生体高分子の高感度 DSC

生体高分子の熱転移系における断熱型 DSC 装置による典型的な測定例として (1) T4 ファージリゾチームの熱変性と (2) 三重らせん多糖の熱転移をとりあげ、DSC によって得られる熱力学量がどのような性質を有するかについて解説する。バイオテクノロジーの進歩による、その応用面での重要性についても言及する。

北村 進一

Shinichi Kitamura

京都府立大学農学部

1. はじめに

示差走査熱測定 (DSC) は、タンパク質や核酸などの生体高分子の高次構造の熱転移を観測する手段として既に広く用いられているが、今後、バイオテクノロジーの進歩によりその応用面での重要性も増大すると思われる^{1)~3)}。例えば、遺伝子工学などの手法を用いて人工的に調製したタンパク質の熱安定性を評価する手段としてなくてはならないものになるであろう⁴⁾。

水溶液中の生体高分子の熱転移測定では、会合を防ぐためにその溶質濃度をできる限り低くする必要がある。しかしながら、水の比熱容量は非常に大きいので、希薄溶液中の溶質のみの熱容量を正確に評価するためには、断熱温度制御機構をもつ高感度 DSC を用いる必要がある。例えば 1% のタンパク質の比熱は水の比熱より 0.7% 小さいだけである。生体高分子溶液系の測定に適した市販の高感度断熱型 DSC として、

Privalov により開発された DASM-4⁵⁾ (ロシア, Mashprintorg, 日本代理店; (株) 真空理工) と Brandts の設計による MC-2⁶⁾ (米国, MicroCal 社, 日本代理店; (株) シイベルヘグナー) をあげることができる。これらの DSC は、高分子化学の分野で一般に用いられている装置と比較して 100 倍以上の実効感度を有している⁵⁾。

本稿では、生体高分子の DSC における解析の基礎と実際の応用例について解説する。

2. DSC データの解析の基礎

断熱型 DSC では、断熱条件下で、熱量を損失することなく、温度変化に伴う熱容量の変化を直接測定することができる。このことは、測定しようとする生体高分子の熱転移の速度に比較して昇温速度を十分に遅くすれば、転移反応が各温度で熱平衡に達しているとみなすことができ、平衡論に基づく熱力学的解析に耐えるデータを得ることができることを意味している。

熱転移の観測において、分光学的な方法との決定的な違いは、DSC では、真のエンタルピー変化 (Δh_{cal} あるいは ΔH_{cal} で表す) が得られることである。ここで Δh_{cal} の単位は Jg^{-1} , ΔH_{cal} の単位は $Jmol^{-1}$ であり、測定対象物質の分子量を M_w とすると、 $\Delta h_{cal} \cdot M_w = \Delta H_{cal}$ である。さらに DSC カーブの解析から

カット図
DASM-4
セルブロック

北村進一 京都府立大学農学部
(606 京都市左京区下鴨半木町
1-5) 講師, 農博
1975 年京都府立大農芸化学科
卒, 1978 年京大農学部農学研
究科博士後期課程中退。同年より
京都府立大, 1985 年~87 年エ
ール大留学, 専門は糖質, タン
パク質の高次構造と機能, <趣
味>らせん状の物の収集, 釣り

van't Hoff のエンタルピー変化 (ΔH_{vH} ; 単位は Jmol^{-1}) も得られるので, 転移の協同単位 ($\beta = \Delta H_{\text{vH}} / \Delta h_{\text{cal}}$) を求めることができる. β は Zimm と Bragg⁷⁾ の協同パラメーター σ と $\beta = m\sigma^{-1/2}$ の関係にある. ここで m は高分子の繰り返し単位の分子量である.

$\Delta H_{\text{vH}} = \Delta H_{\text{cal}}$ のとき $\beta = M_w$ となり, 転移は二状態モデルで表される. 分子量の小さな球状タンパク質の変性はこの例である. 二状態モデルでは, 転移反応を転移前と後の二つの状態の平衡 $A \rightleftharpoons B$ で記述できると仮定する. 平衡定数を $K = \alpha / (1 - \alpha)$ (ここで α は転移率を表す) とすると転移は van't Hoff の式

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_{\text{vH}}}{RT^2} \quad (1)$$

に従った挙動をする. また温度 T における過剰熱容量 (ピーク部分におけるベースラインとの差) を $C_p(T)$ とすると,

$$C_p(T) = \Delta h_{\text{cal}} \frac{d\alpha}{dT} = \alpha(1 - \alpha) \frac{\Delta H_{\text{vH}} \cdot \Delta h_{\text{cal}}}{RT^2} \quad (2)$$

となる.

$\Delta H_{\text{vH}} < \Delta H_{\text{cal}}$ のとき $\beta < M_w$ となり, 熱転移過程に中間状態が存在することが示唆される. いくつかのドメインからなる分子量の大きなタンパク質の変性や, 核酸あるいは多重らせん多糖などの線状高分子のコンホメーションの熱転移がこの例である. らせん状高分子の場合, 転移の中間体の具体的モデルとして, 分子鎖の内部で部分的にらせんの転移が起こり, らせんの一部がほどけた構造を想定することができる. 一方, $\Delta H_{\text{vH}} > \Delta H_{\text{cal}}$ の場合, 多くの分子が集合体として協同的に構造転移していることを示している. リン脂質二重膜のゲル-液晶転移がこの代表的な例である.

3. 測定例

次に, 測定対象として 1) T4 ファージリゾチームの熱変性^{8)~10)} と 2) 三重らせん多糖 (分岐 (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルカン) のコンホメーションの熱転移^{11), 12)} をとりあげ, 生体高分子の DSC の実際について解説する.

3-1. リゾチームの熱安定性

T4 ファージのリゾチームは 164 個のアミノ酸残基よりなる分子量 18,700 のタンパク質である. B.W. Matthews ら¹³⁾ はタンパク質工学的手法を駆使して特定の位置のアミノ酸を別の各種アミノ酸残基に置き換えた変異型リゾチームを調製した. われわれはそのうちのいくつかの試料について DSC 測定を行い, 熱変性反応に対するアミノ酸置換の効果について検討を加えた^{8)~10)}. ここではその代表的な例として, N 末

図1 T4 ファージリゾチーム (Arg 96 $\rightarrow$ His 変異型) の DSC カーブ pH 2.3 で測定

端より 96 番目のアルギニン残基をヒスチジン残基に置き換えた変異型リゾチーム (Arg 96 $\rightarrow$ His) に対して得られた結果⁹⁾ について示す. 図1はその典型的な DSC カーブである. 31°C を頂点として 15°C から 45°C にかけて変性に伴う吸熱が観察される. 図には同時に二状態モデルに基づいて計算で求めた DSC カーブを示した. 計算カーブと実測カーブはよく一致しており, 転移が二状態モデルで表されることを示している. 吸熱ピークの前後の直線部分は, タンパク質が native 状態と変性状態にあるときの熱容量に対応する. 一般にタンパク質の変性では変性前後で熱容量の差 (ΔC_p) は正の値をとる (図1参照). ΔC_p が温度に依存しないと仮定すると, 任意の温度における $\Delta H_{\text{cal}}(T)$ は

$$\Delta H_{\text{cal}}(T) = \Delta H_{\text{cal}}(T_m) + \Delta C_p(T - T_m) \quad (3)$$

で表される. ここで T_m は $\alpha = 1/2$ のときの変性温度である. 各温度における変性の標準自由エネルギー変化 $\Delta G^\circ(T)$ は Gibbs-Helmholtz 式:

$$\frac{d(\Delta G^\circ(T)/T)}{dT} = -\frac{\Delta H_{\text{cal}}(T)}{T^2} \quad (4)$$

により求めることができる. 図2は pH=2 における変性の $\Delta G^\circ(T)$ を表す. 上に凸の曲線が得られ, $\Delta G^\circ > 0$ の温度範囲でタンパク質は native な状態で安定に存在する. また, $\Delta G^\circ = 0$ の温度で変性がおこる. 23°C のみならず -15°C にこのような温度があることに注目していただきたい. この低温側の変性は低温変性と呼ばれ, 実験的にもいくつかのタンパク質で観察されている^{14), 15)}.

アミノ酸置換による熱安定性の変化は, 野生型と変異型タンパク質の ΔG° の差 $\Delta(\Delta G^\circ)$ で定量化できる. 例えば pH=2 における野生型の変性温度を基準にと

図2 リゾチームの変性の ΔG° の温度依存性
pH=2.0

れば, $\Delta(\Delta G^\circ)$ は図の矢印に対応する. その値は $-16.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ である.

一方で $\Delta(\Delta G^\circ)$ をコンピュータを用いた理論計算で予想する試みがなされている. Tidor と Kurplus¹⁶⁾ は Arg 96 $\rightarrow$ His に対して $\Delta(\Delta G^\circ) = -6.7$ から -8.0 kJ mol^{-1} を得て, われわれの実験値と比較的よく合っているとしている. Thr 157 $\rightarrow$ Val に対しても同様な計算がなされ, $\Delta(\Delta G^\circ) = -8.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ が得られている¹⁷⁾. この値は DSC によって求められた -6.7 kJ mol^{-1} とよく一致している¹⁰⁾. 将来, 理論計算により, $\Delta(\Delta G^\circ)$ が予測できるようになればタンパク質をデザインするうえで重要な手法となりえるが, 理論計算の妥当性の検証のためにもいろいろなタンパク質での $\Delta(\Delta G^\circ)$ の実験値の集積が必要なのは明白である¹⁸⁾.

3-2. 分岐 (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルカンの熱転移

多糖類の溶液状態における熱転移の断熱型 DSC による測定例は少ないが, 新規の微生物生産多糖の発見とその利用の拡大に伴って, 今後この分野における DSC の有用性は増大すると考えられる^{11), 111), 12), 19)}. ここでは, スエヒロタケの生産する分岐 (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルカンであるシゾフィランの水-ジメチルスルホキシド (DMSO) 混合溶媒中における高次構造の熱転移を調べた例¹¹⁾ をあげる.

図3は各種組成の水-DMSO 混合溶液に溶解したシゾフィランの DSC カーブである. いずれの場合も二つの吸熱ピークが観察されるが, 低温側高温側のピークともその転移温度, 吸熱量は, 溶媒の組成によって大きく影響を受けることがわかる. また, 混合溶媒中の, 水の重量分率 W_H が 0.5 以下では, ピークは観察されない. シゾフィランは, 水溶液中で三重らせん構造をとり, DMSO 中では一本鎖ランダムコイルとし

図3 水-DMSO 混合溶媒中におけるシゾフィランの DSC カーブ
 W_H は溶媒中の水の重量分率

て溶解していることがわかっている²⁰⁾. 観察された二つの熱転移は, シゾフィランの高次構造の変化に伴うものである. すなわち, 低温側におけるピークは, 三重らせんの外側に秩序だって並んでいた側鎖の配向性が溶媒和の変化によって無秩序となったこと^{21), 22)} によるものと考えられ, 高温側のピークは, 三重らせんが一本鎖ランダムコイルへと転移²³⁾ したことによるものと考えられる.

転移温度を混合溶媒の水の重量分率に対してプロットすればシゾフィランの高次構造に関する“相図”が得られる (図4). すなわち, シゾフィランの高次構造は, 温度, 溶媒組成によって三重らせん I, 三重らせん II, 一本鎖ランダムコイルの三つのコンホメーションをとる.

他の分岐 (1 $\rightarrow$ 3)-グルカンでも同様に二つの転移ピークが観察されたが, その転移温度, エンタルピーはそれぞれの試料で異なっていた¹²⁾. $W_H = 0.16$ における両転移の転移温度を分岐度に対してプロットすると, 明確な正の相関関係が認められ, 側鎖グルコース残基の増大に伴い三重らせん構造が安定することが示された.

シゾフィランの多重らせん構造の熱転移挙動は, 核酸, コラーゲンなどの鎖状生体高分子の場合と同様な方法によって解析できる. 低温側のピークは, 適当な

図 4 シンビオランの水-DMSO 混合溶媒中におけるコンホメーション

転移の協同単位 β を仮定したとき、van't Hoff 式に基づいた分子鎖の解離を伴わない二状態転移モデルでよくシミュレートできる。この場合、 β は溶媒組成に依存したが、常に分子量よりも小さな値であった。高温側のピークは、三重らせんの溶解に伴う吸熱であるが、分子鎖の解離を伴う最も単純なモデル $A_3 \rightleftharpoons 3B$ に基づき解析することはできない。なぜならば、転移温度は分子量依存性を示したので DSC カーブは単分散試料の場合に比較して広幅化しており、また解離は完全な可逆反応ではないからである。さらに三重らせんの融解の過程での再結合、すなわち中間体の存在を考慮する必要がある。これらは、多重らせん構造を有する生体高分子の構造転移に共通の問題である。

4. おわりに

ここではタンパク質と多糖の二つの研究例のみについて示したが、他の生体関連物質、特に核酸や生体膜の高次構造解析としても DSC はよく利用されている。また最近ではタンパク質とリガンドの相互作用、生体高分子集合体、脂質二重膜と薬剤の相互作用、オルガネラなど、より複雑な系にも高感度 DSC は使われ始めている。このように生体系の DSC は多様であり、それぞれの対象によって使われ方も違い、また得られる情報も特徴のあるものとなっている²⁴⁾。

また DSC カーブの解析法、特に、カーブをその成分に分割する deconvolution 法 (カーブリゾリューションと呼ばれることもある) についてはふれなかったが、今後 DSC カーブの定量的な解析法として重要な位置を占めると思われる^{1)~3), 25)}。

文 献

- 1) J.M. Sturtevant: *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **38**, 463 (1989)
- 2) 深田はるみ: 実験化学講座, 第 4 版, 4, 熱・圧力, 日本化学会編, 丸善 (1992) p330
- 2) 高橋克忠: 新版熱分析, 神戸博太郎, 小澤丈夫編, 講談社サイエンティフィク (1992) p233
- 4) 田中晶善, 北村進一: 生物物理, **32**, 110 (1992)
- 5) P.L. Privalov: *Methods Enzymol.*, **131**, 5 (1986)
- 6) K.S. Krishnan, J.F. Brandts: *Methods Enzymol.*, **49**, 3 (1978)
- 7) B.H. Zimm, J.K. Bragg: *J. Chem. Phys.*, **31**, 526 (1959)
- 8) S. Kitamura, J.M. Sturtevant: *Biochemistry*, **28**, 3788 (1989)
- 9) P. Connolly, L. Ghosaini, C. Hu, S. Kitamura, A. Tanaka, J.M. Sturtevant: *Biochemistry*, **30**, 1887 (1991)
- 10) C. Hu, S. Kitamura, A. Tanaka, J.M. Sturtevant: *Biochemistry*, **31**, 1643 (1992)
- 11) S. Kitamura, T. Kuge: *Biopolymers*, **28**, 639 (1989)
- 12) S. Kitamura, M. Ozasa, H. Tokioka, C. Hara, S. Ukai, T. Kuge: *Thermochimica Acta*, **163**, 89 (1990)
- 13) B.W. Matthews: *Biochemistry*, **26**, 6885 (1987)
- 14) P.L. Privalov, Yu. V. Griko, S. Yu. Venyaminov, V. P. Kutysenko: *J. Mol. Biol.*, **190**, 487 (1986)
- 15) A. Tamura, K. Kimura, H. Takahara, K. Akasaka: *Biochemistry*, 11307 (1991)
- 16) B. Tidor, M. Karplus: *Biochemistry*, **30**, 3217 (1991)
- 17) L.X. Dang, K.M. Merz, P.A. Kollman: *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8505 (1989)
- 18) 高橋克忠, 城所俊一, 油谷克英, 次田 皓: 生物物理, **31**, 50 (1991)
- 19) S. Kitamura, K. Takeo, T. Kuge, B.T. Stokke: *Biopolymers*, **31**, 1243 (1991)
- 20) T. Norisuye, T. Yanaki, H. Fujita: *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **18**, 547 (1980)
- 21) T. Hirao, T. Sato, A. Teramoto, T. Matsuo, H. Suga: *Biopolymers*, **29**, 1867 (1990)
- 22) T. Ito, A. Teramoto, T. Matsuo, H. Suga: *Macromolecules*, **18**, 1234 (1986)
- 23) T. Yanaki, K. Tabata, T. Kojima: *Carbohydr. Polym.*, **5**, 275 (1985)
- 24) 新熱分析の基礎と応用, 日本熱測定学会編, リアライズ社 (1997)
- 25) 城所俊一: 熱測定, **14**, 143 (1987)