


 解説

二成分溶液中(水+DMSO)におけるリゾチームの熱力学

神山 匡

(受取日：2009年9月28日，受理日：2009年10月24日)

Thermodynamics of Lysozyme in Binary Solutions of Water + DMSO

Tadashi Kamiyama

(Received Sep.28, 2009; Accepted Oct.24, 2009)

Thermodynamic properties of lysozyme in binary solutions of water + dimethyl sulfoxide (DMSO) were studied paying attention to the intrinsic viscosity, the partial specific volume, the activation free energy for viscous flow, and the thermal denaturation of lysozyme. The thermostability and cooperativity of lysozyme for thermal denaturation was decreased and increased, respectively, with increasing the molar fraction of DMSO (x_2). Lysozyme was stabilized ($\Delta\Delta G = -3 \text{ kJ mol}^{-1}$) through the specific binding of DMSO at $x_2 = 0.05$. In the range of $x_2 = 0.3$ to 0.4, lysozyme was unfolded accompanied with increase in the intrinsic viscosity ($\Delta[\eta] = 5.0 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), the partial specific volume ($\Delta v^\circ = 0.023 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), and the activation free energy for viscous flow ($\Delta\Delta\mu^\circ_3 = 1.4 \times 10^3 \text{ kJ mol}^{-1}$). It was considered that these changes were due to interfering water - lysozyme interaction through the strong water - DMSO interaction which was reflected in the maximum or minimum excess functions of the binary solution. The apparent partial specific volume of lysozyme was significantly dependent on the concentration of lysozyme and DMSO, indicating the preferential hydration or solvation to lysozyme. These results indicate that thermodynamic properties of protein in binary solutions together can sensitively reflect the conformational change of protein and the interaction with solvent.

Keywords: protein, binary solution, thermodynamics

1. はじめに

電離性高分子であるタンパク質はそれぞれ固有のアミノ酸配列を持ち、固有の機能発現において固有の立体構造を形成する。どのような“構造”がどのような“機能”を発現するのか。新しい機能を持つタンパク質を設計するためにはこの相関の解明が不可欠である。しかし、酵素活性の至適温度や反応速度にも見られるように、タンパク質が十分に機能するためには安定性やダイナミクス(揺らぎ)などの物理化学的性質(物性)を無視することはできない。どのような“構造”が、どのような“物性”を持つのか。どのような“物性”が、どのような“機能”に有効なのか。

この“構造”と“物性”と“機能”の相関を解明することが医薬品開発をはじめタンパク質工学の重要な課題となっている。¹⁾

タンパク質の立体構造はペプチド結合、ジスルフィド結合などの共有結合や、水素結合、疎水的相互作用、静電的相互作用などの非共有結合で構成され、これらのエンタルピー的安定化と構造や溶媒和に起因するエントロピー的不安定化の微妙なバランスによって水素結合数本分程度の僅かな安定性で形成されている。このようなタンパク質にとって、“溶媒”は立体構造を形成するための“場”，機能を発現するための“場”であり、生命にとって最も重要な溶媒である水分子の種々の特性が“場”として重要な役割を

果たしていることが知られている。^{2,3)} 変性剤や有機溶媒、pH などにより“場”である溶媒に変化が生じると、タンパク質の立体構造を形成している相互作用が直接的・間接的に大きく影響を受け、タンパク質は容易に構造変化する。そのため、温度や圧力といった外的要因と同様に“溶媒”がタンパク質の“構造”，“機能”，“物性”に与える影響を明らかにすることが重要である。

本実験で用いたジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide : 略称DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) は極性・非極性基を持ち、化学やバイオテクノロジー、薬学の分野において、万能溶媒や生物細胞の不凍剤として用いられる非プロトン性極性溶媒である。DMSOは対称的な構造をしており、水とあらゆる割合において混合する。⁴⁾ 水とDMSOの混合溶液はこれまで蒸気圧測定や熱量測定、分子動力学などの計算機実験など多くの研究がなされてきており、二成分溶液中において水とDMSOが強く相互作用していることが明らかとなってきた。⁵⁻⁸⁾ 二成分溶液は最も単純な混合溶媒であり、“場”としての溶媒の熱力学的特性を考慮したタンパク質の構造や安定性への影響を分子論的な視点で捉える上で最も単純なモデルとなる。本解説では、DMSO-リゾチーム系をモデルに二成分溶液中 (水+DMSO) におけるリゾチームの構造変化やその熱力学的測定・解析方法について解説する。

2. 実 験

2.1 試料

ニワトリ卵白由来のリゾチーム (SIGMA, 6回再結晶, lot No.90K1922) は蒸留水を用いて277 Kで48時間透析脱塩し原液とした。原液の濃度は280 nmの吸光係数 $2,690 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて決定した。ニワトリ卵白由来のリゾチームは分子量14,307のモノマータンパク質であり、モデルタンパク質としてその構造や性質について多くの研究がなされている。⁹⁻¹¹⁾ DMSO (Kanto Kagaku, spectroscopy grade) は0.3 kPa, 327 Kで活性化したモレキュラーシーブ4Aを加えて脱水したものをを用いた。

2.2 試料調製

本実験ではLysozymeのモル濃度はDMSOや水と比べると非常に小さいため、三成分溶液 (水+DMSO+Lysozyme) のDMSOモル分率は二成分 (水+DMSO) のDMSOモル分率とみなした。二成分溶液は質量を基にモル分率 10^{-4} の精度で調製し、三成分溶液は二回蒸留水で透析脱塩し吸光度で濃度決定したリゾチーム水溶液の原液に、質量比と密度を用いて溶媒と同じモル分率になるようDMSOと水を加えて調製した。本実験ではpH調整のための緩衝溶液は用いていない。これは、広いモル分率範囲でバッファーを使用すると、水に対するバッファー濃度やイオン強度、pHなど

様々な要因が変化し、議論が複雑化してしまうためである。また、リゾチームの粉末結晶は純DMSOに完全溶解しないため、モル分率1でのデータは無い。リゾチーム濃度の精度は $10^{-4}(\text{g cm}^{-3})$ であり、いずれの試料も測定前後で沈殿は見られなかった。

2.3 測定

蛍光測定は蛍光分光光度計F-4500 (HITACHI) を用い、励起波長290 nmで芳香族アミノ酸であるTryptophan (Trp) の溶媒環境変化を $(298.15 \pm 0.01) \text{ K}$ で観測した。DSC測定はMCS-DSC (MicroCal) を用い、走査速度は 1 K min^{-1} で行った。全ての溶媒と溶液は測定前に5分間脱気し、変性中点温度 (T_m)、変性中点温度における変性に伴うエンタルピー変化 (ΔH)、熱容量変化 (ΔC_p)、半幅幅 ($T_{1/2}$) の解析は付属の解析ソフト (Origin) を用いて行った。密度測定は振動式精密密度計DMA 512 (Anton Paar) を用い、 $(298.15 \pm 0.001) \text{ K}$ において $10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ の精度で決定した。粘度測定は広い範囲での希釈測定が可能な希釈型ウベローテ粘度計を用いて $(298.15 \pm 0.001) \text{ K}$ で測定した。水の流下時間は98.23秒で測定の再現性は0.02秒である。リゾチーム濃度はそれぞれ蛍光測定 $0.03(\text{mg cm}^{-3})$ 、DSC測定 $1.0(\text{mg cm}^{-3})$ 、密度と粘度測定 $3 \sim 10 (\text{mg cm}^{-3})$ に調製した。

3. 結果および考察

3.1 二成分溶液

溶液の混合はそれぞれの溶液を構成する分子の形状や極性の違いなどを反映し、体積変化や熱エネルギーの出入りを伴う。また、蒸気圧や熱容量、誘電率、粘性率などの溶液特性も非理想性のため構成成分に対して加成性が成り立たなくなる。このような実在溶液の熱力学的性質は理想溶液からの過剰量として下記のように表現される。

過剰エンタルピー

$$H^E = Q / (n_1 + n_2) \quad (1)$$

過剰体積

$$V^E = (x_1 M_1 + x_2 M_2) / \rho_{12} - (x_1 M_1 / \rho_1 + x_2 M_2 / \rho_2) \quad (2)$$

過剰粘性率

$$\eta^E = \eta_{12} - \exp\{x_1 \ln \eta_1 + x_2 \ln \eta_2\} \quad (3)$$

ここで、添え字の1と2はそれぞれ第一成分 (水)、第二成分 (DMSO) を、添え字の12は二成分溶液 (水+DMSO) を意味している。 Q は混合熱であり、 n は物質質量、 x はモル分率、 ρ と η はそれぞれ密度と粘性率である。

Fig.1は二成分溶液 (水-DMSO) の過剰エンタルピー¹²⁾、過剰体積¹³⁾、過剰粘性率¹⁴⁾、粘性流動に対する過剰活性化自由エネルギー¹⁵⁾ (後述3.6) であり、実線はRedlich-

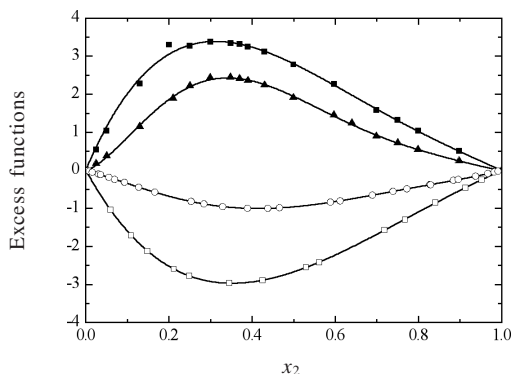


Fig.1 Excess functions of binary solutions, water (1) + DMSO (2), at 298.15 K. □, excess enthalpy (kJ mol^{-1}), ○, excess volume ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$), ▲, excess viscosity (mPa s^{-1}), ■, excess activation free energy for viscous flow (kJ mol^{-1}).

Kisterの式によるフィット線である。過剰エンタルピーと過剰体積は負の値を、過剰粘性率と過剰活性化自由エネルギーは正の値を示しており、水-DMSO間に強い水素結合($\text{S}=\text{O}\cdots\text{HO}$)が形成されていることを示唆している。他の過剰熱力学量^{5-8,16)}においてもモル分率 0.3~0.4 付近に極小や極大が見られることから、水分子とDMSO分子間の相互作用の結果、分子比が2 : 1~3 : 2の時にその影響が最大になるといえる。過剰エンタルピーは -3 kJ mol^{-1} と非常に大きな発熱であり、このような水-DMSO間の強い相互作用が僅かな安定性で構築されているタンパク質の立体構造に与える影響は大きいと推察される。

3.2 蛍光スペクトル

疎水性アミノ酸である芳香族アミノ酸Trpの多くは天然状態においてタンパク質内部に存在しており、変性による三次構造の崩壊によって溶媒中に露出するとその蛍光スペクトルが変化する。このため、二成分溶液中（水+DMSO）でのタンパク質の蛍光スペクトル測定から、Trpを指標にした三次構造的な変化を観測することができる。Fig.2は種々のDMSOモル分率中におけるリゾチームの蛍光スペクトル(A)と極大蛍光波長(B)である。極大蛍光波長はモル分率0~0.1にかけてDMSO濃度の増加と共に短波長側に移動(ブルーシフト)した後、0.3~0.4にかけてシグモイダルに長波長側に移動(レッドシフト)した。これらの変化に応じて極大蛍光強度もモル分率0~0.1にかけてゆるやかに増大し、0.3~0.4にかけて急激に増大した。これらの転移は可逆的であり、DMSOによるリゾチームの変性過程が分光学的には水中での天然状態(N)、モル分率0.2付近での中間状態(I)、モル分率0.4以降の変性状態(D)の

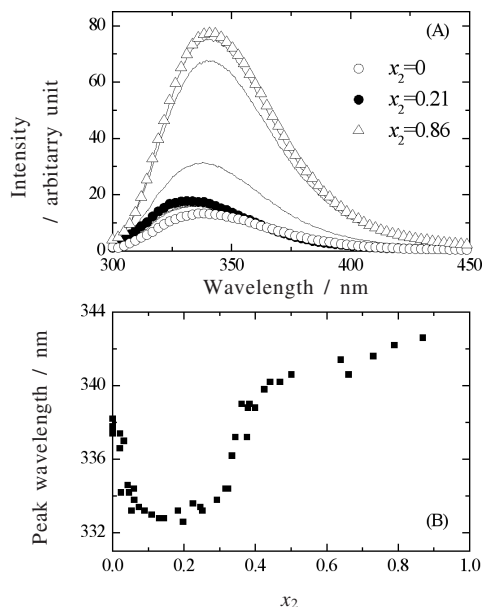


Fig.2 Fluorescence spectra of lysozyme at various x_2 (A) and wavelength for maximum emission at 298.15 K (B).

3状態転移($\text{N} \Leftrightarrow \text{I} \Leftrightarrow \text{D}$)であることが分かる。LehmannとStanfieldによると、モル分率0.03での中性子結晶構造解析により6個のDMSO分子がリゾチームに局所的に結合し、そのうち2個のDMSO分子がTrp 108とTrp 123付近に結合していることが示されている。¹⁷⁾ Trpの蛍光極大波長は溶媒の極性が減少するにつれてブルーシフトすること¹⁸⁾と併せて考えると、溶液と結晶の違いはあるもののI状態は極性の高い水分子(比誘電率78.54)の代わりにDMSO分子(比誘電率46.6)がTrp周りに局所的に溶媒和した構造と考えられる。さらに、D状態へのレッドシフトと蛍光強度の増大は、Trpが三次構造の崩壊によって極性の低いタンパク質内部から極性の高い溶媒に露出したことにより生じたものと考えられる。Jacksonら¹⁹⁾はFTIRを用いて α タンパク質のミオグロビンや β タンパク質のコンカナバリンAにおいてDMSOモル分率0.33付近で二次構造の崩壊と会合が生じること、また、より高濃度では分子間に架かった $\text{C}=\text{O}\cdots\text{HN}$ の水素結合が $\text{S}=\text{O}\cdots\text{HN}$ に置き換えられることにより会合が減少することを報告している。このような会合変化は今回のTrpを指標としたリゾチームの蛍光測定には反映されていないが、後述(3.5)する体積変化に反映されている。

DMSO分子によるタンパク質構造への影響を考えるためには溶媒の熱力学的特性を考慮し分子論的な視点で捉える

ことが重要である。DMSOによるリゾチームの変性には以下の二つの機構が考えられる。(i) 両親媒性分子であるDMSOの濃度増加によって疎水性アミノ酸残基の溶媒への溶解度が増加し、リゾチームの構造変化が誘起された。(ii) タンパク質の構造形成に用いられていた水分子がDMSO分子に強く配向(水和)することで水素結合や静電的相互作用、疎水的相互作用が変化し、リゾチームの構造変化が誘起された。Fig.1に示されるように過剰熱力学量の極大・極小を示すモル分率はリゾチームの構造転移中点とほぼ一致しており、DMSO分子の水への強い相互作用がリゾチームの変性の一因になっていると思われる。以下、種々の熱力学的測定で得られた変性過程について示していく。

3.3 DSC測定

タンパク質のDSC測定から直接的に得られる熱力学的情報には、熱変性の構造転移に伴うエンタルピー変化 ΔH 、熱容量変化 ΔC_p 、転移中点温度 T_m 、半値幅(転移の協同性)

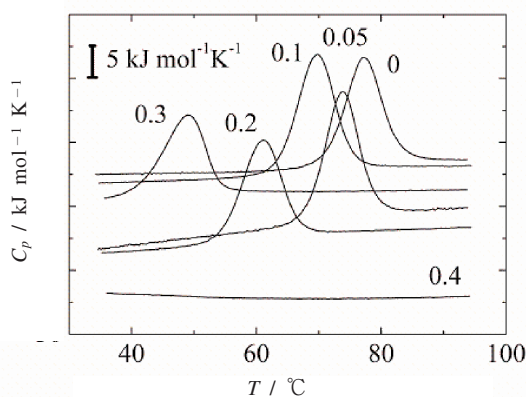


Fig.3 DSC thermograms of lysozyme in binary solutions of water and DMSO. The numbers next to the curves represent the mole fractions of DMSO, x_2 . The reversibilities of these measurements were over 95%.

$T_{1/2}$ があり、間接的には自由エネルギー変化 ΔG やエントロピー変化 ΔS が得られる。二成分溶液中(水+DMSO)でのリゾチームのDSC曲線をFig.3に示した。DMSOモル分率は0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40であり、重量パーセントに換算するとそれぞれ0, 18.5, 32, 52, 65, 74 w/w%に対応する。蛍光測定で示されたようにモル分率0.4以降では室温で変性しており、構造転移に伴う吸熱ピークは見られなかった。得られた熱力学量をTable 1とFig.4に示す。安定性の指標である T_m はDMSOモル分率が増加するに伴い減少した。フィット線($T_m = 350.25 - 58.89x_2 - 115.6x_2^2$)より予想される室温での変性中点モル分率は約0.46であり、蛍光の結果(0.35)よりも若干高いことから、熱変性状態とDMSO変性状態はエネルギー的に異なるものと思われる。DMSOモル分率の増加に伴い ΔH はいったん増加した後に減少した。似たような ΔH の増加はメタノー

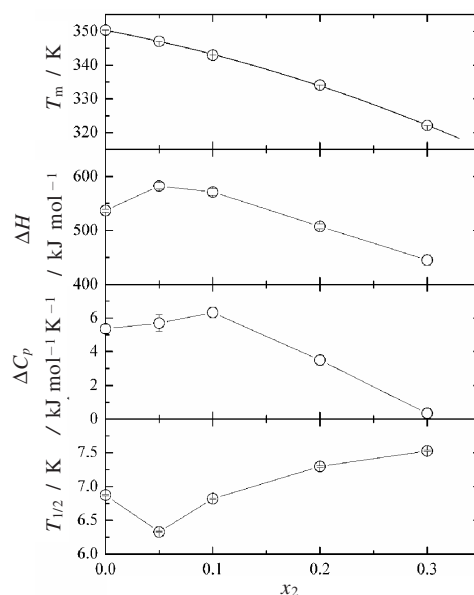


Fig.4 Dependence of thermodynamic properties for thermal denaturation of lysozyme on the x_2 .

Table 1 Thermodynamic properties for thermal denaturation of lysozyme in binary solutions of water and DMSO.

x_2	T_m °C	ΔH kJ mol ⁻¹	ΔC_p kJ mol ⁻¹ K ⁻¹	$T_{1/2}$ °C	ΔG_{300} kJ mol ⁻¹	ΔH_{300} kJ mol ⁻¹	$T\Delta S_{300}$ kJ mol ⁻¹
0.00	77.19 ± 0.01	537 ± 3	5.4 ± 0.3	6.88 ± 0.01	56.8	267.1	210.4
0.05	73.87 ± 0.01	583 ± 6	5.7 ± 0.5	6.33 ± 0.01	59.9	315.0	255.1
0.10	69.80 ± 0.02	571 ± 6	6.3 ± 0.3	6.82 ± 0.01	53.8	299.9	246.1
0.20	60.96 ± 0.01	508 ± 5	3.5 ± 0.3	7.30 ± 0.01	45.5	388.4	342.9
0.30	48.95 ± 0.02	445 ± 10	0.4 ± 0.3	7.53 ± 0.01	30.2	437.0	406.8
0.40	—	—	—	—	—	—	—

ルやエタノール，アセトン水溶液中でも観測されている。²⁰⁻²²⁾ このような低モル分率における変化は ΔC_p の増加や $T_{1/2}$ の減少にも反映されており，DMSO分子の局所的なりゾチームへの結合がなりゾチームの構造化や安定化に寄与しているものと思われる。得られた熱力学量を用いて(4)~(6)式から300Kにおける ΔG_{300} ， ΔH_{300} ， ΔS_{300} を算出した(Table 1)。

$$\Delta H = \Delta H_{T_m} + \Delta C_p (T - T_m) \quad (4)$$

$$\Delta S = \Delta S_{T_m} + \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H_{T_m} \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) - \Delta C_p \left\{ (T_m - T) + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right\} \quad (6)$$

水中 ($x_2 = 0.00$, $\Delta G_{300} = 56.8 \text{ kJ mol}^{-1}$) と比べるとDMSOが結合する低モル分率 ($x_2 = 0.05$) では ΔS の増加を上回る ΔH の増加によって約3 kJ mol^{-1} 安定化しており，DMSO分子の局所的な結合によるなりゾチームの構造化が起きていることが示唆される。

3.4 固有粘度

溶液中におけるタンパク質の流体力学的な体積は固有粘度 $[\eta]$ に反映され，タンパク質の構造化に伴う構造の広がりを観測することができる。²³⁾

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \left(\frac{\eta}{\eta_0} - 1 \right) = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \left(\frac{\rho t}{\rho_0 t_0} - 1 \right) \quad (7)$$

ここで η_0 と η は溶媒と溶液の粘性率， ρ_0 と ρ は溶媒と溶液の密度， t_0 と t は溶媒と溶液の流下時間である。DMSOモル分率に対するなりゾチームの固有粘度 $[\eta]$ をFig.5に示した。DMSO濃度の増加に伴いなりゾチームの固有粘度は増加しており，三次構造が崩壊して構造が広がっていることが示唆される。蛍光測定の結果と同様にモル分率0.05以下と0.35付近に転移点が存在しており，分光学的な構造化が流体力学的にも観測されている。天然状態の固有粘度は $(2.8 \pm 0.4) \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (文献値24 : $2.66 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$)であり，中間状態は $(4.0 \pm 0.4) \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (モル分率0.1~0.3のゼロ外挿値)であった。その後，蛍光測定の結果と同様にモル分率0.3~0.4にかけて大きく増加し，高モル分率では $10.5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ まで増加した。モル分率0.4~0.9におけるDMSO濃度ゼロへの外挿値は $(7.9 \pm 0.6) \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ であり，変性作用の強い塩酸グアニジンによるなりゾチームの変性状態での固有粘度 $6.6 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (文献値23 : $6.5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$)よりも大きいことから，モル分率0.4以降の固有粘度の増加は変性だけでなく会合を伴っていることが示唆される。MaとWang²⁵⁾は光散乱測定からDMSOモル分率の増加に伴いなりゾチーム分子の可逆的な凝集化が起こることを指摘してお

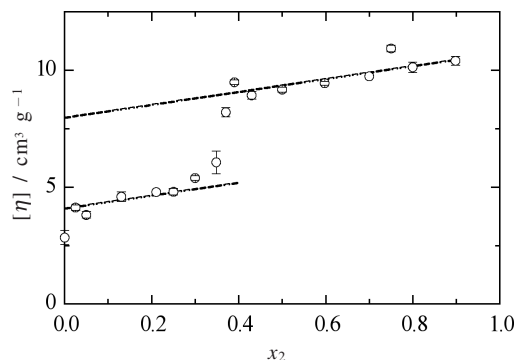


Fig.5 Plots of intrinsic viscosities of lysozyme against the x_2 at 298.15 K.

り，本実験の結果と一致する。

3.5 部分比容

タンパク質の構造化は構成原子の空間的な配置や溶媒露出表面積の変化を伴うため，溶液中のタンパク質の体積(部分比容や部分モル体積)が変化する。無限希釈におけるタンパク質の部分比容 (v^0) は溶媒，溶液の密度と溶質の濃度から下式のように求まる。

$$v^0 = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{1 - V_0}{c} \right) \quad (8)$$

$$V_0 = \frac{\rho - c}{\rho_0} \quad (9)$$

ここで c はタンパク質濃度 ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$)， V_0 は単位体積の溶液中の見かけの溶媒体積を表わしている。あるタンパク質濃度におけるタンパク質の見かけの部分比容 (v_{app}) は一般に低濃度範囲において $v_{app} = v^0 + kc$ のように表され，無限希釈への外挿値からタンパク質の部分比容 v^0 を求めることができる。タンパク質の部分比容に及ぼす構造化の影響については，月向²⁶⁾やChalikian²⁷⁾の総説に詳しいのでご参照いただきたい。溶液内のタンパク質の部分比容 v^0 はタンパク質の立体構造を反映し，(i) タンパク質構成原子のvan der Waals体積の和 V_c ，(ii) タンパク質分子の不完全なパッキングのために生じる空間 (cavity) V_{cav} ，(iii) 溶媒和によって起こる体積変化 ΔV_{sol} ，の三つの成分で表わすことができる。

$$v^0 = V_c + V_{cav} + \Delta V_{sol} \quad (10)$$

タンパク質が構造化をする場合，構成原子の組成は変化しないため V_c は変わらず， v^0 の変化は(ii)と(iii)の

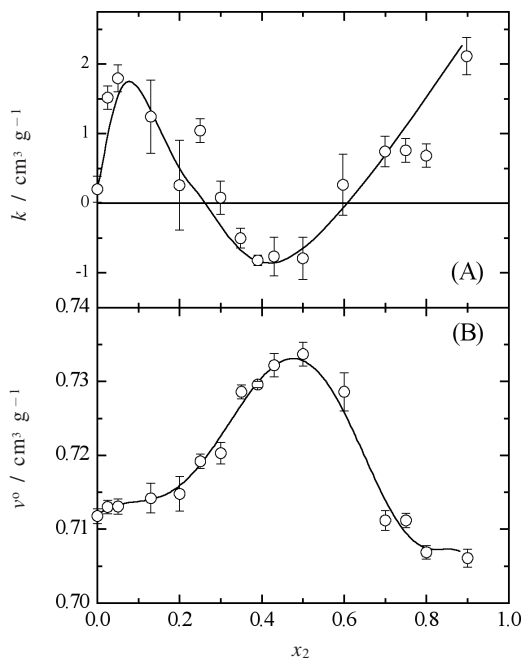


Fig.6 (A) The concentration dependences of apparent partial specific volumes of lysozyme, k , and (B) partial specific volumes of lysozyme at infinite dilutions against x_2 at 298.15 K.

変化に帰属することができる。一般に、水和水はバルク水よりも圧縮されているため密度が高く、水中におけるタンパク質の水和は体積を減少させる方向に寄与する。しかし、溶媒が二成分系の場合、タンパク質への選択的な水和や溶媒和の結果生じるバルク溶媒のモル分率の変化に伴い溶媒密度が変化するため、(ii)と(iii)への帰属は複雑になる。

Fig.6に見かけの部分比容のリゾチーム濃度依存性 k と無限希釈濃度における部分比容 v^0 のDMSOモル分率依存性を示した。**Fig.6(A)**に見られるように濃度依存性 k はDMSOモル分率によって正負に大きく変化していた。これは、リゾチームへの選択的な水和やDMSOによる溶媒和によってリゾチーム濃度の増加に伴いバルクのモル分率が変化し、見かけの溶媒体積 V_0 が変化したためと考えられる。**Fig.6(B)**に見られるように無限希釈濃度におけるリゾチームの部分比容は蛍光測定や粘度測定の結果と同様にモル分率0.05以下と0.35付近に転移点が存在しており、中間状態や変性に伴う構造変化が体積的にも反映されている。低モル分率領域での天然状態から中間状態への転移においては、 ΔH や ΔC_p 、 $T_{1/2}$ のような顕著な変化ではないが、部分比容の僅かな増加が観測された。いくつかのモノマーアミノ酸の水-DMSO溶液においては、DMSOのモル分率0.2で部分比容の微増²⁸⁾や微減²⁹⁾が報告されており、DMSOによる

脱水和やリゾチームの構造化によるcavity変化が生じていると考えられる。

水中でのタンパク質の変性はcavity体積の減少と表面積の増加による水和水の増加を引き起こし、(10)式に従えば変性タンパク質の部分比容は減少する。しかし、モル分率0.2から0.42にかけての構造転移において部分比容は大きく増加していた(+0.023 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)。これは、固有粘度や光散乱、FTIRで観測された凝集による分子間のcavity形成や、構造の崩壊に伴う熱的振動の増加による体積増加²⁷⁾などが原因と考えられる。また、**Fig.6(A)**に見られるようにこのモル分率範囲においてリゾチーム濃度依存性は負に転じており、溶媒の密度が高い(溶媒のみの二成分溶液が大きな負の過剰体積を示す(**Fig.1**))ため相対的に水和水と溶媒和による体積減少の効果が小さくなった(または体積増加に寄与した)ものと考えられる。

DMSO濃度が増加すると($x_2 > 0.6$)、蛍光測定や粘度測定では見られなかった転移(部分比容の減少)が観測された。この減少は他のタンパク質でのFTIR¹⁹⁾に見られた会合の解離や、水和水と溶媒和による体積減少、変性・会合状態で形成されている疎水コア内のcavityへのDMSO分子の浸透の可能性が示唆されるが、前述したように(ii)と(iii)への帰属は複雑であり、これらの体積変化の更なる解析には各アミノ酸の広いモル分率範囲での部分比容の決定が必要である。

3.6 粘性流動に対する活性化自由エネルギー

流動をある位置から隣り合う位置への移動の連続と考えると、粘性流動に対して活性化自由エネルギーの概念を用いることができる。³⁰⁾ **Fig.7**は溶媒中の溶質流動のイメージ図である。ある空間に存在する溶質が隣り合う空間に移動するためには、(i)適度な大きさの空間(ii)溶質-溶媒間の相互作用の切断、が必要になる。(i)は溶質のモル体積に、(ii)は溶質の溶媒露出表面積に比する値となる。溶媒の粘性流動に対する活性化自由エネルギー $\Delta\mu_{12}^*$ は溶媒体積や溶媒-溶媒間相互作用、溶媒分子の自由度の変化を反映し以下の式で定義される。²⁹⁾

$$\Delta\mu_{12}^* = RT \ln \left(\frac{\eta_0 \bar{V}_{12}^0}{hN} \right) \quad (11)$$

R 、 T 、 h 、 N 、 V_{12}^0 はそれぞれ気体定数、絶対温度、Planck定数、Avogadro数、二成分溶液のモル体積($\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$)である。Eyring³⁰⁾によれば、粘性流動に対する活性化エンタルピーは溶媒分子間の結合を切って空孔をつくるのに要するエネルギーと、分子が空孔へ流れこむために要するエネルギーとを含んでいる。また、溶媒分子との結合の切断に伴い溶媒分子の自由度が増加するため、粘性流動に対する活性化エントロピーは増加することが予想

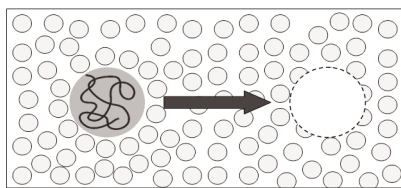


Fig.7 Viscous flow model of protein in solution.

される。これらの結果、溶媒の活性化自由エネルギーは溶媒分子の蒸発エネルギーの約1/3になることが示されている。本研究で得られた二成分溶液（水-DMSO）の $\Delta\Delta\mu_3^*$ のDMSOモル分率依存性をFig.8(A)に示した。 $\Delta\mu_3^*$ の最大誤差は ± 0.01 kJ (0.1 %) 以内である。二成分溶液（水-DMSO）を理想溶液として算出した活性化自由エネルギー（Fig.8(A)中の実線）との差である二成分溶液の過剰活性化自由エネルギーはFig.1に示されるように最大で約3.4 kJ mol⁻¹であった。これは水やDMSOの活性化自由エネルギーと比べて約30%の増加にあたる大きなものであり、強い水-DMSO間相互作用が起きていることが分かる。

溶質の粘性流動に対する活性化自由エネルギー $\Delta\mu_3^*$ は溶媒-溶質間相互作用と溶質の流体力学的な体積、自由度の変化を反映し、下式で表される。^{29), 31)}

$$\Delta\mu_3^* = \Delta\mu_{12}^* + \left(\frac{RT}{\bar{V}_3} \right) \left[B - (\bar{V}_{12}^* - \bar{V}_3^*) \right] \quad (12)$$

ここで、 V_3^* はタンパク質のモル体積 (m³ mol⁻¹) であり、 B はJones-Doll式 ($\eta/\eta_0 = 1 - Ac^{0.5} + Bc$) より求まる。^{32,33)} 得られたリゾチームの $\Delta\mu_3^*$ のDMSOモル分率依存性をFig.8(A)に示した。 $\Delta\mu_3^*$ の最大誤差は140 kJ mol⁻¹ (1.8 %) 以内である。全てのDMSO水溶液中において、 $\Delta\mu_3^*$ と比べると $\Delta\mu_{12}^*$ は非常に大きい。これは溶媒のモル体積よりもリゾチームのモル体積が大きいことに起因している。体積効果 (i) を規格化するためにそれぞれのモル体積で割った $\Delta\mu_{12}^*/V_{12}^*$ と $\Delta\mu_3^*/V_3^*$ のモル分率に対する依存性をFig.8(B)に示した。 $\Delta\mu_3^*/V_3^*$ は全モル分率範囲において $\Delta\mu_{12}^*/V_{12}^*$ よりも大きく、溶媒は溶媒間よりも水和や溶媒和としてリゾチームと選択的に相互作用していることを示している。 $\Delta\mu_3^*$ は部分比容や固有粘度と同様にモル分率0.3から0.4にかけて変化していた。体積効果を規格化した $\Delta\mu_3^*/V_3^*$ も同様な傾向を示していることから、リゾチームの構造崩壊による表面積増加に伴う溶媒-リゾチーム相互作用の増加が主因であるといえる。水中における変性状態の $\Delta\mu_3^*$ と $\Delta\mu_3^*/V_3^*$ は変性後のゼロ外挿値で見積もられ、

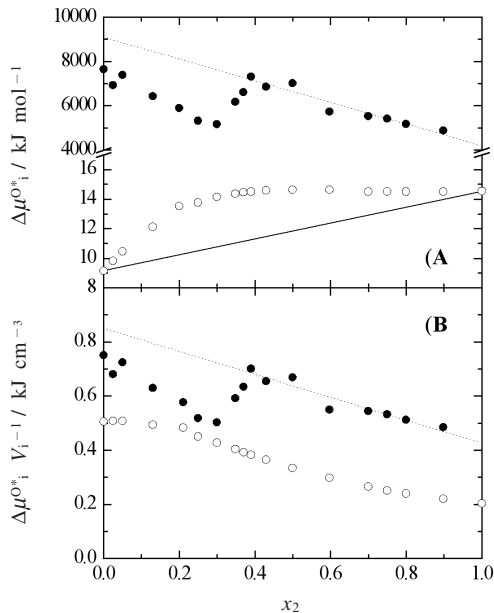


Fig.8 Plots of $\Delta\mu_i^*$ (A) and $\Delta\mu_i^*/V_i^{-1}$ (B) in various aqueous DMSO solutions: $i = "12"$ in the absence of lysozyme (○); $i = "3"$ in the presence of lysozyme (●)

それぞれ、 $(9,100 \pm 360)$ kJ mol⁻¹と (0.85 ± 0.03) kJ cm⁻³であった。これは天然状態 (7,658 kJ mol⁻¹, 0.75 kJ cm⁻³) の1.18倍と1.13倍にあたり、変性・会合によってリゾチームの表面積は十数%増加したと推測される。

Dashらはモノマー疎水性アミノ酸の $\Delta\mu_3^*$ をDMSO水溶液中 ($x_2 = 0.2$) で決定し、14.4 kJ mol⁻¹ (Gly), 15.7 kJ mol⁻¹ (α -Ala), 15.6 kJ mol⁻¹ (β -Ala) と見積もった。²⁹⁾ 本研究で求めたリゾチーム (残基数129) の1アミノ酸あたりの平均 $\Delta\mu_3^*$ は約45.8 kJ mol⁻¹ ($x_2 = 0.1998$) であり、モノマーアミノ酸と比べると約3倍大きな値 ($\Delta\mu_3^*/V_3^*$ で比較すると約1.5倍) であった。立体構造を持つリゾチームの1アミノ酸あたりの表面積はモノマーアミノ酸よりも小さいことを考慮すると、この大きな $\Delta\mu_3^*$ や $\Delta\mu_3^*/V_3^*$ はタンパク質表面に多く存在している親水性アミノ酸が疎水性アミノ酸よりも強く溶媒 (特に水) と相互作用していることを示唆している。

4. おわりに

本研究で示したように、タンパク質は“場”である溶媒の影響を受けてその構造や熱力学的性質が大きく変化した。種々の熱力学量はタンパク質の構造変化や溶媒との相互作用変化を敏感に反映し、安定性や体積、表面積変化につい

て定量的な情報を与えた。このように、分光学などのミクロ的情報とあわせ種々の熱力学量を用いることで、溶液中におけるタンパク質の描像を多角的な視点で描き、溶媒分子の直接的・間接的影響を捉えることが可能となる。

文 献

- 1) タンパク質科学 構造・物性・機能, 後藤祐児, 谷澤克行, 桑島邦博 編, 化学同人 (2005).
- 2) 生体系の水, 上平恒, 逢坂昭 著, 講談社 (1989).
- 3) 水と生命, 永山國昭 編, 共立出版 (2000).
- 4) 加勢範雄 化学工業 **2**, 35 (1960).
- 5) J. Catalan, C. Diaz, and F. Garcia-Blanco, *J. Org. Chem.* **66**, 5846 (2001).
- 6) D. D. Macdonald and J. B. Hyne, *Can. J. Chem.* **49**, 611 (1971).
- 7) J. M. Cowie and P. M. Toporowski, *Can. J. Chem.* **39**, 2240 (1961).
- 8) L.-J. Yang, X.-Q. Yang, K.-M. Huang, G.-Z. Jia, and H. Shang, *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1261 (2009).
- 9) S. E. Radford, C. M. Dobson, and P. A. Evans, *Nature* **358**, 302 (1992).
- 10) W. Pfeil and P. L. Privalov, *Biophys. Chem.* **4**, 23, (1976).
- 11) K. Takano, Y. Yamagata, and K. Yutani, *J. Mol. Biol.* **280**, 49 (1998).
- 12) 木村隆良, 高木定夫, 熱測定 **13**, 2 (1986).
- 13) T. Kamiyama, T. Matsusita, and T. Kimura, *J. Chem. Eng. Data* **48**, 1301 (2003).
- 14) T. Kamiyama, M. Morita, and T. Kimura, *J. Chem. Eng. Data* **49**, 1350 (2004).
- 15) T. Kamiyama, M. Morita, and T. Kimura, *J. Sol. Chem.* **37**, 27 (2008).
- 16) X. Qian, B. Han, Y. Liu, H. Yan, and R. Liu, *J. Sol. Chem.* **24**, 1183 (1995).
- 17) M. S. Lehmann and R. F. D. Stansfield, *Biochemistry* **28**, 7028 (1989).
- 18) R. W. Cowgill, *Biochim. Biophys. Acta* **133**, 6 (1967)
- 19) M. Jackson and H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta* **1078**, 231 (1991).
- 20) G. Velicelebi and M. Sturtevant, *Biochemistry* **18**, 1180 (1979).
- 21) Y. Fujita and Y. Noda, *Bull. Chem. Soc. Japan* **56**, 233 (1983).
- 22) A. L. Jacobson and C. L. Turner, *Biochemistry* **19**, 4354 (1980).
- 23) C. Tanford, K. Kawahara, and S. Lapanje, *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 729 (1967).
- 24) K. Monkos, *Biochim. Biophys. Acta* **1339**, 304 (1997).
- 25) R. J. Ma, and C. H. Wang, *J. Phys. Chem.* **87**, 679 (1983).
- 26) 月向邦彦, 熱測定 **31**, 186 (2004); タンパク質 核酸酵素 **40**, 2461 (1995).
- 27) T. V. Chalikian, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 207 (2003).
- 28) I. N. Basumallick and R. K. Mohanty, *Ind. J. Chem.* **29**, 647 (1990).
- 29) U.N. Dash and N.N. Pasupalak, *Ind. J. Chem.* **36**, 834 (1997).
- 30) H. Eyring, *J. Chem. Phys.* **4**, 283 (1936); S. Glasstone, K.J. Laidler, and H. Eyring, "The Theory of Rate Processes" McGraw-Hill, (1941); "絶対反応速度論 (上) (下)", 長谷川繁夫, 平井西夫, 後藤春雄 共訳, 吉岡書店 (1964).
- 31) D. Feakins, W.E. Waghorne, and K.G. Lawrence, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **82**, 563 (1986).
- 32) G. Jones and M. Dole, *J. Am. Chem. Soc.* **51**, 1073 (1929).
- 33) Y. Z. Wang, and J. Lu, *Biophys. Chem.* **99**, 199 (2002).

要 旨

二成分溶液中(水+DMSO)におけるリゾチームの熱力学の特性を固有粘度, 部分比容, 粘性流動に対する活性化自由エネルギー, DSC測定を指標にして明らかにした。リゾチームはDMSO低濃度($x_2=0.05$)において安定化を示し, $x_2=0.3\sim 0.4$ における構造崩壊に伴い, $[\eta]$, v^0 , $\Delta\mu^{0*}_3$ が増加した。二成分溶液での過剰熱力学量に反映されるように水-DMSO間の強い水素結合により水-リゾチームの相互作用が影響を受け構造転移に至ったものと思われる。また, 見かけのリゾチームの部分比容はリゾチームとDMSO濃度に大きく依存しており, 選択的な水和や溶媒和の存在を示唆している。これらの結果は二成分溶液中のタンパク質の熱力学量が構造崩壊に伴うタンパク質のバックギングや表面積変化に伴う溶媒との相互作用変化を敏感に反映していることを示している。



神山 匡 Tadashi Kamiyama
 近畿大学理工学部理学科, Faculty of Science and Engineering, Kinki University
 TEL. 06-6721-2332 (ext 4111)
 FAX. 06-6723-2721
 e-mail: kamiyama@chem.kindai.ac.jp
 研究テーマ: 生体高分子溶液の熱力学的研究