

## タンパク質の構造安定性に対するイオン液体の効果

(福岡大理・防衛大応用化学) ○吉田亨次<sup>1</sup>・藤吉彩子<sup>1</sup>・山口敏男<sup>1</sup>・  
竹清貴浩<sup>2</sup>・吉村幸浩<sup>2</sup>

## The effect of ionic liquid on the stability of protein

(Fukuoka University<sup>1</sup>, National Defense Academy<sup>2</sup>)

Koji Yoshida<sup>1</sup>, Ayako Fujiyoshi<sup>1</sup>, Toshio Yamaguchi<sup>1</sup>,

Takahiro Takekiyo<sup>2</sup>, Yukihiro Yoshimura<sup>2</sup>

【序論】タンパク質水溶液に対する共溶媒の添加はタンパク質の構造安定性に影響を与える。そのため、共溶媒効果を調べることはタンパク質のフォールディング過程の研究やその過程における水の役割の解明につながる。本研究では、共溶媒としてイオン液体を用いた。イオン液体は工業化学分野のみならず、生物化学分野でも注目されている溶媒である。イオン液体の多くは水と任意の割合で混合することができるため、電解質水溶液に似た性質（イオン液体が低濃度の場合）から熔融塩類似の性質（イオン液体が高濃度の場合）まで変化させることができる。本研究では、3種類のアルキルアンモニウム系イオン液体を用いて、リボヌクレアーゼ A の構造安定性およびβ-ラクトグロブリンの熱変性に対する共溶媒効果について、X線小角散乱(SAXS)ならびに示差走査熱量(DSC)測定を用いて調べた。

【実験】3種類のアルキルアンモニウム系イオン液体：methyllummonium nitrate([MAN][NO<sub>3</sub>]), ethylammonium nitrate ([EAN][NO<sub>3</sub>]), propylammonium nitrate ([PAN][NO<sub>3</sub>]) (関東化学)を水と混合した。そこにリボヌクレアーゼ A(20 mg/mL)ならびにβ-ラクトグロブリン(50 および 100 mg/mL)を溶解した。SAXS 測定は NANO-Viewer (Rigaku)を用い、X線源は CuK $\alpha$  (波長 1.541 Å) である。カメラ長は 650 mm、散乱角は 0.2 から 4° である。室温測定では平板セル (溶液

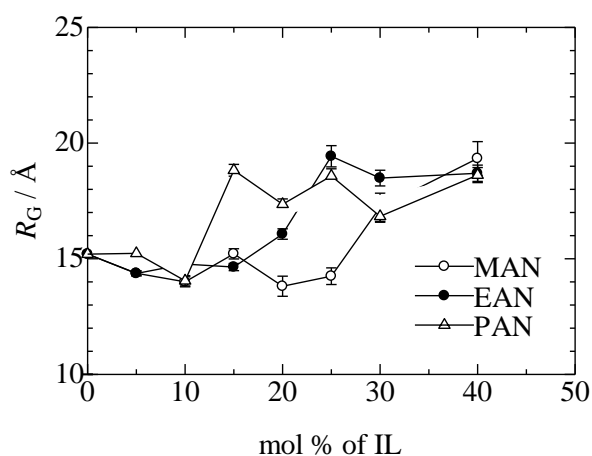


Fig. 1. Guinier radii of ribonuclease A in MAN-, EAN-, and PAN-D<sub>2</sub>O mixtures at room temperature

厚みは 1 mm、窓材は雲母) を使用した。室温から 100°Cまでの温度可変測定では、試料溶液をホウケイ酸ガラスキャピラリー (直径は 1.5 mm、厚みは 0.01mm) に封管した。温度制御はホットステージ(メトラー製)を用いて行った。溶媒の測定も同じ温度で行い、試料の吸収補正を行い、タンパク質の散乱を得た。DSC 測定は試料溶液をアルミ製パンに封入し、DSC6100 (Seiko Instruments Inc)を用いて、25~100 °Cの温度範囲で、昇温・降温速度は 5 K/min で行った。

【結果および考察】 次式により SAXS プロファイル  $I(q)$  からタンパク質の Guinier 半径( $R_G$ )が得られる。

$$I(q) \propto \exp\left(-\frac{1}{3}R_G^2 q^2\right) \quad q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$$

ここで、 $q$  は散乱ベクトルの大きさ、 $\lambda$  は波長、 $2\theta$  が散乱角である。

Fig. 1 にリボヌクレアーゼ A の Guinier 半径のイオン液体の組成依存性を示す。SAXS プロファイルからは会合体を形成している傾向は見られなかった。 $R_G$  は MAN では 25 mol%、EAN では 15 mol%、PAN では 10 mol% で急激に増加し、イオン液体のアルキル鎖長と関連が見られた。イオン液体の濃度がさらに増加しても  $R_G$  は  $\sim 20 \text{ \AA}$  より増加しなかった。完全にアンフォールドした場合の  $R_G$  は  $24 \text{ \AA}$  であり [1]、リボヌクレアーゼ A はモルテングロビュール状態であると考えられる。Kratky プロットから、イオン液体が高濃度でもコンパクトな構造を保っていることを示している。

$\beta$ -ラクトグロブリン(濃度は  $100 \text{ mg/mL}$ )の純水中での変性温度は  $78^\circ\text{C}$  であったが、5 mol% MAN では  $76^\circ\text{C}$ 、5 mol% EAN では  $68^\circ\text{C}$  となり、アルキル鎖が長くなるに従い、変性温度が低下した。これはエタノール添加の効果と定性的には同じである [2]。また、熱変性に伴う発熱ピークがブロードになった。

濃度  $50 \text{ mg/mL}$  の SAXS プロファイル(Fig. 2)では、熱変性後は EAN と PAN 中でフラクタル構造の会合体が形成されることがわかった。これは、エタノールと水の混合溶媒中での結果と類似している [2, 3]。つまり、 $\beta$ -ラクトグロブリンの会合に関して、EAN や PAN では電荷の影響より疎水基の影響が強いと考えられる。一方、MAN では、不規則な会合体の形成が示唆され、NaCl および  $\text{NaNO}_3$  溶液の結果と類似していた。測定された濃度範囲では、MAN 溶液は電解質水溶液に似た性質を示すといえる。アルキルアンモニウム系イオン液体と水の混合溶液では、アルキル鎖が長くなるとナノドメイン構造を形成しており [4, 5]、タンパク質の構造安定性と溶媒構造との関連が示唆される。

[1] T. R. Sosnick, et al., *Biochemistry* **31**, 8329–8335 (1992). [2] K. Yoshida, et al., *BBA - Proteins and Proteomics*, **1824**, 502–510 (2012). [3] K. Yoshida, et al., *J. Mol. Liquids* **189**, 1–8 (2014). [4] W. Jiang, et al., *J. Phys. Chem. B* **111**, 4812 – 4818 (2007). [5] H. Abe, et al., *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 1175–1180 (2014).

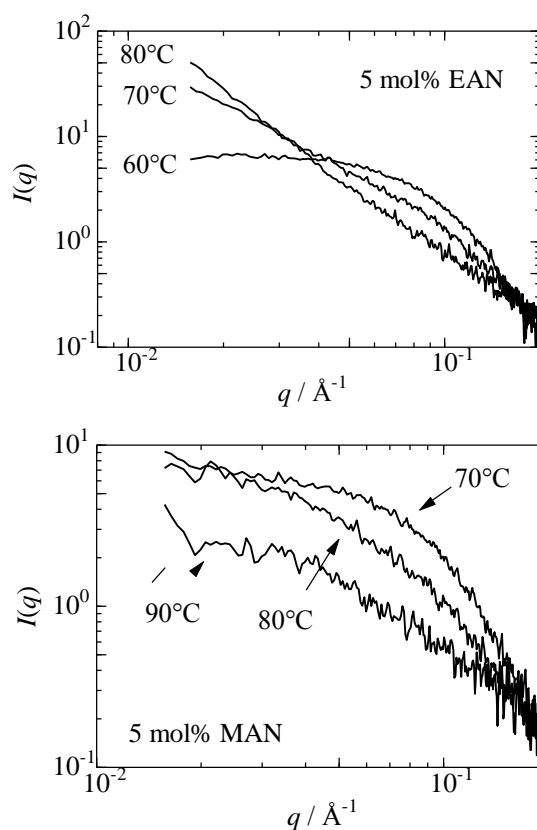


Fig. 2. SAXS profiles of  $\beta$ -lactoglobulin in MAN- and EAN-water mixtures at various temperatures