

グルタチオン合成酵素のDSC 測定

深田はるみ, 高橋克忠, 加藤博章*, 小田順一*

(平成8年3月25日受理)

DSC Study on the Thermal Unfolding of Glutathione Synthetase from *Escherichia coli* B

Harumi Fukada, Katsutada Takahashi, Hiroaki Kato* and Jun'ichi Oda*

(Received March 25, 1996)

The thermal unfolding of glutathione synthetase was studied in three different buffers at pH 7.5 by differential scanning calorimetry. Variation of protein concentration caused the change in the peak temperature of DSC curves observed. It was found that the calorimetric enthalpy becomes larger as the buffer ionization heat becomes larger. The results were discussed in the terms of a possible involvement of the process characterized by a dissociation of the tetrameric enzyme into monomeric unit during the unfolding.

1. はじめに

グルタチオン合成酵素 (EC 6.3.2.3) は γ -L-グルタミル-L-システインとグリシンからATPを用いてグルタチオンを合成する酵素である。大腸菌B株由来の酵素は、アミノ酸316残基からなるサブユニット4個が会合して4量体を形成している分子量142,000の大きな蛋白質である¹⁾。この酵素はX線による結晶構造解析から立体構造がすでに明らかにされ²⁾、密に接した2量体同士が比較的狭い領域で接触している特徴的な構造をしている。多量体蛋白質の変性においては構造転移とサブユニットへの解離の両過程が含まれるため、蛋白質の熱力学的安定性を評価するためにはその変性機序を明らかにしなければならない。このような立場から4量体構造をとるこの酵素の熱変性を断熱型DSCを用いて測定した。

2. 実験

大腸菌B株 (*Escherichia coli* B) 由来グルタチオン合成酵素を大腸菌 (*Escherichia coli* JM109) による既報の大量発現系により培養し、精製した³⁾。硫酸微結晶の状態を冷蔵保存し、後述の各緩衝液に対し十分透析して測定試料とした。

断熱型DSC DASM-4⁴⁾を用い、昇温速度1 K min⁻¹で測定した。緩衝液は20mM濃度、pH 7.5とし、リン酸、HEPES (N-2-ヒドロキエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)、グリシルグリシンを用いた。すべて50mM NaClを含む。蛋白質濃度は、280nmにおける吸光度測定より吸光係数 $A = 0.902 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ (pH 7.0)⁵⁾を用いて決定した。

大阪府立大学農学部生物物理化学研究室：〒593 堺市学園町1-1

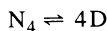
Laboratory of Biophysical Chemistry, College of Agriculture, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 593, Japan

* 京都大学化学研究所：〒611 宇治市五ヶ庄

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, Japan

3. 結果および考察

酵素の至適pHである7.5でDSC測定した結果の一例をFig.1に示す。HEPES緩衝液中で酵素濃度を3.5～0.9mg ml⁻¹の範囲で変えて測定した。濃度が高くなるとピークが高温側へ移動している。このことは変性に伴って、4量体構造が解離することを示唆している^{6), 7)}。昇温後室温に戻し、再度昇温させてもピークは現れず、変性は不可逆であったが、あえてこれに可逆平衡の解析⁸⁾を適用した。4量体が変性と同時に単量体に解離するモデルを考えた。



ここで、N₄は4量体の天然状態、Dは単量体の変性状態を表す。この過程のvan't Hoff エンタルピー ΔH_{vH} は、温度Tにおける変性率を α 、過剰熱容量を $C_{ex}(T)$ 、実測したエンタルピー変化を ΔH_{cal} とすると、

$$\Delta H_{vH} = \frac{4(1-\alpha) + \alpha}{\alpha(1-\alpha)} RT^2 \frac{C_{ex}(T)}{\Delta H_{cal}}$$

により得られる⁸⁾。 ΔH_{vH} と ΔH_{cal} が等しければ上のスキームにしたがって構造転移していることになる。Table 1に約1.7 mg ml⁻¹の試料を三種の緩衝液を用いて測定した結果を示す。リン酸では $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ が1に近いが、HEPES、グリシルグリシンの順に比が小さくなる。この比はピークの大きさとピーク幅との関係を示し、ピークがよりブロードになることを意味する。各pHは室温における値であり、変性温度である60～65℃になると、リン酸はほとんどpHの変化はないが、HEPESではpH単位0.4、グリシルグリシンでは0.8も低下する。しかし、上記の比はpH 7.0リン酸緩衝液中においてもpH 7.5リン酸緩衝液の値と変わらず、緩衝液種による比の違いはpHによる影響ではないことがわかる。また、緩衝液と蛋白質の相互作用については、リン酸において弱い結合は考えられるが、他はほとんど無視できる程度である。したがって、比の違いは緩衝液のイオン化エンタルピーの大きさに基づく見掛けの違いであると推測される。すなわち、温度の上昇に伴うpHの変化と蛋白質のプロトン解離状態・安定性の変化、および構造転移に伴う

プロトン授受、それぞれに由来する熱変化すべてが観測された結果に含まれているためであると解釈される。各緩衝液のイオン化エンタルピー変化 $\Delta H_i/\text{kJ mol}^{-1}$ は次のように与えられる¹¹⁾。

$$\Delta H_i (\text{リン酸}) = 10.43 - 0.2377 t + 1.007 \times 10^{-3} t^2$$

$$\Delta H_i (\text{HEPES}) = 19.77 + 4.935 \times 10^{-2} t$$

$$\Delta H_i (\text{グリシルグリシン}) = 45.59 - 6.432 \times 10^{-2} t$$

ここで、tは摂氏温度である。変性の温度幅を20Kとすると、温度上昇に伴ってリン酸では0.01のpH上昇、HEPESでは0.22のpH低下、グリシルグリシンでは0.38の低下がもたらされる。このpH変化にしたがってプロトンが蛋白質に結合され、さらに、変性に伴うプロトンの解離や結合も加算されることになるため緩衝液組成のプロトン解離熱は無視できないほどに大きくなる可能性がある。これが変性エンタルピー変化の緩衝液による違いの出所である。予備的にpHを変えて測定したところ、pH 6.5付近でDSC曲線のピーク温度が最も高くなるという結果を得た。pH 7.5よりもpHが低下することにより次第に安定性が増し、ピークはより高温に現れることが予想される。Table 1に示すようにピーク温度 t_p は変性時におけるpH低下の大きさにしたがって高くなり、さらに、 ΔH_{cal} の値も同様である。一方、

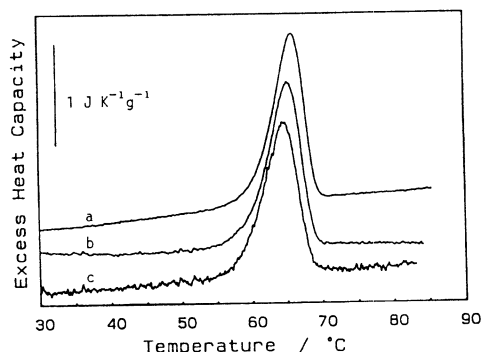


Fig.1 DSC curves of glutathione synthetase observed for the thermal unfolding at various concentrations in HEPES buffer at pH 7.5 : a; 3.5, b; 1.8, and c; 0.9 mg ml⁻¹.

Table 1 Summary of denaturational data for glutathione synthetase at pH 7.5.

Buffer ($\Delta H_i/\text{kJ mol}^{-1}$ at 65°C)*	Concn. mg ml ⁻¹	t_p °C	ΔH_{cal} kJ mol ⁻¹	ΔC_p kJ K ⁻¹ mol ⁻¹	ΔH_{vH} ** kJ mol ⁻¹	$\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$
Phosphate (-0.76)	1.6	64.9	1510	10.8	1420	0.94
HEPES (22.98)	1.8	65.3	1930	8.3	1420	0.74
Glycylglycine (41.41)	1.7	66.7	2160	17.2	1410	0.65

* The calculated value using a temperature function of ionization enthalpy in the text.

** The van't Hoff enthalpy based on the scheme for the unfolding of native tetramer to denatured monomer.

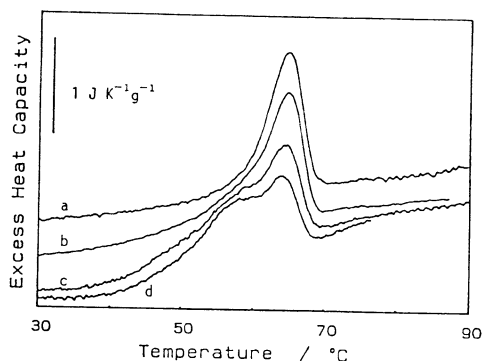


Fig.2 Change of the shape of DSC curve observed for the thermal unfolding of glutathione synthetase at pH 7.5 during the storage : a; 1, b; 5, c; 9, and d; 11 days after preparation. Enzyme concentration was 3-4 mg ml⁻¹.

ΔH_{vH} は緩衝液の種類によらず一定値を示し、相補的な変化の含まれることを窺わせる。このことはDSCにおけるカーブ解析は $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ 比に基づいて行われるため ΔH_i の大きい緩衝液を使用する場合には注意が必要であることを意味する。

試料調製後、時間を経るにしたがってDSCピークの低温側に肩が現れてくる様子をFig.2に示した。硫酸結晶保存状態においても数カ月後には同様の変性温度の低い構造転移を示す成分の出現が認められた。酵素活性はやや低下する程度であり、活性部位の構造を大きく変えるような構造変化ではないと考えられる。還元剤であるジチオスレイトール (DTT) を作用させて酵素試料を調製すると肩が消滅することから、分子内に含まれるシステイン残基の酸化が起こっていると判断される。サブユニット内には4個のシステイン残基が含まれる^{2), 9), 10)}。肩の現れる試料溶液にDTTを直接添加しても肩は消えず、硫酸結晶の溶解時に加えて調製した場合にのみ消えることから、溶媒に完全に露出したSH基ではなく、分子表面近くに互いに近接して存在する残基の酸化であり、サブユニット内あるいは間にS-S結合が生じているのであろうと思われる。なお、肩が存在するとピークはブロードになるが、Table 1のデータは試料調製後2日以内に測定したものであり、したがって、 $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ の値が1よりも小さいのは肩が含まれるからではない。

謝 辞

DASM-4 測定の一部は大阪大学理学部マイクロ熱研究センターで行った。お世話になった但徠道夫教授に感謝します。データ解析には京都府立大学農学部北村進一博士の作成されたソフトを使用した。

文 献

- 1) H. Gushima, T. Miya, K. Murata and A. Kimura, *J. Appl. Biochem.* **5**, 210-218 (1983) .
- 2) H. Yamaguchi, H. Kato, Y. Hata, T. Nishioka, A. Kimura, J. Oda and Y. Katsube, *J. Mol. Biol.* **229**, 1083-1100 (1993) .
- 3) H. Kato, M. Kobayashi, K. Murata, T. Nishioka and J. Oda, *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3071-3073 (1989) .
- 4) P.L. Privalov and S.A. Potekhin, *Methods Enzymol.* **131**, 4-51 (1986) .
- 5) H. Kato, M. Chihara, T. Nishioka, K. Murata, A. Kimura and J. Oda, *J. Biochem.* **101**, 207-215 (1987) .
- 6) K. Takahashi and J.M. Sturtevant, *Biochemistry* **20**, 6185-6190 (1981) .
- 7) 高橋克忠, 蛋白質核酸酵素 **33**, 337-747 (1988) .
- 8) J.M. Sturtevant, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **38**, 463-488 (1987) .
- 9) H. Gushima, S. Yasuda, S. Soeda, E. Yokota, M. Kondo and A. Kimura, *Nucleic Acids Res.* **12**, 9299-9307 (1984) .
- 10) H. Kato, T. Tanaka, T. Nishioka, A. Kimura and J. Oda, *J. Biol. Chem.* **263**, 11646-11651 (1988) .
- 11) K. Takahashi and H. Fukada, *Netsu Sokutei* **14**, 20-32 (1987) .

要 旨

グルタチオン合成酵素の熱変性を調べるために断熱型DSCによる熱転移測定をpH7.5で行った。濃度を変えて測定した結果、濃度の増大とともにピークが高温へ移動し、4量体酵素が変性に伴って解離することが示唆された。また、緩衝液のイオン化エンタルピー変化の違いに応じて観測されるピークの大きさが異なることを示した。