

滴定マイクロカロリメトリー —Ca²⁺受容蛋白質のCa²⁺結合熱測定への応用—

田之倉 優*, 山田和廣*

(昭和59年4月13日受理)

Titration Microcalorimetry. Application to Measurements of Heat of Ca²⁺-Association with Ca²⁺-Binding Proteins

Masaru Tanokura and Kazuhiro Yamada

A microcomputer-controlled system of a batch microcalorimeter equipped with a titration apparatus was described. Using this system, enthalpy titration profiles of bovine brain calmodulin by Ca²⁺ were observed both in the absence and in the presence of Mg²⁺, and at 5, 15 and 25 °C. Titrations of calmodulin with Ca²⁺ in the absence of Mg²⁺ showed that the Ca²⁺-binding reaction is endothermic and thus is driven solely by the entropy change. Following the method of Sturtevant [*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 2236 (1977)], the magnitudes of the hydrophobic and intramolecular vibrational contributions to the entropy change of calmodulin on Ca²⁺-binding were estimated. Ca²⁺-binding to calmodulin gives rise to an increase in hydrophobic entropy and thus to an "assembling" of nonpolar groups. Ca²⁺-binding also gives rise to an increase in vibrational entropy, indicating a "softening" of the overall structure of calmodulin molecule.

1. 緒 言

カルモデュリンやトロポニンCなどのCa²⁺受容蛋白質は、生体内における種々の酵素反応や筋肉の収縮を、Ca²⁺濃度によって制御している¹⁾。これらの蛋白質は、Ca²⁺を結合することによって、大きな構造変化を引き起こし、それが制御のトリガーになっていることが知られている。Ca²⁺結合の熱力学的性質ならびにCa²⁺結合に伴う分子全体の構造変化を明らかにすることは、Ca²⁺受容蛋白質の制御機構を分子レベルで理解する上で重要であるが、そのためには熱量測定は有用な手法である。Ca²⁺受容蛋白質の熱量測定に関しては、これまでに幾つかの総説および報告がある^{2~14)}。大量の試料が得にくく、それほど安定ではない生体試料の熱量測定には、安定で高感度の熱量計が必要である。また結合定数が10⁸~10⁹ M⁻¹の範囲にある複数の結合部位を1分子中にも

つ、Ca²⁺受容蛋白質のCa²⁺結合を解析して個々の結合部位に関する情報を得ることは、熱滴定曲線を求めることによって初めて可能となる。従来のバッチ型熱量計は、そのままでは測定に大量の試料と長い時間がかかるので、滴定型への改良が必要である。改良は初め児玉とWoledgeによってなされ^{15,16)}、更にマイクロコンピュータの導入などの改良が山田と米谷によってなされた¹⁷⁾。この改良法の有効性については、既に上坂らによって詳しい解説がなされている⁹⁾。滴定マイクロカロリメトリーの利点としては、次のような点が挙げられる：(1)試料蛋白質を一度反応セルにセットすることにより熱滴定曲線が得られるので、測定に必要な時間が短縮できる、(2)測定系が、ヒートシンクとして用いるアルミニウムブロックの回転、すなわち試料容液の攪拌も含めて定常状態になったことを確認してから測定にはいり、蛋白質とリガンドの結合熱を観測する前と後に、攪拌による熱を測定できるので、測定の精度を向上させることができる。酸-塩基の中和熱測定のような場合にも、反応セルに入れる試料量を多く、1回に加えるリガンドの量を少なくすることによって、滴定カロリメトリーのこのような利

* 大分医科大学生理学教室：大分県大分郡挾間町医大ケ丘1-1506 〒879-56

Department of Physiology, Medical College of Oita, Hasama, Oita 879-56, JAPAN

点を生かして、短時間に精度の高い測定が可能になると考えられる。

本稿では、現在我々が用いている滴定型微量熱量計、ならびに、それによって測定したウシ脳カルモデュリンのCa²⁺による熱滴定の結果について述べる。

2. 滴定型微量熱量計

熱量計は、微量な熱量の測定に適しているLKBバッチ型微量熱量計を用いた。この熱量計は伝導型で、二つの反応セルによって熱量検出を差動的に行なう。一方のセルには蛋白質試料溶液を、他方には蛋白質を含まない緩衝液と塩のみの溶液を入れることによって、測定に伴う非特異的な熱量を打ち消す双子型のシステムになっている(Fig.1)。これに自動滴定装置をつけ加えて、Ca²⁺溶液を少量ずつ分割して加えることにより、一回の連続した測定で熱滴定曲線が得られるようになった。

改良された装置のブロック・ダイアグラムをFig.1に示す。上に述べたように、二つの反応セルの一方には蛋白質溶液(A液)を、他方にはA液のうち蛋白質を含まない組成の溶液をそれぞれ5mlずつ入れておく。マイクロコンピュータからの制御でマイクロシリンジを動かすモーターを駆動し、一定量(4.1 μl)のCa²⁺溶液を二つの

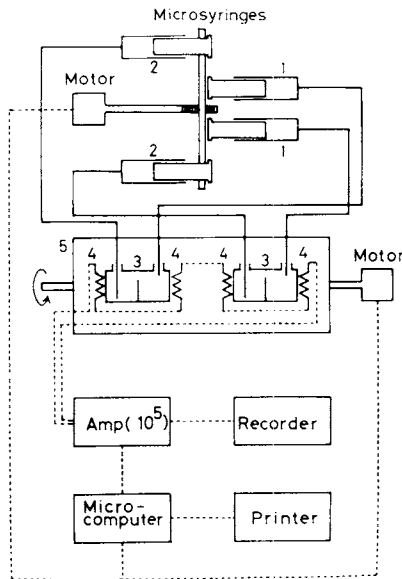


Fig. 1. Block diagram of a batch microcalorimeter equipped with a titration apparatus and controlled by a microcomputer. 1, microsyringe for the injection of a Ca²⁺ (or Mg²⁺) solution; 2, microsyringe for the suction of a solution in the reaction cell in order to keep the pressure in the cell constant; 3, reaction cell; 4, thermopile; and 5, calorimeter block.

反応セルに注入する。この時間時に、注入したのと同量の溶液をそれぞれの反応セルから吸引し、反応セル内の圧力が一定に保たれるようにする。引き続いて、マイクロコンピュータからの制御で、熱量計の反応セルが埋め込まれたアルミブロックを回転し、試料溶液とCa²⁺溶液を混合攪拌する。生ずる熱量を熱電堆で検出し、出力電圧を増幅した後、レコーダに記録するとともにデジタルマルチメータでデジタル化する。デジタル化した出力電圧は、プリンタに出力するとともにマイクロコンピュータのメモリに記憶していく。

試料の攪拌による熱量は、Ca²⁺溶液を加えずにアルミブロックの回転のみを行なうことにより測定する。本法では、測定中は一定時間ごとにアルミブロックの回転、試料溶液の攪拌を繰り返すために定常状態となり、精度の高い測定が可能である。

Fig.2は、カロリメータのアルミブロックに取りつけ

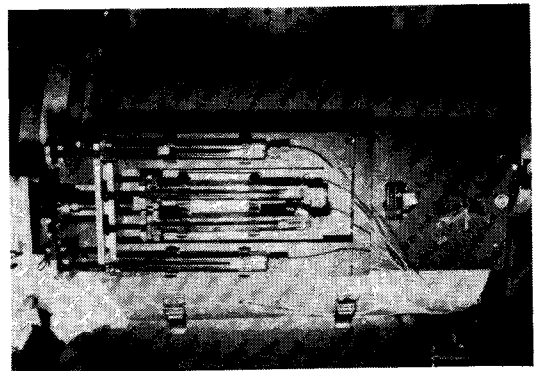


Fig. 2. Titration apparatus consisting of four microsyringes and a motor which is controlled by a microcomputer.

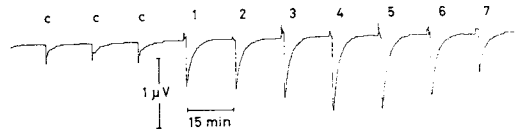


Fig. 3. Part of the calorimeter record obtained during enthalpy titration of bovine brain calmodulin with CaCl₂ in a solution containing 0.1 M KCl and 20 mM Pipes-NaOH (pH 7.0) at 25°C. The calorimeter cell contained 5 ml of calmodulin solution at the concentration of 0.19 mM. The calorimeter block was rotated, to mix the cell contents, marked by "c". Later rotations were accompanied by injection (4.1 μl) of CaCl₂ solution (0.1 M), marked by numbers. The heat attributable to the reaction of Ca²⁺ with calmodulin was obtained by integration of the calorimeter record and by subtraction of the average heat of rotation.

① 83/1/19 CAM MG-FREE HC=0.2949 [CAM]=15.95 MG/5.2 ML 11/19 D
 25 DEG [CA]0/[CAM]=0.0888
 INJECTION
 ***** ROTATION BEFORE MEASURE *****

BASE	101849*UDC+02262E-5	0	1	1.3743	1.38366	1.37334	1.3659
ROTATION	102900*UDC+02204E-5	0	1	2.63096			
BASE	103406*UDC+02154E-5	0	2	1.31329	1.3164	1.3131	1.30437
ROTATION	104418*UDC+02163E-5	0	2	2.53707			
BASE	104923*UDC+02128E-5	0	3	1.28331	1.29099	1.28316	1.27578
ROTATION	105934*UDC+02051E-5	0	3	2.46625			
BASE	110440*UDC+02023E-5	0	4	1.22932	1.24185	1.22865	1.21746
ROTATION	111451*UDC+01973E-5	0	4	2.36484			
BASE	111958*UDC+01976E-5	0	5	1.18409	1.18911	1.18389	1.17927
ROTATION	113010*UDC+01917E-5	0	5	2.27587			
BASE	113516*UDC+01935E-5	0	6	1.15544	1.15854	1.15608	1.1517
ROTATION	114527*UDC+01866E-5	0	6	2.17716			
BASE	115032*UDC+01813E-5	0	7	1.10561	1.11129	1.10943	1.09611
ROTATION	120043*UDC+01809E-5	0	7	2.13552			
BASE	120547*UDC+01801E-5	0	8	1.07577	1.07277	1.0782	1.07634
ROTATION	121558*UDC+01762E-5	0	8	2.07734			

② 83/1/19 CAM MG-FREE HC=0.2949 [CAM]=15.95 MG/5.2 ML 11/19 D
 25 DEG [CA]0/[CAM]=0.0888
 ◀ INJECTION

③ HEAT CONSTANT = .2949
 CONC = 15.95 MG/5.2ML
 = 3.06730769 MG/ML
 = .185897436 MM
 TOTAL PROTEIN = .92948718 U-MOL
 MW= 16.5 K
 * [CA]/[CAM]= .443255172 /INJECTION

④	⑤	⑥	⑦	⑧
CALIBRATED HEAT (MJ)	TOTAL HEAT (MJ)	*	[CA]/[CAM]	TOTAL HEAT (KJ/MOL)
1	-0.952434045	-0.952434045	.443255172	-1.02468766
2	-0.83487419	-1.78730824	.886510345	-1.92289714
3	-1.11574568	-2.90305392	1.32976552	-3.12328559
4	-1.73366294	-4.63671686	1.77302069	-4.98846779
5	-1.84815734	-6.4848742	2.21627588	-6.37683017
6	-1.37293659	-7.85781079	2.65953104	-8.45392058
7	-0.675007448	-8.53381824	3.10278621	-9.18121134
8	-0.399810781	-8.93362903	3.54604138	-9.6113526
9	-0.341950493	-9.27557951	3.98929605	-9.97924416
10	-0.226306545	-9.50188606	4.43255173	-10.2227188
11	-0.151356394	-9.65324245	4.8758069	-10.3855574
12	-0.220374366	-9.94361682	5.31906207	-10.6379602
13	-0.163464897	-10.1070817	5.76231724	-10.8738258
14	-0.196571714	-10.3036534	6.20557242	-11.0853099
15	-0.308920314	-10.6125737	6.64882759	-11.4176655
16	-0.386859275	-10.999433	7.09208276	-11.8333728
◀ 17	-0.304396779	-11.3038318	7.53533793	-12.1613639
18	-0.280111664	-11.5842435	7.97859311	-12.4630481
19	-0.315740927	-11.8999844	8.42184828	-12.8027418
20	.159939642	-11.7400447	8.86510345	-12.6306688

Fig. 4. Part of the printer output of an enthalpy titration. (a) Output during the titration and (b) the result of the titration; 1, note on the experiment; 2, integral values of calorimeter voltage; 3, data typed in from microcomputer keyboard for processing observed data; 4, titration number; 5, observed heat in mJ; 6, total heat produced in mJ; 7, molar ratio of Ca²⁺ to protein; and 8, total heat produced in kJ/mol protein.

た自動滴定装置の写真である。中央の2本がCa²⁺溶液を反応セルに注入するためのものであり、両側の2本が反応セルから溶液を吸引するためのものである。左側に位置するモーターは、マイクロコンピュータからの制御で一回転し、注入用と吸引用のシリンジを駆動する。

Fig. 3は、ウシ脳のカルシウム受容蛋白質であるカルモデュリンのCa²⁺による熱滴定の記録である。試料は、0.1 MKCl, 20 mM Pipes-NaOH (pH 7.0)を含む溶液であり、測定温度は25℃である。カルモデュリンへのCa²⁺結合は吸熱反応であるため、エンタルピー変化の絶対値が小さく、精度の高い測定を行なうために約3 mg/ml (0.19 mM)の試料溶液を使用している。図において、“c”で示したのは、Ca²⁺溶液を加えずにアルミブロックを回転し、攪拌のみを行なったものである。Ca²⁺溶液を加えて攪拌したものは、それが何回目の添加であるかを数字で示した。

マイクロコンピュータへの熱電堆の出力電圧のとりこみは次のように行なっている。出力電圧は、一定時間(5秒)毎にデジタルマルチメータを通してサンプリングを行なう。まず、5分間の値を順次加算することによってベースラインを記録する。次いでアルミブロックの回転を行ない(“c”), 回転から10分間の値を加算する。その後、さらに5分間ベースラインを記録する。回転を行なった時の10分間の加算値から、回転前5分間と回転後5分間の加算値の和を差し引くことによって“c”で示した図形の面積を求める。これを既知の熱を加えた場合と比較することにより、攪拌熱が得られる。回転後5分間のベースラインは、次の回転の前のベースラインとして用いられる。Ca²⁺溶液を加える場合には、ベースラインを記録した後Ca²⁺溶液を加え、反応セル内が定常状態に戻るまで1分間待ってからアルミブロックを回転し、Ca²⁺結合熱を測定する。

Fig. 4(a)に測定を行なっている間のプリンターへの出力を示した。①は、覚えのためにマイクロコンピュータのキーボードから入力した、この測定にたいするコメントである。②は、熱電堆からの出力電圧の加算値である。Fig. 4(b)は測定終了後に、測定結果を処理してプリンターに出力される記録である。③は、測定開始時にマイクロコンピュータのキーボードより入力した、測定データの処理に必要な数値を出力したものである。④はCa²⁺溶液の注入が何度めであるかを示す数であり、⑤はその時に実測された熱量をmJを単位として発熱が正になるようにとって出力したもので、⑥は⑤の実測熱量を順次加算していったものである。⑦はCa²⁺と試料蛋白質のモル比であり、⑧はkJ/mol proteinに換算した積算熱量である。したがって、⑦を横軸に、⑧を縦軸にプ

ロットすることにより熱滴定曲線(Fig. 5)が得られる。この測定は、Ca²⁺溶液の注入が20回、アルミブロックの回転だけがCa²⁺溶液の注入を始める前に10回、注入終了後に10回で、全体で約10時間半の測定であるが、すべて自動化されているので夕刻開始して翌朝までには測定が終了する。

3. カルモデュリンの熱滴定曲線

カルモデュリンは、いろいろの生物の脳をはじめ種々の組織に幅広く存在し、多様な系の活性化に関与している。ウシ脳のは148アミノ酸残基よりなり、分子量16700の蛋白質である^{18,19)}。Ca²⁺結合部位は、1分子あたり4個あり、Ca²⁺のほかMg²⁺や他の2価金属イオンを結合する。一次構造はきわめてよく保持されており、哺乳類であるウシの大脳のもとは原生動物のテトラヒメナのもの²⁰⁾とで違いは僅か12ヶ所である。

3.1 Caを結合していないカルモデュリンの調製

測定に用いる蛋白質試料は純度の高いものでなければならないが、そのために矢沢らのトリクロロ酢酸(TCA)法²¹⁾で抽出精製を行ない、SDSゲル電気泳動法²²⁾で純粋なカルモデュリン画分のみを集めて用いた¹⁴⁾。精製されたカルモデュリン溶液は、TCAを加えて沈殿させる。これを少量の1Mトリスで溶解し、1mM NaHCO₃にたいして透析することによって、Caを結合していないカルモデュリンが得られる。この方法の利点は、精製を行なうことによって、Caを結合していないカルモデュリンが得られることである。混入Caの量は、原子吸光法で定量したところ0.3 mol/mol protein以下であった。得られたカルモデュリンは、濃度をビューレット法²⁵⁾で定量し、純度をSDSゲル電気泳動²²⁾ならびにアルカリゲル電気泳動法^{26,27)}で確認して、測定に用いた。

Ca受容蛋白質からCa²⁺を除くためには、上記のTCA法のほかに、キレート樹脂(Dowex-A1, Chelex 100など)を用いる方法^{7,23)}、1mM塩酸にたいして透析する方法²⁴⁾などがあるので、必要に応じて使い分けができる。

3.2 熱滴定

Ca²⁺およびMg²⁺による熱滴定は、5℃、15℃、25℃で行なった。測定には、0.18 mMカルモデュリン、0.1 M KCl, 20 mM Pipes [piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)]-NaOH (pH 7.0)を含む溶液5 mlを用いた。

25℃におけるMg²⁺不在下のCa²⁺による、カルモデュリンの熱滴定のレコーダへの記録の一部をFig. 3に示した。Fig. 4は、この測定のプリンターへの出力である。

3.3 Ca²⁺ 結合によるH⁺の放出

Ca²⁺ 結合によりH⁺が放出される場合には、放出されたH⁺が緩衝剤Pipesに結合される時の熱量を補正することによって、カルモデュリンへのCa²⁺の結合熱が求められる。

Ca²⁺ 結合によるH⁺の放出量は、熱滴定に用いる溶液でPipes緩衝剤を含まないものについて、Ca²⁺溶液を加えた時にpHを7.0に一定に保つのに必要なNaOHの量から求めることができる^{7,14)}。そのようにして求めたH⁺の放出量(*h*)は、Mg²⁺の存在しない場合には、Ca²⁺結合部位1モルあたり0.12モル(5℃), 0.10モル(15℃), 0.12モル(25℃), 5 mMのMg²⁺が共存する場合には、0.06モル(5℃), 0.05モル(15℃), 0.04モル(25℃)であった。PipesへのH⁺の結合のエンタルピー変化(ΔH_{Pipes})は、25℃において-11.46 kJ/mol²⁸⁾であるので、それに基づいてCa²⁺結合によるH⁺放出の熱量*h*・ ΔH_{Pipes} を補正した。 ΔH_{Pipes} は、5℃と15℃においても25℃と同じ値を仮定した。

Mg²⁺結合によるH⁺の放出量は、Ca²⁺が存在しない場合に、結合部位1モルあたり0.06モル(5℃), 0.06モル(15℃), 0.07モル(25℃)であった。

3.4 熱滴定曲線

25℃におけるCa²⁺ならびにMg²⁺による熱滴定曲線をFig. 5に示す。図からも分かるように、カルモデュリンへのCa²⁺の結合ならびにMg²⁺の結合は吸熱反応である。したがって、これらの反応はエントロピー変化のみの寄与で進行していることがわかる。5 mMのMg²⁺の共存する場合のCa²⁺滴定は発熱反応であり、1.4 mMのCa²⁺が存在する場合のMg²⁺滴定では熱の出入は観測されなかった。Mg²⁺の存在しない場合のCa²⁺による熱滴定曲線は、二つの段階に分けられる。第1段階はCa²⁺による滴定の最初の部分に見い出されるもので、相対的に小さな吸熱によって特徴づけられる。第2の段階は、第1段階に続くもので、相対的に大きな吸熱によって特徴づけられる。

各反応のエンタルピー変化をまとめてFig. 6に示した。熱滴定曲線が一定の値に達することなく、いつまでも吸熱の続くCa²⁺の存在しない場合のMg²⁺滴定(CaM→CaM・Mg₄)では5 mM Mg²⁺の値をとった。これから次のことが分かる：(1) 1.4 mMのCa²⁺が存在する場合のMg²⁺滴定、すなわちカルモデュリン-Caの複合体にMg²⁺を加えてもエンタルピー変化は観測されない、(2) Ca²⁺が存在しない場合のMg滴定(カルモデュリンへのMg²⁺の結合反応)のエンタルピー変化($\Delta H=38$ kJ/mol)と5 mM Mg²⁺が共存する場合のCa²⁺滴定(カルモデュリン-Mg複合体とCa²⁺との反応)のエンタルピー

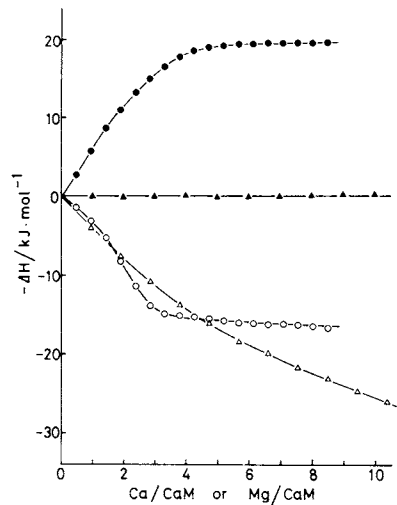


Fig. 5. Enthalpy titration profiles of calmodulin at 25°C and pH 7 with Ca²⁺ in the absence of Mg²⁺ (○), with Ca²⁺ in the presence of 5 mM Mg²⁺ (●), with Mg²⁺ in the absence of Ca²⁺ (△) and with Mg²⁺ in the presence of 1.4 mM Ca²⁺ (▲). The titration profiles have been corrected for the heat of interaction between the Pipes buffer and protons released. Solid lines in the titration profiles are the calculated curves based on the equations described in the text and the values listed in Table 1.

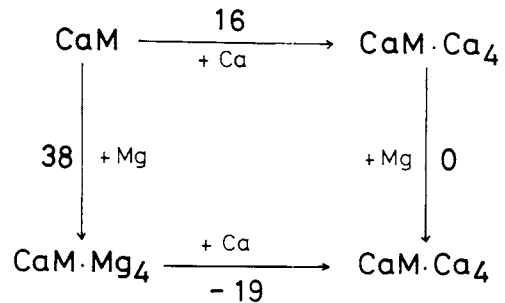


Fig. 6. Schematic diagram of the enthalpy changes of calmodulin on the reaction with Ca²⁺ and Mg²⁺. Numbers are the enthalpy changes (ΔH) in kJ/mol calmodulin for individual reactions. CaM denotes calmodulin.

変化($\Delta H=-19$ kJ/mol)の和は、Mg²⁺の存在しない場合のCa²⁺滴定(カルモデュリン-Ca複合体形成反応)のエンタルピー変化($\Delta H=16$ kJ/mol)と実験誤差の範囲内で一致する。したがってエンタルピー変化でみる限り、Ca²⁺結合部位に結合したMg²⁺はCa²⁺と置き換わると考えられる。つまり、カルモデュリンの4個のCa²⁺結合部位がすべてCa²⁺とMg²⁺の両方を結合する、いわゆ

るCa²⁺-Mg²⁺結合部位であることを示している。これは、同じCa²⁺受容蛋白質である骨格筋のトロポニンCが2個のCa²⁺-Mg²⁺結合部位と2個のCa²⁺に特異的な部位をもつとは異なっている^{7,29)}。またトロポニンCへのCa²⁺結合反応は、60 kJ/mol程度の発熱反応である⁷⁾。代表的なCa²⁺受容蛋白質であるカルモデュリンとトロポニンCの間のCa²⁺結合反応における熱力学的な性質のこのような差異は、生理的機能の差異を引き起こしている、Ca²⁺結合に伴う分子の全体的な構造変化の違いを反映しているものと考えられる。

3.5 熱滴定曲線の解析

熱滴定曲線を最小二乗法で解析することにより、*i*番目(*i*=1~4)のCa²⁺結合部位の、結合定数(*K_i*)、エンタルピー変化(ΔH_i)ならびに見かけのモル数(*f_i*)を求めることができる。カルモデュリン分子の4個のCa²⁺結合部位は互いに独立であると仮定すると、観測されたエンタルピー変化(*Q*)は次の式で表わされる。

$$Q = \sum_{i=1}^4 \frac{f_i \Delta H_i K_i [Ca]}{1 + K_i [Ca]}$$

ここで[Ca]は遊離のCa²⁺濃度である。[Ca]は、加えたCa²⁺の総濃度([Ca] total)とカルモデュリンの総濃度([CaM] total)とから、次の式を解くことによって求められる。

$$[Ca]_{total} = [Ca] + [CaM]_{total} \sum_{i=1}^4 \frac{f_i K_i [Ca]}{1 + K_i [Ca]}$$

以上の最小二乗法によるcurve-fittingは、コンピュータによって実行される⁷⁾。

25℃におけるMg²⁺が存在しない場合のCa²⁺滴定曲線を解析した結果をFig.7に示す。図において、黒丸は実測値である。実線は4個の結合部位が、すべて同一の結合定数をもつと仮定した場合に、実測値を最もよく説明するように選んだ理論曲線である。その特徴は吸熱量が、加えたCa²⁺とカルモデュリンのモル比(Ca/CaM)が0.0から2.5まで、ほぼ直線的に増大することである。この理論曲線は、相対的に小さな吸熱と大きな吸熱を示す、実測データの性質を説明することができない。次に、4個のCa²⁺結合部位が2種類に分けられると仮定して、実測値を最もよく説明するように求めた計算曲線を破線で示した。破線は実測値によく適合しており、したがって、カルモデュリンの4個のCa²⁺結合部位は2種類に分類されると考えられる。このことは、これまでに報告されている結果とよく一致する^{30~33)}。

これ以後の解析は、Mg²⁺の存在しない場合ならびにMg²⁺が共存する場合のいずれの場合にも、カルモデュリンのCa²⁺結合部位が2種類に分けられるとして、行なった。

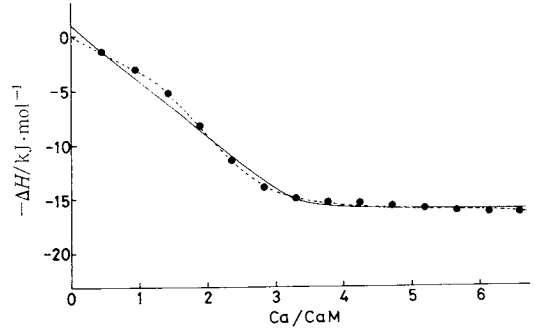


Fig. 7. Results of curve-fitting for the enthalpy titration profile of calmodulin with Ca²⁺ in a Mg²⁺-free solution at 25°C. The solid line was obtained by assuming that all the four Ca²⁺-binding sites are identical and is described by the following binding parameters: log *K* = 5.6, *f* = 0.9 mol per mol site and ΔH = 4.79 kJ per mol site. The dotted line was determined under the assumption that the Ca²⁺-binding sites are classified into two categories and is described by the following binding parameters: log *K*₁ = log *K*₂ = 6.2, log *K*₃ (= log *K*₄) = 4.8, *f*₁ (= *f*₂) = 0.8, *f*₃ (= *f*₄) = 0.7, ΔH ₁ (= ΔH ₂) = 3.02 kJ per mol site and ΔH ₃ (= ΔH ₄) = 7.37 kJ per mol site.

実測された熱滴定曲線を最もよく説明するパラメータの値をTable 1にまとめて示した。大きな結合定数をもつ高親和性部位と結合定数の小さな低親和性部位の両方について、Ca²⁺の結合定数は測定温度に依存しないように見える、また、Mg²⁺が共存するかしないかにも依らないように見える。もしもMg²⁺がCa²⁺と完全に競争的に結合部位に結合して、カルモデュリンに結合して

Table 1. Binding parameters of calmodulin on Ca²⁺-binding

	Site	Temp ℃	<i>f</i>	log <i>K</i> ^{a)}	ΔH kJ·mol ⁻¹
Mg ²⁺ -free	1.2	5	0.8	6.2	2.4
		15	0.8	6.2	3.2
		25	0.8	6.2	3.0
	3.4	5	0.7	5.0	4.4
		15	0.7	4.4	6.9
		25	0.7	4.8	7.4
5 mM Mg ²⁺	1.2	5	0.7	6.2	-1.3
		15	0.7	6.0	-2.8
		25	1.1	6.4	-5.9
	3.4	5	1.1	4.8	-6.3
		15	0.9	4.6	-6.4
		25	1.0	4.6	-4.4

a) The values of log *K* are estimated within ±0.5.

Table 2. Thermodynamic parameters of calmodulin on Ca²⁺-binding at 25°C

	Site	ΔG°	ΔS°	$\Delta S_u(\text{CaM})$	ΔC_p°	$\Delta C_p(\text{CaM})$
		$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
Mg ²⁺ -free	1,2	-35.4	129	64	32	-127
	3,4	-27.4	117	52	146	-13
5 mM Mg ²⁺	1,2	-36.5	103	166	-228	-282
	3,4	-26.2	73	136	98	44

いたMg²⁺がすべてCa²⁺によって置換されるものとする。Ca²⁺の結合定数はMg²⁺が共存する場合にはMg²⁺が存在しない場合よりも低くなるはずである。しかしながら、これは実測データと一致していないように思われる。したがって、Mg²⁺はCa²⁺と競合的に結合するだけでなく、それ以外の効果をもカルモデュリン分子に及ぼしていると考えられる³⁴⁾。求められた結合定数は、これまでに測定された値と合っている^{32,34~36)}。結合部位の見かけのモル分率(*f*)は、ほとんどの場合1.0より小さい。これは、蛋白質濃度を決めるのに用いたビュレット法の係数が小さいために、カルモデュリンの濃度を実際より高く見積り過ぎたためと考えられる。また、エンタルピー変化の絶対値は、骨格筋や心筋のトロポニンCと比べて小さい^{3,7,11)}。

Mg²⁺のカルモデュリンへの結合の熱滴定曲線は、結合定数が小さいために、Fig. 7に示すように測定している間中、一定の値に達することなく吸熱が続く。4個の結合部位の結合定数がすべて等しく、見かけのモル分率(*f_i*)がすべて1.0であると仮定して解析すると、カルモデュリンへのMg²⁺の定数は、3×10² M⁻¹ (5°C), 4×10² M⁻¹ (15°C), 6×10² M⁻¹ (25°C)となった。

3.6 Ca²⁺ 結合の熱力学パラメータ

Ca²⁺ 結合の標準自由エネルギー変化(ΔG°)は、Table 1の $\log K$, 気体定数 R , 絶対温度 T から、 $\Delta G^\circ = 2.3 RT \log K$ によって求められる。エントロピー変化(ΔS°)は、 $\Delta S^\circ = (\Delta H - \Delta G^\circ) / T$ の関係で求められる。 ΔS° は、Mg²⁺の存在しない場合にはカルモデュリン(CaM)とCa²⁺の結合反応(CaM + Ca²⁺ ⇌ CaM·Ca)のエントロピー変化である。したがって、

$$\Delta S^\circ = S^\circ(\text{CaM}\cdot\text{Ca}) - S^\circ(\text{CaM}) - S^\circ(\text{Ca}^{2+}) \quad (1)$$

ただし S° は、 S° の次の括弧の中に示した化合物の水溶液中の標準部分モルエントロピーである。カルモデュリン分子自体のCa²⁺結合によるエントロピー変化 $\Delta S_u(\text{CaM})$ は、次式で表わされる。

$$\Delta S_u(\text{CaM}) = S^\circ(\text{CaM}\cdot\text{Ca}) - S^\circ(\text{CaM}) \quad (2)$$

(1)式と(2)式から、

$$\Delta S_u(\text{CaM}) = \Delta S^\circ + S^\circ(\text{Ca}^{2+}) \quad (3)$$

5 mMのMg²⁺が共存する場合には、Mg²⁺は上に述べ

たように、Ca²⁺と競合的にカルモデュリンと結合する以外の変化をも引き起こすと考えられるが、単純化のために、Ca²⁺とMg²⁺の置換だけを考える(CaM·Mg + Ca²⁺ ⇌ CaM·Ca + Mg²⁺)。したがって、

$$\begin{aligned} \Delta S_u(\text{CaM}) &= S^\circ(\text{CaM}\cdot\text{Ca}) - S^\circ(\text{CaM}\cdot\text{Mg}) \\ &= \Delta S^\circ + S^\circ(\text{Ca}^{2+}) - S^\circ(\text{Mg}^{2+}) \end{aligned} \quad (4)$$

$S^\circ(\text{Ca}^{2+}) = -65 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ と $S^\circ(\text{Mg}^{2+}) = -128 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ^{7,37,38)} を代入して、 $\Delta S_u(\text{CaM})$ の値が求められる。以上のようにして求めた、25°Cにおける ΔG° , ΔS° , $\Delta S_u(\text{CaM})$ の値をTable 2に示した。

熱容量変化(ΔC_p°)は、Kirchhoffの式 $\Delta C_p^\circ = (\partial \Delta H / \partial T)_p$ により、エンタルピー変化の温度依存性から求められる。それぞれの結合部位のエントロピー変化の温度依存性をFig. 8に図示した。 ΔC_p° の値は、5~15°Cおよび15~25°Cの平均として求めた(Table 2)。Ca²⁺結合によるカルモデュリン分子の熱容量変化 $\Delta C_p(\text{CaM})$ は、上に述べた $\Delta S_u(\text{CaM})$ と同様にして、次の式で求めら

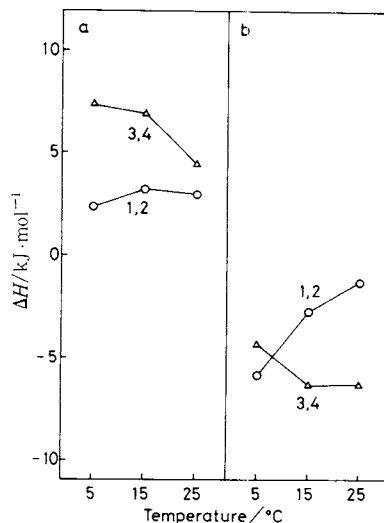


Fig. 8. Temperature dependence of enthalpy changes associated with Ca²⁺-binding to calmodulin (a) in the absence of Mg²⁺ and (b) in the presence of 5 mM Mg²⁺. The numbers attached indicate the particular sites involved.

れる。Mg²⁺の存在しない場合には、

$$\begin{aligned} \Delta C_p(\text{CaM}) &= C_p^\circ(\text{CaM} \cdot \text{Ca}) - C_p^\circ(\text{CaM}) \\ &= \Delta C_p^\circ + C_p^\circ(\text{Ca}^{2+}) \end{aligned} \quad (5)$$

5 mMのMg²⁺の共存する場合には、

$$\begin{aligned} \Delta C_p(\text{CaM}) &= C_p^\circ(\text{CaM} \cdot \text{Ca}) - C_p^\circ(\text{CaM} \cdot \text{Mg}) \\ &= \Delta C_p^\circ + C_p^\circ(\text{Ca}^{2+}) - C_p^\circ(\text{Mg}^{2+}) \end{aligned} \quad (6)$$

C_p[°](Ca²⁺)ならびにC_p[°](Mg²⁺)の値は、それぞれ-159, -105 J·mol⁻¹·K⁻¹である^{7,97,99}。

3.7 Ca²⁺結合によるエントロピー変化に対する疎水性効果および分子内振動自由度の寄与

Ca²⁺結合によって引き起こされるカルモデュリンの分子自体の熱容量変化ΔC_p(CaM)ならびにエントロピー変化ΔS_u(CaM)は、主に疎水性効果[ΔC_p(hydro), ΔS_u(hydro)]および分子内振動自由度の変化[ΔC_p(vib), ΔS_u(vib)]から生じている。すなわち、

$$\begin{aligned} \Delta C_p(\text{CaM}) &= \Delta C_p(\text{hydro}) + \Delta C_p(\text{vib}) \\ \Delta S_u(\text{CaM}) &= \Delta S_u(\text{hydro}) + \Delta S_u(\text{vib}) \end{aligned} \quad (7)$$

次に示すSturtevantの見出した経験則⁴⁰)に従って、熱容量変化およびエントロピー変化から、これらに対する疎水性効果と分子内振動自由度の寄与をそれぞれ評価することができる。

$$\begin{aligned} \Delta S_u(\text{hydro}) &= -0.26 \Delta C_p(\text{hydro}) \quad (298 \text{ K}) \\ \Delta S_u(\text{vib}) &= 1.05 \Delta C_p(\text{vib}) \quad (273-373 \text{ K}) \end{aligned}$$

疎水性効果は、分子がフェルニアラニンのような疎水性残基が表面に露出するような高次構造をとっているとき、その疎水性残基の周囲の水分子が構造をつくることから生ずる。疎水性残基どうしが結合するか、あるいは分子内に引き込まれて水と接しない分子構造が変わるときには、疎水性残基のまわりの水の構造が壊れたり減少したりするので、系のエントロピーは増加する。またこのとき、系の熱容量は減少する⁴¹⁾。

また、蛋白質分子の高次構造の変化は、分子内部の運動性すなわち分子内振動の自由度に変化を生じ、そのためにエントロピーが変化する。分子構造が緊密になれば、分子内振動の自由度が減少し、したがってエントロピーが減少する。

以上のような解析の結果を、25℃のものについてTable 3に示した。また、とくにエントロピー変化についてFig.9のパネル(a)と(b)に示す。この図から、カルモデュリンの各部位がCa²⁺を結合することによって、疎水性効果に由来するエントロピー-S_u(hydro)や分子内振動の自由度に由来するエントロピー-S_u(vib)が変化する様子を知ることができる。(a)のパネルはMg²⁺の存在しない場合のものであり、(b)のパネルは5 mMのMg²⁺が共存する場合のものである。

Mg²⁺が存在しない場合にも5 mMのMg²⁺が共存する場合にも、カルモデュリンの結合部位にCa²⁺が結合していくに従って、分子内振動の自由度に由来するエントロピー-S_u(hydro)が増大していく。すなわち、Ca²⁺が結合部位に結合することによってカルモデュリン分子は、

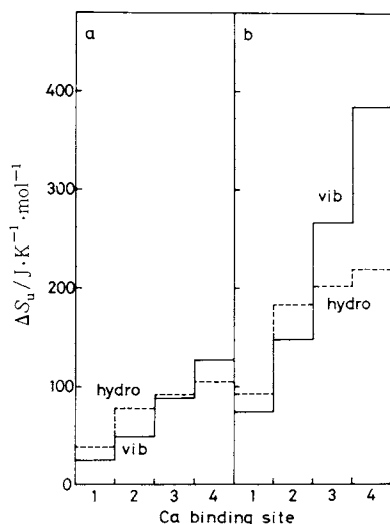


Fig. 9. The hydrophobic (hydro) and vibrational (vib) contributions to the entropy changes associated with Ca²⁺ binding to calmodulin (a) in the absence of Mg²⁺ and (b) in the presence of 5 mM Mg²⁺. Entropy changes are ascribed to the binding sites involved as indicated at the bottom of the figure. Entropy changes are drawn in a cumulative way, so that the final levels indicate the overall entropy changes when calmodulin binds four mol of Ca²⁺.

Table 3. Estimation of hydrophobic and vibrational contributions to the changes in heat capacity and entropy at 25°C

	Site	ΔC _p (hydro)	ΔC _p (vib)	ΔS _u (hydro)	ΔS _u (vib)
		J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹	J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹	J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹	J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
Mg ²⁺ -free	1, 2	-151	23	39	25
	3, 4	-50	37	13	39
5 mM Mg ²⁺	1, 2	-353	70	92	74
	3, 4	-69	113	18	118

分子全体としては、より動き易くなる。このような傾向は、 Mg^{2+} の存在しない場合よりも、 Mg^{2+} の共存する場合の方が顕著である。分子の構造が“やわらかく”なることによって、カルモデュリンはアポ酵素と相互作用することができるようになると考えられる。

円二色性の研究から、 Ca^{2+} の結合によってカルモデュリン分子のヘリックス含量が増加することが知られている^{35, 42~46}。このことは、少なくともヘリックスを形成する部分では分子内振動の自由度が減少することを示している。したがって、カルモデュリンは Ca^{2+} を結合することによって、いわゆる EF ハンド構造以外の領域において、“やわらかく”なっているものと考えられる。

同様に、 Mg^{2+} が存在しない場合にも共存する場合にも、カルモデュリン分子の疎水性効果に由来するエントロピー $S_u(\text{vib})$ は、 Ca^{2+} の結合によってだんだん増大していく。これは、上に述べたように分子表面の疎水性残基の量が Ca^{2+} 結合に伴って減少していくことを示している。これまでの報告は、 Ca^{2+} 結合によってカルモデュリン分子の表面に疎水性のリガンド^{47, 48}と相互作用できる程度の比較的大きな疎水性の領域ができることを示している^{49~55}。上に述べた結果と併せて考えると、 Ca^{2+} を結合していないカルモデュリン分子では分子表面上にたくさんの疎水性の残基が散在しているが、 Ca^{2+} が結合することに伴って集まって、疎水性のリガンドと相互作用できる大きな疎水性領域を形成するとして説明される。

4. 結 論

熱滴定法は、短期間で熱滴定曲線が得られるので、カルモデュリンなどの Ca^{2+} 受容蛋白質の熱力学的挙動を明らかにするためには、きわめて有用な方法である。本稿では、カルモデュリンの Ca^{2+} による熱滴定曲線を解析することにより、カルモデュリン分子に Ca^{2+} が結合すると、分子表面の疎水性残基が集まって比較的大きな疎水性領域を形成すること、分子構造が全体としては、フレキシブルになることを述べた。

文 献

- 1) 垣内史郎編, Ca^{2+} 受容蛋白質, カルモデュリンとトロポニオンの分子生物学, 蛋白質・核酸・酵素 27, No. 15 (1982).
- 2) K. Yamada, H. Mashima and S. Ebashi, *Proc. Japan Acad.* **52**, 252 (1976).
- 3) J. D. Potter, F.-J. Hsu and H. J. Pownall, *J. Biol. Chem.* **252**, 2437 (1977).
- 4) K. Yamada, *Biochim. Biophys. Acta* **535**, 342 (1978).

- 5) K. Yamada, *Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms* (eds. S. Ebashi, K. Maruyama and M. Endo), p. 267, Japan Sci. Soc. Press. Tokyo (1980).
- 6) H. J. Moeschler, J.-J. Schaer and J. A. Cox, *Eur. J. Biochem.* **111**, 73 (1980).
- 7) K. Yamada and K. Kometani, *J. Biochem.* **92**, 1505 (1982).
- 8) S. Smith and R. C. Woledge, *J. Musc. Res. Cell Motility* **3**, 507 (1982).
- 9) 川崎広吉, 上坂伸宏, 生物物理 **22**, 90 (1982).
- 10) 山田和廣, 米谷快男児, 田之倉 優, 蛋白質核酸酵素 **27**, 2236 (1982).
- 11) K. Kometani and K. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**, 162 (1983).
- 12) M. Tanokura and K. Yamada, *J. Biochem.* **94**, 607 (1983).
- 13) N. Siegel, R. Coughlin and A. Haug, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 512 (1983).
- 14) M. Tanokura and K. Yamada, *J. Biochem.* **95**, 643 (1984).
- 15) T. Kodama and R. C. Woledge, *J. Biol. Chem.* **251**, 7499 (1976).
- 16) 児玉孝雄, 第3回熱講習測定会テキスト 17 (1978).
- 17) 山田和廣, 米谷快男児, 日本熱測定学会講演集 33 (1979).
- 18) H. Kasai, Y. Kato, T. Isobe, H. Kawasaki and T. Okuyama, *Biomed. Res.* **1**, 248 (1980).
- 19) D. M. Watterson, F. Sharief and T. C. Vanaman, *J. Biol. Chem.* **255**, 962 (1980).
- 20) M. Yazawa, K. Yagi, H. Toda, K. Kondo, K. Narita, R. Yamazaki, K. Sobue, S. Kakiuchi, S. Nagano and Y. Nozawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 1051 (1980).
- 21) M. Yazawa, M. Sakuma and K. Yagi, *J. Biochem.* **87**, 1313 (1980).
- 22) U. K. Laemmli, *Nature* **227**, 680 (1970).
- 23) S. Ebashi, A. Kodama and F. Ebashi, *J. Biochem.* **64**, 465 (1968).
- 24) Iida, S., *J. Biochem.* **86**, 733 (1979).
- 25) A. G. Gornall, C. S. Bardawill and M. M. David, *J. Biol. Chem.* **177**, 751 (1949).
- 26) J. F. Head and S. V. Perry, *Biochem. J.* **137**, 145 (1974).
- 27) M. Tanokura, Y. Tawada, A. Ono and I. Ohtsuki, *J. Biochem.* **93**, 331 (1983).
- 28) L. Beres and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **10**, 2120 (1971).
- 29) J. D. Potter and J. Gergely, *J. Biol. Chem.* **250**, 4648 (1975).
- 30) T. S. Teo and J. H. Wang, *J. Biol. Chem.* **248**, 5950 (1973).
- 31) D. M. Watterson, W. G. Harrelson, Jr., P. M. Keller, F. Sharief and T. C. Vanaman, *J. Biol. Chem.* **251**, 4501 (1976).
- 32) M. Yazawa, H. Kuwayama and K. Yagi, *J.*

- Biochem.* **84**, 1253 (1978).
- 33) M. Ikura, T. Hiraoki, K. Hikichi, T. Mikuni, M. Yazawa and K. Yagi, *Biochemistry* **22**, 2573 (1983).
 - 34) Y. Ogawa and M. Tanokura, *J. Biochem.* **95**, 19 (1984).
 - 35) J. R. Dedman, J. D. Potter, R. L. Jackson, D. Johnson and A. R. Means, *J. Biol. Chem.* **252**, 8415 (1977).
 - 36) T. H. Crouch and C. B. Klee, *Biochemistry* **19**, 3692 (1980).
 - 37) F. D. Rossini, D. D. Wagmann, W. H. Evans, S. Levine and K. Jaffe, Selected Values of Chemical Thermodynamic Properties, Circular of the National Bureau of Standards 500, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
 - 38) K. S. Pitzer and L. Brewer, Thermodynamics 2nd Ed., p.401, McGraw-Hill, New York.
 - 40) J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **74**, 2236 (1977).
 - 41) C. Tanford, The hydrophobic effect; Formulation of micelles and biological membranes, John Willey & Sons, New York (1973).
 - 42) C. B. Klee, *Biochemistry* **16**, 1017 (1977).
 - 43) D. J. Wolff, P. G. Poirier, C. D. Brostrom and M. A. Brostrom, *J. Biol. Chem.* **252**, 4108 (1977).
 - 44) P. C. Richman and C. B. Klee, *J. Biol. Chem.* **254**, 5372 (1979).
 - 45) M. Walsh, F. C. Stevens, K. Oikawa and C. M. Kay, *Can. J. Biochem.* **57**, 267 (1979).
 - 46) W. Wnuk, J. A. Cox and E. X. Stein, *J. Biol. Chem.* **256**, 1538 (1981).
 - 47) R. M. Levin and B. Weiss, *Mol Pharmacol.* **13**, 690 (1977).
 - 48) R. M. Levin and B. Weiss, *Biochim. Biophys. Acta*, **540**, 197 (1978).
 - 49) T. Endo, T. Tanaka, T. Isobe, H. Kasai, T. Okuyama and H. Hidaka, *J. Biol. Chem.* **256**, 12485 (1981).
 - 50) D. R. Marshak, D. M. Watterson and L. van Eldik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **78**, 6793 (1981).
 - 51) R. E. Kleivit, B. A. Levine and R. J. P. Williams, *FEBS Lett.* **123**, 25 (1981).
 - 52) R. Gopalakrishna and W. B. Anderson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 830 (1982).
 - 53) J. Krebs and E. Carafoli, *Eur. J. Biochem.* **124**, 619 (1982).
 - 54) H. J. Vogel, L. Lindahl and E. Thulin, *FEBS Lett.* **157**, 241 (1983).
 - 55) T. Shimizu and M. Hatano, *FEBS Lett.* **160**, 182 (1983).