

生化学における熱測定研究法

I 生体物質の生物的機能に関連した研究法(下)

深田はるみ**, 高橋克忠**

2.3 タンパク質間相互作用を探る方法

2.3.1 同種のタンパク質の特異的会合

a) タンパク質溶液の濃度ジャンプ

サブユニット構造を持つタンパク質など会合状態をとっているものは、その濃度を低くしていくと次第に解離する。したがって、一般の高分子溶液論における分子間相互作用を調べるのと同じ手法でタンパク質溶液を逐次希釈する際の熱測定から会合のエンタルピー変化を得ることができる場合がある。

この方法で会合熱の求められたものとしては、ヘムエリトリンにおける八量体生成²⁴⁾、 β -ラクトグロブリンAの四量体への会合²⁵⁾、リゾチームにおける自己会合²⁶⁾などがある。

原理的にはどのような会合系にも適用できるものであるが、現実には、解離条件を満足するような低い濃度範囲で測定することが困難なものが多く、種々のタンパク質の系で有意なデータが求められるのは現在普及している装置の精度がさらに一段改良されてからのことであろう。

b) リガンド結合熱のタンパク質濃度依存性

リガンド結合に伴って会合状態が変化するタンパク質がある。そのような系では、先の希釈という直接的な手段ではなく、リガンド結合熱のタンパク質濃度依存性の解析から間接的に会合熱を評価することがある。

このような方法で会合熱が求められた例としてホスホリラーゼbにおける二量体から四量体への会合²⁷⁾がある。この酵素は通常二量体であるが、リガンドであるAMPの結合に伴って四量体への会合が協同的に促進させられる。AMP結合熱の酵素濃度依存性は図1.9のように得られた。1.5~2.66 mg cm⁻³の酵素濃度を境に結合熱が

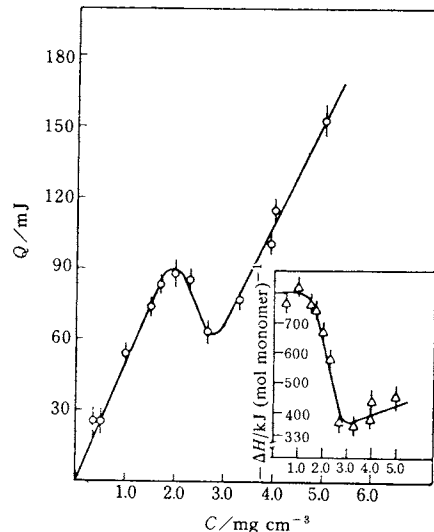


図1.9 ホスホリラーゼbとAMPの結合熱の酵素濃度依存性(pH9.6, 298K)²⁷⁾

異常な変化を示すが、これが二量体から四量体への変化に対応するものであることは超速心分析による沈降係数の測定結果からほぼ間違いないと推定される。四量体への会合のエンタルピー変化は25℃で $\Delta H = +400 \text{ kJ (mol monomer)}^{-1}$ であった。ただし、リガンド濃度に多少差があるが、同じタンパク質濃度依存性から求めたHoらの結果では、18℃で $\Delta H = -360 \text{ kJ (mol monomer)}^{-1}$ ²⁸⁾となり、測定温度が異なるとはいえ、二者による結果のくい違いが余りにも大きいようである。いずれかが間違っているのかもしれないが、どちらも正しくて両者を詰めて行けばさらに新しい事実が得られる可能性もある。

リゾチームでも基質アナログ(GlcNAc)₃との結合熱の酵素濃度依存性が調べられている²⁹⁾。濃度を上げて行くとリゾチームは二量体、三量体、……のように自己会合して行く。しかし、この場合は活性の発現と直接関わりのあるような特異的な会合ではないように思われる。

2.3.2 異種タンパク質間の特異的会合

この例としてはトリプシンへの大豆トリプシンインヒ

* 生化学における熱測定研究法I(上)熱測定4(2)67-75(1977)

** 大阪府立大学農学部生物物理化学研究室:堺市百舌鳥梅4丁目

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

ビター(STI)の結合²⁹⁾, イムノグロブリンGのFcフラグメントと *S. aureus* のAタンパク質の反応³⁰⁾, ヘモグロビンとハフトグロビンの結合³¹⁾, イムノグロブリンGのH鎖とL鎖の会合³²⁾などがある。

トリプシンへのSTIの結合はエンタルピー変化および熱容量変化にpH依存性がみられるが, それはSTIに含まれるヒスチジン残基1個に由来するものと説明されている。さらに, 単に1個の解離基による変化としては, ΔC_p が大きなpH依存性を示すことから, そのヒスチジン残基は他の残基と相互作用していると結論されている³³⁾。しかし ΔC_p の精度上の問題もあり, ここまで言いきるのは少し性急にすぎるかもしれない。プロテアーゼインヒビターはこのSTI以外にも多種知られており, それらとの結合熱を比較するといった方向で実験値を積み上げて行くことも必要であろう。

2.3.3 タンパク質の重合

サブユニットの非共有結合的な重合が, バクテリアのペン毛タンパク質フラジェラを構成しているフラジェリン^{33, 34)}で, また脳などに存在するチューブリン³⁵⁾で測定されている。フラジェリンの重合は起源の異なる二種のものについての測定がある。Bodeは*Pr. mirabilis*のフラジェリンについて10~33°Cの温度範囲で重合熱を測定し, $\Delta C_p = -12.6 \text{ kJ K}^{-1} (\text{mol flagellin})^{-1}$ と得ている³³⁾。一方, Valdesらはサルモネラ菌のものについての25°Cと40°Cの測定から, $\Delta C_p = +13.8 \text{ kJ K}^{-1} (\text{mol flagellin})^{-1}$ と前者と大きく異なった値を得ている³⁴⁾。この違いは, 菌種によるフラジェリン構造の違いによると解釈するには大きすぎるようである。40°Cという温度ではフラジェリンの熱変性が起こっている可能性もあり, また, タンパク質相互作用では, ΔC_p が負の値を持つ例が多いことから, Bodeの値の方に妥当性がありそうである。

2.4 生化学反応における熱容量とエントロピー変化

2.2.4で生化学反応系には熱容量変化を伴うものが多く, コンホメーション変化との対応がなされていることを述べた。ここでは, 実際に ΔC_p がどのようなミクロな変化を反映しているかをみる目的でSturtevantにより提案されている新しい解析法を紹介する³⁶⁾。

タンパク質反応系における相互作用の主要な熱力学的因子として, 疎水性相互作用とinternal vibrational modeさらにコンホメーションの変化を考える。表1.5にそれらが増加した時に予想される熱容量変化, エントロピー変化(ΔC_p , ΔS_u°)の符号を記した。

いま, 与えられた ΔC_p , ΔS が上記三因子の一次結合で表わされるとすると,

表1.5 ΔC_p および ΔS_u° におよぼす各因子の影響³⁶⁾

An Increase in	ΔC_p	ΔS_u°
疎水性基と水の相互作用	+	-
Vibrational mode	+	+
水素結合	+	-
荷電グループの露出	-	-
コンホメーション	0	+

$$\Delta C_p = \Delta C_{p(h)} + \Delta C_{p(v)} \tag{1.3}$$

$$\Delta S_u^\circ = \Delta S_{u^\circ(h)} + \Delta S_{u^\circ(v)} + \Delta S_{u^\circ(c)} \tag{1.4}$$

と書ける。ここで, h, v, cはそれぞれ疎水性相互作用, vibrational mode, コンホメーションを表わす。

ΔS_u° はunitary entropyで, みかけのエントロピー変化 ΔS に対し, リガンド結合など反応の前後で分子数に変化のある場合のcraticなエントロピー $\Delta S_{cratic} = -33.4 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ を補正したもので, $\Delta S_u^\circ = \Delta S^\circ - \Delta S_{cratic} = \Delta S^\circ + 33.4$ で与えられる。

実測された ΔC_p , ΔS_u° を各項にふり分けるために次のような経験式を用いる。

$$\Delta S_{u^\circ(h)} = (-0.26 \pm 0.08) \Delta C_{p(h)} \text{ at } 298 \text{ K} \tag{1.5}$$

$$\Delta S_{u^\circ(v)} = (1.047 \pm 0.003) \Delta C_{p(v)} \text{ at } 250 \sim 310 \text{ K} \tag{1.6}$$

これらの関係を用いて, 乳酸脱水素酵素へのNADH結合反応の熱測定²⁹⁾で得られた ΔC_p , ΔS_u° をもとに筆者が計算してふり分けた各値を表1.6に示す。この計算で, $\Delta S_{u^\circ(c)}$ は無視した。これらの値から, リガンド結合に伴い疎水基間相互作用は増加するのに対し, vibrational modeは減少することがわかる。すなわち, 疎水性相互作用が駆動力として働いていることになる。また, ΔS_u° に対しては $\Delta S_{u^\circ(h)}$, $\Delta S_{u^\circ(v)}$ とも同程度に寄与しており, 温度の上昇に伴っていずれの値も減少している。従来, 大きな熱容量変化, ΔC_p が観測されると, それは主として疎水性相互作用によるものと記述されてきたが, 上のような解析から, 疎水性相互作用に加えてvibrational modeの変化も大きな寄与をしていることを伺うことができる。

ただ, ここでは $\Delta S_{u^\circ(c)}$ が無視されているほか, 水素結合の状態変化や静電的相互作用に基づく熱容量, エントロピー変化が無視されているなど問題点も多いが, 熱測定という手段を通して熱力学的性質の新しい解釈を生み出す方向を示したのもとして, 今後注目をあびるようになるのではないと思われる。

3. Scanning Calorimetry

Scanning Calorimetry (走査カロリメトリー)の中心は熱容量測定であり, 生体高分子でこの方法が適用されるのは主として相転移の一種である熱変性の場合で,

表 1.6 乳酸脱水素酵素の NADH 結合における熱力学量 (pH 7.0)⁴⁵⁾

温度 K	ΔG_u° kJ mol ⁻¹	ΔH kJ mol ⁻¹	ΔS_u° JK ⁻¹ mol ⁻¹	$\Delta C_{p(h)}$ JK ⁻¹ mol ⁻¹	$\Delta C_{p(v)}$ JK ⁻¹ mol ⁻¹	$\Delta S_u^{(h)}$ JK ⁻¹ mol ⁻¹	$\Delta S_u^{(v)}$ JK ⁻¹ mol ⁻¹
278	-37.5	-4.39	119	-1180	-180	310	-190
288	-38.4	-18.0	70.8	-1150	-220	300	-230
298	-38.9	-31.6	24.4	-1110	-250	290	-260
308	-38.9	-45.1	-20.2	-1080	-290	280	-300

$$\Delta C_p = -1360 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

a) 文献 23) にある ΔH , ΔG , ΔS のデータをもとに筆者が計算したものの。

熱的に誘起された構造変化に伴う熱容量異常を測定し、それから転移のエンタルピー変化を評価する⁴⁶⁾。けれども実際の操作としては熱容量の絶対値を求めることはあまりやらない。というのは生体物質の多くは希薄な水溶液として存在し、その熱容量は溶媒としての水の熱容量よりはるかに少いため、有意なデータを得るためには極度に精度の高い測定が要求されるためである。そこで転移を含む比較的狭い温度領域で溶媒の熱容量との差をとりながら、熱容量異常だけを観察する熱容量差測定 (differential heat capacity calorimetry) が行なわれている。現在もっとも精度の高い測定装置である Privalov の装置 (differential scanning calorimeter) とその熱容量差測定原理を述べる。

3.1 Privalov の熱量計と熱容量差測定原理

図 1.10 に Privalov の熱容量差測定装置を示す^{46), 47)}。試料セルおよび溶媒セル (C, C') は直径 20mm, 容量 1 cm³ の金製円盤状のものである。E, E' は試料および溶媒注入用の白金パイプで、その先端は定圧に制御されて、昇温に伴う溶液中でのガス発生を防いでいる。セルの温度制御をより精密に行なうため機械的に圧着した二重の断熱壁 A_I, A_{II} を設けている。温度走査は昇温のみであるが、その速度は最大で 2 Kmin⁻¹, 通常タンパク質溶液では 0.1 Kmin⁻¹ の昇温速度が採られている。

二つのセルには抵抗値 R の等価のヒーターが組み立てられていて、一定電流 I を通じて昇温させるが、試料の状態変化で試料側の熱容量が溶媒側のそれに比べて単位時間に \dot{C}_p だけ高くなると、それに対応して試料セルの温度は、 $\Delta T = I^2 R / \dot{C}_p$ だけ低くなる。この二つのセル間の温度差 ΔT は熱電対により検出され、それとともにセル温度差制御回路が作動して試料セルに流す電流を $I + \Delta I$ 、溶媒セルに流す電流を $I - \Delta I$ となるように変化させ、二つのセル間に生じた温度差を零にする。セル間の熱容量差は二つのセルの加熱速度の差

$$R(I + \Delta I)^2 - R(I - \Delta I)^2 = 4RI \cdot \Delta I \quad (1.7)$$

すなわち、温度差を打ち消すために流した余分の電流 ΔI に比例することになるので、X-Y 記録計を用いてセルの温度を X 軸に、 ΔI を Y 軸にとり熱容量差-温度曲線を

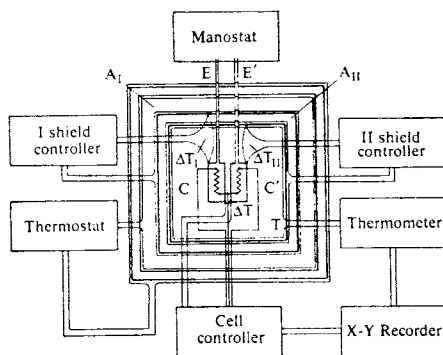


図 1.10 Privalov の熱容量差測定装置⁴⁷⁾

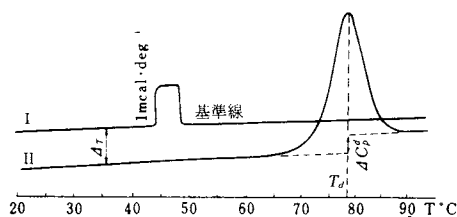


図 1.11 リゾチーム溶液の熱容量差曲線⁴⁶⁾
リゾチーム濃度 0.16% pH 4.5

描かせる。

図 1.11 にリゾチーム溶液を加熱したときの熱容量差曲線を示してある⁴⁶⁾。

熱容量を測定するためには昇温の過程で系が各温度において反応速度的にも熱的にも平衡状態になっていなければならない。このため簡便な装置として一般に普及している DSC 装置、定量 DTA 装置に比べ温度走査速度は低い。

熱容量差測定においてももっとも問題となるのはベースラインのとり方である。図 1.11 のリゾチームの測定例ではベースラインが非常に明瞭にひけるが、生体高分子一般については必ずしもこのように単純でない。実際変性に先立って前変性状態と呼ばれる微小な熱容量変化がみとめられる場合もある。したがって多段階の変性によ

って生じる小さな熱容量変化をベースラインの中に埋めてしまうようであれば、変性のエンタルピーを正しく評価していないことになり、測定値の精度および確度に大きく響いてくる。合成ポリペプチドの場合には変性に相当する温度転移が比較的すどく、ベースラインを差し引いて熱容量異常だけを精度よく分離することは容易であるが⁴⁸⁾、生体高分子では複雑な変性機序を示すのでそれが難しい。

ベースラインのとり方に不安があるということは測定における精度はもとより確度にとって致命的である。実際には確度について問われることは少ないが、それは対象である生物試料がいくら精製してもその純度が99%止まりであることから、必要以上に確度を要求することが意味をもたないからである。

3.2 測定の実際

3.2.1 タンパク質の熱変性

タンパク質はその生物的機能を保持するために特定の空間構造(コンホメーション)をとっており、温度が高くなると熱運動、溶媒との相互作用などのためにその構造がくずれる。この過程はまた本来の生物活性を失うという立場からタンパク質の熱変性という言葉で表現されている。

熱変性の過程の熱力学的性質は古くから関心の持たれてきたテーマであり、今日でも熱容量差測定を通じてもっともよく研究されているものである。すでに述べた図1.11におけるリゾチームの例は球状タンパク質の熱容量差測定の典型的なもので、熱変性に伴う熱容量異常が観測されている。熱容量のピーク温度はまたそのタンパク質の変性温度と称されることが多いが、単一のピークを示さない変性もあるので注意がいる。

図1.11の曲線Iは二つのセルがともに溶媒のみを含

む場合(ベースライン)で、曲線IIは試料セルにタンパク質溶液が入っている場合である。70℃~90℃のピークは熱変性をあらわし、その面積から変性のエンタルピー ΔH_d を決める。このとき一般に変性の前後で異ったベースラインが観測される。この差は変性したタンパク質と未変性タンパク質の熱容量の差 ΔC_p であり、大きなコンホメーション変化を伴う変性過程ではエンタルピーと同時に熱容量が変化することを意味している。ピーク面積から変性のエンタルピー ΔH_d を評価するときには、変性温度 T_d を境にして変性前後のベースラインを点線のように延長してきめる。

タンパク質の熱変性はいうまでもなく様々の環境因子によって支配され、その熱力学的性質も条件によって異ってくる。図1.12に四種の球状タンパク質溶液について種々のpHで観察された熱容量差曲線を示してある⁴⁹⁾。安定なpH程、転移温度が高くなる。水素イオン濃度(pH)のほか、イオン強度や緩衝液の種類、試料としてのタンパク質濃度、あるいは変性剤濃度、などが測定に当って常に考慮されなければならない因子である。

試料濃度はあまり高くすると分子内だけでなく分子間の相互作用まで含めてしまう恐れがあるため、1%以下の濃度でなければならない。いいかえれば、これだけの低濃度での測定が可能な検出感度が熱容量差測定装置に要求されるのである。

Privalovは多くの系で精密な熱容量差測定を行ない、球状タンパク質の熱変性を次のように総括している⁴⁶⁾。

- 1) 常温における未変性タンパク質の熱容量はいずれも $1.3\text{JK}^{-1}\text{g}^{-1}$ 程度である。
- 2) 未変性状態では温度上昇に伴い直線的に熱容量が増加する。
- 3) 変性タンパク質の熱容量は未変性のそれより必ず高い($\Delta C_p > 0$)。
- 4) 熱安定性のよいものほど変性のエンタルピー変化も大きく、

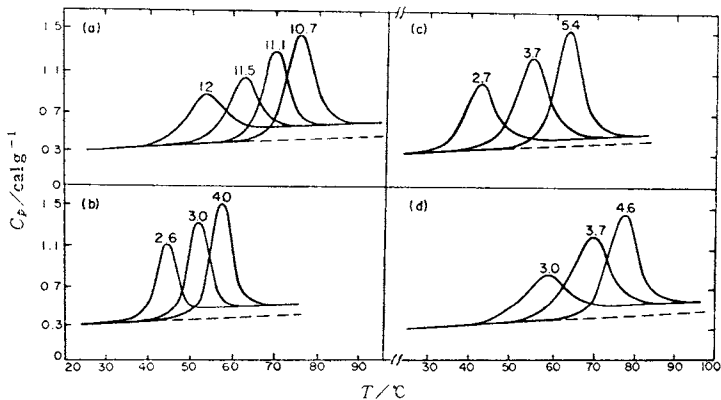


図1.12 球状タンパク質の種々のpHにおける熱容量差曲線⁴⁹⁾ 数字はpH, (a)ミオグロビン, (b) α -キモトリプシン, (c)リボスクレアーゼ, (d)チトクロームC

転移は鋭くなる。5) van't Hoffの関係から得られたエンタルピー変化は熱容量測定で決定されたものと誤差範囲内で一致し、球状タンパク質の熱変性は二状態転移で考えてよい。

繊維状タンパク質の熱変性は上の球状タンパク質とは少し性質が異なるようである。現在三本鎖ヘリックス構造のコラーゲンの転移が知られている^{46,49)}。コラーゲンの分子量は先に述べた球状タンパク質に比べはるかに大きい、分子の中に数十個の転移挙動単位(協同効果単位 cooperative unit)が含まれていて、その単位の大きさが熱容量測定の結果から約12,000daltonと見積られている。この大きさは分子全体が協同効果単位である球状タンパク質のそれとほぼ等しい(3.3参照)。このことは生体高分子構造の熱力学的安定性が一定の大きさを単位としてきまることを示唆しており興味深い。

次に固体状態の性質として結晶の融解熱測定を述べる。タンパク質結晶は一般の結晶と同じく結晶多形を示すことが知られており、その熱測定を通じて各結晶形の安定性を比較したり、結晶間の相互の変換をみることができる⁵⁰⁾。融解の熱力学量を定量的に評価する場合は別にして、単に結晶の安定性を定性的に論ずる場合には、一般のDSC装置、定量DTA装置でもかなりの解析が可能である。けれども温度走査速度にはじゅうぶん注意しなければならない。図1.13はペプシン結晶の融解のサーモグラムを種々の温度走査速度でみたものである⁵¹⁾。現在市販されているDSC装置に比べ、きわめて低い温度走査速度(0.56~21.4 K h⁻¹)による測定にもかかわらず、ピーク温度(変性温度 T_d)は図の右側に示すように温度走査速度により著しく変化する。またピークのすださ

を示す半値幅(ピークの1/2高さを与える温度幅 $\Delta T_d^{1/2}$)も温度走査が遅いほど狭く、走査速度零における補外値はほぼ $\Delta T_d^{1/2} = 0$ となり、球状タンパク質結晶の融解も低分子結晶と同じく、定温における不連続な相転移(isothermal transition)であることが伺われる。

実際にはこの系では結晶の融解熱よりもむしろタンパク質の変性熱をみていることがこの論文で結論されているが、リゾチームについても結晶の融解と分子の変性が同時におこり、両者を区別できないことが滝沢らによって報告されている⁵²⁾。このことが球状タンパク質について一般性のある現象であるとするれば、結晶系への scanning calorimetryの適用範囲がさらに広げられる。滝沢は、結晶系での熱測定の有効性について、タンパク質表面の水分子の状態も考慮した精密な熱容量測定を通じて、生物的機能と密接に関わっている分子内の部分的な構造のゆらぎを明確に把握することができるのではないかと述べている⁵⁰⁾。

3.2.2 生体膜および脂質二重層の温度転移

生体膜の基本構造である脂質二重層が液晶性をもつことは、膜内に保持された酵素など各種機能性タンパク質の活性発現と密接に関連している。この脂質二重層は温度走査することにより結晶の融解熱に相当する吸熱現象を示す。これは二重層内部にある疎水性部(炭化水素鎖)の規則的な配列が温度上昇に伴い熱運動による乱れを生ずるためである。その結果、分子の集合体である膜の構造は巨視的にも変化する。図1.14はその様子をモデル的に示してある。

熱測定による研究の現状は天然の膜を対象とする場合と人工膜モデルについて測定を行う場合の二つの方向に

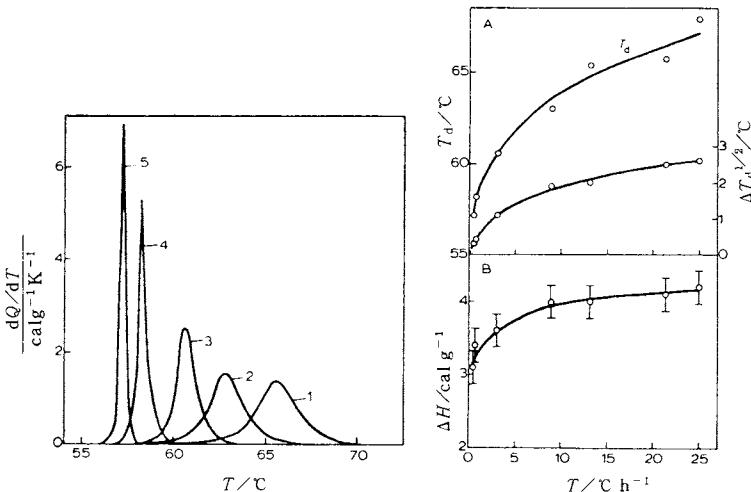


図 1.13 ペプシン結晶の融解サーモグラムにおける昇温速度依存性⁵¹⁾
昇温速度(K h^{-1}):(1)21.4, (2)9.0, (3)3.1, (4)0.8, (5)0.56

わけてみるができる。天然のものを扱う場合には、生体膜、あるいはそれから抽出して再構成した脂質二重層の相転移の性質が脂肪酸組成や酵素活性、毒物に対する感受性などの生物活性と比較されるのが多い。

脂肪酸はその炭化水素鎖の長さや、それに含まれる二重結合の数(不飽和度)により固有の熱運動を示すので、温度に対する巨視的な膜の性質もそれを構成する脂肪酸の種類により異ってくる。特定の脂肪酸を特異的に要求する大腸菌突然変異株を用い、人為的に膜組成を調節してその熱的性質を調べるといこともおこなわれている。

試料の状態には1)抽出した脂質を lamella(薄層状)や vesicle(小胞状)にする、2)もともと含まれているタンパク質は除かないで膜のまま単離してみる、3)それ

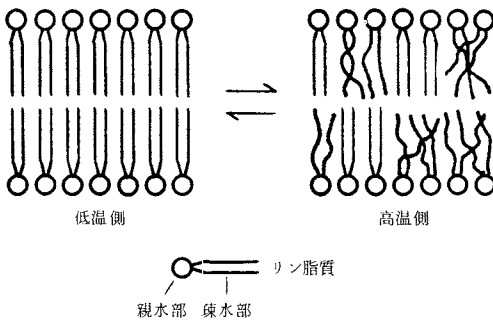


図 1.14 脂質二重層の温度転移

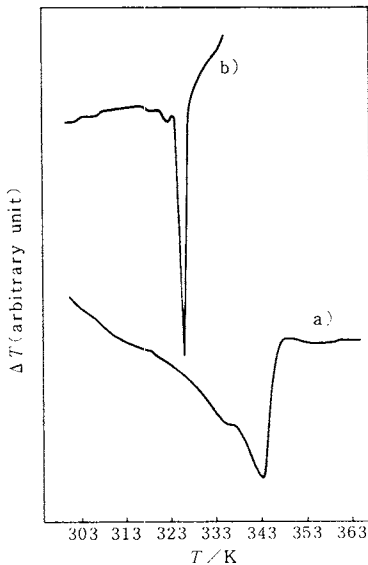


図 1.15 定量DTAによる脂質二重層転移のサーモグラム a)大腸菌から抽出した脂質膜 b)DPPL(ジパルミトイルフォスファチジルコリン)で構成された膜、昇温速度0.6Kmin⁻¹

を外膜、内膜にわけてみる、4)細胞のままみる、というようにいくつもの段階がある。脂質や膜の段階であれば市販のDSC装置、定量DTA装置でもかなりの精度で検出が可能である。図1.15は定量DTAによる転移のサーモグラムの例で、大腸菌から抽出した脂質のもの(a)を、膜モデルとしてDPPL(ジパルミトイルフォスファチジルコリン)で構成した二重層の転移(b)と比較して示してある。単一の脂質で構成した二重層が狭い温度範囲であるような転移をするのに対し、天然の膜に由来する脂質では多種類の脂肪酸を含むのでブロードなサーモグラムになる。タンパク質を含む膜の状態であればさらにブロードになる。

人工膜モデルによる研究はより単純な系を用いて巨視的な膜の物性との関係を明らかにしようとする立場のものである。天然の膜が複雑な脂肪酸組成をもち、その熱測定解析も定性的な段階にとどまっている現状ではこのような単純なモデル系での基礎的なデータの集積は不可欠である。最近Sturtevant⁵³⁾によりPrivalovの装置を用いて示された膜モデルによる実験は脂質組成と相転移の関係を基本的に捉えた重要なもので、今後の発展のための大きな布石になっている。

図1.16はミスチン酸およびパルミチン酸の二種の脂肪酸よりなるリン脂質(dimyristoyl phosphatidylcholine, DMPCおよび dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC)で構成した lamellaの相転移の熱容量差測定の結果である。Aにみられるように二種の脂質の比が変わると転移温度は変化する。転移温度(転移開始温度と終了温度)を脂質組成比に対してプロットしたものがBでみごとな相図が描かれている⁵³⁾。

天然の膜および人工膜モデルを対象とする二つの方法はお互いに相補的な関係にあり、膜の生物学的機能が明らかになるにつれ両者の協力がますます必要となってきている。

3.2.3 核酸の融解

核酸は二重らせん構造が基本骨格となっているが、その融解(すなわち温度を上げることにより二重らせんがほどけてばらばらになる一種の相転移)は3.2.1で述べた球状タンパク質とは性質が異っている。図1.17は塩濃度の異った条件におけるtRNA^{Val}の熱容量差曲線であり、いずれの場合も非常に複雑な形になる^{45,54)}。これをいくつかの転移が重なりあった結果であるとみなし、それぞれの転移が独立であるとして図形解析したのが図中の細線で示したものである。6個の転移曲線に分解されるが、Mg⁺⁺イオンの存在(c, d)により低温側の転移が合している。

このtRNA^{Val}は分子量が25,000で3.2.1で述べた球

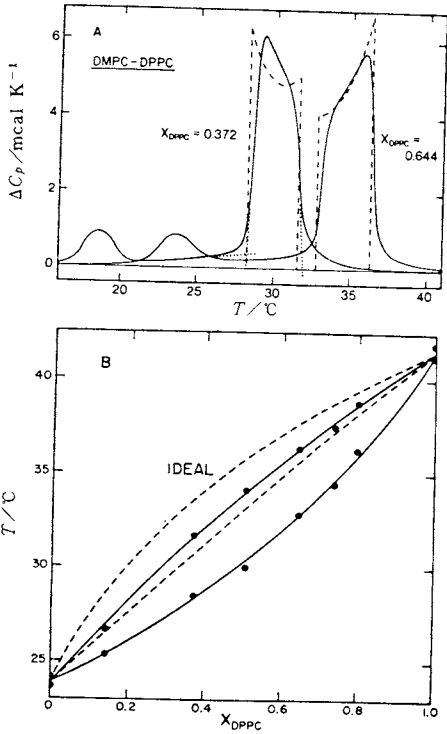


図 1.16 人工膜モデルにおける温度転移⁵³⁾
 (A) DMPCとDPPCの混合系の熱容量差転移曲線, X_{DPPC} はDPPCのモルフラクション, 点線はBの相図に基いて計算された曲線。
 (B) 転移開始温度と終了温度から描かれる相図, 点線は理想系におけるもの。

状タンパク質とほぼ同じ大きさのものでありながら, その温度転移の熱容量差曲線は図 1.12 との比較からもわかるように単純な球状タンパク質のそれとは著しく異っている。このことは核酸が分子内に独立した転移挙動単位を作りやすい性質をもつためと考えられている。すなわち, 球状タンパク質ではアミノ酸側鎖による分子内の相互作用は空間的にあらゆる方向に向けられており, 結果的に分子全体が一つの協同効果単位になる。これに対し, 核酸では二重らせんの基本である塩基対を形成するための各塩基が常にスクレオチド鎖と直角の方向に向いており, 相補的な塩基をもつ特定の鎖の部分でのみ二重らせんを形成して, それぞれが独立した転移を示す小規模単位となるのである。

実際 tRNA は図 1.18 に示すようにいくつかの単位よりなる空間構造をとっている。この単位の転移熱は塩基対の多いものほど大きく, また塩基対のうち, グアニン-シトシン対(G-C対)の多いものほど転移温度は高く

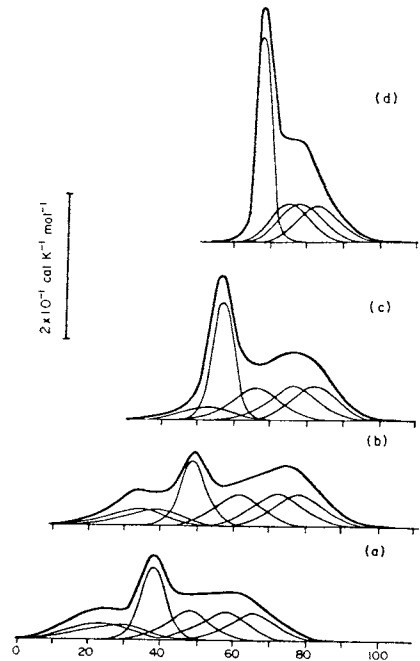


図 1.17 tRNA^{Val}の各種塩濃度における融解熱容量差曲線^{45, 54)}
 塩濃度: (a) 塩なし, (b) $150 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$, (c) $150 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ および $1 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ MgCl}_2$, (d) $1 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ MgCl}_2$

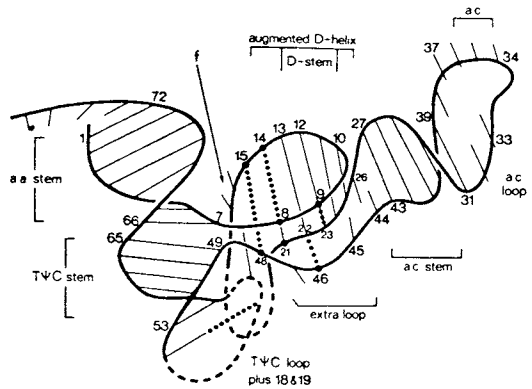


図 1.18 tRNAの構造⁴⁵⁾
 各記号は分子内で形成された二重らせんを基本とする小規模単位をあらわす。

なる。このことを基本にして, 図 1.17 の図形解析で得られた各転移曲線が tRNA 分子内のどの単位のものであるか, その帰属がたやすく決められる。

3.3 生体高分子の転移挙動単位

高分子の熱変性(温度転移)においては、未変性(N)および変性(D)の二状態を考え、各フラクションの比を適当な手段で見積って、その温度依存性から van't Hoff の関係

$$\frac{\partial \ln(N/D)}{\partial (1/T)} = \frac{\Delta H_{v.H.}}{R} \quad (1.8)$$

を用いて変性のエンタルピー(van't Hoffのエンタルピー、 $\Delta H_{v.H.}$)を求めることがよくおこなわれている。ところが、このときのエンタルピー変化 $\Delta H_{v.H.}$ Jmol^{-1} の単位“mol”は単に数学的に与えられるものであって、必ずしもタンパク質分子などの高分子1 molに相当するとは限らない。この場合の“mol”は変性挙動を示すある単位(協同効果単位または転移挙動単位)を指すのであって、それはあるときには分子全体におよぶときもあれば、また1分子の中にその単位がいくつも存在するときもある。この単位が分子全体を指すときには問題はないが、そうでないときにはこのような van't Hoff の関係から得られたエンタルピー変化 $\Delta H_{v.H.}$ は熱測定から得られたもの ΔH_{cal} とは異ってくる。

そこでこの関係をもう少し詳しくみるために $\Delta H_{v.H.}$ と ΔH_{cal} の比をとって考える。一般に合成高分子(ポリペプチド、ポリヌクレオチド)におけるヘリックス-コイル転移では、この比は1よりはるかに小さな値をとる。

$$\Delta H_{v.H.}/\Delta H_{cal} \ll 1 \quad (1.9)$$

すなわち、このようなポリマーの転移では転移挙動を示す単位がポリマー1分子よりもはるかに小さいのが普通で、極端な場合には、それを構成するモノマーに近い状態が転移挙動の単位になっている。高分子物性では統計力学的に導いた式

$$\Delta H_{cal} = n \Delta H_{v.H.} \sigma^{1/2} \quad (n: \text{重合度}) \quad (1.10)$$

を用い、 σ という協同効果指数(cooperativity factor)でポリマーの性質を論じている。

逆に両者の比がはるかに1より大であるのは、

$$\Delta H_{v.H.}/\Delta H_{cal} \gg 1 \quad (1.11)$$

転移挙動を示す単位が分子より大きい、すなわち協同効果が分子間にもおよぶ場合である。

膜あるいは生体膜モデルとしての脂質二重層にみられる温度転移がこれにあたる。水の融解のような低分子の等温相変化はこのもっとも極端な場合とみなすことができ、いわば協同効果単位が無限大の系ということになる。

van't Hoffのエンタルピーと直接熱測定により評価されたエンタルピーとの間にみられるこのような関係を理解したうえで、実際のタンパク質の熱変性を振り返ってみる。数種の球状タンパク質の熱変性についての実験結果を整理したものが図1.19である⁴⁵⁾。

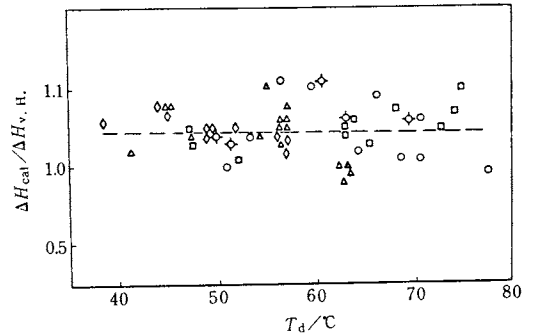


図 1.19 5種の球状タンパク質についていろいろな条件で求められた ΔH_{cal} と $\Delta H_{v.H.}$ の比⁴⁵⁾ ○チロクロームC, △リボヌクレアーゼ, ◇ミオグロビン, ◇ α -キモトリプシン, □リゾチム

図にみられるように、タンパク質の種類によらず、 $\Delta H_{v.H.}$ と ΔH_{cal} の比はほぼ1となり、上にあげた二つの場合の中間の性質を示すことがわかる。その平均値は $\Delta H_{cal}/\Delta H_{v.H.} = 1.05$ である。このように両者の比がほとんど1であるということは、これらの球状タンパク質では分子全体に協同性がおよぶものであり、しかも他の分子にはそれがおよばないということを意味している。高分子量のものとはいえ、それが独立した分子として挙動するという点で、タンパク質のモデル物質としてしばしば研究対象になっている合成ポリペプチドとは根本的にその物性が異なるということに注意しなければならない。

このように熱測定結果を van't Hoff のエンタルピーと組み合わせることにより、生体高分子の中の転移挙動単位を知ることができる。例をあげれば、分子量360,000のコラーゲンでは約30個の挙動単位があると見積られている^{46, 49)}。また分子量150,000のイムノグロブリンGでは転移が二段階で起こり、構造解析で知られている12個の分子内単位の内、最初の段階では4個、次の段階では2個ずつが組になって挙動するというように推定されている⁴⁵⁾。tRNAでは、すでに3.2.3で述べたように転移挙動単位と分子内構造の対応づけがなされている^{44, 54, 55)}。

3.4 いわゆるDSC装置、定量DTA装置について

これまでは主として熱容量差測定による方法を紹介してきたが、一般の研究室ではおおがかりな熱容量差測定装置を組むよりも、簡便で価格も手頃な市販のDSC装置、定量DTA装置を用いて研究しようとする場合の方が多い。これらの方法を生物試料に適用する場合の問題点や特徴的な事柄をいくつか述べる。

測定温度範囲は当然のことながら生体の温度が中心になり、したがって-50℃から150℃の範囲で制御できる装置を選ばなければならない。試料は水溶液系が殆んど

であるが、水の蒸発熱が非常に大きいため、試料を保持するセルは完全に密封されていなければならない。また水の熱容量が大きいので、試料セルと比較セルとの間の熱容量バランスをとることが難しく、実測されるサーモグラムのベースラインは著しく傾斜を持ったり、曲ったりする。そのためベースラインを正しく引くことはきわめて困難となり、サーモグラムのピーク面積評価のばらつきは50%を超えることがざらにある。同じ理由で転移温度を決めるためにピークの立ち上がり開始温度をもとめることは難しくなる。したがってピーク温度を転移点とする場合が多いが、これはあくまで便宜的なものにすぎない。

これらの装置は熱量が評価できるとはいうものの本来はダイナミックな手法であり、セルの中で雰囲気を追隨する非平衡な状態を作りだして、その応答から速度パラメーターをもとめ、さらに間接的に熱量を評価する仕組みになっている。非平衡な状態を検出原理にしているから、みかけのピーク温度は温度走査速度に依存することになる。もし生物活性の温度特性と比較するために転移温度を問題とするのであれば、かなり綿密にこのピーク温度の温度走査速度依存性を検討しなければならない。試料濃度が1%以下という希薄な条件で、相対的に感度をよくするため温度走査速度を高くすることがあるが、これは危険である。膜の転移では $0.1 \sim 0.5 \text{ Kmin}^{-1}$ が妥当な範囲であるが、タンパク質の場合にはこれよりさらに低いことが望ましい場合もある。

タンパク質研究の場合は、変性熱をもとめることのほか、変性温度を決める、変性の活性化エネルギーを評価する、複数の組成をもつ系で各タンパク質毎の安定性を比較する、pHやリガンドの影響による安定性の変化を知る、など様々な目的でこのDSC、定量DTAが使われている。けれども、このいずれもが温度走査速度により影響を受けるものであることを強調しておきたい。私見

ではあるが、代表的なタンパク質系でDSC、定量DTAにおける温度走査速度の問題を、合成高分子研究でなされている以上に厳密に検討しておくべきであろうと考えている。

先にも述べた通り、生物試料の純度がたかだか99%止まりで、必要以上に精度を要求する意味がないという点で、このようなDSC、定量DTAをまだまだ有効に活用できることは事実である。ただ本来は分析的なものであり、その精度、確度は熱容量(差)測定にもとづくものと厳密に区別されるものだという認識は必要であろう。ここに述べた問題点をじゅうぶん踏まえた上、実験の方針をたて、また得られた結果についても、何がどこまでいえるか慎重にとり組む必要がある。(つづく)

文 献

- 45) P. L. Privalov, *Pure Appl. Chem.* 47, 293 (1976)
- 46) P. L. Privalov, *FEBS Letters* 40, S140 (1974)
- 47) P. L. Privalov, V. V. Plotnikov, V. V. Filimonov, *J. Chem. Thermodyn.* 7, 41 (1975)
- 48) K. Nakamoto, H. Suga, S. Seki, A. Teramoto, T. Norisuye, H. Fujita, *Macromolecules* 7, 784 (1974)
- 49) P. L. Privalov, E. I. Tiktopulo, *Biopolymers* 9, 127 (1970)
- 50) 滝沢俊治, *生物物理* 14, 239 (1974)
- 51) A. A. Makarov, N. G. Esipova, D. R. Monaselidze, G. N. MGeladze, G. V. Madzhagaladze, I. P. Kuranova, A. I. Grebenko, *Biochim. Biophys. Acta* 434, 286 (1976).
- 52) T. Takizawa, Y. Miyoshi, N. Saito, *Polym. J.* 6, 85 (1974)
- 53) S. Mabrey, J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3862 (1976)
- 54) P. L. Privalov, V. V. Filimonov, T. V. Venkstern, A. A. Bayev, *J. Mol. Biol.* 97, 279 (1975)
- 55) H-J. Hinz, V. V. Filimonov, P. L. Privalov, *Eur. J. Biochem.* 72, 79 (1977)

[訂正] 本稿I(上)p69表1.2中、イオン化エンタルピー変化 ΔH_i の単位は kcal mol^{-1} に訂正します。