解 説

タンパク質凝集系の熱量測定

神山 匡

近畿大学 理工学部

(受取日:2019年11月9日,受理日:2019年12月12日)

Thermodynamics of Thermal Aggregation of Proteins

Tadashi Kamiyama

Faculty of Science and Engineering, Kindai University

(Received Nov. 9, 2019; Accepted Dec. 12, 2019)

In order to realize the mechanism of aggregate formation of proteins in solution, the thermodynamic properties and state diagram of the thermally induced aggregation of protein at various molar fractions of 1,4-dioxane were determined by DSC, circular dichroism (CD), dynamic light scattering (DLS), and scanning electron microscopy (SEM). In this solution, the transition temperatures of thermal denaturation and aggregation differ significantly, so each transition enthalpy can be easily determined. The transition temperature and enthalpy of protein were significantly dependent on the molar fraction of 1,4-dioxane, incubation time, and scan rate. In this paper, the DSC measurements for protein aggregation are introduced focusing on the recently revealed results for β -lactoglobulin (LG). The secondary structure of LG influenced greatly with dioxane concentration, temperature, and incubation time, resulting the aggregated structure became spherical or amorphous. The enthalpy changes for the thermal aggregation were large negative (exothermic) which may reflect to the aggregation from a supersaturated state of the protein and the interaction between protein molecules.

Keywords: Protein, aggregation, DSC, dioxane, state diagram

1. はじめに

タンパク質はアミノ酸がペプチド結合で連なった高分子 であり、酵素などの球状タンパク質が固有の機能を発現す るために、折れたたんだ固有の規則正しい立体構造を持つ 天然状態を形成することが知られている。天然状態の安定 性は,変性状態などの非天然状態と天然状態のギブズエネ ルギー差で表されるため、タンパク質や基質また水和水な どの溶媒との相互作用(エンタルピー)や自由度(エント ロピー)の変化によってその安定性は大きく影響を受ける。 一般に,水中での天然状態の安定性(変性剤変性との比較) は 20 - 80 kJ mol⁻¹程度であり,温度や圧力, pH,イオン強 度,溶媒の極性などの外的要因によってタンパク質は容易 にその構造と機能を失う。) タンパク質の非天然状態には, 構造が崩壊した変性状態だけでなく、モルテングロビュー ルのような変性中間体,そして,分子間会合によって生じ るアモルファス凝集体やアミロイドーシスなどのタンパク 病を引き起こすアミロイド線維のような凝集体も存在する。 特に、アミロイドのような規則正しい凝集体は多くのタン パク質にも観測されており、モルテングロビュールのよう なタンパク質の基礎構造の一つとして考えられている。2) このような凝集のメカニズムを明らかにすることはタンパ

ク病の予防や治療において重要であると共に、タンパク質 が一次構造からどのように立体構造を形成するのかという 立体構造構築機構の解明においても重要な課題である。

一般にタンパク質の研究において,研究者は凝集を生じ させないことに腐心する。これは、凝集は失活につながる とともに,凝集状態への不可逆的転移による可逆性の減少 は天然状態に関する熱力学量を決定するのに不都合だから である。そのため、pHやイオン強度、タンパク質濃度、温 度など、測定条件に注意することになる。逆に考えると、 DSCなどの熱量測定においてタンパク質の凝集を起こすこ とそのものは容易である。例えば、等電点付近でDSC測定 を行うと、タンパク質分子間の静電的な反発が抑制される ため、熱変性によって溶媒に露出した疎水性部位を介して 分子間会合が起こりやすくなる。この場合、熱変性と凝集 が逐次的に進行し、DSCのシグナルが重なってピーク分離 が困難になるケースも多い。このように、凝集に関する熱 力学量を決定するためには、まず、容易に凝集を形成し、 観測できる条件を選ぶ必要がある。一般的なモデル球状 タンパク質としてよく研究されているリゾチームでは、ジ スルフィド結合の還元に酸性条件を加えることでアミロイ ドを形成することが知られている。3) また, ある種のタン パク質では、アミノ酸置換、pHや高圧下、4) 超音波照射5)が トリガーとなってアミロイドのような凝集が起こることが 報告されている。タンパク質の凝集構造,特に線維状凝集 体の構造についてはNMRやX線結晶構造解析,CDを用いた 研究のが多く行われており,CDの温度依存性より凝集体 崩壊におけるファントホッフエンタルピーも求められてい る。7 しかし,一般に凝集は溶液濃度の減少を伴い分光学 的に定量的な解析が難しくなることもあるため,凝集状態 に関する熱力学的データはあまり多くない。一方,熱測定 や熱分析は凝集に伴う熱をそのまま観測できるため,分光 学的に観測が難しい情報を補完的に得ることができる効果 的な方法となる。近年では,ITCを用いたアミロイド線維凝 集化の熱量測定^{8,9} やDSCを用いた可逆的オリゴマー化の 機構解明¹⁰ など,タンパク質分子間の会合に関する熱量測 定が盛んに進められている。

筆者はこれまでに球状タンパク質であるシトクロム *c* や ミオグロビンについて、タンパク質水溶液に 1,4-ジオキ サンを添加し DSC 測定を行うことにより、加熱がトリガー となって規則正しい線維状や球状の凝集体を形成すること、 熱変性と凝集の転移温度が大きく異なるため各転移エンタ ルピーが容易に決定できることを見いだしてきた。^{11,12)} この系では全てのタンパク質や条件において必ずしも線維 状の凝集体を形成するわけではないが、実験条件がシンプ ルな上、1,4-ジオキサン濃度や温度、保存時間などによって タンパク質の構造が変化し、それに伴って最終的な凝集状 態が変化することが明らかになっており、凝集前の構造と 凝集状態の相関関係を熱力学的、速度論的に明らかにする 上で良いモデル系となる。本稿では、最近明らかになった β ラクトグロブリン (LG) での結果を中心に、DSC を用い たタンパク質の凝集測定について紹介する。

2. 実 験

2.1 DSC 測定

本実験では測定後の洗浄が容易な脱着式セルを有する Micro DSC VII evo (SETARAM)を用いて凝集過程の熱量測 定を行った。走査速度は1K min⁻¹であり,試料溶液は測定 前に5分間脱気している。測定後には,試料溶液を出来る だけ取り除いた後にセルを水でよく洗浄し,8M 尿素水溶 液をセルに満たして30分程度静置することで沈殿した タンパク質の除去を行った。一般に生体分子の熱分析に広 く用いられる固定型セルの DSC は,非常に高精度ではある が,セル内で凝集したタンパク質が詰まってしまうと洗浄 が困難になる恐れがある。脱着型セルの場合,視覚的に洗 浄を確認できる点も良い。1回の測定で用いる試料液量は 約0.7 mL であり,反応熱は装置に付属の解析ソフト CALISTO を用いて,溶液内のタンパク質の物質量あたりの 値として求めた。

2.2 分光測定

タンパク質の研究において円二色性(CD)はタンパク質 の二次構造変化を観測するのに広く利用される。筆者は円 二色性分散計J-820 (JASCO, JAPAN)に温調システム PTC-348WIを接続し、セル長1 mmの石英セルを用いて測定し た。溶液中におけるタンパク質の粒子径は Zetasizer Nano ZSP (Malvern)を用いて動的光散乱法(DLS)により決定 した。凝集したタンパク質は真空乾燥したのち、オスミウ ムでコーティングして走査電子顕微鏡(SEM)S-4800 (HITACHI)を用いて観測した。

2.3 試料調製

ミリQ水で透析したタンパク質水溶液の濃度を吸光度や TG を用いて決定し、目的のモル分率とタンパク質濃度に なるように適量の 1,4-ジオキサンとミリ Q 水を添加して調 製した。DSC 測定と DLS 測定でのタンパク質濃度は 0.5 -1.0 w/v%, CD 測定では 0.03 - 0.05 w/v%である。これらの 凝集実験では溶媒系をシンプルな二成分溶液とするため バッファーは使用していない。pH はタンパク質の物性およ び凝集反応に重要なファクターであり、今後考慮すべき点 である。

3. 結果

3.1 ジオキサンモル分率依存性 ー凝集前構造と凝集の関係-

タンパク質の凝集を観測するためには、凝集しやすい条件を整える必要がある。我々は1,4-ジオキサンを添加する ことにより,比較的容易に再現良く凝集を観測している(他の溶媒については後述する)。ジオキサンの比誘電率は2.2 と低いが、アクセプターとして水素結合能を有するため水 と任意の比率で混合でき、様々な濃度での測定が可能であ る。また、沸点も高いため、100 ℃付近でのDSC 測定も十 分可能である。

Fig.1 は 1,4-ジオキサンのモル分率 (x) を 0 から 0.5 まで 変化させたジオキサン水溶液中における β ラクトグロブリ ン (LG)の DSC 測定の結果である。詳細は後述するが, 調製後の経過時間も凝集に大きな影響を与えるため,これ らの測定はいずれも試料調製から一定時間(1時間以内) で行っている。x=0 (水中)では 75 ℃付近に LG の熱変性 に伴う幅の広い吸熱ピークが観測されている。このとき, DSC 測定前後の溶液は透明であり,凝集に伴う沈殿は観測 されていない。一方, x = 0.01では,95 ℃付近に協同性の 高い発熱ピークが観測され,加熱後の溶液には白い沈殿が



Fig.1 DSC results of β -LG in (1-*x*) water + 1,4-dioxane within 1 hour after sample preparation. The numbers in the figure are mole fractions of 1,4-dioxane.



Fig.2 Photo of β -LG solution after heating in (1-x) water + 1,4-dioxane and its SEM image. (a) x = 0.025, $\times 20k$; (b) x = 0.10, $\times 40k$.

生じていた(Fig.2(a),加熱後の凝集体の例,x=0.025)。凝 集に伴う発熱ピークはx=0.01-0.20にかけて観測されて いるが、0.3以降では現れていない。これは、モル分率の増 加に伴って加熱前から凝集が生じたため、加熱による新た な凝集が生じなかったためである。凝集が生じた試料溶液 を冷却後に再昇温してもピークは観測されず、溶液中の多 くのタンパク質が不可逆的に凝集していると考えられる。 LGの凝集に伴う転移中点温度(T_a)とエンタルピー変化

 $(\Delta H_{\rm a})$ のモル分率依存性を Fig.3 に示す。 $T_{\rm a}$ はx = 0.01-0.05 にかけて指数減少的に低温側に大きくシフトしている が、ΔHaはx=0.03付近に極大を示している。極大よりも低 モル分率側ではおよそ 400 nm 程度の球状の凝集体が形成 されていたが(Fig.2(a)),極大よりも高モル分率側では無 定形 (アモルファス)の凝集体であった (Fig.2(b))。 $\Delta H_a \delta$ 比較すると、アモルファス凝集体(-250 kJ mol⁻¹)への 転移のほうが球状凝集体 (-200 kJ mol-1) への転移よりも 大きかった。このような球状の凝集体はミオグロビンでも 観測されており、同様にΔHaはアモルファス凝集体(-809 kJ mol⁻¹, *T*_a = 76.1℃, *x* = 0.30)のほうが球状凝集体(-565 kJ mol⁻¹, $T_a = 80.1^{\circ}$ C, x = 0.10) よりも大きかった。¹²) これ らの結果は、アモルファス凝集体のほうがタンパク質分子 間の相互作用が多いことを示唆している。このように、モ ル分率の違いによって最終的な凝集体の構造に変化が生じ ることは、凝集形成のプロセスを解明する上でも非常に興 味深い結果である。



Fig.3 Plots of T_a and ΔH_a for thermal aggregation of β -LG in (1-*x*) water + *x*1,4-dioxane.

さて、DSC 測定はマクロな変化を熱力学的情報として得ることができるため、溶液中のタンパク質の構造変化に伴う熱力学量を決定するには有効な手段であるが、タンパク 質の構造そのものの情報を得ることは難しい。そこで、凝 集沈殿前に LG がどのような構造をしているのかを調べる ために、CD スペクトルを測定した(Fig.4(a))。x=0-0.05 では CD スペクトルに大きな変化はないが、x=0.05-0.2 に かけてβシート構造の存在を示すスペクトル形で楕円率強 度が 2 倍近く増加する特異的な変化が観測された。また、 x=0.25 以上では楕円率強度が急激に減少しており、凝集に よるタンパク質濃度の減少が起きたことが示唆される。

Fig.4(b)はモル分率 0.1 における昇温過程の CD スペクト ル変化である。20℃ではβシート構造を示していたスペク トル形が,昇温とともにαヘリックスが多く存在する構造 ヘ転移していることが分かる。CD 測定は DSC 測定に比べ てタンパク質濃度が 1/10 程度低いため,このモル分率での 昇温において凝集による濃度減少は生じておらず,加熱に よる凝集において LG はαヘリックスが多い構造に転移し ながら凝集化していると考えられる。このように,LG の二 次構造はジオキサンのモル分率や温度によって大きく変化



Fig.4 (a) CD spectra of β -LG at 25°C and various mole fraction of 1,4-dioxane. (b) CD spectra of β -LG at various temperatures and x = 0.1.



Fig.5 State diagram of protein in aqueous dioxane solutions. (a) β -lactoglobulin, (b) cytochrome *c* (Ref. 11), (c) myoglobin (Ref. 12). N, Native state; TD, Thermal denatured state; AA, Amorphous aggregated state; SA, Spherical aggregated state; FA, Fibrinous aggregated state; I α , α -rich Intermediate state; I β , β -rich Intermediate state.

しているため、最終的な凝集状態に変化が生じている。こ れらの結果から得られる LG のジオキサン系における状態 図を Fig.5(a)に示す。x=0-0.03 では熱変性に伴う吸熱ピー クも観測されており、天然状態(Native state, N)から熱変 性状態(Thermal Denatured state, TD)を経て, 球状凝集体 (Spherical Aggregated state, SA, Fig.2(a)) へ転移する。一方, x=0.03-0.20 では、熱変性に伴う吸熱ピークが観測されな いため三次構造的には崩壊していると考えられるが、天然 状態よりもβシートが多い状態(β-rich Intermediate state, Iβ) から, α ヘリックスが多い状態 (α-rich Intermediate state, Iα) を経てアモルファス凝集体 (Amorphous Aggregated state, AA, Fig.2(b)) へ転移する。さらに濃度が高いx=0.25以上 では、加熱前に AA 状態へ進行するため昇温による新たな 凝集が生じず、発熱ピークは観測されない。このような状 態図は濃度や転移温度,凝集構造に違いはあるが,シトク ロム c¹¹⁾ やミオグロビン¹²⁾ でも観測されている。シトク ロム c (Fig.5(b)) では, x=0.20-0.30 においてヘリックス が多い状態 (Ia) から加熱によって線維状の凝集体 (Fibrous

Aggregated state, FA) ヘ転移し, x = 0.40 以上では常温にお いて AA 状態へと転移し凝集が生じている。一方、ミオグ ロビン(Fig.5(c))では、x=0.1付近においてヘリックスが 多い状態(Iα)から加熱によって球状凝集体(SA)へ転移 している。x=0.2付近においては、室温でβシートが多い状 態(Iβ)に転移した後,加熱によって AA 状態へ転移して いる。3 つの系に共通して見られることとして、常温で高 モル分率において AA 状態へ転移する,常温で AA 状態へ 転移する前に二次構造が多い構造に転移する,二 二次構造の 多い非天然の構造から SA 状態や FA 状態のような規則正 しい凝集体が形成する、ということが挙げられる。規則正 しい凝集体への転移は限られたモル分率範囲内だけで生じ ており、このような相図はシトクロム c のへキサフルオロ 2 プロパノール (HFIP) 系でも報告されている¹³⁾。ただし, これらの状態図にある多くの転移は不可逆であり、また、 後述するように試料調製からの静置時間やタンパク質濃度 に依存性を示すことから、あくまでこの条件での転移を整 理する意味合いしかない。このように、凝集構造は凝集前 のタンパク質の構造に大きく依存し、その結果、転移温度 や転移エンタルピーが大きく変化することになる。

3.2 時間依存性(短時間)

前節で示したように凝集はその前構造に大きく依存する。 そのため、時間とともにタンパク質の構造が変化する場合、 DSC の結果も大きく影響を受ける。Fig.6 は x = 0.1 におい て,試料調製後に4℃で一定時間静置した後の DSC 測定 の結果である。調製直後は 60 ℃付近に凝集に伴う発熱ピ ークが観測されているが、保存時間が長くなるにつれて発 熱ピークは 46 ℃付近まで低下し、エンタルピー変化も -250 kJ mol⁻¹(1時間後)から-200 kJ mol⁻¹(11時間後)ま で減少している。13時間以上ではピークが観測されなくな っており、これは、加熱前から凝集が進行しているためで ある。このような加熱前の凝集は DLS でも観測されており, 25℃における水中でのLG(天然状態)の粒径は1.8 nm 程 度であるが, x=0.1 で調製後, 1.5 時間で 4.0 nm, 5 時間で 10 nm, 6.5 時間で 18 nm となり, 徐々に溶液が白濁化して いる。この凝集反応の速度定数 k = y0 + Aexp(kt)の式 を用いて求めると、 $k=0.49\pm0.07\,h^{-1}$ であった。ここで、y0=1.4±1.0, A=0.98±0.44 であり, 誤差は非線形最小自乗 法により求めた標準誤差である。一方, x=0.2, 20℃におけ る LG の CD スペクトルの経時変化から, βシート構造が時 間経過とともにわずかに増える転移が観測されている。こ の構造転移の速度定数をy = y0 + Aexp(-kt)の一次反応モ デルで求めると k=3.95±0.43 h⁻¹ であり,1時間程度で転



Fig.6 DSC thermoprofiles of β -LG at x = 0.1. The number is an incubation time at 4 °C after sample preparation.

移が終了する比較的速い反応であった。タンパク質濃度が 異なるため単純な比較は難しいが、時間経過とともにβシ ート構造が増加することによって凝集性が増加し、粒径が 大きくなっていることが示唆される。このように、加熱前 の小さな凝集がシード(種)となって凝集化が進行してい ると思われる。

Fig.7 は各モル分率における転移温度(a)とエンタルピー 変化(b)の保存時間依存性であり、それぞれの傾き(時間依 存性の大きさ)が(c)と(d)である。球状の凝集体に転移する 低モル分率(x<0.03)では転移温度やエンタルピー変化は 時間依存性をほとんど示していないが、x>0.04 では時間と ともに大きく変化し、x>0.1 で変化率はほぼ一定になって いる。前述したように、モル分率の増加とともに加熱前の 凝集が徐々に進行するため、時間経過の影響が大きく現れ てくるものと思われる。このような短い時間での変化はミ オグロビンでも観測されている。¹²⁾ ミオグロビンは, x < 0.10 では大きな時間依存性は見られないが, x = 0.10 - 0.30 では時間とともに転移温度が下がり、その後、高温側にシ フトする変化が観測されている。これは、天然状態では α ヘリックスが多いミオグロビンが、ジオキサンの添加によ ってβシートが多い構造に転移し、その後、時間経過ととも に徐々に凝集とαヘリックス化したためである(一次反応 モデルによる速度定数 $k = 0.20 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$, x = 0.125, 20 °C)。 加熱前に凝集が進行するため、加熱による凝集の転移エン タルピーも大きく変化し, x = 0.2 において, −620 kJ mol⁻¹ (1時間後)から-200 kJ mol-1 (20時間後)まで減少して いる。



Fig.7 Time dependence of T_a (a) and ΔH (b) of β -LG at x = 0.01 - 0.2 and concentration dependence of the slope for T_a (c) and ΔH (d) against time.

3.3 時間依存性(長時間)

前節で示したように、LG はx = 0.1 において、試料調製 からおよそ 12 時間が経過すると、常温で凝集が進行し、昇 温による凝集や発熱が観測されなくなる。これがさらに経 過するとどうなるだろうか。Fig.8 は4 ℃で1-8 日間静置 保存した後の DSC 測定の結果である。1-4 日間静置した 溶液の DSC では、明確なピークは観測されていない。しか し、5 日以降においては、定量的な再現が難しい転移であ ったが、有意な吸熱や発熱ピークが観測されていた。加熱 前後の溶液の状態を比較すると、2 日間の静置では、4 ℃で 白濁した溶液が、加熱によって白い塊が生じていた。一方、 3 日目以降では加熱後に白濁が薄くなり、8 日目では加熱後



Fig.8 DSC thermoprofiles of β -LG at x = 0.1. The number is an incubation time at 4 °C after sample preparation.

にほぼ透明の溶液になった。DLS 測定よりこの透明な溶液 にはおよそ 21 nm の均一な粒子が存在しており,加熱前に 凝集沈殿していた LG が 40 - 50℃付近の吸熱反応で凝集体 が崩壊し,70 ℃以降の発熱反応で小さな粒子への再凝集が 生じたものと思われる。

さて,加熱前のLGの構造はどうなっているのか。Fig.9(a) はx=0.1で試料調製後,4℃において一定時間静置したCD スペクトルである。最初はβシートが多いことを示すスペ クトル形であるが、時間と共に208 nm に負の極大ピーク が現れ、およそ7日後にはαヘリックスを示すスペクトル



Fig.9 (a) CD spectra of LG at x = 0.1 and 20 °C. The day shows an incubation time at 4 °C after sample preparation. (b) CD spectra of LG at x = 0.1 and various temperatures. The incubation time is 0 day.



Fig.10 Temperature dependence of $[\theta]_{222}$ of LG at x = 0.1 after various incubation time.

形に転移している。20℃保存でも同様のスペクトルに転移 しており、一次反応モデルで得られた速度定数は(6.4±2.2) ×10⁻³ h⁻¹ (4 °C) と 0.22 ± 0.05 h⁻¹ (20 °C) であり、前節で 示した短い時間での凝集化と比べると比較的ゆっくりした 転移であった。Fig.9(b)は調製直後のLGを昇温した際のCD スペクトル変化である。強度変化は小さいものの、経時変 化と同じように昇温とともにαヘリックスを示すスペクト ル形に転移していることがわかる。Fig.10 は 0 - 11 日間静 置した後の昇温過程のモル楕円率変化(222 nm)である。 調製直後(0 day) は β シートが多い構造から α ヘリックス が多い構造へ緩やかに転移しているが、調製から7日経過 して α ヘリックスが多い構造に転移した LG は,昇温で強 度減少、降温で強度増加の可逆的変化を示していた。この ように、調製直後はβシートが多く、分子間会合によって 凝集していた LG が、時間とともに α ヘリックスが多い構 造に転移したため、昇温によって凝集状態が再構築された と考えられる。

3.4 その他の影響

ここまで、1,4-ジオキサンを凝集の誘導剤として使用し た系について示してきた。前述したように、筆者らはこれ までに水に可溶で沸点があまり低くない溶媒を選び、ジメ チルスルフォキシド, n-プロパノール, 1,3-ブタンジオール, HFIP, トリフルオロエタノール (TFE) 系について測定を 行ってきた。シトクロム c において各添加溶媒のモル分率 と凝集転移温度を比較すると、1,4-ジオキサン (T_a=83.0 ℃、 x = 0.20), DMSO ($T_a = 96.0$ °C, x = 0.65), PrOH ($T_a = 103$ °C, x=0.8), 1,3-BtOH (Ta=108 ℃, x=0.8) であった。ヘリッ クス誘導剤として知られる TFE (30 wt%) では, LG やミオ グロビン系において加熱による凝集が観測されず,また, HFIP (30 wt%) では加熱前から凝集が生じたため、加熱に よる凝集に伴うピークが観測されなかった。1,4-ジオキサ ン以外の溶媒では, HFIP を除いて高モル分率で高温になら ないと凝集が生じておらず、低い誘電率が凝集誘導の大き な要因と考えられる。ただ、1,4-ジオキサンを用いてもイン シュリンでは凝集体形成は生じておらず、タンパク質の種 類によって二次構造も平均疎水性度も異なるため、影響が 変わるものと思われる。

凝集には昇温速度も影響している。Fig.11(a)と(b)は DMSO水溶液中(x=0.65)と1,4-ジオキサン水溶液中(x= 0.2)におけるシトクロム c の異なる昇温速度での DSC 測 定の結果である。縦軸は熱流束であるため昇温速度が大き



Fig.11 (a) DSC thermoprofiles of cytochrome *c* in DMSO (x = 0.65) and (b) 1,4-dioxane (x = 0.20). The number in the figure is the scan rate (K/min). (c) Plots of T_a and (d) ΔH for the aggregation against the scan rate.

Netsu Sokutei 47 (1) 2020

くなるにつれて見かけ上ピークが大きくなっているが,得られる転移温度(c)やエンタルピー変化(d)も有意に大きく変化している。また,昇温速度が大きいほど転移温度が上がる傾向が見られるが,昇温速度1.2 K min⁻¹では逆に転移温度が低下していることから,凝集速度が昇温速度に比して単純に遅いというだけでなく,凝集構造が変化しているものと思われる。

圧力が凝集に及ぼす影響はどうだろうか。異なる圧力下 において、ジオキサン水溶液中のミオグロビンが凝集する 過程の密度変化を測定した結果、高圧ほど凝集が速くなり、 活性化体積はおよそ (-4.5 ± 1.3) × 10² cm³ mol⁻¹ であっ た。¹²⁾ インターロイキン-1 受容体拮抗蛋白質¹⁴⁾の凝集に おいても活性化体積は (-1.2 ± 0.2) × 10² cm³ mol⁻¹ と見積も られており、このような負の活性化体積は、凝集への活性 化状態が部分的に構造崩壊を起こし、分子内の隙間の減少 や表面積増加に伴う水和量の増加が生じていることを示唆 している。

4. おわりに

本稿では 1,4-ジオキサンの添加によって加熱による凝集 を誘起しやすくしたβラクトブロブリンの DSC 測定を中心 に紹介した。タンパク質の凝集はジオキサン濃度,温度, 静置時間,昇温速度によって大きく変化した。本稿では示 していないが、タンパク質濃度によっても転移温度や転移 エンタルピーは大きく変化しており、昇温過程ではなく降 温過程で凝集が生じる場合もあった。これらの結果は、ジ オキサンの添加によってタンパク質の溶解度が減少し、過 飽和となったタンパク質が凝集状態へ転移することによっ て発熱している可能性を示唆している。特にLG系(Fig.8) の静置5日以降の再現が難しかった理由も過飽和に由来す ると思われる。さらに、ジオキサン濃度や静置時間によっ て凝集前の二次構造が変化するため最終的な凝集構造も変 化しており、凝集に伴うエンタルピー変化の解釈を難しく している。凝集に影響を与える要因が多く、それらの相関 関係も明らかにしていく必要があるであろう。これらの問 題を解決するため、現在、等温熱量計を用いた加熱前の状 態変化に伴う熱量測定を進めている。当初は有機溶媒+水 の二成分溶液中のタンパク質の安定性測定から選択的溶媒 和量の見積もりを目指して始めた研究であったが、気付け ばまったく違う目的地に進んでいる途上である。

謝 辞

本稿の測定の多くは近畿大学共同利用センターの機器を 用いて行いました。この場を借りて御礼申し上げます。

文 献

- 濱口浩三,「改訂 蛋白質機能の分子論」,学会出版センター (1990).
- 2) C. M. Dobson, *Nature* **426**, 884-890 (2003).
- 3) A. Cao, D. Hu, and L. Lai, Protein. Sci. 13, 319-324 (2004).
- 4) T. N. Niraula *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 4089-4093 (2004).
- 5) K. Kakuda et al., Sci. Rep. 9, 6001-6010 (2019).
- T. Lührs et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 102, 17342-17347 (2005).
- 7) K. J. Korshavn et al., J. Biol. Chem. 29, 4638-4650 (2017).
- M. Kinoshita and Y. Lin *et al.*, *Chem. Commun.* 54, 7995-7998 (2018).
- 9) T. Inoue and Y.-H. Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 6654-6659 (2014).

- 10) 城所俊一, 熱測定 46, 17-21 (2019).
- 11) T. Marutani, T. Inomata, and T. Kamiyama, *Thermochim. Acta* **659**, 8-12 (2018).
- 12) T. Marutani, T. Inomata, and T. Kamiyama, 熱測定 45, 63-69 (2018).
- 13) Y. Lin et al., Langmuir 32, 2010-2022 (2016).

神山 匡

14) M. B. Seefeldt et al., Protein Sci. 14, 2258-2266 (2005).



Kamiyama Tadashi E-mail: kamiyama@chem.kindai.ac.jp