

## 生体高分子の高次構造の熱変性

馬場 義博\*, 影本 彰弘\*

一般に生体高分子と称せられる核酸、タン白質は溶液中で高次構造を形成し、その構造が生物機能と密接な関係にある。また、この構造は温度、pH、イオン強度などの環境パラメーターの変化によって変性することが知られている。この高次構造の安定化の要因の知見を得るには、二つの方法が考えられる。その一つは、直接その変性機構を解明すること、他は、核酸、タン白質のモデル物質の変性機構を解明することである。後者に関して、たとえば、デオキシリボ核酸は側鎖にアデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)と四つの塩基からなる一種の copolymer と考えられ、これをより単純化したモデル分子である合成ポリヌクレオチドとしての Poly A の二本鎖 helix 構造、Poly (A + U) の二本鎖 helix 構造さらに Poly (A + 2U) の三本鎖 helix 構造などの変性機構を知ることにより、より複雑な DNA 分子の高次構造の安定化の要因を知る一つの手がかりを与えるものと思われる。

さて、この生体高分子の高次構造の研究について、一般的に、UV スペクトル、円偏光二色性、旋光分散などの分光学的手段がもちいられ、多くの報文に接する。しかし、基礎的データである高次構造の変性する際のエネルギーについて、直接の熱量測定は非常に少ない。これは、溶液の温度変化にともなう熱量測定がまだ充分確立されていないという実験的困難さに起因するものであろう。高次構造の変性エネルギーについては、二、三の研究者によって測定されているが、まだまだ充分な基礎的データの集積がなされていないのが現状である。

われわれの研究室では、生体高分子の高次構造を解明する一方法として、変性の熱量測定、および分光学的な手段より、その高次構造の安定化の要因を得、さらに、構造と生物機能との関連を追求している。まだ充分な成果といえないが二、三の研究例を紹介しよう。

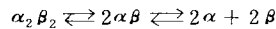
### ◎ 結果と簡単なコメント

#### 1) 球状タン白質の構造変化

球状タン白質として、赤血球中で酸素を吸脱着し、呼吸作用の機能をもつ複合タン白質であるヘモグロビン分子がある。このヘモグロビン分子は一本のペプチド鎖と

一個のヘムが結合したものを単量体として、それが四個集合した四量体である。ペプチド鎖として、アミノ酸配列、アミノ酸の個数が異なった  $\alpha$ 、 $\beta$  鎖があり、ヘモグロビンは  $\alpha_2\beta_2$  として存在する。

溶液中でのヘモグロビンは、温度、pH、濃度により



の二段解離がおこる。この解離のエネルギーをもとめるため、溶解熱測定を行なった。

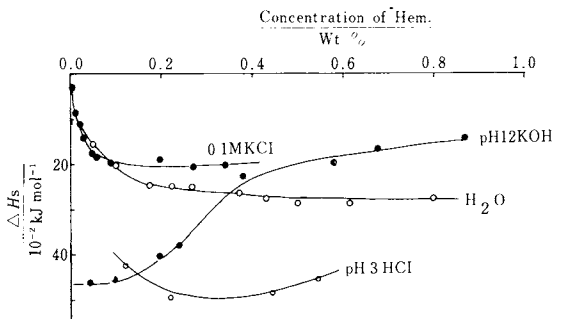


図1 Heats of solution of bovin hemoglobin with a various solvent systems at 310K

図1はヘモグロビンの溶解熱を示したものである。pH 3、12などの強酸性側、強アルカリ性側の挙動は、 $H_2O$ 、 $0.1M KCl$  溶液の中性附近の挙動とは異なる。pH 10.5 以上、または pH 5 以下の条件で容易に二量体、さらには単量体まで解離することから、pH 3、12での溶解熱はヘモグロビン分子の構造変化による熱量とともに、かなり中和熱が寄与しているものと思われる。一方  $H_2O$ 、 $0.1M KCl$  溶液の場合、 $0.1 \sim 0.2 wt\%$  付近から溶解熱の発熱量が急激に減少する傾向にある。この急激な吸熱方向のたちはがりは、一般の性質(例えば nonpolar, dipole を有する物質)に比較して大きすぎる傾向にある。したがって、この吸熱効果は  $\alpha_2\beta_2$  が  $2\alpha\beta$  に解離する際のエネルギー変化と考えてよいであろう。

簡単な取扱いにより、 $2\alpha\beta$  が  $\alpha_2\beta_2$  に会合する場合の理論式を誘導すると、つぎの関係式が得られる。

$$\varphi/X_A = K\Delta H(1 - 4KX_A)$$

ここで、 $\varphi$  は観測熱、 $X_A$  は任意のヘモグロビン濃度、 $K$ 、 $\Delta H$  は  $2\alpha\beta$  が  $\alpha_2\beta_2$  に会合する際の平衡定数及びへ

\* 大阪工業大学：大阪市旭区大宮町

Yoshihiro Baba, Akihiro Kagimoto: Osaka Institute of Technology

モグロビン1モル当りの会合熱である。評価した $\Delta H$ ,  $K$ を他の熱力学量とともに表1に示した。 $\Delta H$ は非常に大きな値である。

一方, DSCでヘモグロビン分子の解離エネルギーを評価した値も表1に示した。なお0.1MKClでの解離エネルギーの評価はDSCでは不可能である。これは表1に示した溶解熱の熱力学量より判断すると, 塩の存在下ではヘモグロビン分子はかなり安定化すると考えられる。

表1 Heat of association(Heat of solution method)

Solvents	$K \times 10^{-5}$	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$
		$\text{kJ mol}^{-1}$	$\text{kJ mol}^{-1}$	$\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
H <sub>2</sub> O(pH 7)	3.13	26	-1688	-5.0
0.1MKCl	12.98	22	-2048	-6.9

Heat of dissociation (DSC method)				
Solvent	$K \times 10^5$	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$
		$\text{kJ mol}^{-1}$	$\text{kJ mol}^{-1}$	$\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
H <sub>2</sub> O	--	0	1500	4.99

ii) 核酸・金属イオン系

生物において重要な遺伝情報を保持する分子であるデオキシリボ核酸(DNA)は二本鎖helix構造を形成する。この構造は温度, pH, イオン強度などの環境パラメーターの変化によって, 一本鎖coilへ転移する。特にDNAのhelix構造に対するイオン強度として金属イオンの効果の研究は数多くあり, その金属イオンの作用として, DNAの主鎖の構造単位として負に荷電したリン酸基と相互作用するMg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>などの金属イオンと, DNAの側鎖の塩基と相互作用するCu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>などの金属イオンとに大別できる。DNAに対する金属イオンの作用の違いを, DSCをもちいて熱的に検討した例を示そう。

DNAのモノヌクレオチド(DNA(P))のモル数と金属イオンのモル数の比に対して, DNAのhelix-coil転移熱( $\Delta H$ )をプロットしたのが図2である。金属イオンの違いによって,  $\Delta H$ の金属イオン濃度の依存性が異なる。すなわち, Mg<sup>2+</sup>では, モル比が1までは,  $\Delta H$ が約5kJの増加を示す。またCd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>では, あるモル比で $\Delta H$ は最大になるが, Cd<sup>2+</sup>の方がCu<sup>2+</sup>より, モル比が大きいくところでの最大値を示す。しかし, 最大値の $\Delta H$ とモル比0での転移熱の差はMg<sup>2+</sup>と同様約5kJである。金属イオンによる $\Delta H$ の増加は, DNAの主鎖の負に荷電したリン酸基に金属イオンが作用し, その電荷を遮蔽して, helix構造を安定化すると考えられる。一方Hg<sup>2+</sup>での $\Delta H$ はモル比とともに減少する。またCu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>でも, 大きいモル比では $\Delta H$ は減少する傾向にある。この $\Delta H$ の減少は側鎖の塩基と相互作用し, helix構造を不安定化するものと考えられる。なおDNAのhelix構造を安定化させる金属イオンの順序としてMg<sup>2+</sup> > Cd<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup>となり, またそ

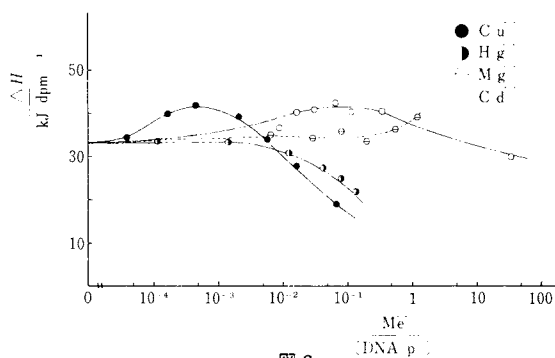


図2

の構造を不安定化させる順序としてHg<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup> > Cd<sup>2+</sup>になる。

iii) 核酸-色素系

ある種の色素は細胞内にとりこまれて光の存在のもとで, 細胞の致死あるいは遺伝的障害などの作用を及ぼすことが知られている。この色素のはたす役割は生体高分子, 特に核酸と色素間の相互作用により, 核酸-色素複合体を形成する。その核酸と色素の結合様式は色素濃度により異なる。

すなわち色素濃度が薄い場合(DNAのモノヌクレオチドの濃度(P)と色素濃度(D)のモル比P/Dが6以上)には, 色素分子が核酸の二本鎖helix構造を形成している塩基対の面の間にサンドウィッチ状に位置する Intercalation model, 一方色素濃度が濃い場合(P/Dが小さい場合)には Stacking modelが提唱されている。そこで, 色素の核酸に対する結合様式の違いを混合熱の手段で検討し, 核酸-色素系の熱力学パラメーターを評価した。

DNAと色素(ここではアクリジン・オレンジ(A.O)を使用)が相互作用する場合, 平衡定数をKとすると次のように表現できる。

$$K = r/(n-r) \cdot C_1 \quad (1)$$

ここでnはDNA分子当りのサイトの数, rはDNAの分子当りに相互作用する色素の数, C<sub>1</sub>は遊離色素濃度である。一方, 相互作用する色素1モル当りの熱量

$$\Delta H = \Delta Q / C_b \cdot V \quad (2)$$

となる。 $\Delta Q$ は観測値, Vは混合の全体積, C<sub>b</sub>は相互作用した色素濃度(=r)である。(1), (2)式より,

$$\Delta Q/V \div \Delta H / 2 \left[ \alpha P + \frac{2}{K} + (2 - \alpha P / (2P + \frac{1}{K})) C \right] \quad (3)$$

が得られる。ここでPはDNAのヌクレオチド濃度( $\alpha P = n$ ), Cは色素濃度,  $\alpha$ はヌクレオチド当りにA.Oが相互作用する割合である。DNA濃度を一定にし, (3)式にしたがって評価した核酸-色素系の熱力学量を表2に示した。

なお Intercalation の場合は $\alpha = 0.2$ , Stacking の場合には $\alpha = 1$ とした。色素の核酸への相互作用エネルギーは Intercalation の方がかなり大きい。 Intercalation model

表 2

	K	$\frac{\Delta G}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta H}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta S}{\text{JK}^{-1} \text{mol}^{-1}}$
Intercalation	$6.4 \times 10^4$	-27.4	-13.7	46
Stacking	$6.4 \times 10^3$	-21.7	-2.2	66

から考えて、このエネルギーは単なる Van der Waals 力だけではなく、DNA と A.O のなんらかの相互作用により、構造的に DNA の二本鎖 helix 構造をより安定化する要因があると考えられる。

IV) 核酸のモデル物質 I

ポリリポアデニン酸 (Poly A) と ポリリボウラシル酸 (Poly u) を等モルに混合すると、DNA と同様な二本鎖 helix 構造をもつ Poly(A+u) complex を形成する。そこで NaCl 濃度による Poly(A+u) の変性機構を DSC で検討した。

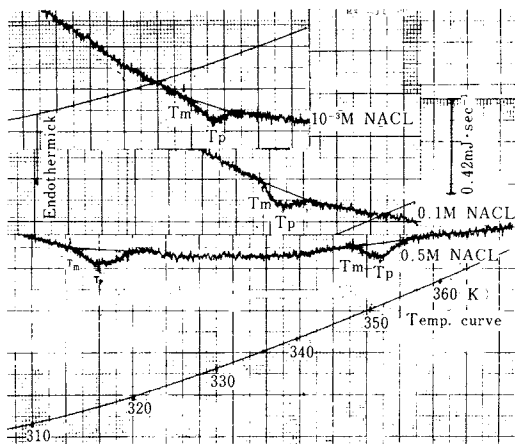
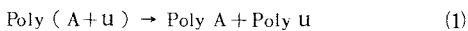
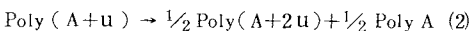


図 3

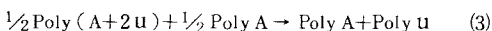
得られた DSC 曲線を図 3 に示した。 $10^{-5}$ , 0.1 M-NaCl 溶液中では一つの吸熱ピークが、0.5 M-NaCl では低温側と高温側にそれぞれ二つの吸熱ピークが得られた。これら得られた吸熱ピークについて、UV スペクトルで検討した結果、0.1 M NaCl 以下の濃度での一つの吸熱ピークは



の転移に相当する。一方 0.5 M-NaCl での低温側のピークは



のように、三本鎖 helix 構造をもつ Poly(A+2u) に転移し、高温側で



のように、個々の一本鎖に転移する。

NaCl 濃度に対して、(1), (2), (3) の転移温度 ( $T_m$ )、転移熱 ( $\Delta H$ ) をプロットしたのが図 4 である。図 4 より明らかなように (1) の転移は  $10^{-2}$  から  $10^{-1}$  M NaCl と増加すると  $T_m$ 、 $\Delta H$  は増加する。この増加は Poly(A+u) の二本鎖 helix 構造を安定化させる。この要因は、アデニン塩基に  $\text{Na}^+$

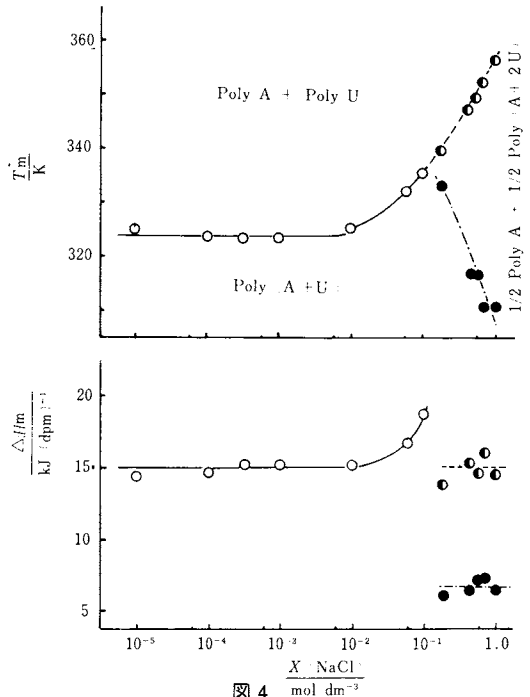


図 4

が作用することによるのか、あるいは NaCl によりまわりの水の構造を変化させ、間接的に二本鎖 helix 構造を安定化するものと考えられる。一方 (2) の転移は 0.1 M 以上でおこり NaCl 濃度の増加とともに  $T_m$  は減少するが、 $\Delta H$  はほぼ一定の 7 kJ になる。また (3) の転移については NaCl 濃度の増加とともに  $T_m$  は増加するが  $\Delta H$  はほぼ一定の 15 kJ となる。この 0.1 M 以上になると Poly(A+u) よりむしろ Poly(A+2u) の三本鎖 helix が安定に存在する。

V) 核酸のモデル物質 II

ポリリボグアニル酸 (Poly G) とポリリボチシル酸 (Poly C) は Poly A, Poly u と同様、環境等の条件により二本鎖 helix 構造を形成すると考えられる。Poly G と Poly C の等モル混合の混合熱を LKB パッチ型熱量計で得られた結果を簡単に示す。

混合熱はすべて発熱を示した。図 5 には Poly G, Poly C 単独の混合熱もプロットした。塩濃度 (NaCl) が  $10^{-6} \sim 10^{-4}$  モルの範囲では一定値 (-9 kJ/BPM)、それ以上になると塩濃度に依存する。Poly G と Poly C の等モル混合の混合熱を二つの仮定にもとづき解析する。その一つは、混合熱の発熱は Poly (G+C) complex を形成すること、仮定の 2 はその complex が塩濃度に依存する範囲と依存しない範囲に分けられる。この二つの仮定を基にすると混合に際してつぎの反応が考えられる。Poly (G+Poly C)  $\xrightarrow{\Delta H_1}$  Poly (G+C) complex, Poly (G+C) +  $\text{Na}^+$   $\xrightarrow{\Delta H_2}$  Poly (G+C) -  $\text{Na}^+$ , Poly G +  $\text{Na}^+$   $\xrightarrow{\Delta H_3}$  Poly (G+ $\text{Na}^+$ ), Poly C +  $\text{Na}^+$   $\xrightarrow{\Delta H_4}$

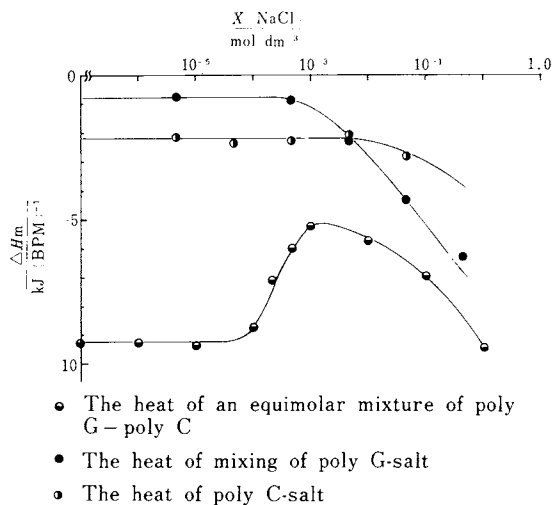


図 5

Poly (C+Na<sup>+</sup>), Poly (G+C)  $\Delta H_5$ , Poly (G+C), Poly G  $\Delta H_6$ , Poly G, Poly C  $\Delta H_7$ , Poly C. いま, 観測熱を  $\phi$  とし,  $\Delta H_5$ ,  $\Delta H_6$ ,  $\Delta H_7$  の希釈熱は非常に希薄領域を取扱っているの  
で, 希釈熱は小さいとして無視すると, Poly (G+C)

complex の  $\Delta H_1$  は,

$$\Delta H_1 = \phi - (\Delta H_2 + \Delta H_3 + \Delta H_4)$$

上式を使って, 解析すると, Poly (G+C) complex の形成に要するエネルギーは約  $-12.3 \text{ kJ/BPM}$  となる。

以上, 生体高分子の高次構造の研究手段として, 熱分析, 熱量測定を紹介した。特に熱分析, DSC による研究手段について, 大阪府大の高橋氏が炉とセルの間の熱交換が起ることによって, 熱測定の効率が悪いと指摘しているが, 何ら定量的なことについては言及していない。この問題に関して, 実際, 炉に比較してセルは非常に小さく, また反応熱も非常に小さいため, その熱交換がどの程度熱量測定に影響を及ぼすか疑問である。しかし, この問題についてさらに検討すべきであろう。

なお紙面の都合上, 分光学的な知見についての詳細, その他, Poly A と Poly U の混合熱, その環境変化による構造変化, DNA の環境変化による Conformational な挙動, コラーゲン分子の抽出方法による熱変性の相異など紹介できないのが残念である。今後, これらの基礎データをもとに, 構造と生物機能との関連を追求し, 具体化していきたい。

研究ノート

細菌胞子「活性化」過程の示差熱分析

1. はじめに

前田好美\*, 古賀正三\*

*Bacillus* 属や *Clostridium* 属などの細菌は適当な培地で培養すると, 培養の後期に耐久器官としての胞子(芽胞)を形成する。胞子は熱・薬剤・放射線などに対して著しく高い抵抗性を示す。たとえば栄養細胞は 333K の加熱によって死滅する菌が多いが, 細菌胞子は 373K の加熱によっても死滅しない場合が多い。むしろ細菌胞子は 333K 前後の温度で加熱すると発芽しやすくなる。この現象を「熱活性化」という。「熱活性化」によって起る効果としては, 発芽率ならびに発芽速度が高くなること以外に発芽誘導物質に対する要求性が変化することや Glucose oxidation のような代謝活性が出現することが知られている。このように加熱処理によって現象的には顕著な差異がみられるにもかかわらず, その機構についてはほとんど分

っていない。加熱処理によって胞子細胞中のある種の高分子(おそらくは蛋白質)の高次構造が変化して活性化されるのであろう。そしてこの過程では代謝反応は行われていないという考えが漠然とあるけれども, またほかの考え方もあって, その点を確める実験方法が困難なため, いまのところははっきりしていない。

もしも胞子成分の高次構造に変化が起るなり, 胞子中の何処かに相転移が起るなりするのであれば, 微少な熱の出入りを伴うだろうから, 胞子の生細胞を試料として示差熱分析を行えば, 問題の手掛りが得られるだろうという希望をもって始めた著者らの仕事の一部をつぎに述べる。

\* 東京大学応用微生物研究所: 東京都文京区弥生 1-1-1

Yoshimi Maeda, Shozo Koga: The Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo