl, *Protein Sci.* **5**, 991-1000 (1996).
- 4) A. N. Schechter, R. F. Chen, and C. B. Anfinsen, *Science* **167**, 886-887 (1970).
- 5) T. Nakano, and A. L. Fink, *J. Biol. Chem.* **265**, 12356-12362 (1990).
- 6) H. M. Chen, J. L. You, V. S. Markin, and T. Y. Tsong, *J. Mol. Biol.* **220**, 771-778 (1991).
- 7) H. M. Chen, V. S. Markin, and T. Y. Tsong, *Biochemistry* **31**, 12369-75 (1992).
- 8) W. F. Walkenhorst, S. M. Green, and H. Roder, *Biochemistry* **36**, 5795-5805 (1997).
- 9) G. P. Tsurupa, T. Ikura, T. Makio, and K. Kuwajima, *J. Mol. Biol.* **277**, 733 (1998).
- 10) T. Sugawara, K. Kuwajima, and S. Sugai, *Biochemistry* **30**, 2698-706 (1991).
- 11) K. Kuwajima, N. Okayama, K. Yamamoto, T. Ishihara, and S. Sugai, *FEBS Lett.* **290**, 135-138 (1991).
- 12) H. M. Chen and T. Y. Tsong, *Biophys. J.* **66**, 40-45 (1994).
- 13) D. Shortle, A. K. Meeker, and E. Freire, *Biochemistry* **27**, 4761-4768 (1988).
- 14) A. Tanaka, J. Flanagan, and J. M. Sturtevant, *Protein Science* **2**, 567-576 (1993).
- 15) K. Hiromi, H. Nakatani, A. Tanaka, and H. Iwamoto, *Analytical Sciences* **7**, 819-821 (1991).
- 16) G. Wright and R. B. Freedman, *Protein Eng.* **2**, 583-

- 588 (1989).
- 17) D. Xie, R. Fox, and E. Freire, *Protein Sci.* **3**, 2175 (1994).
- 18) J. H. Carra, E. A. Anderson, and P. L. Privalov, *Biochemistry* **33**, 10842 (1994).
- 19) J. H. Carra, E. A. Anderson, and P. L. Privalov, *Protein Sci.* **3**, 952 (1994).
- 20) R. M. Ionescu and M. R. Eftink, *Biochemistry* **36**, 1129-1140 (1997).
- 21) P. A. Evans, R. A. Kautz, R. O. Fox, C. M. Dobson, *Biochemistry* **28**, 362-370 (1989).
- 22) A. T. Alexandrescu, E. L. Ulrich, and J. L. Markley, *Biochemistry* **28**, 204-211 (1989).
- 23) F. X. Schmid and R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* **15**, 285-287 (1979).
- 24) J. R. Garel, B. T. Nall, and R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1853-1857 (1976).

要 旨

黄色ブドウ球菌ヌクレアーゼの再生過程を、本酵素の蛍光強度増大を指標としてストップフロー法により観測した。pH 1.6から6.7へのジャンプに関し、三相が観測され、それぞれの見かけの速度定数 k_1 , k_2 , および k_3 ($k_1 > k_2 > k_3$) と遷移相の熱力学諸量を評価した。最も速い k_1 -相には、小さい活性化エンタルピー変化と大きい負の活性化エントロピー変化が伴った。酸性領域において急激に小さくなったが、 k_3 はほぼ一定であった。 k_1 -相と k_2 -相は脱プロトン化過程を反映しているものと考えられる。