

タンパク質工学と熱測定

田中晶善

(平成7年3月1日受理)

Protein Engineering and Calorimetry

Akiyoshi Tanaka

This article outlines several topics concerning the thermodynamic effects of amino acid replacements on protein stability studied mainly by calorimetric methods.

(Received March 1, 1995)

1. はじめに

タンパク質はアミノ酸がペプチド結合で鎖状につながった構造を持ち、生理的条件下ではきわめて規則的な立体構造を維持している。この規則的な構造（天然状態；N）は、酸・アルカリ、熱、変性剤などによって壊れ、エントロピーの大きいランダムコイル状の変性状態（D）となる。通常、天然状態のタンパク質は、変性状態に比べおよそ20～60 kJ・mol⁻¹程度安定である。この値は天然状態・変性状態それぞれが持つ全エネルギーに比べて数桁小さく、エネルギー差はほとんどないと言ってもよい。つまり天然の規則的な構造は変性状態に比べ「ぎりぎり」で安定であり、テストで満点に近くても、1点以下のごわずかな差で合格と不合格に分かれる、というようなことにもなぞらえ得る。したがって構造保持には共有結合のような強い結合とともに、van der Waals力、水素結合、疎水性相互作用のような比較的弱い力も重要であり、時には‘ケアレミス’に相当するような弱い力の変化が決定的な役割を果たすことになる。それらを定量的に理解し、一般則を見いだすことがタンパク質化学の目標の一つであるが、種々の要因が複雑に入り組んでおり、十分な理解は得られていない。

近年の遺伝子工学・タンパク質工学の進展により、天然に産出するタンパク質（野生型タンパク質）の特定のアミノ酸を別の任意のアミノ酸に置換した変異型タンパク質を大量に得る手法が日常化した。この手法は上記の問題に対しても有効な素材を提供する。たとえば、野生型タンパク質と変異型タンパク質の熱変性を断熱型示差走査熱量計（DSC）を用いて観測することにより、それぞれの変性の熱力学諸量を直接測定でき、それらを比較することでアミノ酸置換が変性の熱力学量に与える効果を定量的に評価できる。

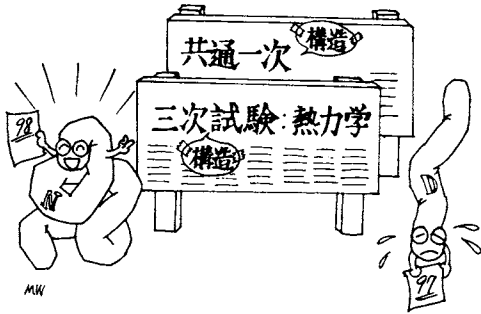
タンパク質変性の熱力学量は、分光学的手法などで間接的に観測することは不可能ではないが、広い温度範囲（ただし生化学的な意味で）に互って信頼できる値を得るには、熱測定が最も適していることは言うまでもない。

本稿では、アミノ酸置換タンパク質を対象とした、DSCによる熱変性の測定例を中心に、球状タンパク質の構造維持に寄与する要因とその解析に関する話題のいくつかを紹介する。またDSCとともに生化学系でよく使われるようになってきた等温滴定熱量計（ITC）を用いて、アミノ酸置換を行ったペプチドがタンパク質に結合するときの結合熱を測定した例について最後に簡単に触れる。

三重大学教育学部化学教室：〒514 三重県津市上浜町1515

Department of Chemistry, Faculty of Education, Mie University, Tsu, Mie 514, Japan

E-mail : akiyoshi@edu.mie-u.ac.jp



わずかな差なのに

2. アミノ酸置換とタンパク質の安定性

2.1 S-S結合の効果

タンパク質分子内では、折り畳まれた状態で空間的に隣接した二つのCys (システイン残基*)のチオール基が酸化されて、Cys-S-S-Cysというジスルフィド結合 (S-S結合) を形成していることがある。S-S結合は、変性状態の構造に制限を加えて変性状態のエントロピーを減少させる。したがって、新たに導入したS-S結合が天然状態の構造にゆがみをもたらさない限り、その導入によって天然状態を相対的に安定化することが期待できる。

タンパク質工学的に、T4ファージのリゾチーム (溶菌酵素; アミノ酸残基数164) の分子内三カ所を対象としてS-S結合を導入し、熱変性温度への影響を調べた実験²⁾では、予想通りS-S結合によってタンパク質が安定になった。より長いループが形成されるほど、つまりS-S結合を形成する二つのCysの間のアミノ酸残基数 n が多いほど、より大きく安定化した。このタンパク質には深い溝があるが、これに橋を架けるように、120アミノ酸残基をはさんでS-S結合を導入した場合は、変性温度が11℃上昇している。複数のS-S結合を導入すると、変性温度の上昇の大きさは、個々のS-S結合による場合の和とほぼ等しい。

Pace ら³⁾は、リボヌクレアーゼT1 (RNA分解酵素) に含まれる二つのS-S結合の効果調べ、構造エントロピーへの寄与 ΔS° を次のように表した。 $\Delta S^\circ = -8.8 - (3/2) R \ln n$ ($J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$)。Rは気体定数、 n はS-S結合のループの長さである。この式に基づいて計算した変性の ΔG° への効果は、リゾチームやリボヌクレアーゼAなどのいくつかのタンパク質について実験結果をよく再現している。

Ladbury らは、大腸菌チオレドキシシン (電子伝達タンパク質) のS-S結合の効果もDSCを用いて調べた⁴⁾。このタンパク質では、アミノ末端からのアミノ酸残基数で数えて32番目と35番目にある二つのCys (Cys32, Cys35) が、Gly-Proというわずか二つのアミノ酸をへだててS-S結合し、小さいループを形成している。DSC測定の対象は、野

生型の酸化型・還元型チオレドキシシンそれぞれ、および、関与する二つのCysをSerに置換した変異型タンパク質の計3種である。酸化型を基準とした場合、還元型、変異型いずれも変性温度が11~12℃も下がった。酸化型の変性温度85℃ (pH 7) で比較すると、変性の ΔG° が、還元型、変異型いずれも約13kJ $\cdot mol^{-1}$ 減少しており、この場合もS-S結合がタンパク質を安定にすることを示している。 ΔG° の減少の中身を見てみると、還元型では、 ΔH が43kJ $\cdot mol^{-1}$ 、 $T\Delta S^\circ$ が56kJ $\cdot mol^{-1}$ の増加であり、また変異型では ΔH が94kJ $\cdot mol^{-1}$ 、 $T\Delta S^\circ$ が107kJ $\cdot mol^{-1}$ の増加であり、いずれもエントロピー項の増加が ΔG° の減少 (S-S結合の欠損による不安定化) をもたらしている。

ただし、結果として ΔG° の変化がほとんど同じであっても、 ΔH と ΔS° の変化は、いずれも変異型では還元型の倍である。変異型と還元型のチオレドキシシンの相違は、32番目と35番目のアミノ酸側鎖のOH基とSH基だけであることを考えると、 ΔH と ΔS° の大きな違いが目をはく。その原因として、SH基とOH基それぞれが形成し得る水素結合の強さの違いなどが考えられている。

ストレプトマイセスのズブチリシン阻害物質SSIは、相同な小型タンパク質分子が2個会合している。S-S結合は分子内に導入されるのが普通であるが、Tamura らは、SSIの各サブユニットのAsp83をCysに置換して分子間S-S結合を導入することに成功し、熱安定性に対する効果をDSCを用いて調べた⁵⁾。この場合も大きな安定化が観測され、たとえばpH 7では変性温度は82℃から95℃へ上昇した。安定化の原因は、 ΔS° の減少 (pH 7において210 J $\cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ 減少) が、 ΔH の減少の効果より大きいことであると評価されている。

2.2 疎水性相互作用

球状タンパク質では、親水性側鎖を持つアミノ酸を表面に配するとともに、疎水性側鎖を持つアミノ酸を分子内部に詰めた「疎水性コア」を形成している。水溶液中のタンパク質を安定化させる要因に関しては長年に亘る議論があるが、1960年前後にKauzmanやTanfordによって疎水性相互作用の重要性が強調されて以来、疎水性相互作用がタンパク質の折れ畳みの主な駆動力であるとするのが主流の考え方となっている。

Pace は、リゾチームなど4種のタンパク質について、大きな非極性側鎖を持つアミノ酸を小さい非極性側鎖を持つアミノ酸に置換した場合の「文献調査」を行った⁶⁾。総計72個のアミノ酸置換について調べた結果、タンパク質内部に完全に埋もれたメチレン基1個につき、5.4 \pm 2.1 kJ $\cdot mol^{-1}$ 、安定化に寄与するとしている (25℃)。

Yutani らは大腸菌のトリプトファン合成酵素 α サブユニットのGlu49を、他の19種のアミノ酸に置換した変異型タンパク質を作成してその安定性を調べた⁷⁾。その結果、

Phe など芳香族アミノ酸の例外を除くと、疎水性の高いアミノ酸に置換したもののほど、より安定となる、という結果を得た。

T4ファージのリゾチームのカルボキシル末端側ドメインは、このタンパク質の疎水性コアを形成している。Eriksson らは、そのうちの二つのアミノ酸 Leu99 と Phe153 を一連の疎水性アミノ酸で置換し、それぞれの結晶構造解析を行うとともに、それらの熱安定性を円二色性 (CD) で観測した⁸⁾。この場合も、置換アミノ酸残基の疎水性と安定性の間には相関関係が見られた。しかし野生型の Phe153 を Leu に置換した変異型タンパク質では、Leu が Phe より疎水性が小さいにもかかわらず、安定化がみられた。これは、野生型では、大きな容積を持つ Phe が構造にゆがみをもたらしており、容積の小さい Leu に置換したことでゆがみが解放されたことに基づいている。上記トリプトファン合成酵素 α サブユニットにおいて、芳香族アミノ酸による置換が、疎水性から期待される安定性をもたらさなかったことも同様に理解されている。

黄色ブドウ球菌のヌクレアーゼ (核酸分解酵素) の野生型と、数種のアミノ酸置換タンパク質の DSC 測定を行った研究⁹⁾ においても、疎水性が大きいアミノ酸に置換したもののほど変性温度が高くなる傾向が見られた*2。変性の熱力学量を野生型の変性温度 (51 °C, pH 7) で比較してみると、置換アミノ酸の疎水性が増大したものでは、変性の ΔH と ΔG° がいずれも減少し、また親水性が増大したものでは、いずれも増大する傾向が見られたが、 ΔG° にはほとんど変化がないという典型的なエントロピー・エンタルピー補償が観測されている¹⁰⁾。

2.3 水素結合

Pauling は、すでに半世紀以上前に、タンパク質の構造形成における水素結合の重要性を指摘している。その後は、タンパク質を安定化する要因としては水素結合はあまり大きな貢献をしていない、と考えられてきた。変性すれば、今度は溶媒の水分子と水素結合を形成できるからである。しかし最近、水素結合の重要性を指摘する報告がいくつかなされている。

Shirley ら¹¹⁾ は、大腸菌リボヌクレアーゼ T1 (RNA 加水分解酵素) の野生型タンパク質と、これにアミノ酸置換を施した 12 種の変異型タンパク質を調製し、それらの尿素変性と熱変性を観測した。天然状態の野生型タンパク質では、総計 86 個の分子内水素結合がある。変異型タンパク質ではこれらのうちの平均的な結合長を持つ水素結合が 1~3 個欠損している。実験結果の解析から、構造安定化への寄与は、水素結合 1 個あたり平均 5.4 kJ \cdot mol⁻¹ であると見積もられた。これはタンパク質内の総計で 460 kJ \cdot mol⁻¹ に相当し、疎水性相互作用による効果と同等の大きさとなる。

なおタンパク質を安定化する要因は主として疎水性相互作用であるとされてきているのは上述の通りであるが、Privalov らは、DSC 測定の結果などに基づいてこの伝統的な見解を批判的に検討し^{12)~15)}、タンパク質を安定化するのに主として寄与するのは van der Waals 相互作用と水素結合であると結論づけている¹⁵⁾。バルナーゼ (RNA 分解酵素) の熱変性を DSC で観測した論文¹⁶⁾ においては、「分子内水素結合と、変性に伴う極性基の水和」としての水素結合の寄与、および、「非極性基の分子内 van der Waals 力と、変性に伴う非極性基の水和」としての疎水性相互作用の寄与はほぼ同等であるとされ、25 °C では、前者が 1,350 kJ \cdot mol⁻¹、後者が 1,200 kJ \cdot mol⁻¹ と見積もられている。

3. アミノ酸置換が結合の熱力学量に与える効果

等温滴定熱量計 ITC はタンパク質とリガンドの結合などに伴うエンタルピー変化、結合定数、結合部位の数を精度よく迅速に測定することができる装置で、活発に利用されるようになってきた。

ウシ膵臓のリボヌクレアーゼ A は 124 アミノ酸残基からなる酵素である。この酵素タンパク質は 20 番目と 21 番目の間で加水分解されて二つの分解物、S ペプチド (1-20) と S タンパク質 (21-124) となる。これら二つの加水分解物は、特異的に 1:1 で非共有結合的に会合し、酵素活性を持つ複合体を形成する。

Varadarajan らは、Met13 を種々のアミノ酸に置換した変異 S ペプチドと、S タンパク質との結合を ITC を用いて観測した¹⁷⁾。その結果、たとえば Leu と Ile それぞれに置換したペプチドの結合では、 ΔG° が、Met13 では -39 kJ \cdot mol⁻¹ であるのに対して、Leu では -39 kJ \cdot mol⁻¹、Ile では -41 kJ \cdot mol⁻¹ と、ほとんど差がない。しかし ΔH では、Met13 の -175 kJ \cdot mol⁻¹ に対して、Leu では -152 kJ \cdot mol⁻¹、Ile では -144 kJ \cdot mol⁻¹ であり、大きな変化が見られた (25 °C)。しかしこの場合、各アミノ酸側鎖の大きさの違いがあり、観測された熱力学量の差が側鎖の形の違いによるものか、それとも Met の -S- と、Leu、Ile の -CH₂- の化学的性質の違いに基づくものであるか、ははっきりしない。

Thomson らはこの問題を解決するために、Met13 をノロイシン (Nle) に置換したペプチドを用いた研究を行った¹⁸⁾。Nle は Met の -S- が -CH₂- に置き変わった構造をしている非天然アミノ酸である。ITC を用いた観測から、Nle の結合は Met に比較して、 ΔG° ではわずか 3.3 kJ \cdot mol⁻¹ の増加 (結合定数の減少) であったが、 ΔH では 33 kJ \cdot mol⁻¹ の増加 (発熱量の減少) であった (25 °C)。

S タンパク質とそれぞれのペプチドとの複合体の結晶構造を比較すると、両者には構造上の差異はほとんど見られ

なかった。これらの結果から Thomson らは、結合エンタルピーの大きな違いは、アミノ酸側鎖の形の違いではなく、-S- と -CH₂- の化学的性質の違いに由来すると結論した。具体的には、遊離ペプチドの水和状態の違い、複合体中での静電的相互作用の違いなどが考えうる、としている。

4. おわりに

前述のように、タンパク質の安定化の要因は単純ではなく、類似のアミノ酸置換を行いつつも、ここに記した研究例とは逆の結果をもたらすような場合もある。また安定化機構の解釈も同じではない(例えば文献19参照)。その現象の背後にある原理を見つけていくことが課題であり、熱測定は今後も重要な役割を果たしていこう。ただ、めざましい高感度化が進んだとは言え、生化学で濫用される方法に比べると熱測定ではかなり高濃度の試料が必要であり、これは本質的には可逆であるはずの変性反応を非可逆的にする原因ともなる。タンパク質の測定に適した、さらに安定で高感度の(そして安価な!)熱測定装置の普及が強く望まれる。

執筆の機会を与えていただいた北村進一先生、草稿にご意見をいただいた深田はるみ先生に深謝します。

文 献

- 1) 田中晶善, 北村進一, 生物物理 **32**, 110 (1992) .
- 2) M. Matsumura, G. Signor and B. W. Matthews, *Nature* **342**, 291 (1989) .
- 3) N. Pace, G. R. Grimsley, J. A. Thomson and B. J. Barnett, *J. Biol. Chem.* **263**, 11820 (1988) .
- 4) J. Ladbury, N. Kishore, H. W. Hellinga, R. Wynn, and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **33**, 3688 (1994) .
- 5) A. Tamura, S. Kojima, K. Miura, and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **33**, 14512 (1994) .
- 6) N. Pace, *J. Mol. Biol.* **226**, 29 (1992) .
- 7) K. Yutani, K. Ogasawara, T. Tsujita and Y. Suginoh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4441 (1987) .
- 8) E. Eriksson, W. A. Baase and B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **229**, 747 (1993) .
- 9) A. Tanaka, J. Flanagan and J. M. Sturtevant, *Protein Sci.* **2**, 567 (1993) .
- 10) D. Shortle, A. K. Meeker and E. Freire, *Biochemistry* **27**, 4761 (1988) .
- 11) A. Shirley, P. Stanssens, U. Hahn, and C. N. Pace, *Biochemistry* **31**, 725 (1992) .
- 12) L. Privalov and S. J. Gill, *Adv. Protein Chem.* **39**,

- 191 (1988) .
- 13) P. Murphy, P. L. Privalov and S. J. Gill, *Science* **247**, 559 (1990) .
- 14) I. Makhatadze and P. L. Privalov, *J. Mol. Biol.* **232**, 639 (1993) .
- 15) L. Privalov and G. I. Makhatadze, *J. Mol. Biol.* **232**, 660 (1993) .
- 16) V. Griko, G. I. Makhatadze, P. L. Privalov, *Protein Sci.* **3**, 669 (1994) .
- 17) R. Varadarajan, P. R. Connelly, J. M. Sturtevant, and F. M. Richards, *Biochemistry* **31**, 1421 (1992) .
- 18) J. Thomson, G. S. Ratnaparkhi, R. Varadarajan, J. M. Sturtevant and F. M. Richards, *Biochemistry* **33**, 8587 (1994) .
- 19) J. Doig and D. H. Williams, *J. Mol. Biol.* **217**, 389 (1991) .

要 旨

種々のアミノ酸置換タンパク質を対象として、その熱測定を行い、タンパク質の構造保持に寄与するさまざまな要因を解析しようとした最近の研究例のいくつかを紹介する。

注 釈

*1 本文中、アミノ酸残基の種類は三文字表記した。Asp; アスパラギン酸, Glu; グルタミン酸, Gly; グリシン, Ile; イソロイシン, Leu; ロイシン, Met; メチオニン, Phe; フェニルアラニン, Pro; プロリン, Ser; セリン。

*2 なお、筆者らのこの研究⁹⁾では、種々の結果に基づき、野生型と8種のアミノ酸置換タンパク質すべてについて、「変性に伴うタンパク質分子の(部分的)二量体化」を仮定して解析を行っている。その後、Carra らは同じタンパク質を含む系のDSC測定を行い、その変性は、二量体化などを伴わない単純な二状態転移であると報告している。(J. H. Carra, E. A. Anderson and P. L. Privalov, *Protein Sci.* **3**, 944 (1994) .) Carra らは両者の違いの原因として、文献9での「タンパク質濃度測定誤差」の可能性を挙げている。考えつきやすい原因ではあるが、文献9では、二量体化に伴って期待される「変性温度のタンパク質濃度依存性」が、すべてのタンパク質で、よい精度で矛盾なく観測・解析されている。この現象は単純な二状態転移では説明できない。