

クロコウジカビ酸性プロテアーゼの熱変性

麹菌の一種である *Aspergillus niger* (クロコウジカビ) の産生する非ペプシン型酸性プロテアーゼA (プロクターゼAとも呼ばれます) は酸性 pH 条件下でのみ蛋白質分解活性を有し、その至適 pH は1付近にあるとされています。この酵素は生成後ペプチド鎖が切断されて軽鎖・重鎖の2本のペプチド鎖となって活性な状態になります。分子量は22,000です。酸性プロテアーゼの代表格にペプシンがありますが、このペプシンの阻害剤であるペプスタチンによって阻害されず、その他の性質や分子構造も全く異なるという点で非ペプシン型と呼ばれます。この酵素は自己消化を起こさず、プロテアーゼとしてはかなり安定なものです。一方、中性 pH では、2本鎖に分離し、変性していることがCD, NMR, ゲル濾過により明らかにされています。このようなプロテアーゼの熱変性を断熱型DSC (DASM-4) により測定しました。

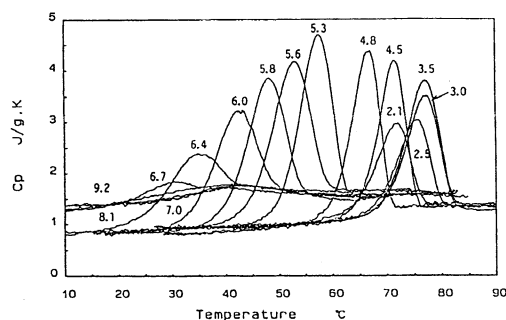


Fig.1 DSC curves of acid proteinase A from *Asp. niger* at various pHs.

Protein concentration is 3 mg ml⁻¹

The numbers are pH values.

種々の緩衝液 (0.2M NaCl を含む) を用い、pH を変えて測定を行った結果、図1のように非常に特異なpH依存性を示しました。熱転移挙動からpH 5 を境に大きく2つのpH領域に分類されます。pH 5 以下ではピーク温度の上

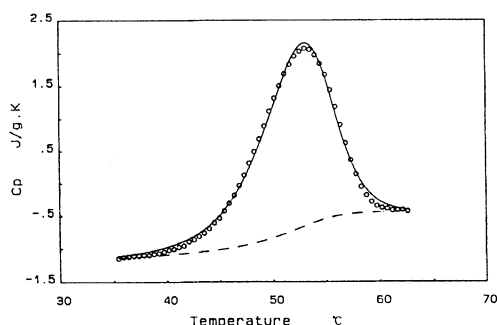


Fig.2 Curve fitting made on two-state transition model with the dissociation to two chains for the thermal transition of acid proteinase A at pH 5.6.

Circles are the experimental values.
Solid line is the fitted curve.

昇と共にピーク面積が小さくなり、一般に見られる傾向とは逆になります。pH 5 以上になるとピークの低温への移行は面積の減少を伴い、正常な現象になります。ピーク前後のベースラインの差、すなわち転移の熱容量変化にもpH 5 の境界が見られます。pH 5 以下の場合には変性後沈澱が生じていました。最もピーク温度の高いpH 3 付近やそれ以下のpH では激しい沈澱が見られました。酸性になるほど酵素活性が高くなるため、変性後にペプチド結合の部分的切断が起こっていました。このような沈澱や切断が特異な挙動を招いたのかもしれませんが。

pH 5 以上になると、熱転移の可逆性が出現し始めます。この転移は、変性状態への転移と同時に2本鎖に解離する変性モデルによく適合しました (図2)。蛋白質濃度を変化させるとピーク温度が変化することからこの解離を含む二状態転移モデルが妥当であることがわかりました。pH 6~7 にかけて2つのピークが観測されました。低温側のピークが2本鎖への解離を伴う転移であり、pH に依存してピーク温度、面積ともに変化しています。ゲル濾過法に

より中性 pH では 2 本鎖に解離していることが知られていますが、この結果とよく一致します。一方、高温側のピークは pH に依らず一定で、アルカリ pH 領域でも同様に存在しています。この高温ピークと低温側の解離ピークとが重なった温度での転移は、それぞれ独立に起こるのではなく、協同的に同時に起きようになることがわかります。

中性 pH で現れる小さなピークはブロードですが、確かに存在しています。塩濃度を高くするとそれがより明確になります。NMR や CD 測定からこの pH 領域では特定の構造を持たない変性状態にあることが結論付けられています。

ところが熱転移ピークが存在していることから何らかの構造を持っていることになります。このピークは完全に可逆ですである特定の構造をとっていることが推定されます。他の方法では知り得なかった現象が DSC 測定により初めて明らかになりました。

(深田はるみ)

参考文献

深田はるみ, 高橋克忠, 徂徠道夫, 小島正樹, 田之倉優, 高橋健治, 第30回記念熱測定討論会(豊中), P 15 (1994)