

解 説

## タンパク質の熱力学的安定性と分子機能の 精密熱量測定

城所 俊一  
長岡技術科学大学 生物系

(受取日 : 2013 年 11 月 12 日, 受理日 : 2013 年 12 月 8 日)

### Precise Calorimetry for Thermodynamic Stability and Molecular Function of Proteins

Shun-ichi Kidokoro  
Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology

(Received Nov. 12, 2013; Accepted Dec. 8, 2013)

Development of precise calorimetry has enabled us to understand the stability of three-dimensional structure, catalytic activity, and molecular recognition of biomolecules. We have developed isothermal acid-titration calorimetry (IATC) to evaluate the pH dependence of protein enthalpy and demonstrated the thermodynamic transition between the native and the molten globule (MG) state of cytochrome *c* with very small enthalpy change ( $\sim 30$  kJ/mol) by this method. The double deconvolution method with precise differential scanning calorimetry (DSC) has revealed the MG state as an equilibrium intermediate state of the reversible thermal transition of the protein and pressure perturbation calorimetry (PPC) has succeeded to determine its volumetric properties. The hydrolytic activity of cellulase against a kind of oligo-cellulose can be quantitatively evaluated using dynamic feature of isothermal titration calorimetry (ITC) and a kinetic equation for enzymatic reaction. We developed a new multi-binding model and succeeded to characterize the interaction between adenosine 5'-triphosphate and magnesium ion. These examples strongly indicate the importance of precise calorimetry in the field of protein research.

Keywords: structure transition, molten globule, catalytic activity, cellulase, molecular recognition, ATP



城所 俊一  
Shun-ichi Kidokoro  
E-mail: kidokoro@nagaokaut.ac.jp

## 1. はじめに

地球上の生物が進化という壮大な実験の過程で生み出し活用してきたタンパク質分子は、数 nm の大きさを持つ微粒子である。20 種類のアミノ酸を（遺伝子に刻まれた）順に結合させて作られたペプチド鎖は、水中で決まった立体構造に自動的に折れたたむ能力を持つ（立体構造形成能）。場合によっては、更に別のタンパク質分子と結合して複合体（4 次構造）を形成する、あるいは様々な化学物質と結合あるいは化学修飾を受けて成熟したタンパク質分子が完成する。これらの多くの過程は熱力学的に決められているが、与えられたアミノ酸配列（1 次構造）がどのような立体構造（3 次構造）を形成するのか、この立体構造を取っている状態（native 状態、N 状態）がどのような安定性や分子機能（分子認識能や触媒能）を示すのか、そして、生体系全体の中で、どのような生命現象に関係しているのか、という基本的な問いにはまだ十分に答えられないのが現状である。

これは、タンパク質分子が、秩序を持つ立体構造を形成する粒子でありながら、内部に大きな自由度を持ち、周囲の多数の溶媒分子やイオンとも強く相互作用するという複雑さに原因があると考えられている。一方で、以下に例示するように、立体構造安定性、触媒活性や分子間相互作用の多くは比較的少数の巨視的状態間の平衡や速度論で説明できることもわかってきた。

1980 年前後から、(1) 少量の試料、希薄溶液中の生体分子用の高精度熱量計が開発され測定感度・精度が飛躍的に改善されてきたこと、(2) 遺伝子組換え技術により野生型・変異体タンパク質を比較的容易に大量に調製できるようになったこと、(3) 放射光を利用した X 線結晶構造解析により原子レベルの分解能で（水溶液中と本質的には変わらない）タンパク質の立体構造が決められるようになり立体構造に基づいて熱力学量が議論できるようになったこと、等により、タンパク質の熱力学的な研究は加速度的に進展しつつある。

著者は 1980 年代半ばに、当時日本で一台だけ導入されていた DASM-1M という当時のソ連製の DSC (differential scanning calorimeter, 示差走査熱量計) を使用してタンパク質の熱転移の研究を始める機会を得た。1990 年代初めに MicroCal 社製の MCS という DSC と ITC (isothermal titration calorimeter, 等温滴定型熱量計) のシステムを導入し、タンパク質の分子機能の研究に熱量測定を利用してきた。本稿では、DSC, ITC と PPC (pressure perturbation calorimeter, 圧力摂動熱量計) を用いたタンパク質の熱力学的安定性の評価について、シトクロム *c* を題材にして解説するとともに、ITC による酵素活性の評価法と複雑な複合体を含む分子間相互作用評価の例を紹介する。

## 2. タンパク質の熱力学的安定性の熱量測定

可逆的な熱転移をするタンパク質立体構造の熱力学的安定性は、DSC により解析される場合が多い。<sup>1)</sup> この方法によれば、(1) 熱力学第一法則により、定圧で熱を測定することでエンタルピー変化が直接評価できること、(2) 熱力学第二法則より、可逆な熱転移に伴う熱からエントロピー変化が直接評価できること、よって、エンタルピー変化とエントロピー変化とからギブズエネルギー変化が直接評価可能という熱測定法の利点が最大限利用できる。

しかし、立体構造転移の平衡定数 *K* の温度依存性（次式に示すように熱転移に伴うエンタルピー変化  $\Delta H$  により決まる）が小さい場合には DSC による観測は困難になる。

$$\left(\frac{\partial}{\partial T} \log_{10} K\right)_{p,pH} = \frac{\Delta H}{(\ln 10)RT^2} \quad (1)$$

たとえば  $\Delta H$  が 100 kJ/mol の場合、323 K (50°C) で右辺は  $0.050 \text{ K}^{-1}$  となり、40°C 温度を上昇させてようやく平衡定数が 2 桁（例えば 1:10 から 10:1 に）増加する程度の温度依存性である（ちなみに、 $\Delta H$  が 400 kJ/mol あれば 10°C の温度上昇で平衡定数は 2 桁増加する）。

そこで、我々は、DSC の相補的な熱測定法として、酸を滴下し溶液の pH を下げることでタンパク質の立体構造転移の熱を観測する手法、等温酸滴定熱量測定 (isothermal acid-titration calorimetry, IATC)<sup>2)</sup> を開発した。中和熱は大きい、塩酸の希釈熱がそれほど大きくないことを利用すると、中性 pH のタンパク質溶液に塩酸を加えることで、タンパク質の部分エンタルピーの pH 依存性が測定でき、立体構造転移が評価できることがわかった。ここで、平衡定数の pH 依存性は次式で与えられる（立体構造転移に伴う水素イオン結合数変化  $\Delta \nu$  が依存性を決めている）。

$$\left(\frac{\partial}{\partial pH} \log_{10} K\right)_{T,p} = -\Delta \nu \quad (2)$$

例えば  $\Delta \nu$  が 2（立体構造転移に伴って水素イオンが 2 個余分に結合する）の場合、pH を 1 下げるだけで平衡定数は 2 桁大きくなる。多くのタンパク質で立体構造は酸で変性する（酸性 pH で  $\Delta \nu$  が正で大きい）ことが知られており、IATC 法はタンパク質の熱力学的安定性を評価する手法として汎用的に使えることが期待できる。

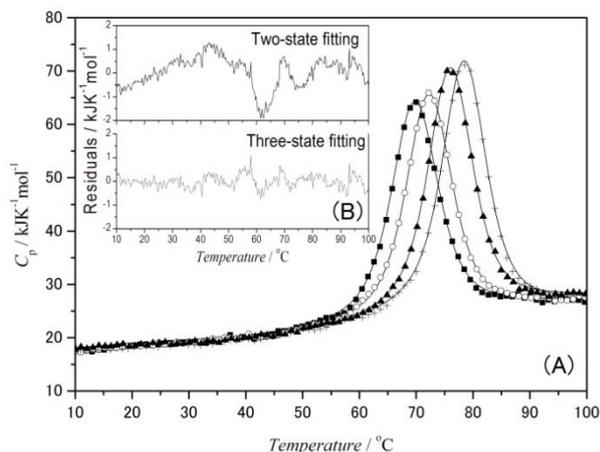
pH による変性では、以下に述べるシトクロム *c* の高塩濃度低 pH で安定な、熱変性状態とは異なる状態が観測される場合もある。この場合には、低 pH での DSC 測定、あるいは高温での IATC 測定による立体構造転移を測定することにより、熱変性状態との区別が可能となる。

実際に我々は、シトクロム *c* という小さな球状タンパク質の立体構造が、高塩濃度下でモルテングロビュール(MG)状態という立体構造形成中間体に転移するのを IATC 法で測定し、30°C で  $\Delta \nu = 2.1$  であり、 $\Delta H = 30 \text{ kJ/mol}$  と非常に小さなエンタルピー変化である<sup>3)</sup>ことを明らかにした。また、この測定を温度を変えて行い、2 状態転移モデルを仮定して得た平衡定数の温度依存性と観測されたエンタルピー変化が式(1)を満足することから、今回解析に用いたモデルの妥当性を確認した。

ここで紹介した MG 状態は、タンパク質主鎖が天然の立体構造と同様に  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シートなどの 2 次構造を形成し、天然の立体構造と同程度までコンパクトな球状になっているが、側鎖の構造は未だ形成されておらず大きく揺らいでいる状態である。通常は、立体構造形成時の過渡的な中間体として観測されるが（平衡論的には不安定）、シトクロム *c* では、酸性 pH・高塩濃度条件でこの構造が安定化<sup>4)</sup>されるため前述のような測定が可能である。

ここでシトクロム *c* を低塩濃度で酸性にすると、通常の変性 (denatured, D) 状態になる。そこで、IATC 法でこのタンパク質の N 状態から D 状態への立体構造転移に伴うエンタルピー変化を評価した<sup>5)</sup>ところ、DSC で報告されていた N-D 間のエンタルピー変化の文献値<sup>6)</sup> (IATC の測定温度まで外挿した値) に比べて我々の値は約 100 kJ/mol も大きいことがわかった。

従来、シトクロム *c* の熱転移は 2 状態転移であるとされ、文献値もそのモデルにより解析されたものであった。我々は最新の DSC 装置を用い、このタンパク質の熱転移を測定



**Fig.1<sup>5)</sup>** (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) in 50 mM sodium acetate buffer. 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. (Reprinted with permission from Elsevier).

し直し (**Fig.1**), double deconvolution (DD) 法<sup>7)</sup> と非線形最小 2 乗法<sup>8)</sup> とを用いて解析した。<sup>5)</sup>

DD 法については本誌に既に解説記事がある<sup>1)</sup> が、以下に要点をまとめる。すなわち、タンパク質分子 (系全体, N 状態, D 状態) の部分定圧熱容量, それぞれ,  $C_p$ ,  $C_{p,N}$ ,  $C_{p,D}$  を温度  $T$  の関数として評価し, 次の関係式を使って, 系全体および N, D 状態のエンタルピー  $H(T)$ ,  $H_N(T)$ ,  $H_D(T)$  とギブズエネルギー  $G(T)$ ,  $G_N(T)$ ,  $G_D(T)$  とを以下の式で評価する。

$$H(T) = \int_{T_0}^T C_p(T) dT \quad (3)$$

$$G(T) = -T \int_{T_0}^T \frac{H(T)}{T^2} dT$$

ここで, 充分低温では  $H=H_N$ ,  $G=G_N$ , 充分高温では  $H=H_D$ ,  $G=G_D$  とする近似を用いると, 以下に定義するエンタルピー変化  $\Delta H_i$ , ギブズエネルギー変化  $\Delta G_i$  が一意的に決まる。

ここでは,  $i$  は N または D を表す。

$$\Delta H_i = H - H_i \quad (4)$$

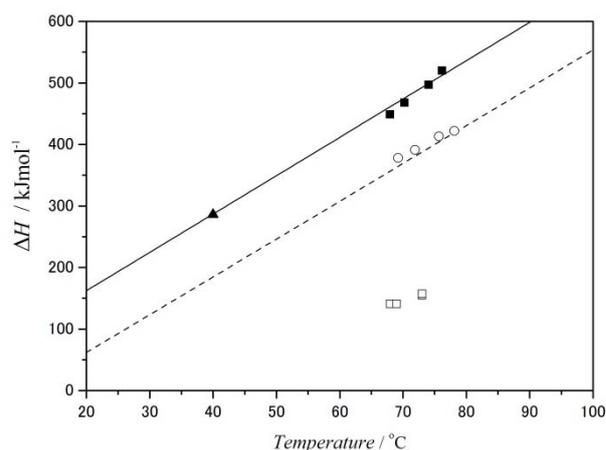
$$\Delta G_i = G - G_i$$

単量体タンパク質の 1 分子反応 (異性化反応) の場合, 各状態のモル分率  $f_i$  は

$$f_i(T) = \frac{\exp[-G_i(T)/RT]}{\exp[-G(T)/RT]} = \exp\left[\frac{\Delta G_i(T)}{RT}\right] \quad (5)$$

となるため, 上で求めた  $\Delta G_i$  から直接評価できる。

多量体タンパク質の熱転移など, 立体構造転移に伴って自己解離・会合が起きる場合には, 式(5)は適用できないが, 化学量論係数を仮定することで, 同様に, モル分率を決めることができる。<sup>8)</sup>我々はこの方法を用いて T4 フェージ由来の分子シャペロンである gp57A という 6 量体タンパク質 ( $N_6$ ) の立体構造が 3 量体の安定な中間体 ( $I_3$ ) を経て単量体の変性状態 (D) に可逆的に熱転移をすることを明らかにした。<sup>9)</sup> この例では, 異なる複数の濃度のタンパク質溶液を用いて熱転移を測定・解析することで, 解析の際に必要な化学量論係数の妥当性を検証している。



**Fig.2<sup>5)</sup>** The temperature dependence of the enthalpy change of horse cytochrome *c* obtained by DSC and IATC methods. The filled squares show the enthalpy change from the N to the D state, determined by DSC with the three-state transition analysis. The filled triangle shows the change by IATC. The solid line shows the linear fitting curve using these data. The open squares show the enthalpy change from the N to the I state, determined by DSC with the three-state transition analysis. The open circles show the enthalpy change from the N to the D state, determined by DSC with the two-state transition analysis. The broken line shows the enthalpy change from the N to the D state, by the two-state transition analysis reported previously.<sup>6)</sup> (Reprinted with permission from Elsevier).

このように実測した N 状態と D 状態のモル分率の和 ( $f_N + f_D$ ) が観測した温度範囲で (実験誤差内で) 1 になっていれば, この 2 つの熱力学状態以外の熱力学状態のモル分率は無視できることを示す。これがいわゆる 2 状態転移である。

これに対して, この和が 1 よりも有意に小さい場合には実験データは, 少なくとももう一つの熱力学状態 (中間状態, I 状態) の存在を示していることになる。全ての熱力学状態のモル分率の和は 1 なので, この場合の中間状態のモル分率  $f_i$  は

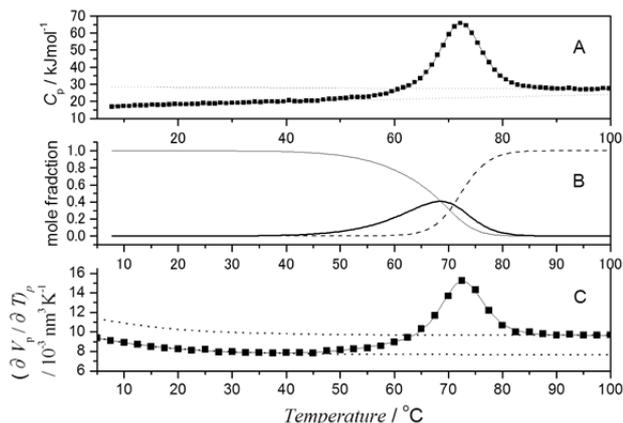
$$f_i(T) = 1 - f_N(T) - f_D(T) \quad (6)$$

と評価される。

一方, 実験誤差を考慮しても和  $f_N + f_D$  が 1 を超える場合には, これは, タンパク質分子の熱転移の協同性が, 現在考えているユニット (最初に部分熱容量を評価した, 熱力学的に独立に扱うユニット) よりも大きいことを意味している。例えば, 多量体タンパク質の部分熱容量をタンパク質の単量体をユニットとして評価してしまうと, このような解析結果となる可能性がある。前述のように, このような場合には, 解離・会合を考慮した解析法<sup>8)</sup> を用いる必要がある。

例えば, **Fig.1** の pH 4.1 の場合, 和  $f_N + f_D$  は転移温度付近で 0.6 程度となり, 中間状態の存在を強く示唆した。図に示す pH 3.8~5.0 の弱酸性 pH では, 非線形最小 2 乗法解析では, 2 状態モデルでは特に低温側に系統的で大きな残差が残り, 3 状態モデルではこれが解消されることがわかった。

**Fig.2** に示すように, 3 状態モデルを用いて N-D 間のエンタルピー変化を評価すると, 2 状態モデルにより評価したものより 100 kJ/mol 程度大きな値を示し, IATC 法の結果と符合することがわかった。我々のデータを無理に 2 状態モデルにより fitting した結果は従来の文献値<sup>6)</sup> と良く一致



**Fig.3<sup>11)</sup>** (A) The heat capacity function of 1 mg/ml cytochrome *c* at pH 4.1 in 50 mM sodium acetate buffer evaluated by DSC measurement. Filled squares show the experimental data. Solid lines indicate the theoretical fitting curve calculated by three-state transition analysis. Dotted lines illustrate the baselines of the N and D state curves calculated by three-state transition analysis. (B) The temperature dependence of the mole fraction of each state—i.e., the N (thin line), I (thick line), and D (broken line) states—in the thermal transition of 1 mg/ml cytochrome *c* at pH 4.1. (C) The temperature dependence of  $\partial v / \partial T$  of 15 mg/ml cytochrome *c* at pH 4.1 in 50 mM sodium acetate buffer. Solid lines show the theoretical fitting curves calculated by three-state transition analysis using DSC parameters. Dotted lines illustrate the baselines of the N and D state calculated by three-state transition analysis using DSC parameters. (Reprinted with permission from American Chemical Society)

しており、実験データとしては従来のデータと矛盾するものではないことがわかる。すなわち、測定精度が高くなることで従来のデータでは困難だった N-I 間の熱転移 (68°C で  $\Delta H = 141 \text{ kJ/mol}$ ) を区別して観測することが可能となったと考えられる。この N-I 間のエンタルピー変化を低温に外挿することで、IATC 法で測定された N-MG 間のエンタルピー変化と一致すること<sup>10)</sup>、中間状態の円二色性スペクトル測定が MG 状態の特長と一致すること<sup>5)</sup> から I 状態は MG 状態であると考えられる。また、この状態の部分定圧熱容量は N 状態と D 状態の中間程度の値であることもわかった。高塩濃度低 pH の DSC 測定では、MG 状態から熱変性状態への立体構造転移が観測され、安定な中間状態の存在が示されており、今後、この構造転移を詳細に研究する必要がある。<sup>10)</sup>

**Fig.3** に示す解析では、DSC の結果と組み合わせることで PPC のデータから中間状態である MG 状態の分子体積の特性を評価した。この結果、MG 状態の部分分子体積および熱膨張率は N 状態と D 状態の丁度中間程度の値であることがわかった。<sup>11)</sup> N 状態でタンパク質内部に埋もれていた非極性基 (の一部) が MG 状態や D 状態では溶媒に露出することで疎水性水和が増加することで、部分定圧熱容量・部分分子体積・熱膨張率の増加を起こすとすると、MG 状態は疎水性水和がかなり進んだ状態であると考えられる。

### 3. 酵素活性の熱量測定

タンパク質の持つ分子機能の一つとして触媒活性は重要である。ほとんどの生合成・代謝・運動・シグナル伝達などの生体内の化学反応は、酵素により触媒される。また、工業用の触媒や洗剤中に配合された酵素など、生体外でも

酵素の分子機能は広く使用されている。

化学反応に伴うエンタルピー変化を熱として測定することで化学反応を熱量測定で観測することができる。ITC は本来動的な測定であり、単位時間当たりの吸熱・発熱量 (thermal power, 熱流)  $P$  を時間の関数として測定する。化学反応により熱量計のセルの中で生じる熱流  $\delta P(t)$  は、化学反応速度  $v(t)$  と反応エンタルピー  $\Delta H$ 、熱量計セルの体積  $V_c$  によって

$$\delta P(t) = (V_c \Delta H) v(t) \quad (7)$$

と書ける。 $V_c$  は装置により決まっており、 $\Delta H$  は通常は全反応熱を測定することで実験的に評価できるから、熱流を測定することで化学反応速度の時間経過が直接測定できる可能性がある。

これは熱により酵素反応を測定する大きな特長である。熱以外の酵素活性評価法では、基質や産物を定量し、その濃度の時間変化から反応速度を計算する。このため、酵素反応の基質に特別なプローブをつける場合もある。また、基質や産物 (あるいはその類似物) が高濃度に存在する場合、その微小な濃度変化を正確に測定するのが困難な場合も存在する。しかし、熱測定であれば、反応エンタルピーさえ 0 でなければあらゆる化学反応が原理的には測定でき、基質や産物がいくら高濃度であってもそれによって観測が妨害されることはない。

また、この場合に化学反応するのはタンパク質ではなく基質であり、タンパク質は酵素反応を起こすのに必要な量だけあれば良く、立体構造変化やタンパク質・リガンド相互作用などのタンパク質自身も変化する熱の測定とは異なって、少量のタンパク質で測定できる場合が多い。

以下では、基本的な酵素反応の速度論である Michaelis-Menten (MM) 式

$$v(t) = \frac{k_{\text{cat}} E_t(t) S(t)}{K_M + S(t)} \quad (8)$$

に従って反応速度が表される場合について説明する。ここで  $E_t(t)$  はセル中の全酵素濃度、 $S(t)$  はセル中の基質濃度 (時間の関数) であり、 $k_{\text{cat}}$  (回転数) と  $K_M$  (ミカエリス定数) は酵素と基質とで決まる酵素活性パラメーターである。MM 式が前提としている定常状態では、反応速度は、基質濃度  $S(t)$  が減少する速度と等しいから、MM 式は数学的には  $S(t)$  の 1 階の常微分方程式であり、時間で 1 回積分することで以下の積分型 MM 式を得る。<sup>12)</sup>

$$[S_0 - S(t)] + K_M \ln \frac{S_0}{S(t)} = k_{\text{cat}} \int_0^t E_t(t) dt \quad (9)$$

ここで  $S_0$  は初期基質濃度  $S(0)$  である。ITC のセルに基質溶液を入れておき、一定時間をかけて酵素溶液を滴下 (注入) する際のセル中の酵素濃度を  $E_t(t)$  とすると、セル中の基質濃度は式(9)に従って変化 (減少) することになる。

式(9)は  $S$  についての超越方程式なので、解析解は持たないが、0 と  $S_0$  との間に必ず解を持つので、 $E_t(t)$  と酵素活性パラメーターを与えれば、任意の時刻  $t (> 0)$  で 2 分法などの簡単な繰り返し計算アルゴリズムを使って高精度で数値解を求めることができる。また、この時の反応速度は、求めた  $S(t)$  を式(8)に代入することで計算できる。

式(8)と(9)の両辺に  $V_c \Delta H$  を乗じることで以下の式を得る。

$$\delta P(t) = \frac{P_{\text{max}} \frac{E_t(t)}{E_f} \delta Q(t)}{Q_M + \delta Q(t)} \quad (10)$$

$$[\delta Q_0 - \delta Q(t)] + Q_M \ln \frac{\delta Q_0}{\delta Q(t)} = P_{\max} \int_0^t \frac{E_t(t)}{E_f} dt \quad (11)$$

ここで  $E_f$  は酵素溶液滴下完了時のセル中の (最終) 酵素濃度であり, その他の関数・物理量は以下のように定義される。

$$\begin{aligned} \delta Q(t) &= \int_t^\infty \delta P(t) dt = (V_c \Delta H) \int_t^\infty v(t) dt \\ &= (V_c \Delta H) S(t) \\ \delta Q_0 &= (V_c \Delta H) S_0 \\ Q_M &= (V_c \Delta H) K_M \\ P_{\max} &= (V_c \Delta H) k_{\text{cat}} E_f = (V_c \Delta H) v_{\max} \end{aligned} \quad (12)$$

ここで  $v_{\max}$  は, 酵素溶液滴下完了後 (酵素濃度  $E_f$  の時) の酵素反応のいわゆる「最大速度」である。式(7)と(12)に見るように, 反応速度, 基質濃度に  $V_c \Delta H$  を乗じて定義された物理量を ITC により評価し, 酵素活性パラメータに  $V_c \Delta H$  を乗じて定義されたパラメータを式(10)と(11)を用いて実測値  $\delta P(t)$  から決定すればよい。

この手法はタンパク質分解酵素サーモライシンのペプチド加水分解活性の評価法として, 酵素滴下完了後の  $\delta P(t)$  の解析法として開発され,<sup>13)</sup> その後, 酵素滴下中の時間のデータも解析可能な形に拡張され, セルラーゼのオリゴセルロースに対する酵素活性評価に適用された。<sup>12)</sup>

**Fig.4(A)** は pH 4.0, 30°C でセロヘキサオース (グルコースが  $\beta$  1,4 結合で 6 個結合したオリゴセルロース) をセロテトラオースとセロピオースとに反転型機構で加水分解する際の熱流  $P(t)$  を ITC で測定したものである。図の向きの矢印の時刻から 127 秒をかけて酵素溶液 60  $\mu$ L を 1 mM の基質溶液 (1.344 mL) に混合した。酵素最終濃度  $E_f$  は 0.27  $\mu$ M である (**Fig.4(B)**)。

酵素の滴下中は, セル中の酵素濃度の増加に対応して熱流 (負なので発熱反応であることがわかる) の大きさが増加してゆく。酵素溶液滴下完了直後からは, 加水分解の進行に伴って基質濃度が減少することにより反応速度は少しずつ遅くなり熱流の大きさも徐々に小さくなる。基質濃度が  $K_M$  程度になると反応速度は急激に遅くなり熱流の大きさも大きく減少している。

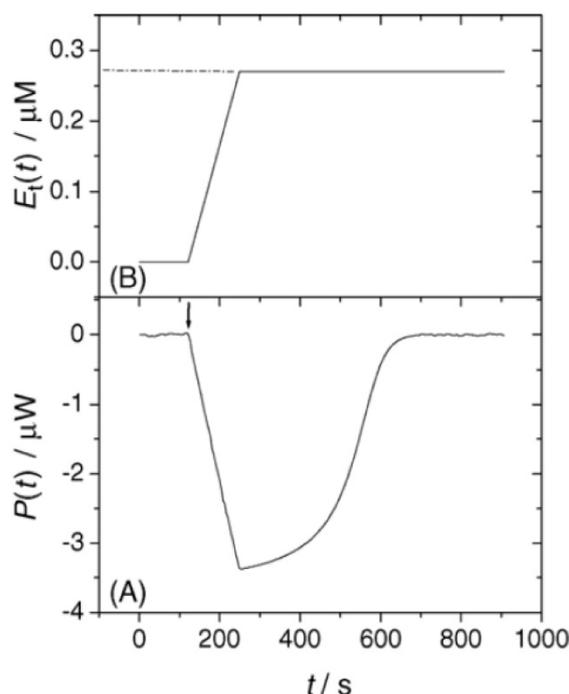
このデータを解析した例を **Fig.5** に示す。まず式(10)を用いると, 以下の式が導出される。

$$\frac{1}{\delta P(t)_{\text{corr}}} = \frac{Q_M}{P_{\max}} \frac{1}{\delta Q(t)} + \frac{1}{P_{\max}} \quad (13)$$

ここで  $\delta P(t)_{\text{corr}}$  は酵素溶液滴下中の全酵素濃度を  $E_f$  に補正した関数で次式で与えられる。

$$\delta P(t)_{\text{corr}} = \delta P(t) \frac{E_f}{E_t(t)} \quad (14)$$

式(12)は酵素反応解析で用いられる Lineweaver-Burk プロットを示しており, 酵素反応が MM 式に従うならば  $\delta Q(t)$  の逆数に対して  $\delta P(t)_{\text{corr}}$  の逆数をプロットすると直線になり, 直線の傾きと切片とから  $P_{\max}$  と  $Q_M$  とが決まる。実際に **Fig.5(A)** に示す  $\delta P(t)_{\text{corr}}$  と **Fig.5(B)** に示す  $\delta Q(t)$  を使って作図すると (**Fig.5(C)**) きれいな直線が得られ, この反応が MM 式でうまく説明できることがわかった。このプロットから計算されるパラメータを初期値として式(10), (11)に基づく理論曲線を実験値に fitting すること (**Fig.5(D)**) で  $\delta Q_0$ ,  $P_{\max}$ ,  $Q_M$  の 3 つのパラメータは, それぞれ, -1138  $\mu$ J, -3.72  $\mu$ W, -92  $\mu$ J となった。この値から計算すると加水分解



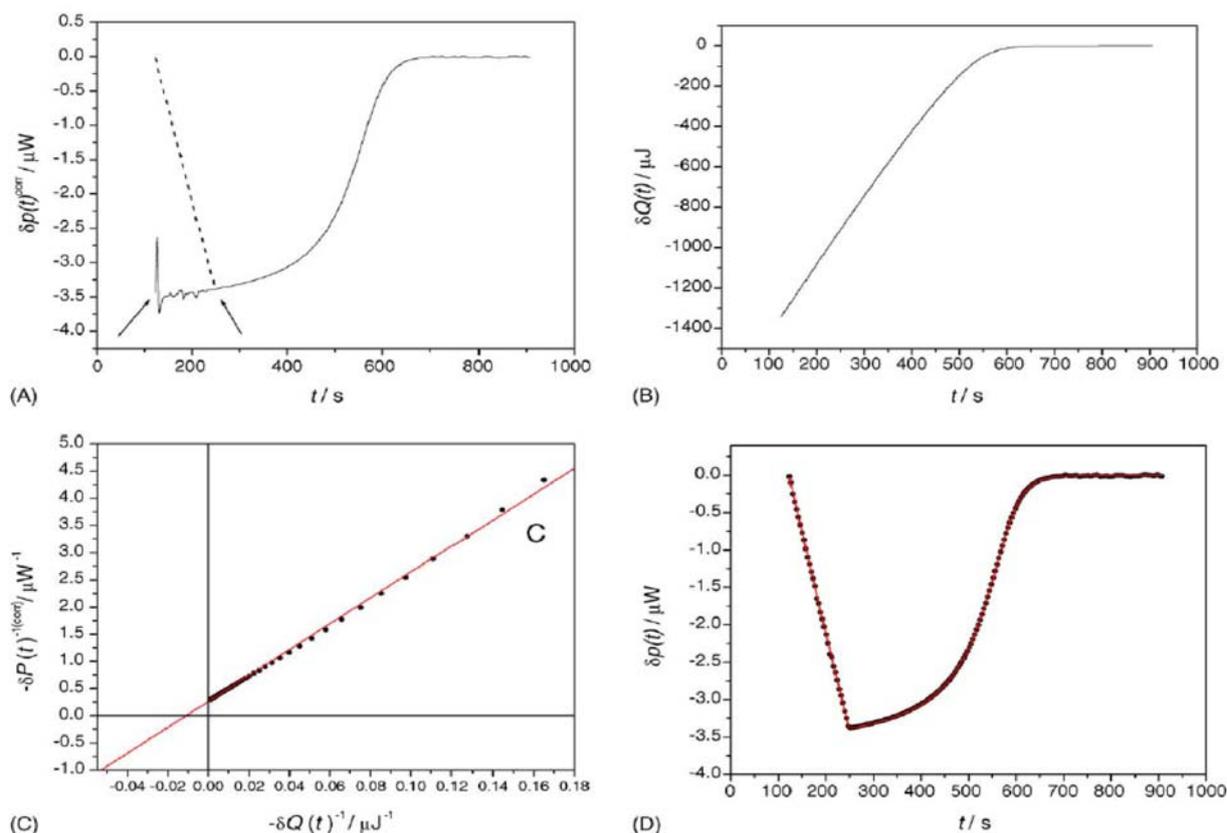
**Fig.4**<sup>12)</sup> The isothermal titration calorimetric observation of cellohexaose hydrolysis. (A) The inverting-type endoglucanase catalyzed 1mM cellohexaose hydrolysis at 30 °C. The substrate solution was 1.0 mM cellohexaose in 20 mM acetate buffer, pH 4.0, loaded in a 1.344mL ITC cell, and the enzyme solution in the same buffer was loaded in the syringe. After thermal equilibrium was reached at 30°C, the compensation power was monitored as a function of time with stirring at 41.9 rad/s. Before injection, the baseline stability was checked. After 122 s, 60  $\mu$ L of the enzyme solution was injected (indicated by the arrow) with a time duration of 127 s, giving a final enzyme concentration of 0.27  $\mu$ M in the ITC cell. (B) The time course of the enzyme concentration of **Fig.4(A)** during the titration. The total enzyme concentration during titration of **Fig.4(A)** is not constant and depends on time. Starting with 122 s the enzyme concentration continues to increase for the next 127 s. So at 249 s, the enzyme concentration reaches its final value of 0.27  $\mu$ M. (Reprinted with permission from Elsevier)

反応の  $\Delta H$ ,  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_M$  は, それぞれ, -847 J/mol, 12.1  $\text{s}^{-1}$ , 82  $\mu$ M と評価された。この図に見るように, 実験データはこのモデルでほぼ完全に説明できる。

ここで紹介したモデルは, 単純な MM 式に従う反応であるが, 対象に応じて反応を的確に表す速度論的モデルを構築することでより複雑な酵素反応に適用が可能と考えられる。ただし, 反応速度定数の温度依存性と熱から直接決まる反応エンタルピーとの間には, 式(1)の平衡定数の温度依存性で見られたような直接の関係はないため, 採用するモデルの検証は, 慎重に行う必要がある。

#### 4. 分子間相互作用の熱量測定

もう一つのタンパク質の重要な分子機能は, 特定の分子やイオンだけを認識して結合する能力 (分子認識能) である。酵素反応でも, 特定の基質だけが酵素に結合することで基質特異性 (選択性) が現れる。また, 抗体は, 特定の非自己の物質 (体外から入ってきた異物) にのみ強く結合することで, 異物を分解あるいは生体外に排出する免疫シ



**Fig.5**<sup>12)</sup> Experimental ITC data of the inverting-type endoglucanase-catalyzed cellohexaose-hydrolysis of **Fig.4(A)** following the simple Michaelis–Menten model. (A) The corrected compensation power of hydrolysis reaction was monitored as a function of time (represented by a solid line). The dashed lines represent the experimental ITC data during the enzyme injection and the compensation power that had been corrected for the hydrolysis reaction during enzyme injection, representing the deviated part of the solid line between the two arrows. (B) The observed total heat was calculated from **Fig.5(A)** using Eq. (12). (C) The Lineweaver–Burk plot of calorimetric observables,  $\delta P(t)_{\text{corr}}$  and  $\delta Q(t)$  (using the data in (A) and (B)). (D) The plotted points were the observed power of hydrolysis reaction, and the solid line represented the theoretical function on a simple Michaelis–Menten mechanism. (Reprinted with permission from Elsevier)

システムで重要な役割を果たす。

このような結合反応は、最も基本的には次の平衡反応で記述できると考えられ、ITCによる分子間相互作用の解析に使用されている。



ここでMはタンパク質分子、Xはタンパク質に結合する物質(リガンド)を表す。上式の平衡定数は、通常、結合定数と呼ばれる。

ITC実験により、セル中のMにXを徐々に滴下し、滴下に伴う熱量を測定し、上式の平衡モデルを仮定することで、この結合定数Kと結合エンタルピー $\Delta H$ とを評価する。

ここで、異なる溶液の混合を行うITCの測定では、混合によるエントロピーの増加が起きるため、タンパク質とリガンドの結合は可逆過程であっても、測定した熱から直接エントロピーを評価することはできない(定圧測定なので2節の最初に述べたように熱からエンタルピー変化は直接評価できる)。このため、上記のような結合反応から平衡定数を決めるためには必ずモデルが必要となる。当然のことだが、採用するモデルにより解析結果は異なるので、モデルの慎重な検討が必要になる。

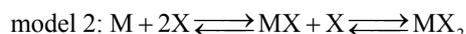
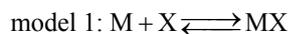
ITCによる測定では、結合エンタルピー $\Delta H$ が直接測定できることを利用することで、複数の温度で結合定数を測定し、結合定数の温度依存性が式(1)を満たすかを検証する

ことでモデル・解析結果に対する信頼性を格段に高めることができる。

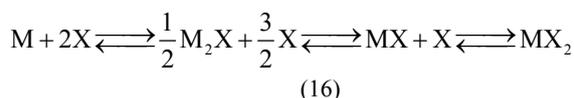
アデノシン3リン酸(ATP)は、生体内の化学エネルギー源として知られている。中性pHではリン酸基からの水素イオンの解離により負電荷を持つため正電荷を持つ金属イオンと複合体を形成する。特に $Mg^{2+}$ とは2個まで結合することが知られている。<sup>14)</sup>金属イオンとの結合により、ATPの実質的な(金属イオンとの複合体を含めたATP全体の持つ)標準ギブズエネルギーは金属イオン濃度によって変化することになる。このため、我々はITCを使って相互作用の熱力学量の評価を試みた。<sup>15)</sup>

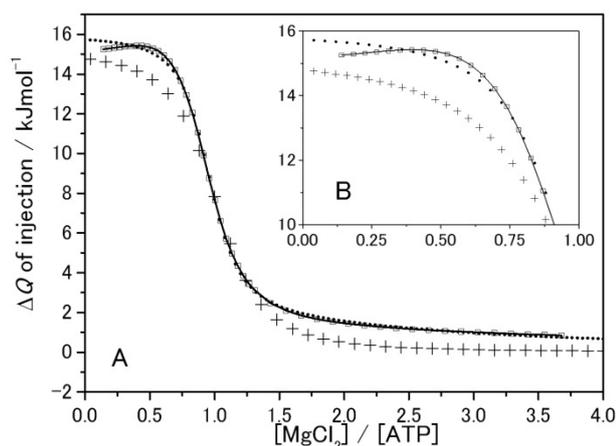
ATPがほぼ-4価を持つpH 8.5で、300 mM KCl共存下でATPに $MgCl_2$ を滴定することで得られた30°Cのデータを**Fig.6**に示す。この条件では、金属イオンの結合には、大きな吸熱を伴い、エントロピー駆動による結合であることは明確である。

本研究で用いた解析モデルは、次の3種類である。



model 3:



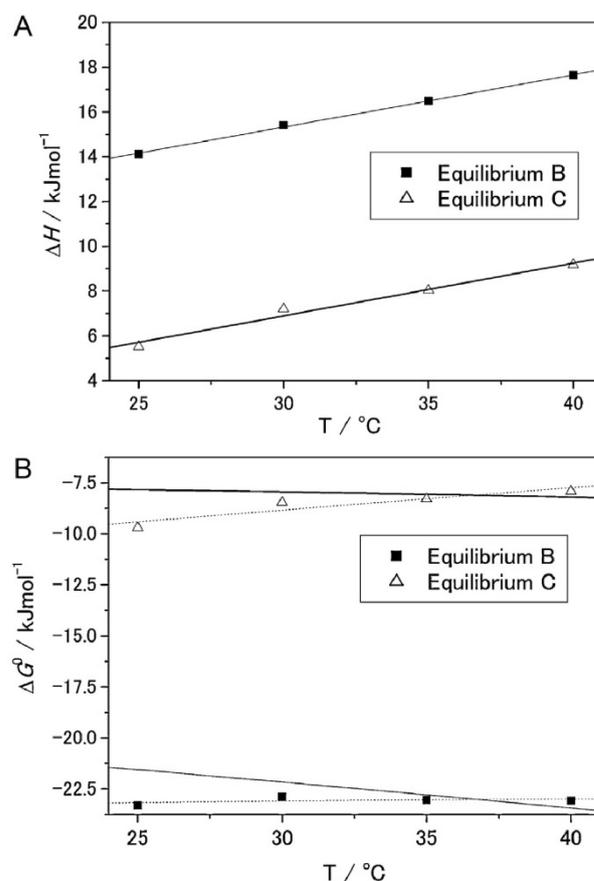


**Fig.6**<sup>15)</sup> (A) The titration curves of the interaction between adenosine 5'-triphosphate and  $Mg^{2+}$  ion. Open squares show the measurement data. The titrations of 187 mM  $MgCl_2$  were performed to 10 mM ATP at 30°C. The solid line shows the theoretical fitting curve by the fitting analysis with model 3. The dotted line shows the fitting curve with model 2, and the crosses show the fitting curve with model 1. (B) The enlarged view of the initial part of the titration curve. (Reprinted with permission from Elsevier)

データを見ると、単純な1対1反応(model 1)のような印象を受けるが、このモデルでは、濃度比(= $[MgCl_2]/[ATP]$ )が大きいくところ観測される吸熱(2個目の $Mg$ イオンの結合による)と考えられる)が説明できず、また、全体をfittingしようとするため濃度比の小さい部分でも実験データとの差が大きいくことがわかる。Model 2では、濃度比0.75以上の条件では実験データを説明できるが、これより小さな濃度比では系統的な残差がみられる。この残差は、model 3で $M_2X$ という複合体の形成を考慮することで解消できる。X( $Mg^{2+}$ イオン)に比べてM(ATP<sup>4+</sup>)の濃度が高い場合には、2つのMでXを共有する $M_2X$ 複合体が安定に出現することを示している。

Model 2で解析した場合の平衡定数 $K$ (あるいは標準ギブスエネルギー変化 $\Delta G^0$ )の温度依存性を確認したのがFig.7である。この図でEquilibrium B, Cとあるのは、model 2の中の2つの平衡、それぞれ、 $M+X \rightleftharpoons MX$ と $MX+X \rightleftharpoons MX_2$ を指している。両方の平衡とも、この温度範囲では $\Delta H$ は正なので、式(1)より結合定数は温度とともに増加し、 $\Delta G^0$ は温度とともに減少しなければならないが、model 2を用いた解析結果は逆の温度依存性を示しており、やはりこのモデルが適切ではないと考えられる。

一方、Model 3を用いた場合には、新たに導入される平衡 $M + \frac{1}{2}X \rightleftharpoons \frac{1}{2}M_2X$  (Equilibrium A)のパラメータを1つの温度のデータだけで決定すると推定誤差が大きくなるため、複数の異なる温度、ATP濃度のデータを同一のパラメータでfittingするグローバル解析を行うことで、式(1)をより積極的に用いてパラメータを決定した。Fig.6の低い濃度比のデータから予想されるように、Equilibrium Aに伴う $\Delta H$ は負なので $M_2X$ の結合は温度を下げた方が強くなり、また当然ATP濃度を上げることでより観測しやすくなると推測されるが、実際の実験結果でもこの通りの温度依存性、濃度依存性が観測された。<sup>15)</sup>



**Fig.7**<sup>15)</sup> (A) The temperature dependence of  $\Delta H$  on the interaction between ATP and  $Mg^{2+}$  ion evaluated by the fitting analysis with model 2. The filled squares and the open triangles show  $\Delta H$  of equilibriums B and C, respectively. The thin solid line and thick solid line show the linear fitting curve of equilibriums B and C, respectively. (B) The temperature dependence of the standard Gibbs energy change,  $\Delta G^0$ , of the interaction between ATP and  $Mg^{2+}$  ion. The filled squares and open triangles show  $\Delta G^0$  of equilibriums B and C, respectively, evaluated by the fitting analysis with model 2. The thin solid line and thick solid line show the van't Hoff plot of equilibriums B and C. In this plot,  $\Delta G^0$ ,  $\Delta H$ , and  $\Delta C_p$  at 35°C were determined as the thermodynamic parameters evaluated by the fitting analysis. The dotted lines show the fitting curves calculated by the van't Hoff equation with  $\Delta H$  as the fitting parameter. (Reprinted with permission from Elsevier)

## 5. おわりに

タンパク質が自発的に立体構造を形成する能力や、それらが発現する分子機能(触媒能、分子認識能)は、タンパク質のアミノ酸配列と溶媒条件とから熱力学的に決まるものだが、系の複雑性のために定量的で確実な予測は未だ実現できていない。しかし、DSC, ITC, PPCなどの熱量計の精度の向上や有用な解析法の開発により、それらを熱力学的に記述する技術は確実に向上している。今回紹介した例も、タンパク質分子の物性・機能を理解・予測する上で、熱測定法がいかに重要であることを示している。今後、平衡論に基盤をおきながら、生命現象の本質である速度論的な現象の解明に熱測定の特長をさらに活用していくことは、大いに挑戦しがいのあるテーマと感じている。

## 謝 辞

この度、2013 年度日本熱測定学会 学会賞を頂いたことは、身に余る光栄です。タンパク質の物性研究に導きご指導いただいた東京大学名誉教授の和田昭允先生と、熱測定のご指導をいただき本学会に導いていただいた上平初穂博士に心より感謝いたします。また、数多くの研究テーマに導いていただいた共同研究者の皆様と、それらの研究テーマの一つ一つに粘り強くとりくんでくれた研究室のポストドク・学生諸氏に感謝します。

## 文 献

- 1) 城所俊一, 熱測定 **14**, 143-153 (1987).
- 2) S. Nakamura and S. Kidokoro, *Biophys. Chem.* **109**, 229-249 (2004).
- 3) S. Nakamura and S. Kidokoro, *Biophys. Chem.* **113**, 116-118 (2005).
- 4) M. Ohgushi and A. Wada, *FEBS Lett.* **164**, 21-24 (1983).
- 5) S. Nakamura, *et al.*, *Biophys. Chem.* **127**, 103-112 (2007).
- 6) L. Fu and E. Freire, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9335-9338 (1992).
- 7) S. Kidokoro and A. Wada, *Biopolymers* **26**, 213-229 (1987).
- 8) S. Kidokoro, *et al.*, *Biopolymers* **27**, 271-297 (1988).
- 9) S. A. Ali, *et al.*, *Biophys. J.* **85**, 2606-2618 (2003).
- 10) S. Nakamura, *et al.*, *Biochemistry* **50**, 3116-3126 (2011).
- 11) S. Nakamura and S. Kidokoro, *J. Phys. Chem. B* **196**, 1927-1932 (2012).
- 12) N. Karim, *et al.*, *Thermochim. Acta* **431**, 9-20 (2005).
- 13) S. Kidokoro, *Netsu Sokutei* **28**, 74-82 (2001).
- 14) R.A. Alberty, *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 1-11 (1994).
- 15) S. Nakamura, *et al.*, *Thermochim. Acta* **563**, 82-89 (2013).