タンパク質の熱変性とアミノ酸置換

—リゾチームとヌクレアーゼを例に—

三重大学教育学部化学教室 田 中 晶 善
京都府立大学農学部農芸化学教室 北 村 進 一

One of the best methods for understanding the forces responsible for holding proteins in their highly cooperative structure is to study effects of amino acid replacements on thermal unfolding of proteins using high sensitivity differential scanning calorimetry (DSC). This article outlines examples of the DSC study on the effects of mutations of T4 phage lysozyme and staphylococcal nuclease.

amino acid replacement/differential scanning calorimetry/structural stability of protein/thermal unfolding

はじめに

タンパク質は高度に組織的な構造を持っているが、それには安定化・不安定化に種々の要素が寄与しており、安定化の自由エネルギーは、それらの相殺された結果として、5ないし15kcal・mol⁻¹程度でしかない¹⁾。従って、例えばアミノ酸置換などによる分子内・分子間相互作用のわずかな変化で安定性に著しい変化が起こりうる。

タンパク質工学的手法が確立した現在では、アミノ酸置換タンパク質の調製は日常的な手法となり、タンパク質の構築原理を探る重要な手段を提供しつつある^{2),3)}。

本稿では高感度示差走査熱量計(DSC)を用いて筆者らが行った、T4ファージ・リゾチームおよび黄色ブドウ球菌・ヌクレアーゼの熱変性反応に対するアミノ酸置換の効果についての研究例と、それに関連した研究について簡略に紹介する。(なお、一部内容の重複する部分があるが、本誌1992年2月号の油谷による総説、「蛋白質構造の構築原理は「アミノ酸置換」の手法でどこまで解明できたか」⁴⁾も併せ読んでいただくとう有益である。)

Effects of Amino Acid Replacements on Thermally-Induced Unfolding of Proteins

Akiyoshi TANAKA*, Shinichi KITAMURA

Department of Chemistry, Faculty of Education, Mie University* and Department of Agricultural Chemistry, Kyoto Prefectural University

1. タンパク質の熱変性反応

通常、分子量が3万程度以下の小型タンパク質の熱変性反応は、天然(未変性)状態Nと変性状態Dの二状態の平衡:

で記述することができ、ファント・ホッフの式、

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_{VH}}{RT^2} \quad (2)$$

に従った挙動を示す。ここでKは絶対温度Tにおける平衡定数、 ΔH_{VH} はファント・ホッフのエンタルピー変化である。変性が厳密に二状態であれば、カロリメトリーによる直接測定から得られる真のエンタルピー ΔH_{cal} とファント・ホッフのエンタルピーの値は等しい⁵⁾。これら二つのエンタルピーの値の比較から、熱変性反応が二状態か否かを判定できる。

タンパク質の熱変性反応では、通常の熱転移と同様、反応の前後でエンタルピーと比熱が変化し、その様子をDSCを用いて測定することができる。DSCでは、外界との断熱下で、温度変化に伴う比熱の変化を測定することができる。従って、観測されるのは正味の値であり、また通常、十分な平衡を保ちつつ測定ができるので、厳密な熱力学的解析に耐えるデータを得ることができる。

DSC測定から、変性の標準熱力学量、 ΔG_d 、 ΔH_d 、および ΔS_d を温度の関数として求めることができる⁵⁾⁻⁸⁾。アミノ酸置換が変性の熱力学量に与える効果

を、野生型とアミノ酸置換タンパク質（変異型）の差として次のように定義する。

$$\Delta\Delta X_d = \Delta X_d(\text{野生型}) - \Delta X_d(\text{変異型}) \quad (3)$$

ここで X は、 G , H または S を表す。 $\Delta\Delta G_d$ が正であることは、アミノ酸置換によって構造に不安定化がもたらされること、すなわち未変性状態が不安定になるか変性状態が安定化するか、あるいはその双方であることを意味する。

これらのパラメータの値は、通常、野生型の変性反応の中点温度 $T_{1/2}$ で比較する。この温度で野生型の変性反応の $K = 1$ であり、従って $\Delta G_d = 0$ である。

これらの熱力学量は現象論的な値であって、そこから変性機構やアミノ酸置換の効果について分子論的な結論は得にくい。X線結晶構造解析などに基づいて得られた構造変化との関連において比較の対象、あるいはその推論の正否の判定基準となり得る。構造に関する知見と熱力学的手法とが相補的に働いてタンパク質の構造安定化機構の理解に資することが期待できる。

2. リゾチーム

T4 のファージのリゾチーム (図1)^{9),10)} は、アミノ酸164残基を含む、分子量18,700、単ポリペプチド鎖の単純タンパク質である。

図2は、リゾチームのアミノ酸置換タンパク質、Arg96→His (R96H; 図1参照) のDSC曲線の例である。変性反応は完全に可逆的であり、測定後、系を低

図1 T4ファージのリゾチームの骨格構造。文献9), 10)に基づく。

図2 T4ファージのリゾチームのアミノ酸置換タンパク質 Arg96→His のDSC曲線 (実線)。pH2.3で測定。DSC曲線に沿う点線は、ファント・ホッフの式 (本文式1) に基づいて描いた理論曲線。2本の直線は、変性反応の前後でのベースラインを表す。そのベースラインをシグモイダルに結ぶ点線は、DSC曲線に対応するように計算によって求めたベースライン。↑は、変性の前後での熱容量の差、 ΔC_p を表す。

温に戻し再走査すると、初めと全く同じDSC曲線が得られる。また走査速度依存性も見られず、これらのことは、DSC曲線を平衡熱力学的に取り扱うことの妥当性を保証する。図の点線は、ファント・ホッフ式に基づく理論曲線で、この熱変性反応が二状態モデルでよく説明されることを示している。

表1に12種類のアミノ酸置換タンパク質について、同じpHと温度で比較した $\Delta\Delta X_d$ の値を記す⁶⁾⁻⁸⁾。

表1 アミノ酸置換による、リゾチーム熱変性の熱力学量への効果⁶⁾⁻⁸⁾。pH2.5。野生型の $T_{1/2} = 319.4\text{K}$ (46.2°C)、この温度での $\Delta H_{\text{cal}} = 108\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

タンパク質	$\Delta\Delta G_d$	$\Delta\Delta H_d$	$\Delta\Delta S_d$
A82P	-0.5	-5	-15
A93P	-0.5	-6	-18
R96H	4.0	-6	-32
G113A	-0.5	-5	-15
T157A	0.9	-3	-13
T157E	1.3	12	33
T157I	1.9	-1	-9
T157L	1.7	9	23
T157N	1.1	-6	-21
T157R	0.6	-2	-7
T157V	1.6	1	-2
C54T+C97A	0.8	2	4

単位: $\Delta\Delta G_d$ および $\Delta\Delta H_d$: $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,
 $\Delta\Delta S_d$: $\text{cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

$\Delta\Delta H_d$ の値は $-6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ から $12 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ まで分布しているが、野生型 (WT) の ΔH_d が $108 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ であることを考えるとその差は比較的小さい。 $\Delta\Delta G_d$ の値は、それとはほぼ無関係に、さらに小さい値をとっている。

野生型と R96H について、変性の標準ギブズ自由エネルギー変化を温度に対してプロットしたものを、図 3 に示す。 $\Delta\Delta G_d$ は、図の $\downarrow$ で表され、R96H のアミノ酸置換によって、pH2、および 3 において、約 $3.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 不安定 ($\Delta\Delta G_d > 0$) となることを表している。この図から、いずれの pH の場合も 5℃ 前後で最も安定であることがわかる。また例えば pH2 での R96H の ΔG_d は -15°C 付近で再び負の値をとる。これはいわゆる低温変性 (cold denaturation)¹¹⁾ がこの温度付近で起こることを示唆している。

Weaver ら¹²⁾ は、R96H の結晶構造解析を $1.9\text{\AA}$ の分解能で行い、これを野生型と比較し、この不安定化を未変性状態における構造変化に帰し、不安定化の原因を二つ挙げている。ひとつは、ヒスチジン残基のイミダゾール環が構造に歪をもたらすこと (特に His96 の $\text{C}-\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta$ の結合角)、もうひとつはアミノ酸残基 82-90 の形成するヘリックスが関与するヘリックス-双極子相互作用の欠落である。

一方、Tidor と Karplus はシミュレーションによって野生型と R96H の自由エネルギー解析を行っている¹³⁾。かれらは、未変性状態と変性状態の双方について、それぞれの自由エネルギーの変化に寄与する

図 3 T4 ファージのリゾチームの熱変性における、ギブズ自由エネルギー変化の温度依存性⁶⁾。野生型 (実線) および R96H (点線) を pH2 および 3 で比較した。野生型の pH3 における斜線は、実験誤差の範囲を示す⁶⁾。

種々の要因を詳細に検討し、 $\Delta\Delta G_d$ として、 -1.9 ないし $-1.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ という値を得ている。計算に含まれる項が極めて複雑であることを考えると、DSC で得られた結果、 $-3.2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ とは、まずまず一致していると言えようか。

T157 は、活性部反対側、タンパク質表面ループ上に位置しており、これを種々のアミノ酸に置換した変異型タンパク質について多くの報告がある。

T157I は最も大きな不安定化を示す ($1.9 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)。Alber らは、T157I の不安定化を、Thr157-Asp159 間の水素結合が、T157L では形成されないからである、としている¹⁴⁾。類似の効果が期待される T157L でも、ほとんど同程度 ($1.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) の不安定化が観測される。しかし DSC 測定に基づいてその内訳を見てみると、 $\Delta\Delta H_d$ で $10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、また $\Delta\Delta S_d$ で $32 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ もの違いがあり、それらが相殺された結果、 $\Delta\Delta G_d$ が似た値を取っていることがわかる。X 線結晶構造解析からは、T157I では、Asp159 の位置が野生型に比べて $1.1\text{\AA}$ シフトしていることが示されている。これに対し、T157V では $0.4\text{\AA}$ のシフトにとどまっている。これらのことから、T157L が T157I あるいは T157V よりも著しく大きな $\Delta\Delta H_d$ の値をとる理由は説明することができず、更に種々の要素が寄与していることを予想させる。

T157V について Dang らは、未変性・変性状態それぞれ自由エネルギーを計算し、 $\Delta\Delta G_d$ の値として $1.91 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ を求めている¹⁵⁾。この値は、DSC によって求められた値、 $1.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ¹⁹⁾ とよく一致している。

なお Alber らは CD を用いて種々の T157 置換タンパク質の $\Delta\Delta G_d$ の値を求めているが¹⁴⁾ その値は DSC の結果とはしばしば大きく異なっている。その原因としては、測定タンパク質濃度の違いや単純な測定誤差の問題以外に、CD の測定においては ΔC_p の寄与が考慮されていないことが考えられる。特にリゾチームでは大きな ΔC_p を持つために (図 2 参照)、変性の熱力学量は温度や pH に大きく依存し ΔC_p の効果を考慮しないと、正確に比較することがむずかしい*)。

*) ΔC_p は図 2 のように単一の DSC 曲線から求めることも可能であるが、正確には、pH を変えるなどの方法で $T_{1/2}$ を変化させ、それに伴う ΔH_d の変化を $T_{1/2}$ に対してプロットし、その傾きから求める。図 3 のような、変性の ΔG_d の温度依存性を広い温度範囲に亘って描くためには、このような方法で厳密に得られた熱力学パラメータが必要である。

Ala82は、81-91のアミノ酸残基の形成ヘリックスの一部をなしている。Alaはヘリックス形成能の比較的高いアミノ酸であり、これをヘリックス破壊能を持つProに置換すると不安定化することが予想される。しかしA82Pはむしろ安定化している(表1)。一方、同じヘリックス内にあるPro86を逆にAlaに置換したもので、むしろ若干不安定になることが報告されている¹⁶⁾。これは81-91のアミノ酸残基が完全なヘリックスを形成していないことが原因であるとされているが、安定化・不安定化の機構がそれほど単純ではないことを示唆している。

オリゴ-1, 6-グルコシターゼの場合、プロリンの含有量とタンパク質の熱安定性には正の相関関係がある¹⁷⁾が、リゾチームのA82PとA93Pで観測された小さい安定性は、その類似の例であるかもしれない。

3. ヌクレアーゼ

黄色ブドウ球菌のヌクレアーゼ(図4)は、単一のポリペプチド鎖からなり、分子内にS-S結合、あるいは遊離のSH基を持たない、分子量16,800の単純タンパク質である。

測定対象は野生型(WT)の他、1ないし3箇所であミノ酸置換を行った変異型タンパク質である。(図4、および表2)

野生型を含むすべてのタンパク質で、観測した0.5ないし20mg/ml程度の範囲において、タンパク質濃度の増大に伴う変性のピーク温度の低下が見られた^{20), 21)}。これは熱変性に多量体化が伴うことを示唆する。タンパク質の種類やpHによって若干の幅はあるが、 $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$ の比が1.5前後になることから、

図4 黄色ブドウ球菌・ヌクレアーゼの3次構造のリボンダイアグラム。文献18), 19), 23)に基づく。

表2 アミノ酸置換による、ヌクレアーゼ熱変性の熱力学量への効果^{20), 21)}。pH7.0。野生型の $T_{1/2} = 324.6K$ (51.4℃)、この温度での $\Delta H_{cal} = 73.9kcal \cdot mol^{-1}$ 。

タンパク質	$\Delta\Delta G_d$	$\Delta\Delta H_d$	$\Delta\Delta S_d$
L25A	2.6	-11	-40
V66L	-0.8	14	45
G79S	1.3	14	40
G88V	-0.5	17	55
A90S	2.5	-13	-50
H124L	-1.2	-2	-3
V66L+G88V	-1.0	24	75
V66L+G79S+G88V	-0.4	52	160

単位: $\Delta\Delta G_d$ および $\Delta\Delta H_d$: $kcal \cdot mol^{-1}$,
 $\Delta\Delta S_d$: $cal \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$ 。

多量体化は二量体化であることが示される。

これらのDSC曲線は、二状態モデルを修正した変性反応の模式:

に基づいて解析することができ^{5), 20), 21)}。その結果の一部について表2に示す。変性反応の midpoint 温度 $T_{1/2}$ が濃度の関数であるので、基準濃度として任意に500 μM を取り、 $\Delta\Delta X_d$ の値もその濃度における野生型の $T_{1/2}$ (pH 7で、51.4℃) で比較している。

一般に、埋もれたアミノ酸を疎水性の高い残基で置換したもの(V66L, G88V)では $T_{1/2}$ がWTに比べて高くなり、従って $\Delta\Delta G_d$ が負(安定化); また埋もれた疎水性残基を極性のアミノ酸に置換したもの(A90S)では $T_{1/2}$ が低くなり、 $\Delta\Delta G_d$ が正(不安定化)となっている。

ヌクレアーゼの場合は、リゾチームと異なり、野生型の $\Delta H_d = 74kcal \cdot mol^{-1}$ に対して、それとの差 $\Delta\Delta H_d$ が、-13ないし52 $kcal \cdot mol^{-1}$ という大きな幅を持っている。

変異型タンパク質の中に、二つの多重置換タンパク質(V66L+G88V, V66L+G79S+G88V)が含まれている。一般に多重置換タンパク質では、置換対象アミノ酸間に強い相互作用がない場合や、アミノ酸置換によって大きな三次構造の変化が起こらない場合には、 $\Delta\Delta X_d$ の値に加成性が成り立つことが予想される²²⁾。表2のヌクレアーゼの場合は、 $\Delta\Delta G_d$ 、および $\Delta\Delta H_d$ のいずれについてもおおまかに加成性が成り立っている。すなわち、V66LおよびG88V単独の場合の和、および、実際にV66L+G88Vで観測された値は、 $\Delta\Delta G_d$ では、-1.3および-1.0、 $\Delta\Delta H_d$ では、31およ

び24; V66L+G79S+G88V の場合はそれぞれ, 0 と -0.4, 45と52である ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Shortle と Meeker²³⁾ は, 上記 2 種の他, V66L+G79S, I18M+A69T, I18M+A90S の計 5 種について変性剤による変性反応の $\Delta\Delta G_d$ の加成性を調べているが, いずれもかなりよい加成性を示している.

一方, 表 2 から理解されるもう一つの特徴は, $\Delta\Delta H_d$ の値が大きな分布を示すのに対して, $\Delta\Delta G_d$ はごく小さな値の分布しか示していないこと, すなわちエンタルピー変化とエントロピー変化の補償が見られることである. 特に V66L+G79S+G88V の場合には, $\Delta\Delta H_d$ は $52\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ であるのに対し, これを打ち消すような $\Delta\Delta S_d$ の寄与があり, 結局, $\Delta\Delta G_d$ はわずかに $-0.4\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ である.

Shortle らは蛍光を指標として熱変性を観測²⁴⁾し, 少なくとも中性 pH 付近では DSC の結果とほぼ一致する結果を得ている. 彼らは上記のような, エンタルピー変化とエントロピー変化の著しい補償の原因を, 主として変性状態における溶媒露出面積の違いと, それに基づく, 水和水分子数の違いとして説明している²³⁾⁻²⁵⁾. なお, 以上のアミノ酸置換の場合とはやや趣を異にするが, WT, V66L, G88V, V66L+G88V, V66L+G79S+G88V それぞれの C 末端から13残基を欠くフラグメントの DSC 測定を行うと, いずれの場合もピークが全く観測されない²⁰⁾. このことから, 少なくとも C 末端13残基が三次構造形成に必須であることがわかる. 一次構造上では中心に近い, Ω -ループ上の Thr44 から Lys49 の 6 残基を欠くフラグメントでは, WT 類似の DSC 曲線を与える (J. Thomson, J. Sturtevant; 私信) ことも考えあわせると, 一次構造上では遠く離れているアミノ酸間相互作用が三次構造の形成に重要であることを示唆している.

おわりに

タンパク質の構造安定性を計算によって求める試みは精力的になされ, かつ精密化しているが, その正否の判定は結局, 熱測定によって求められた正確な熱力学量である. DSC はタンパク質の熱変性の熱力学諸量を直接, 定量的に評価することのできる唯一の手法であることを考えれば, その重要性は強調しても強調しすぎることはないと思われる.

しかしながら現在のところデータの蓄積は不十分な状況にある. タンパク質の構築原理の理解のために, 多くの研究者が熱測定に関心を持たれることが望まれる^{4), 26)}.

ご助言を頂きました北海道大学 (現・東京大学), 桑島邦博先生, 武庫川女子大学, 土井祐司先生にお礼申し上げます. また, 文献 4 の原稿をお見せいただきました大阪大学, 油谷克英先生にお礼申し上げます.

本稿中の DSC 測定による研究は, 筆者らがエール大学 Sturtevant 教授の研究室で行ったもので, 研究の機会を与えて頂き, ご助言いただいた同先生に深謝します.

文 献

- 1) Pfeil, W. (1981) *Mol. Cell. Biochem.*, **40**, 3-28
- 2) Matthews, B. W. (1987) *Biochemistry*, **26**, 6885-6888
- 3) Beasty, A. M., Hurle, M. H., Manz, J. T., Stackhouse, T., Matthews, C. R. (1987) *Protein Engineering*, 91-102
- 4) 油谷克英(1991)生物物理, **32**, 27-32
- 5) Sturtevant, J. M. (1987) *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **38**, 463-488
- 6) Kitamura, S., Strutevant, M. (1988) *Biochemistry*, **28**, 3788-3792
- 7) Connelly, P., Ghosaini, L., Hu, C. Q., Kitamura, S., Tanaka, A., Sturtevant, J. M. (1991) *Biochemisrty*, **30**, 1887-1891
- 8) Hu, C. Q., Kitamura, S., Tanaka, A., Sturtevant, J. M., *Biochemistry*, **31**, 1643-1647
- 9) Remington, S. J., Anderson, W. F., Owen, J., TenEyck, L. F., Grainger, C. T., Matthews, B. W. (1978) *J. Mol. Biol.*, **118**, 81-98
- 10) Grutter, M. G., Hawkes, R. B., Matthews, B. W. (1979) *Nature*, **277**, 667-668
- 11) Privalov, P. L., Griko, Yu. V., Venyaminov, S. Yu., Kutysenko, V. P. (1986) *J. Mol. Biol.*, **190**, 487-498
- 12) Weaver, L. H., Gray, T. M., Grutter, M. G., Anderson, D. E., Wozniak, J. A., Dahlquist, F. W., Matthews, B. W. (1989) *Biochemistry*, **28**, 3793-3739
- 13) Tidor, B., Karplus, M. (1991) *Biochemisrty*, **30**, 3217-3228
- 14) Alber, T., Dao-pin, S., Wilson, K., Wozniak, J. A., Cook, S. S., Matthews, B. W. (1987) *Nature*, **330**, 41-46
- 15) Dang, L. X., Merz, K. M. Kollman, P. A. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8505-8508
- 16) Alber, T., Bell, J. A., Dao-Pin, S., Nicholson, H., Wozniak, J. A., Cook, S., Matthews, B. W. (1988) *Science*, **239**, 631-635
- 17) Suzuki, Y. (1989) *Proc. Japan Academy*, **30**, 3217-3228
- 18) Richardson, J. S. (1981) *Adv. Protein Chem.*, **34**, 167-339
- 19) Shortle, D., Lin, B. (1985) *Genetics*, **110**, 539-555
- 20) 田中晶善, 北村進一, Sturtevant, J. M. (1988) 第39回タンパク質構造討論会講演要旨集, p. 1-4

- 21) Tanaka, A., Flanagan, J. M., Sturtevant, J. M. 未発表データ
 22) Wells, A. J. (1990) *Biochemistry*, **29**, 8509-8517
 23) Shortle, D., Meeker, A.K. (1986) *Protein: Structure, Function, and Genetics*, **1**, 81-89
 24) Shortle, D., Meeker, A. K., Freire, E. (1988) *Biochemistry*, **27**, 4761-4768
 25) Dill, K. A., Shortle, D. (1991) *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 795-825
 26) 高橋克忠, 城所俊一, 油谷克英, 次田皓(1991) *生物物理*, **31**, 50-52

たなか あきよし

82年, 京大農学部博士課程(酵素化学; 廣海啓太郎教授)を修了。同年より現勤務先。86-87年, 89-90年, エール大学化学教室で熱測定を学びました。講義や学生実験, 打ち続く会議の合間を縫って実験屋としての自覚を持ち続けるのはなかなかの仕事です。

学生時代, 約十年, 故富田和久先生から聖書を学びました。

☎0592-32-1211 内線3743(勤務先)

きたむら しんいち

昭和28年愛知県に生まれる。50年京都府立大学農芸化学科卒業, 53年京都大学農学研究科博士後期課程中退後, 京都府立大学農芸化学科助手。60~62年米国エール大学に留学, 留学中はタンパク質の熱安定性について研究したが, 現在は糖質の高次構造と機能, 特に多重らせん構造に興味をもって仕事を進めている。趣味はらせん状の物や生物の収集と防波堤釣り。

☎075-781-3131 内線289(勤務先)

■吉岡書店出版事業部より■

「自費出版」のご案内 —印刷した立派な本が簡単につくれます—

記念論文集 / 予稿集 / リプリント / 旅行記 / 回顧録 / 詩歌句集
 遺稿・追悼集 / 画・写真集 / その他

字くぱり・印刷・製本・用紙・装丁・あらゆるご相談に応じます

案内書お送りします

■京都市左京区田中門前町87

郵便番号606 / 振替京都3-4624

■TEL-075-(781)4747

吉岡書店出版事業部