

解 説

タンパク質のアンフォールディング

大前 英司

広島大学大学院統合生命科学研究科

(受取日：2021年1月25日，受理日：2021年2月26日)

Unfolding of Proteins

Eiji Ohmae

Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University

(Received Jan. 25, 2021; Accepted Feb. 26, 2021)

Unfolding mechanism of proteins is an old and new problem. In this article, basic mechanism of protein unfolding are explained using the examples of pressure-induced unfolding, denaturant-induced unfolding, and thermal and cold unfolding. Although unfolding of small globular proteins follow two-states, native and unfolded states, it does not mean the existence of only two structures, since the states are determined by intermolecular interactions but the structures are determined by intramolecular ones. Pressure-induced unfolding clarifies important contribution of hydration to the unfolding mechanism of proteins, because pressure affects to total volume of the system. Denaturant-induced unfolding are explained by preferential interactions between protein and denaturant molecules, which mechanism can also explain effects of stabilizers such as salts or sugars although sign of the interactions are inverted. Negative entropy change due to cold unfolding indicates extensive restriction of hydrated water molecules exceed to the increase of protein's conformational chain entropy due to unfolding. Contrary to instinctive images, thermodynamic parameters showed that the folding of several proteins at room temperature raise the randomness of protein solution in the case of cytochrome c, myoglobin, tryptophan synthase α subunit, and human serum albumin.

Keywords: protein unfolding, hydration, intermolecular interaction, structure, state.

1. はじめに

タンパク質は 20 種類のアミノ酸が紐状に重合した高分子であるが、機能を持つタンパク質は、それぞれのアミノ酸配列に基づいた固有の立体構造を持っており、これをタンパク質の「天然構造」と呼んでいる。しかしタンパク質の立体構造は、高温、高圧力、酸・アルカリ・変性剤（尿素や塩酸グアニジン）などの添加により容易に破壊されて紐状に戻り（アンフォールディング）、機能が喪失する（変性）。このことは広く知られているが、そのメカニズムに関しては誤解されているところもある。本稿では、圧力変性、変性剤による変性、熱変性の 3 つを取り上げながら、タンパク質のアンフォールディングのメカニズムを述べるとともに、塩や糖などの安定化剤の効果や、アンフォールディングの逆反応であるフォールディングのメカニズムにも触れる。なおアンフォールドしたタンパク質は漏れなく機能を喪失するが、アンフォールディングを伴わない機能の喪失もあるため、「アンフォールディング」と「変性」は厳密には同じではない。しかし本稿では後者には言及しないので、「アンフォールディング」と「変性」を同義に捉えてもらって構わない。

2. タンパク質の天然構造と天然状態

タンパク質の「天然構造」と「天然状態」は同じものとして扱われることも多いが、両者は全く異なるものである。低分子の有機化合物で考えれば、「構造」と「状態」の違いは明白だろう。例えば Fig.1 に示したように、ベンゼンの「構造」は 6 個の炭素原子が正六角形に結合し、それぞれの炭素原子に 1 個の水素原子が結合したものである。また *n*-ヘキサンの「構造」は、6 個の炭素原子が直鎖状に結合し、両末端の炭素原子に水素原子が 3 個、中間の 4 個の炭素原子それぞれに水素原子 2 個が結合したものである。*n*-オクタンの「構造」は、*n*-ヘキサンの中間の炭素原子が 6 個に増えたものである。

一方、ベンゼンの「状態」は、温度により固体、液体、気体の 3 通りが存在し、単位体積当たりの分子の数が異なる。*n*-ヘキサンの「状態」も、この 3 種である。またベンゼンの場合、分子のとり得るコンフォメーション（立体構造）が 1 種類しかないので、どの「状態」中でも全ての分子が同じコンフォメーションをとっている。一方 *n*-ヘキサンの場合、固体中でのコンフォメーションはエネルギー

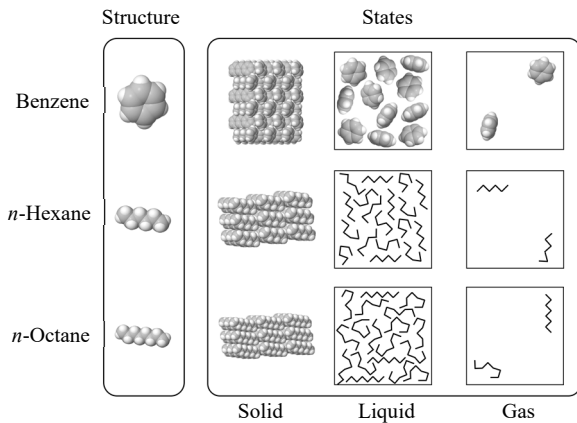


Fig.1 Structures and states of benzene, *n*-hexane, and *n*-octane.

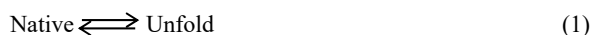
が最低の全トランス型だけになるが、液体および気体中では、C-C結合の回転により様々なコンフォメーションの分子が存在する。鎖長を *n*-ヘプタン、*n*-オクタンと伸ばしていくと、液体や気体中で分子のとり得るコンフォメーションの数は増加するが、「状態」の数は増加しない。

これらのことから分かるように、「構造」は個々の分子の持つ性質であるが、「状態」は多数の分子の集合が持つ巨視的な性質である。また各分子のコンフォメーションは、それぞれの分子が持つエネルギーや分子内の相互作用により変化し得るが、状態は分子間の相互作用によって変化する。

タンパク質の場合はどうだろうか？ベンゼンや *n*-ヘキサンの同じレベルでタンパク質の「構造」を述べるならば、それはタンパク質のアミノ酸配列（一次構造）に相当するだろう。しかし「天然構造」は、タンパク質の機能がその立体構造に由来していることを考えると、X線結晶構造解析やNMRにより決定される立体構造になるだろう。では「天然状態」はどうだろうか？「状態」が多数の分子の集合が持つ巨視的な性質であることを考慮すると、天然構造を持ったタンパク質が溶けた水溶液が「天然状態」になる。

3. 二状態変性

ここでタンパク質のアンフォールド実験の典型的な例を紹介しよう。**Fig.2**は、大腸菌のジヒドロ葉酸還元酵素（分子量18 kDa）の尿素によるアンフォールディングを、主鎖構造を反映する遠紫外円二色性（CD）とトリプトファン側鎖の構造を反映する蛍光重心波長（励起波長290 nm、蛍光波長300–450 nm）で観測したものである。¹⁾この例で示されるように、分子量が20 kDa程度までの比較的小型の球状タンパク質では、アンフォールドが起こる際に分子全体の立体構造が同時に壊れる。この結果は平衡にある2つの状態、「天然状態(Native)」と「アンフォールド状態(Unfold)」、間の転移と考えることができることから、「二状態変性」と呼ばれている。



尿素濃度 c における両状態間の平衡定数を K_c とすると、各尿素濃度下において平衡になっている ($\Delta G_c = 0$ である) ことから、それぞれの尿素濃度でのアンフォールドに伴う Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG_c° を以下の式で算出できる。

$$\Delta G_c^\circ = -RT \ln K_c \quad (2)$$

ここで、 R は気体定数、 T は測定温度である。また、 $^\circ$ (ディグリー) はタンパク質 1 mol 当たりの値であることを示している。

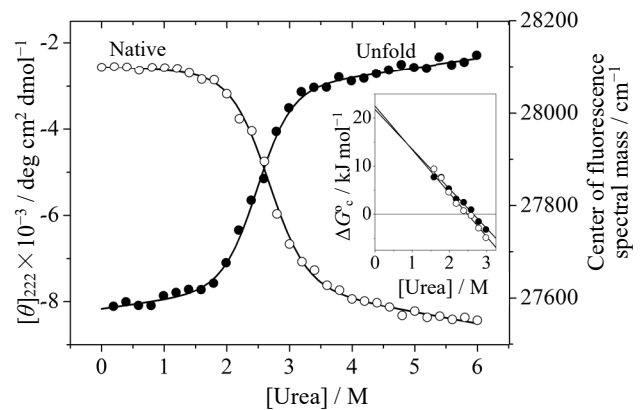


Fig.2 Urea-induced unfolding of dihydrofolate reductase monitored by CD (●) and fluorescence (○) spectra. The inset shows urea-concentration dependence of the Gibbs free energy change due to unfolding.

両状態の存在量が明確である転移領域を用いて ΔG_c° を尿素濃度 c に対してプロットすると、良い直線関係が得られ (**Fig.2 inset**), 以下の式で直線回帰することができる。

$$\Delta G_c^\circ = \Delta G_0^\circ - mc \quad (3)$$

切片の ΔG_0° は、水中において天然状態のタンパク質 1 mol をアンフォールドさせるために必要なエネルギーを表すため、タンパク質の「構造安定性」と呼ばれている。また傾きの m は、アンフォールドの前後でタンパク質と相互作用する尿素分子数の差に関係している。

しかし、この解析において大切なことは「状態」が2つなのであって、「構造」が2つというわけではないことである。したがって ΔG_0° は、天然構造の安定性ではなく、天然状態の安定性を示している。「構造」に関しては、タンパク質は多くの回転可能なC-C結合を持っているため、紐状になったアンフォールド状態において多くのコンフォメーションをとるだけでなく、天然状態においても、エネルギーや分子内の相互作用が異なる複数の構造のアンサンブルになっていることに留意が必要である。そしてこのことは鎖長やアミノ酸配列には依存しない。また、「状態」が分子内相互作用ではなく、分子間相互作用により決定されることにも注意が必要である。タンパク質のアンフォールド実験は、タンパク質分子どうしの相互作用が無視できる（実験結果がタンパク質濃度に依存しない）条件下で行われることから、分子間相互作用のほとんどは、タンパク質分子と溶媒である水分子との間にある。

4. 圧力によるアンフォールディング

タンパク質のアンフォールディングにおける水分子の寄与を理解する上で効果的なのは、圧力によるアンフォールディングである。**Fig.3**はジヒドロ葉酸還元酵素の圧力によるアンフォールディングを、トリプトファンの蛍光を指標にして観測したものである。¹⁾このように、典型的なタンパク質の圧力によるアンフォールディングも二状態変性になり、それぞれの圧力におけるアンフォールドに伴う Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG_p° の圧力依存性は式(3)と同様に直線になる。

$$\Delta G_p^\circ = \Delta G_0^\circ - P\Delta V^\circ \quad (4)$$

ここで、 ΔG_0° は大気圧下における Gibbs 自由エネルギー変化を表している。アンフォールドが起こる圧力は数百 MPa

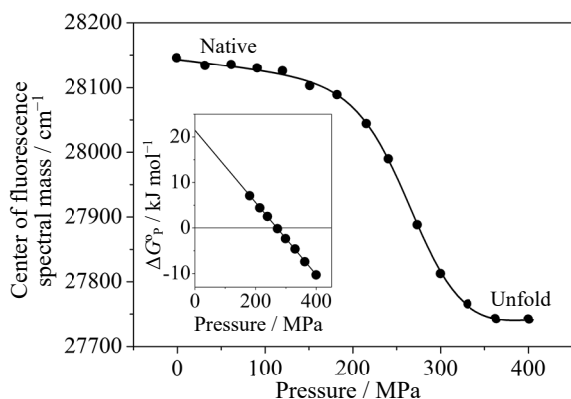


Fig.3 Pressure-induced unfolding of dihydrofolate reductase monitored by fluorescence spectra. The inset shows pressure dependence of the Gibbs free energy change due to unfolding.

(数千気圧)なので、真空 (0 MPa) と大気圧 (0.1 MPa) との差は無視してかまわない。また、 ΔV° はタンパク質のアンフォールドに伴う体積変化であり、この例では $-79 \pm 6 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ である。

タンパク質のアンフォールドに伴う体積変化とはどのようなものだろうか？ル・シャトリエの原理より、平衡にある系を加圧すると体積が減少する方向に平衡はシフトする。圧力によるアンフォールディングの測定では、圧力は系 (タンパク質溶液) 全体にかけられているため、実際に変化するのはタンパク質溶液全体の体積であり、(1)の平衡も、溶液全体の体積が減少する方向にシフトする。

溶液全体の体積 V_t は、どちらの状態でも以下の式で表すことができる。

$$V_t = \sum n_i V_i \quad (5)$$

ここで n_i と V_i は、溶液に含まれる i 番目の成分のモル数と部分モル体積である。したがって、溶液全体の体積変化 ΔV_t は、以下の式で表される。

$$\Delta V_t = \sum n_i^U V_i^U - \sum n_i^N V_i^N \quad (6)$$

ここで上付きの N と U はそれぞれ、天然状態とアンフォールド状態を表している。高圧測定容器は密閉系で物質の出入りがない上に、タンパク質のアンフォールドは化学反応を伴わないため、各成分のモル数 n_i は不変である。したがって式(6)は、以下のように表せる。

$$\Delta V_t = \sum n_i \Delta V_i \quad (7)$$

ここで、 ΔV_i はタンパク質のアンフォールドに伴う各成分の部分モル体積の変化である (Fig.4)。

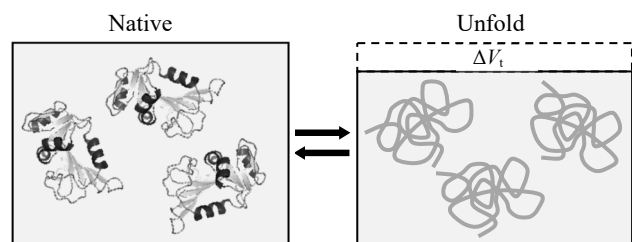


Fig.4 Schematic drawing of volume change due to protein unfolding.

ΔV_i は測定容器の体積に依存した値であり、単位も多くの場合 cm^3 になる。これをタンパク質 1 mol あたりの体積変化に換算するために、溶液に含まれるタンパク質の物質質量 n_p で規格化する。この値が実験的に得られるタンパク質のアンフォールドに伴う体積変化 ΔV° である。

$$\Delta V^\circ = \frac{1}{n_p} \sum n_i \Delta V_i = \Delta V_p^\circ + \sum_{i \neq p} \frac{n_i}{n_p} \Delta V_i \quad (8)$$

ここで、 ΔV_p° はタンパク質自身のアンフォールドに伴う部分モル体積変化である。各成分とタンパク質の物質質量の比 n_i/n_p は、仕込み時における各成分とタンパク質のモル濃度の比 c_i/c_p に置き換えることができるため、以下の式が得られる。

$$\Delta V^\circ = \Delta V_p^\circ + \sum_{i \neq p} \frac{c_i}{c_p} \Delta V_i \quad (9)$$

式(9)は、実験的に得られる ΔV° には、タンパク質自身の部分モル体積変化のみならず、溶液中に存在する他の成分の部分モル体積変化からの寄与も含まれていることを示している。また他の成分からの寄与には、その成分とタンパク質とのモル濃度の比 (c_i/c_p) が、重みとしてかかっていることにも注意が必要である。一般的なアンフォールド実験におけるタンパク質のモル濃度は、NMR 実験で数 mM 程度、蛍光や活性測定などを用いた実験では、数 μM ~ 数 nM 程度であるのに対して、他の成分の濃度はこれらよりもはるかに高く、緩衝剤成分や塩などで数十~数百 mM、水にいたっては 55 M 余りも存在していることに注意が必要である。

ここで話を簡単にするために、最も単純な系、すなわち、タンパク質と水のみを考慮することにしよう。この場合、式(9)は以下のように簡略化できる。

$$\Delta V^\circ = \Delta V_p^\circ + \frac{c_w}{c_p} \Delta V_w \quad (10)$$

ここで c_w と ΔV_w は、水のモル濃度と、タンパク質のアンフォールドに伴う水の部分モル体積変化である。

タンパク質自身の部分モル体積は、タンパク質を構成する原子の体積 V_a と、原子間の空隙 (キャビティー) の体積 V_c とに分けることができる。また水の部分モル体積は、タンパク質と相互作用している水 (水和水) の体積 V_h と、タンパク質と相互作用していない水 (バルク水) の体積 V_b との加重平均である。したがって式(10)は、以下のように表せる。

$$\Delta V^\circ = \Delta V_a^\circ + \Delta V_c^\circ + \frac{c_h}{c_p} \Delta V_h + \frac{c_b}{c_p} \Delta V_b \quad (11)$$

ここで ΔV_a° 、 ΔV_c° 、 ΔV_h 、 ΔV_b は、タンパク質のアンフォールドに伴うそれぞれの成分のモル体積変化であるが、タンパク質を構成する原子の体積はタンパク質の構造には依存しない ($\Delta V_a^\circ=0$) ことから、右辺第 1 項は消去できる。一方、 c_h と c_b は水和水とバルク水のモル濃度であるが、 $c_b^N > c_b^U$ であるため、 c_h と c_b をアンフォールド状態の水和水とバルク水のモル濃度にとれば、バルク水の体積もタンパク質の構造には依存しない ($\Delta V_b=0$) ことから右辺第 4 項も消去できる。したがって、実験的に得られる体積変化 ΔV° は、以下のようにキャビティーと水和水の体積変化のみに帰属される。

$$\Delta V^\circ = \Delta V_c^\circ + \frac{c_h}{c_p} \Delta V_h \quad (12)$$

一見すると式(12)では、 ΔV° がタンパク質濃度 c_p に依存

するように見えるが、 c_p が増加すれば c_h も増加し、 c_h/c_p は一定に保たれる。このとき式(11)に戻って考えると、 $c_w (= c_h+c_b)$ が一定なので、 c_b/c_p が減少することになるが、 ΔV_b がゼロなので、 c_b/c_p の値が変化しても ΔV^o は変化しない。したがって、 ΔV^o はタンパク質濃度や実験手法によらず、一定の値になる。

また、式(12)は Kauzmann が示した水中におけるタンパク質の部分モル体積を表す以下の式²⁾からも、容易に導くことができる。

$$V_p = V_a + V_c + \delta V^o_h \quad (13)$$

ここで、 δV^o_h はタンパク質 1 mol あたり (式(12)では水和水 1 mol あたり) の水和による水の体積変化である。

タンパク質のアンフォールドに伴う体積変化の話が続けてきたが、ここで安定性 (Gibbs エネルギー変化) の話に戻そう。式(9)の両辺に定数として圧力 P を乗じると、以下の式が導出できる。

$$\Delta G^o = \Delta \mu^o_p + \sum_{i \neq p} \frac{c_i}{c_p} \Delta \mu_i \quad (14)$$

ここで、 ΔG^o は実験的に得られるタンパク質のアンフォールドに伴う Gibbs 自由エネルギー変化、 $\Delta \mu^o_p$ および $\Delta \mu_i$ はタンパク質および各成分の化学ポテンシャル変化である。式(14)は、実験的に得られるタンパク質のアンフォールドに伴う Gibbs 自由エネルギー変化には、他の成分からの寄与が含まれていることを明確に示している。

なお式(14)は、自由エネルギーと化学ポテンシャルの関係式

$$G = \sum n_i \mu_i \quad (15)$$

から、 ΔV^o と同様にして導くことも可能である。

5. 変性剤によるアンフォールディングと安定化剤の効果

変性剤によるアンフォールディング (Fig.2) では、圧力の場合と違って、タンパク質溶液中に他の成分が追加される。追加成分による ΔG^o への寄与は、式(14)より以下のように表される。

$$\frac{c_i}{c_p} \Delta \mu_i \quad (16)$$

したがって、タンパク質と比較して追加成分の濃度が非常に高い (c_i/c_p が大きい) 場合、あるいは、天然状態またはアンフォールド状態のどちらかにおいて、追加成分とタンパク質が特異的に相互作用する ($\Delta \mu_i$ が大きい) 場合には、追加成分の寄与により ΔG^o が大きく変化することになる。前者が尿素や塩酸グアニジンなどの変性剤や、塩や糖類などの安定化剤を加えた場合に相当し、後者が酵素基質や補因子など、それぞれのタンパク質に特異的なりガンドを加えた場合に相当することは、容易に想像できるだろう。

$\Delta \mu_i=0$ の場合には追加成分による ΔG^o の変化はないが、変性剤や安定化剤のようにタンパク質との特異的な相互作用がない場合でも、追加成分とタンパク質の間に若干の親和性 (正の相互作用) があると、Fig.5A のように水和水中の追加成分の濃度がバルク水中よりも高くなる。逆に追加成分とタンパク質の間に若干の反発 (負の相互作用) があると、Fig.5B のように水和水中の追加成分の濃度がバルク水中よりも低くなる。前者を選択的結合、後者を選択的疎外と呼び、両者を合わせて選択的相互作用と呼ぶ。³⁾

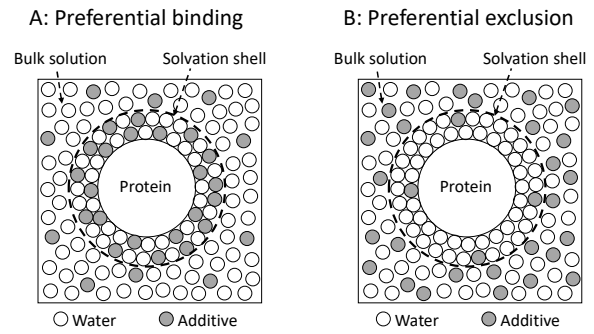


Fig.5 Schematic drawings of preferential interactions. (A) Preferential binding of additive molecules to protein. (B) Preferential exclusion of additive molecules from protein.

水中よりも低くなる。前者を選択的結合、後者を選択的疎外と呼び、両者を合わせて選択的相互作用と呼ぶ。³⁾

変性剤はタンパク質と選択的に結合する物質である。このため、変性剤存在下では天然状態が安定化されて、系の自由エネルギーが減少する。しかしタンパク質がアンフォールドすると溶媒接触表面積が増加し、タンパク質と相互作用する変性剤分子の量も増加する。このため、アンフォールド状態は天然状態よりも更に安定化され、系の自由エネルギーも大きく減少する。その結果、アンフォールド状態の方が天然状態よりも安定に (系の自由エネルギーが小さく) なり、両状態間の自由エネルギー変化 (ΔG^o) が負になってアンフォールドが起こる (Fig.6 左)。

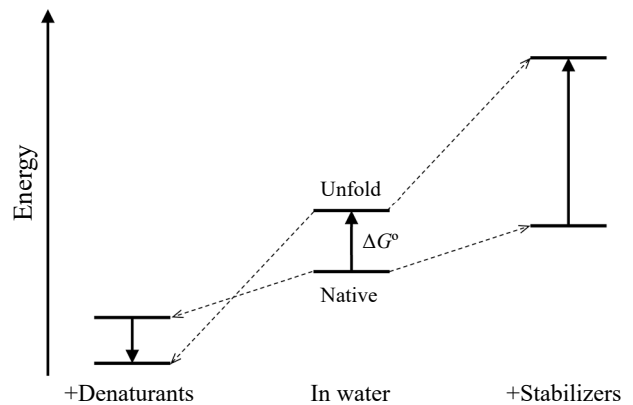


Fig.6 Change of energy levels of native and unfold proteins induced by the addition of denaturants or stabilizers.

逆に塩や糖などの安定化剤は、タンパク質に選択的に疎外される。その結果、系の自由エネルギーは増加して天然状態は不安定化するが、アンフォールド状態はより大きく不安定化されるため、 ΔG^o が増加して、安定化剤非存在下よりもアンフォールドは起こり難くなる (Fig.6 右)。

「タンパク質を安定化させる物質が変性剤で、不安定化させる物質が安定化剤」というのは矛盾しているように思われるかもしれないが、これは尿素や塩酸グアニジンがタンパク質の溶解度を増加させ、塩がタンパク質の溶解度を低下させることを考えれば、適切な解釈とわかるだろう。また塩による安定化効果が Hofmeister 系列に従うことも、Hofmeister 系列が元々塩析作用の強さを表していることを考慮すると、当然の結果と言える。

6. 熱および低温によるアンフォールディング

ジヒドロ葉酸還元酵素の熱によるアンフォールディングは三状態変性になる⁴⁾ため、ここでは1 mM 塩酸中においてウマ由来チトクローム *c* の熱によるアンフォールディングを可視吸収で観測したものを示す (Fig.7 inset)。熱によるアンフォールディングでは、温度 T におけるアンフォールドに伴う Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG°_T は以下の式で表される。

$$\Delta G^\circ_T = \Delta H^\circ_T - T\Delta S^\circ_T \quad (17)$$

ここで、 ΔH°_T および ΔS°_T はアンフォールドに伴うエンタルピーおよびエントロピーの変化である。タンパク質のアンフォールドは立体構造の破壊に伴う大きな構造エントロピーの増加をもたらすため、室温から温度を上昇させていって $T\Delta S^\circ_T$ が ΔH°_T を凌駕するようになるとアンフォールドが誘起される。

ΔH°_T および ΔS°_T が温度に依存しないならば、 ΔG°_T の温度依存性 ((17)式) は直線になるが、実験的には ΔG°_T の温度依存性は上に凸の曲線になる。このため、 ΔH°_T および ΔS°_T の温度依存性として以下の式を導入する。

$$\Delta H^\circ_T = \Delta H^\circ_m + \Delta C_p^\circ (T - T_m) \quad (18)$$

$$\Delta S^\circ_T = \frac{\Delta H^\circ_m}{T_m} + \Delta C_p^\circ \ln \frac{T}{T_m} \quad (19)$$

ここで、 T_m は変性中点の温度、 ΔH°_m は温度 T_m におけるアンフォールドに伴うエンタルピー変化である。また ΔC_p° はアンフォールドに伴う熱容量変化であるが、その温度依存性は、多くのタンパク質では無視できるほどに小さい。

これらの式を用いて測定結果を解析すると、Fig.7 に示したように ΔH°_T および $T\Delta S^\circ_T$ の温度依存性は極めて大きく、タンパク質の天然構造は両者の極わずかな差により形成されていることがわかる。

また ΔH°_T の温度依存性が右上がりであることは、 ΔC_p° が正であることを示しているが、これはアンフォールドに伴い露出される疎水性側鎖に水和する水分子が、バルクの水分子よりも強固な水素結合ネットワークを形成するためと考えられている。

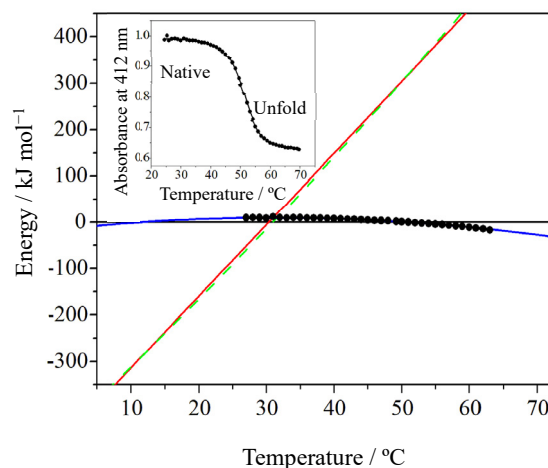


Fig.7 Temperature dependence of the Gibbs free energy change due to thermal unfolding of cytochrome *c*. Lines indicate temperature dependence of the ΔG°_T (blue), ΔH°_T (red), and $T\Delta S^\circ_T$ (dashed green) calculated from thermodynamic parameters. The inset shows change of visible absorption at 412 nm due to unfolding.

一方、 $T\Delta S^\circ_T$ の温度依存性は下に凸の曲線になっているため、 ΔH°_T と $T\Delta S^\circ_T$ は 2 点で交差する。したがって、タンパク質は冷却した場合にもアンフォールドすることになる。低温によるアンフォールディングのメカニズムはどのように考えられるだろうか？ ΔH°_T が負になっていることから、アンフォールディングに伴い発熱が起こることがわかる。これは低温下ではタンパク質分子内の水素結合や疎水性相互作用を破壊するのに必要なエネルギーが、タンパク質と水分子間の水素結合の形成や、アンフォールドにより露出した疎水性側鎖に水和した水分子間の水素結合の形成により十分に補えることを示している。また $T\Delta S^\circ_T$ も負になっており、 ΔS°_T が負になることを示している。タンパク質自身のコンフォメーションエントロピーはアンフォールディングにより大きく増加するので、 ΔS°_T の減少はアンフォールディングに伴い新たに水和した水分子がもたらし

Table 1 Thermodynamic parameters of several proteins at their midpoint of thermal unfolding and 25 °C.

Protein	pH	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H^\circ_m / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta C_p^\circ / \text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$\Delta S^\circ_m / \text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$\Delta H^\circ_{25} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ_{25} / \text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$\Delta G^\circ_{25} / \text{kJ mol}^{-1}$
Cytochrome <i>c</i>	3.0	50.7 ± 0.1	314 ± 7	15.4 ± 1.5	1.4 ± 0.0	-82 ± 8	-0.3 ± 0.0	9 ± 1
Lysozyme ⁵⁾	2.7	65.6 ± 0.1	478 ± 1	6.6 ± 0.7	1.4 ± 0.0	210 ± 22	0.6 ± 0.0	41 ± 4
RNase T1 ⁶⁾	7.0	48.9 ± 0.1	400 ± 4	5.6 ± 0.6	1.2 ± 0.0	266 ± 29	0.8 ± 0.0	25 ± 3
Myoglobin ⁷⁾	11.0	76.5	494	11.7	1.4	-109	-0.5	26
Staphylococcal nuclease ⁸⁾	7.0	51.5	328	9.2	1.0	84	0.2	17
Tryptophan synthase α subunit ⁹⁾	9.0	53.7 ± 0.9	394 ± 29	20.1 ± 1.7	1.2 ± 0.1	-183 ± 21	-0.6 ± 0.1	8 ± 1
α -Lactalbumin ¹⁰⁾	4.2	57	271 ± 14	6.8 ± 0.7	0.8 ± 0.0	53 ± 6	0.1 ± 0.1	15 ± 2
Human serum albumin ¹¹⁾	7.4	63.2 ± 0.4	372 ± 19	16.3 ± 1.7	1.1 ± 0.1	-251 ± 29	-0.9 ± 0.1	5 ± 1
RNase A ¹²⁾	6.0	63.7 ± 0.2	477 ± 33	5.4 ± 0.4	1.4 ± 0.1	268 ± 27	0.8 ± 0.1	42 ± 5
Ubiquitin ¹³⁾	3.0	59.3	203	3.4	0.6	86	0.2	15
Carbonic anhydrase II ¹⁴⁾	7.0	64.0 ± 0.2	795 ± 84	15.9 ± 1.7	2.4 ± 0.3	175 ± 26	0.4 ± 0.1	55 ± 10

ている。タンパク質が低温でアンフォールドするという事実も、タンパク質の安定性に水和水が大きく寄与していることを示している。

タンパク質の室温におけるフォールディング（天然構造の形成）は、アンフォールディングの逆反応であるから、 ΔH°_T と ΔS°_T の符号を逆にすれば良い。Table 1に幾つかのタンパク質のアンフォールドに伴う ΔH°_{25} 、 ΔS°_{25} 、および ΔG°_{25} を示した。Table 1を見ると、チトクローム *c*、ミオグロビン、トリプトファンシンターゼ α サブユニット、ヒト血清アルブミンなどではアンフォールドに伴う ΔS°_{25} が負になっており、室温でもフォールディングに伴って系のエントロピーが増加することがわかる。これらのタンパク質では素朴なイメージとは反対に、室温でのフォールディングは系の乱雑さが増加する反応なのである。



大前 英司
Eiji Ohmae
E-mail: ohmae@hiroshima-u.ac.jp

7. おわりに

以上で見てきたように、① タンパク質のアンフォールディングは状態の転移であること、② 状態を決定するのは分子内相互作用ではなく分子間相互作用であること、③ タンパク質溶液内の分子間相互作用はタンパク質と水や他の追加成分との間にあること、の3つの理由により、タンパク質のアンフォールディングやフォールディングでは、タンパク質と水や追加成分との相互作用が極めて重要である。

本稿では簡略化のために二状態変性のみ絞って述べたが、中間体を含むような三状態以上の変性でも、状態間の転移である以上、分子間相互作用が重要であることに変わりはない。異なる生物に由来する相同タンパク質の安定性の違いを、結晶構造に基づいた分子内水素結合の数などで説明する際には、十分な注意が必要だろう。

文 献

- 1) E. Ohmae, C. Murakami, S. Tate, K. Gekko, K. Hata, K. Akasaka, and C. Kato, *Biochim Biophys Acta* **1824**, 511–519 (2012).
- 2) W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **14**, 1–63 (1959).
- 3) 月向邦彦, 化学と生物 **22**, 466–471 (1984).
- 4) E. Ohmae, T. Kurumiya, S. Makino, and K. Gekko, *J. Biochem.* **120**, 946–953 (2010).
- 5) K. Masumoto, T. Ueda, H. Motoshima, and T. Imoto, *Protein Eng.* **13**, 691–695 (2000).
- 6) C. Q. Hu, J. M. Sturtevant, J. A. Thomson, R. E. Erickson, and C. N. Pace, *Biochemistry* **31**, 4876–4882 (1992).
- 7) L. Lin, R. J. Pinker, and N. R. Kallenbach, *Biochemistry* **32**, 12638–12643 (1993).
- 8) A. Tanaka, J. Flanagan, and J. M. Sturtevant, *Protein Sci.* **2**, 567–576 (1993).
- 9) K. Hiraga and K. Yutani, *Protein Eng.* **9**, 425–431 (1996).
- 10) Y. V. Griko, E. Freire, and P. L. Privalov, *Biochemistry* **33**, 1889–1899 (1994).
- 11) B. Farruggia and G. A. Picó, *Int J Biol Macromol.* **26**, 317–323 (1999).
- 12) Neira JL, Sevilla P, Menéndez M, Bruix M, Rico M, *J Mol Biol.* **285**, 627–643 (1999).
- 13) Thomas ST, Makhatadze GI, *Biochemistry* **39**, 10275–10283 (2000).
- 14) D. Matulis, J. K. Kranz, F. R. Salemme, and M. J. Todd, *Biochemistry* **44**, 5258–5266 (2005).