

コロコウジカビ酸性プロテアーゼおよび その H 鎖の構造転移

コロコウジカビ *Aspergillus niger* の生産する非ペプシン型酸性プロテアーゼ A は、39 個のアミノ酸から成る L 鎖と 173 個から成る H 鎖の二本のペプチド鎖より構成される分子量 22,000 の蛋白質です。(図 1)。一本鎖ペプチドの前駆体として生合成されますが、それが切断されて二本鎖の活性な酸素になったものです。酸性領域のみで活性を持ちます。昨年レポートでは、この蛋白質の熱変性が各種 pH 領域により特徴的な DSC 曲線を示すことを紹介し、さらに、二本鎖が解離して変性状態にあることが CD や NMR から知られている中性 pH 領域においても小さいながらもピークが認められ、特定の構造を持つことが示唆されることを記しました。そこで、今回は、この構造転移が H 鎖に由来することを確かめるために、H 鎖を単離してその DSC 測定を行いました。

プロテアーゼ H 鎖をゲル濾過により単離後、pH 4.5~8 の各種緩衝液 (0.2 M NaCl を含む) に対して透析し、DASM-4 により熱転移を測定しました。元のプロテアーゼ (intact) についても、濃度 3 mg/ml、同一 pH で測定しました。昇温速度は 1 K/min です。

種々の pH における intact (A) および H 鎖 (B) の DSC 曲線を図 2 に示します。(B) のスケールは 2.5 倍に拡大してあります。H 鎖は単離し

てもピークを示し、確かに構造を持っていることがわかります。pH 7.0 における両者の曲線は図 3 に比較したようによく一致し、中性 pH における構造転移は H 鎖に由来することが明らかになりました。H 鎖の濃度を変えてもピークの位置や形状に変化がなく、従って、H 鎖の会合体ではなく H 鎖内で形成されている特定の構造の転移であると判断され、H 鎖内に“コア構造”のあることが窺われます。このピークのカーブ解析の結果、二状態転移で変性することがわかりました。転移エンタルピー変化は 100 kJ/mol 程度の小さな値です。pH 7~6 の範囲では 2 つのピークが現れ、高温側のピークが H 鎖の構造転移に基づきます。(図 3, pH 6.6)。pH 5.2 以下になると intact, H 鎖両者ともにピークより高温に比較的大きなピークが見られるようになりますが、これは変性分子の会合体による変性であると思われます。pH 5 以下では測定後の溶液は白濁していますので、pH 5.2 でも肉眼的には認められなくても凝集の起こっている可能性があります。pH 5.2~5.0 における intact のピーク後半の急激な低下は凝集によると考えられます。さらに、pH 5.2 以下ではピーク転移の可逆性が失われることもこれを支持します。ただし、会合体由来の高温の転移は可逆でした。

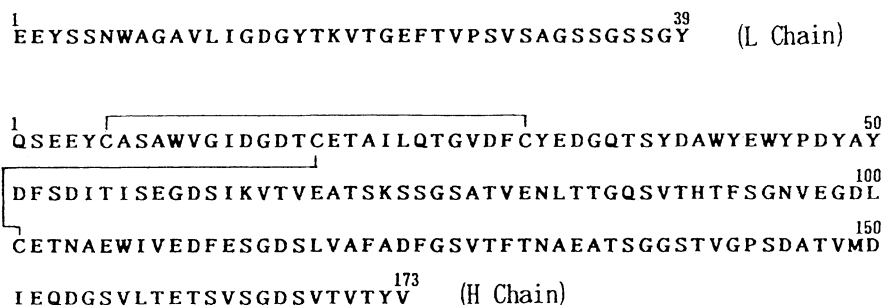


Fig.1 Amino acid sequence of acid proteinase A from *Aspergillus niger*. This is composed of H and L chains.

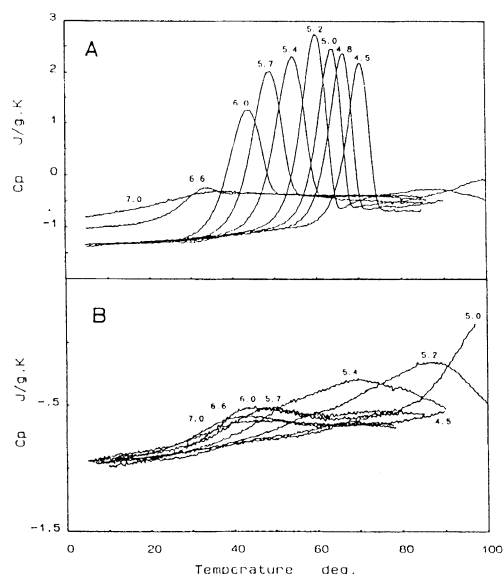


Fig.2 DSC curves of acid proteinase A(A) and of its H chain(B) observed at various pHs. The numbers are pH values.

pH 6~5.4 では intact と H 鎖のピーク温度がほぼ一致します。この pH 範囲で intact の DSC 曲線の解析を行うと H 鎖と L 鎖の解離を伴う二状態転移に適合しました。すなわち、intact の場合は、単離した H 鎖の示す転移のピークが独立した存在として認められませんでした。L 鎖が解離すると同時にすべての構造が崩れてしまうことを意味します。昇温後すぐに室温に戻しても元の intact 構造に戻らない分子種が混在しますが、その再昇温 DSC 曲線は単離 H 鎖と同様のピークと intact 由来のピークの両方が含まれますので、L 鎖が結合した intact 構造を取っているときのみ協同的に転移するようです。pH 6 以上になるとプロテアーゼ分子構造の協同性が低下して H 鎖のコア構造は独立に転移するようになります。いくつかのグルタミン酸残基が解離型になるとコア構造とその他のドメイン部分との相互作用がなくな

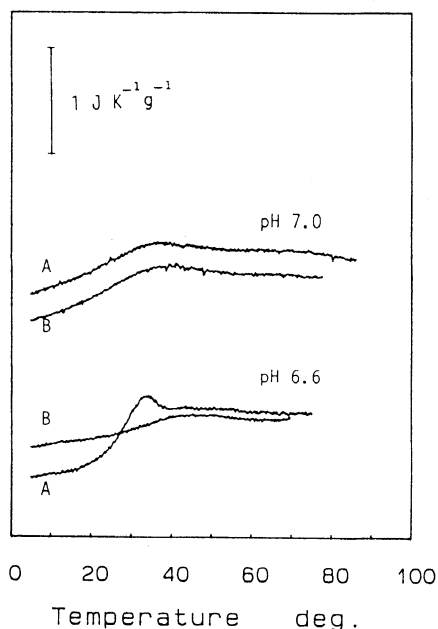


Fig.3 DSC curves of acid proteinase A(A) and of the H chain(B) at pH 7.0 and pH 6.6.

り、さらに L 鎖との相互作用も弱くなると推測されます。狭い pH 範囲で蛋白質構造の性質が大きく変化しますので、L 鎖と H 鎖の相互作用、また、H 鎖におけるコアあるいはドメイン構造について大変興味を持たれます。現在、X 線結晶構造解析や NMR 解析が進行中であり、その結果が大いに期待されます。

(深田はるみ)

参考文献

- 深田はるみ, 高橋克忠, 小島正樹, 田之倉優, 徂徠道夫, 高橋健治, 第 31 回熱測定討論会 (名古屋) 2B08(1995).
H. Fukada, K. Takahashi, M. Sorai, M. Kojima, K. Tanokura, K. Takahashi, *Thermochim. Acta* (印刷中).