

第2章 酵素の蛍光スペクトルから見た有機溶媒／水系での構造変化

2-1 実験

2-1-1 使用試薬

・ 酵素

α -キモトリプシン (α -CT) (EC 3.4.21.1, Type II)

pH7.8, 25 °Cの条件下で *N*-ベンゾイル-L-チロシンエチルエステルの加水分解において 50 unit の活性をもつ. (1 unit = 1 μ mol \cdot min⁻¹)

スブチリシン BPN' (STB) (EC3.4.51.14, type X XVll, Nagarse)

pH7.5, 37 °Cの条件下でカゼインの加水分解において 8.1 unit の活性をもつ.

以上 Sigma Chemical Company より購入.

・ アミノ酸

N-アセチル-L-チロシンエチルエステル (ATEE)一水和物 分子量 269.3

酵素反応の基質として使用した. Sigma Chemical Company より購入.

N-アセチル-L-チロシン (AT) 分子量 223.23

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の検量線作成のため使用した.

Sigma Chemical Company より購入.

N-アセチル-L-チロシンメチルエステル (ATME)一水和物 分子量 255.3

HPLC の検量線作成のため使用した. 後で述べる方法で合成した.

・ 有機溶媒 (試薬特級をモレキュラーシーブズを用いて脱水した後使用)

アセトニトリル 分子量 41.05

エタノール 分子量 46.07

・消光剤

ヨウ化カリウム 分子量 166.00

アクリルアミド 分子量 71.08

酢酸エチル 8 : ベンゼン 2 の組成の溶液から再結晶したものを用いた.

・その他の試薬

アセトアニリド 分子量 135.17

HPLC での定量の際の内部標準物質として用いた.

塩化カリウム 式量 74.55

ホウ酸 式量 61.83

炭酸ナトリウム (無水) 式量 105.99

ホウ酸緩衝液の調製に用いた.

以上, 和光純薬工業株式会社より購入.

2-1-2 使用機器

高速液体クロマトグラフ (HPLC)

送液ユニット LC-6A (株) 島津製作所

紫外分光光度計検出器 SPD-6A (株) 島津製作所

クロマトパック C-R6A (株) 島津製作所

カラム Shim-Pack CLC-ODS (150 mm × 6 mm φ) (株) 島津製作所

充填剤 : オクタデシル基を化学結合した全多孔性球状シリカゲル

(直径 5 μ m, 細孔径 100 Å)

脱気装置 DGU-4A (株) 島津製作所

分光蛍光光度計 RF-5000 (株) 島津製作所

恒温循環装置 EL-8 COOLNIT BATH TAITEC

スターラー CUV-O-STIR HELIMA

レシプロ式恒温槽 INCUBATION PERSONAL

(株) 大洋科学工業

30 °Cに保温し, 毎分 120 回, 振幅 3 cm で振蕩する.

ガラス電極式水素イオン濃度計

METTLER TOLEDO 320 pH Meter

メトラー・トレド社

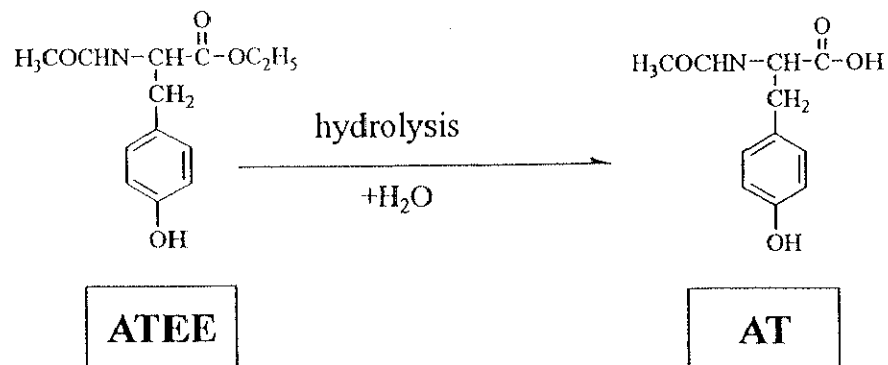
2-1-3 実験方法

2-1-3-1 ホウ酸緩衝液の調製

- ① ホウ酸 3.0915 g, 塩化カリウム 3.7275 g を純水に溶かして 500 ml の溶液 (0.1 M) を作る.
- ② 炭酸ナトリウム 1.0599 g を純水に溶かし 100 ml の溶液 (0.1 M) を作る.
- ③ ①,②の溶液を混合, 攪拌した後, pH メーターで pH 8.0 に調製する.
値が正確でなくなるので pH メーターで測定中は攪拌しない.

2-1-3-2 アミノ酸エステルの加水分解反応の測定

加水分解反応には, 基質として *N*-アセチル-L-チロシンエチルエステル (ATEE) を用いた. 反応は次の通りである.



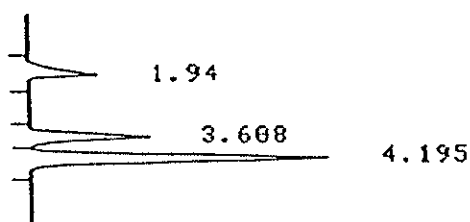
Scheme 2

- ① 30 ml スクリューバイアル中で α -CT 10 mg をホウ酸緩衝液 (pH8.0, 0.1M) 5 ml に溶かす.

- ② ①の酵素溶液を、あらかじめ 30 °C に保温しておいた有機溶媒／緩衝液 5.5 ml に加え、全量 6 ml にする。この時点を保存時間 0 分とした。
この溶液は、測定する回数分だけ作成した。
- ③ 30 ml スクリューバイアル中で ATEE 269 mg, アセトアニリド 250 mg を反応に用いる有機溶媒に溶かす。この際有機溶媒の量は、反応系の有機溶媒の濃度 10 % につき 4 ml の割合で加えた。例えば有機溶媒 80 % の反応系で実験する際には有機溶媒を 32 ml 加えた。このようにしたのは、基質溶液を長時間保存しておく際に溶液内での非酵素的加水分解反応が起こらないようにするためである。
- ④ ③の溶液と緩衝液を混ぜ 4.5 ml にする。このとき③の溶液は反応系の有機溶媒濃度 10 % につき 0.45 ml 加えた。例えば有機溶媒 80 % の反応系での実験では③の溶液 0.9 ml と緩衝液 3.6 ml を加える。このときの物質の濃度は、ATEE 26.9 mg / 4 ml, アセトアニリド 25.0 mg / 4 ml になる。
- ⑤ ④の溶液をマイクロシリンジで 0.8 μ l 取り、HPLC で基質溶液中の基質の加水分解をチェックする。このときの非酵素的反応による加水分解物は、後の酵素反応による加水分解反応から差し引く。
- ⑥ ②で作成した酵素保存用の溶液を所定の時間 30 °C で保温した後に④の基質溶液を 4 ml 加え、全量 10 ml で反応を開始させる。このときの酵素濃度は 1 mg / 10 ml になっている。
- ⑦ 適宜、注射器を用い反応溶液を少量取り、メンブランフィルターで濾過した後、マイクロシリンジで 2 μ l 取り HPLC で生成物の定量をする。検出波長は 270 nm, 流動相はアセトニトリル：水 = 1 : 1, 流速は 1 ml / min で行った。
- ⑧ 後述する式により、反応初速度、収率を計算した。

・反応の解析

HPLC の流動相と同一の溶媒に溶解させた濃度の異なる AT 溶液（所定量のアセトアニリドを含む）を数種類用意し、それぞれ HPLC で定量する。AT の濃度と HPLC で測定されたピークの面積とのグラフを描き、検量線を作成する。HPLC での測定結果の一例を示す。



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.94	6707			13.7541	
2	3.608	11342			23.2597	
3	4.195	30714	V		62.9862	
TOTAL		48763			100	

ここで、加水分解物 AT は 1.94 分後、基質 ATEE は 3.608 分後、内部標準物質アセトアニリドは 4.195 分後にピークが現れている。各ピークとアセトアニリドのピーク面積比から、検量線を用い生成物の定量を行う。また、加水分解の収率と反応初速度は次の式より求めた。

$$\text{加水分解収率 (\%)} = \frac{N\text{-Ac-L-Tyr-OH (mol)}}{\text{はじめに加えた } N\text{-Ac-L-Tyr-OEt (mol)}} \times 100$$

$$\text{初速度 } (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{N\text{-Ac-L-Tyr-OH } (\mu\text{mol})}{\text{反応時間 (min)} \times \text{酵素量 (mg)}}$$

なお、初速度を測定する際には、収率が 10 % を超えない範囲で時間を変えて最低 3 点測定し、反応時間と生成量が直線関係にあることを確認する必要がある。本研究では、反応時間 vs. 生成量の 3 次近似グラフの 0 分における傾きを初速度とした。

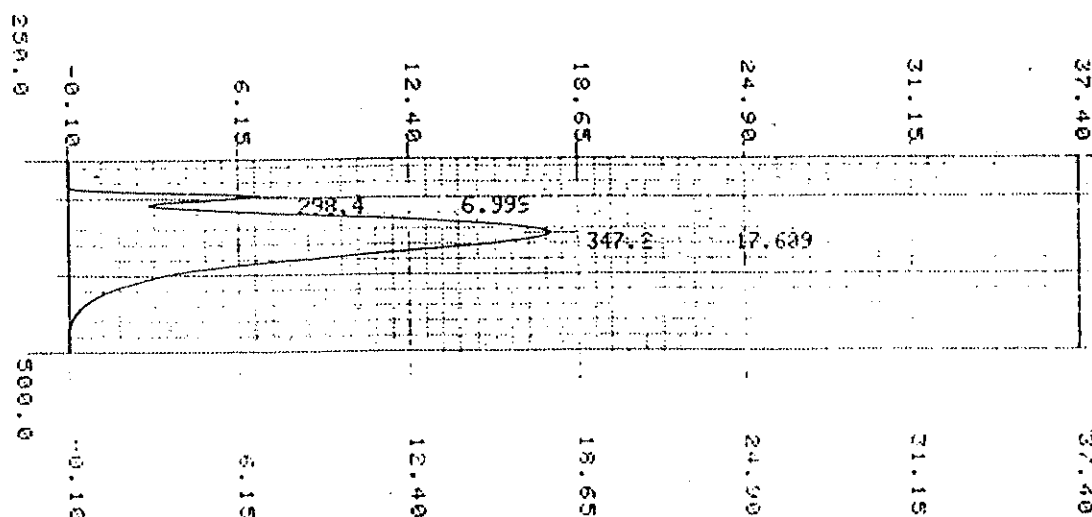
2-1-3-3 酵素の蛍光および蛍光消光の測定

・緩衝液を用いた際の蛍光波長の測定

① 50 ml スクリューバイアルに α -CT 7.5 mg を秤り取り、緩衝液、有機溶媒

の順に加え全量 30 ml に調製する。このときの酵素濃度は 2.5 mg / 10 ml になる。

- ② ①の溶液を 30 °C で保温し、適宜、無蛍光石英セルに約 3 ml とりわけ、30 °C で保温し攪拌しながら、蛍光分光器で蛍光スペクトルを測定する。
- ③ 蛍光スペクトルのピークの極大波長を蛍光波長、その強度を蛍光強度とする。4 ~ 5 回の測定の平均値をその系での測定値とする。測定例を以下に示す。



ここでは励起光が 298.4 nm に強度 6.999 で、蛍光が 347.2 nm に強度 17.609 で現れている。蛍光分光法は懸濁状態に比較的影響を受けないが、懸濁状態によっては励起光が散乱した光が分光器に入り、測定されることがある。このため懸濁がある程度を超えると蛍光分光も不可能になる。また、不均一な懸濁状態（攪拌できない沈殿物があるなど）の場合も上澄みのみの測定となる恐れがある。本研究では均一な懸濁状態の測定のみを行った。

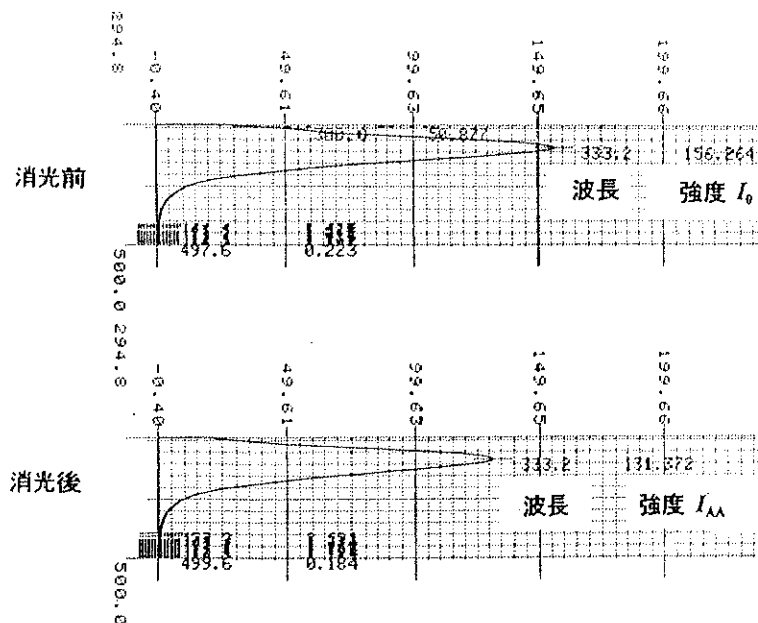
測定の際のパラメーターは次のように設定した。

SCAN MODE	: SPECTRUM	RESPONSE	: AUTO
SELECT MODE	: EM	BAND WIDTH EX	: 10 nm
EX	: 295 nm	BAND WIDTH EM	: 10 nm
EM RANGE	: 250 nm ~ 500 nm	SENSITIVITY	: LOW
SCAN SPEED	: SUPER		

・蛍光消光の経時変化の測定

- ① 50 ml スクリューバイアルに酵素 10 mg を秤り取り，純水，有機溶媒の順に加え全量 40 ml に調製した後 30 °C で保温する．この時点を保存時間 0 分とする．酵素濃度は 2.5 ml / 10 ml になる．
- ② 消光剤としてアクリルアミド 3.554 g を所定の濃度の含水有機溶媒に溶かし，メスフラスコを用いて全量 10 ml に調製する．
- ③ ①の溶液からマイクロピペットで 2 ml をセルに取り出し，消光剤のない場合の蛍光スペクトルを攪拌しながら測定する．
- ④ ③の溶液に消光剤溶液 41 μ l を加え，消光剤のある場合の蛍光スペクトルを攪拌しながら測定する．この際のアクリルアミドの濃度は 0.1 M になる．酵素濃度は③の測定時の 0.98 倍になる．

③,④の操作間の時間は 30 秒程度のため，同時刻に測定したと見なした．また，酵素の濃度が薄まるが，消光剤溶液の代わりに水 41 μ l を加えた際の蛍光強度変化の様子から，消光剤無しの場合の強度を 0.98 倍したものを基準として，消光の度合いを求めても差し支えないと判断した．消光の度合いの求め方を以下に示す．



$$\text{消光の度合い} = \frac{I_{AA}}{I_0 \times 0.98}$$

I_{AA} : アクリルアミドで消光された強度

I_0 : 消光前の強度

この場合の消光の度合いは 0.858 になる．

消光の度合いが1の時は全く消光を受けず、0の時は完全に消光されるということになる。

測定の際のパラメーターは前述したものと同一である。

・ Stern-Volmer の式を用いた消光の実験

- ① ヨウ化カリウム 8.3005 g を 50 ml メスフラスコを用いて 1.0 M に調製する。この際、含水有機溶媒には溶けにくいので、あらかじめホウ酸緩衝液に溶解させてからアセトニトリルを加え、最後に含水有機溶媒で容量を微調整する。
- ② ①で調製した溶液を薄めて、最終的に 0.1 ~ 0.4 M, 5 ml の溶液になるような 2 ml の溶液をつくる。
- ③ 酵素 52.5 mg を溶媒（ホウ酸緩衝液、アセトニトリルの順で加える）126 ml に溶かし、溶媒 3 ml 中、酵素 1.25 mg になるような溶液を調製する。
- ④ 蛍光スペクトルを測定する直前に 30 °C で保温していた②の溶液に③の酵素溶液 3 ml を加え全量 5 ml にした後、セルに入れて測定する。
- ⑤ 消光される Trp 残基の割合および消光効率を、先に述べた Stern-Volmer の式、変形 Stern-Volmer の式を用いて実験結果をプロットし、求めた。

測定の際の蛍光分光器のパラメーターは、前述のものと同じである。

2-2 結果および考察

2-2-1 酵素の蛍光波長と触媒活性の関連性

有機溶媒中で酵素を用いる際には、酵素の特異性が変化する、平衡のシフトにより水系では起こりにくい反応でも触媒するなどといったプラスの面がクローズアップされる。しかし、ではなぜ酵素を有機溶媒中で用いるとそのような変化が生じてくるのかについては、過去にはあまり省みられなかった。だが、酵素の利用が進むにしたがって、より有効に酵素反応を制御しようとする動きが強まり、有機溶媒中における酵素の構造変化と触媒活性の間の関連についての研究がなさ

れてきた。本研究室においても以前からそのテーマに取り組み、含水親水性有機溶媒中における酵素の蛍光波長の変化と、触媒活性との間に明瞭な相関関係があることを明らかにしている^{109~111)}。蛍光波長と触媒活性の間には、蛍光波長が長波長へシフトすると活性が低下する相関関係がある(Fig.2-1)。酵素中の Trp 残基は通常の状態では酵素内部の疎水性の領域(極性の低い領域)に埋もれた形で存在していることが多い。そのために、疎水領域での Trp の蛍光の特性(Fig.2-2)により、酵素の蛍光波長は短波長に現れることになる。ところが、有機溶媒によって酵素の構造が変化し、Trp 残基の周辺の環境が変化すると蛍光波長が長波長へとシフトする。Trp 残基の蛍光特性から、長波長へのシフトは極性の高い環境にさらされたことを示し、酵素がほぐれた状態になっているのではないかと考えられた。さらに、有機溶媒が高濃度の場合でも酵素の活性が残存しているが、これは、酵素の構造が水溶液中に比較的近い状態で保たれているためであることも蛍光スペクトルの測定からわかった。

これまでの研究では、溶媒組成を変化させた場合の、酵素の蛍光波長変化と触媒活性との間に相関関係が見られた。しかし、酵素を実際に使用する際には溶液中での安定性が非常に重要になってくる。そのため本研究においては、溶媒中での酵素の立体構造の経時変化を蛍光波長変化、触媒活性の変化、蛍光消光の測定から調査した。

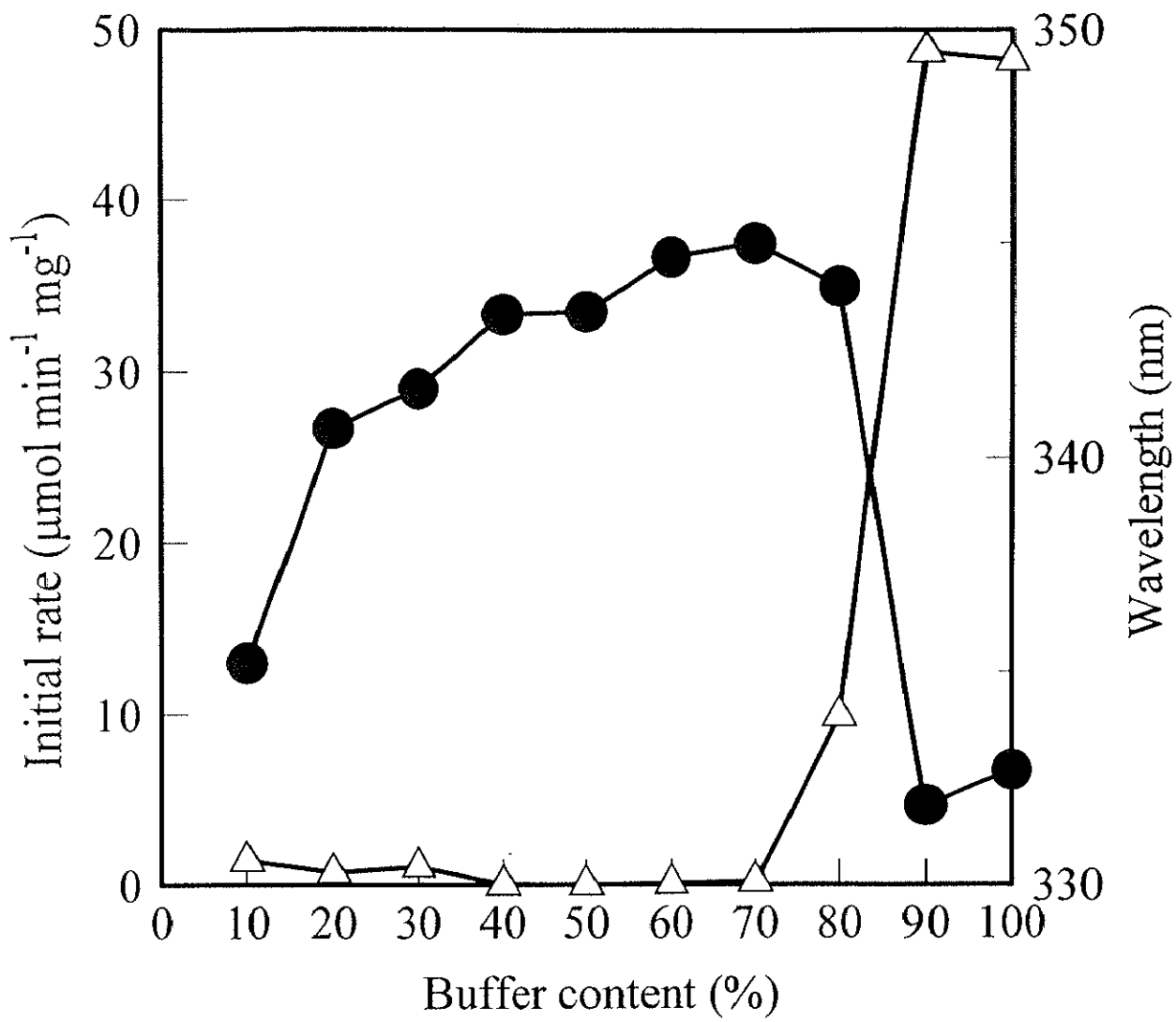


Fig.2-1

α -CT の加水分解活性と蛍光波長との関連性

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液系
(pH 8.0, 0.1 M)

- △— Initial rate
- Wavelength

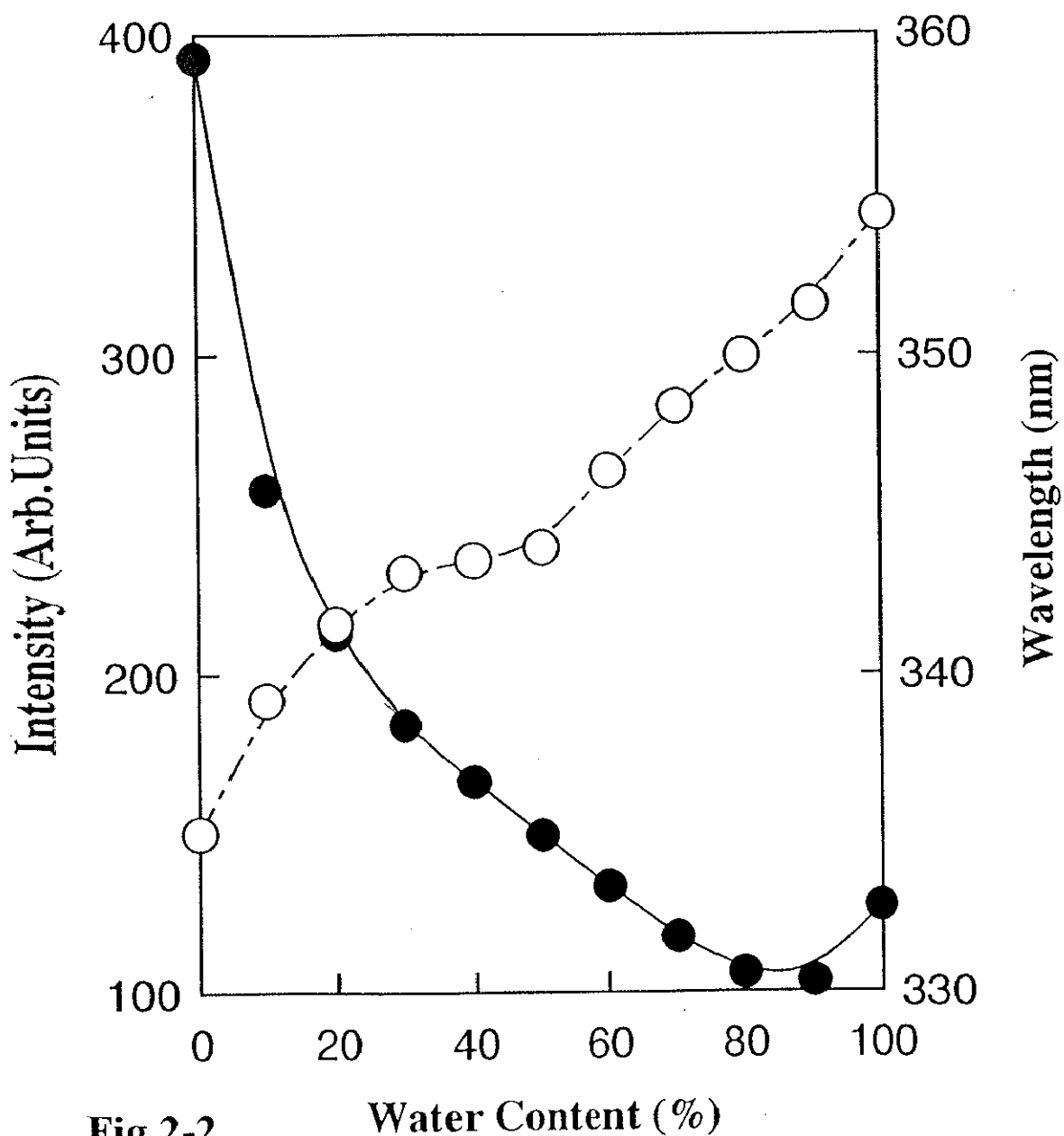


Fig.2-2

N-Ac-L-Trp-OEt の蛍光スペクトル変化

アセトニトリル-水系

○: Wavelength (nm) $\lambda_{em}=295\text{ nm}$
 ●: Intensity (Arb. Units)

2-2-2 酵素の蛍光波長の経時変化と触媒活性

酵素は、溶媒に溶かした際に速やかに構造変化を起こし、失活する場合も多いが、溶媒組成によってはゆっくりと時間をかけて変化していく場合もある。酵素の溶液中での挙動を明らかにすることで、活性を長時間維持するための手がかりが得られると考えられる。

・ アセトニトリル-緩衝液系

Fig.2-3 に α -CT の ATEE 加水分解活性がどのように経時変化を起こすのかを示した。内部のグラフは溶媒が高濃度の際の拡大図である。

このグラフからわかるように、緩衝液濃度 90 % では、 α -CT の触媒活性が徐々に低下していった。半減期はおおよそ 40 時間である。アセトニトリルは 10 % でも存在すれば α -CT の失活を引き起こす。緩衝液 80 %, 70 % では、当初の活性を数時間しか維持できない。緩衝液 60 % ~ 40 % では α -CT を溶媒に溶かした時点で失活過程が終了していた。以前からアセトニトリル-水系ではアセトニトリルが高濃度になると α -CT の活性が回復する結果が得られているが、緩衝液 30 % ~ 10 % では保存開始時点では低いながらも活性が確認できた。しかしやはり、短いもので数時間、長いものでも 2 日後にはほとんど活性がなくなった。緩衝液 100 % の系では加水分解反応が即座に終了するために HPLC を用いた初速度の測定は不可能だったが、2 日保存した後も、検出できる範囲での活性の低下は見られなかった。

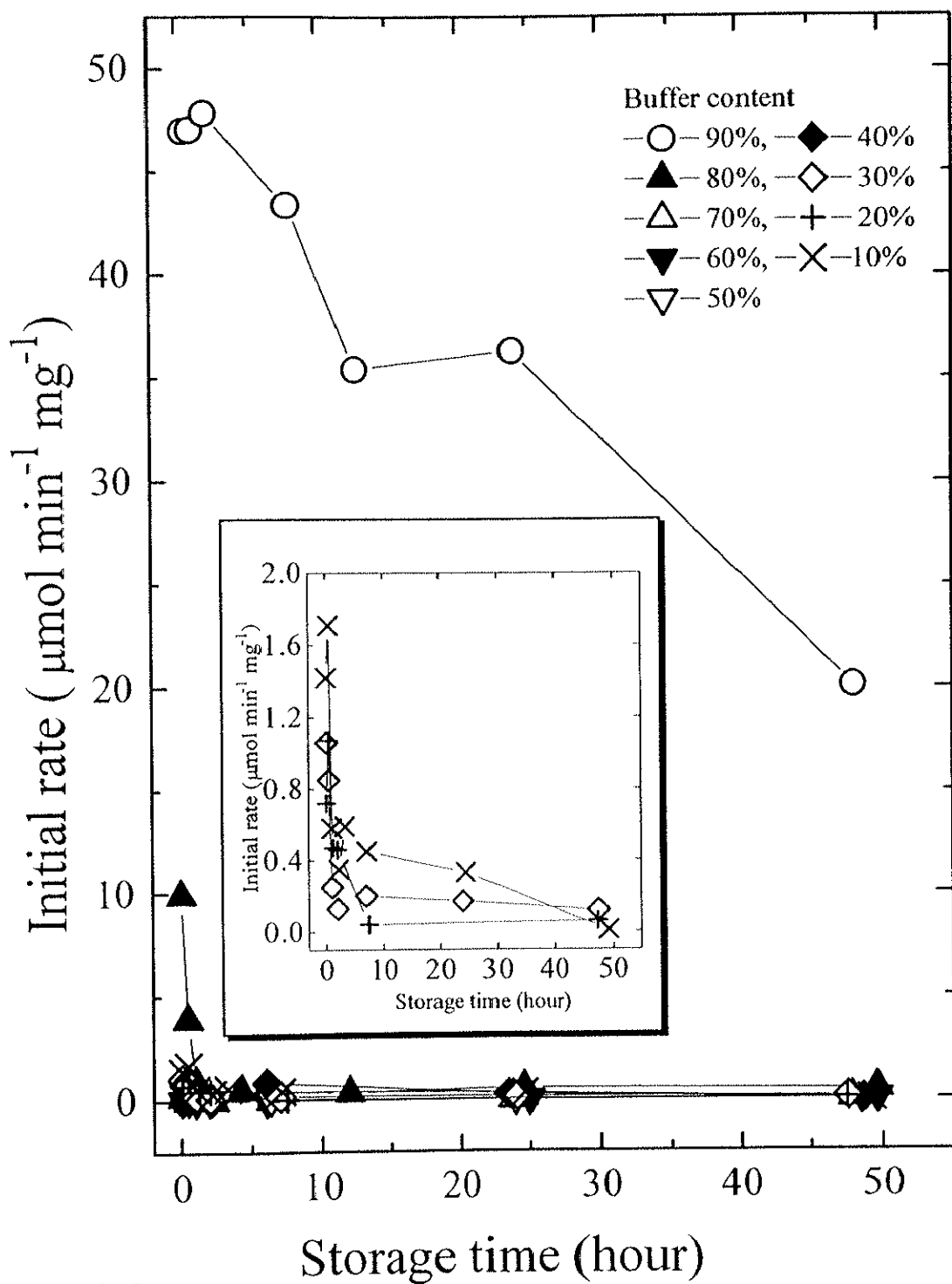


Fig.2-3

エステルの加水分解に対する α -CTの保存時間の影響

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液系
(pH 8.0, 0.1 M)

Fig.2-4 にアセトニトリル-ホウ酸緩衝液系での α -CT の蛍光波長の経時変化を示す。緩衝液 100 % では 2 日後でもほとんど波長変化がなかったのに対して、緩衝液 90 % では初速度の低下と関連するように蛍光波長の長波長へのシフトが見られた。緩衝液 80 %, 70 % では数時間のうちに波長のシフトが完了した。緩衝液 60 % ~ 40 % では測定開始時点で波長シフトが終了していた。緩衝液 30 % ~ 10 % の組成では数時間の間、蛍光波長が短波長に保持されていた。

初速度、蛍光波長の経時変化から、溶媒組成による α -CT の急激な構造変化だけでなく、その後ゆっくりと生じる構造変化に対してもよい相関が得られた。有機溶媒は酵素を変性させるため、アセトニトリルの濃度が高まると活性が低下していく傾向になるのが普通だが、高濃度の場合に α -CT の活性があるのは酵素が懸濁状態になっているためと考えられる。蛍光波長からも示唆されるように、この溶媒組成では立体構造、少なくとも Trp 残基周辺の立体構造は数時間保持されている。懸濁状態で会合しているため、会合体内部の酵素にはアセトニトリルが接近し、変性作用を受けるまでの時間的余裕があると思われる。有機溶媒中での酵素反応は、高濃度の有機溶媒を用いて初めて新たな展開が開けるのであるから、この付近の有機溶媒濃度で酵素の立体構造を保持できれば有効利用が可能になると考えられる。

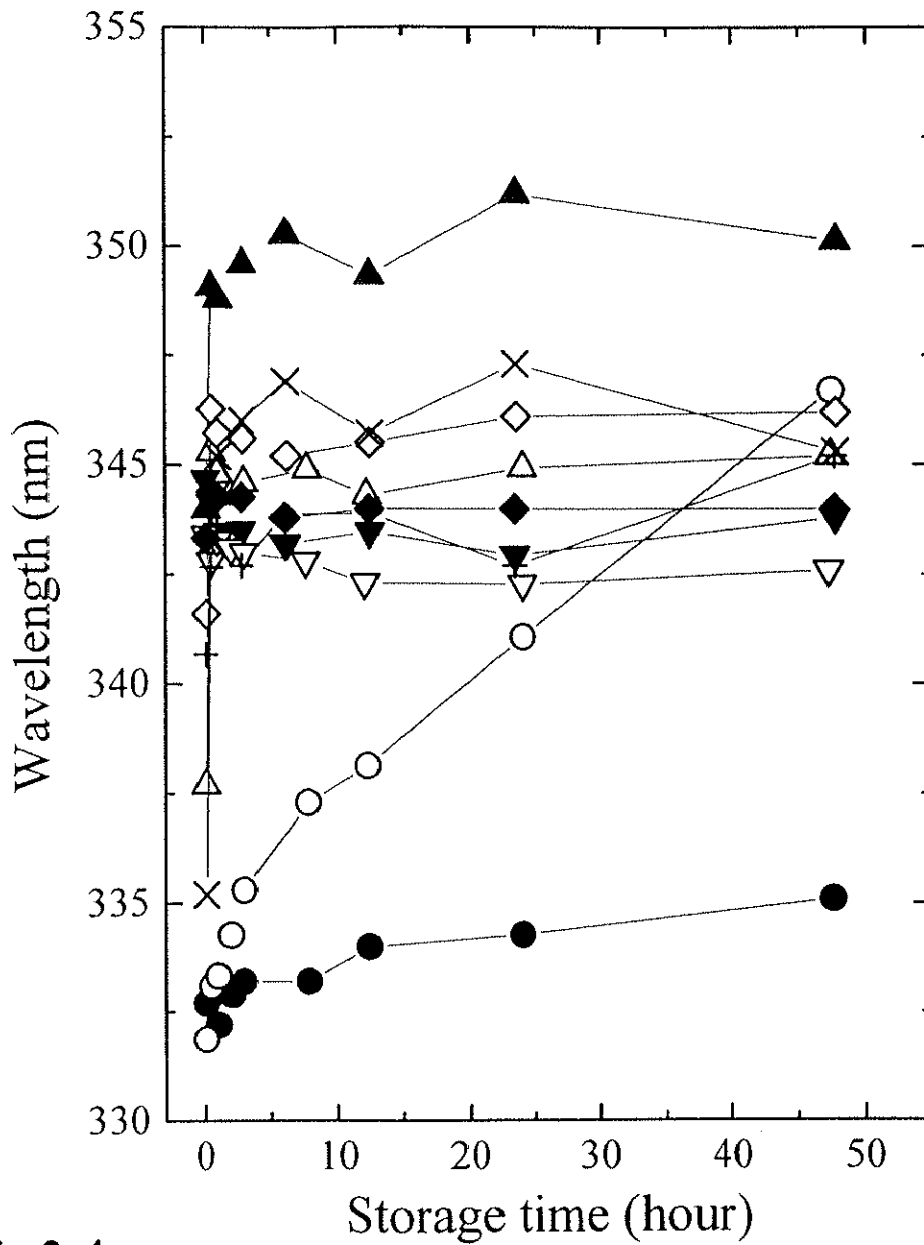


Fig.2-4

α -CT の保存時間による蛍光波長の変化

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液系
(pH 8.0, 0.1 M)

- | | | | | |
|-----|-----|-----|-------|------|
| -×- | 緩衝液 | 10% | , -▼- | 60% |
| -+- | | 20% | , -△- | 70% |
| -◇- | | 30% | , -▲- | 80% |
| -◆- | | 40% | , -○- | 90% |
| -▽- | | 50% | , -●- | 100% |

・エタノール-緩衝液系

Fig.2-5, 6 に、有機溶媒にエタノールを用いた際の α -CT の活性、蛍光波長の経時変化をそれぞれ示す。

アセトニトリルとは異なり、緩衝液 90 % の場合の失活は見られなかった。蛍光波長のシフトがないことから、エタノールは少量では α -CT の立体構造に長時間にわたって影響を与えないと言える。エタノールが高濃度になるにつれて活性は低下し、アセトニトリルの時に見られた活性は見られなかった。これは、エタノールを用いた際にはアセトニトリルの時よりも懸濁が生じないことから、会合による酵素の立体構造保護効果が少ないためと思われる。また、検出はできないが ATEE から ATEE へのエステル交換反応が起こっている可能性も否定できない。ペプチドの合成ではアセトニトリルがよい溶媒であるという報告¹⁾²⁾もあることから、高濃度有機溶媒中での酵素の立体構造保持の対策をとれば、エタノールよりアセトニトリルのほうが有効に利用できると思われる。

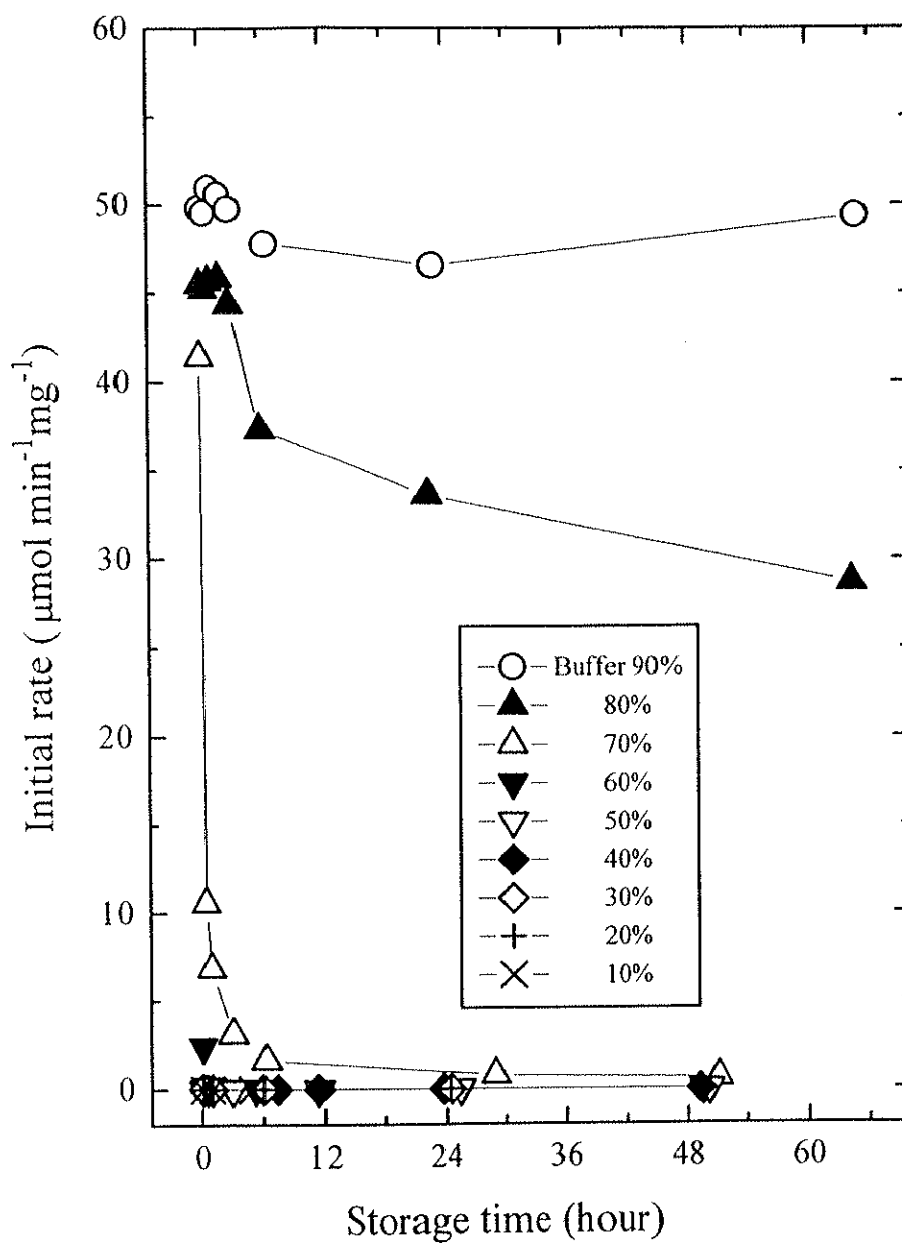


Fig.2-5

エステルの加水分解に対する α -CT の保存時間の影響

エタノール-ホウ酸緩衝液系
(pH 8.0, 0.1 M)

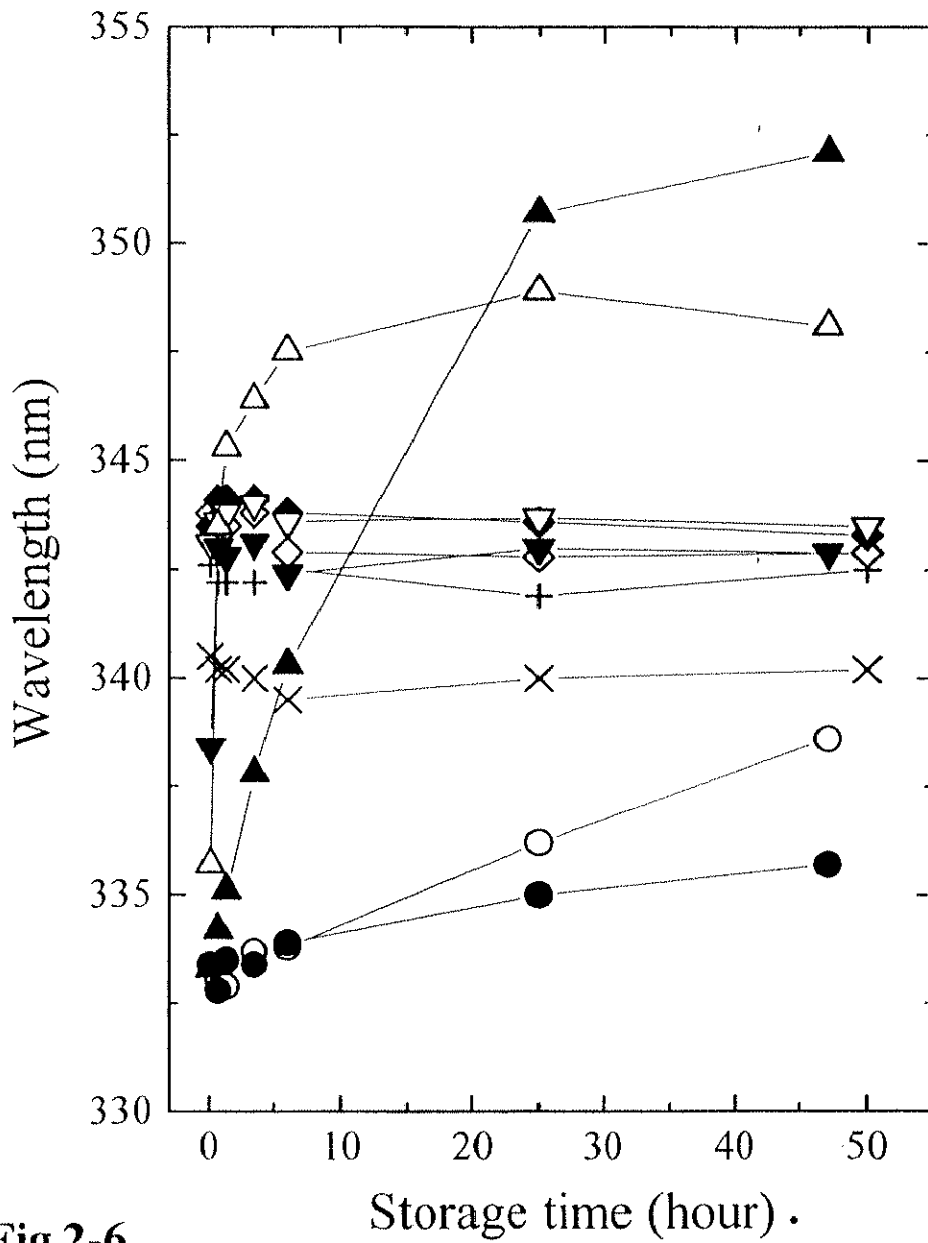


Fig.2-6

α -CTの保存時間による蛍光波長の変化

エタノール-ホウ酸緩衝液系
(pH 8.0, 0.1 M)

-x-	緩衝液	10%	-▼-	60%
-+-		20%	-△-	70%
-◇-		30%	-▲-	80%
-◆-		40%	-○-	90%
-▽-		50%	-●-	100%

2-2-3 酵素の消光の経時変化

2-2-3-1 消光の度合いの経時変化

酵素中の Trp 残基は通常は内部に埋もれた状態にあることが多い。しかし構造変化が起こると外部の溶媒が接する状態に変化することがある。Trp 残基の蛍光を消光する消光剤を溶媒に加えることで、酵素中に埋もれた Trp 残基は消光を受けず、溶媒に接する状態に変化した Trp 残基は消光を受けようになり、違いが生じてくる。このことを利用して、溶媒に溶かしてからの酵素の立体構造の変化を調べた。

・アセトニトリル-水系における消光の度合いと触媒活性との関連

Fig.2-7 に溶媒組成を変えた際の消光の度合いと初速度の変化を示した。消光の度合いは、消光剤を加えても全く消光されない場合が 1、消光剤により完全に消光されてしまう場合が 0 になる。そのため、1 に近いほど消光剤が Trp 残基に接近しにくい、すなわち酵素の立体構造がしっかりまとまった形を取っていることになる。反対に 0 に近づくと酵素の構造がほぐれて Trp 残基が外部の溶媒に接するようになったことを示す。このグラフからは酵素の構造がほぐれると活性が低下するよい相関が見られる。水 100 % においても消光が起こるのは通常の状態の α -CT 中の 8 個の Trp 残基が、すべて埋もれているわけではないことによるものである。

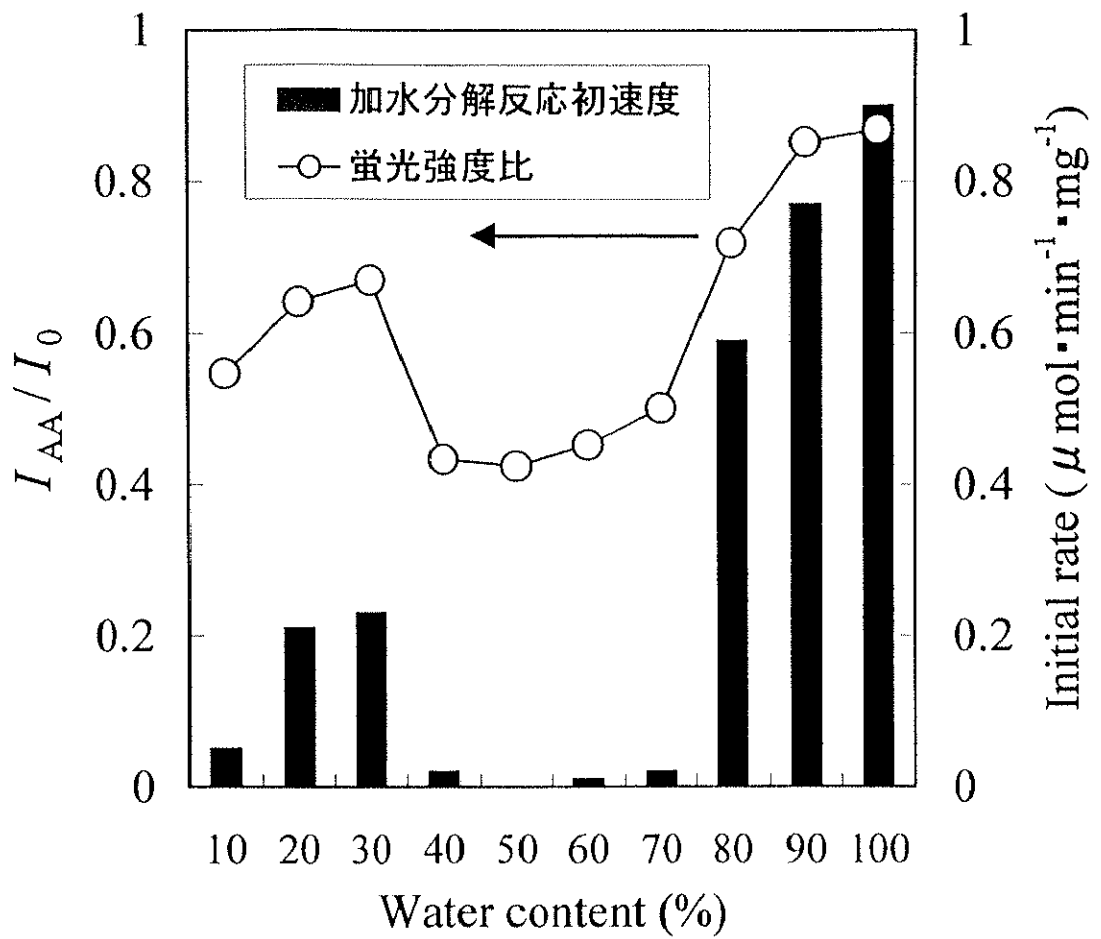


Fig.2-7

溶媒組成による α -CTの触媒活性と消光の度合いの変化

アセトニトリル-水系

・アセトニトリル-水系における消光の度合いの経時変化 (α -CT)

Fig.2-8 にアセトニトリル-水系における蛍光波長の経時変化を示す。先の実験における緩衝液を用いた場合とほぼ同じ傾向になったが、いくつか異なる点もある。まず、水 90 % の時に蛍光波長の変化がほとんどなかった。緩衝液を用いた際には経時変化が見られたが、水を用いた場合には見られないのは、緩衝液を用いたことで α -CT の活性が向上し、そのために自己分解を起こしたためと考えられる。緩衝液を用いると酵素活性は 50 倍以上にもなるが、今回の蛍光測定において緩衝液を用いなかったのは、緩衝剤が析出するために蛍光測定が困難になるのと、消光剤以外の影響をなるべく除外するためである。全体的に見て、緩衝液を用いた際に比べて α -CT の構造変化は起こりにくくなった。

Fig.2-9 に蛍光強度の経時変化を示す。アセトニトリルの濃度が増すにつれて強度が増すが、これは水のほうが放出された蛍光のエネルギーを受け取りやすい性質があるためである。

Fig.2-10 に消光剤としてアクリルアミドを 0.1 M 加えた際の蛍光波長の経時変化を示す。消光剤を加えない場合とほとんど同じ傾向を示すことから、消光剤は α -CT の構造にほとんど影響を及ぼさないと考えられる。アクリルアミドは α -CT に対してごく弱い拮抗阻害剤としての影響はあるが、結合することはないという報告もなされている¹¹³⁾。若干、蛍光波長が短波長側にシフトしたが、これは溶媒に接して極性の高い環境にある Trp 残基（長波長の蛍光を発する）が消光を受けたためと考えられる。

Fig.2-11 に消光剤を加えた際の蛍光強度の経時変化を示す。消光剤を用いることで強度は大きく減少した。強度の減少の度合いは溶媒組成によって異なるため、Fig.2-9 で見られたようなアセトニトリル濃度の増加にしたがって蛍光強度が増すといった傾向は無くなった。

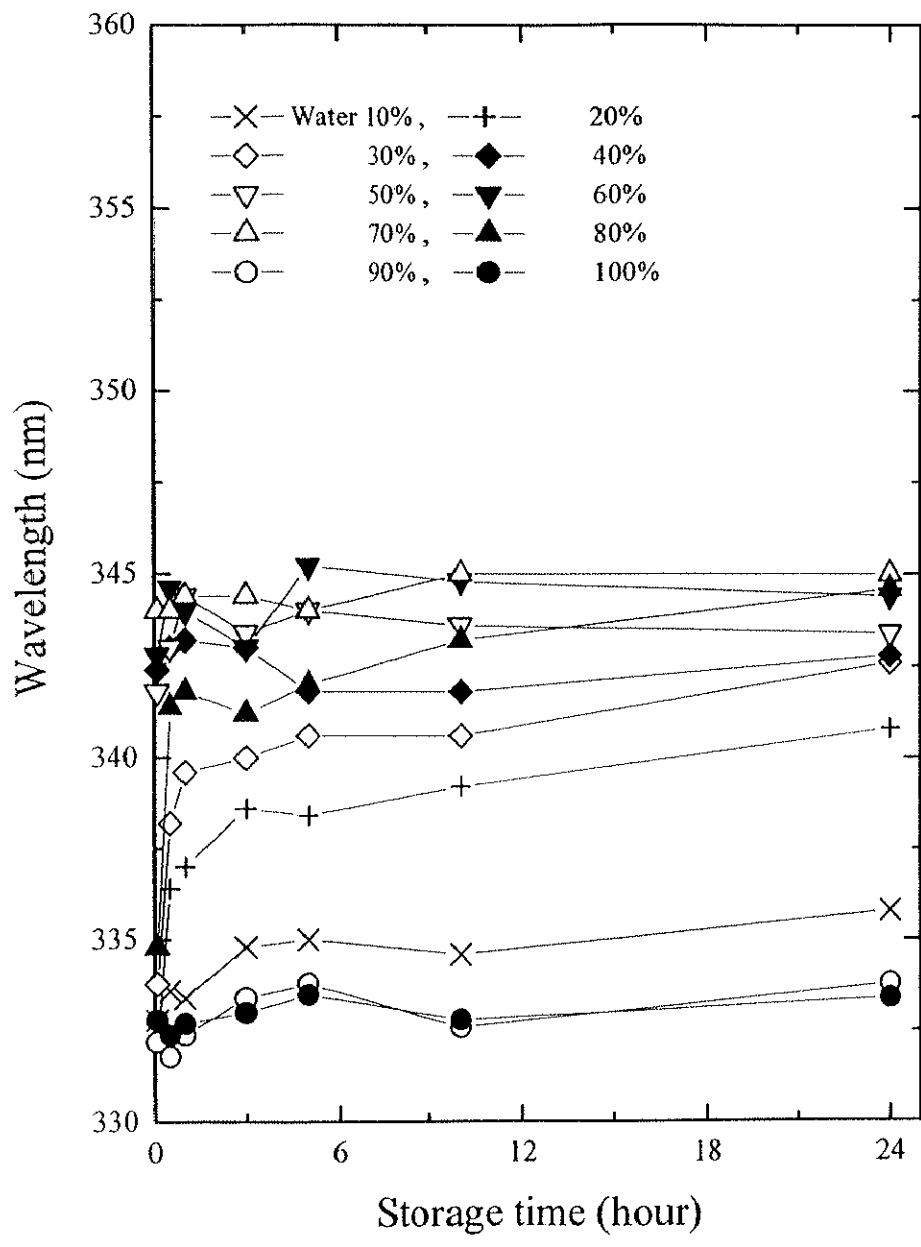


Fig.2-8

アセトニトリル-水系での蛍光波長の経時変化
 α -CT 2.5 mg / 10 ml

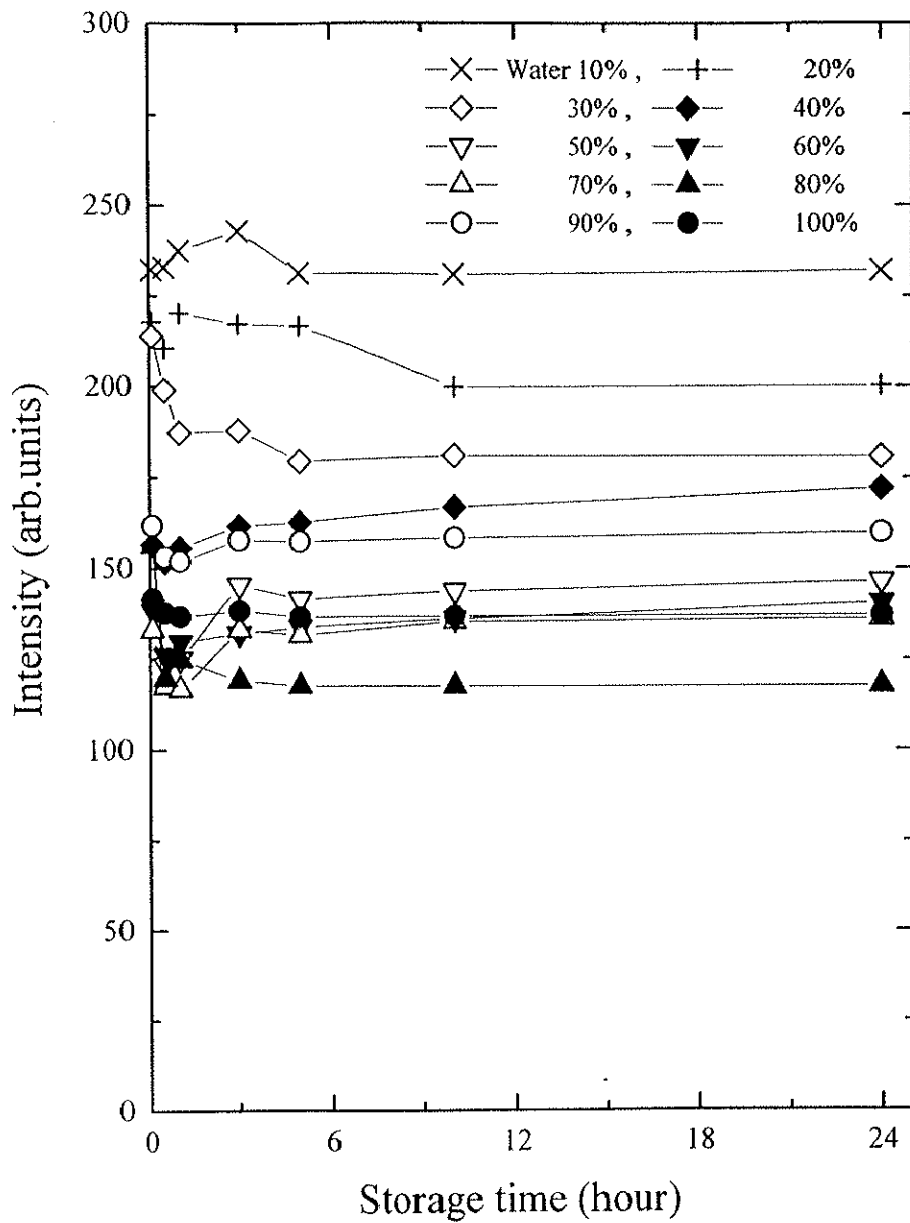


Fig.2-9

アセトニトリル-水系での蛍光強度の経時変化
 α -CT 2.5 mg / 10 ml

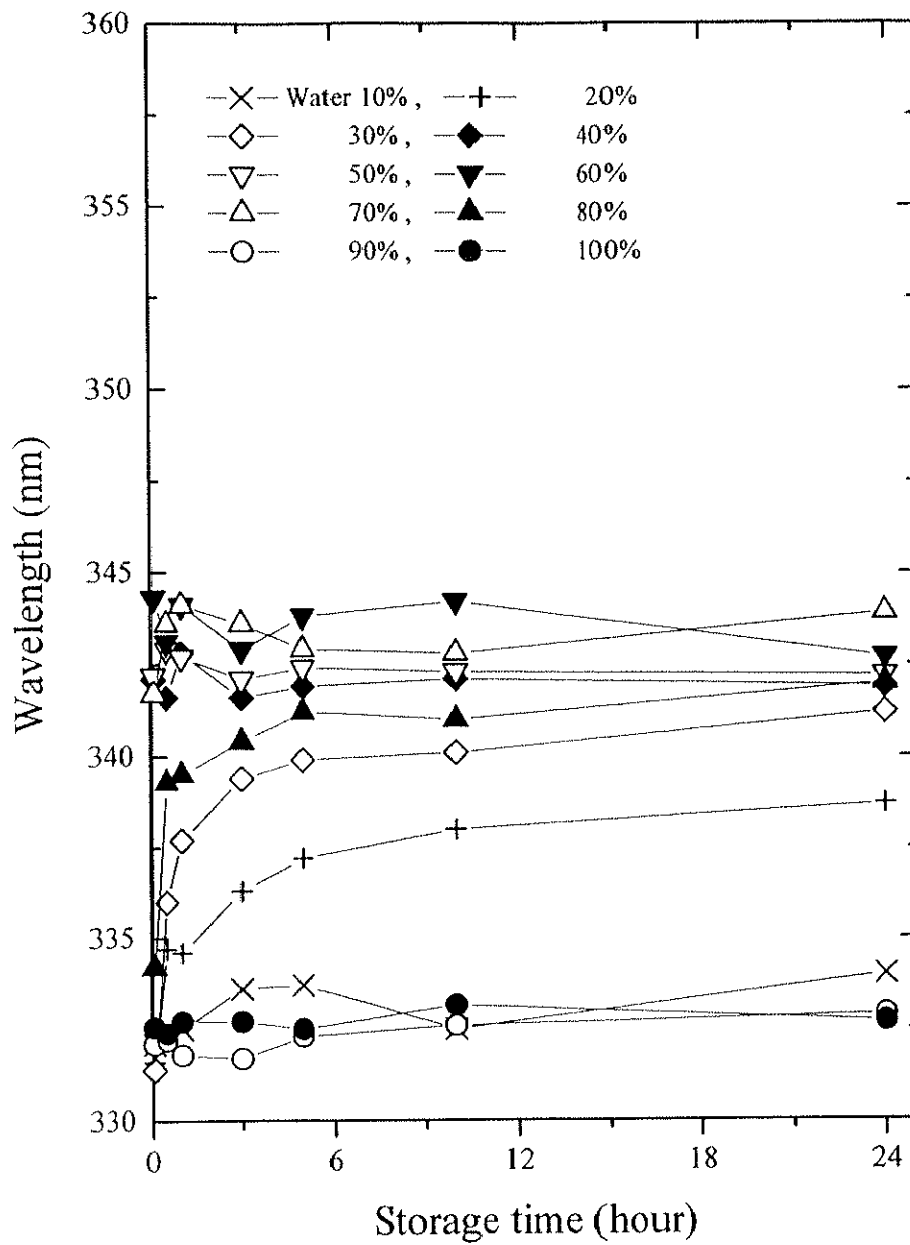


Fig.2-10

アセトニトリル-水系での蛍光波長の経時変化
(消光剤添加時)

α -CT 2.5 mg / 10 ml

消光剤 : アクリルアミド 0.1 M

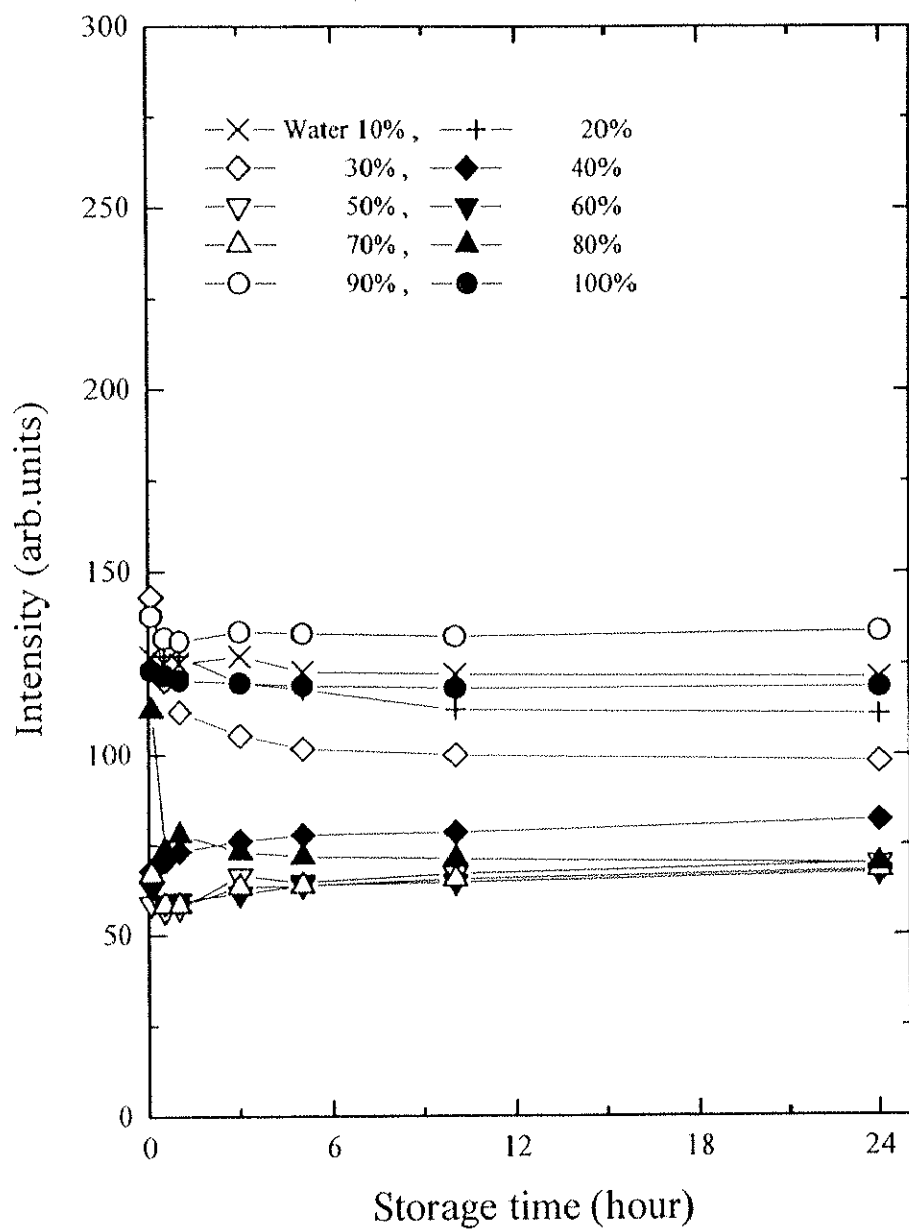


Fig.2-11

アセトニトリル-水系での蛍光強度の経時変化
(消光剤添加時)

α -CT 2.5 mg / 10 ml

消光剤 : アクリルアミド 0.1 M

Fig2-12 に溶媒組成による消光の度合いの変化および経時変化を示す。経時変化の様子は大きく分けて3つのグループに分けられる。

1. 水 100 %, 90 %では消光の度合いに変化がなかった。これは溶媒に溶かしてから α -CTの立体構造の変化がなかったことを示している。
2. 水 70 %～40 %では酵素の構造が保たれていると考えられる消光の度合い0.9付近から大きくずれ、0.4～0.5付近になった。これは α -CTの構造がほぐれTrp残基に消光剤が接近できるようになったためであると考えられる。さらに経時変化もほとんど見られないことから、この変化が速やかに生じ、酵素が失活しているものと思われる。
3. 水 80 %, 30 %～10 %では経時変化が見られ、初めの数時間はあまり消光を受けないが、時間とともに消光されていく。 α -CTの立体構造がほぐれるまでには時間がかかることがわかる。

蛍光波長の経時変化では、Trp周囲の極性環境に変化があることは突き止められるが、極性に変化するのは外部の溶媒によるものだけではない。酵素内部の極性を持つアミノ酸残基がTrp残基に接近することでも極性環境が変化するために、酵素が大きくほぐれる変化が起こっているのか、内部の側鎖の位置の小さな変化が起こっているのかは判断しにくい。今回の結果から、アセトニトリル-水系で α -CTに起こる変化は、立体構造がほぐれる部類のものであることが強く示唆された。

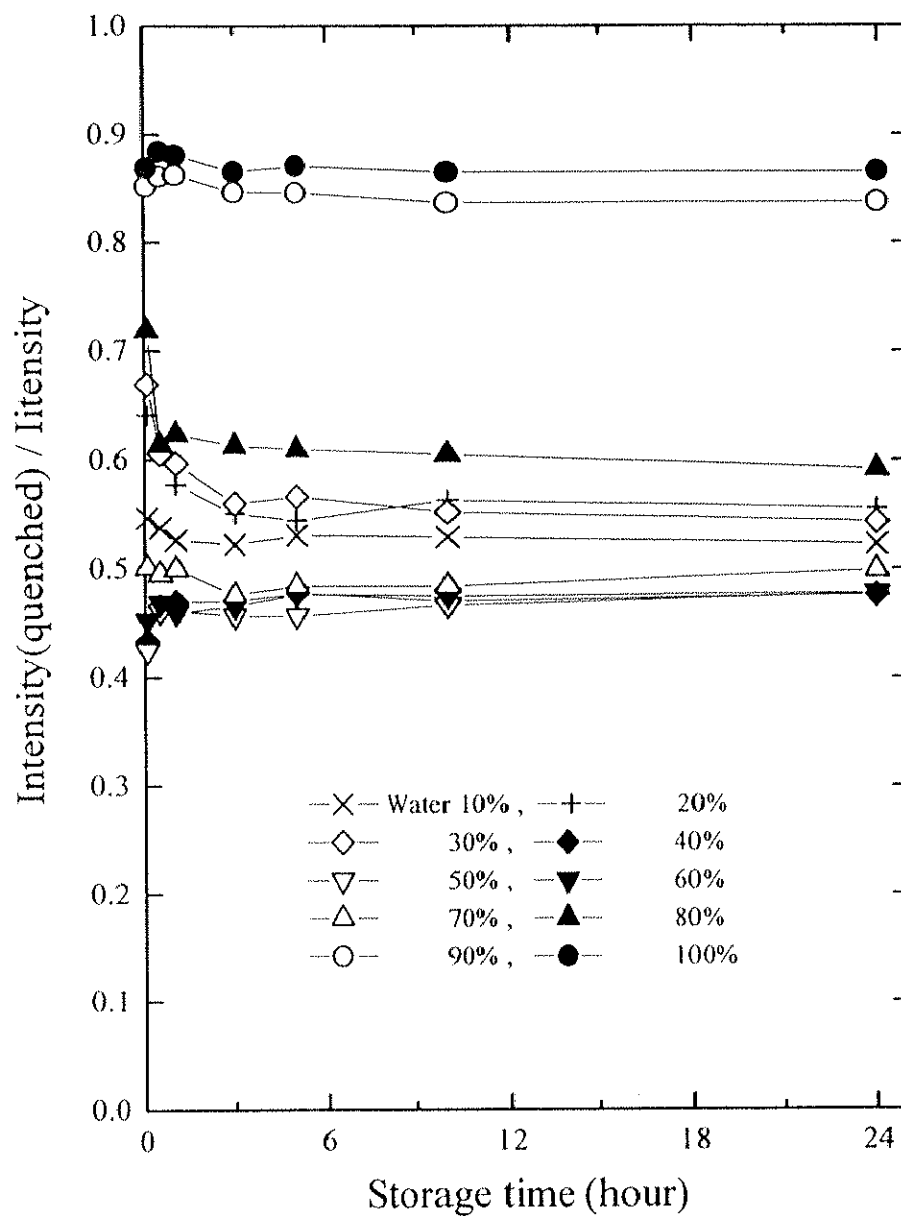


Fig.2-12

アセトニトリル-水系での消光の度合いの経時変化

α -CT 2.5 mg / 10 ml

・エタノール-水系における消光の度合いの経時変化 (α -CT)

有機溶媒をエタノールに変えて同様な実験を行った。結果を Fig.2-13 ~ 17 に示す。アセトニトリルでの実験と同様に、緩衝液を用いた場合に比べて蛍光波長の経時変化が起こりにくくなった。やはり α -CT の自己分解が起こらなくなったためと考えられる。消光の度合いはアセトニトリルを用いた場合と異なり、水 50 % 以下では経時変化が見られなかった。また、消光の度合いも 0.6 付近までにとどまっており、アセトニトリルのように消光を受けなかった。しかし α -CT は以前の研究で、高濃度のエタノール中では失活しているため、消光の度合いが 0.7 を割った辺りからは立体構造変化が許容限度を超えて進行した状態になっている可能性がある。

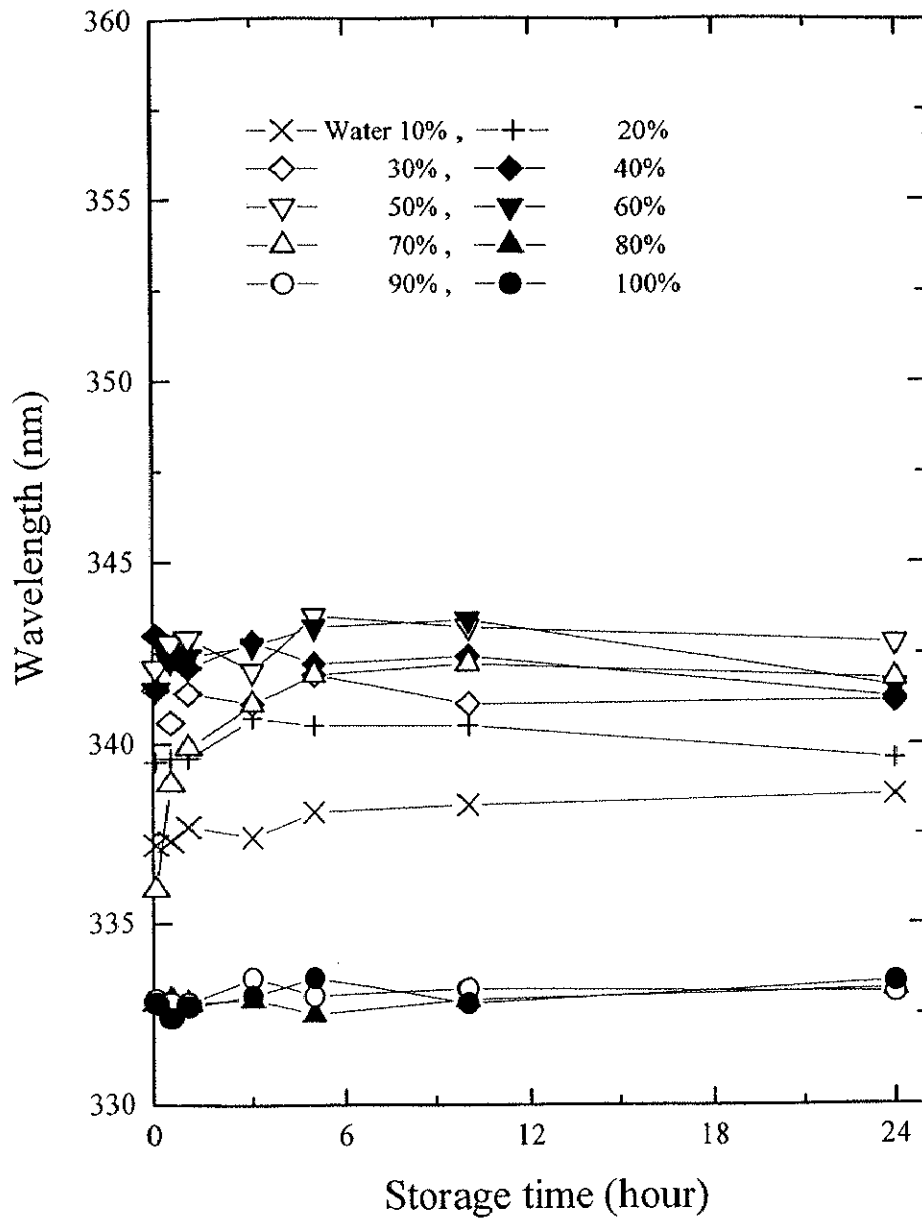


Fig.2-13

エタノール-水系での蛍光波長の経時変化

α -CT 2.5 mg / 10 ml

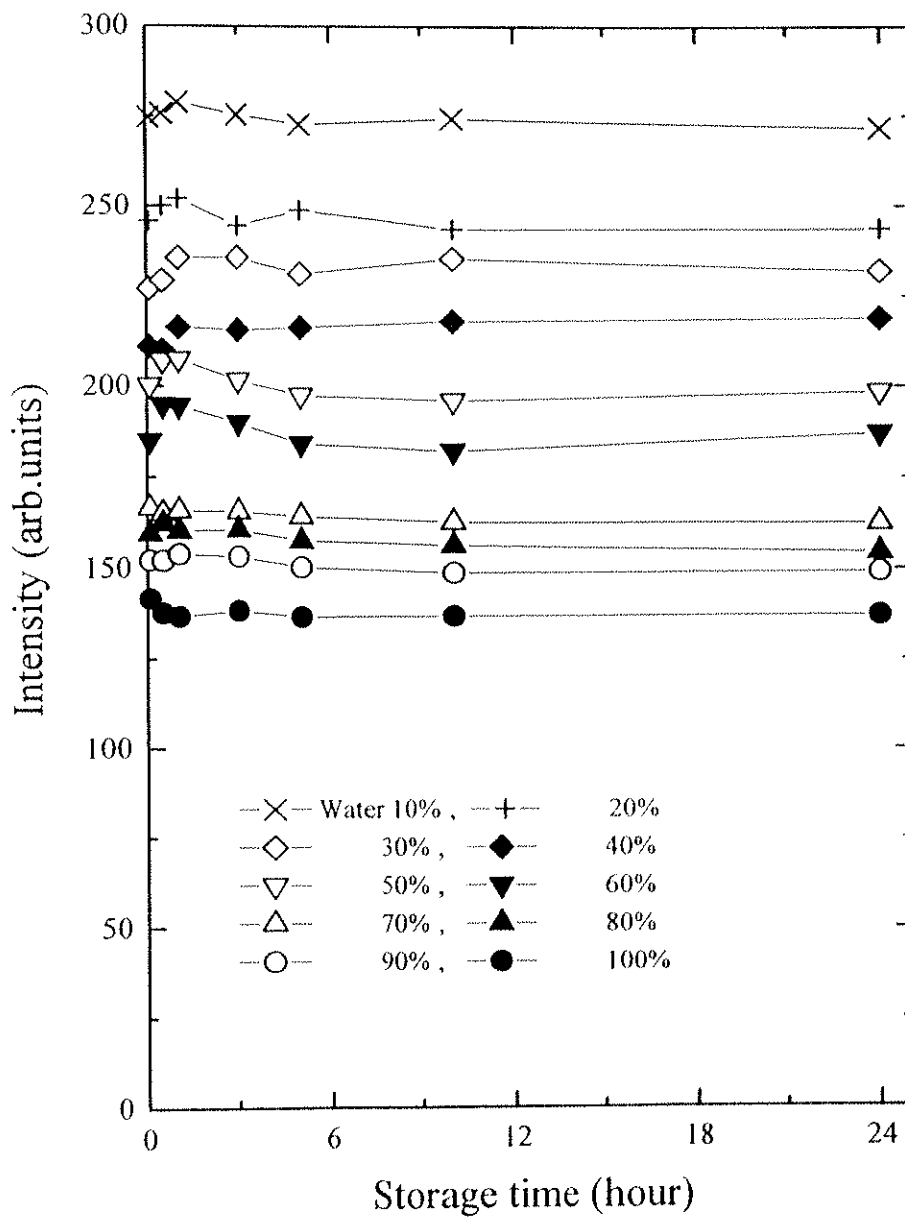


Fig.2-14

エタノール-水系での蛍光強度の経時変化

α -CT 2.5 mg / 10 ml

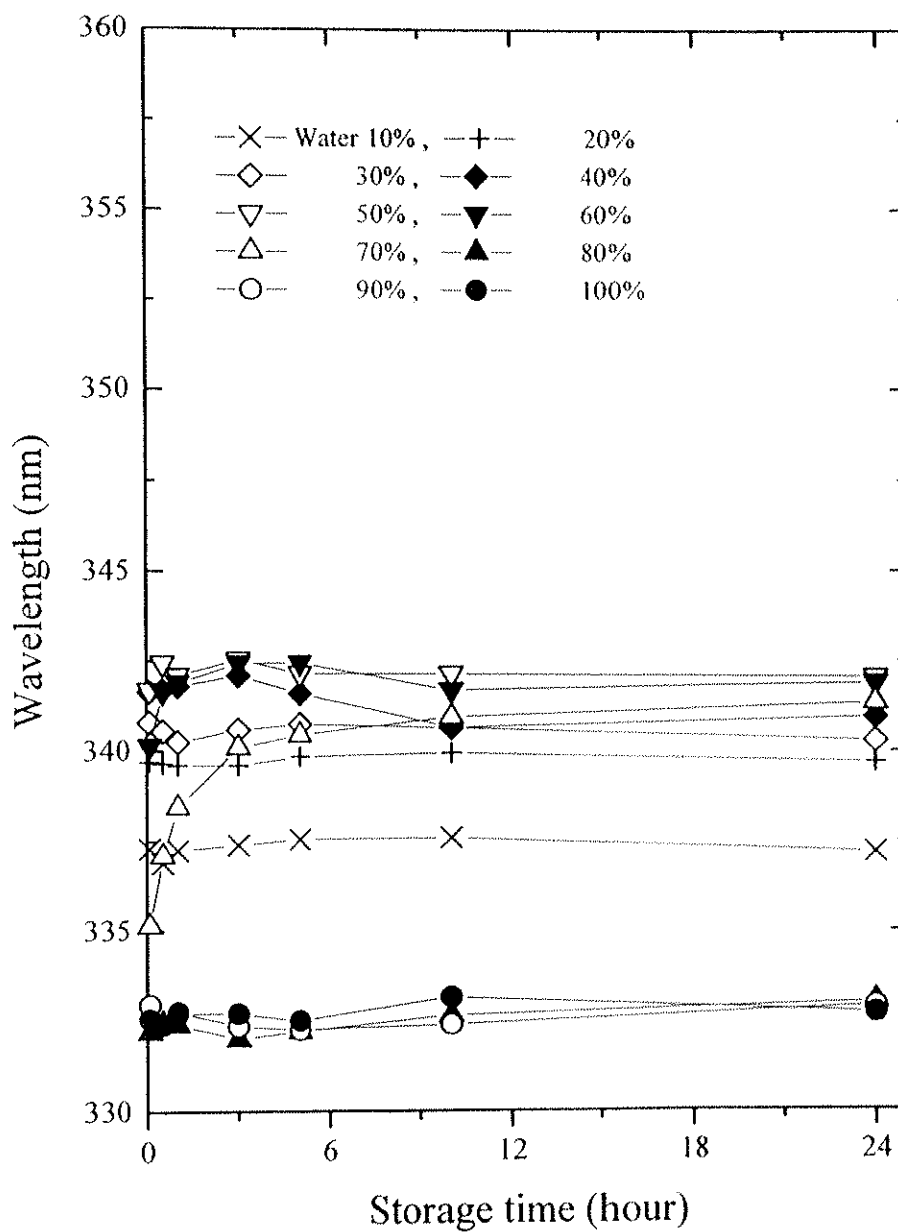


Fig.2-15

エタノール-水系での蛍光波長の経時変化
(消光剤添加時)

α -CT 2.5 mg / 10 ml

消光剤 : アクリルアミド 0.1 M

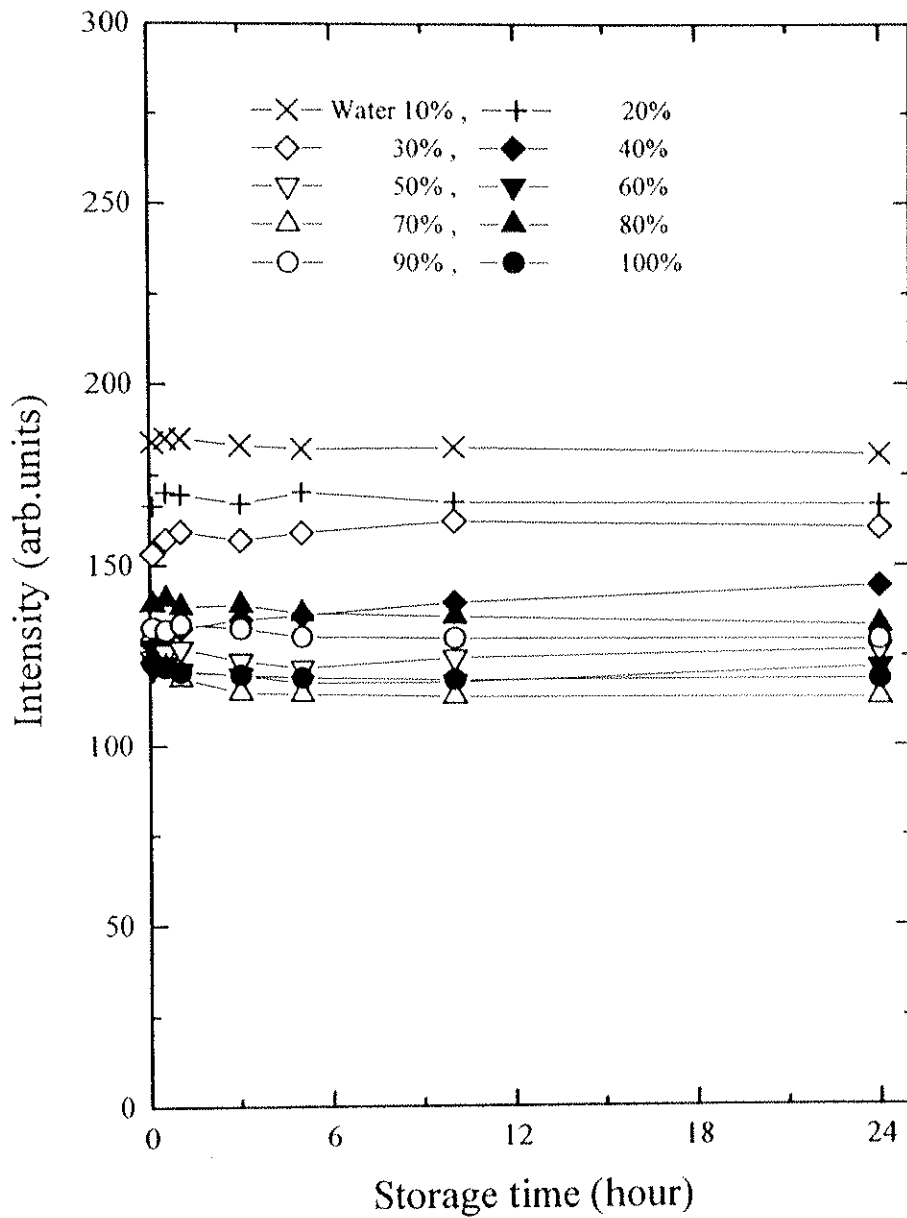


Fig.2-16

エタノール-水系での蛍光強度の経時変化
(消光剤添加時)

α -CT 2.5 mg / 10 ml
消光剤 : アクリルアミド 0.1 M

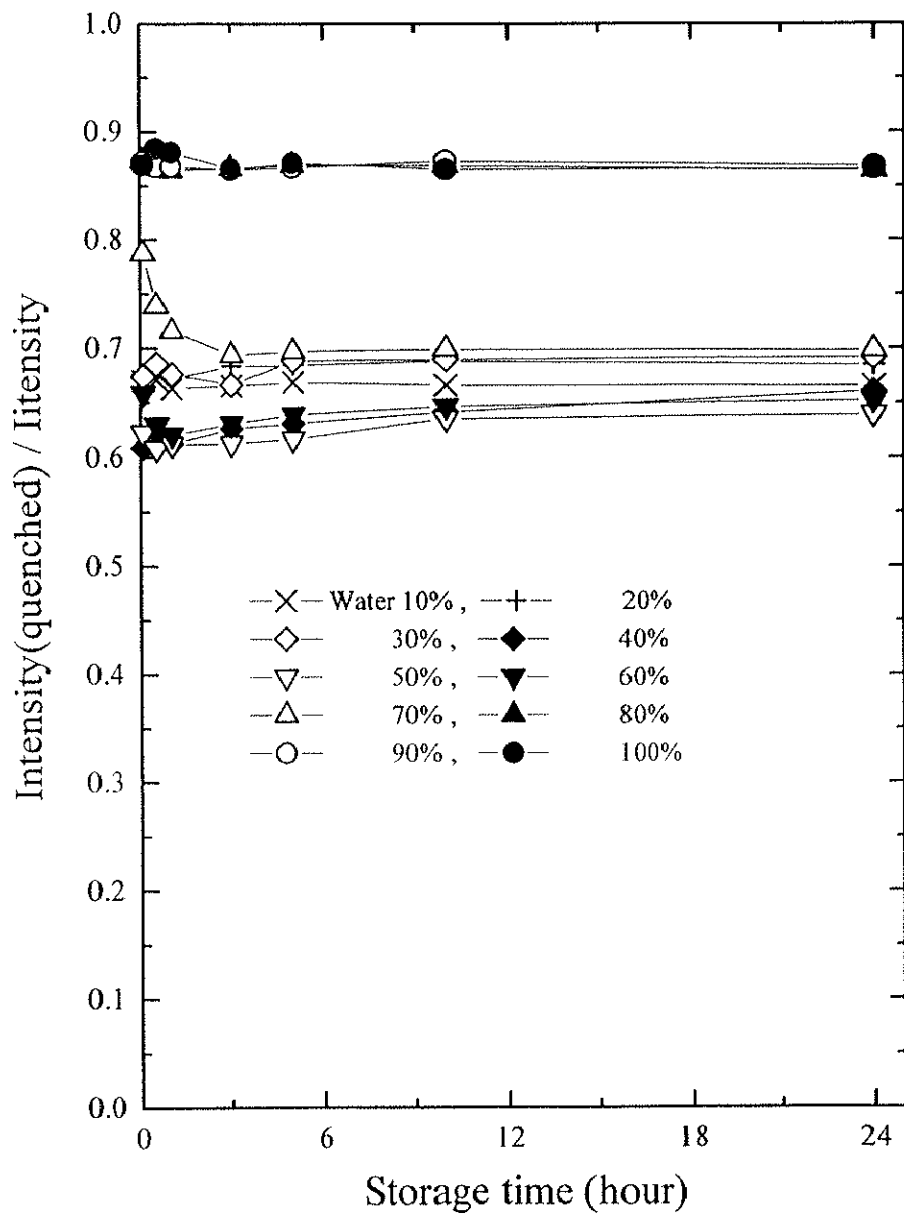


Fig.2-17

エタノール-水系での消光の度合いの経時変化

α -CT 2.5 mg / 10 ml

・ エタノール-水系における消光の度合いの経時変化 (STB)

α -CTと同じ、セリンプロテアーゼの仲間であるSTBを用いた。STBは反応機構は α -CTに類似しているが、構造は全く違う酵素であるため、有機溶媒に対する振る舞いもことなると思われる。

Fig.2-18 ~ 22 に結果を示す。Fig.2-18, 20 において α -CTと大きく異なる点はエタノールを増やすにしたがって蛍光波長が短波長側にシフトする点である。Fig.2-22 では水中では消光を強く受けていたものが、エタノールが増加すると消光を受けなくなってくることから、通常の状態では溶媒が接近できる位置にあったTrp残基が、エタノールの濃度が増すことでSTBの立体構造が変化し、溶媒に接しにくくなったのではないかとと思われる。あるいは、通常は近傍のTyr, Phe残基へのエネルギー移動により消光を受けていたTrp残基が、構造変化によって蛍光を発するようになったとも考えられる¹⁴³⁾。また、蛍光強度以外にはほとんど経時変化が見られなかった。

消光の度合いを測定することにより、系中の有機溶媒を増していくと α -CT, STBにおいては内部の極性アミノ酸残基の位置が変わるような小さな変化ではなく、酵素の立体構造全体が大きく変化していくことがわかった。また、同じセリンプロテアーゼではあっても構造の全く異なる α -CTとSTBでは、溶媒組成の変化に対する消光の受け方に差がでてきた。 α -CTでは通常埋もれているTrp残基が溶媒に接するようになるような、構造がほぐれる変化が起こっていると考えられる。それとは反対に、STBでは通常溶媒と接していたTrp残基が構造変化によって溶媒に接しにくくなる変化が生じたか、Trpの他の残基による消光が構造変化で解除されるようなアミノ酸残基の移動が生じたと考えられる。

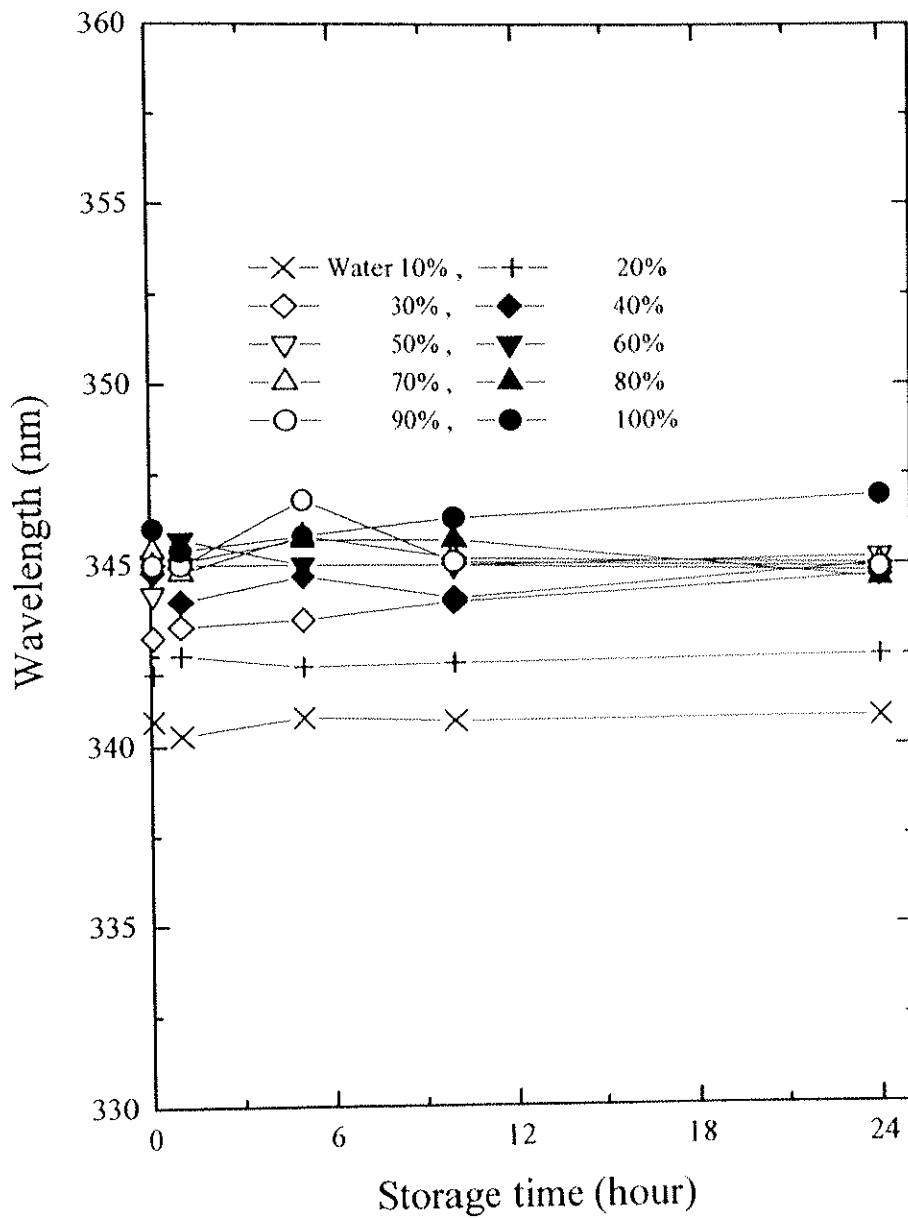


Fig.2-18

エタノール-水系での蛍光波長の経時変化

STB 2.5 mg / 10 ml

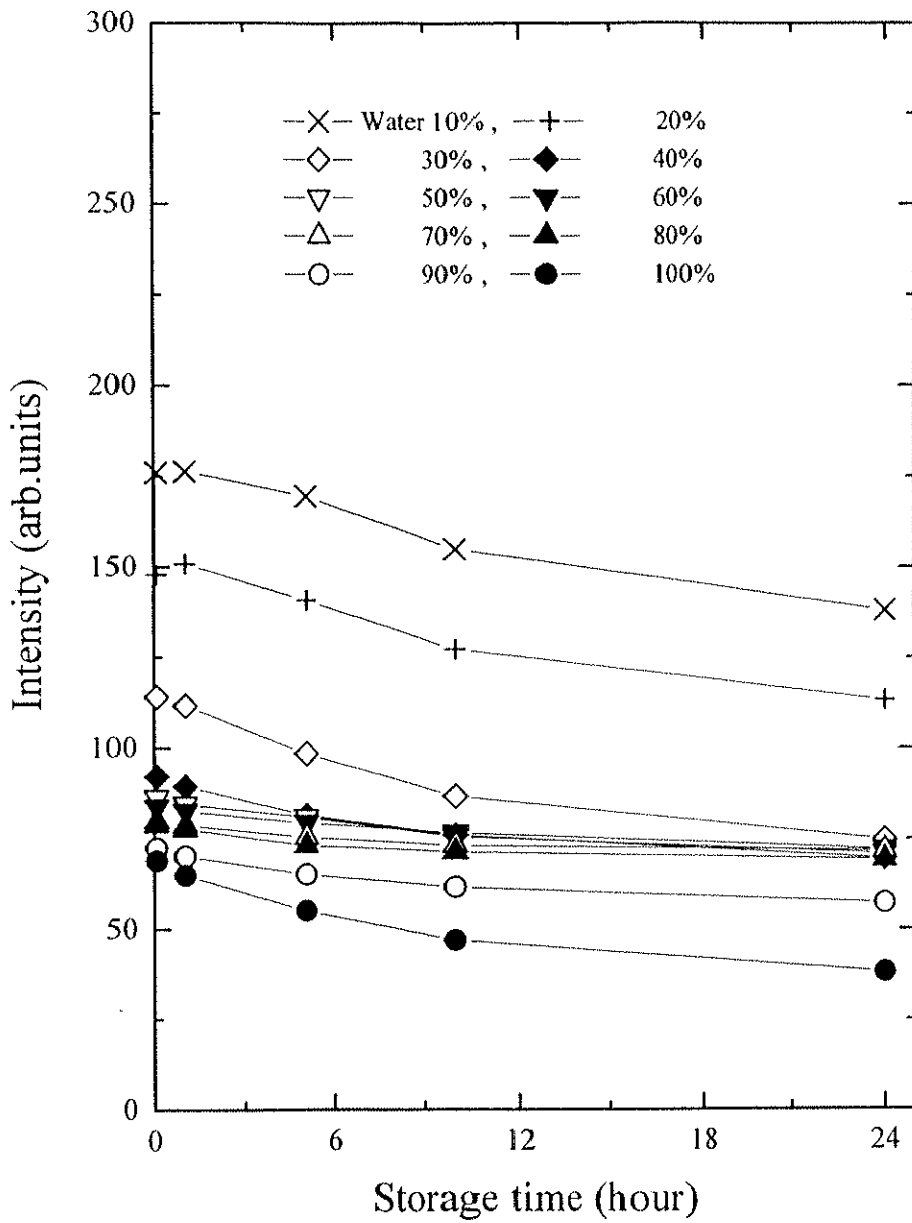


Fig.2-19

エタノール-水系での蛍光強度の経時変化

STB 2.5 mg / 10 ml

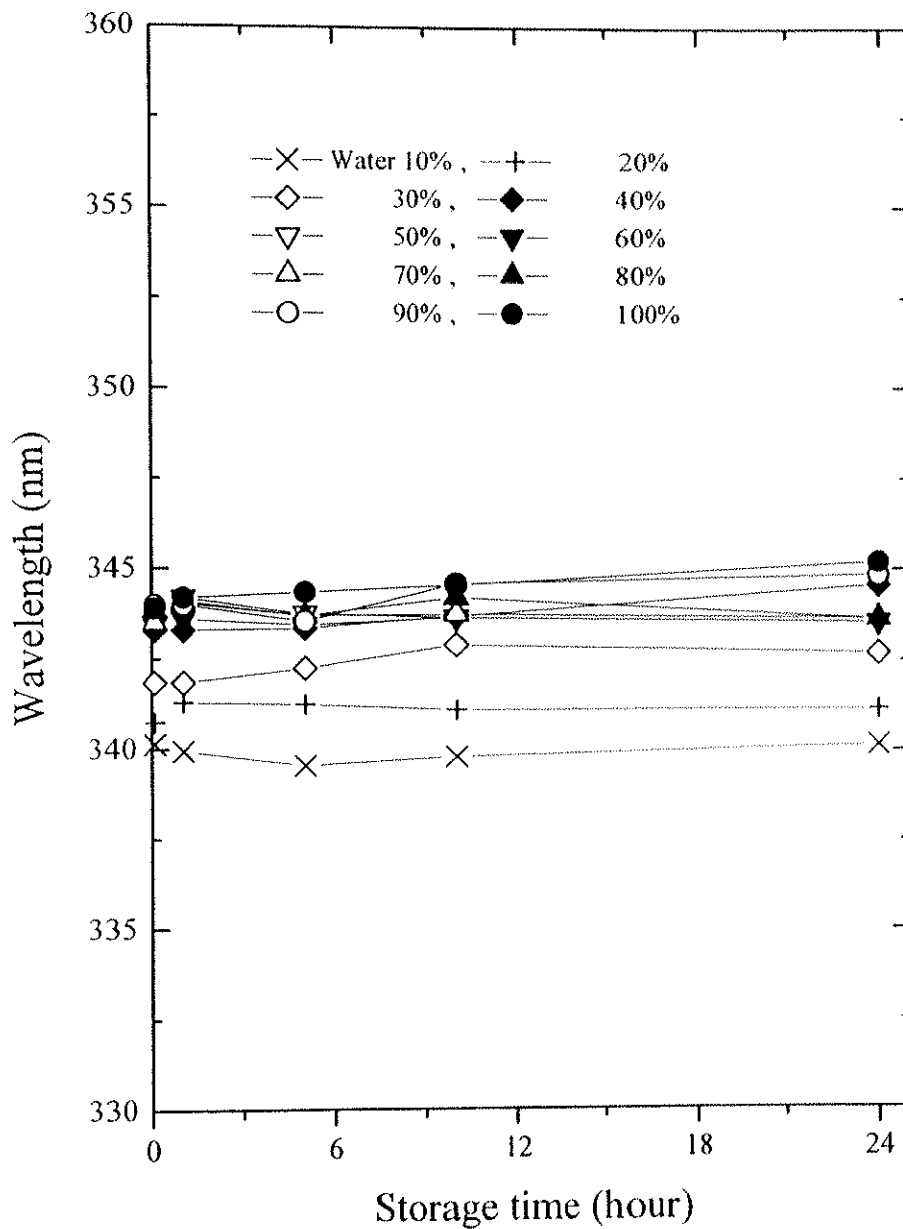


Fig.2-20

エタノール-水系での蛍光波長の経時変化
(消光剤添加時)

STB 2.5 mg / 10 ml
消光剤 : アクリルアミド 0.1 M

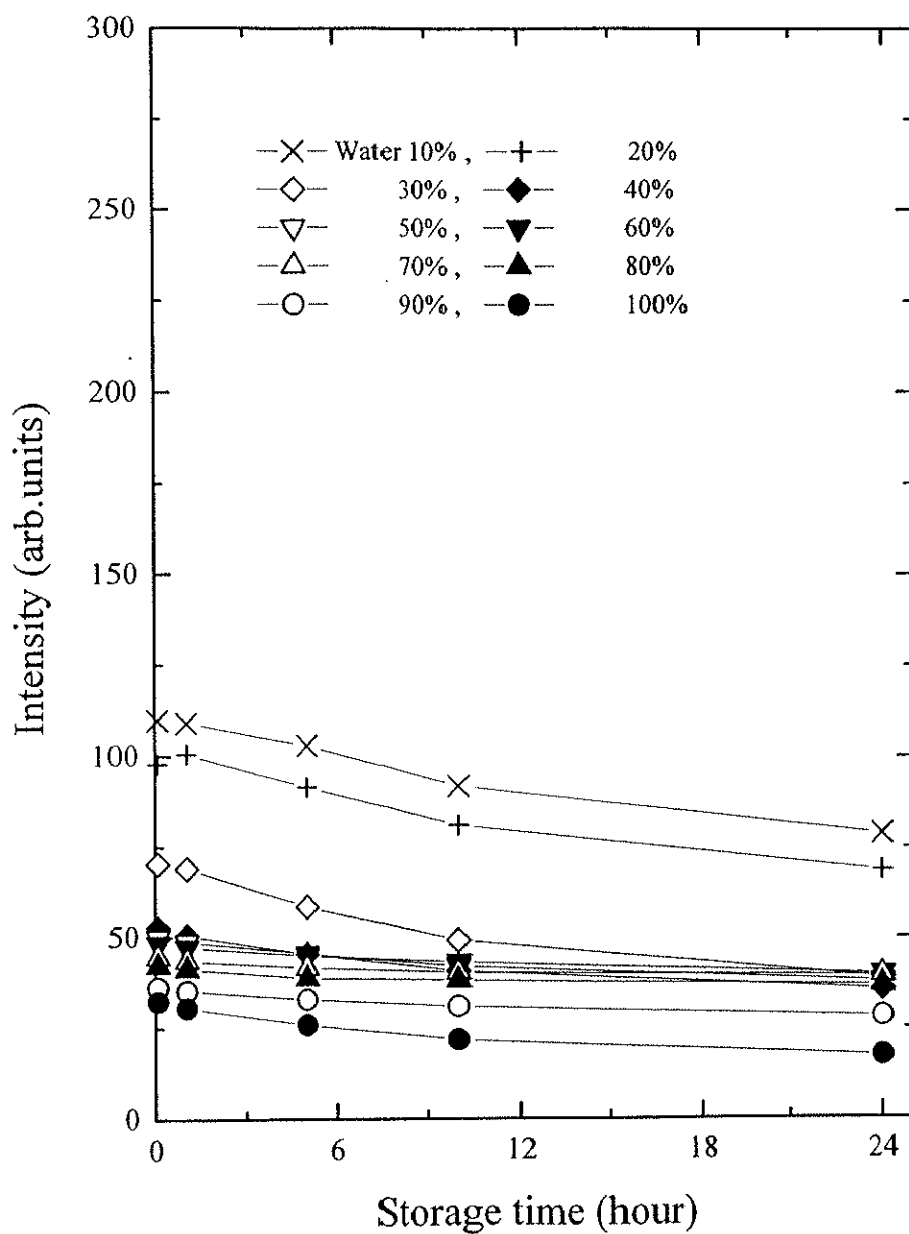


Fig.2-21

エタノール-水系での蛍光強度の経時変化
(消光剤添加時)

STB 2.5 mg / 10 ml

消光剤 : アクリルアミド 0.1 M

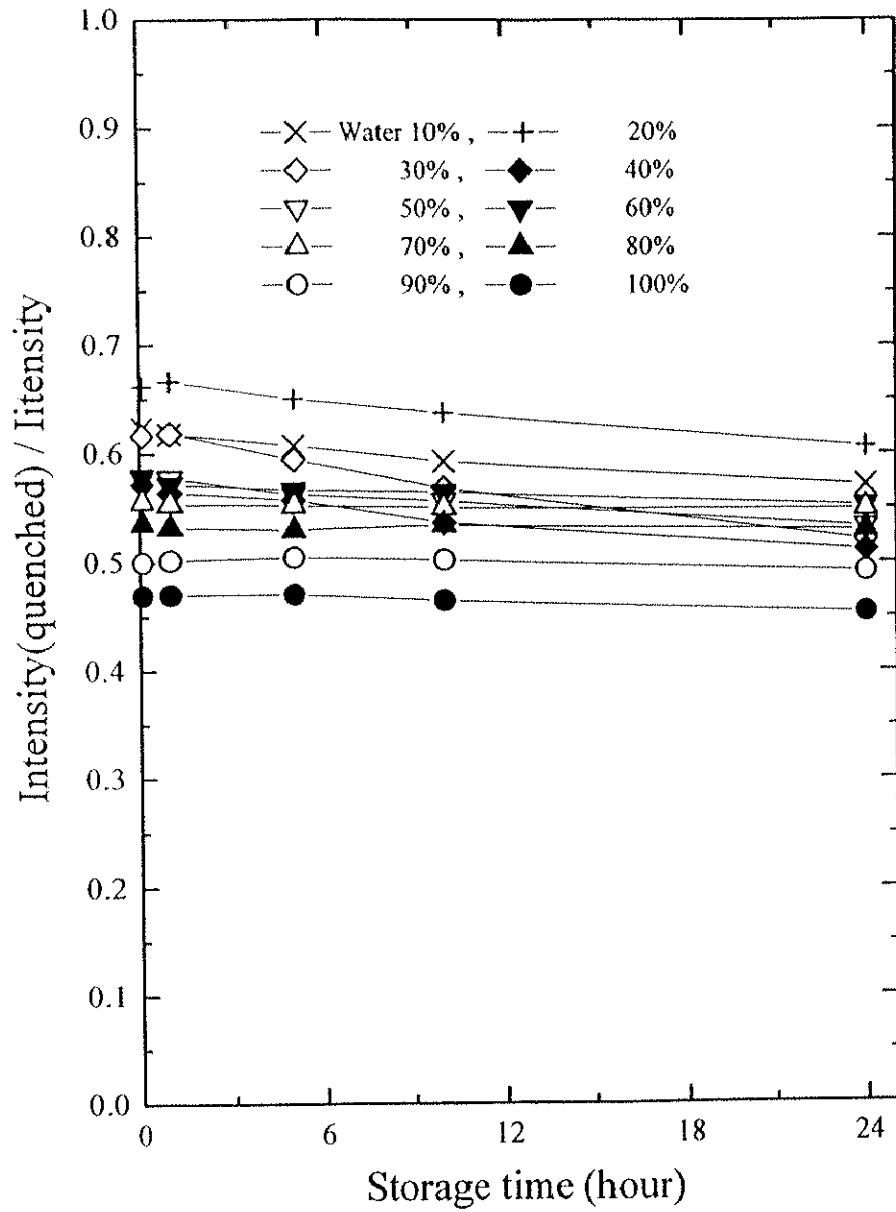


Fig.2-22

エタノール-水系での消光の度合いの経時変化

STB 2.5 mg / 10 ml

2-2-4 Stern-Volmer の式を用いた解析

蛍光の消光の実験は酵素内の Trp 残基の位置の変化についての情報を与えてくれるために、酵素の立体構造変化の研究には大変役に立つ手法である。さらに、消光剤の濃度を変化させて消光を測定することによって、酵素中の何割の Trp 残基が消光作用を受けているのかが計算できる。本研究で蛍光の実験に用いた α -CT は Trp 残基を 8 個、STB は Trp 残基を 3 個持つ酵素であるために、それぞれの Trp 残基の置かれた環境は異なったものになることも十分に考えられる。消光剤の濃度を変えて蛍光強度を測定した結果を Stern-Volmer の式を用いプロットすることで、酵素中の Trp 残基の環境が同一か、異なるかに関する知見が得られる。また、変形した Stern-Volmer の式を用いることにより、酵素中で消光を受けている Trp 残基の割合と消光効率が計算できる。

・アセトニトリル-ホウ酸緩衝液中でのヨウ化カリウムによる α -CT の消光

緩衝液 90 % の場合の Stern-Volmer プロットを Fig.2-23 に示す。時間が経過するにつれて消光を受けるようになった。また、やや上に凸の曲線を描いているため、Trp 残基の環境は均一ではないことがわかる。

Fig.2-24 に変形 Stern-Volmer プロットを、Fig.2-25 にその結果から導いた、消光される Trp の割合 f_0 と消光効率 K_0 を示す。Fig.2-24 の切片から $1/f_0$ が、傾きから $(f_0 K_0)^{-1}$ が得られる。時間の経過とともに、消光される Trp の割合が増加したことがわかる。測定開始時点では α -CT 中の 8 個の Trp 残基のうち 2 ~ 3 個が消光を受けるが、時間が経過すると約 6 個の Trp 残基が消光を受ける計算になる。結晶状態の α -CT では Trp 残基は 3 つのグループが異なる環境下にいることが知られている¹¹⁵⁾。消光されやすさも異なるため、構造変化によって消光を受けていなかったグループが消光されるようになったと考えられる。

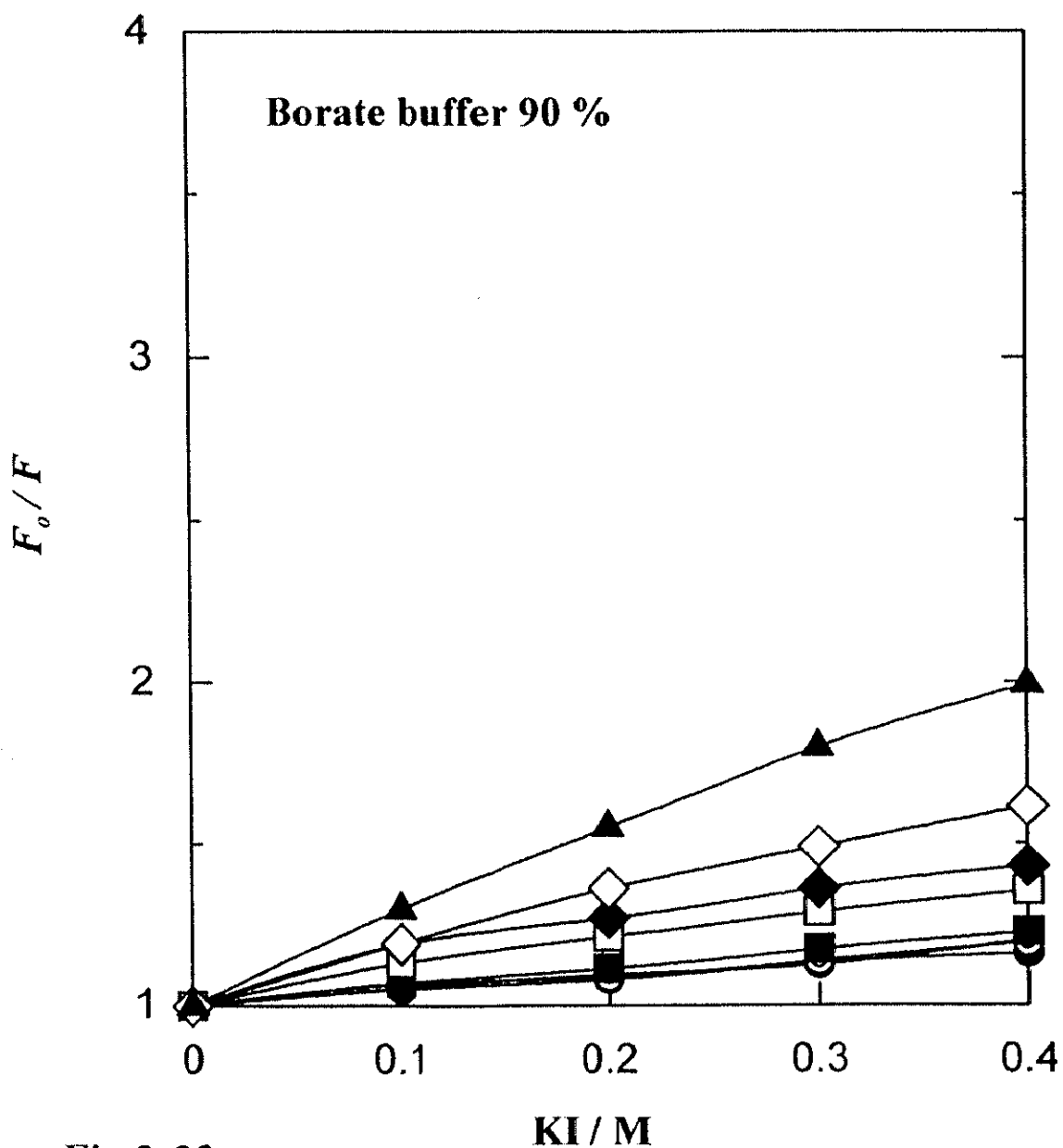


Fig.2-23

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 (pH 8.0, 0.1 M) 系での
Stern-Volmer プロット

α -CT 2.5 mg / 10 ml

消光剤 : ヨウ化カリウム

- | | | |
|----------|----------|----------|
| ● 0.2 h | ○ 0.7 h | ◎ 1.1 h |
| ■ 2.1 h | □ 7.8 h | ◆ 11.9 h |
| ◇ 24.4 h | ▲ 48.1 h | |

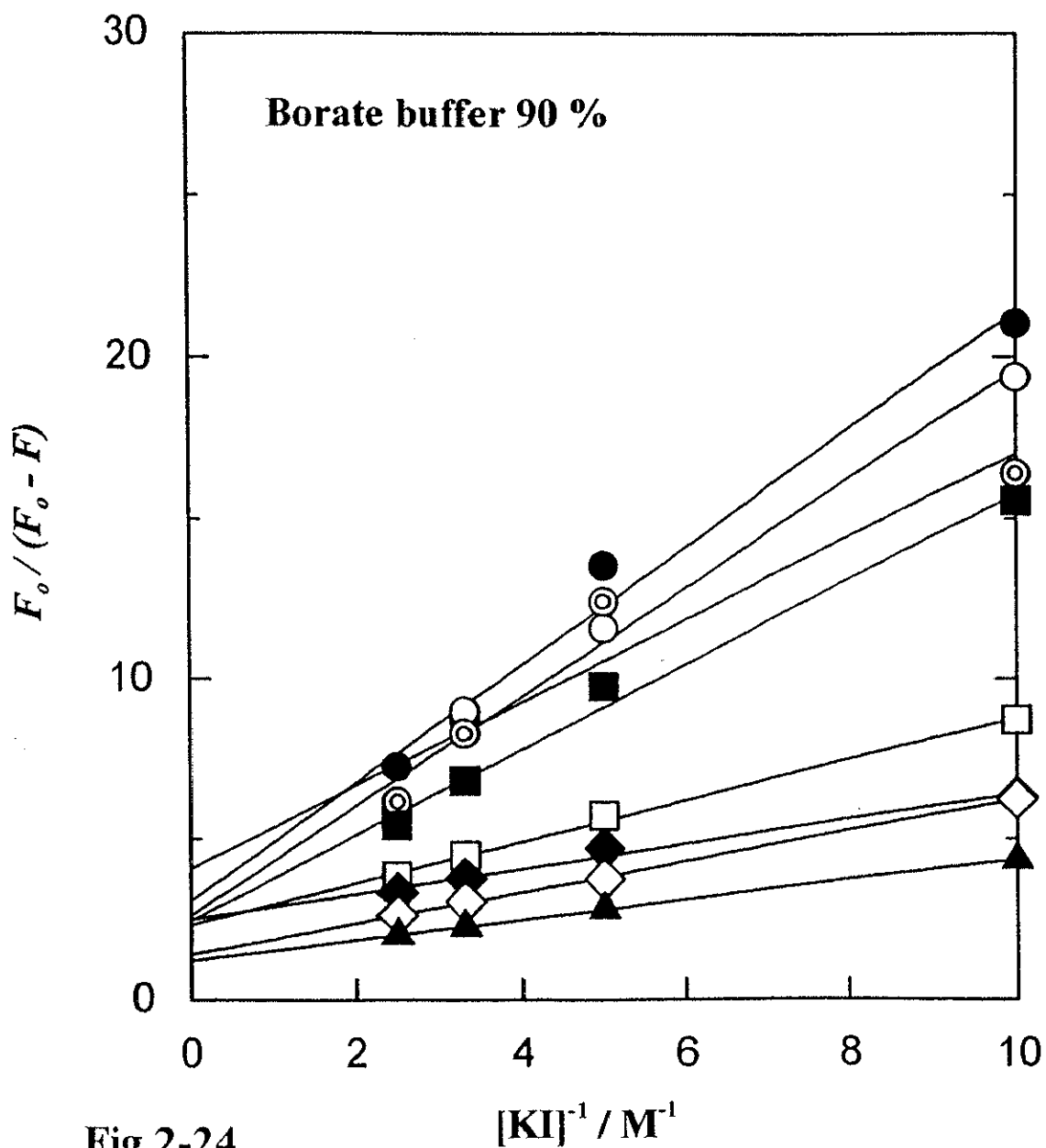


Fig.2-24

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 (pH 8.0, 0.1 M) 系での
変形 Stern-Volmer プロット

α -CT 2.5 mg / 10 ml 消光剤 : ヨウ化カリウム

- | | | |
|----------|----------|----------|
| ● 0.2 h | ○ 0.7 h | ◎ 1.1 h |
| ■ 2.1 h | □ 7.8 h | ◆ 11.9 h |
| ◇ 24.4 h | ▲ 48.1 h | |

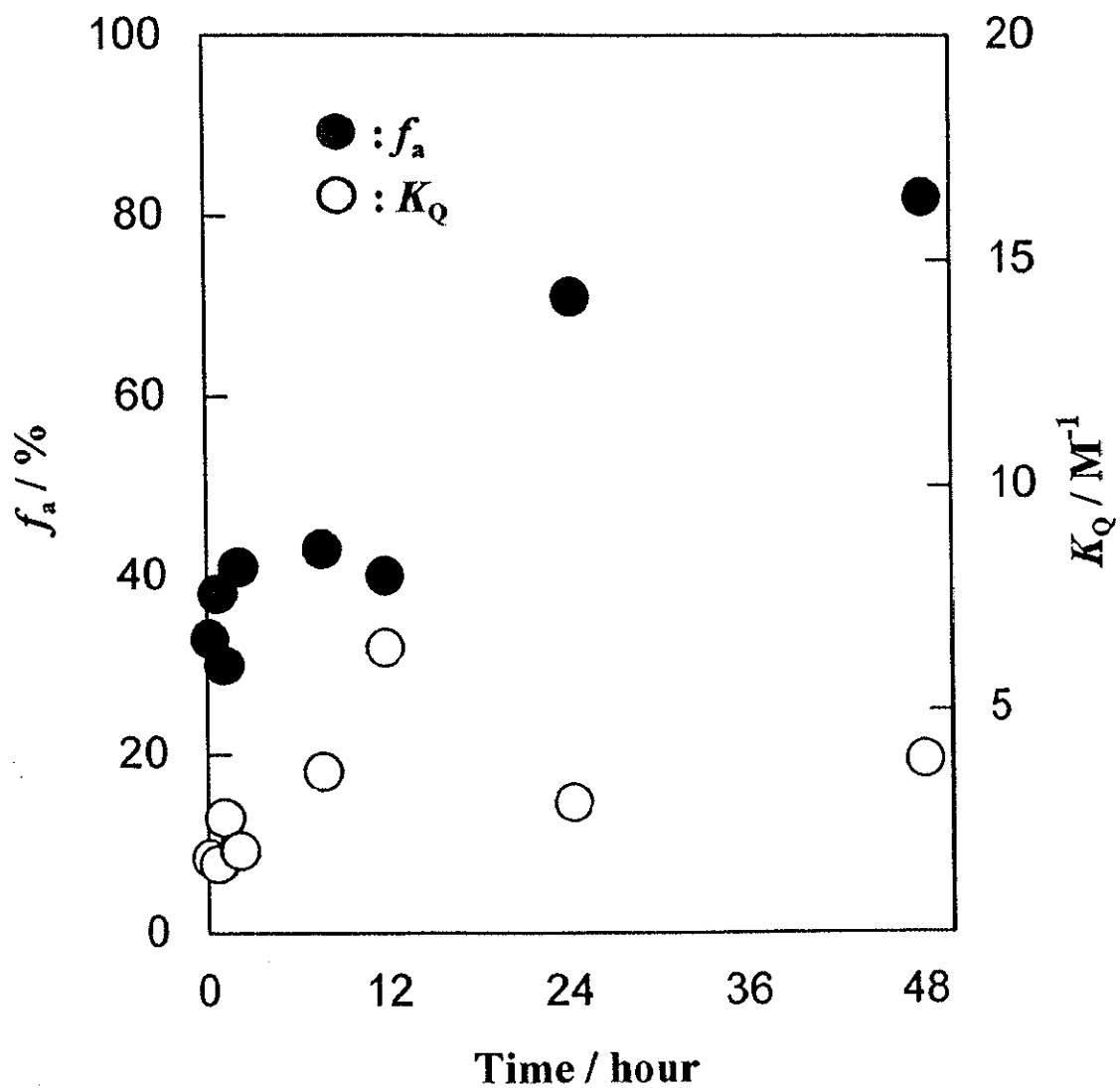


Fig.2-25

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 (90%) 系での
 α -CT 中の消光される Trp 残基の割合 f_a と
 消光効率 K_0 の経時変化

緩衝液 30 % での結果を Fig.2-26 ~ 28 に示す。Stern-Volmer プロットからは測定開始時には異なる環境にあった Trp 残基が（下に凸の曲線を与えている）数十分後には均一な環境になったことがわかる。アセトニトリル濃度が高くなったために α -CT の立体構造がほぐれ、どの Trp 残基も消光を受けるようになったと考えられる。 f_0 の値を示した Fig.2-28 からもそれはうかがえる。測定開始後しばらくして f_0 の値が 1 となり、すべての Trp 残基が消光を受けていることを示している。ヨウ化カリウムの有機溶媒への溶解度が低いため、これ以下の緩衝液濃度では測定できなかったが、緩衝液濃度が 10 % の場合でもほぼ似たような傾向が現れると予想される。なお、消光の効率は溶媒の組成の影響を強く受けるため、同一の溶媒組成では経時変化がほとんど見られない結果になったと思われる。

Stern-Volmer の式を用いた実験により、有機溶媒で変性した α -CT 中にある Trp 残基は、本来異なる環境下に存在していたものが均一になることがわかった。

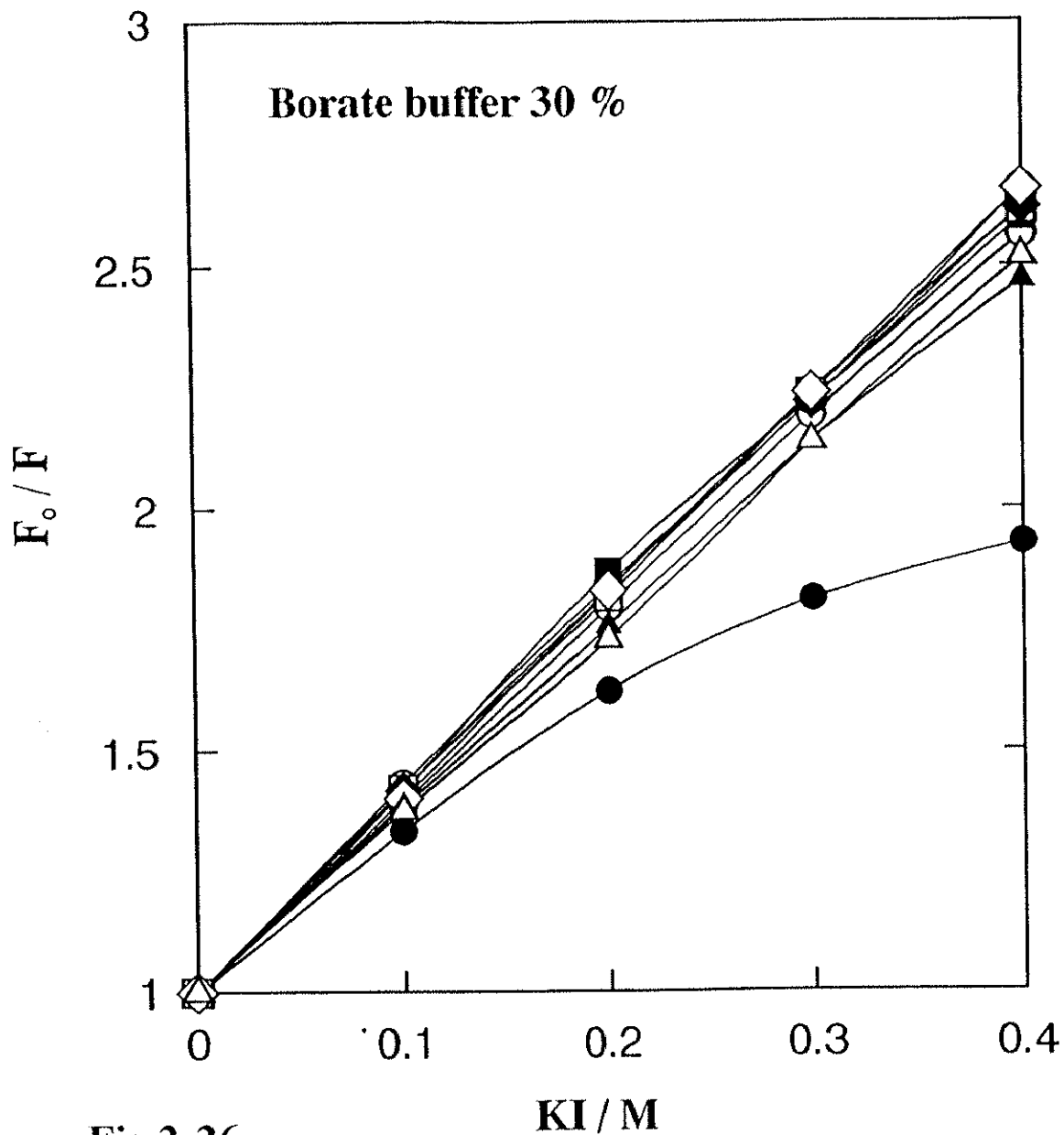


Fig.2-26

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 (pH 8.0, 0.1 M) 系での Stern-Volmer プロット

α -CT 2.5 mg / 10 ml

消光剤 : ヨウ化カリウム

- | | | |
|----------|----------|----------|
| ● 0.3 h | ○ 0.7 h | ⊙ 1.2 h |
| ■ 2.1 h | □ 3.1 h | ◆ 5.1 h |
| ◇ 12.4 h | △ 26.1 h | ▲ 47.6 h |

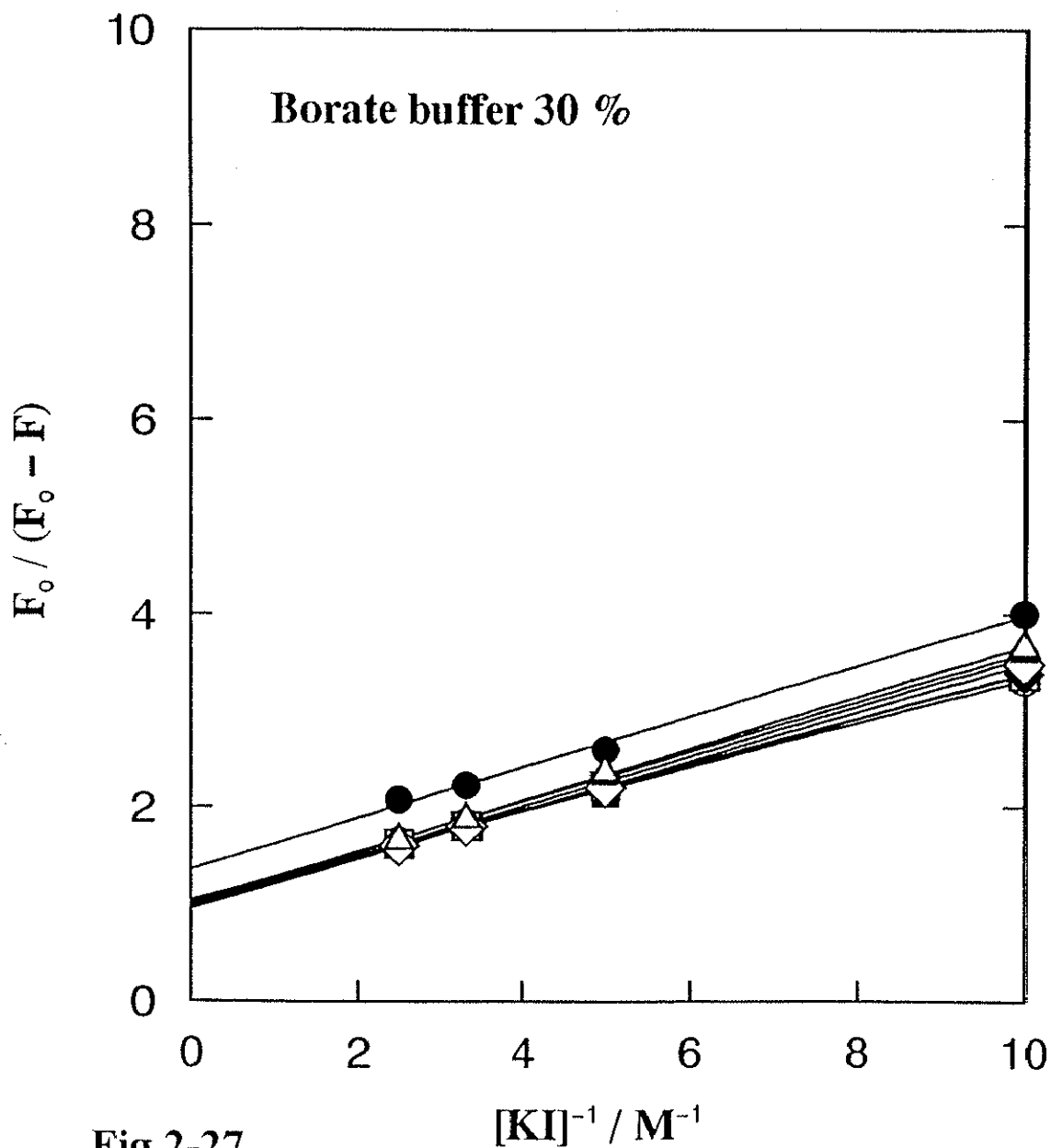


Fig.2-27

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 (pH 8.0, 0.1 M) 系での
変形 Stern-Volmer プロット

α -CT 2.5 mg / 10 ml 消光剤 : ヨウ化カリウム

- | | | |
|----------|----------|----------|
| ● 0.3 h | ○ 0.7 h | ⊙ 1.2 h |
| ■ 2.1 h | □ 3.1 h | ◆ 5.1 h |
| ◇ 12.4 h | △ 26.1 h | ▲ 47.6 h |

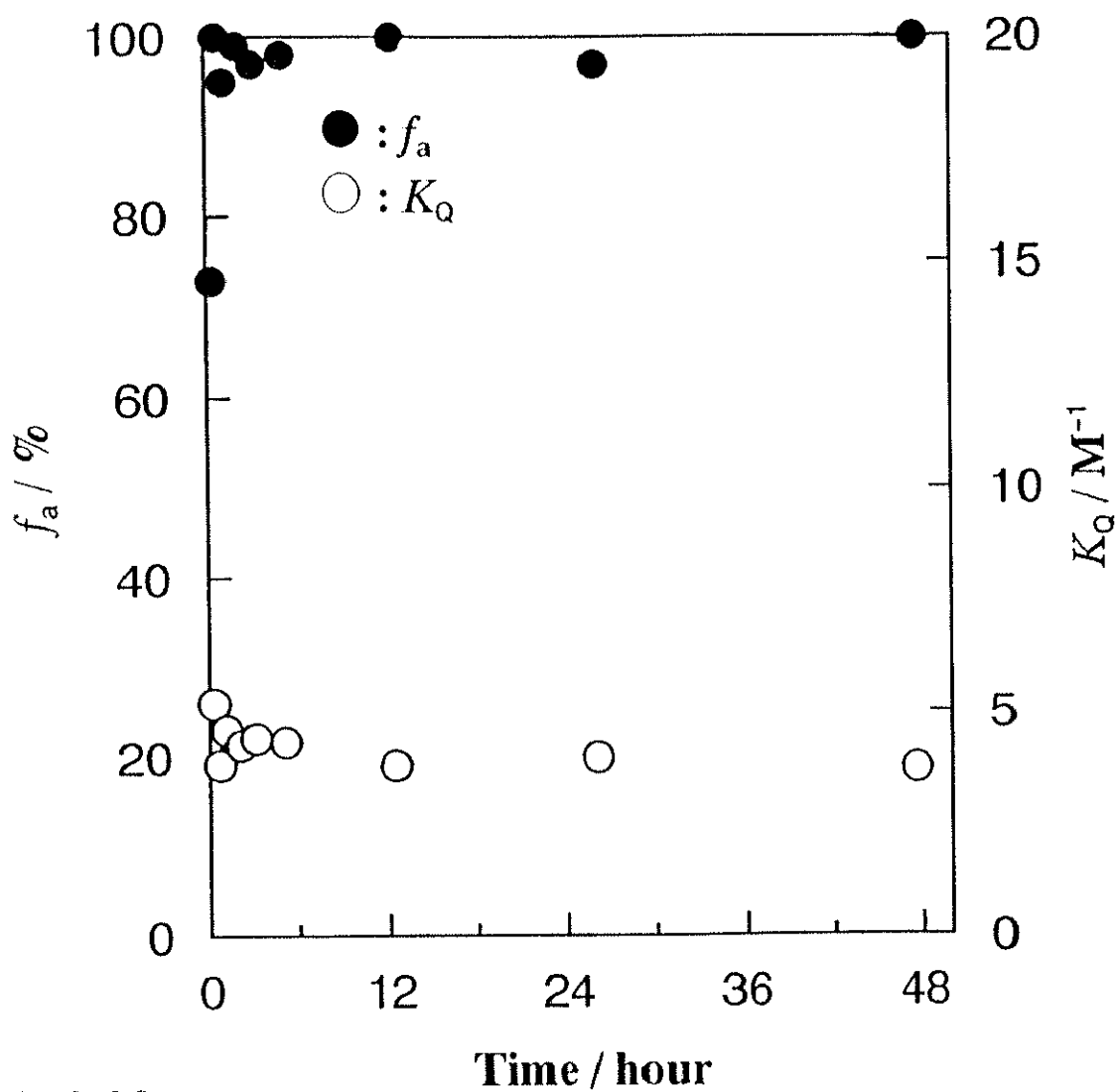


Fig.2-28

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 (30%) 系での
(pH 8.0, 0.1 M)

α -CT 中の消光される Trp 残基の割合 f_a と
消光効率 K_q の経時変化

2-3 まとめ

蛍光スペクトルおよび ATEE の加水分解反応初速度の経時変化を調べた結果、次のようなことがいえる。

1. α -CT は高濃度の有機溶媒により立体構造が変化（変性）するが、その変化は、立体構造がほぐれた状態になるような変化であると考えられる。
2. α -CT の消光の度合いと触媒活性との間には明らかな相関関係が見られることから、立体構造のほぐれは活性部位も含むものと思われる。
3. α -CT に対してはアセトニトリルよりもエタノールの方が与える影響は少ないと言えるが、高濃度加えた際には懸濁状態が異なるため、アセトニトリルを用いた場合にのみ加水分解活性が見られた。
4. 水相側に緩衝液を用いると活性は向上するが、立体構造の変化は加速される。これは酵素の自己分解も促進された結果と思われる。
5. STB では溶媒組成に対する蛍光波長変化、消光の度合いの変化は α -CT と反対の傾向を示し、有機溶媒が増すと Trp 周辺の極性が低下し、消光を受けにくくなった。構造変化により Trp 残基が酵素内に埋もれた位置になるよう移動したか、他のアミノ酸残基による消光が位置の変化により解消されたかの結果ではないかと考えられる。

以上のことより、酵素の立体構造がほぐれないよう保護する手段をとることで、有機溶媒中でも酵素の活性を長期間保持できると思われた。