

## 室温燐光法でとらえた蛋白質分子の段階的酸化と2段階モデル

甲斐義幸\* , 小寺義男† , 前田忠計†

### Room-temperature Phosphorescence observation for NaOCl Oxidation of Alkaline Phosphatase and Two-steps Oxidation Model

Yoshiyuki Kai\* , Yoshio Koder† and Tadakazu Maeda†

#### abstract

The reactions of oxygen radicals ( $O_2^-$ ,  $^1O_2$ ,  $^*OH$ ) and other reactive oxygen species produced *in vivo* have been well studied relating to human aging and disease. It is supposed that one of those effects of oxidizing reagents directly alters protein structure.

In this paper, we used sodium hypochlorite (NaOCl), artificial oxidizing reagent, or its dissociated form  $OCl^-$  that is strong oxidant reagent and react with many biological molecules. It resulted in chemical modification of amino-acid residues, especially Trp residue of *E. Coli* alkaline phosphatase (M.W. 94000) that was adopted in this experiment.

And room-temperature phosphorescence (RTP) technique was also mainly used to investigate the effect of NaOCl on the structural change of protein matrix. The RTP of alkaline phosphatase (ALP) has been studied previously and is estimated that the emission is from tryptophan residue 109 buried in the protein matrix.

We observed by the RTP method that exposure of a globular protein ALP to NaOCl resulted in stepwise modification of the protein. And the further exposure of ALP to the amounts of NaOCl resulted in structural destroy of the protein.

This stepwise change of the protein structure has not been observed by fluorescence spectroscopic method used for the additional experiment.

As a conclusion, the process of oxidative modification of ALP was complicated with the structural change of protein molecule and was not shown by a simple stochastic process. We proposed here the two-step reaction model for the oxidization process by NaOCl, which include the change of the structure, surface and inner-core side-chain, of globular protein.

SDS-PAGE was also used for an observation of a total structural change of ALP in the oxidization process.

---

\*中央大学法学部総合教育, 理工学研究所研究員  
†北里大学理学部

## 1 はじめに

生体中において、 $O_2^-$  (super-oxide) や  $^1O_2$  (singlet oxide),  $^*OH$  (hydroxyl radical) など酸素ラジカルは細胞膜脂質やタンパク質、および核酸を酸化し老化や病気を引き起こす原因物質であることが知られている。これら詳しいメカニズムはまだよく分かっていない。本論文では酸化剤として NaOCl をもちいて、球状蛋白質の人為的な酸化修飾にともなう構造変化を観測した。酸化にともなう蛋白質の構造がどのように変化をうけるかがこの論文のテーマである。

観測の手段として主に室温燐光法を用いた。室温燐光法 (RTP 法) は脱酸素化した水溶液系で蛋白質の内部にある (buried) Trp 残基からの室温での燐光発光が観察されるという現象に基づいている。観測される発光減衰曲線は、その初期強度  $I(0)$  が三重項励起分子 (蛋白質分子) の数に対応し、減衰寿命 ( $\tau$ ) はその残基をとりまく局所部位の熱的揺らぎの大きさや消光剤の有無を表している。溶液系で単独の Trp 分子や蛋白質の表面に位置する Trp 残基からは室温燐光は観測されない。また消光剤の効果を受けることもある。

この実験の対象としたアルカリ性フォスファターゼ (ALP) は球状蛋白質でリン酸エステルの加水分解酵素であり通常ダイマー構造 (M.W. 94000) をとり、サブユニットあたり 3 個の Trp 残基と 2 個の SS 結合をもっている。ALP 室温燐光 (RTP) は従来から研究され、特徴的に長い室温燐光寿命をもつことが知られている [1]。実際そのスペクトルの性質および減衰曲線が単一指数関数を示すことからタンパク質内部に十分に埋もれており分子ゆらぎがほとんどない Trp 残基 (Trp109) からの単一の燐光と考えられている [2],[3]。本論文でもこの Trp109 の RTP を観測している。

NaOCl は通常用いられている酸化剤で、細胞内で作用する HOCl と同じ酸化ハロゲンの一つである。NaOCl の水溶液は弱酸性で、酸化剤としての  $OCl^-$  (次亜塩素酸塩, hypochlorite) を生じ、タンパク質を速やかに酸化修飾する。この酸化剤を用いてアルカリ性フォスファターゼ (ALP) の人為的な酸化プロセスを観測し酸化修飾反応の過程を知ることができれば酸化修飾によるタンパク質の構造への影響を調べることができると期待される。

これまで酸化剤がどのようにして溶液中の蛋白質の表層部分や内部構造を酸化修飾し破壊するのか、そのプロセスの詳しい様子はよくわかっていない。この酸化の経過がどのようになるかは蛋白質の構造に依存すると考えられ、そのプロセスを観察研究することは水溶液におけるタンパク質分子の立体構造、特に表層部や内部コアの構造的意味 (役割) を知る手がかりにもなるだろう。

補完のために蛍光測定および SDS-PAGE の測定をおこない、蛍光では酸化修飾において ALP の全体的な立体構造は保たれているかどうか、また酸化の過程で変性型のスペクトルの有無をしらべた。他方、SDS-PAGE の測定ではモノマー以外に観測されず、この酸化過程では断片化は起っていないことが示される。本論文では蛋白質の NaOCl 酸化修飾についての室温燐光および蛍光と SDS-PAGE の測定からこの変化が段階的な過程を経ることを示す。これには蛋白質構造の安定に対する表層部位や内部コアの役割を考えなければならない。

従来、蛋白質機能モデルは主に静的な X 線立体構造に基づくものであり、動的な構造や実際の溶液系での変化に関する実験的検証は限られたものである。その意味でもここに示す室温燐光データは貴重なものであろう。

## 2 試薬、実験法及び手順

アルカリ性フォスファターゼ (ALP) は Sigma Chem. Co. より購入した 2.5 M 硫酸  $(NH_2)_2SO_4$  のサスペンションであり、ダイマー構造 (M.W. 94000) をとっている。これを希釈したサンプルを測定に用いた。測定の際、ALP の濃度 ( $E_{0.1\%}^{280} = 0.27$ ) は  $3 \mu M$  であった。次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) 溶液は原液 (濃度 0.64 M, ヨード液酸化法で検定した) をバッファとしての塩類を入れず、純水で希釈したものである。

室温燐光測定用に用いたセルは、特別な密閉タイプで先端に石英セルがあり、内部上方にポケットのついたものである。

石英セル中の NaOCl 溶液 (2.8 ml) およびポケットの ALP 液 (0.2 ml) 全体をアルゴン (Ar) 気流で 1 時間以上フローし脱酸素した。その後, Ar 飽和状態でポケットの ALP 液を NaOCl 溶液へ混入後 (デッドタイムは 30 秒以下) 静置し, 室温 (24°C) で溶液系の燐光強度  $I(0)$  と寿命  $\tau$  の時間的経過を測定した。

サンプルは NaOCl 濃度を変えた 4 つのケース (各 0.32 mM, 0.64 mM, 0.96 mM および 2.5 mM) であり, 各々 ALP 液を混入後, 1 分後から約 200 分後までの時間経過を観測した。また別に酸化剤なしのサンプルを参照とした。室温燐光測定はキセノンフラッシュランプ (浜松ホトニクス製品) によって半値幅は約 10  $\mu\text{sec}$ , 単発の紫外線 (295 nm を中心としたバンドパス光学フィルターを通した) フラッシュ光を励起光とした。また受光部としては, ホトマルでうけた信号をシングルフォトンコリレータ装置 (MALVERN k7032 correlator) により高感度の測定をおこなった。一回の測定時間は 10 秒である。装置の詳細は別の論文 [4] を参照されたい。

測定されたデータは解析ソフト (IGOR) によって解析した。全てシングル減衰であり, その解析結果から初期強度  $I(0)$  および 寿命 を求めた。

また蛍光測定には日立 F4500 Fluorescence Spectrometer を使用し, サンプルは室温燐光に用いたものとすべて同じ条件で Ar ガスで脱酸素したものである。蛍光の励起波長は蛋白質の Trp 残基のみを励起するために 295 nm を採用した。

### 3 測定の手順および結果と解析

#### 1) ALP の室温燐光測定の一典型例 (NaOCl 0.64 mM サンプル)

まず, NaOCl の濃度 0.64 mM の ALP 酸化サンプルについて, 測定手順と結果とを典型的な事例として示す。手順としては脱酸素環境で ALP 液を NaOCl 溶液に手動ですばやく混入させ, その直後 (約 1 分後) から測定を開始した。示されるデータは経過時間 (T) における結果である。ただし経過時間はこの混入時点を超えて (T=0) とし分単位で示される。

Fig. 1 にはこのサンプルについての RTP 減衰曲線の測定結果が示されている。混入直後 (1 分後) から, 約 210 分後までの任意の時間 (T) における結果が縦軸を対数表示とし任意のスケールでとってある。データをみると, NaOCl 混入直後 (T=1 分) において RTP の寿命は 160 ms と短く, その後, 5 分程で寿命は 260 ms へと増大し, 約 10 分迄は安定して経過する。この間強度はほぼ一定である。それに対して T=10 分以降は強度  $I(0)$  が目立って減少しており (Fig. 1 脚注参照), 寿命も多少変動する。また, NaOCl なしの純水溶媒中で同一条件の参照サンプルの ALP 測定の結果, 寿命は  $300 \pm 3 \text{ msec}$  であった。この数値は溶媒条件が純水であることおよび Ar ガス飽和溶液にある痕跡程度の残余酸素によって多少変わるが, ここでの参照値として充

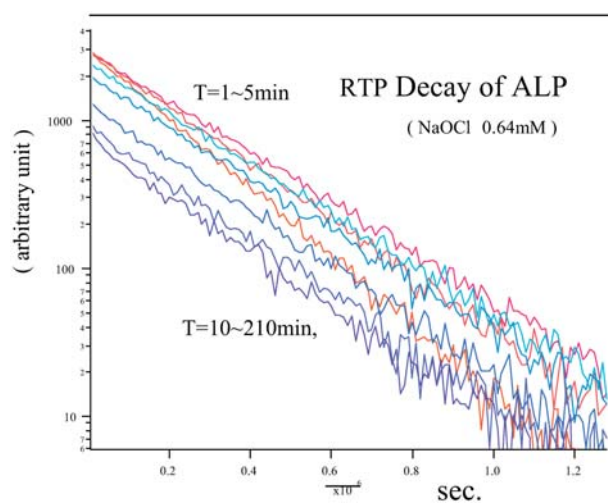


Fig. 1 ALP の酸化に伴う RTP 減衰曲線の時間経過 (NaOCl 濃度, 0.64 mM)  
 図中, 黄色~薄赤色: T=1 分~5 分 および薄青色~濃青色: T=10 分~210 分

分である。

次に、この結果と解析について述べる。一般に燐光測定で燐光分子の状況は減衰曲線の初期強度  $I(0)$  および寿命  $\tau$  によって知ることができる。NaOCl 溶液への ALP 混入後の酸化経過もそれに基づいて解析する。この場合、減衰曲線のデータは全て一次減衰であり、次の式で近似できる。

$$I(t) = I(0) \exp(-t/\tau) \quad (1)$$

この式で三重項励起分子（蛋白質分子）の数は初期強度  $I(0)$  に対応している。また、励起分子のエネルギー緩和過程、構造揺らぎによる熱緩和や消光分子効果などはその寿命  $\tau$  に反映される。Fig. 1 のデータについて、寿命および強度に注目して、測定結果を整理すると、いくつかの過程に分けることができる。

最初に酸化剤を含む水溶液に ALP を混入した時点から約 30 秒間のデッドタイムの後、約 1 分から約 5 分後までを初期経過と考える。この過程では、デッドタイムの間に減少した寿命が一定の値に回復する様子がみられる。Fig. 1 では初めの寿命（約 160 msec）が時間の経過とともに次第に回復し、10 分後までには極大（約 260 ms）に達した。一方、この間の燐光初期強度  $I(0)$  は変わらず、ほぼ一定値である。同様の現象は、その程度は比較的の小さいが、純水溶液中の参照サンプルでも観測される。従って、この過程は酸化とは直接関係していないと推測される。

初期的過程をへて 5 分以上経つと、燐光初期強度  $I(0)$  がある一定の割合で減少し始めるのが観測できる。これ以降が酸化プロセスとみなされる。Fig. 1 から、酸化プロセスは段階的であり、初めの段階は約 5 分～約 40 分の間である。その間、燐光初期強度  $I(0)$  は一定の割合で減少し、ある飽和値に近づくように見える。一方、この間の寿命はほとんど変わらない。（詳しくは、後述。Fig. 4-a, 4-b 参照）

時間経過が約 40 分から約 200 分においては  $I(0)$  の大きな減少が観測され寿命も多少の減少がみられることから第二段階と考えられる。この状況は最後まで続く。このように室温燐光法で測定した ALP の酸化の経過は複雑で、蛋白質の構造的変化を含む段階的な経過をへるようすが観測された。他方、後述するように（Fig. 2-a, Fig. 3）蛍光測定ではこの第二段階の変化は捉えることは困難である。

## 2) 蛍光スペクトル法および SDS-PAGE 測定 (NaOCl 0.64 mM サンプル)

ALP 液を NaOCl（濃度 0.64 mM）溶液に混入した後の時間経過に伴う蛍光スペクトル変化が Fig. 2-a に示されている。また、Fig. 2-b に SDS-PAGE の測定結果を示した。溶液条件等は Fig. 1 と同一である。

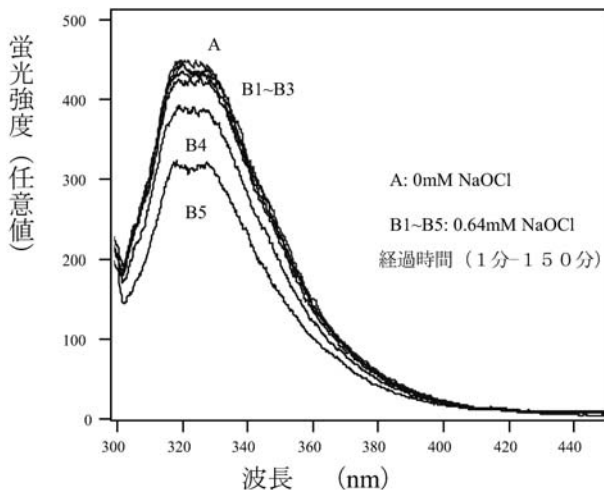


Fig. 2-a ALP の酸化に伴う蛍光スペクトル  
 図中 B: NaOCl 濃度, 0.64 mM のサンプル, A: 参照サンプル (純水中) のスペクトル  
 B1~B5 は経過時間 (T) が 1 分から 150 分までの結果

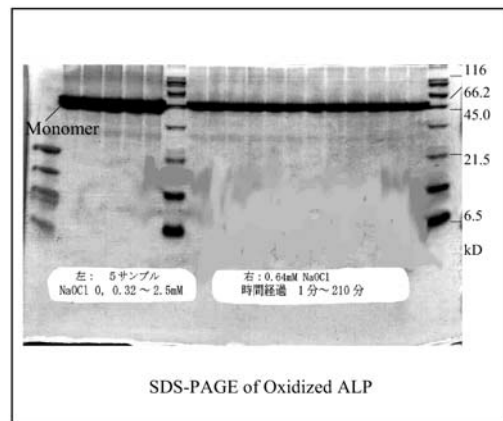


Fig. 2-b ALP の酸化に伴う SDS-PAGE 測定結果  
 図中、左部分：参照サンプル (0 mM) および 4 サンプル (NaOCl: 0.32 ~ 2.5 mM) の酸化最終産物  
 右部分：前記サンプルのうち、0.64 mM サンプルの経時的変化の結果 (1 分 ~ 210 分)

酸化剤の混入直後(1分後)の蛍光スペクトルは純水中での同じ条件での参照サンプルのそれ(Fig. 2-a, A)とほぼ一致している。その後、時間の経過とともに蛍光強度が一次反動的に減少してゆくことが観測された(Fig. 2-a, B1~B5)。例えば150分経過後のスペクトルは、混入直後と形状は同じであったが強度が7割ほどに減少した。この蛍光強度の減少は酸化剤により Trp 残基が直接酸化修飾をうけ、蛍光分子が消失したためと考えられる。この場合、発光強度(ピーク値)は蛍光発光分子数(寿命が変化しなければ一重項励起分子数)に比例する。

ちなみに球状蛋白質が尿素や SS 結合還元剤で変性したときに蛍光スペクトルに現れる異常ストークスシフト [5] はここでは観察されていない。つまり完全な変性は生じていない。

また、NaOCl 酸化にともなう ALP サンプルの SDS-PAGE の測定結果が(Fig. 2-b)に示されている。ここでは処理過程の影響でモノマー成分が観測されるが、断片化はみられない。

従って NaOCl 酸化にともなって観測される蛍光スペクトルの変化は一定の立体構造を保ちつつ Trp109 をはじめとした Trp 残基の直接酸化によるものであると考えられる。蛍光法では RTP 測定と違い、その性質上、蛋白質が受ける中間的な構造変化の詳細をとらえることは困難である。

### 3) 室温燐光および蛍光の測定で得られた酸化過程の時間経過

上述したように蛍光データから得られた酸化の状況と室温燐光のそれは大まかには一致するものの、一部内容が異なっている。上の結果に基づく RTP の初期強度の変化(Fig. 1)および蛍光強度(I<sub>f</sub>)の変化(Fig. 2-a)とをまとめて、それらの時間的変化について Fig. 3 に示す。

Fig. 3 において、蛍光強度(I<sub>f</sub>)が時間(T)とともに一次的減衰曲線で推移しているのに対して、RTP 初期強度は時間に対して複雑な変化をしている。この場合、蛍光の変化(Fig. 3 中、領域 (II) で示される)は主に Trp 残基(サブユニットあたり3個)の酸化修飾によるものである。

他方、室温燐光のそれは複雑で比較的大きな減少を示している。例えば150分経過後、蛍光でみると約70%のALPが酸化の影響を受けずに残っているのに燐光ではその半分(36%)ほどが観測できる程度である。Fig. 3 に示された領域 (I) は、蛍光では観測されるが、RTP では観測されていない領域であり、後に構造モデルを示しながら議論するけれども、この差は蛍光法と RTP 法の違いから次のように考えられる。

蛍光法では NaOCl によって Trp 残基が直接酸化を受けて消滅した分子を反映するのに対して、室温燐光の場合は蛍光と同じく Trp 残基が直接酸化をうけた変化と同時に Trp 残基の周囲の構造変化をもあわせて反映している。つまり RTP では強度 I(0) として観測されるのは蛋白質コア内部に埋もれていて、「ゆらぎ」の影

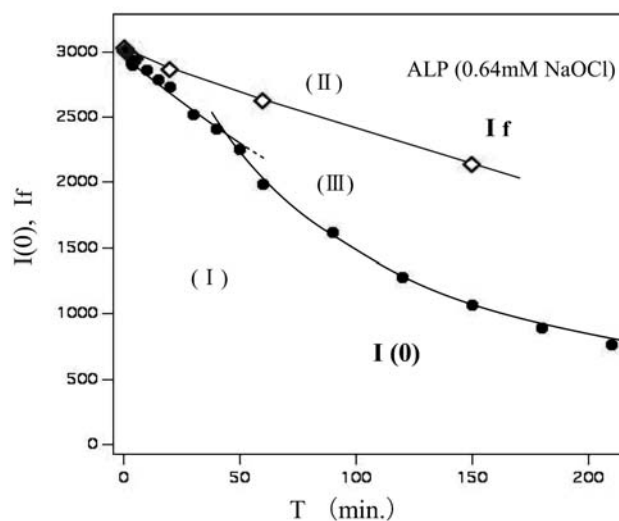


Fig. 3 蛍光強度(I<sub>f</sub>)および RTP 初期強度 I(0) 値の時間的経過 (NaOCl 0.64mM サンプル)  
 蛍光強度(I<sub>f</sub>)は最大値を 3000 に合わせた。図中 (I), (II), (III) については本文中の説明を参照。

響を受けない、もしくは受けにくい Trp 残基 (Trp109) に由来しており、蛍光で観察されている Trp 残基でも構造変化を受けたものは RTP では観測されない。詳しい解析は後で議論するが、こうした構造変化と関係する事象の一つは蛋白質分子運動の大きさが変化することによる励起分子の熱緩和過程の速度定数の変化であり、もう一つは消光剤としての効果 (蛋白質内部への浸透の度合い) に由来するものである。このいずれの効果であるか分離することは難しいが、重要なことはこれら両者とも Trp109 残基周辺の蛋白質の構造が緩くなり、熱的ゆらぎが大きくなっていることと関連している。すなわち酸化にともなう蛋白質の構造変化が段階的に起っていることを室温燐光法によって示すことができる。

4) NaOCl 濃度を変えた 4 つのケースでの室温燐光測定結果とその基本型

a) 室温燐光測定の時間経過, 4 つのケースと参照サンプル (純水中) 結果

脱酸素環境中で NaOCl 溶液の濃度を 0.32 mM から 2.5 mM まで (0.64 mM も含む) 変えて行った 4 つのケースおよび参照として純水のみサンプルについての RTP 測定の結果が Fig. 4 (Fig. 4-a, Fig. 4-b) に示されている。全て ALP 液を NaOCl 溶液に混入後、1 分後から約 210 分までの発光初期強度  $I(0)$  および寿命の時間経過を測定した結果である。これら 4 つは全体の傾向としては上述した Fig. 1 のケースに似ていて、混入後 1~5 分間は初期経過の過程として酸化プロセスには直接関係せず、その後の酸化修飾の経過が Fig. 4 で示されている。以下、詳しくのべるが、これら 4 つのケースにおいてデータは程度の違いはあるものの全体的な経過は共通していて、Fig. 1 のそれで代表される。

ここで以下の記述に先立ち、Fig. 4-b において NaOCl の濃度を変えた 4 つのケースで各々の最大寿命 (ほぼ 5~10 分の値) が異なっている点について述べる。これは発光分子周囲の NaOCl 濃度に応じた消光効果によると考えられ、濃度が高いと寿命は小さくなる。また純水中では寿命や強度の時間的変化はないことも付け加えておく。

b) 経過時間, 約 5 分後~約 40 分後の変化

濃度を変えた 4 つのケースの測定結果について、上述の例 (Fig. 1) に従って酸化の経過を観察することができる。Fig. 4-a に示される初期発光強度  $I(0)$  の値の時間経過によると、約 5 分~40 分の間にそれぞれのサンプルについて  $I(0)$  が時間とともに減少して、一定値に近づくようにゆっくりと見える。また NaOCl 濃度が大きいサンプルでは、その減少の割合は大きくなる。Fig. 4-b は燐光寿命の値が時間とともに変化する様子を示す。それによれば、はじめの間の寿命は時間が経過してもグラフはほぼ横ばいでその値はほとんど変わらない。以上のことからこの時間経過 (約 5 分~約 40 分) については酸化の第一段階と考えた。

4 つのケースとも基本的に Trp 残基 (Trp109) の酸化修飾をとらえ、更に消光効果が加わっていると考えら

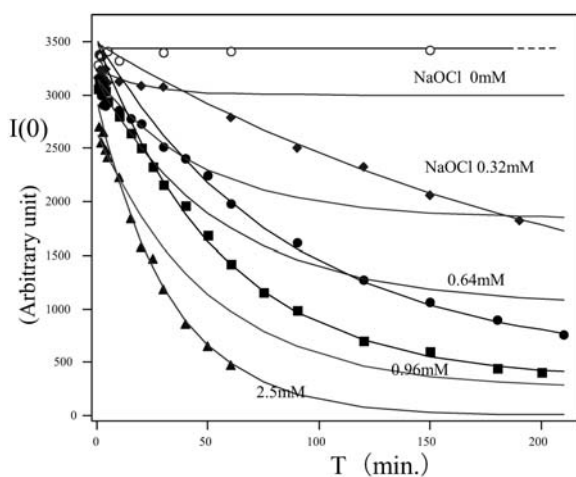


Fig. 4-a 4 サンプル (NaOCl 0.32~2.5 mM) および参照 (0 mM) の RTP 初期強度  $I(0)$  の時間経過, 説明は本文を参照。

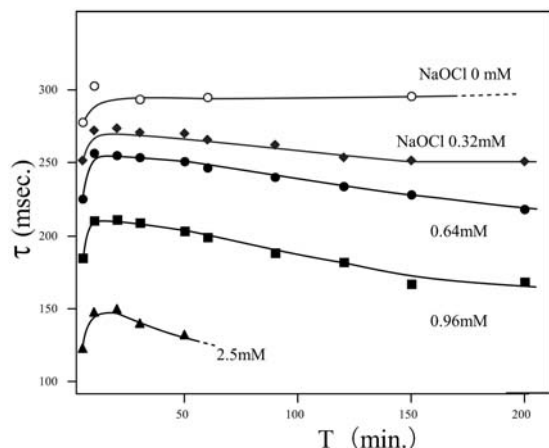


Fig. 4-b ALP の酸化に伴う RTP 寿命  $\tau$  (msec.) の時間経過  
各サンプルとも 1 分から 210 分までの測定値, ただし 2.5 mM サンプルについては 50 分までの値

れる。また蛋白質内部に埋もれた燐光発光分子 ( Trp109 ) の近傍ではノーマルな蛋白質構造としての一定の安定が保たれていることを示唆する。

c) 経過時間、約 40 分後～約 210 分後の変化

ALP 混入後、約 40 分以降ではその時間経過のようすが、それまでとは違ってくる。40 分以降 ( 2.5 mM の場合では約 20 分以降 ) 4 つのケースとも発光強度の減少は急速に大きくなり、上述した第一段階のそれとは異なった別の反応速度 ( Fig. 4-a 参照 ) で減少するようすが示されている。また減衰寿命も多少変動している。従って、この段階では全体構造に何らかの変化が生じているようであり、第二の段階である。

d) ALP 酸化経過における RTP の基本的型

上に述べたように 4 つのケースはいずれも共通の経過をたどっていることが分かる。特に第二の段階では Trp 残基の直接酸化修飾だけではこれだけの大きな変化は生じないことから、4 つのケースとも全体的な構造変化を反映しているものと考えられる。つまり蛋白質構造がゆるみ、それが内部の大きい揺らぎを引き起こし、熱緩和を増加させる。また酸化剤がさらに浸透し易くなって RTP 消光効果もその分増大する。この変化の割合は該当するサンプルでの酸化剤の濃度が大きいと著しくなるものである。この第二段階の変化は時間とともに或る一定の値になるまで続くと考えられ Fig. 4-a, b と対応している。

従って、以下の議論では Fig. 1 ( Fig. 3 ) に示された室温燐光変化を基本型として、かつ全体的な構造に着目しつつ第一段階と第二段階のようすを論じることとする。

#### 4 議論と結論および2段階酸化モデルの提案

酸化修飾について以上の測定結果から、我々は溶液中での NaOCl による ALP 酸化の過程が基本的な型を経て段階的に起ると考え、以下、球状蛋白質の構造モデルと対応づけながら議論したい。

ここで測定に用いた室温燐光法はユニークな方法であり、内部に埋もれた側鎖である Trp 残基からの発光によって Trp 残基およびその近傍の構造の動的な状況を知る手がかりを与えるものである。我々はこのような RTP 測定の特徴を活かして酸化過程を議論することにしたい。そのためにまず表層部位と内部コアを念頭においた次の 3 つの構造上のパターンを考えることにする。後に提唱することになる酸化反応の時間経過における 2 ステップ ( two-steps ) モデルを説明する際に、こうした構造上のパターンを念頭に置くことで理解し易くなると考える。

これらの構造パターンは Fig. 3 において領域  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  として示されているもので、その一つ目 ( パターン  $\alpha$  ) はノーマルな立体構造に近いものであり、蛍光、RTP ともに観測される。二つ目 ( パターン  $\beta$  ) は Trp 残基が酸化修飾を受けたもので、この構造パターンでは蛍光も RTP も観察されない。三つ目がここで注目している構造パターン  $\gamma$  で、Trp 残基はまだ酸化修飾をうけておらず蛍光は観測されているものの RTP に変化がある場合をさす。ここでは RTP が観察されない状態と、一部が観測できる状態とが平衡関係にある。この RTP が観測できる場合にも不安定でパターン  $\beta$  とは寿命が多少違っている。

これら 3 つの構造パターンをもとにして、改めて蛋白質酸化の時間的過程を追ってみることにする。まず、最初の段階はパターン  $\alpha$  に対応し、全体の立体構造が保たれたままであるが、酸化剤の一部は蛋白質表面から表層内に浸透し Trp 残基が直接に酸化剤の攻撃を受けて、次第に酸化修飾された非発光分子となりパターン  $\beta$  を生じる。ここでの蛋白質構造は一定保持されており、蛋白質内での反応は反応速度を異にするものの反応自体は溶液中と本質的には変わらないと考えられる。

一方、構造変化を伴うパターン  $\gamma$  ではその過程は複雑になるであろう。この構造変化について蛍光法では変性にもなうような大きなスペクトル変化は観測されていないし、また断片化も生じていないことから推測すると、RTP 法でとらえた変化は中間的な構造変化であり、その変化に伴い「内部の揺らぎ」が解放されると考えられる。

小寺ら [6] は球状蛋白質の NaOCl 酸化において、この蛋白質側鎖のいくつか酸化修飾されることをマスマスペクトル法で測定し報告している。また、Trp 残基は側鎖の中でも比較的酸化修飾を受けやすい [7]。こうした溶液系での酸化において、特別の理由がなければ表層部位の側鎖が内部コアのそれより先に酸化修飾を受

ける確率が高いものと考えられる。こうした点を踏まえて、我々は ALP の構造に関連した 2 段階（ステップ）の酸化モデルに従って考える。

提示される 2 ステップ酸化モデルは表層部位（水和部位や構造保持部位）および内部コア側鎖（疎水結合部位）という構造を念頭において、上述した 3 つの構造パターンに従い ALP の酸化反応の時間的経過を説明するものである。すなわち、このモデルの最初のステップは表層部位（outer-layer）酸化の段階、次ぎのステップは内部コア（inner-core）酸化の段階である。ちなみに蛋白質構造において内部コアと表層部位とは厳密に分けられるものではないが、一般的には表層部位は親水性側鎖からなり、電荷を帯びたり極性が大きく、また水素結合など構造保持の役割をもち、水分子と水和状態をつくったりする。一方、内部コアは疎水性側鎖からなり内部に埋もれているが、時に Trp 残基によく見られるように立体障害などから表面に露出（exposed）することもある。

まず、蛋白質と酸化剤との混入後の時間的経過において始めのステップ（約 30～40 分間）ではネイティブ構造もしくはこれに近い状態の構造パターンである。この状況では酸化剤は蛋白質分子の表層部位、すなわち表面にあって主に親水性側鎖からなる部位をアタックする。全体的な構造には特に変化がないけれども、溶液中の低分子（例えば酸素分子など）が蛋白質表層部位を通してある確率で蛋白質内部に浸透することがある。ここでは浸透した酸化剤によって次第に Trp 残基が直接酸化修飾をうける（構造パターン）と考えることができる。

次に、酸化反応が一定時間経過したあと（約 40～50 分以降）第二のステップへ移行する。ここでの蛋白質構造は全体が完全には変性していないけれども、ある中間的構造変化が生じている段階である。パターンに対応する。この段階では表層をなす側鎖部位（水和構造や構造保持部位）が酸化修飾をうけて構造を保つ力が弱まる。こうした構造の不安定化を反映して RTP 寿命は多少減少して蛋白質の酸化による破壊は第一ステップと異なる反応速度となり、それは終わりまで続く。以上が 2 段階変化による説明である。

一般に蛋白質の表層部位と内部コア部位について、従来の論文でも数は少ないが議論されている。たとえば Davies は（1987）「活性酸素による温和な酸化修飾により蛋白質の疎水性アミノ酸が蛋白質分子表面に露出する」ことがあると推測している [8]。酸化修飾は蛋白質表層部分の安定効果に変化をもたらすであろう [9]。また、構造保持部位について、Lumry は knot 構造モデルを提唱している [10]。この構造の存在により構造が固くなり揺らぎが押さえられるというものである。もし酸化修飾の際そうした表層や繋ぎの部分が壊れると安定が損なわれ揺らぎは大きくなり酸化剤の影響は顕著になるであろう。

最後に、酸化プロセスとは直接に関係しないとした ALP 液混入後の初期過程についてここで簡単に触れておく。この現象は混入の時点で ALP が何らかの構造的不安定さをもたらしたもので酸化とは直接関係しないと考えられる。つまり測定開始（約 1 分後）から約 5 分までの初期経過で生じる現象として、蛋白質は初めの状態（濃い硫酸のサスペンション）から混入に伴う希釈により一時的な環境変化を受け、寿命が減少するが、その後次第にあらたな溶媒環境にたいして水和などが形成され一時的に安定化し RTP 寿命が回復したと考えられる。そのようすが Fig. 1（1 分～5 分）に示されている。このような溶媒の新たな環境への移行に際し、構造の一時的不安定化と再安定化という過渡的な変化が観測されたのはこれが最初であろう。今後研究を続ける必要があるが、ここでは、これ以上とりあげない。

本論文の結論をまとめると、室温燐光法を用いた測定によって、次のような ALP 酸化の経過の様子を実験的に始めて明らかにした。つまり NaOCl 混入後、初めの間は Trp109 のように内部に埋もれた疎水性側鎖は構造としては揺らぎの少ない固い環境にあり、局所的には浸透してきた酸化剤で酸化修飾を受けるものの、全体的にはほぼネイティブで比較的安定な状態である。その後、表層部位（水和部位や構造保持部位）が酸化の影響でくずれルーズな構造になって熱的揺らぎが促進される。それとともに内部の疎水性環境に埋もれていた Trp 残基も揺らぎを受け安くなり、消光効果も顕著になり、最終段階へと蛋白質全体の酸化修飾がすすんでゆくのであろう。この場合、揺らぎが大きい状態は中間的構造であり、必ずしも完全変性状態とはかぎらない。このような経過を踏まえ、我々は ALP 酸化修飾の過程が単純な一次反応的な確率過程ではないことを示し、2 ステップ酸化モデルを提唱した。このモデルは溶液中において蛋白質の側鎖でつくられる表層およびコア部位が全体のネイティブな立体構造を保つために主鎖とともに不可欠の役割をもつ構造因子であることを示してい



る。酸化修飾に関して言えば、蛋白質の表層部位はいわば内部の保護効果をもつが、酸化によりその働きが損なわれ、さらに内部に埋もれて固い環境を維持していた疎水性側鎖が変化し完全変性には至らないが安定な構造を保てなくなる。こうした中間的構造変化は例えば酸化によりプロテオリシスの感受性が高まることなど生体中での幾つかの蛋白質構造に伴う現象とも関係しているかもしれない。詳しくは今後の研究に待たれる。

#### 参考文献

- [1] Yoshiyuki Kai and Keiichi Imakubo. *Photochem. Photobiol.* Vol.**29** (1978) pp.261–265
- [2] R. A. Bradshaw *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.**78** (1981) pp.3473–3477
- [3] C. J. Fischer *et al.* *Biochemistry* Vol.**39** (2000) pp.1455–1461
- [4] Y. Kai and Tadakazu Maeda, *J. Phys. Soc. Japan* Vol.**67** (1998) pp.1486–1491
- [5] Y. Kai, *J. Institute Sci. & Engineering. CHUO UNIVERSITY* Vol.**6** (2000) pp.55–61 (in Japanese)
- [6] Y. Kodera *et al.* 「日本ヒトプロテオーム学会(第2回)」発表(東京,板橋区)2005
- [7] M. Kuroda, F. Sakiyama, and K. Narita, *J. Biochem.* Vol.**78** (1975) pp.641–651
- [8] K. J. A. Davis, M. E. Delsignore, and S. W. Lin. *J. Biol. Chem.* Vol.**262** (1987) pp.9902–9907
- [9] R. L. Levine. *J. Biol Chem.* Vol.**258** (1983) pp.11828–11833
- [10] R. Lumry “The New Paradigm for Protein Reserch” pp.56–67 :  
PROTEIN-SOLVENT INTERACTION *Ed.* R. B. Gregory (Marcel Dekker, Inc.) 1994