

## 生化学における熱測定研究法

## I 生体物質の生物学的機能に関連した研究法(上)

深田はるみ\*, 高橋克忠\*

生化学反応系, 生体物質系での熱測定が生化学者だけでなく, 広く一般の化学, 物理の分野の人々からも関心が持たれるようになり, その研究レポートの数も, 他に例を見ない程, 毎年急速に増加している<sup>1-4)</sup>。この講座では, 将来生体物質を扱ってみたいと思っている方, あるいはそれに関心を持つ方々を対象に理解の助けとなるよう中心的なテーマを選び, 技術よりも方法論を主体にして, 問題点を交えつつ紹介することにする。まず(Ⅰ)ではタンパク質を代表とする生体高分子の生物学的機能に関連した研究方法を Isothermal calorimetry および Scanning calorimetry に分けて述べ, 次の(Ⅱ)ではこれらを総合した形で Privalov により体形化されたタンパク質構造の熱力学的性質を導く方法論を解説する。さらに(Ⅲ)では生体のマクロな状態を熱測定の対象とする場合の種々な研究方法を紹介し, 最後に(Ⅳ)ではこうした熱測定技術が生命科学の分野でどのように応用されつつあるかを述べて結ぶ予定である。

ただ, これを読まれる方々に直ちに生化学系の熱測定を開始するよう説くつもりはないことを始めにおことわりしておきたい。生体物質や生化学反応系の性質をじっくりと見極めないで性急に取組むと, かえって遠廻りしてしまう恐れがある。実際, プームとはいえ, 生化学者の側からみて疑問を抱かせるような粗雑な実験の例が国際的にも数多く見受けられるのが現状であり, 1976年イタリアで開かれたヨーロッパ生物熱力学ワークショップに関する田村氏のレポート<sup>6,7)</sup>も, こうした安易な研究態度が一部にみられることを厳しく批判している。パスに乗り遅れまいという安易な取り組み方でなく, とくにこれまで生体物質を扱った経験のない人々には, 生

学者との間の緊密な連携を望みたい。

## 1. 生体物質の生物学的機能に関連した研究法

生化学熱測定と呼ばれるものの範囲は実に広いが, まず測定対象から整理すれば, 1) 生物個体レベルのもの, 2) 細胞や組織レベルのもの, および 3) 分子論的なレベルのものに大別される<sup>3)</sup>。1), 2) のマクロな対象を取扱うものについては(Ⅲ)で述べることにし, ここではまず 3) の分子論的なレベルのものから入って行くことにする。

分子論的なレベルの研究には, さらに, 生体構成成分の一般的な物理化学的性質を明らかにしようとする立場のものと, 生体物質の持つ固有の生物学的機能に関連した立場のものがある。このうち, 前者は熱容量や燃焼熱の測定, あるいは生体内物質代謝の反応熱測定などを通じて生体物質の熱力学量を得ようとするものを指し, 基本的物性値を決めるといふ熱測定の本来の目的にもっともよく添うものといえよう。けれども, データに有意性を持たせるだけの純度を持つ試料がなかなか得られないということのために, 実際にはこの方面での研究はあまり進められていないのが現状である。

一方, 生化学の進歩により数多くの生体物質の同定が進むと同時に, それらの生体内での役割が次々と明らかにされ, 遺伝現象や物質変換における高度の反応性, あるいはそれらの間にみられる有機的な調節制御, などという生物に特異的な現象が分子レベルで論じられるようになってきた。いいかえれば, こうした生物固有の現象において主役を演ずる生体物質—主としてタンパク質に代表される生体高分子—がどのような機構でその生物学的機能を保持, あるいは発現させているのか, ということが今日の生化学の中心的なテーマのひとつとなっており, そうした系での物理化学的立場からの説明の一環として熱力学的データが要求されているのである。

ここに紹介する各種の研究法はいずれもこのような生体の中で重要な位置付けにある生体高分子を扱ったもので, それらの持つ生物学的機能という側面から眺めることに意義のある実験である。

\* 大阪府立大学農学部生物物理化学研究室: 堺市百舌鳥梅町4丁

Harumi Fukada and Katsutada Takahashi: Laboratory of Biophysical Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka, 591 Japan

生体物質の名称で, 常用される省略記号のあるものはそのまま使用した。また, 例示した図はすべて原著通りとし, したがって熱量の単位は不統一のままである。

## 1. 試料および測定値の取扱い

生化学の側からすればごく常識的な事柄ではあるが、熱測定を行なうに際しての最小限の予備知識として、生体物質の持つ性質と測定値の取扱いに関する注意を簡単に述べる。

タンパク質はある特定の立体構造をとることによって特異的な機能を果している。その構造や機能は、pH、溶媒組成、温度、圧力などの外部環境の変化に応じて微妙に変わり、生理的条件を大きくはずれると全く異なった挙動を示すようになる。タンパク質に含まれる多くの解離基(アミノ酸側鎖にあるもの)は機能発現に直接、間接に関与しているため、生理的 pH からはずれた酸性あるいはアルカリ性ではその活性が失われ、極端な場合には大きなコンホメーション変化をきたす。環境が変わることにより本来の生物活性を失なうことを変性と呼んでいるが、個々のタンパク質にはこの変性を起こさない安定な pH 領域があり、その範囲で測定を行なうということをまず心掛けるべきであろう。

pH と同様 に 溶液のイオン強度も活性や構造に変化を与える大きな因子であるが、実際の測定ではイオン強度 0.1 附近にそろえる場合が多い。

また、単離されたタンパク質は一般に不安定であり、熱変性でなくとも常温で長時間放置すると変性するものが多い。さらに、空気と水との界面で変性するタンパク質があることも心しておかねばならない。

測定にあたっては試料濃度にも注意が要る。濃度を高くすると分子間に相互作用が働いて会合や凝集を引き起こし、誤った結果を導くおそれがある。タンパク質濃度は一般的には  $10^{-4} \sim 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (約 0.1%) 程度が望ましいように見られる。

サブユニット構造を持つタンパク質では、モノマーでなくオリゴマーの状態ですべてその機能が発揮されるものが少ない。オリゴメリックな状態は、pH、濃度、温度等で大きく変化するため、オリゴマーでないもの以上に外部環境に対して注意を払う必要がある。

さきに生体高分子にはそれが安定に存在する pH 範囲があることを述べたが、目的とする反応系の溶液の pH を一定に保つため、緩衝液を用いて測定するのが普通である。その場合、反応系のプロトン出入りの有無をチェックする必要がある。反応がプロトンの放出あるいは吸収を伴えば、測定されたみかけの反応熱には、真の反応熱以外に緩衝液組成のプロトン附加あるいは脱プロトンの熱も含まれることになるからである。反応系が取り込んだプロトン数、 $n$ 、が既知であれば、みかけの反応熱、 $\Delta H_{\text{obs}}$ 、に対して緩衝液組成のイオン化エンタルピー変

化、 $\Delta H_i$ 、を補正し、正味の反応のエンタルピー変化、 $\Delta H_0$ 、を算出できる。これを式で示せば(1.1)式のようになる。

$$\Delta H_0 = \Delta H_{\text{obs}} - n \Delta H_i \quad (1.1)$$

一方、 $n$  が未知の場合には、二種以上の緩衝液を用いてそれぞれ測定することにより  $\Delta H_i$  に基づく熱量を補正することができる。図 1.1 はインスリンの DTT による還元反応を三種の緩衝液中で測定した例で、緩衝液組成のイオン化エンタルピー変化を横軸に、それぞれの場合のみかけの反応熱を縦軸にとり、その傾斜から  $n = -1.91$ 、その縦軸切片から正味の還元反応のエンタルピー変化を  $\Delta H_0 = 51.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  と得た<sup>8)</sup>。

表 1.1 には生化学反応系によく用いられる緩衝液の  $\Delta H_i$  と緩衝作用を示す pH 範囲を示してある。この中で、イオン化熱が 0 に最も近いものはリン酸緩衝液であるが、酢酸緩衝液はさらに小さな、ほとんど 0 に近い値を持つ<sup>9)</sup> ことを知っておくと便利な場合がある。

また、緩衝液の選択を誤れば間違った結果を招くおそれがあるので、その面での注意も必要である。つまり、組成イオンがタンパク質に結合し、その機能に影響を与えることがある。たとえば、ヘモグロビンに対する  $\text{O}_2$

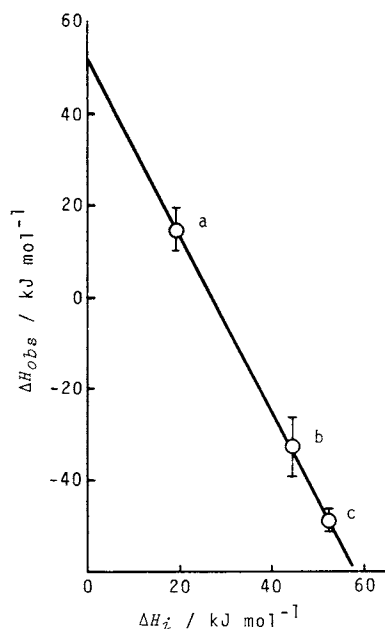


図 1.1 インスリンとジチオスレイトールの反応におけるみかけの反応熱と緩衝液組成のイオン化熱の関係 (pH 9.6, 298 K)<sup>8)</sup>

- a 炭酸緩衝液
- b グリシン緩衝液
- c アンモニウム緩衝液

結合熱をリン酸緩衝液、Tris緩衝液、非緩衝液系で測定すると、あるpH範囲では、イオン化熱 $\Delta H_i$ を補正してもなお、それぞれ異なった値をとる<sup>10)</sup>。また、ホスホリラーゼbに対するAMP結合の熱測定で、グリセロリン酸を使用するとグリシルグリシン緩衝液を使用した場合に比べて非常に異なったエンタルピー変化を与える<sup>11)</sup>。この二つの例はいずれも緩衝液組成イオンがタンパク質に結合してしまうことによるものと説明されている。後者の場合、結合する小分子(リガンド)のAMPにはリン酸基が含まれており、それと競合する可能性のあるグリセロリン酸緩衝液を用いるのがまずいのであって、これに類する組み合わせは避けるべきであろう。

なお、タンパク質を構成するアミノ酸残基中の解離基の種類とその解離定数(pK)の範囲、およびイオン化エンタルピー変化を参考までに表1.2に示す。

次に、熱力学量の表示についての注意を述べる。熱力学における水溶液系の標準状態は濃度 $1 \text{ mol dm}^{-3}$ を採用

している。ところが、生化学反応系ではほとんどの場合プロトン(水素イオン)が関与しており、そのような系で水素イオン濃度 $1 \text{ mol dm}^{-3}$ というのはpH=0に相当し、生体にとってあり得ない条件である。先に述べたように、タンパク質を初めほとんどの生体物質には解離基が含まれていて、その解離基の解離状態によって生物学的機能が大きく変わり、特にpH=0という条件ではあらゆる物質の機能は失われてしまう。したがって、物理化学的な標準状態である $1 \text{ mol dm}^{-3}$ をそのまま生体に持ち込むことは全く意味を持たないので、水素イオン濃度に関しては、 $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ すなわちpH=7.0をあらたに生物学的標準状態と定義している。生体反応系における生物学的標準自由エネルギー変化は、pH=7.0を標準状態としていることを表すために $\Delta G'$ の記号を用い、物理化学的標準自由エネルギー変化 $\Delta G^\circ$ と区別している。

## 2. Isothermal Calorimetry

定温でのエンタルピー変化測定はいろいろな系に適用されている。測定装置としては特に生化学反応熱測定用というものはなく、非生体物質系で用いるものと区別して考える必要はない。しいて特徴を挙げるならば、溶液反応系で微少な熱量を測定しようものというように言えよう。ただ、混合熱や希釈熱測定においてしばしばみられる水銀を用いた試料混合手段は、タンパク質試料の場合に水銀表面に吸着したり、条件によっては水銀イオンがタンパク質と反応するおそれがあるためこれらの系に使うことは適当でない。

簡易な熱量計としてDewarびんを反応容器とする恒温等熱量計(Isoperibol calorimeter)が依然として便利なこともあるが、試料の微量化という面から、最近では双子型構造の伝導熱量計を使用する例がほとんどである。これには良く知られているようにバッチ型とフロー型があり、それぞれの利点を生かして使い分けされている。現在広く使われている市販装置の測定例から見れば、試料はバッチ、フローのいずれも $5 \sim 15 \text{ cm}^3$ の範囲で、精度はバッチの場合で $10 \text{ mJ}$ の熱量を、フローの場合で $100 \mu\text{W}$ の熱流をいずれも10%程度の精度で測定しているとみてよいだろう。フローの場合、通常熱量計シグナルが定常値を示すようになるまで10分間は液を流さなければならぬから、この $100 \mu\text{W}$ という熱流は $100 \mu\text{W} \times 10 \text{ min} = 60 \text{ mJ}$ という熱量に相当することになる。このように一般にはフローの方がバッチに比べ精度が少し悪いようである。したがって、試料が少ない時、あるいはより精度の高い測定値を得たい時にはバッチ型を使用の方がよい。これに対し、試料が不安定で短時間での測定が好ましいときにはフロー型が適切である。ただし、

表1.1 緩衝液のイオン化エンタルピー変化<sup>a)</sup>(298 K)

緩 衝 液	pH	イオン化エンタルピー変化, $\Delta H_i$ kJ mol <sup>-1</sup>
リン酸	5.2~8.3	4.73
PIPES <sup>b)</sup>	6.0~8.0	11.46
HEPES <sup>c)</sup>	6.5~8.5	20.96
グリシルグリシン	7~9	44.35
Tris <sup>d)</sup>	7.3~9.3	47.45
ホウ酸	7.5~9.2	11.72
炭 酸	9.0~11.5	19.25

- a) 高橋克忠, “新実験化学講座2”(日本化学会編)6章, 丸善, 印刷中  
 b) Piperazine-N,N'-bis-(2-ethanesulfonic acid)  
 c) N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid  
 d) Tris(hydroxymethyl)aminomethane

表1.2 アミノ酸の解離基のpK値とイオン化エンタルピー変化<sup>a)</sup>(298 K)

解 離 基	pK	$\Delta H_i$ kJ mol <sup>-1</sup>
カルボキシル基	$\alpha$ 3.0~3.2	±1.5
	$\beta, \gamma$ 3.0~4.7	
アミノ基	$\alpha$ 7.6~8.4	10~13
	$\epsilon$ 9.4~10.6	
スルフィドリル基	7.5~10.3	6~7
フェノール性水酸基	9.1~10.8	6
イミダゾール基	5.6~7.0	6.9~7.5
グアニジル基	11.6~12.6	12~13

- a) 広海啓太郎, “入門酵素反応速度論”, (小野宗三郎編) p.58, 共立出版, 東京(1975)

反応が熱量計セル内での溶液の滞留時間(2~5 min くらい)に比べじゅうぶん短い時間に終了するような速い反応速度の系に限られる。

次に、タンパク質を含む反応系を中心に実際の例と解析法を紹介する。

2.1 タンパク質表面の状態を探る方法

2.1.1 リガンド結合のエンタルピー滴定

ここにいうリガンドとはタンパク質に特異的に結合する小分子を指し、ヘモグロビンに対する酸素、酵素に対する基質や阻害剤あるいは補酵素などである。リガンド濃度を変えて結合熱を測定すると一種のエンタルピー滴定曲線を得ることができる。図1.2aはそれをモデル的に示したもので、このような飽和曲線を解析して結合定数やエンタルピー変化が求められる<sup>3)</sup>。しかし、結合定数については、精度の点から、分光学的な手段など他の手法を用いることができるときにはそれらによって求めることが多い。

リガンドが複数個結合したり、あるいはタンパク質がサブユニット構造よりなるオリゴマーである場合、しばしばエンタルピー滴定曲線は図1.2のbのようにシグモイド状や屈曲点を持った曲線となる。これは、そのリガンド結合に際して協同性のあることを表わしている。すなわち、タンパク質間の相互作用あるいはリガンド結合が引金になって結合の性質が変化するのである。その結合サイトが等価で相互作用していなければ協同効果がなければ)図1.2のaのような単純な飽和曲線を描く。

ホスホリラーゼb(二量体)とアロステリックエフェクターであるAMPとの相互作用におけるエンタルピー滴定は図1.3のように二段のシグモイド曲線を与える。このことから、モノマー当りで二種の異なる親和力を持つ結合サイトがあること、および各サイトへのAMP結合は協同的に起ることが示された<sup>11)</sup>。

酵素の基質結合部位を探るためには基質アナログ(基質と類似の構造を持ち、基質と同じサイトに結合するもの)との結合を利用する。リゾチームではN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)やその重合体(GlcNAc)<sub>n</sub>(n=

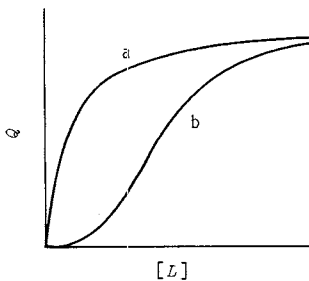


図1.2 リガンド結合のエンタルピー滴定

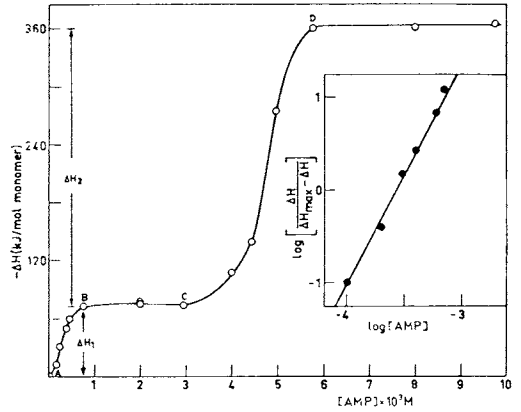


図1.3 ホスホリラーゼbとAMPの結合のエンタルピー滴定(pH9.6, 298 K)<sup>11)</sup>  
挿入図はAB間のHillプロット

2~4)との結合熱が測定され<sup>12,13)</sup>、結合サイトに含まれる四個のグルコース残基に相当する各サブサイトの熱力学的性質が詳しく論じられている。特に、触媒部位である四番目のサブサイトが他のサブサイトと異なったエンタルピー変化、エントロピー変化を与えることが示されているのは他の方法による結果とも併わせ興味深い。リボスクレアーゼAについては3'-CMPなどのモノヌクレオチドとの結合熱が測定され<sup>14)</sup>、これを解析して、3'-CMPのリン酸二価アニオンとリボスクレアーゼA分子表面の正に荷電したヒスチジン残基2個との間の静電的相互作用が結合に大きな寄与をしていることが明らかにされた。

アロステリックエフェクターとそのアナログを用いた例としてグルタミン酸脱水素酵素がある。アデノシンおよびAMP, ADP, ATPというリン酸基を0~3個持つアデノシンアナログについてその結合の熱力学的性質を求め、本来のリガンドであるADPの結合がやはり特異な熱力学量を持つことが示された<sup>15)</sup>。

2.1.2 リガンド結合熱のpH依存性

リガンド結合熱を種々のpHで測定し、エンタルピー変化のpH依存性を解析して結合サイトの性質についての情報を得ることもできる。最も単純なのは結合に関する解離基の状態を推定する場合で、リゾチームでは(GlcNAc)などの結合熱のpH依存性から活性部位に位置している解離基の中の一つのpKを3.8と得ている<sup>16)</sup>。リボスクレアーゼAと3'-CMPとの結合熱のpH依存性を図1.4に示す。実線は、解離基の解離定数pKおよびイオン化エンタルピー変化ΔH<sub>i</sub>を用いて描いた理論曲線で、実測値と一致するところから、3'-CMPの結合に伴い、リボスクレアーゼA分子の表面で結合サイトにあるヒ

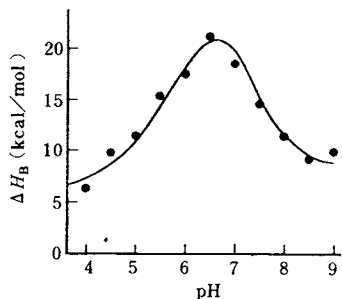


図 1.4 リボヌクレアーゼ A と 3'-CMP の結合の pH 依存性 (298 K)<sup>17)</sup>

スチジン残基 2 個 (His 12, His 119) と他の部位にあるヒスチジン残基 1 個 (His 48) の状態が変化すると結論された<sup>17)</sup>。

リガンド結合が pH に依存することはかなり一般的であり、特にヘモグロビンでは古くから Bohr 効果としてその現象が知られている。ヘモグロビンは、タンパク質としてはその生理的機能の発現について解明のすすんでいるものの一つであり、Bohr 効果についても詳細が明らかにされつつある。この方面での熱測定によるアプローチも期待が持てそうな気がする。

### 2.1.3 タンパク質の pH 滴定

以上のような活性に関与する解離基だけでなく、タンパク質全体の様相をも調べる手段として pH 滴定が行なわれる。特定の pH に調製したタンパク質溶液に対し、酸またはアルカリを加えて pH をジャンプさせたときの熱量変化を測定する方法である。

図 1.5 はリボヌクレアーゼ A を pH 8 から酸性側にジャンプさせたときの結果である<sup>18)</sup>。リボヌクレアーゼ A には 4 個のヒスチジン残基 (イミダゾール基) が含まれ

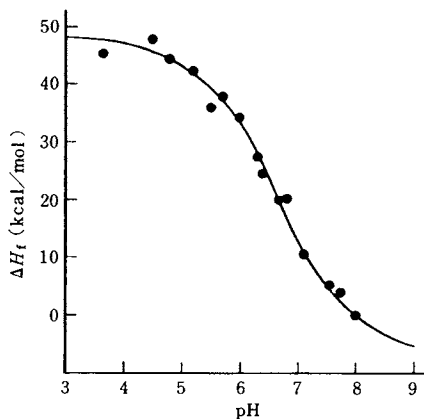


図 1.5 リボヌクレアーゼ A の pH 滴定 (298 K)<sup>18)</sup>  
滴定前の酵素液の pH は 8.0

るが、それぞれの pK,  $\Delta H_i$  が理論曲線に対する回帰分析で決められた。なお、カルボキシル基の pK も近いところにおいて同時に滴定されるが、幸いその  $\Delta H_i$  はほぼ 0 と見なせるためこの解析が可能となる。この論文では、さらに、3'-CMP と結合した状態の複合体も同様に pH 滴定し、リボヌクレアーゼ A 単独の場合と比較することによって、3'-CMP の結合に 3 個のヒスチジン残基 (His 12, 119, 48) が関与していることを明らかにした。このことは 2.1.2 で述べた 3'-CMP 結合熱の pH 依存性の結果とも一致する。

Shiao らは、リゾチーム、キモトリプシノーゲン A、酸化型チトクローム c の三種の球状タンパク質を広い pH 範囲で滴定した<sup>19)</sup>。その例を図 1.6 と 1.7 に示す。このような曲線は電位差滴定の結果と組み合わせることにより Linderström-Lang のモデルなどに従って解析し、そのタンパク質に含まれる解離基の pK や  $\Delta H_i$  を計算することができる。アミノ酸組成が既知のタンパク質では、熱測定で得られた結果を表 1.1 の値を用いて個々の構成アミノ酸のレベルまで分解、帰属させることが可能である。上記三種のタンパク質はアミノ酸配列はもとよりその空間構造も明らかにされているものであり、Shiao らはその滴定結果をもとに通常のタンパク質に含まれるア

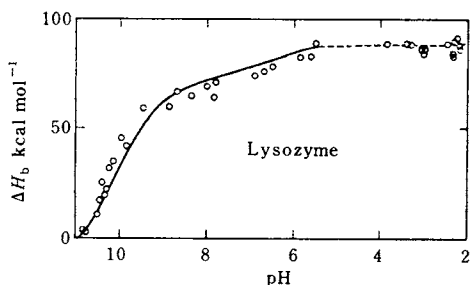


図 1.6 リゾチームの pH 滴定 (298 K)<sup>19)</sup>

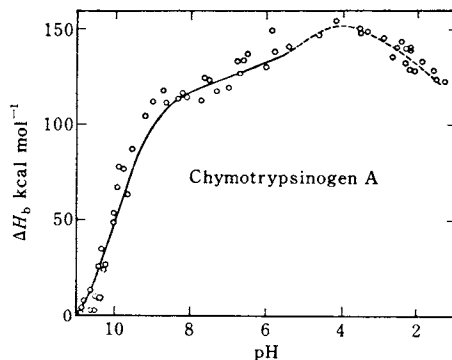


図 1.7 キモトリプシノーゲン A の pH 滴定 (298 K)<sup>19)</sup>

表 1.3 球状タンパク質に含まれる解離基の正常解離における標準熱力学量 (298 K)<sup>19)</sup>

解離基	$\Delta H_i^\circ$ kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta G_i^\circ$ kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta S_i^\circ$ JK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	pK
カルボキシル基	0	—	—	—
$\alpha$ -アミノ基	41.8	4.2	126	7.7
$\epsilon$ -アミノ基	43.9	18.4	85.8	10.2
フェノール性水酸基	26.4	18.0	28.0	10.1
イミダゾール基	26.4	-2.9	98.3	6.5

ミノ酸残基が正常な電離を示すときの pK および熱力学量を表 1.3 のように決めている<sup>19)</sup>。ここで正常というのは、近傍にある他の残基やその他の環境因子によって影響を受けていない状態を指している。いいかえれば、表 1.3 に示す値と異なった pK,  $\Delta H_i^\circ$  を示す残基があれば、それは他の残基と相互作用していたり、疎水性領域あるいは分子内部に埋もれた状態にあると考えられる。

タンパク質には多くの解離基が含まれているため、解析が複雑である。したがって、pH 滴定が適用されるのは、現在のところ比較的小さい分子量のタンパク質に限られている。pH 滴定を行なう際、タンパク質の種類によっては不可逆的な変性を起こすことがある。また、pH によって会合状態の変化するタンパク質もあるため、あらかじめ他の方法でチェックしておく必要がある。

## 2.2 タンパク質のコンホメーション変化をみる方法

### 2.2.1 リガンド結合熱の pH 依存性

リガンド結合熱の pH 依存性から結合サイトの様子を探ることはすでに述べたが、同時にタンパク質分子内の局所的な構造変化を見ることもできる。たとえば、2.1.1 に記したようにリボスクレアゼ A に対する 3'-CMP の結合において、結合熱の pH 依存性から結合サイトにある 2 個のヒスチジン (His 12, 119) 以外に、もう一つのヒスチジン (His 48) も関与していることが明らかにされた。このことは、3'-CMP の結合に伴ってコンホメーションが変化し、His 48 の位置する環境が変わった結果、みかけの pK および  $\Delta H_i^\circ$  が変化したことで説明される<sup>17, 18)</sup>。

### 2.2.2 タンパク質の pH 滴定

この方法も、本来、タンパク質表面の解離基の状態を知るものとして採用されているが、低 pH 領域における滴定からはしばしばコンホメーション変化を推測することがある。その原理は、低い pK 値を持つカルボキシル基のイオン化熱が非常に小さい ( $\Delta H_i^\circ \approx 0$ ) ことによる。すなわち、低 pH 領域では反応熱による pH 滴定曲線がほとんど勾配を持たず、タンパク質はみかけ上滴定されないことになる。実際、低 pH で安定なリゾチー

ムの場合、この領域での滴定曲線はほとんど水平になる (図 1.6)。図 1.7 はキモトリプシンノーゲン A の滴定の例であるが、この場合には低 pH で勾配のある曲線を示す。この勾配に対応する  $\Delta H$  は正常な解離基の  $\Delta H_i^\circ$  以外の要因に基づくものであり、なんらかの分子内での局所的構造変化が起こった結果であると推定される。

このような pH 滴定で観測されるコンホメーション変化は低い pH に限られており、中性や高い pH ではアミノ酸側鎖の大きなイオン化熱に埋もれてしまって観測することはできない。

### 2.2.3 変性熱の測定

前二者がタンパク質の局所的な変化に対応するものであるのに対し、ここでは分子全体にわたる大きなコンホメーション変化の測定について述べる。測定系は、pH 変化や塩酸グアニジンなどの変性剤によるどちらかといえば特異性に乏しい変性反応を対象としている例が多い。方法としては、酸、アルカリもしくは変性剤をタンパク質溶液と混合する方式をとる。環境をかなり drastic に変化させるため、希釈熱、混合熱の寄与が大きく、ブランクの補正が測定値の精度に大きく影響する。さらに、変性剤による場合には、その中に含まれる反応が複雑であり、たとえばコンホメーション変化に加えて変性剤とタンパク質の結合過程の熱変化も含まれてしまう。その結合は非特異的であるため、それによる熱量を補正してコンホメーション変化のみに基づくエンタルピー変化を評価することはなかなか難しい。Pfeil<sup>20)</sup> は、リゾチームの塩酸グアニジン変性熱を測定し、できるだけこれらの寄与を厳密に補正しようとしている。このような変性剤を用いた変性では、種々の補正を慎重に行なわなければ正確さを欠いた意味のないデータになってしまう。また、変性状態が分子論的に全く無秩序なものであるだけに、このような実験方法自体の有意さを疑問とする意見もある。この点、II で述べるように scanning calorimetry を併用することにより、より高度な熱力学的把握にまで進めることができることを理解すべきであろう。

図 1.8 はリゾチームの塩酸グアニジンによる変性熱測定の例で<sup>20, 21)</sup>、最終塩酸グアニジン濃度 (0~5 mol dm<sup>-3</sup>) の範囲での反応熱をプロットしたものである。1~3 mol dm<sup>-3</sup> の間の反応熱の急激な変化は変性 (コンホメーション変化) に基づくものである。その前後の点線で示される一定の勾配は、未変性状態および変性状態のタンパク質に対する塩酸グアニジンの結合によるエンタルピー変化を意味し、みかけの変性のエンタルピーは変性の中点である 1.9 mol dm<sup>-3</sup> グアニジン濃度における 2 本の点線の差より  $\Delta H_{app} = +32 \text{ kcal mol}^{-1}$  と得られた。さらに、変性状態に移行する過程で特異的に結合する塩

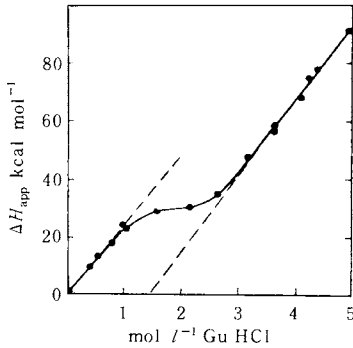


図 1.8 塩酸グアニジンによるリゾチームの変性熱 (pH 1.5, 298 K)<sup>21)</sup>

酸グアニジンの反応熱  $\Delta H_{\text{pref}} = -22 \text{ kcal mol}^{-1}$  を補正することにより、タンパク質の正味の変性エンタルピー変化を  $\Delta H = +54 \text{ kcal mol}^{-1}$  と得た (この計算については II で詳しく述べる)。

一方、多くのタンパク質には S-S 結合が含まれていて、そのタンパク質構造に対する熱力学的寄与の大きさの解明も興味ある課題である。S-S 結合はペプチド鎖の立体構造保持の役割を果たしている唯一の共有結合であり、これを切断することによって当然コンホメーション変化が誘起されると予想される。たとえば、分子内に 3 個の S-S 結合を持つインスリンにジチオスレートを加えて S-S 結合を還元すると旋光度が大きく変化し、このことが裏付けられる。この反応系の熱測定は図 1.1 に緩衝液の種類を変えたときのものを示してあるが、これから、S-S 結合切断に基づくエンタルピー変化を  $\Delta H = +51.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  と得た<sup>8)</sup>。この値は、一般の球状タンパク質の熱変性や塩酸グアニジン変性におけるエンタルピー変化と同程度の大きさである。

このような特異的な反応による変性熱の測定は、変性剤を用いる場合と違って、コンホメーションの熱力学的性質をより詳細に明らかにすることが可能である。今後、もっと多くの特異的なタンパク質の反応系が発見されればこの分野の解析が一段と深められるだろう。

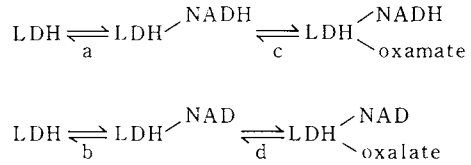
#### 2.2.4 反応熱の温度依存性と熱容量変化

反応に伴う熱容量変化  $\Delta C_p$  の大きさも、しばしばコンホメーション変化の結果として説明される。エンタルピー変化の温度依存性は、

$$\frac{\partial \Delta H}{\partial T} = \Delta C_p \quad (1.2)$$

により熱容量変化  $\Delta C_p$  を与える。したがって、反応熱をあるひとつの温度だけで評価するのではなく、いくつかの温度で測定することによって、エンタルピー変化の温度に対するプロットの勾配から熱容量変化が求められる。

ブタ心筋の乳酸脱水素酵素 (LDH) への補酵素 (NAD, NADH) の結合、さらにその複合体への基質アナログ (oxamate, oxalate) の結合の熱測定から、下に示す各ステップでの熱力学量が得られた<sup>22)</sup> (表 1.4 参照)。



これらの過程の  $\Delta C_p$  はいずれも負の値を示す。このことはリガンド結合に伴って何らかのコンホメーション変化の起こっていることを示唆する。このコンホメーション変化は、疎水性基の露出あるいは系の rotational mode および vibrational mode における自由度の減少を反映したものとみられる。一方、dogfish の LDH を用いた LDH-NADH-oxamate 複合体の X 線解析によれば、LDH の状態に比べて 6% の体積減少がみられる。この酵素は心筋よりもむしろ骨格筋 LDH に近い種類のものであり、先のブタ心筋起源の LDH と単純に比較することはできないが、ブタ骨格筋の LDH も NADH との結合過程の熱測定で同様な負の  $\Delta C_p$  を示す<sup>23)</sup> (表 1.4 参照) ことから類推して、心筋 LDH-NADH-oxamate 系でのコンホメーション変化が体積減少を伴う種類のものであるとみなして差支えないだろう。

このような例にみられるように、反応に伴う熱容量変化  $\Delta C_p$  は、直接コンホメーション変化の中味を知ることにはできないまでも、少なくともコンホメーション変化の度合を示す一つの尺度として重視されるようになってきている。リガンド結合および 2.3 で述べるタンパク質間相互作用の熱測定から  $\Delta C_p$  の評価されているものを他の熱力学量とともに表 1.4 にまとめた。この表にみられるように、大きな  $\Delta C_p$  値をとる場合には負の符号を持つものが多い。一般的な結論を導くにはまだ実例がそれほど多くないが、これまでのところ、タンパク質間相互作用やオリゴマータンパク質へのリガンド結合では大きな負の  $\Delta C_p$  を持つものが多いようである。またその場合、負の  $\Delta C_p$  を示す系では、その反応に疎水性相互作用の寄与が大きく含まれているとの推定がしばしばなされている。

rigid なタンパク質として知られているリゾチームの場合、基質アナログ結合に伴う  $\Delta C_p$  がほとんど 0 であり、また上記の LDH の結合とも併わせ、 $\Delta C_p$  がコンホメーション変化に対応することが理解されるだろう。この点をさらに詳しく掘り下げた解析法、考え方については 2.4 で述べる。

一般に、生体高分子を含む反応系においては、反応熱

表1.4 タンパク質反応系の熱力学量 (298 K)  
(直接熱測定により求められているものの中で $\Delta C_p$ の記載のあるもののみ)

反応系	pH	リガンドモル当り				文献	
		$\frac{\Delta G}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta H}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta S}{\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta C_p}{\text{kJK}^{-1}\text{mol}^{-1}}$		
リゾチーム + GlcNAc (GlcNAc) <sub>3</sub>	5.0	-9.0 -28.8	-24.3 -56.8	-51 94	-0.22 0.17	13)	
グルタミン酸 脱水素酵素 + AMP	7.6	-25.9	-24.3	8.4	0.33	15)	
ADP		-31.0	-51.9	-71	-0.50		
カルボニックベンゼンスルホン アンヒドラーゼ + アミド CL 11.366 <sup>a)</sup>	8.2	-36.1	-45.7 -60.3	-32	0.13 0.14	37)	
グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 + NAD (酵母)	7.3	-31.0	-51.9	-70.3	-2.18	38)	
(ウサギ筋肉) + NAD	7.3	1 <sup>b)</sup> -36.5	-92.0	-169		38)	
		2-36.5	-69.9	-94.6			
		3-36.5	-69.9	-94.6	-0.92		
		4-24.2	-60.2	-122			
乳酸脱水素酵素 (ブタ心筋) + NADH	a <sup>c)</sup>	-30.9	-44.4	-45.2	-0.70	22)	
	NAD	7.0	-19.9	-25.5	-18.8		-0.20
	oxamate	c	-28.2	-63.2	-117		-1.69
	oxalate	d	-32.4	-32.6	0		-1.42
(ブタ骨格筋) + NADH	7.0	-28.9	-31.6	-9.0	-1.36	23)	
アルドラーゼ + ヘキストール 1,6- 二リン酸	7.5	-30.3 <sup>d)</sup>	5.4 <sup>d)</sup>	119 <sup>d)</sup>	-4.60	39)	
抗TNP抗体 + TNP-L-リジン	7.4		-90.8		-0.65	40)	
アビジン + ビオチン	9.0		-94.1		-0.99	41)	
ヘモグロビン + ATP	6.9	-27.2	-21.8	21	1.09	42)	
		DPG	-20.5	-37.7	-59		0.42
ミオシン + ADP	7.8		-64.5 <sup>e)</sup>		-1.4	43)	
トリプシン + 大豆トリプシン インヒビター	5.0	-5.9	-16.9	-36.8	-0.23	44)	
	4~8.5				-0.42~-1.26	29)	
ヘモグロビン + ハプトグロビン	5.5	-38.3	-139	-337	-7.86	31)	
イムノグロブリン G + Aタンパク質 Fcフラグメント (S. aureus)	7.0		-165		-4.31	30)	
イムノグロブリン G	H鎖 + L鎖 ( $\kappa$ )	5.4		-75.0	-10	32)	
	H鎖 + L鎖 ( $\lambda$ )	5.4		-112.5	-8.7		
フラジェリン重合 (Pr. mirabilis)			-145		-12.6	33)	
	(Salmonella)		-53.1		13.8	34)	

a) 5-benzenesulfonamido-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide

b) 4種のサイトを示す c) 本文中反応スキーム参照

d) 酵素モル当り e) 285 Kでの値



を特定の温度だけで求めるのではなく異なった二種以上の温度での測定を試みる事が望ましい。わずかな温度範囲で反応のエンタルピー変化  $\Delta H$  の符号が逆転するような場合もあり得るし(たとえばアルドラーゼ<sup>20)</sup>), そのような  $\Delta H$  の温度依存性から  $\Delta C_p$  を評価することで熱力学的性質がより鮮明に映し出されることになるのである。

なお, 熱容量変化を実測する方法としては scanning calorimetry があるが, この方法では一般に温度変性と呼ばれる熱的に誘起されたコンホメーション変化の際の熱力学量が得られる。この方法については, タンパク質の熱力学的安定性を導く重要な手段として独立に II で紹介する。(つづく)

### 文 献

- 1) I. Wadsö, "Thermochemistry and Thermodynamics", ed. by H. A. Skinner, p. 1, Butterworth-University Press (1972)
- 2) J. M. Sturtevant, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 3, 35 (1974)
- 3) 高橋克忠, 熱測定 1, 61 (1974)
- 4) 高橋克忠, 蛋白質核酸酵素 20, 1169 (1975)
- 5) 深田はるみ, 生物物理 16, 194 (1976)
- 6) 田村 守, 熱測定 3, 114 (1976)
- 7) 田村 守, 児玉孝雄, 生物物理 16, 202 (1976)
- 8) 深田はるみ, 高橋克忠, 第12回熱測定討論会要旨集, p. 24 (1976)
- 9) R. M. Izatt, J. J. Christensen, "Handbook of Biochemistry", ed. by H. A. Sober, p. J58, Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland (1970)
- 10) D. H. Atha, G. K. Ackers, *Biochemistry* 13, 2376 (1974)
- 11) C. G. Merino, F. Blanco, J. Laynez, *FEBS Letters* 67, 9 (1976)
- 12) C. Bjurulf, J. Laynez, I. Wadsö, *Eur. J. Biochem.* 14, 47 (1970)
- 13) C. Bjurulf, I. Wadsö, *Eur. J. Biochem.* 31, 95 (1972)
- 14) M. Fogel, A. Albert, R. L. Biltonen, *Biochemistry* 14, 2616 (1975)
- 15) S. Subramanian, D. C. Stickel, H. F. Fisher, *J. Biol. Chem.* 250, 5885 (1975)
- 16) S. K. Banerjee, G. E. Vanderhoff, J. A. Rupley, *J. Biol. Chem.* 249, 1439 (1974)
- 17) M. Fogel, R. L. Biltonen, *Biochemistry* 14, 2610 (1975)
- 18) M. Fogel, R. L. Biltonen, *Biochemistry* 14, 2603 (1975)
- 19) D. D. F. Shiao, J. M. Sturtevant, *Biopolymers* 15, 20 (1976)
- 20) W. Pfeil, P. L. Privalov, *Biophys. Chem.* 4, 33 (1976)
- 21) P. L. Privalov, *Pure Appl. Chem.* 47, 293 (1976)
- 22) F. Schmid, H-J. Hinz, R. Jaenicke, *Biochemistry* 15, 3052 (1976)
- 23) H-J. Hinz, R. Jaenicke, *Biochemistry* 14, 24 (1975)
- 24) N. Langerman, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* 10, 2809 (1971)
- 25) D. H. Atha, G. K. Ackers, *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 392 (1974)
- 26) S. K. Banerjee, A. Pogolotti, Jr., J. A. Rupley, *J. Biol. Chem.* 250, 8260 (1975)
- 27) C.G. Merino, F.G. Blanco, J. Laynez, *FEBS Letters* 68, 129 (1976)
- 28) H.C. Ho, J.H. Wang, *Biochemistry* 12, 4750 (1973)
- 29) M.T. Barnhill, Jr., C.G. Trowbridge, *J. Biol. Chem.* 250, 5501 (1975)
- 30) J. Sjöquist, I. Wadsö, *FEBS Letters* 14, 254 (1971)
- 31) F. Lavialle, M. Rogard, A. Alfsen, *Biochemistry* 13, 2231 (1974)
- 32) K. J. Dorrington, C. Kortan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 529 (1974)
- 33) W. Bode, *Biophys. Struct. Mechanism* 1, 55 (1974)
- 34) R. Valdes, G. K. Ackers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1403 (1974)
- 35) J. W. H. Sutherland, J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3565 (1976)
- 36) J. M. Sturtevant, 第12回熱測定討論会要旨集 p. 60 (1976)
- 37) J. S. Binford, S. Lindsog, I. Wadsö, *Biochim. Biophys. Acta* 341, 345 (1974)
- 38) S. F. Velick, J. P. Baggott, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* 10, 779 (1971)
- 39) H-J. Hinz, D. D. F. Shiao, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* 10, 1347 (1971)
- 40) B. G. Barisas, S. J. Singer, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* 11, 2741 (1972)
- 41) J. Suurkuusk, I. Wadsö, *Eur. J. Biochem.* 28, 438 (1972)
- 42) B. Hedlund, C. Danielson, R. Lovrien, *Biochemistry* 11, 4660 (1972)
- 43) T. Kodama, R. C. Woledge, *J. Biol. Chem.* 251, 7499 (1976)
- 44) R. J. Baugh, C. G. Trowbridge, *J. Biol. Chem.* 247, 7498 (1972)