


 解説

## シトクロムcモルテングロビュール状態に関する熱力学的研究

中村成芳, 城所俊一

(受取日: 2007年5月8日, 受理日: 2007年5月19日)

## Thermodynamic Study on the molten globule state of cytochrome c

Shigeyoshi Nakamura and Shun-ichi Kidokoro

(Received May 8, 2007; Accepted May 19, 2007)

Molten globule (MG) state, which is structurally distinct from both the native (N) and denatured (D) states, was originally proposed as an equilibrium intermediate state of denaturation of some proteins with a compact conformation, a considerable native-like secondary structure, and a largely fluctuating tertiary structure. Recently, our group has developed isothermal acid-titration calorimetry (IATC), a calorimetric method for evaluating the enthalpy change accompanying the pH-induced transition of protein using isothermal titration calorimeter. By this method, the pH-induced transition from N to MG state of cytochrome c was directly observed by calorimetry and was confirmed to be a two-state transition with small enthalpy change. Also, the MG state was detected in the thermal transition from N to D state by highly precise differential scanning calorimetry.

Keywords: folding intermediate; isothermal acid-titration calorimetry; pH transition; thermodynamic stability; cooperativity

## 1. はじめに

蛋白質分子はアミノ酸が数珠状につながったポリペプチド鎖であり, 水中でこの鎖が, 熱力学的に安定な立体構造へと自発的に折れ畳むことで, その分子機能を発揮する。この立体構造の安定性や折り畳み(フォールディング)過程を理解し, 予測・設計することは生命科学の最も重要なテーマの一つである。<sup>1)</sup>

蛋白質立体構造の熱力学的な安定性を理解する上で, 様々な蛋白質で平衡論的なモルテングロビュール(MG)状態が確認され, 物理化学的な研究の対象となっている。<sup>2,3)</sup> また, MG状態が多くの蛋白質のフォールディング過程で速度論的な中間状態として観測されている。<sup>2)</sup> 蛋白質のMG状態の共通の性質として, 天然(N)状態と同程度の

2次構造を形成しており, コンパクトな球状をしているが, 側鎖の特異的なパッキングは緩く, 揺らぎが大きい構造であることが知られている。多くの蛋白質で, 平衡論的に観測されるMG状態が速度論的なMG状態と同一の構造的特徴を示すことが報告されている。よってMG状態の熱力学的安定性を正確に評価することは, 蛋白質の立体構造安定化機構や, フォールディング機構を理解する上で非常に重要である。

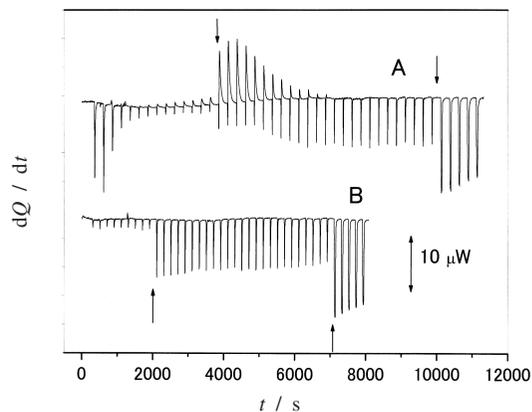
しかしながらMG状態の熱力学的研究は, その測定が困難であるためあまり進んでいない。例えば, 最もMG状態が研究されている代表的な蛋白質であるシトクロムc(ヘムを持つ104残基の小さな球状蛋白質)では, 酸性pH, 高塩濃度条件での, MG状態からD状態への転移(MG~D転移)は, 示差走査熱量測定(DSC)や分光測定を用

いて、比較的大きなエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) を伴う協同的な熱転移であることが示されている。<sup>4-6)</sup> しかしN~MG状態の転移については、 $\Delta H$ が小さいことからDSCでは観測が困難で、この転移についての協同性などの熱力学的機構は不明であった。また、シトクロムcのMG状態は、酸性pH、高塩濃度存在下や変性剤存在下などの特殊な条件下のみ安定な状態として観測されてきた。すなわち、フォールディングが実際に起こりうる(平衡論的にN状態が安定に存在する)溶媒条件ではMG状態を安定な状態として検出するのは困難とされていた。本解説では平衡論的にN状態が安定に存在する溶媒条件のことを「ネイティブ条件」とよぶことにするが、ネイティブ条件でのMG状態の立体構造や熱力学的安定性を実測することは困難と考えられていたのである。

我々は、最近、等温滴定型熱量計を用いて、蛋白質溶液中に酸を滴下し、溶液のpHを下げることで蛋白質の構造転移を誘導し、その際のエンタルピー変化を直接測定する、「等温酸滴定熱量測定法(IATC)」を開発し、立体構造転移に伴う熱容量変化の測定や構造転移の協同性の評価が可能なることを示した。<sup>7)</sup> 本解説では、この方法を簡単に紹介するとともに、この方法を用いてシトクロムcのN~MG転移を熱量計で直接測定することに成功したのを第2章で紹介する。また、高精度DSCと多状態解析によって、これまでNとDの2状態転移と考えられていたシトクロムcの熱転移に、MG状態と考えられる安定な中間状態が存在することを明らかにしたのを第3章で紹介する。これらの知見により、ネイティブ条件でのMG状態の熱力学的安定性について、その詳細が明らかになってきた。

## 2. 等温酸滴定熱量測定法 (IATC) を用いたシトクロムcのN~MG転移の観測

現在、蛋白質の熱力学的な安定性を評価する最も有力な方法として、示差走査熱量測定法(DSC)が普及している。DSCでは、温度変化に伴う熱力学量変化を精密に決定でき、特に熱転移に伴うエンタルピー変化を直接測定できる。<sup>8)</sup> 温度以外の原因による蛋白質の変性(変性剤変性、酸変性)を評価する熱測定法も報告されているが、<sup>9,10)</sup> 高濃度の蛋白質が多量に必要ななどの問題点があり、汎用的に用いられるまでには至っていなかった。近年、等温滴定型熱量計(IATC)を用いて、酸変性したシトクロムcに塩を滴定することでMG状態に構造転移させ、変性(D)状態からMG状態の熱力学量を精密に評価できることが報告され、<sup>5)</sup> ITCが蛋白質安定性の評価にも非常に有効であることが示された。またITCを用いて蛋白質溶液に塩酸を滴定することで、アポミオグロビンのMG状態から酸変性状態への転移に伴う熱力学量を評価することが試みられた。<sup>11)</sup> こ

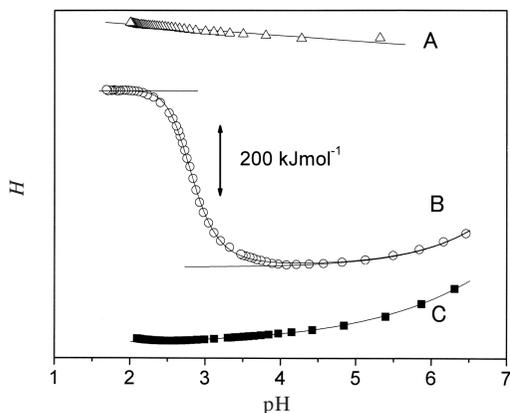


**Fig.1** (A) Typical raw calorimetry data of acid-titration to bovine ribonuclease A in 20 mM NaCl solution. In this experiment, 200 mM HCl in 20 mM NaCl was titrated to the protein solution in the calorimeter cell at 40 °C. 0.5 μl of 200 mM HCl was added for the initial 14 injections, 2.5 μl was added for the next 25 injections, and 15 μl was added for the final 5 injections. The downward-pointing arrows indicate the time points at which the injection volume was changed. (B) A control titration of 200 mM HCl in 20 mM NaCl solution to 20 mM NaCl solution at 40 °C. The titration was performed with injection of 0.5, 2.5 and 15 μl each of an HCl titrant with a syringe of 250 μl. The upward-pointing arrows show the time points at which the injection volume was changed.<sup>7)</sup> (Reprinted with permission from Elsevier).

の研究では転移に伴うエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) が非常に小さいためかMG~D転移は明確には観測されていないが、塩酸の希釈熱が小さいことが報告されており、ITCを用いることで蛋白質の酸転移に伴う熱力学量を精密に評価できる可能性を示している。

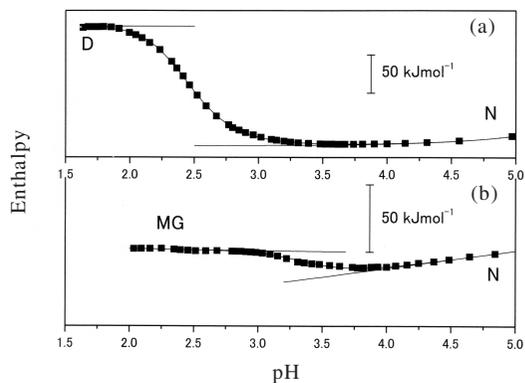
我々は溶液中に蛋白質以外の塩基を入れなければ、蛋白質溶液に酸を滴下した際に生じる中和熱は非常に小さいため、酸の混合による希釈熱を正確に補正できれば、ITCにより、pH変化に伴う蛋白質分子のエンタルピー変化が直接測定可能であろうと考えた。そこで、塩酸を滴定することで生じる熱をITCで測定し、同組成溶液のpHを別に測定することで、酸の希釈熱を正確に補正し、蛋白質分子のエンタルピーをpHの関数として評価する手法を確立し、「等温酸滴定熱量測定法(IATC)」と名付けた。<sup>7)</sup>

Fig.1は蛋白質溶液 (A) とブランク溶液 (B) の酸滴



**Fig.2** The enthalpy of bovine ribonuclease A was determined as a function of pH at 15 °C (filled squares), 40 °C (open circles) and 65 °C (open triangles). The solid lines were determined by least-squares fitting with an exponential function (15 °C), a linear function (65 °C), and a theoretical curve calculated by a two-state transition model (40 °C), respectively.<sup>7)</sup> (Reprinted with permission from Elsevier).

定に伴う ITC の生データを示す。ブランク溶液では酸の希釈熱に由来する発熱ピークのみが観測されるのに対し、蛋白質溶液では酸の希釈熱の他に蛋白質の構造転移に伴う吸熱が観測される。これらのピークを積分し、希釈熱、中和熱を補正することで蛋白質の酸転移に伴うエンタルピーを pH の関数として評価することができる。Fig.2 は 65 °C (A)、40 °C (B)、15 °C (C) でのウシ・リボヌクレアーゼ A のエンタルピーの pH 依存性を示す。65 °C では観測した全 pH 範囲でリボヌクレアーゼ A は変性 (D) 状態であり、15 °C では観測した全 pH 範囲で天然 (N) 状態であるため、両者とも酸転移は観測されない。一方、40 °C では pH 4 から pH 2 の範囲で N ~ D 構造転移に伴うエンタルピー変化が観測できる。この報告では、40 °C でのエンタルピーの pH 依存性を 2 状態モデルを用いて最小 2 乗法で解析することにより、リボヌクレアーゼ A の酸転移に伴う熱力学量変化を評価している。ここで、N 状態のエンタルピーの pH 依存性を指数関数、D 状態のエンタルピーの pH 依存性を定数で近似した。解析の結果、転移中点 pH (pH 2.84) でのエンタルピー変化 ( $\Delta H^{\text{cal}}$ ) は 312 kJ mol<sup>-1</sup>、水素イオン結合数の変化 ( $\Delta v$ ) は 2.5 となった。これらの熱力学量を用いて計算した理論曲線は実験データと非常に良く一致している。また、これらの結果は、従来法である DSC により評価した pH 2.7 でのリボヌクレアーゼ A の熱転移における転移中点温度 (40 °C) での  $\Delta H$ , 310 kJ mol<sup>-1</sup> と良



**Fig.3** (a) The enthalpy function of bovine cytochrome c in pH-induced transition from N to D state at 30 °C. The solid lines show the theoretical fitting curve calculated by two-state analysis and the base lines of N and D state. (b) The enthalpy function of bovine cytochrome c in pH-induced transition from N to MG state. The solid lines show the theoretical fitting curve calculated by global fitting two-state analysis and the base lines of N and D state.<sup>12)</sup> (Reprinted with permission from Elsevier).

く一致した。また、円二色性 (CD) 測定により観測したリボヌクレアーゼ A の構造転移も、この理論曲線でうまく説明できることが確かめられた。更に、リボヌクレアーゼ A の酸転移が観測できる複数の温度で IATC 測定をすることでファントホッフエンタルピー ( $\Delta H^{\text{vH}}$ ) を評価したところ、前述の  $\Delta H^{\text{cal}}$  と誤差の範囲内で一致した。この結果はリボヌクレアーゼ A の酸転移が、熱転移と同様に 2 状態転移であることを示している。また温度を変えて IATC 測定することにより、 $\Delta H$  の温度依存性すなわち熱容量変化 ( $\Delta C_p$ ) が評価できる。DSC 測定による  $\Delta C_p$  の評価の際には、通常  $\Delta H$  の pH 依存性は無視されるが、IATC の場合には、 $\Delta H$  の pH 依存性も実測値を用いて正しく評価し  $\Delta C_p$  を決定できる。本研究よりリボヌクレアーゼ A の酸変性では、 $\Delta H$  の pH 依存性が  $\Delta C_p$  へ与える影響は小さく、実験誤差と同程度になることがわかった。このように IATC は蛋白質溶液の pH 変化に伴う転移の熱力学量を評価するのに非常に有効な手法であることが示された。

IATC を用いることでウシ・シトクロム c の N 状態から D 状態への酸転移と、これまで熱力学的機構が不明であった N 状態から MG 状態への酸転移を解析した。<sup>12)</sup> Fig.3(a) は 30 °C でのシトクロム c の N ~ D 転移におけるエンタルピーの pH 依存性を示している。2 状態解析の結果、転移中点 pH (pH 2.47) での  $\Delta H$  は 154 kJ mol<sup>-1</sup>、 $\Delta v$  は 2.41 とな

った。Fig.3(b)は20℃でのシトクロムcのN~MG転移におけるエンタルピーのpH依存性を示している。N~MG状態転移をIATCにより複数温度で測定し2状態モデルでグローバル解析を行なった。中点pH (pH 3.47) での $\Delta H$ は20 kJ mol<sup>-1</sup>,  $\Delta v$ は2.1となった。2状態グローバル解析により計算した理論曲線は実験データと非常によく一致している。2状態グローバル解析は $\Delta H^{\text{H}}$ と $\Delta H^{\text{cal}}$ が一致するという前提に基づいているため、理論曲線が実験データの温度依存性までうまく記述できていることは、シトクロムcのN~MG転移は協同的な2状態転移であることを証明している。これによりMG状態は構造だけでなく熱力学的にもN状態と明確に区別できる状態であることが示された。

これらの研究によりIATCを用いることでDSCでは観測することが困難な、転移に伴うエンタルピー変化が非常に小さい構造転移についても、精密に評価できることが確かめられた。水素イオンは多くの生体分子に共通のリガンドであるため、今後、等温酸滴定熱量測定法 (IATC) は、生体分子の熱力学的評価に幅広く応用できることが期待される。

### 3. 低塩濃度でのシトクロムcのN~D転移で検出されたMG状態

従来、シトクロムcのMG状態は酸性pH、高塩濃度存在下や変性剤存在下などの特殊な条件下のみ安定に観測されていた。前章で熱測定により観測に成功したN~MG転移も、高い塩濃度条件下の測定であった。これは、この蛋白質がリジンやアルギニンなどの正電荷を持つアミノ酸が多く、酸性側では、分子全体として大きな正電荷を持ち、分子鎖がコンパクトに折りたたまれたMG状態は不安定になるが、陰イオン濃度が高ければ、これらが蛋白質に結合することでMG状態を静電的に安定化することができるためと考えられている。

従来のDSCの結果から、シトクロムcなどの比較的小さな球状蛋白質の熱転移は、第一次近似としては協同的な2状態転移で記述できることが示されていた。<sup>13)</sup> この際、 $\Delta H^{\text{H}}$ は $\Delta H^{\text{cal}}$ よりわずかに小さいことが既に指摘されており、中間 (I) 状態がわずかに存在する可能性が示されていた。しかしながら、このI状態の構造、熱力学的安定性などの詳細についてはこれまでの所、明らかになっていない。我々は、シトクロムcにおいて、熱転移におけるI状態がネイティブ条件下でのMG状態ではないかという仮説を立て、最新の生体分子用DSC装置 (MicroCal社VP-DSC) 等を用いてウマ由来シトクロムcの熱転移中間状態を解析した。<sup>14)</sup>

Fig.4はDSCにより観測したpH 3.8~5.0のシトクロムcの熱転移である。その熱容量関数をダブルデコンボリュ

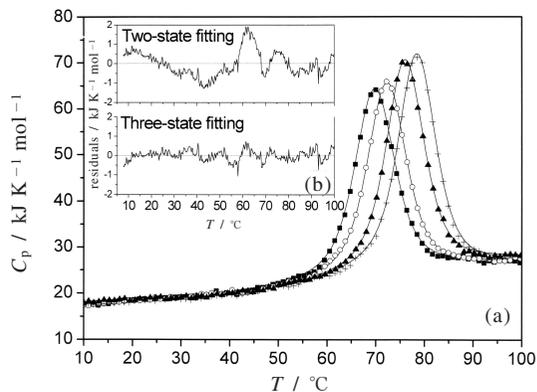


Fig.4 (a) The temperature dependence of the partial molar heat capacity of horse cytochrome c at pH 3.8 (closed squares), 4.1 (open circles), 4.5 (closed triangles), and 5.0 (crosses). The solid lines show the theoretical fitting curves determined by the analysis with the three-state transition model. (b) The residuals of two-state (upper graph) and three-state (lower graph) fittings.<sup>14)</sup> (Reprinted with permission from Elsevier)

ーション法<sup>8,15)</sup>により解析することで、シトクロムcの熱転移では転移中点温度付近でI状態が存在することが示された。この結果を踏まえ、シトクロムcの熱転移を3状態転移モデルを用いて最小2乗解析を行い、I状態を含めた熱転移の熱力学量変化を評価した (Table 1)。Fig.4(a)の実線は3状態解析により評価した熱力学量を用いて計算した熱転移の理論曲線を示している。理論曲線は実験データを非常によく説明している。Fig.4(b)はpH 4.1のシトクロムcの熱転移における2状態解析、3状態解析により計算した理論曲線と実験値の残差を示している。2状態解析では、3状態解析に比べて残差が大きいのはもちろんだが、特に転移中点温度以下の温度範囲で理論曲線と実験値が“系統的に”ずれていることがわかる。

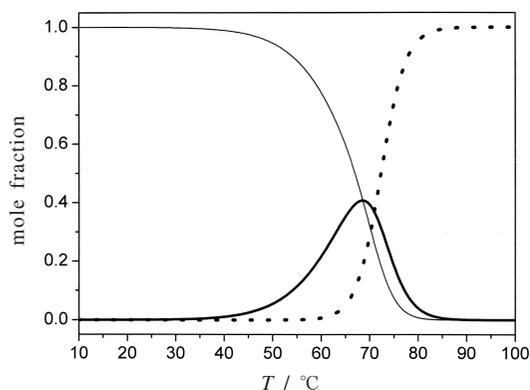
Fig.5はpH 4.1のシトクロムcの熱転移の3状態解析により評価したモル分率を示している。転移中点温度付近でI状態が40%程度存在することとなり、I状態が従来の予想よりかなり大きい割合で存在することが明らかになった。

Fig.6はpH 4.1のシトクロムcの熱転移におけるエンタルピー変化の温度依存性を示している。DSCの3状態解析とIATCにより評価したN~D転移に伴うエンタルピー変化 ( $\Delta H_{\text{ND}}$ ) は、従来報告されていた値より100 kJ mol<sup>-1</sup>も大きい値を示している。我々の実験データを、前述のような系統的な残差を無視して2状態解析で評価した $\Delta H_{\text{ND}}$ は、従来報告されていた値とほぼ一致することから、今回は、

**Table 1** The thermodynamic parameters, such as the mid-point temperature,  $T_m$ , the enthalpy change,  $\Delta H$ , and the heat capacity change,  $\Delta C_p$  on the thermal transition of horse cytochrome *c* determined by DSC and IATC. The  $\Delta H$  was evaluated at  $T_m$ .

a) These data were evaluated by IATC method. b) These values of the  $\Delta C_p$  were determined by the three-state analysis of the heat capacity function. c) This value of the  $\Delta C_p$  was the linear fitting of the temperature dependence of  $\Delta H$  (see Fig.6). d) These values of the  $\Delta H$  were determined by the two-state analysis.

pH	$T_{m,NI}$ / °C	$\Delta H_{NI}$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$T_{m,ND}$ / °C	$\Delta H_{ND}$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_{p,ND}^{b)}$ / kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_{p,ND}^{c)}$ / kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	$\Delta H_{ND-2}^{d)}$ / kJ mol <sup>-1</sup>
3.8	68 ± 2	141 ± 8	68.0 ± 0.3	449 ± 6	5.7 ± 0.7		378 ± 2
4.1	69 ± 1	141 ± 6	70.2 ± 0.3	468 ± 6	5.6 ± 0.7	6.2 ± 0.1	391 ± 2
4.5	7.3 ± 1	155 ± 6	74.1 ± 0.2	498 ± 6	6.3 ± 0.7		413 ± 1
5.0	73 ± 1	157 ± 3	76.2 ± 0.2	520 ± 4	5.8 ± 0.7		422 ± 1
2.9 <sup>a)</sup>			40 <sup>a)</sup>	288 ± 1 <sup>a)</sup>			

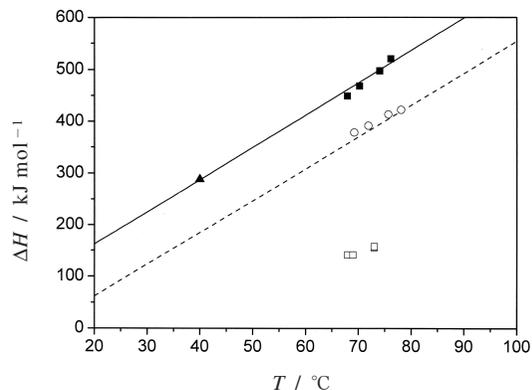


**Fig.5** The temperature dependence of the mole fraction of each state of cytochrome *c* at pH 4.1 determined by the three-state analysis with the nonlinear least squares method. The mole fractions of the native (thin solid line), the intermediate (thick solid line), and the denatured (dotted line) state were shown.<sup>14)</sup> (Reprinted with permission from Elsevier).

実験精度が高くなったことで、中間状態の存在を確認でき、更に、N~D転移のエンタルピー変化も正しく評価できるようになったものと考えられる。

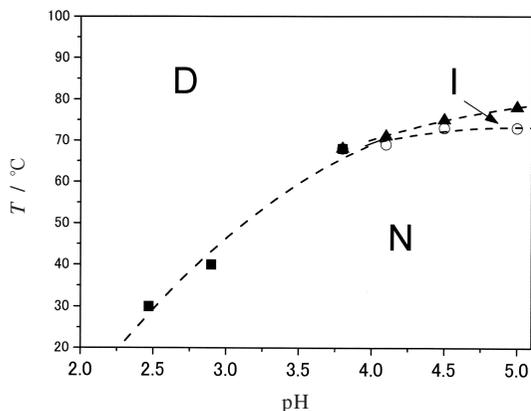
DSCの3状態解析とIATCにより評価した $\Delta H_{ND}$ の温度依存性からN~D転移に伴う熱容量変化( $\Delta C_{p,ND}$ )は6.2 kJ K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>と推定された。この結果は従来報告されていた $\Delta C_{p,ND}$ と一致している。<sup>16)</sup> N~I転移にともなう熱容量変化( $\Delta C_{p,NI}$ )は0~3 kJ K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>と推定された。

文献<sup>14)</sup>では、円二色性(CD)の温度変化測定によりpH 4.1のシトクロム*c*の熱転移を観測し、芳香族側鎖の規則構造を反映する波長(289 nm, 416 nm)でのCDは2次構



**Fig.6** The temperature dependence of the enthalpy change,  $\Delta H$ , obtained by DSC and IATC methods. The filled squares show the enthalpy change from the N to the D state,  $\Delta H_{ND}$ , determined by DSC with the three-state transition model. The open squares show that from the N to I state,  $\Delta H_{NI}$ . The open circles show the  $\Delta H_{ND}$ , determined with the two-state transition model. The filled triangles show the enthalpy change from the N to the D state,  $\Delta H_{ND}$ , determined by IATC. The solid line represents the fitting line of  $\Delta H_{ND}$  from DSC and IATC in this study. The broken line shows  $\Delta H_{ND}$  by the two-state transition analysis reported previously.<sup>14,15)</sup> (Reprinted with permission from Elsevier).

造を反映する波長(222 nm)でのCDより低い温度で変化することも示している。この結果はシトクロム*c*の熱転移がN状態とD状態以外に安定な中間状態が存在することを明確に示しており、熱測定の結果と一致している。また

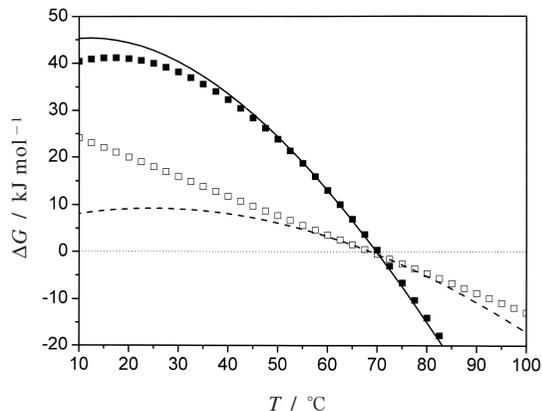


**Fig.7** The phase diagram of cytochrome *c* under low salt concentration. The symbols and broken lines show the borders between N and I state (open circles), I and D state (filled triangle), and N and D state (filled square).

I状態では2次構造はN状態と同程度形成しているが、側鎖の規則構造やヘムへのメチオニン残基の配位はN状態とは異なり、3次構造は壊れていることが示唆された。<sup>14)</sup> また、溶液X線散乱(SXS)測定よりI状態は球状でN状態と同程度にコンパクトであることが示されている。これらのCD, SXSの結果から低塩濃度でのシトクロム*c*の熱転移で観測されたI状態はMG状態であることが示された。これは、シトクロム*c*のMG状態がネイティブ条件で安定に存在することを示した初めての報告である。

**Fig.7**は低塩濃度でのシトクロム*c*のpHと温度に対する相図である。なお、相の境界線は境界の両側の状態のモル分率が等しくなる条件を示している。pH 4より中性側では、N状態とD状態の境界にI状態が安定に存在することがわかる。我々が観測したネイティブ条件でのMG状態は、弱酸性条件下で、まだ中和していないカルボン酸残基が分子に残り、静電反発が弱いため低塩濃度でも安定に存在でき、pH 4より酸性側では、カルボン酸が中和することで分子内の静電反発が強くなるため低塩濃度では安定に存在できなくなると考えられる。本研究では熱測定に使用するサンプルの可逆性を良くするために弱酸性(pH 3.8~5.0)で実験を行っているが、相図からは中性pHではMG状態はより安定に存在することが予測される。

N~I転移に伴う熱容量変化 $\Delta C_{p,NI}$ が $0 \sim 3 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ であることから、N状態で分子内部に埋まっている疎水領域の50%以上が低塩濃度でのMG状態でも保持されており、ネイティブ条件でのMG状態が疎水相互作用で安定化されていることが強く示唆された。



**Fig.8** The temperature dependence of the Gibbs free-energy change,  $\Delta G$ . The filled squares show  $\Delta G_{ND(0)}$  and the open squares show  $\Delta G_{NI(0)}$ , calculated with  $\Delta C_{p,NI}$  fixed at  $0 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . The solid lines show  $\Delta G_{NI(3)}$  and the broken lines show  $\Delta G_{ND(3)}$ , calculated with  $\Delta C_{p,NI}$  fixed at  $3 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .<sup>14)</sup> (Reprinted with permission from Elsevier).

**Fig.8**はpH 4.1、低塩濃度でのシトクロム*c*のN~I間、N~D間のギブス自由エネルギー変化( $\Delta G_{NI}$ ,  $\Delta G_{ND}$ )の温度依存性を示している。15℃での $\Delta G_{NI}$ と $\Delta G_{ND}$ は9~22  $\text{kJ mol}^{-1}$ と41~45  $\text{kJ mol}^{-1}$ と評価された。これはN状態が安定に存在する条件でI状態(MG状態)はD状態よりも自由エネルギー的に安定であることを示している。この結果はネイティブ条件で平衡論的に観測されたMG状態が、フォールディング過程で自発的に形成されることとうまく符合している。すなわち、シトクロム*c*の水中でのフォールディング過程ではD状態から、まずギブス自由エネルギーが20~30  $\text{kJ mol}^{-1}$ 低いMG状態に変化し、その後、10~20  $\text{kJ mol}^{-1}$ ギブス自由エネルギーを下げながらN状態に到達する(立体構造が形成される)と考えられる。

#### 4. おわりに

本解説ではITCを用いた蛋白質の酸転移に伴う熱力学量を評価する手法である等温酸滴定熱量測定法(IATC)について紹介し、その有用性を示すと共に、IATCや高精度DSCといった最新の熱測定法を用いることで、シトクロム*c*のN~MG転移の熱力学的機構やネイティブ条件でのMG状態の熱力学的安定性といった新しい重要な知見が明らかになったことを紹介した。これらの成果は、蛋白質の熱力学的安定性や構造形成過程の研究において、熱測定が非常に有力な手法であることを改めて示していると言える。

## 文 献

- 1) 曾田邦嗣, 熱測定 **32**, 42-50 (2005).
- 2) M. Arai and K. Kuwajima, *Adv. Protein Chem.* **53**, 209 (2000).
- 3) M. Ohgushi and A. Wada, *FEBS Lett.* **164**, 21 (1983).
- 4) S. Potekhin and W. Pfeil, *Biophys. Chem.* **34**, 55 (1989).
- 5) D. Hamada, S. Kidokoro, H. Fukada, K. Takahashi, and Y. Goto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10325 (1994).
- 6) Y. Kuroda, S. Kidokoro, and A. Wada, *J. Mol. Biol.* **223**, 1139 (1992).
- 7) S. Nakamura and S. Kidokoro, *Biophys. Chem.* **109**, 229 (2004).
- 8) S. Kidokoro and A. Wada, *Biopolymers* **26**, 213 (1987).
- 9) W. Pfeil and P. L. Privalov, *Biophys. Chem.* **4**, 23 (1976).
- 10) W. Pfeil and P. L. Privalov, *Biophys. Chem.* **4**, 33 (1976).
- 11) M. Jamin, M. Antalik, S. N. Loh, D. W. Bolen, and R. L. Baldwin, *Protein. Sci.* **9**, 1340 (2000).
- 12) S. Nakamura and S. Kidokoro, *Biophys. Chem.* **113**, 161 (2005).
- 13) P. L. Privalov and N. N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* **86**, 665 (1974).
- 14) S. Nakamura, T. Baba, and S. Kidokoro, *Biophys. Chem.* **127**, 103 (2007).
- 15) S. Kidokoro, H. Uedaira, and A. Wada, *Biopolymers* **27**, 221 (1988).
- 16) L. Fu and E. Freire, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9335 (1992).

## 要 旨

天然 (N) 状態, 変性 (D) 状態と構造的に区別される状態であるモルテングロビュール (MG) 状態はいくつかの蛋白質の変性の平衡論的な中間状態として発見された。MG 状態は, N 状態と同程度の2次構造を持ったコンパクトな球状であるが3次構造は大きく揺らいでいる。最近, 我々は等温滴定熱量計を用いて, 蛋白質のpH転移に伴うエンタルピー変化を評価する手法として等温酸滴定熱量測定法 (IATC) を開発した。本法を用いて, シトクロムcのN状態からMG状態へのpH転移を直接熱量計で観測し, N状態からMG状態への転移は小さいエンタルピー変化を伴う2状態転移であることを確認した。またシトクロムcのN状態からD状態への熱転移を高精度DSCで解析することで, 転移の際にMG状態が観測されることを示した。



中村成芳 Shigeyoshi Nakamura  
長岡技術科学大学生物系, Dept. of Bioengineering, Nagaoka Univ. of Technology, TEL.&FAX 0258-47-9425, e-mail: shige@stn.nagaokaut.ac.jp  
研究テーマ: 蛋白質の構造, 物性  
趣味: ドライブ, 読書, 競馬, 散歩



城所俊一 Shun-ichi Kidokoro  
長岡技術科学大学生物系, Dept. of Bioengineering, Nagaoka Univ. of Technology, TEL.&FAX 0258-47-9425, e-mail: kidokoro@nagaokaut.ac.jp  
研究テーマ: 蛋白質物性  
趣味: 古典音楽