



タンパク質低温変性の熱力学

田村厚夫

(平成7年3月22日受理)

Cold Denaturation of Proteins

Atsuo Tamura

(Received March 22, 1995)

It has been known that the native structure of a protein can be denatured not only by increasing the temperature but also by decreasing it, the latter phenomenon being called "cold denaturation". Common features of cold denaturation as well as characteristics to each protein are summarized.

1. はじめに

タンパク質の三次元立体構造は、温度を上げた場合だけでなく、下げた場合にも壊れる（変性する）ことが知られている。前者は熱変性（英語では"heat denaturation"が一般的）、後者は低温変性（英語では"cold denaturation"が一般的）と呼ばれる。これは、分光学的に求めた標準ギブス自由エネルギー (ΔG^0) が通常室温付近で最大値をとり、その高温側および低温側双方で減少すること¹⁻³⁾ から予言されていた。近年、熱測定を含めた手法により、種々のタンパク質についてより詳しく低温変性が研究されてきている⁴⁻¹⁵⁾ ので、ここでまとめるとともに、問題点も指摘したい。

2. 測定について

低温変性は、どのように測定したらいいのか？最大の問題は、「タンパク質水溶液が凍ってしまう」ことをいかに避けるかということに尽きる。溶液の凝固点を下げるためもあり、高濃度の変性剤（塩酸グアニジン等）や有機溶媒（メタノール等）を加えたりする場合も報告されている¹⁶⁾。ただし、これらの添加は副次的な効果をタンパク質にもた

らす可能性も高く、筆者らが測定した場合^{7,8)} には、ひたすら過冷却をすることに賭けた。過冷却のコツは、まず振動等を避け静かにすること、タンパク質の溶液は遠心分離やろ過などによって混入物が氷形成の核となるのを防ぐこと、さらに常に状態をモニターして凍り始めたらすぐに温度を上げること、などである。

DSC装置は一度でも凍らせてしまうとセルのジオメトリが変まって使い物にならなくなってしまうので、それは許されない。融点以上からスタートするのが無難であろう。分光法ではかなり果敢に過冷却に挑んだが、その結果、NMR（重水溶液）では -12°C 程度まで下げることができた。温度を下けている間、常にNMRシグナル（Free Induction Decay）を見ているので、その緩和が急に早くなった場合に凍ったということですぐ試料を出すことができる。もちろん、測定中、試料管のスピンニングは行わない。CD等の分光測定では、水浴の振動のせいか、 -5°C 程度が限度であった。この際も、吸収曲線を常にモニターし、凍った場合はすぐ温度を上げた。凍ったといっても、固い氷に一瞬にして変わるわけではなく、「シャーベット」状になるようで、高価な石英セルを壊すことがなかったのは幸いであった。

Yale University, Department of Chemistry, New Haven, CT 06520, USA

現住所：神戸大学大学院自然科学研究科：〒657 神戸市灘区六甲台町1-1

Present Address : Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Rokkodai, Nada-ku, Kobe 657, Japan

また、低温の場合、速度論的にタンパク質のfoldingも unfolding もかなり遅くなるため十分待つて平衡状態で観測することが必要であり、特にDSC測定では $1\text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ の昇温速度を用いる場合が多いが低温変性観測はそれでは速すぎる場合が多い。他の速度論的測定を組み合わせるとともに、DSCでも異なる昇温速度で測定を行うこと、できれば降温測定を行う⁴⁾ ことなどが必要と思われる。

3. 理論的背景

低温変性はなぜ起こるのか？ここではタンパク質変性の熱力学を最も簡単な場合について理論的側面を概説し¹⁷⁾ 低温変性の機構を明らかにする。単量体で可逆的な熱変性をするタンパク質は、多くの場合、熱変性に伴ってnative状態(N)からdenatured状態(D)へ二状態に転移し、その際正の熱容量変化(ΔC_p)がある。つまり、変性エンタルピー(ΔH)には温度依存性がある。

$$N \rightleftharpoons D \quad K = \frac{[D]}{[N]} \quad \dots\dots\dots (1)$$

ΔC_p が温度に依存しないとすると、変性エンタルピーは

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_{1/2}) + \Delta C_p(T - T_{1/2}) \quad \dots\dots\dots (2)$$

で与えられる。ここで、 T は絶対温度、 $T_{1/2}$ は熱変性の変性温度を示す。なお、変性エンタルピーは熱測定で直接求まるものとし、標準エンタルピー(ΔH^0)でないものとした。同様に、変性エントロピーは

$$\Delta S^0(T) = \Delta S^0(T_{1/2}) + \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_{1/2}} \right) \quad \dots\dots\dots (3)$$

よって、変性の自由エネルギー(ΔG^0)は $\Delta G^0(T) = \Delta H(T) - T\Delta S^0(T)$ の関係式より

$$\Delta G^0(T) = \left(1 - \frac{T}{T_{1/2}} \right) \Delta H(T_{1/2}) + \Delta C_p(T - T_{1/2} - T \ln \left(\frac{T}{T_{1/2}} \right)) \quad (4)$$

と求まる。**Fig.1** (a) に (4) 式で与えられる自由エネルギー曲線を示す。(このシュミレーションに用いたパラメーターは実験値ではなく、低温変性が見えやすいよう設定した。) ΔG^0 がゼロとなる温度において $\Delta G^0 = -RT \ln K$ (R は気体定数)の関係式より (1) 式で表わされる平衡定数が1、すなわち50%の分子が変性するため、これを変性温度と定義するが、**Fig.1** (a) より一見してわかるように、熱変性温度を80℃とした場合、低温側約5℃にも変性温度が現われる。また、 ΔG^0 は40℃付近で最大値をとる(この温度で $\Delta S^0 = -d\Delta G^0/dT$ の関係式より ΔS^0 はゼロである)。これに相当するDSCの熱容量曲線のシュミレーションを**Fig.1** (b) に示した。ここでは、N状態に相当する熱容量 C_N およ

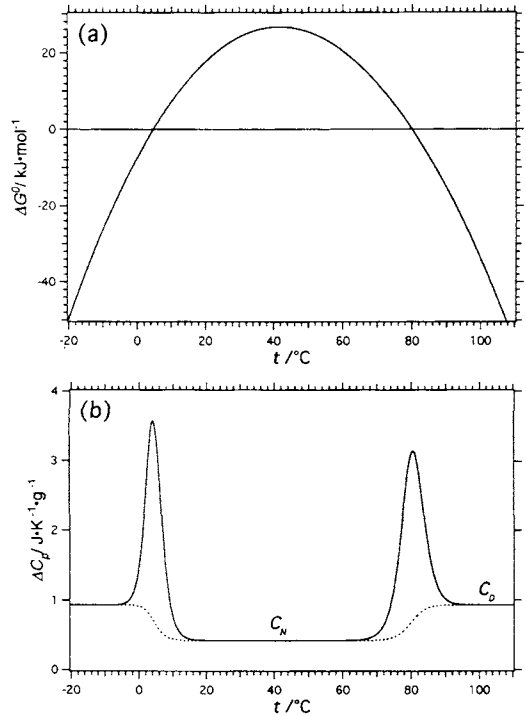
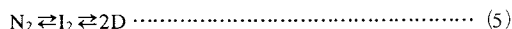


Fig.1 (a) A calculated free energy curve with the following parameters : $T_{1/2} = 353.15\text{ K}$ (80℃), $\Delta C_p = 0.515\text{ (J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{g}^{-1})$, $\Delta H = 20.9\text{ (J}\cdot\text{g}^{-1})$ at 80℃, MW = 23,000. (b) Corresponding curves for the excess heat capacity (solid curve) and its accompanying baseline (dashed curve) with $C_N = 0.418\text{ (J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{g}^{-1})$, $C_D = 0.933\text{ (J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{g}^{-1})$. C_N and C_D denote the heat capacities for the native and the denatured states, respectively.

びD状態に相当する熱容量 C_D を温度に依らない定数とした(この問題点については後述する)。これより、約80℃と5℃に熱の出入りの伴う転移があり、各々熱変性と低温変性に相当することがわかる。なお、本稿のすべてのシュミレーションはSturvantの論文¹⁸⁾をもとにし、筆者がマッキントッシュ上で走るように作ったものを用いた。

高温変性と低温変性の熱力学的な違いは、高温変性では ΔH , ΔS^0 ともに正であるが、低温変性では両者とも負であることである。また、低温側で、 ΔG^0 が再び減少するのは(4)式の ΔC_p 項が効いてくるためであり、 ΔC_p と $T_{1/2}$ が大きいほど、また ΔH が小さいほど、低温変性温度が高くなり、測定が容易になることがわかる。低温変性を測定する場合は、これに合ったタンパク系と条件で測定することが大切となる。

酸性条件下で二量体の中間体を経て熱変性することを発見した²⁰⁾。つまり



という三状態機構であるが、この場合どのような熱容量曲線となり得るかのsimulationをFig.2 (a)に、相当する各分子種の割合をFig.2 (b)に示した。30℃付近から温度を上昇させるにつれて、まず N_2 から I_2 へ二量体を保ったままの転移、そしてそれに続いて I_2 から 2D へ解離を伴った転移が起こるが、両者はかなり重複している。一方、温度を下降させた場合、まず N_2 から I_2 への転移に相当する低温変性が、続いて I_2 から D への解離を伴った転移に相当する低温変性が予測されるが、その両者がかなり分離されて見える。なお、現在のところ、この変異体タンパク質について、低温変性の観測を試みていないので、これも、あくまでシュミレーションであり、可能性を示したものである。

また、二量体であるSSIの二つの相同なサブユニット間にジスルフィド結合を導入したことで、変性しても解離しなくなった変異体²¹⁾を準備した。この場合、野生型で低温変性の観測が期待できる条件(pH 2未満)で、予想に反し低温変性はまったくおこらず、異なる反応、つまり温度の上昇に伴う分子間の会合と解離が起こることを見出した。このように、実際のタンパク系には、単純な理論では予測不能な興味深い点が多く残されている。

5. 理論的な諸問題

では理論自体に問題点はないのか？実は、3.で紹介した理論はシンプルではあるが、その中の仮定に問題が含まれている。それは、 ΔC_p の一定性に関するものである。

ΔC_p は物理学的には系の自由度と関係しており、タンパク質の場合、その要因は6種ほど考えられる²²⁾。中でも、「疎水相互作用」が最大の原因であることが多い²³⁻²⁵⁾が「内部振動モード」等が影響を与えている場合もある²⁶⁾。DSCの実験を行ってみると、 $\Delta C_p = C_D - C_N$ (Fig.2 (b)参照、この図では ΔC_p は温度に依らず一定であるとした)は多くのタンパク質の場合 C_N に正の傾きがあり C_D はほぼ水平であるため、一定でない、つまり温度の関数である。ところが、実験上転移温度を変化させても必ずしも ΔC_p がこの関数($C_D - C_N$)上にないことも多い。この理論的理由は今のところはっきりしないが、その理由の一つは実験誤差にある。つまり、 C_N あるいは C_D に誤差のあることは実験上避けられないので、どうしてもこの両者の延長線上から求まる ΔC_p の誤差は大きくなる。

一方、 ΔH は、熱容量曲線の積分型であり、熱容量曲線とベースラインとに囲まれた部分の面積に相当するためかなり正確に求まる。そこで、 ΔH を温度に対してプロットする

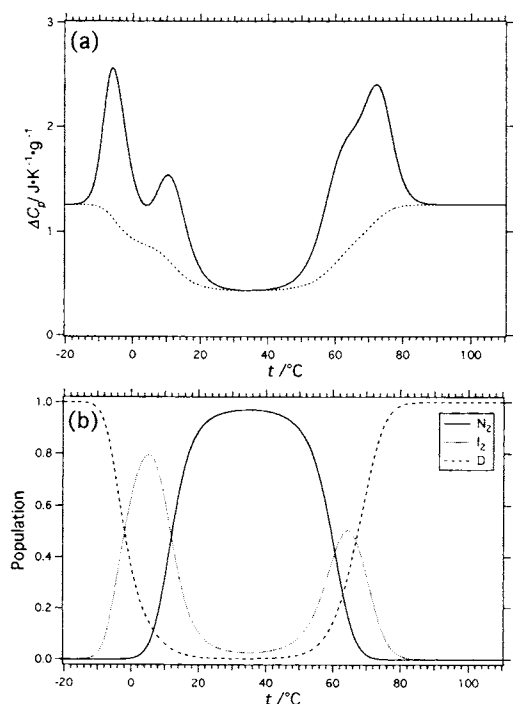


Fig.2 (a) Simulated excess heat capacity curve (solid curve) and the baseline (dashed line) for the reaction $\text{N}_2 \rightleftharpoons \text{I}_2 \rightleftharpoons 2\text{D}$ with the following parameters: ΔH for the first step = 10.5 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$), ΔH for the second step = 16.7 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$), $T_{1/2}$ for the first step = 333.15K (60°C), $T_{1/2}$ for the second step = 343.15K (70°C), MW = 23,000, c (concentration of the protein) = 1.97 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), C_{N_2} = 0.418, C_{I_2} = 0.837, C_{D} = 1.26 ($\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). (b) Corresponding temperature dependencies of populations for each species. Solid curve (N_2), dotted curve (I_2), and dashed curve (D).

4. 実際のタンパク系に際する諸問題

以上は二状態転移として、つまり(1)式に常に従うとして話を進めてきた。これによると、低温変性状態は熱変性状態と熱力学的には等価なはずである。ところが、低温変性が高温変性と異なる挙動を示す例がいくつか報告されてきている^{7, 8, 19)}。さらに、二状態でなく多状態転移を示すタンパク質も存在する。例えば筆者らは、*Streptomyces subtilisin inhibitor* (SSI) という二量体タンパク質の103位のメチオニン残基をロイシンに遺伝子操作で置換したものは

ことで、その傾きから ΔC_p を求めることが考えられる。ただし、その場合、変性温度やpHを変える、変性剤を加えるなどして変化させなければならないが、これは熱力学系を変えてしまうことを意味するので、傾きが(真の) ΔC_p である保証はないことになってしまう。それでも、このようにして実験的に変性温度を変化させた場合、それに応じて ΔH も直線的に変化することがほとんどのタンパク質で示されており²⁷⁾、この傾きは、DSC 曲線から求まる ΔC_p とよい一致を見る場合も多い^{28, 29)}。そこで、この傾きを ΔC_p とみなすことが正当化される場合がある。ただし、直線性がよいということは傾きは温度に依存しないということを意味するので、熱容量曲線から求まる ΔC_p ($=C_D - C_N$) が温度依存性を示すことと矛盾する点、傾きと ΔC_p が一致しない場合もある点^{21, 30)}などの問題点も残されている。

このように、単純に見えるタンパク質の低温変性熱力学には、依然未解決かつ重要な問題が残されており、これからさらに多くの系で低温変性が観測されれば、タンパク質の熱力学、およびタンパク質自体の安定性の理解の進歩につながると考える。

文 献

- 1) J. F. Brandts, *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 4291-4301 (1964) .
- 2) J. F. Brandts and L. Hunt, *J. Amer. Chem. Soc.* **89**, 4826-4838 (1967) .
- 3) N. C. Pace and C. Tanford, *Biochemistry* **7**, 198-208 (1968) .
- 4) P. L. Privalov, Y. V. Griko, S. Y. Venyaminov and V. P. Kutysenko, *J. Mol. Biol.* **190**, 487-498 (1986) .
- 5) R. H. M. Hatley and F. Franks, *Cryo-Lett.* **7**, 226-233 (1986) .
- 6) Y. V. Griko, P. L. Privalov, J. M. Sturtevant and S. Y. Venyaminov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3343-3347 (1988) .
- 7) A. Tamura, K. Kimura, H. Takahara, and K. Akasaka, *Biochemistry* **30**, 11307-11313 (1991) .
- 8) A. Tamura, K. Kimura and K. Akasaka, *Biochemistry* **30**, 11313-11320 (1991) .
- 9) Y. V. Griko and P. L. Privalov, *Biochemistry* **31**, 8810-8815 (1992) .
- 10) G. Damaschun, H. Damaschun, K. Gast, R. Miseselwitz, J. J. Müller, W. Pfeil and D. Zirwer, *Biochemistry* **32**, 7739-7746 (1993) .
- 11) K. Gast, G. Damaschun, H. Damaschun, R. Miseselwitz and D. Zirwer, *Biochemistry* **32**, 7747-7752 (1993) .
- 12) B.-I. Chen and J. A. Schellman, *Biochemistry* **28**, 685-691 (1989) .
- 13) E. Kitakuni, Y. Kuroda, M. Oobatake, T. Tanaka and H. Nakamura, *Protein Sci.* **3**, 831-837 (1994) .
- 14) I. Nishii, M. Kataoka, F. Tokunaga and Y. Goto, *Biochemistry* **33**, 4903-4909 (1994) .
- 15) F. Franks, *Adv. Protein Chem.* **46**, 105-139 (1995) .
- 16) A. L. Fink, *Cryobiology* **23**, 28-37 (1986) .
- 17) P. L. Privalov and S. J. Gill, *Adv. Protein Chem.* **39**, 191-234 (1988) .
- 18) J. M. Sturtevant, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **38**, 463-488 (1987) .
- 19) E. Freire, K. P. Murphy, J. M. Sanchez-Ruiz, M. L. Gakisteo and P. L. Privalov, *Biochemistry* **31**, 250-256 (1992) .
- 20) A. Tamura, S. Kojima, K. Miura and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **33**, 14512-14520 (1994) .
- 21) A. Tamura and J. M. Sturtevant, *J. Mol. Biol.*, in press (1995) .
- 22) J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2236-2240 (1976) .
- 23) W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **14**, 1-63 (1959) .
- 24) G. I. Makhatadze and P. L. Privalov, *J. Mol. Biol.* **213**, 375-384 (1990) .
- 25) P. L. Privalov and G. I. Makhatadze, *J. Mol. Biol.* **213**, 385-391 (1990) .
- 26) P. R. Connolly, R. Varadarajan, J. M. Sturtevant and F. M. Richards, *Biochemistry* **29**, 6108-6114 (1990) .
- 27) P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **33**, 167-241 (1979) .
- 28) C. -Q. Hu, S. Kitamura, A. Tanaka and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **31**, 12701-12705 (1992) .
- 29) J. E. Ladbury, C. -Q. Hu and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **31**, 10699-10702 (1992) .
- 30) C. -Q. Hu, J. M. Sturtevant, J. A. Thomson, R. E. Erickson and C. N. Pace, *Biochemistry* **31**, 4876-4882 (1992) .

要 旨

タンパク質の立体構造は、温度を上げた場合だけでなく、下げた場合にも壊れることが知られており、後者は低温変性と呼ばれている。低温変性が起こる機構および報告例をまとめるとともに、實際上単純な機構にあてはまらないタンパク質系、熱力学上の問題点を指摘した。