Netsu Sokutei **46** (1), 17-21 (2019)

解　説

DSCにより明らかになった蛋白質の高温での可逆的オリゴマー形成

城所 俊一

長岡技術科学大学大学院 生物機能工学専攻

（受取日：2018年8月17日，受理日：2018年9月19日）

Reversible Oligomerization of Proteins at High Temperature Revealed by DSC Analysis

Shun-ichi Kidokoro

Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology

(Received Aug. 17, 2018; Accepted Sep. 19, 2018)

While irreversible aggregation or amyloid formation of denatured proteins are well known and studied in detail, the reversible oligomerization (RO) states of some monomeric proteins at high temperature have been recently discovered by DSC analysis. In this article, the RO states of horse cytochrome *c* and envelope protein domain 3 from dengue 4 virus were reviewed, and the essential points for the DSC analysis for such self-association/dissociation process were briefly introduced. The significance of RO was discussed as a key process for the kinetics of aggregation and/or amyloid formation, and the importance of the concentration dependence check was suggested for DSC analysis even for monomeric proteins.

Keywords: reversible oligomerization, concentration dependence, thermal denaturation, cytochrome *c*, envelope protein

1. はじめに

蛋白質の中には，赤血球のヘモグロビンや免疫グロブリンなど生体中で自発的に多量体（会合体）を形成するものが知られており，このような立体構造は4次構造と呼ばれる。また，球状蛋白質アクチンは，高塩濃度で自発的にらせん状に規則正しく多数重合して繊維状の構造を形成し，細胞の形を決めたり，力学的な仕事をしたりする。[1] また，通常は単量体の蛋白質が，ある条件では，3 次構造の一部分を隣接分子と交換することで多量体を形成する例も知られている。[2]

このような多量体蛋白質は，温度・pH・変性剤などで変性させると，3次構造の喪失とともに4次構造も無くなり，通常は変性とともに単量体に解離する。これは，3 次構造に特有の分子間相互作用が多量体を安定化していると考えれば当然と思われる。例えば，我々は，T4 ファージ由来の蛋白質 gp57A が，中性 pH で，安定な 6 量体を形成している天然状態が，昇温に伴って途中 2 つに解離して 3 量体の中間状態が出現するが，高温では変性して単量体へと可逆的・平衡論的に完全に解離することを DSC や超遠心分析を用いて明らかにした。[3]

一方で，変性した蛋白質は疎水性残基が溶媒に露出するため溶解度が低下し，会合（凝集）を起こしやすくなる。実際に，蛋白質の種類や溶媒条件によっては，変性した蛋白質が不規則な凝集体を形成し，溶液が白濁したり沈殿を起こしたりする場合がある。[4] また，ある溶媒条件では，分子間でβシートを形成し，繊維状の集合体（アミロイド）を形成する場合も知られている。[5] これら凝集体やアミロイド形成は不可逆変化である。特に熱転移に伴って凝集体が生じると大きな発熱が観測されることは良く知られているが，これは完全に不可逆な反応であり，低温にしても凝集が解離することはない。一度できたゆで卵が冷やしても生卵に戻らないのと同様である。

もし変性した蛋白質が可逆的に会合体を形成するのであれば，蛋白質立体構造の安定性を評価する際にこの点を考慮しなければならない。しかし，単量体蛋白質の熱安定性の測定では，可逆的な変性であれば，通常は高温での会合体は生じていないとみなされる場合がほとんどである。これは，DSC で熱転移を測定した場合，熱変性後に会合体を形成する場合としては，発熱を伴った不可逆な凝集体を生じ，熱変性が不可逆となる場合しか知られていなかったためと考えられる。

本報では，DSC による解離・会合を含む熱転移の解析法について解説するとともに，この方法を用いて，DSC の蛋白質濃度依存性を測定することで，単量体蛋白質が，高温で可逆的な多量体（オリゴマー）を形成することを明らかにした最近の報告 2 件を紹介し，その意義について考察する。以下，このような可逆的なオリゴマー形成過程を reversible oligomerization の略で RO，可逆的オリゴマーが形成された状態を reversibly oligomerized（RO）状態と略称する。

© 2019 The Japan Society of Calorimetry and Thermal Analysis

2. 自己解離・会合を含む熱容量関数の解析法

本論文で紹介する 2 つの研究例は，[6,7] いずれも自己解離・会合を含む多状態転移の熱容量関数の解析法を用いている。[8] この手法については本誌でも解説があるが，[9] 今回紹介する研究に関係する部分に焦点を絞り，要点を簡単に下記に述べる。ここで対象としているのは，自己解離・会合過程を含む複数の熱力学状態の間の平衡であり，式(1)で記述される。

$$m_0\mathrm{A}_0 \rightleftarrows m_1\mathrm{A}_1 \rightleftarrows \ldots \rightleftarrows m_i\mathrm{A}_i \rightleftarrows \ldots \rightleftarrows m_n\mathrm{A}_n \quad (1)$$

ここで，A_i は i 番目の状態の蛋白質の要素粒子（会合体），m_i はその化学量論係数である。例えば前述の 6 量体蛋白質（N_6），3 量体の中間状態（I_3）と単量体の変性状態（D）の 3 つの熱力学状態の間で平衡になっている場合は，

$$\frac{1}{6}\mathrm{N}_6 \rightleftarrows \frac{1}{3}\mathrm{I}_3 \rightleftarrows \mathrm{D} \quad (2)$$

と記述される。DSC 測定では，温度変化によって平衡定数が変化し，これによって溶液中の各 A_i の濃度（A_i）が変化する。このとき，会合体の構成要素の溶液中の総量は不変なので，化学量論係数が 1 となる要素粒子の濃度に換算した換算蛋白質濃度（次式）M は一定であり，保存される。

$$\sum_{i=0}^{n}\frac{1}{m_i}\left(\mathrm{A}_i\right) = M \quad (3)$$

従って，各状態のモル分率を次式で定義すると，モル分率の総和は 1 となる。

$$f_i = \frac{1}{Mm_i}\left(\mathrm{A}_i\right) \quad (4)$$

式(1)の任意の 2 つの状態 i と j の間の平衡定数を K_{ij} とすると，この平衡定数は，標準自由エネルギー変化 ΔG_{ij}^0 を用いて

$$K_{ij} = \frac{\left(\mathrm{A}_j\right)^{m_j}}{\left(\mathrm{A}_i\right)^{m_i}} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{ij}^0}{RT}\right) \quad (5)$$

と表される。なお ΔG_{ij}^0 は，各 A_i の標準化学ポテンシャル μ_i^0 により，次式のように定義される。

$$\Delta G_{ij}^0 = m_j\mu_j^0 - m_i\mu_i^0 \quad (6)$$

ここで，式(4)で定義したモル分率を使って式(5)を表すと

$$\frac{\left(m_j f_j\right)^{m_j}}{\left(m_i f_i\right)^{m_i}} M^{m_j - m_i} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{ij}^0}{RT}\right) \quad (7)$$

となる。また，上式の両辺の自然対数をとって整理すると次式を得る。

$$m_j \ln\left(m_j f_j\right) - m_i \ln\left(m_i f_i\right) = -\frac{\Delta G_{ij}^0}{RT} - \Delta m_{ij} \ln M \quad (8)$$

ここで，化学量論係数変化 Δm_{ij} は次式で定義される。

$$\Delta m_{ij} = m_j - m_i \quad (9)$$

また，蛋白質濃度 M の関数である見かけの自由エネルギー変化 $\Delta G_{ij}^{\mathrm{a}}$ を下記のように定義すると，

$$\Delta G_{ij}^{\mathrm{a}} = \Delta G_{ij}^0 + \Delta m_{ij} RT \ln M \quad (10)$$

式(7),(8)は下記のように簡単に表され便利である。

$$\frac{\left(m_j f_j\right)^{m_j}}{\left(m_i f_i\right)^{m_i}} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{ij}^{\mathrm{a}}}{RT}\right) \quad (11)$$

$$m_j \ln\left(m_j f_j\right) - m_i \ln\left(m_i f_i\right) = -\frac{\Delta G_{ij}^{\mathrm{a}}}{RT} \quad (12)$$

これらの式は，化学量論係数が異なる場合には，蛋白質濃度 M によってモル分率が変化することを示している。さらに式(12)の両辺を温度で微分すると，

$$\frac{\mathrm{d}}{\mathrm{d}T}\left(m_j \ln f_j - m_i \ln f_i\right) = \frac{\Delta H_{ij}^0}{RT^2} \quad (13)$$

となる。ここで標準エンタルピー変化 ΔH_{ij}^0 は，各 A_i の部分モルエンタルピー H_i により，

$$\Delta H_{ij}^0 = m_j H_j - m_i H_i \quad (14)$$

と表される。一般にモル分率 f_i やその温度微分は蛋白質濃度によって変化するが，式(13)の左辺のような差（の温度微分）をとることで濃度依存性がなくなることがわかる。

次に式(13)の両辺に f_j をかけて添え字 j について総和を計算する。ここで，全系の部分モルエンタルピー H が次式

$$H = \sum_{j=0}^{n}\frac{\left(\mathrm{A}_j\right)}{M}H_j = \sum_{j=0}^{n} m_j f_j H_j \quad (15)$$

であることを用いて

$$\frac{\mathrm{d}}{\mathrm{d}T}\left(\sum_{j=0}^{n} m_j f_j - m_i \ln f_i\right) = \frac{\Delta H_i}{RT^2} \quad (16)$$

という関係式が得られる。ここで右辺の ΔH_i は次式で定義される。

$$\Delta H_i = H - m_i H_i \quad (17)$$

この ΔH_i は，状態 i を基準にした過剰定圧熱容量 $\Delta C_{p,i} = C_p - m_i C_{p,i}$ を温度で数値積分することで得られる DSC の観測量である。式(16)の関係を使って実験値からモル分率を直接評価する手法（deconvolution 法）が開発されている。

式(16)には各状態の化学量量係数 m_j が含まれているため，解析にはこれらの値が必要となる。実験的に化学量論係数が不明な場合などでは，様々な値を仮定して，式(16)からモル分率を求め，式(8)を用いてこれらのモル分率から評価した標準自由エネルギー変化 ΔG_{ij}^0 が，様々な蛋白質濃度で変わらないことを実験的に確認することが必要である。

この，ΔH_i からモル分率を解析的に評価する方法とは別に，各状態の化学量論係数，熱容量関数，状態間のエンタルピー変化，ギブズエネルギー変化をパラメターを使って表現し，定圧熱容量関数 C_p が観測量を最もよく近似するよう（残差 2 乗和が小さくなるよう）にパラメターを調整する方法（非線形最小 2 乗法）も有効である。ここでは，全てのモル分率の和が 1 となることを式(11)を用いて表した次式

$$\sum_{j=0}^{n}\frac{\left(m_i f_i\right)^{m_i/m_j}}{m_j}\exp\left(-\frac{\Delta G_{ij}^{\mathrm{a}}}{m_j RT}\right) = 1 \quad (18)$$

が f_i についての方程式とみなすことができることを利用する。全てのモル分率は，0 と 1 の間に必ず 1 つの解を持つ

ため，この方程式は比較的容易に数値解を得ることができる。これらのモル分率が決まれば，蛋白質の部分モル熱容量 C_p は次式で計算できる。

$$C_p = \sum_i m_i C_i f_i + \frac{\sum_{i>j} \Delta H_{ij}^2 \frac{f_i f_j}{m_i m_j}}{RT^2 \sum_i \frac{f_i}{m_i}} \tag{19}$$

一つの熱容量関数だけを用いて最小二乗法でパラメターを決定する方法を個別解析と呼ぶ。この方法で化学量論係数についてある程度情報を得ることは可能だが，式(1)のような解離・会合を含む多状態熱転移の解析では，様々な蛋白質濃度で測定した複数の熱容量関数について，同じ熱力学パラメターに式(10)で個別の蛋白質濃度を補正することで，複数の蛋白質濃度の熱容量関数から共通の熱力学パラメターを決定するグローバル解析が有効である。化学量論係数が実験的に不明確な場合には，化学量論係数を変えてグローバル解析を行い，実験値を最もよく説明する係数を採用することが行われる。

どの程度の濃度依存性を測定する必要があるかは，熱転移に伴う化学量論係数の変化やエンタルピー変化に依るが，濃度を n 倍にしたときの転移温度の変化を近似的に示す次式

$$\Delta T_{\mathrm{m}} = \frac{RT_{\mathrm{m}}^2 \Delta m}{\Delta H\left(T_{\mathrm{m}}\right)} \ln n \tag{20}$$

が濃度範囲の検討に有効である（この式は式(8)から得られる）。[10] 同じ n 倍の濃度変化でも，化学量論係数変化が小さい場合や，エンタルピー変化が大きい場合には T_{m} の変化が小さく，濃度依存性の観測が困難となる。例えば，$n = 2$ の場合，単量体から 2 量体への熱転移（$\Delta m = -0.5$）で $\Delta H(T_{\mathrm{m}})$が 400 kJ/mol, $T_{\mathrm{m}} = 320$ K では $\Delta T_{\mathrm{m}} = -0.74$ K と，高精度の DSC であれば十分に観測可能な転移温度の変化が期待されるが，6 量体から 3 量体（$\Delta m = 0.16\ldots$），$\Delta H = 1000$ kJ/mol とすると $\Delta T_{\mathrm{m}} = 0.098\ldots$ K と変化はかなり小さくなる。ここで，式(20)を n について解いた次式

$$n = \exp\left[\frac{\Delta H\left(T_{\mathrm{m}}\right)}{RT_{\mathrm{m}}^2 \Delta m} \Delta T_{\mathrm{m}}\right] \tag{21}$$

を用いると，後者の場合，0.5 K の T_{m} の差を出すためには，34 倍の濃度変化が必要であることがわかる。ここで，Δm や ΔH は，ともに蛋白質の物質量を計算するための要素粒子の大きさに比例するが，式(20), (21)はともにこれらの比となるため，要素粒子の取り方にはよらないことに注意されたい（上の例では，蛋白質の単量体を物質量の要素粒子としているが別の取り方も可能である）。これらの例が示すように，RO 状態の解析には，ΔH が直接測定可能な DSC 測定で蛋白質濃度依存性を評価することが有効であることがわかる。

3. シトクロム *c* のモルテングロビュール状態の熱転移で観測された，高温での可逆的オリゴマー形成

シトクロム *c* は分子量約 1 万の小さな球状蛋白質で，分子内部にヘム鉄を 1 つ共有結合している。このため，立体構造変化に伴う分光学的な情報が多く，また，弱酸性から酸性条件下では，温度・pH・変性剤など様々な条件で可逆的な変性が観測されるため，従来から蛋白質の立体構造変化の研究対象として使われている。[11] また，2 次構造はほとんど巻き戻り，分子鎖の広がりも天然構造と同等であるが，側鎖がまだ変性状態と同程度に大きく揺らいでいる，モルテングロビュール（MG）状態と呼ばれる巻き戻り中間体が観測され，かつ，この構造が，酸性・高塩濃度の条件で安定化されることから MG 状態の研究対象としても用いられている。[13]

また，この蛋白質の場合，MG 状態は温度を上げることで，熱変性状態（D 状態）へと可逆的・協同的な熱転移を示すことでも MG 状態の熱力学的研究には大変有利である。[11] これは，可逆的な熱変性であれば DSC 測定によって直接ギブズエネルギー変化が評価できるからである。実

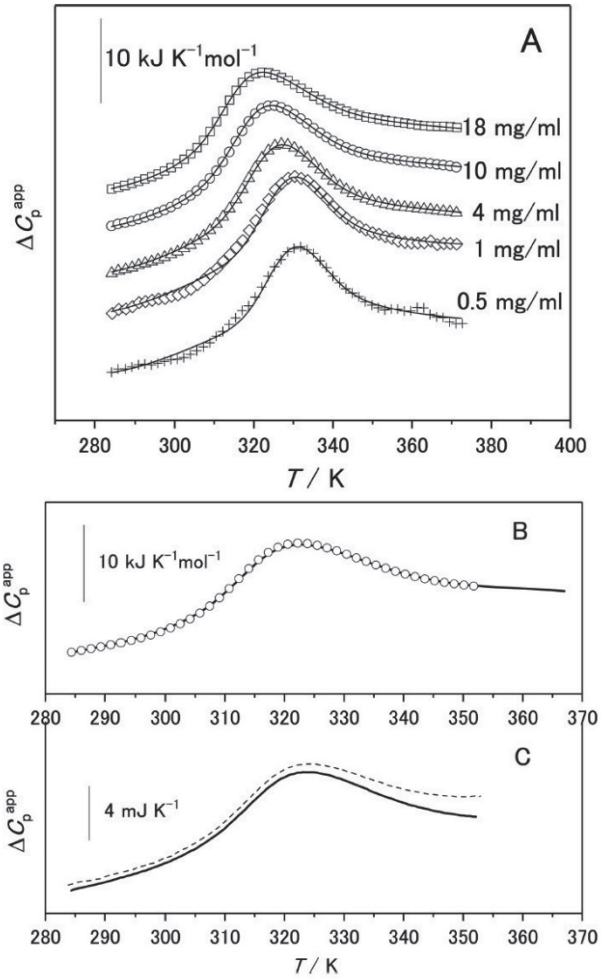


Fig.1[6] (A) Heat capacity profiles of the transition of horse cytochrome *c* at 50 mM glycine buffer, pH 2.5, 500 mM KCl. Open squares, circles, triangles, diamonds, and crosses show the heat capacity profiles at 18, 10, 4, 1, and 0.5 mg/mL cytochrome *c*, respectively. Solid lines show the fitting data calculated with the six-state model (see the text in detail). (B) Reversibility of the thermal transition of the molten globule state of cytochrome *c* with the protein concentration of 18.0 mg/mL. Open circles show the first heating of DSC (scanning up to 353.15 K). Solid line shows the second heating of DSC. (C) Scanning rate dependence of DSC profile of the thermal transition of the molten globule state of cytochrome *c* with the protein concentration of 18.0 mg/mL. Both data of the down scan (broken lines) with the scanning rate of –0.5 K min^{-1}and the up scan (Thick solid line) with 1 K min^{-1} were indicated in the figure. The down scan was started from 353.15 K to 283.15 K, and the up scan was done just after the down scan in the same temperature range. (Reprinted with permission from American Chemical Society).

際に，弱酸性・低塩濃度のシトクロム *c* の N 状態から D 状態の DSC 測定から，酸性・高塩濃度の MG 状態と同様の中間状態を検出するのに成功している。[14)]

シトクロム *c* は天然状態（N 状態）の他，MG 状態や D 状態も単量体であることが，溶液X線散乱実験から示されており，[15)] この蛋白質の可逆的な熱転移で蛋白質の濃度依存性が示された報告は筆者の知る限りなかった。また，シトクロム *c* に限らず，N状態で単量体の蛋白質が熱転移の際に可逆的に多量体を形成するという報告もなかったため，単量体の可逆的な熱転移については，可逆的な多量体形成は，従来想定されていなかったと思われる。

しかし，**Fig.1(A)**に示すように，酸性・高塩濃度（pH 2.5, 500 mM KCl）の 50 mM グリシン緩衝液中で測定したシトクロム *c* の MG 状態（厳密には低温側で安定な MG1 状態）からの熱転移では，0.5 mg/mL～18 mg/mL の濃度範囲で顕著な濃度依存性が観測された。**Fig.1(B),(C)**からは，18 mg/mL という高濃度の測定でも，熱転移は可逆的であり，昇温速度に依存しない，各温度で平衡が成立していると見なせる測定であることがわかる。また，最も濃度の高い 18 mg/mL は 1.5 mM の蛋白質濃度になるが，本論文では 50 mM グリシン緩衝液 pH 2.5 で 500 mM KCl 溶液条件で十分に透析を行うことで，蛋白質濃度以外の pH やイオン強度など蛋白質安定性に影響を与える外部条件が一定になるようにしている。

最も濃度の薄い 0.5 mg/mL は，従来から提案されている単量体の 3 状態モデル（式(22)）による個別 fitting は可能であるが，もちろんこのモデルでは，濃度依存性は全く説明できない。

$$\mathrm{MG1} \rightleftarrows \mathrm{MG2} \rightleftarrows \mathrm{D} \qquad (22)$$

式(20)から，高濃度にした時（$\ln n > 0$）に T_m が減少する吸熱反応（$\Delta H > 0$）が起きるためには Δm が負となる（会合数が増加する）ことが必要なことがわかる。そこで，2 量体，3 量体などの多量体をモデルに追加したところ, 4 量体の状態を含む下記の 6 状態モデル（式(23)）で全ての DSC データが説明できることがわかった。

$$\mathrm{MG1} \rightleftarrows \mathrm{MG2} \rightleftarrows \mathrm{D} \rightleftarrows \frac{1}{2}\mathrm{I}_2 \rightleftarrows \frac{1}{3}\mathrm{I}_3 \rightleftarrows \frac{1}{4}\mathrm{I}_4 \qquad (23)$$

すなわち，今回の DSC のデータ（濃度依存性）は，少なくとも 4 量体程度の会合体が高温で可逆的に形成されていることを示している。5 量体以上の可逆的会合体の形成は否定できないが，もし会合数の大きな安定な状態があるとすると，式(20)から，4 量体までのモデルよりもさらに濃度依存性は大きく観測されるはずであり，5 量体以上の可逆的会合体の形成の可能性は小さいと考えられる。

さらに，この DSC の結果を利用して同条件で測定した PPC（圧力摂動熱量測定）結果を解析し，部分分子体積が，単量体間では MG1 < MG2 < D と構造が壊れるとともに増加するのに対し，会合数が大きくなるほど部分体積は減少することが示されている。蛋白質の疎水性表面が溶媒に露出することで疎水水和した水分子の分子体積が増加する寄与を考えると上記の結果は大変合理的であるが，温度を上げた時に単分子では疎水水和が増加する方向に，分子間では疎水水和が減少する方向へと変化している可能性を示唆しており，大変興味深い。

4. デングウイルスの外殻蛋白質ドメイン 3 の高温での可逆的なオリゴマー形成

デング熱の原因ウイルスの外殻を形成する蛋白質の一部（ドメイン 3, 以下 ED3 と省略）は，分子量約 1 万の球状蛋白質である。X線結晶解析で N 状態の立体構造が決定され，また溶液中では，超遠心分析で単量体であることが確認された。[7)] この ED3 の DSC 測定では，**Fig.2** に一例を示

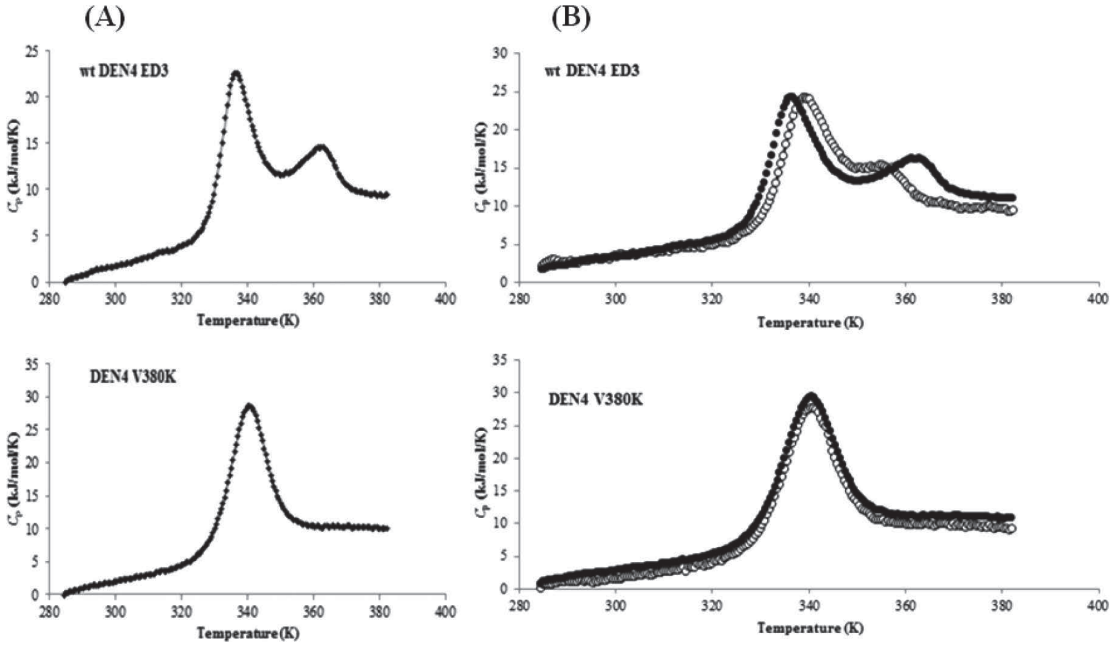


Fig.2[7)] (A) DSC thermogram of envelope protein domain 3 (ED3) wild type from dengue 4 virus with three-state model fitting (see text in detail) and V380K mutant with two-state model fitting at 1 mg/mL, pH 4.6, and a scan rate of 1 K/min. Dots represent the raw data, and lines represent the fitting curve. (B) Concentration dependence of the DSC thermogram of wild type ED3 and V380K mutant at 0.5−1 mg/mL protein concentration in 50 mM acetate buffer, pH 4.6, and a scan rate of 1 K/min. The filled and open circles show DSC thermograms at 1 and 0.5 mg/mL, respectively. (Reprinted with permission from American Chemical Society).

すように，弱酸性から中性 pH で，明確な 2 つの吸熱ピークが観測され，安定な中間状態が存在することがわかった。これらの熱転移は完全に可逆であった。また，2 倍程度の濃度変化で明確な差がみられた。蛋白質濃度を上げることで，低温側のピークはより低温に，高温側のピークはより高温にシフトすることがわかった。すなわち，濃度が高くなることで，中間状態は N・D 両方の状態に対して安定化していることになる。0.5 mg/mL と 1.0 mg/mL の 2 つの濃度のデータをグローバル解析することで，中間状態は 4 量体，D 状態は単量体ということがわかった（下記式(24)）。

$$\mathrm{N} \rightleftarrows \frac{1}{4}\mathrm{I}_4 \rightleftarrows \mathrm{D} \qquad (24)$$

本論文では，動的光散乱法を用いて，溶液中の蛋白質粒子径（流体力学的半径）の温度変化を評価することで，この高温での会合体の形成と低温に戻した時の可逆的な解離とを確認している。

また，分子表面にある疎水性残基の一つである 380 番のバリン（V）を，より疎水性の低いアラニンや極性のアミノ酸（セリン，トレオニン，アスパラギンなど）に置換したところ（**Fig.2** ではリシン（K）に置換した V380K を示す），吸熱ピークは 1 本となり，濃度依存性もなくなり，熱転移は N と D の間の 2 状態転移となった。この N, D 間の T_m や $\Delta H(T_m)$は，380 番をどのアミノ酸に置換してもほぼ同じなだけでなく，野生型の解析から得られた N, D 間の値とも一致している。すなわち，野生型の 380 番目のバリンは，N, D 状態の安定性には大きな影響を与えずに，中間体である 4 量体の形成だけを安定化していることが示唆される。

5. 可逆的オリゴマー形成（RO）の意義

従来から，熱変性した蛋白質は会合体を形成しやすいことは良く知られている。これらの会合体は凝集体あるいはアミロイドと呼ばれ，非常に多数の蛋白質分子が不可逆的に会合したものである。例えば，DSC で熱変性後に観測されることのある凝集体の形成は発熱反応で，エンタルピーの減少を伴う。定性的にはルシャトリエの原理によって，定量的にはファントホッフの式で示されるように，もし反応が可逆であれば，その反応の（定圧での）平衡定数は昇温によって必ずエンタルピーが増加する（吸熱の）方向に変化する。従って，もし昇温により発熱反応が生じる場合には，この反応は不可逆過程でなければならない。

今回観測された可逆的オリゴマー形成（RO）と不可逆過程である凝集体やアミロイド形成反応との関係については現在のところ不明であるが，大きく分けて 2 つの可能性が考えられる。すなわち，(1) RO 状態が核となって，さらに大きな会合体が形成される（すなわち，RO が凝集体やアミロイド形成を促進する）場合と，(2) RO が凝集体やアミロイド形成に直接関与しない（凝集体やアミロイド形成は，別の種類の初期会合体から成長する）場合である。(1)のように RO が必須の初期過程であるとすると，RO の形成・解離の速度論的研究は凝集体形成やアミロイド形成反応に直接関係することになる。また，これを不安定化させることで，凝集体やアミロイド形成を抑制できる可能性がある。また，(2)のように RO が凝集体やアミロイド形成過程に直接関与しない場合には，より RO 状態を安定化させ，変性した単量体蛋白質から積極的に RO 状態を作ることで，変性した単量体の濃度を下げ，間接的に凝集体やアミロイドの形成反応を抑えられる可能性がある。

また，RO がどのような機構で安定化されているか，立体構造はどんな特徴があるのか，についても，今後の問題である。前述の ED3 のアミノ酸置換の実験からは，RO のためには，分子間の疎水性相互作用が重要である可能性が示唆される。今後，様々なアミノ酸置換体を調べることで RO 状態安定化の機構を明らかにすることが可能と思われる。

RO 状態の立体構造に関しては，MG 状態と同様に，結晶化による構造解析は難しいと思われる。溶液状態での構造解析（NMR 等の分光法，散乱法など）が有望である。近年急速に進展した X 線結晶構造解析によって，我々は蛋白質の N 状態についての立体構造情報は非常に詳細に得られるようになった。しかし，それ以外の状態の立体構造についてはまだまだわからない部分が多いことを改めて痛感させられる。

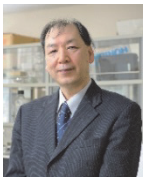
さらに，今回の知見は，蛋白質立体構造転移の DSC 測定では，従来から標準的に実施されている，可逆性や昇温速度依存性の確認に加えて，蛋白質濃度依存性の確認を行うことの重要性を示している。現状では，単量体蛋白質については，濃度依存性の測定はほとんど行われていないが，濃度依存性を確認することで，これまで見逃されていた RO が発見されるのではないかと期待できる。

謝　辞

本論文は，2017 年 11 月 2-4 日に福岡大で開催された 8th International and 10th Japan-China Joint Symposium on Calorimetry and Thermal analysis（CATS-2017）で行った招待講演を元にまとめたものである。講演の機会をいただいた実行委員長の近畿大学・木村隆良先生始め関係各位に深く感謝いたします。また，蛋白質のモルテングロビュール状態に関する研究の創始者・開拓者であり，筆者の恩師でもある東京大学名誉教授・和田昭允先生の卒寿を心よりお祝いし本論文を献呈します。

文　献

1) 有坂文雄, 第 8 章蛋白質の集合, "バイオサイエンスのための蛋白質科学入門", pp.193-216,裳華房 (2004).
2) S. Hirota *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12854-12859 (2010).
3) S. A. Ali *et al.*, *Biophys. J.* **85**, 2606-2618 (2003).
4) M. Goyal *et al.*, *PLoS One*, **9**, e115877 (2014).
5) T. Ikenoue *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 6654-6659 (2014).
6) S. Nakamura *et al.*, *Biochemistry* **56**, 2372-2378 (2017).
7) T. Saotome *et al.*, *Biochemistry* **55**, 4469-4475 (2016).
8) S. Kidokoro, H. Uedaira, and A. Wada, *Biopolymers* **27**, 271-297 (1988).
9) 城所俊一, 熱測定 **14**, 143-153 (1987).
10) S. Kidokoro and S. Nakamura, *Method. Enzymol.* **567**, 391-412 (2016).
11) Y. Kuroda, S. Kidokoro, and A. Wada, *J. Mol. Biol.* **223**, 1139-1153 (1992).
12) M. Ohgushi and A. Wada, *FEBS Lett.* **164**, 21-24 (1983).
13) S. Nakamura and S. Kidokoro, *Biophys. Chem.* **113**, 161-168 (2005).
14) S. Nakamura, T. Baba, and S. Kidokoro, *Biophys. Chem.* **127**, 103-112 (2007).
15) S. Nakamura *et al.*, *Biochemistry* **50**, 3116-3126 (2011).



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