タンパク質の変性の熱力学

阪大蛋白研 油谷 克英

Thermodynamics of protein denaturation has been investigated by calorimetry. Analyzing the excess heat capacity curve of a protein obtained using an adiabatic differential scanning calorimeter, we can get important thermodynamic parameters of protein denaturation such as heat capacity change of denaturation and temperature functions of denaturation enthalpy, denaturation entropy, and denaturation Gibbs energy. In this paper, the thermodynamic parameters have been discussed to elucidate the role of each amino acid residue in conformational stability of a protein.

Protein denaturation/Thermodynamics/Calorimetry

1. はじめに

タンパク質は個々に特異な立体構造を有し、その特異な立体構造が機能発現に重要な役割を果たしている。その天然状態の立体構造を N 状態 (Native State) と呼ぶ。この N 状態のタンパク質は加熱または尿素、塩酸グアニジンなどのいわゆる変性剤によって、立体構造は破壊され変性する。この変性状態を D 状態 (Denatured State) と呼ぶ。D 状態のタンパク質は冷却または変性剤の希釈によって N 状態に復元する。一般に、タンパク質は N と D の 2 状態間の平衡系として取り扱うことができる。つまり、

$$N \rightleftharpoons D \quad (1)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (2)$$

ここで、 $K (= [D]/[N])$ は (1) 式の変性反応の平衡定数。球状タンパク質の変性のギブスエネルギー変化 (ΔG) は 25°C 付近で高々 10 kcal/mol 程度であることが、色々な手法の変性実験から求められている。タンパク質の N 状態の構造はこのようなわずかなエネルギーによって保たれているのである。

本報では、タンパク質の N 状態の立体構造の安定化機構を明らかにするのに、熱測定によって得られた変性の熱力学的パラメータが、どのように役立てられるか (熱測定によって何が分かるか) について述べる。

2. タンパク質の熱測定

先に、タンパク質の変性は可逆的であると述べたが、高い濃度のタンパク質溶液を高温にすると、通常は変性ととも不可逆的の会合体を形成し、沈殿を生じる。可逆的条件を得るためには、低いタンパク質濃度で、そのタンパク質の等電点から可能な限り離れた pH を選ぶ。pH11 付近に等電点を持つリゾチームの熱変性は、pH2-3 で 2 mg/ml 程度またはそれ以下の濃度のタンパク質溶液で良好な可逆性を示す。希薄なタンパク質溶液で測定可能な断熱型示差走査熱量計は、長い間、Privalov によって開発された旧ソ連製の熱量計 (DASM)¹⁾ しかなかった。数年前から、アメリカの MicroCal 社製の熱量計 (MC2) が一般に普及してきた。そして、タンパク質の熱測定の論文が急速に増加してきた。しかし、1-2 mg/ml のタンパク質濃度をほぼ 1 ml を必要とすることと、可逆的条件の探索が容易でないために、タンパク質を研究する生化学者に広く使われている状況ではない。

図 1 には断熱型示差走査熱量計 (DASM1) を用いて測定した例を示す²⁾。熱測定によって、N 状態の熱容量 (ΔC_p^{app})、熱変性に伴う熱吸収量 (過剰熱容量: 変性のエンタルピー変化, ΔH_d)、D 状態の熱容量、及び熱変性温度 (T_d) が実測される。これから 2 状態の転移に伴う熱容量の差 ($\Delta_d C_p$) が求められるので、熱測定の結果から次式によって変性の熱力学的パラメータの温度関数が得られる。ここでは、 $\Delta_d C_p$ に温度依存性がないと仮定している。

Thermodynamics of Protein Denaturation

Katsuhide YUTANI

Institute for Protein Research, Osaka University

図1. 断熱型示差走査熱量計 (DASM 1) による測定例。大腸菌トリプトファン合成酵素αサブユニット (濃度2.1mg/ml) をpH 9, 1 mM ほう酸緩衝液で透析し、昇温速度 2 K/min で測定。ベースラインは試料セルと参照セルの両方に透析外液を入れて測定。各温度での見かけの比熱の差 (ΔC_p^{app})、変性温度 (T_d)、 T_d での変性に伴うエンタルピー変化 (ΔH_d)、及び N と D 状態の比熱の差 ($\Delta_d C_p$) を求めることができる。

$$\Delta H(T) = \Delta H_d - \Delta_d C_p (T_d - T) \quad (3)$$

$$\Delta S(T) = \Delta H_d / T_d - \Delta_d C_p \cdot \ln(T_d / T) \quad (4)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T \Delta S(T) \quad (5)$$

3. タンパク質変性の熱力学的パラメータの特徴

タンパク質の熱測定によって得られた熱力学的パラメータの特徴点を探ることは、タンパク質立体構造の安定化機構を知る上で欠かせない。タンパク質の変性に伴う熱容量の変化は大きく、N 状態の値の25-50%に達する。N 状態の熱容量はタンパク質によって異なり、非極性残基が溶媒と接触している量に関連することが示されている。一方、D 状態での熱容量はタンパク質間での差異は少ない。よく調べられている数種のタンパク質において、2 状態間の熱容量の差、 $\Delta_d C_p$ は $0.07-0.18 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ の範囲となっている³⁾。 $\Delta_d C_p$ は $10-80^\circ\text{C}$ ではほとんど温度依存性を示さない。しかし、 80°C 以上の温度では N 状態の熱容量は引き続き直線的に増加するが、D 状態のそれは温度に依存せず一定値となる。その結果、水溶性の球状タンパク質の $\Delta_d C_p$ は外挿すると約 140°C ではほぼゼロとなる。

$\Delta_d C_p$ に温度依存性がないと仮定すると、熱測定されたほとんどの球状タンパク質の変性のエンタルピー

変化とエンタルピー変化は 110°C 付近で同じ値に収斂する¹⁾。球状タンパク質の種類に関わらず、その温度でどうして同じ値をとるかはタンパク質の熱的特性を知る上で興味のあるところである。Baldwin⁴⁾ はエンタルピー値が同一となる温度 (T_s^*) を説明するのに液体炭化水素モデルを提案している。ベンゼンなどの6種の炭化水素の水溶液への移行の熱力学的パラメータの内、移行のエンタルピーがゼロになる温度 (T_s) は良く一致し、 $112.8 \pm 2.2^\circ\text{C}$ になることを見いだした。また、移行のエンタルピーがゼロになる温度 (T_h) は $22.2 \pm 5.5^\circ\text{C}$ であった。タンパク質の変性実験で得られた ΔH または ΔS を疎水性相互作用による寄与 (ΔH_{hyd}) とその他の寄与 (ΔH_{res}) に分けて解析している。この炭化水素で得られた値を ΔH_{hyd} に当てはめると、その他の寄与 (ΔH_{res} または ΔS_{res}) は全ての温度で一定値となり、タンパク質の構造変化からの寄与であることが分かる。この解析から、 113°C ($=T_s^*$) で共通の ΔS をもつことが推定できる。一方、Doing と Williams⁵⁾ は球状タンパク質が室温付近ではほぼ同一値の小さな変性の ΔG を持つことに注目し、変性の ΔH が 100°C 付近で共通の値 (T_h^*) を持つことを示した。彼らが $T_h^* = 100^\circ\text{C}$ を得るのに使った仮定は、どのタンパク質も 25°C で同じ ΔG を持つことと $T_s^* = 110^\circ\text{C}$ であることだけである。これらの解析にはいろいろと議論のあるところなので最近の論文⁶⁾を示しておく。

また、多くの球状タンパク質の変性の ΔG (5式の ΔG の温度関数) は $10-30^\circ\text{C}$ 付近で極大値を与える。このことは高温側と低温側の両方でタンパク質が変性することを示唆している。適当な条件を選ぶことによって、ミオグロビンの低温変性に伴う熱容量変化が実測されている⁷⁾。それは温度低下に伴う変性が発熱反応 (下に凸のカーブ) であることを示した。低温変性したミオグロビンの構造は、CD, NMR 及び粘度の測定から、熱変性と同一程度に破壊されていることが確認されている。

4. タンパク質の立体構造保持と水和の役割

タンパク質の変性 (N 状態から D 状態への転移) は、N 状態で分子内部に埋もれていた残基が水と接触できるような状態 (D 状態) へ転移したとみることができる。N 状態でどの残基がどの程度分子内部に埋もれているかは X 線結晶構造解析などで判明した立体構造から推定できる。しかし、D 状態の構造が完全にランダムな構造で、全ての残基が溶媒と接触している

かどうか疑問が出されている。高濃度の変性剤変性状態⁸⁾においても、熱変性状態⁹⁾においても、疎水性クラスターの存在がNMR測定によって確認されており、完全なランダム状態ではないことを示している。さらに、タンパク質の骨格構造を反映する遠紫外領域のCDスペクトルは、熱変性タンパク質において、かなりの2次構造の保持を示唆している。しかし、Privalovらは次のような根拠で、タンパク質の熱変性状態は熱力学的にはランダムコイルと区別できないとしている。①タンパク質の実測された $\Delta_d C_p$ は変性にとまって分子内部の残基が完全に表面に露出されたと仮定して計算した比熱変化の値と一致する¹⁰⁾。このことは、熱変性によって全ての残基が溶媒に接触していることを示唆している。②種々のタンパク質の固有粘度の温度依存性から推測して、熱変性状態(高温)でのタンパク質の固有粘度はランダムコイル状態の値に近い¹¹⁾。

そのため、変性に伴ってアミノ酸残基が溶媒に露出して水和するエネルギーを検討することは立体構造の安定化機構を知る上で重要である。水和に伴うエネルギーは、モデル物質について得られている原子団ごとの水和の熱力学的パラメータ¹²⁾を用いて計算できる。リボヌクレアーゼAが変性して、埋もれていた残基が完全に水和したときの25°Cでの水和の熱力学的パラメータは $\Delta G_h = -287.7$, $\Delta H_h = -607.6$, $T\Delta S_h = -319.8$ (単位は全て kcal/mol) となる¹²⁾。熱測定(示差走査熱量計)によって実測された熱力学的パラメータを差し引くことによって、水和以外(主に真空中のポリペプチド鎖)の25°Cでの変性の熱力学的パラメータ, $\Delta G_c = 289.8$, $\Delta H_c = 654.6$, $T\Delta S_c = 364.8$ (単位は全て kcal/mol) が求まる。これらの数値を比較すると、ポリペプチド鎖の分子間相互作用の力(ΔG_c)が水和のエネルギー(ΔG_h)に僅かに勝っているだけであることが分かる。

更に、タンパク質の変性に伴う水和を極性残基と非極性残基に分けて解析することにより、それらの残基が構造形成にどのような役割を果たしているかが明らかにできる。いろいろなモデル化合物の気相から水相への移行のエンタルピーとエントロピーの値およびタンパク質のN状態とD状態で水相に接している残基の表面積の差異に基づいて、4種のタンパク質の変性にとまなう極性残基と非極性残基の水和の熱力学量が広い温度範囲(5°C-125°C)で求められている。極性残基と非極性残基の水和の ΔH 及び極性残基間の相互作用(水素結合)と非極性残基間の相互作用(ファン

図2. 4種のタンパク質の変性に伴う極性残基(破線)と非極性残基(実線)のエンタルピー変化の温度依存性。

Mb: ミオグロビン, Cyt: シトクロムc, Lys: リゾチーム, Rns: リボヌクレアーゼA.

デル・ワールス相互作用)の ΔH を推定することによって、タンパク質の分子内部の極性残基と非極性残基の変性のエンタルピーへの寄与の温度関数を見積もることができる(図2)¹⁴⁾。これらの結果は、二種のエンタルピーは示された温度範囲で反対の符号を持つこと、温度の増加につれて反対の方向に変化することを示している。つまり、非極性残基のタンパク質内部から水への移行の ΔH は25°C以下では負でそれ以上では正である(極性残基のそれらは逆である)。高い温度で、非極性残基の移行の ΔH が優っていることが熱変性のエンタルピーを正にしている所以である。

タンパク質の変性に伴う極性残基と非極性残基の水和のエントロピー変化に関しても同様に調べられている¹⁵⁾。非極性、極性残基の水和のエントロピーはともに負である。極性残基の水和のエントロピーの絶対値は温度の増加につれて増加する方向にあるが、非極性残基のそれは逆である。熱測定から得たタンパク質変性のエントロピー変化と極性と非極性残基の水和のエントロピーを比較することによって、変性に伴う構造変化のエントロピーを推定できる。更に、先に得た水和のエンタルピー変化を使って水和のギブスエネルギー、そして水素結合とファンデルワールス相互作用の破壊のギブスエネルギーを求めることができる。図3には、タンパク質分子内部のファンデルワールス相互作用が有機化合物の結晶のそれと同じであると仮定した場合の、ミオグロビンの安定化に寄与している各

図3. ミオクロビンを安定化している因子の温度依存性。タンパク質分子内部のファンデルワールス相互作用は有機化合物の結晶の値と同一と仮定して計算された。ΔG^{vdw}: ファンデルワールス相互作用のギブスエネルギー変化, ΔG^{hyd}: 水素結合のΔG, ΔG^{HB}: 非極性残基の水和のΔG, ΔG^{exp}: 熱測定で得られた実測値のΔG。

因子のギブスエネルギー変化の温度関数を示してある¹⁵⁾。この図は、非極性基の水和はタンパク質の安定化に寄与しているが、主要な安定化効果はファンデルワールス相互作用と水素結合であることを示している。水素結合の重要性に対して懐疑的な見解もある¹⁶⁾。図には示されていないが、極性残基の水和のギブスエネルギーは大きな負の値を示し、温度の低下につれてその絶対値は大きくなる。このことは、タンパク質の低温変性は主に極性基の水和に起因していることを示唆している。

5. アミノ酸置換タンパク質による研究

アミノ酸残基を置換することによって、性質の異なる

個々の残基がタンパク質物性にどのような影響を与えるかを調べることができる。アミノ酸置換タンパク質を用いて、提案されている種々の安定化のメカニズムを証明するための実験がおこなわれている¹⁷⁾。例えば、タンパク質に含まれているSS結合は変性状態の構造エントロピーを減少させることによって安定性を高めていると考えられる。この説に従えば、SS結合の欠如は変性のΔSの増加によってΔGを低下させることになる。しかし、ヒト・リゾチームの4本あるSS結合のうち1本のSS結合を欠いた変異型は理屈通りに熱安定性を低下(ΔGの低下)させたが、ΔSは減少していた。ΔGの低下は、主にエンタルピーの減少によっていることが熱測定によって明らかにされている¹⁸⁾。このエンタルピーの減少は、N状態での置換部位周辺残基の運動性の増加によると説明されている。表1にヒト・リゾチームの一連のIle→Val変異型の変性の熱力学的パラメータを示す¹⁹⁾。同じ性質のアミノ酸置換に関わらず、変異型の変性の熱力学的パラメータが異なっている。変性温度は-1.2から-3.8°Cの範囲で変化している。I56VとI59V変異型を比べると変性温度の変化(ΔΔGも)がほぼ等しいにも関わらず、両変異型のエントロピー変化とエンタルピー変化に大幅な差が見られる。I59Vでは、ΔHの大きな変化はΔSの大きな変化によって相殺されている。その結果、両変異型の安定性はほぼ等しくなっている。ここで調べられている変異型の全ての立体構造が判明している。一連の疎水性残基を置換した変異型の安定性の変化(ΔΔG)は、置換残基の溶媒接触面積に逆比例し、変異によって形成された分子内部の空洞体積の増加に比例すると報告されている²⁰⁾。しかし、ヒト・リゾチームの一連のIle→Val変異型の変性の熱力学的パラメータの変化はその説にしたがわない。一残基置換によって変性の熱力学的パラメータは

表1. ヒト・リゾチームのIle→Val変異型の変性の熱力学的パラメータと置換位置の特性。pH2.7で、野性型の変性温度64.9°Cでの値を基準にしている。ASAはそれぞれの置換位置でIleのN状態での溶媒接触面積比。Cavityは変異型X線結晶解析結果から得られた置換部位で置換によって形成された空洞。

human lysozyme	ΔTd (°C)	ΔΔH (kcal/mol)	TΔΔS (112.4)	ΔΔG (0)	location of Ile	ASA of Ile (%)	cavity (Å ³)
wild-type	(64.9)	(112.4)	(112.4)	(0)			
I23V	-1.2	-2.9	-2.5	-0.4	turn	6.7	34
I56V	-3.8	-1.1	0.1	-1.2	turn	0.4	26
I59V	-3.6	-7.0	-5.9	-1.1	sheet	0.5	76
I89V	-1.8	1.0	1.6	-0.6	loop	2.7	79
I106V	-2.6	-4.9	-4.1	-0.8	turn	8.0	58

著しく変化することは多くの例で知られている。そして、変性の ΔG の変化とアミノ酸残基の特性との関連はいくつかのタンパク質について調べられている²⁰⁾。しかし、変性の ΔH または変性の ΔS と関連させた系統的な研究は少ない。式3-5で分かるように、 ΔH 、 ΔS 、及び ΔG の温度関数は熱測定で実測可能な $\Delta_d H$ 、 $\Delta_d C_p$ 、及び T_d を定数とした関数である。系統的にアミノ酸を置換したタンパク質の熱測定によって得られる変性の各種熱力学的パラメータの変化、立体構造上の置換位置の構造、および置換アミノ酸の性質、これらの間の関連を見きわめるなら、ある構造上にある残基のタンパク質立体構造の安定化に果たす役割について経験則を引き出すことが可能となる。この場合、変異に伴うN状態の構造変化(X線結晶解析で)とD状態の構造変化(NMRなどで)とを関連させて経験則を構築していくのが望ましい。

6. おわりに

タンパク質の折れたたみの基本構造は1000種以下であると推定されている²¹⁾。タンパク質はこの1000種の構造を基本にして、それぞれのタンパク質のアミノ酸配列順序に依存して微調整されて固有の立体構造を形成していると思われる。タンパク質の変性の熱力学もこの基本構造との関連で検証する必要があるがまだそのような試みは行われていない。現状は、熱測定に適した僅かな種類のタンパク質で研究が進んでいるにすぎない。最近では、110°C付近に変性温度を持つ超高度好熱菌からのタンパク質の研究も進められつつある。超高度好熱菌のタンパク質を用いれば、球状タンパク質の変性のエンタルピー値が収斂する110°Cでの実測値が可能となる。色々な特徴を持ったタンパク質及び系統的な変異型タンパク質の熱測定データの蓄積によって、タンパク質立体構造形成の熱力学的基盤を確立することができる。「アミノ酸配列にタンパク質の立体構造に関する情報が如何に書き込まれているか」を解明することはライフサイエンスの重要な課題の一つである²²⁾と見られているが、そのための基礎的で最も重要なデータを提供するのがタンパク質の熱測定であると筆者は考えている。現状ではまだまだその期待には応えていない。

文 献

- 1) Privalov, P. L. and Khechinashvili, N. N. (1974) *J. Mol. Biol.* **86**, 665-684.
- 2) 油谷克英 (1990) 新生物化学実験講座 (日本生化学会編) I. タンパク質 III, 27-35, 東京化学同人, 東京
- 3) Privalov, P. L. and Gill, S. J. (1988) *Adv. Protein Chem.*, **39**, 191-234
- 4) Baldwin R. L. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8069-8072
- 5) Doig, A. J. and Williams, D. H. (1992) *Biochemistry*, **31**, 9371-9375
- 6) Ragone, R., and Colonna, G. (1994) *J. Biol. chem.* **269**, 4047-4049
- 7) Privalov, P. L., Griko, Y. V., Venyaminov, S. Y., and Kutysheiko, V. P., (1986) *J. Mol. Biol.* **190**, 487-498
- 8) Neri, D., Billeter, M., Wider, G. & Wuthrich, K., (1992) *Science* **257**, 1559-1563
- 9) Evance, P. A., Topping, K. D., Woolfson, D. N., & Dobson, C. M. (1991) *Proteins* **9**, 248-266
- 10) Privalov, P. L., Tiktupulo, E. I., Venyaminov, S. Y., Griko, Y. V., Makhatadze, G. I., & Khechinashvili, N. N. (1989) *J. Mol. Biol.* **205**, 737-750
- 11) Sosnick, T. R., & Trewella, J. (1992) *Biochemistry* **31**, 8329-8335
- 12) Ooi, T., Oobatake, M., Nemethy, G., and Sheraga, H. A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3086-3090
- 13) 大島玄久, 大井龍夫 (1991) *Netsu Sokutei*, **18**, 203-204
- 14) Makhatadze, G. I., & Privalov, P. L. (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 639-659
- 15) Privalov, P. L., & Makhatadze, G. I. (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 660-675
- 16) Dill, K. A. (1990) *Biochemistry* **29**, 7133-7155
- 17) 油谷克英 (1994) 蛋白質核酸酵素 **39**, 1017-1027
- 18) Kuroki, R., Inaka, K., Taniyama, Y., Kidokoro, S., Matsushima, M., Kikuchi, M., and Yutani, K. (1992) *Biochemistry* **31**, 8323-8328
- 19) Takano, K., Ogasahara, K., Kaneda, H., Yamagata, Y., Fujii, T., Kanaya, E., Kikuchi, M., Oobatake, M., and Yutani, K. (未発表)
- 20) Matthews, B. W. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 139-160
- 21) Chothia, C. (1992) *Nature* **357**, 543-544.
- 22) Gros, F., and Tocchini-Valentini, G. P. (1994) *Nature* **369**, 11-12