

X 線小角散乱による糖・ポリオール水溶液中のリゾチームの選択的溶媒和 Preferential Solvation of Lysozyme in Aqueous Solutions of Sugars and Polyols Studied by Small-Angle X-Ray Scattering

楨靖幸^{1,*}¹九州大学大学院理学研究院化学部門, 〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744Yasuyuki MAKI^{1,*}¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyushu University, 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka, Fukuoka 819-0395, Japan

1 はじめに

タンパク質水溶液に糖やポリオールを添加すると、タンパク質の安定性が向上することがよく知られている。この現象は、食品や医薬品の保存などの応用上重要であると考えられる。タンパク質の安定性に対する糖やポリオールの効果は、これらの共溶媒がタンパク質の近傍から選択的に排除されている（あるいは、タンパク質が選択的に水和している）ことと関連づけて理解されている [1-3]。また、この共溶媒の選択的溶媒和は選択的相互作用パラメータ $\xi_3 = (\partial g_3 / \partial g_2)_{T, \mu_1, \mu_3}$ で定量化されてきた [1-3]。ここで μ_i と g_i は成分 i (1: 水, 2: タンパク質, 3: 共溶媒) の化学ポテンシャルと水 1g あたりの重量、 T は温度である。 ξ_3 の値は溶液の密度測定などから求められてきたが、実際に測定されている系はかなり限られている。最近我々は、平井らが報告した X 線小角散乱 (SAXS) を利用した糖・ポリオール水溶液中のタンパク質の選択的溶媒和挙動の研究手法 [4][5] を発展させ、スクロースまたはスクラロース水溶液中のミオグロビンの選択的溶媒和挙動の違いを定量的に示すことに成功した [6]。我々はさらに、SAXS データから ξ_3 を計算する方法を導いた（第 71 回高分子討論会で発表）が、過去に同じ系で ξ_3 が測定された例がなく、この新しい手法の妥当性の検討が課題であった。本研究では、密度測定によって ξ_3 の値が求められている、グルコース [1]、グリセロール [2] およびソルビトール [3] の水溶液中のリゾチームについて、SAXS 実験から ξ_3 の値を算出し、文献値と比較することにより、SAXS を用いて ξ_3 を求める手法の妥当性を示すことを目的とした。

2 実験

ニワトリ卵白由来リゾチーム（生化学工業）を試料として用いた。グルコース、グリセロール、ソルビトールは、富士フイルム和光純薬より購入し、そのまま用いた。溶媒に 50 mM NaCl を含む酢酸緩衝液 (pH4, 10 mM) を用いた。リゾチームのストック溶液 (100 mg/mL) と糖・ポリオールのストック溶液 (50 w/v%) と溶媒を適量混合することにより、リゾチーム水溶液を調製した。リゾチームの最終濃度は 20 mg/mL、糖・ポリオールの最終濃度は 0~40

w/v% とした。SAXS 測定は、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリー BL-6A において行った。X 線波長は 1.5 Å, カメラ長は 0.5 m である。試料温度は 25°C に保ち、試料の X 線損傷を防ぐため溶液をゆっくり流しながら測定した。SAnGLer ソフトウェア [7] を用いて 2 次元画像から 1 次元散乱データへの変換とバックグラウンドの差し引きを行った後、間接フーリエ変換法により距離分布関数を計算し、原点散乱強度 $I(0)$ を求めた。以前に報告した方法 [6] により、 $I(0)$ の共溶媒濃度依存性の測定値を CRY SOL ソフトウェアによる理論計算値と比較することで選択的溶媒和挙動を定量的に評価し、さらに ξ_3 を計算した。

3 結果

SAXS データから計算したグルコース、グリセロール、ソルビトール水溶液中のリゾチームの ξ_3 の値は、密度測定により求められた ξ_3 の文献値 [1-3] と良好な一致を示した。これにより、SAXS データに基づいて ξ_3 を求める手法の妥当性が確認できた。

参考文献

- [1] T. Arakawa and S. N. Timasheff, *Biochemistry* **21**, 6536–6544 (1982).
- [2] K. Gekko and S. N. Timasheff, *Biochemistry* **20**, 4667–4676 (1981).
- [3] K. Gekko, *J. Biochem.* **91**, 1197–1204 (1982).
- [4] M. Hirai *et al.*, *Biophys. J.* **115**, 313–327 (2018).
- [5] S. Ajito, H. Iwase, S. Tanaka and M. Hirai, *J. Phys. Chem. B* **122**, 8685–8697 (2018).
- [6] I. Kuroiwa, Y. Maki and M. Annaka, *J. Phys. Chem. B* **128**, 676–683 (2024).
- [7] N. Shimizu *et al.*, *AIP Conf. Proc.* **1741**, 050017 (2016).

成果

1. Y. Maki, Preferential Solvation and Thermal Stability of Proteins in Aqueous Solutions of Sugars and Polyols, The 29th Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation, Higashi-Hiroshima, March 2025.

* maki@chem.kyushu-univ.jp