


 解説

## タンパク質機能に重要な構造変化の熱力学解析

織田昌幸

(受取日：2006年11月15日，受理日：2006年12月31日)

## Thermodynamic Analysis of Conformational Change Important to Protein Function

Masayuki Oda

(Received November 15, 2006; Accepted December 31, 2006)

In the present post-genome era, although many three-dimensional structures of proteins have been determined at atomic resolution mainly by X-ray structural analysis, there remain some problems, such as dynamic properties of proteins and hydration effects, to clarify the correlation between protein structure and function. Proteins are flexible and need some conformational changes to recognize other molecules, but it is difficult to detect the dynamic properties only by static structural analyses. Thermodynamic analyses of biomolecular interactions reveal details of the energetic and dynamic features of molecular recognition processes, and complement the structural information. I have investigated several biomolecular interactions, including DNA-protein, antigen-antibody, and peptide-protein interactions, using isothermal titration and differential scanning calorimetry, together with other methods, such as NMR, X-ray, and surface plasmon resonance. Here, I focus on the thermodynamics to detect conformational changes of proteins, which is important for biomolecular function in general.

## 1. はじめに

生命科学分野では、タンパク質をはじめとする生体分子の構造と機能との相関解明が重要な研究課題となっている。その中でも特に溶液中で機能するタンパク質の構造的揺らぎの解明は重要で、構造から機能を知る上で必要不可欠な知見である。タンパク質構造におけるダイナミクスの寄与は、X線結晶解析をはじめとする既存の立体構造解析手法では捉えにくい情報で、熱力学解析や速度論解析などを併用し、解明する必要がある。特に熱力学解析で得られるエントロピー量は、タンパク質の柔らかさや水和の程度を示す極めて重要な知見となりえる。筆者らはこれまで、DNA結合タンパク質、抗体、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC)

タンパク質、酵素など、種々のタンパク質を対象として、多角的にタンパク質の構造機能解析を行ってきた。NMRやX線結晶解析による立体構造解析、示差走査型熱量計 (DSC) や等温滴定型熱量計 (ITC) による熱力学解析、ストップフロー法や表面プラズモン共鳴バイオセンサーによる速度論解析などにより、タンパク質が相手を如何に認識し機能するか、その時にタンパク質の柔らかさが如何に関与するか、といった問題の解明を目指している。本解説では、タンパク質の立体構造変化がその分子認識に重要な役割を果たしている例を取り上げ、熱力学解析結果とその意義に焦点をあてて紹介したい。

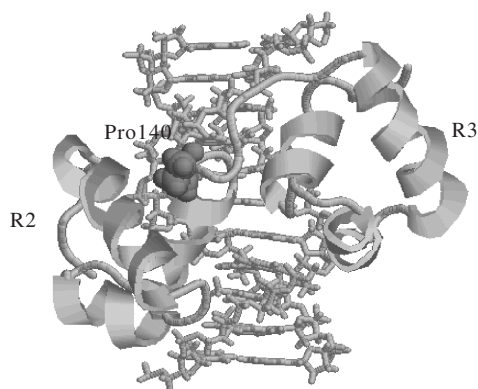
## 2. 転写因子c-MybのDNA認識機構と構造変化

転写因子c-Mybは分子量約70 kで、N末端側にDNA結合領域を、C末端側に転写調節領域を有している。DNA結合領域には、約50アミノ酸残基からなる三つの繰り返し配列(R1, R2, R3)があり、このうちDNAとの特異的結合にはR2とR3が必須である。筆者らはこのR2R3と、特異的塩基配列((C/T)AAC(G/T)G)を含むDNA(MBS-I)、及びそれぞれの変異体を調製し、各相互作用を主にITCで測定し解析した。一般的にタンパク質とDNAとの相互作用は、DNAのリン酸基由来の負の電荷とタンパク質の塩基性アミノ酸の正の電荷との引力により、解離定数にして $\mu\text{M}$ 程度の結合が生じ、さらにDNA塩基配列特異的である場合には特定の塩基とアミノ酸の間で水素結合や疎水結合などにより、解離定数にして $\text{nM}$ 程度の強い結合が生じるものと考えられる。生物学的にみた「特異的DNA認識」とは特定のDNA塩基配列だけを他の配列よりも「排他的」に認識し強く結合することで、「非特異的DNA認識」とは「特異的DNA認識」以外の全ての現象を指していると思われる。これらを生命現象の制御といった生体内での「特異性」として捉える場合、その観測方法にかかってくる現象論的なものになりがちである。例えばあるタンパク質と、特定の塩基配列をもつDNAとの間に「排他的」な結合が起こる場合でもその結合が弱いと、他の塩基性の強いタンパク質が「非特異的結合」でも同程度の解離定数を持てしまえば、実際には「排他的」な結合も「特異的」にはならない。実際に本研究で用いた各種変異体解析の結果からも、結合は弱いものの「排他性」が残っている相互作用が存在した。筆者らは熱力学的解析を行うことで、特にこれまで現象論的に「非特異的認識」として一つに考えられていた認識形態においても、個々の塩基配列を弱いながらも識別しうるような「排他的」な認識の存在が確認できることを示した。<sup>1)</sup> すなわち「非選択的」な「非特異的DNA認識」を、「選択的」な「特異的DNA認識」から、次の観点で識別できることを提案した。① エントロピー変化( $\Delta S^\circ$ )が相対的に正側の値になる。② エンタルピー変化( $\Delta H$ )が必ずしもゼロになる必要はないが、ゼロか小さな負の値になる。③  $\Delta H$ のイオン強度依存性が高い。④ 比熱変化( $\Delta C_p$ )がゼロか小さな負の値になる。さらに速度論解析結果<sup>2)</sup>とあわせて、「非特異的DNA認識」から「特異的DNA認識」にいたる過程を整理し、Table 1にまとめる特徴を提案した。これらは一般論としても、DNAとタンパク質との相互作用に適用できるものと考えている。

c-Myb R2R3のDNA認識機構の特徴として、NMRによる立体構造解析から、R2とR3が協同的に特異的DNA認識に関与することが挙げられる(Fig.1)。<sup>3)</sup> そこでこのR2

**Table 1** Proposed mechanism of the protein-DNA interaction with the characteristic features of thermodynamics and kinetics.

| <i>Non-specific binding</i>                                  | <i>Specific binding</i>                                    |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| lower affinity binding                                       | higher affinity binding                                    |
| long-range electrostatics                                    | specific hydrogen bonds and van der Waals contacts         |
| entropy driven                                               | enthalpy driven                                            |
| higher sensitivity of $\Delta H$ against the ionic strength  | lower sensitivity of $\Delta H$ against the ionic strength |
| smaller negative $\Delta C_p$                                | larger negative $\Delta C_p$                               |
| faster dissociation rates                                    | slower dissociation rates                                  |
| <i>Both non-specific and specific bindings</i>               |                                                            |
| conformational change of the protein and the DNA (if needed) |                                                            |
| hydration and released cations                               |                                                            |



**Fig.1** The DNA-complexed structure of c-Myb R2R3 (PDB code, 1MSE). The DNA double strands are shown by stick models. The backbone of R2R3 is shown by ribbon models, and the residue Pro140 is indicated by spacefill models.

とR3をつなぐリンカーの役割を明らかにすべく、リンカー部分にある3残基(N139, P140, E141)をGlyまたはAlaで置換し、各変異体とMBS-Iとの結合の熱力学量を野生型と比較した。その結果、N139G, P140G, P140A各変異体で、MBS-Iに対して明らかに結合親和性が低下し、その熱力学的寄与は、N139G変異体では $\Delta H$ の増大、P140G, P140A各変異体では $\Delta S^\circ$ の減少によることが明らかになった(Table 2)。前者のN139G変異体では近紫外円二色性スペクトルにも変化が認められ、立体構造上も139位が、疎水性コア形成に関与するR2内部のW134との距離が近いことから、同アミノ酸置換によりR2内部に構造変化が生じ、親和性が低下するものと考えられる。またN139A変異体では結合親和性の低下がほとんど認められないことから、139

**Table 2** Thermodynamic parameters of c-Myb R2R3 mutants binding to cognate DNA, MBS-I, at 20 °C.

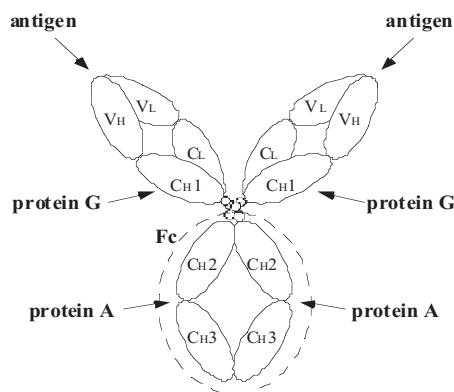
| protein   | <i>n</i> | $K_a / M^{-1}$    | $\Delta G^\circ / kJ mol^{-1}$ | $\Delta H / kJ mol^{-1}$ | $T\Delta S^\circ / kJ mol^{-1}$ | $\Delta C_p / kJ mol^{-1} K^{-1}$ |
|-----------|----------|-------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| wild-type | 1.01     | $2.0 \times 10^7$ | -50.7                          | -52.3                    | -1.6                            | -2.6                              |
| N139G     | 1.00     | $3.3 \times 10^6$ | -46.5                          | -47.3                    | -0.8                            | -2.5                              |
| N139A     | 0.99     | $1.3 \times 10^7$ | -49.9                          | -52.0                    | -2.1                            | -2.3                              |
| P140G     | 0.99     | $3.3 \times 10^6$ | -46.5                          | -52.0                    | -5.5                            | -2.6                              |
| P140A     | 1.01     | $3.9 \times 10^6$ | -46.9                          | -51.5                    | -4.6                            | -2.4                              |
| E141G     | 1.01     | $1.1 \times 10^7$ | -49.4                          | -48.2                    | 1.2                             | -2.7                              |
| E141A     | 1.00     | $2.1 \times 10^7$ | -51.1                          | -49.9                    | 1.2                             | -2.6                              |

The *n* value represents binding stoichiometry of DNA to protein.

位のアミノ酸はβ位のメチル基までがR2の疎水性コア形成に必須であることが示唆された。一方P140置換体での親和性の低下が $\Delta S^\circ$ の減少に起因することは、DNAと結合していない状態でのタンパク質側のエントロピーの増加によるものと考えられる。すなわちリンカー部分もDNA結合状態ではある定まった構造をとるが、非結合状態では140位にPro残基があることで自由度が抑えられ、結果として結合の自由エネルギー変化( $\Delta G$ )を減少させるということである。これをタンパク質フォールディングの問題から見ると、Pro残基の導入やGly残基の変異により、変性状態のエントロピーを下げて変性状態を不安定化し、タンパク質を安定化する(やはり5 kJ mol<sup>-1</sup>ほど)という概念とも良く一致する。<sup>4)</sup> タンパク質がDNAと結合することである定まった構造をとる(ある場合は特定の二次構造まで形成される)という現象は、「ローカル・フォールディング」と呼ばれ、<sup>5)</sup> 特異的DNA認識において重要な役割を果たしていることが、本結果からも熱力学的に証明された。

### 3. 抗体の抗原認識機構と構造変化

IgG抗体は二つの異なるポリペプチド鎖からなる分子量約150 kのタンパク質で、2箇所の抗原結合部位をもつ(Fig.2)。生体内では免疫後経時的に、あるいは免疫の繰り返しによって、同一個体が産生する抗体の抗原結合親和性が高くなる「親和性成熟」という現象が知られている。これら各抗体の抗原認識機構の変化は極めて興味深く、高親和性抗体の創製といったラショナルデザインにも役立つことが期待される。筆者らはハプテン抗原の一つである(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetic acid (NP) に対する一連の抗NPモノクローナル抗体の抗原認識機構解析を行っている。その研究の一つとして、抗体進化の方向性を熱力学的、および速度論的に解析した。アミノ酸配列から明らかに同一クローンから派生したと考えられる4種類の抗NP抗体(9T7, 9T8, 9T10, 9T13)の各抗原認識機構について、ITCによる熱力学解析と表面プラズモン共鳴バイオセンサーに



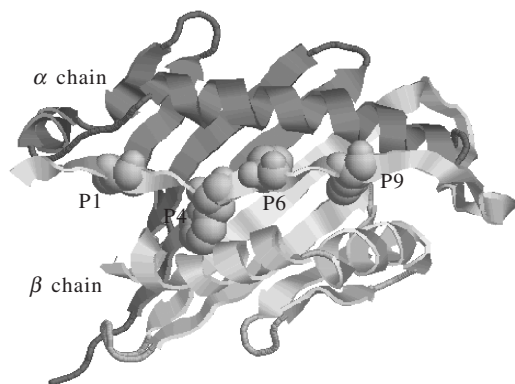
**Fig.2** Schematic diagram of interactions between mouse IgG1 and antigen, streptococcal protein G or staphylococcal protein A.

よる速度論解析を行ったところ、親和性成熟に伴い、熱力学的には $\Delta S^\circ$ を増加する方向へ、速度論的には結合速度定数( $k_{on}$ )、解離速度定数( $k_{off}$ )ともに減少する方向へ変化していることが明らかになった。<sup>6)</sup> これは親和性成熟過程において、抗原認識機構が「ジッパー」型から「鍵と鍵穴」型へ変化することを示唆しており、生物学的事実とあわせて次のように解釈できる。成熟前の抗体は、限られたレパートリーで多種多様の抗原と結合する必要がある、弱いながらも特異性の広い抗体が求められる。その結果、特定の抗原に対しては、構造変化を伴う「ジッパー」のように抗原に結合し適応するため、結合前後での $\Delta S^\circ$ が大きくなる。一方、成熟した抗体は、ある特定の抗原に対して強く結合できるよう進化するため、「鍵と鍵穴」的に抗原を認識できる構造をもち、結合前後での $\Delta S^\circ$ が小さくなると解釈できる。これら各抗体の立体構造上の違いは、円二色性分散計では検出されなかったことから、極めて微視的な、あるいは動的な構造の違いであり、その程度の違いが異なる抗原認識に寄与するものと考えられる。また各抗体(9T7, 9T8,

9T10, 9T13) では、体細胞突然変異により親和性が増大しているが、アミノ酸置換された各部位を眺めると、抗原と直接相互作用する部位だけでなく、その外側にも多く分布している。これら各部位でのアミノ酸置換が、全体として抗原結合部位の構造や、抗体そのものの安定性に寄与しているものと考えられる。同様のアミノ酸置換は他の抗体でも認められ、これら抗原結合部位から離れた残基の役割を明らかにしていくことは、抗体のラショナルデザインなど今後の応用研究にも大きく貢献するものと考えられる。<sup>7)</sup>

抗体は複数の抗原結合部位 (例えばIgG抗体では2箇所、IgM抗体では10箇所) を持ち、特に抗原価が複数の多価抗原に対しては、各抗原結合部位が同時に結合することで、見かけ上の結合親和性が増大する。このアビディティの寄与は、各抗原結合部位の親和性や可動範囲、抗原の大きさや抗原価、抗原エピトープの分布密度などに影響される。筆者らは、ハブテンであるNPを異なる価数で、大きさの異なる種々のタンパク質に結合させたものを抗原として調製し、これら各抗原と、親和性の異なる抗NPモノクローナル抗体との相互作用解析から、アビディティと抗原価をはじめとする上記各因子との相関を明らかにした。<sup>8,9)</sup> また最近では、抗原・抗体間相互作用に、超遠心分析や質量分析などを適用し、各手法の有効性の証明や特徴づけも行っている。<sup>10)</sup> 熱力学解析や速度論解析を含めて、それぞれの測定手法に利点があり、ポストゲノムにおける今後の構造機能解析にますます応用利用されるものと考えられる。

細胞上での抗体は抗原と結合した情報を細胞内へ伝える受容体としての機能も有する。この細胞内シグナル伝達機構に関しては、抗体の構造変化の必要性が長年にわたり議論されているが、未解明な点が多い。例えば種々の立体構造解析結果も、抗原結合に伴う構造変化が認められる報告がある一方、ほとんど構造変化が認められない場合も報告されている。これらの結果は、抗原結合に伴う構造変化は非常に小さく誘起される、あるいは抗体の自由度に変化が生じるなど、既存の解析手法では検出が難しいことを示唆する。筆者らは、以上の問題を別のアプローチから解決すべく、抗体の定常領域に結合するタンパク質 (ブドウ球菌由来のプロテインAや連鎖球菌由来のプロテインG) をプローブとして (Fig.2)、抗原結合による影響を解析した。すなわち抗体とプロテインAやプロテインGとの相互作用解析を、抗原の存在下、非存在下それぞれで行ったところ、抗原存在下での結合親和性が明らかに低下した。<sup>11,12)</sup> これらの結果は、抗原結合に伴い抗体の構造に何らかの変化が起り、プロテインAやプロテインGとの結合モードが変化すると解釈できる。特にプロテインAは抗体Fc部分に結合することから、自由度の高い抗体ヒンジ部を超えて、比較的長距離にまで構造変化が波及することを示唆し、細胞



**Fig.3** Structure of Hb peptide covalently bound to I-E<sup>k</sup> (PDB code, 1IEA). I-E<sup>k</sup>  $\alpha$  and  $\beta$  chains are shown by ribbon models, and the anchor residues of Hb peptide, Ile (P1), Phe (P4), Glu (P6), and Lys (P9), are indicated by spacefill models.

内シグナル伝達に関与することを想起させる。抗体を介したシグナル伝達に関して、多価抗原結合により細胞上の複数の抗体が架橋される必要性が報告されているが、これだけではタンパク質抗原をはじめとする単価抗原結合に伴う免疫応答現象は説明できない。ごく最近、タンパク質抗原としてのリゾチーム、およびそのオリゴマーによる細胞活性化の事例が報告された。<sup>13)</sup> これらのうち少なくとも単価抗原結合に伴うシグナル伝達には、抗体の構造変化の関与が必要と考えられるが、筆者らは抗原結合の強弱やアビディティと抗体構造変化とが相関する可能性を検討すべく、研究を進めている。

#### 4. MHC class II のペプチド認識機構と構造変化

MHC class II 分子は、二つのポリペプチド鎖からなり、細胞内小胞に取り込まれたタンパク質抗原由来のペプチドに結合し、これをT細胞に抗原提示する。その立体構造は逆並行 $\beta$ シート上に2本の $\alpha$ ヘリックスが位置し、これら2本の $\alpha$ ヘリックス間に抗原由来ペプチドの収容溝が形成されている (Fig.3)。生体内で新しく合成されたMHC class II 分子は、MHC class II 関連インバリエント鎖由来ペプチド (CLIP) と結合しており、これが酸性pHの小胞内で、CLIPから抗原由来ペプチドに交換し、細胞表面に出て抗原提示する。この立体構造上で特筆すべき点は、抗原由来ペプチドがMHC class II の分子構造の一部として不可欠であり、ペプチドが結合していない状態では安定性を失うことが挙げられる。研究試料として、MHC class II をペプチド非結合状態で調製することが極めて困難であることも、その表れである。筆者らは、マウスMHC class II の一つI-E<sup>k</sup> 分子を対象として、ヘモグロビン (Hb) 由来のペプチド

**Table 3** Thermodynamic parameters for denaturation of I-E<sup>k</sup>-Hb at the denaturation temperature at pH 5.5.

| pH  | $T_d$ / °C | $\Delta T_d$ / °C | $\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup> | $\Delta H$ / kJ mol <sup>-1</sup> | $T\Delta S$ / kJ mol <sup>-1</sup> |
|-----|------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 5.5 | 75.4       |                   | 0                                 | 723                               | 723                                |
| 7.4 | 67.2       | -8.2              | -11                               | 874                               | 885                                |

を、I-E<sup>k</sup>  $\beta$ 鎖のN端側にリンカーを介してつなげたものを発現、精製し、試料とした。<sup>14)</sup> 同分子を含めていくつかのMHC class IIとペプチドとの複合体の結晶構造が報告されているが、<sup>15,16)</sup> 特に酸性条件下でペプチド交換する機構については静的な立体構造情報では説明できなかった。そこで筆者らは、結合しているペプチドがMHC class IIの安定性に影響することを利用して、I-E<sup>k</sup>とHb、及びそのアミノ酸置換Hbペプチドとの複合体の熱安定性を主にDSCを用いて解析し、酸性pHの必要性を検討した。<sup>17-19)</sup> その結果、いずれのペプチド複合体においても、酸性pHでの変性温度( $T_d$ )が中性pHよりも高かった。さらに熱変性に伴う $\Delta H$ と $T_d$ との相関をみると、明らかに酸性領域(pH 5.0~6.0)と中性領域(pH 6.5~8.0)にグループ分けすることでき、酸性領域での構造的特徴が中性領域のそれとは異なることが示唆された。I-E<sup>k</sup>とHb複合体の $\Delta H$ と $T_d$ との相関関係から求められる $\Delta C_p$ は、酸性領域で11.1 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>、中性領域で15.9 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>であった。次にこの $\Delta C_p$ 値を用いて、同じ温度での酸性pHと中性pHの変性に伴う熱力学量を算出したところ、酸性pHでは中性pHに比べてエントロピー的に安定化されていることが明らかになった(**Table 3**)。 $\Delta C_p$ が酸性pHで相対的に小さな値である結果とあわせて考察すると、MHC class II分子は酸性pH条件下で中性pH条件下よりも相対的に揺らいだ「オープン構造」をとっており、これが酸性小胞内でペプチド交換するという機能を良く説明できる。

MHC class IIと抗原ペプチドとの特異的結合は、ペプチドのアンカー残基と、対応するMHCの結合ポケット(P1, P4, P6, P9)との組み合わせで説明付けられる。筆者らはCLIPと抗原由来ペプチドとの交換反応、すなわち両ペプチドとの相互作用の違いを明らかにすべく、マウスMHC class II分子I-A<sup>b</sup>を対象として、各複合体の熱安定性を解析した。<sup>20)</sup> 上記I-E<sup>k</sup>と同様に、I-A<sup>b</sup>とペプチドとの複合体においても、酸性pHでより安定であり、さらにいずれのpH領域においても、抗原ペプチドとの複合体の熱安定性がCLIPとの複合体よりも高く、両ペプチド共存下では平衡論的に抗原ペプチドに交換されることが示唆された。またCLIPのP1ポケットに結合するアンカー残基Metを、抗原ペプチドの対応する残基Pheに置換したところ、そのI-A<sup>b</sup>複合体の熱安定性は抗原ペプチドと同程度にまで上昇し、このP1部位の寄与が極めて大きいことが明らかになった。

その後のI-A<sup>b</sup>-CLIP複合体の結晶構造解析結果<sup>16)</sup>でも、ペプチド全体の結合モードは抗原ペプチドと変わりなく、局所的な違いが、ダイナミクスを含めた構造上の特徴を決定し、生物学的にも重要な機能に反映されていることが示唆された。さらにI-E<sup>k</sup>と各種アミノ酸置換Hbペプチドとの複合体の熱安定性解析結果においても、抗原ペプチドのアミノ酸配列の違いが複合体に限定的ながら微小な構造変化を生じさせることが明らかになった。<sup>19)</sup> T細胞受容体は、MHC class II上の抗原ペプチドの違いによる微小な変化を識別し、異なるシグナルを伝えるものと考えられる。

## 5. おわりに

以上、これまで種々の分子間相互作用に熱測定を適用し、既存の立体構造解析だけでは得られない微小な構造変化や揺らぎの寄与に関する情報を取得し、タンパク質の機能解明に重要な知見を得てきた。研究を進めながら、改めてタンパク質の「柔らかさ」という難題を思い知らされ、構造から機能へ進む上で明らかにしていかなければならない重要課題であると再認識させられる。日々蓄積されつつある原子レベルでの立体構造情報は極めて有用な知見を与えるが、これらはあくまで揺らいでいるタンパク質立体構造のスナップショットにすぎない。一例として、ある抗体の結晶構造は一つの立体構造を呈するが、<sup>21)</sup> これを電子顕微鏡トモグラフィーにより1分子ごとに観察すると、FcやFabの各アーム部分が多様な角度をとって存在していることが見てとれる。<sup>22)</sup> タンパク質分子は溶液中で多様な立体構造間を揺らいで存在しており、他分子との相互作用時にはある特定の構造に収束したり、ある場合にはローカル・フォールディングを含めた立体構造変化が誘起されたり、またある場合には動的移動範囲が変化することもありうるであろう。その結果として、個々のタンパク質の機能が発現されるという精巧なメカニズムが存在する。本解説で述べてきた例を含めて、タンパク質の一連の構造変化は、既存の解析手法で捉えられるものもあるが、特にダイナミクスを含めた微小な変化は観測そのものが難しく、現段階では溶液中での情報を熱力学や速度論なども駆使して、多角的に解析する必要がある。ポストゲノムとして「タンパク質の構造から機能へ」という重要課題を明らかにしていく上で、タンパク質の自由度や微小な構造変化の検出は、測定手法の開発とあわせて今後のデータの蓄積が待たれるところで

ある。タンパク質科学分野において熱測定が有用な基礎情報を与えることは言うまでもないが、さらに立体構造情報との定量的評価法の確立や、溶液中で機能するタンパク質にとって重要な水分子の寄与の解明などが今後ますます求められる。筆者も引き続きタンパク質の熱力学解析を行い、タンパク質全般、ひいては生命科学現象に通じるタンパク質の構造機能解明に貢献したいと考えている。

## 謝 辞

一連の上記研究は、主に生物分子工学研究所と東京理科大学にて行い、中村春木博士（大阪大学）、東 隆親博士（東京理科大学）はじめ、多くの共同研究者や大学院生の方々と共同研究の賜物である。最後に記して謝意を表したい。

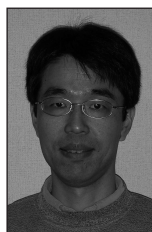
## 文 献

- 1) M. Oda, K. Furukawa, K. Ogata, A. Sarai, and H. Nakamura, *J. Mol. Biol.* **276**, 571 (1998).
- 2) M. Oda, K. Furukawa, A. Sarai, and H. Nakamura, *FEBS Lett.* **454**, 288 (1999).
- 3) K. Ogata, S. Morikawa, H. Nakamura, A. Sekikawa, T. Inoue, H. Kanai, A. Sarai, S. Ishii, and Y. Nishimura, *Cell* **79**, 639 (1994).
- 4) B. W. Matthews, H. Nicholson, and W. J. Becktel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6663 (1987).
- 5) R. S. Spolar and M. T. Record, *Science* **263**, 777 (1994).
- 6) T. Sagawa, M. Oda, M. Ishimura, K. Furukawa, and T. Azuma, *Mol. Immunol.* **39**, 801 (2003).
- 7) E. T. Boder, K. S. Midelfort, and K. D. Wittrup, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10701 (2000).
- 8) M. Oda and T. Azuma, *Mol. Immunol.* **37**, 1111 (2000).
- 9) T. Tobita, M. Oda, and T. Azuma, *Mol. Immunol.* **40**, 803 (2004).
- 10) M. Oda, S. Uchiyama, C. V. Robinson, K. Fukui, Y. Kobayashi, and T. Azuma, *FEBS J.* **273**, 1476 (2006).
- 11) M. Oda, H. Morii, H. Kozono, and T. Azuma, *Int. Immunol.* **15**, 417 (2003).
- 12) T. Sagawa, M. Oda, H. Morii, H. Takizawa, H. Kozono, and T. Azuma, *Mol. Immunol.* **42**, 9 (2005).
- 13) Y. -M. Kim, J. Y. Pan, G. A. Korbel, V. Peperzak, M. Boes, and H. L. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3327 (2006).
- 14) H. Kozono, J. White, J. Clements, P. Marrack, and J. Kappler, *Nature* **369**, 151 (1994).

- 15) D. H. Fremont, W. A. Hendrickson, P. Marrack, and J. Kappler, *Science* **272**, 1001 (1996).
- 16) Y. Zhu, A. Y. Rudensky, A. L. Corper, L. Teyton, and I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **326**, 1157 (2003).
- 17) K. Saito, A. Sarai, M. Oda, T. Azuma, and H. Kozono, *J. Biol. Chem.* **278**, 14732 (2003).
- 18) K. Saito, M. Oda, A. Sarai, T. Azuma, and H. Kozono, *Micro. Immunol.* **48**, 53 (2004).
- 19) K. Saito, M. Oda, A. Sarai, T. Azuma, and H. Kozono, *Biochemistry* **43**, 10186 (2004).
- 20) T. Tobita, M. Oda, H. Morii, M. Kuroda, A. Yoshino, T. Azuma, and H. Kozono, *Immunol. Lett.* **85**, 47 (2003).
- 21) L. J. Harris, S. B. Larson, E. Skaletsky, and A. McPherson, *Immunol. Rev.* **163**, 35 (1998).
- 22) L. Bongini, D. Fanelli, F. Piazza, P. De Los Rios, S. Sandin, and U. Skoglund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6466 (2004).

## 要 旨

ポストゲノム時代において、タンパク質の立体構造からの機能解明が重要課題となっている。現在、X線結晶構造解析などにより多くのタンパク質の立体構造が原子レベルで決定されているが、機能発現におけるタンパク質の動的構造や水和の寄与など、未解明かつ明らかにすべき問題も多く残されている。タンパク質は柔らかな分子であり、他分子との相互作用時には構造変化を伴う場合もある。これらの問題解明に向けて熱力学解析は重要な情報を与え、既存の立体構造情報を相補しうる。筆者はこれまでにDNA-タンパク質、抗原-抗体、ペプチド-タンパク質といった種々の生体分子間相互作用を、ITCやDSCといった熱測定を利用して解析し、タンパク質の構造機能解明に取り組んできた。本解説では、タンパク質の機能発現にその立体構造変化が重要な役割を果たしている事例を取り上げ、各熱力学解析結果がどのような有用情報を与えるか、その概要を紹介した。



織田昌幸 Masayuki Oda  
京都府立大学大学院農学研究科, Graduate School of Agriculture, Kyoto Prefectural Univ., TEL&FAX. 075-703-5673, e-mail: oda@kpu.ac.jp  
研究テーマ：タンパク質科学  
趣味：スポーツ観戦、旅行