

## 解 説

## タンパク質の熱力学的安定性と圧力変性

加藤 稔<sup>a</sup>, 山本 翼<sup>b</sup><sup>a</sup>立命館大学 生命科学部 応用化学科<sup>b</sup>立命館大学 総合科学技術研究機構

(受取日: 2023年1月9日, 受理日: 2023年1月16日)

## Thermodynamic Stability and Pressure Denaturation of Proteins

Minoru Kato<sup>a</sup> and Tsubasa Yamamoto<sup>b</sup><sup>a</sup>Department of Applied Chemistry, College of Life Sciences, Ritsumeikan University<sup>b</sup>Research Organization of Science and Technology, Ritsumeikan University

(Received Jan. 9, 2023; Accepted Jan. 16, 2023)

Despite the fact that proteins are important molecules involved in almost all life phenomena, the principles of thermodynamic stability, the most fundamental topic of protein research, have not been elucidated. In this review, we first describe the thermodynamic properties of temperature-dependent denaturation (thermal and cold denaturation) and outline the generally accepted model of the denaturation mechanism (Kauzmann model). Then, the thermodynamic properties of pressure denaturation and the pressure dependence of the Gibbs energy of dissolution of hydrocarbons in water are presented. Comparison of these shows that the Kauzmann model cannot explain pressure denaturation of proteins. Since Gibbs free energy is a function of temperature and pressure, a correct denaturation model must be able to account for both temperature and pressure denaturation without contradiction. The temperature-pressure axial energy landscape of denaturation is essential for constructing a true model. Finally, we describe some recent theoretical and experimental studies on pressure denaturation mechanisms that have been very influential in this research field.

Keywords: protein stability, pressure denaturation, temperature-pressure axis energy landscape of denaturation, denaturation mechanism

## 1. はじめに

タンパク質は生命のほとんどの機能を担う分子であり、生命現象の本質的な解明にはタンパク質分子の理解が不可欠である。タンパク質の生理的機能の発現には、アミノ酸配列に紐づけられた固有の立体構造（天然構造）の形成が必要である。この天然構造は、一般に、わずかな熱力学的安定性によって保たれており、溶液および熱力学的環境（pH, 溶媒組成, 温度, 圧力など）の変化によって、変性構造へ変化し、機能を失う。<sup>1)</sup> このわずかな熱力学的安定性を起源とするタンパク質分子の構造揺らぎが、材料系分子とは異なる生体系特有の精巧な機能を生み出す。一方、この不安定な構造は、神経変性疾患の原因となるアミロイド凝集や抗体薬の製造・管理で問題となるアモルファス凝集などの誘因でもある。

水溶性球状タンパク質の変性反応は基本的に可逆的であり、天然状態と変性状態の2状態の化学平衡として取り扱うことができる。したがって、タンパク質の熱力学的安定性を理解することは、天然状態と変性状態間のギブズエネルギー差（変性の標準ギブズエネルギー $\Delta G^\circ$ ）の分子論的起源を解明することに他ならない。一般に生理的な条件下では、 $\Delta G^\circ = 20 \sim 50 \text{ kJ mol}^{-1}$ 程度である。この値は水素結合

の結合エネルギー数個程度（水の気化熱に占める水素結合エネルギーの寄与は約  $16 \text{ kJ mol}^{-1}$ ）の大きさであり、タンパク質が分子内・分子間で膨大な相互作用点を持つことを考えると、この値は驚くほど小さくバランスされたものである。<sup>1)</sup> この小さな安定化エネルギーは、タンパク質がその生物にとって都合のよい生理的条件下で機能できるように自然界が進化を通して設計したものである。人類はこの設計原理を解き明かすことはできるか。<sup>1)</sup> これは生物科学の長きにわたる大問題の一つである。熱測定をはじめとする熱力学的アプローチ、様々な分光法、分子シミュレーションなどその時代の様々な実験、理論研究が行われ、いくつかのモデルが提案されてきたが、最終的には変性の熱力学を矛盾なく説明するものではなくてはならない。

平衡状態を決定するギブズエネルギーの基本的な状態パラメータは温度と圧力である。本解説記事では、初めに温度に依存する変性（熱変性と低温変性）の熱力学的特徴と変性機構モデルを概説する。続いて本記事の主題である圧力変性の特徴を紹介する。その中で温度変性研究から得られた変性モデルが圧力変性を説明するときに破綻することを示す。最後に最近の圧力変性機能に関するトピックスを紹介する。

## 2. 温度変性の熱力学的特徴

タンパク質の変性反応の平衡定数  $K$  を  $[D]/[N]$  ( $[D]$ : 変性状態の濃度,  $[N]$ : 天然状態の濃度) と表したとき, 変性の標準反応ギブズエネルギー  $\Delta G^\circ$  は,

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (1)$$

で与えられる。平衡定数の決定には紫外可視吸収分光, 蛍光分光, 円偏光二色性(CD)分光, FTIR 法, NMR 法などの分光法がしばしば用いられるが, 2 次の熱力学量である  $\Delta C_p$  の決定には熱測定が最も有効な実験法である。多くの実験から  $\Delta G^\circ(T)$  は, 室温付近ではわずかに正の極大値をとり, 温度上昇または温度減少により負の値をとる (熱変性あるいは低温変性する)。 $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$  であることから,  $\Delta G^\circ$  の温度依存性は, 以下の式が示すように,  $\Delta H^\circ$  および  $T\Delta S^\circ$  の温度依存性, さらに, 定圧熱容量変化  $\Delta C_p$  に決定づけられることとなる。

$$\begin{aligned} \Delta G^\circ(T) &= \Delta H^\circ(T) - T\Delta S^\circ(T) \\ &= \Delta H^\circ(T_0) + \Delta C_p(T - T_0) - T \left( \Delta S(T_0) + \Delta C_p \ln \frac{T}{T_0} \right) \\ &= \Delta G^\circ(T_0) - \Delta S^\circ(T)(T - T_0) - \Delta C_p \left( T \left( \ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right) \quad (2) \end{aligned}$$

ここで,  $T_0$  は参照温度を表す。様々なタンパク質の熱測定実験から, 変性の  $\Delta C_p$  が正値をとることが示されている。<sup>2)</sup> また,  $\partial^2 \Delta G^\circ / \partial T^2 = -\Delta C_p / T$  であることから, 正の  $\Delta C_p$  は,  $\Delta G^\circ(T)$  が温度に対して極大値を持つことを意味し, タンパク質の熱変性および低温変性を引き起こすことになる。<sup>2,3)</sup>

Fig.1(a) に典型的な球状タンパク質である Ribonuclease A<sup>3)</sup> の  $\Delta G^\circ(T)$ ,  $\Delta H^\circ(T)$  および  $T\Delta S^\circ(T)$  の温度依存性を示した。温度に対して  $\Delta H^\circ(T)$  と  $T\Delta S^\circ(T)$  の傾きはともに正の値を持ち, それらの値のわずかな差 (補償関係) によって  $\Delta G^\circ(T)$  の温度依存性が決定されているのがわかる。変性に伴い, タンパク質内部のアミノ酸残基は溶媒側に露出する。タンパク質内部の分子内相互作用には, 分散相互作用, 分散力を除く van der Waals 相互作用, 水素結合, クーロン相互作用など様々な相互作用が働いている。変性に伴うこれらの相互作用の変化が変性の熱力学量に反映される。これらの相互作用の中で, 最も大きく寄与している効果は, タンパク質内部の疎水性アミノ酸残基が水に露出することによる, 疎水性側鎖間の分散相互作用の消失と疎水性水和の形成によるものであることが知られている。<sup>5-8)</sup>

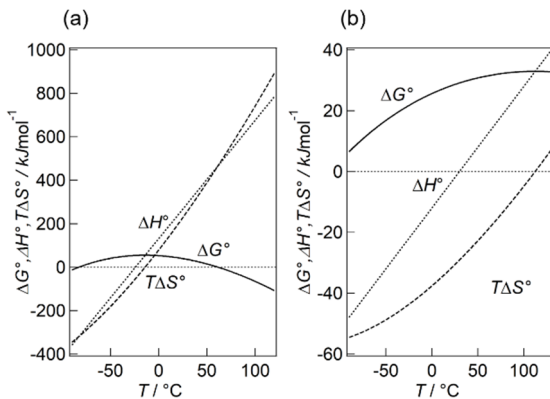


Fig.1 Temperature dependence of the thermodynamic functions for (a) the denaturation reaction of ribonuclease A, and (b) transfer of pentane of liquid pentane to water. The curves in (a) are calculated using data from Ref. 3; those in (b) are calculated using data in Ref. 4.

Fig.1(b) は, 液体ペンタンの水への溶解に伴う熱力学量変化<sup>4)</sup>を温度に対してプロットのものである。 $\Delta H^\circ(T)$  と  $T\Delta S^\circ(T)$  の温度依存性 (正の傾き) は (a), (b) ともに類似している。

(一方, 極性基であるペプチド結合部位-CONH-の  $\Delta H^\circ(T)$  および  $T\Delta S^\circ(T)$  の温度依存性は逆の傾きを示す。) タンパク質の  $\Delta H^\circ(T)$  と  $T\Delta S^\circ(T)$  との差はペンタンと比べて小さいが, これは変性 (アンフォールド) に伴うコンフォメーションの自由度 (鎖エントロピー) の増大で説明できる。さらに, 正の  $\Delta C_p$  は水中での疎水性化合物/疎水基周りでの疎水性水和の形成と一致する。

以上のことから, タンパク質の温度変性のモデルとして, 「炭化水素の水への移相モデル」が有効であることがわかる。炭化水素移相モデル (Kauzmann モデル) は 1959 年に Kauzmann<sup>5)</sup> によって提案された。フォールドしたタンパク質のパッキング率は液体炭化水素より有意に高いため定量的理解には修正が必要であるが,<sup>6-8)</sup> 「タンパク質の天然構造の形成はミセルや 2 分子膜の形成と同様の効果が主な駆動力となっている」という描像は現在広く受け入れられている。しかしながら, 炭化水素移相モデルを圧力変性の熱力学 (第 3 節で解説) にも当てはめて検討してみると, タンパク質構造安定化 (変性) 機構がそれほど単純でないことがわかる。

## 3. 圧力変性の熱力学的特徴

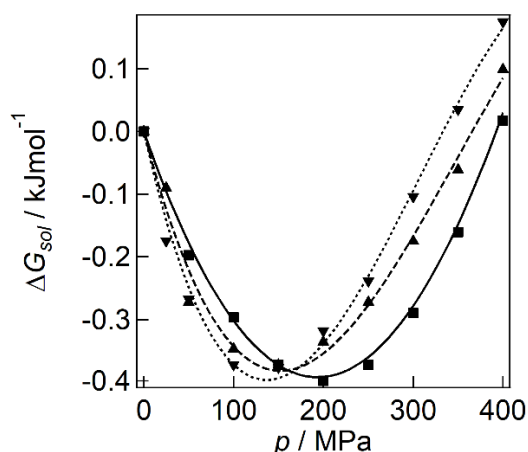
多くのタンパク質は一般に 400~600 MPa の圧力で変性する。<sup>9)</sup> 温度変性と同様に圧力変性の熱力学を整理すると,  $\Delta G^\circ$  の圧力依存性は次式で与えられる:

$$\Delta G^\circ(p) = \Delta G^\circ(p_0) + \Delta V^\circ(p - p_0) + \frac{\Delta \beta_T}{2}(p - p_0)^2 \quad (3)$$

ここで,  $p_0$  は参照圧力,  $\Delta V^\circ$  は部分モル体積差,  $\Delta \beta_T$  は  $\Delta V^\circ$  の圧力偏微分係数 (一等温圧縮率差 × 部分モル体積) である。 $\Delta G^\circ$  の圧力依存性, すなわち, それを支配する  $\Delta V^\circ$  および  $\Delta \beta_T$  を決定するには,  $\Delta G^\circ$  の値を圧力可変で測定する必要があるが, 温度可変測定に比べて実験方法は非常に限られる。高圧力下でのタンパク質の熱測定はこれまで報告例はない。変性の分光測定によく使われる遠紫外 CD 分光法は高圧力下での窓材の偏光特性の変化によって定量測定ができない。エネルギー分解能が高い NMR 法はタンパク質の構造解析に優れているが, 最大圧力が 300 MPa 程度であり, 限られた溶液条件下で測定が行われてきた。 $\Delta G^\circ$  の圧力依存性の決定の多くは UV 吸収分光, 蛍光法, FT-IR 法, NMR 法によって行われてきた。<sup>9)</sup>

これまでの実験結果から多くのタンパク質の  $\Delta V^\circ$  は  $-30 \sim -100 \text{ ml mol}^{-1}$  を示し,<sup>9)</sup>  $\Delta \beta_T$  の報告例は少ないが, 0 または小さい負の値をとる。<sup>10)</sup> これらの圧力に対する応答関数である熱力学量は, 温度に対する熱力学量と同様に, 炭化水素移相モデルで説明できるだろうか。前節と同様に疎水性化合物の溶解ギブズエネルギーとタンパク質の変性のギブズエネルギーの圧力依存性を比較してみる。

Fig.2 に疎水性化合物 (alkylbenzenes) の水への溶解ギブズエネルギーの圧力依存性<sup>11)</sup>を示した。縦軸の値は 0.1 MPa における溶解ギブズエネルギーを基準として, そこからの加圧による変化量を表している。圧力増加に伴い, 溶解ギブズエネルギーは減少し, 150~200 MPa 付近に極小を示し増加に転じる。これをタンパク質の構造安定性に当てはめると, 圧力増加に伴い不安定化 (変性) が促進され, 150~200 MPa 付近を境に, 安定化 (構造回復) へ向かうことになる。一方, 実際のタンパク質の挙動は, 圧力の増加に伴い,  $\Delta V^\circ$  はより大きな負の値 (変性がより促進) をとる。タンパク質の圧力変性は炭化水素移相の圧力挙動とは全く



**Fig.2** Pressure dependence of the relative Gibbs energy to the value at 0.1 MPa, for transfer of alkylbenzenes of the liquids to water at 25 °C: ■, toluene; ▲, ethylbenzene; ▼, n-propylbenzene. The plots and curves are calculated using data in Ref 11.

逆の傾向である。温度変性で有効であった炭化水素移相モデルは、圧力変性ではもろくも破綻した。このことは Kauzmann 自身が既に予想していたことでもある。<sup>12)</sup> 今回、具体的なデータを用いて解説した。

#### 4. 温度・圧力軸エネルギー地形

第2および第3節では、それぞれ変性のギブズエネルギー $\Delta G^\circ$ の温度依存性と圧力依存性の特徴を概説し、第3節で温度依存性から導かれた温度変性モデル（炭化水素移相モデル）が圧力変性の熱力学挙動と一致しないという問題を指摘した。系の状態を決定するギブズエネルギーの熱力学変数が温度と圧力であることを考えると、炭化水素移相モデルは根本的な欠陥を抱えている。温度と圧力応答を分けて $\Delta G^\circ(T, p)$ としてとらえ、タンパク質の温度・圧力応答を統合的に説明するモデルが真のモデルといえよう。

式(2)と式(3)を基に、 $\Delta G^\circ(T, p)$ へ応用すると、式(4)が得られる。

$$\begin{aligned} \Delta G^\circ(T, p) &= \Delta G^\circ(T_0) - \Delta S^\circ(T)(T - T_0) \\ &- \Delta C_p \left( T \left( \ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right) + \Delta V^\circ(p - p_0) + \frac{\Delta \beta_T}{2} (p - p_0)^2 \\ &+ \Delta \alpha (T - T_0)(p - p_0) \end{aligned} \quad (4)$$

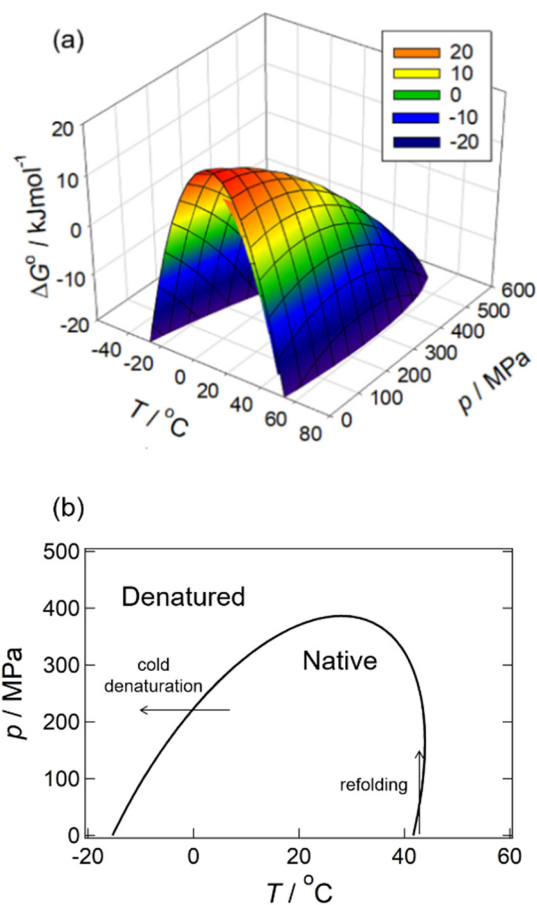
ここで、 $\Delta \alpha$ は $\Delta V^\circ$ の温度偏微分係数であり、その他の物理量は前述の通りである。この式の偏微分係数である変性の熱力学量がすべてがわかっているならば、タンパク質の安定化ギブズエネルギーが温度・圧力軸で決定できることになる。逆に、様々な温度・圧力での平衡定数を実験的に得ることができれば、式(4)による回帰分析によって様々な変性の熱力学量を求めることができる。式(4)は構造安定性に関する包括的熱力学方程式といえる。

1970年 Hawley<sup>10)</sup>は、Ribonuclease A と $\alpha$ -Chymotrypsinogenの温度・圧力可変紫外吸収実験から得られた $\Delta G^\circ(T, p)$ 値に対して、初めて式(4)を用いた回帰解析を行った。1970年代では、 $\Delta G^\circ$ の1階微分量（特に $\Delta V^\circ$ ）を得ることさえも容易ではなかったが、2階微分量を得ることに成功した。現在においても $\Delta \beta_T$ の決定はこの方法以外に有効な方法はない。Hawleyが算出した熱力学量を用いて、式(4)で表された $G^\circ(T, p)$ を3次元グラフにしたものをFig.3(a)に示した。このエネルギー曲面は、変性の温度・圧力を表すエネルギー地形である。この地形の任意の点での傾き・曲率から、任

意の温度・圧力での式(4)中のすべての熱力学量を算出することができる。このように温度・圧力軸エネルギー地形は構造安定性に関する完全な熱力学的記述を提供する。このエネルギー地形を $\Delta G^\circ(T, p) = 0$ となる面で切断した断面図（曲線）を描くと、Fig.3(b)が得られる。曲線の内側は天然構造が、外側は変性構造がより安定な領域となり、“天然状態-変性状態相図”と呼ばれている。低温領域の曲線から低温変性が起こることが予測される（矢印←）。また、熱変性領域（常圧）では曲線が正の傾きを持っているため、常圧で40 °Cを少し超えた変性状態から加圧するとリフォールドすることも予測される（矢印↑）。このように変性のエネルギー地形および相図から、タンパク質の安定性に関わる熱力学量の算出、さらには、観測困難な領域での現象を予測することも可能となる。

#### 5. 圧力変性機構

第2節および第3節ではタンパク質変性の熱力学量を用いて、それぞれ、温度変性と圧力変性の特徴を比較した。現状では、それらを統一的に説明できるモデルがないこと説明した。統一モデルの構築には第4節で紹介した温度・圧力軸エネルギー地形に基づくモデルの検証が必要であろう。しかしながら、これまでに実験的に決定できたエネルギー地形図は極めて少ない。エネルギー地形図を得るには、常温・常圧から変性温度・圧力を超える広い温度・圧力領域での多くの点での平衡定数の決定が必要である。特に圧力軸では多くのタンパク質で1 GPa程度までのデータを必要とするため、必要なデータが揃えることは容易ではない。



**Fig.3** (a)  $\Delta G^\circ(T, p)$  landscape and (b) phase diagram of denaturation for  $\alpha$ -chymotrypsinogen. Both graphs are calculated using data in Ref. 10.



これまで、様々な分光測定により、“天然状態－変性状態相図”は1桁を超える報告がされているが、よりデータ数を必要とするエネルギー地形図に関しては、Hawley<sup>10)</sup>の $\alpha$ -Chymotrypsinogen および Ribonuclease A 以外には、Yamaguchi ら<sup>13)</sup>の Ribonuclease A, Lassalle ら<sup>14)</sup>の SNase, Lesch ら<sup>15)</sup>の Zn-cytochrome c に限られる。凝集を伴わない可逆圧力変性研究の歴史は半世紀以上に渡り、熱変性などと比較しても決して遅く始まったわけではないが、測定技術の困難さからデータの蓄積は十分とはいえない。

最後に、最近の圧力変性機構の研究に大きな影響を与えた研究を二つ紹介したい。一つ目は、モデル系を用いた理論研究である。近年の計算機能力の発展と計算アルゴリズムの改良により、生体分子を含む溶液系において計算化学の重要性が増している。圧力変性研究において現在でも強い影響を与えた研究に、Hummer ら<sup>16)</sup>による水中でのメタン2量平衡系の理論研究がある。メタン2量平衡は疎水性効果の単純なモデル系として理論研究でよく用いられてきた系であるが、彼らは初めて圧力効果の定量的な計算を行った。Fig.4 は水中での2つのメタン分子間の平均力ポテンシャル（ギブズエネルギーに相当）を2分子間の距離に対して計算した結果を示している。圧力は-16 MPa から725 MPa まで変化させた。各平均力ポテンシャル曲線は、3.8 Å および7.2 Å 付近で極小を示し、前者ではメタン分子は互いに接触した2量体（contact pair; CP）を、後者ではメタン-メタン間に水分子1個が、存在する配置（solvent-separated pair; SSP）をとる。また、各平均力ポテンシャル曲線は2つの極小値の相対比較のため、2番目の極小値を同じ値に合わせて描いている。常圧においてCPはSSPに対してエネルギー的に強く安定に存在しているが、圧力増加に伴いCPとSSPのエネルギー差はより小さくなることが示された。すなわち、高圧力下ではSSPの存在比が増加する。Hummer らはこれらの結果から、圧力変性はタンパク質のポリペプチド鎖がコイル様に広がるのではなく、疎水的環境にあるタンパク質内部に水が浸入してタンパク質が膨れた比較的コンパクトな状態になるという仮説を提案した。Hummer らの研究<sup>16)</sup>はタンパク質内部への水の侵入説を支持する大きな流れを生んだ。一方で、高圧力下での回転半径や流体半径は温度変性など他の変性と比べてほとんど違いがないという報告もあり、再び議論は振り出しに戻っているといえる。<sup>17)</sup>

二つ目に紹介すべき研究は、200種類を超えるタンパク質立体構造データを活用し、変性の $\Delta V^\circ$ の起源のモデル化を試みたChenとMakhatadzeの研究<sup>18)</sup>である。式(3)が示すように、 $\Delta V^\circ$ は、第1次の項として最も寄与が大きい。一

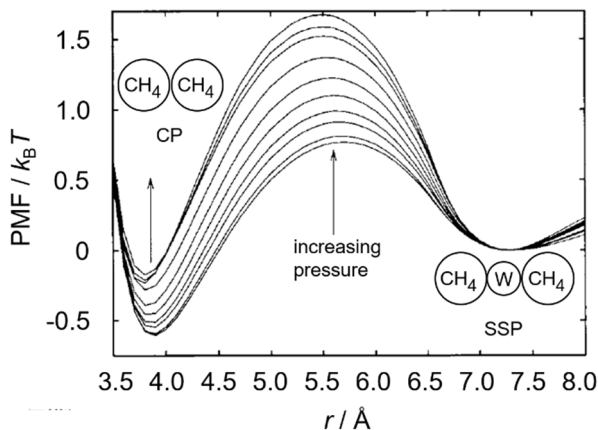


Fig.4 Potential mean force (PMF) for methane association for varying pressure from -16 to 725 MPa.

般にタンパク質の $\Delta V^\circ$ は天然状態の部分モル体積に対して、-数%から+0.5%の非常に小さい値を示す。この小さな値が問題を難しくしている一因でもある。 $\Delta V^\circ$ は、構造変化に伴う幾何学的寄与だけでなく、タンパク質と溶媒との分子間相互作用（水和）にも依存する。そこで、前者の寄与と後者の寄与を分割して考察することが伝統的に行われてきた。<sup>19)</sup> 幾何学的寄与は、溶媒分子（水）であるプローブ球（Fig.5 赤色部分）をタンパク質分子に接触させてできる境界面で区切られる領域であり、van der Waals 体積 $V_{vdw}$ （Fig.5 紫色部分）と Void 体積 $V_V$ （Fig.5 水色部分）の和からなる。 $\Delta V_{vdw} \approx 0$ であるため、水和の寄与を $V_H$ とすると、 $\Delta V^\circ$ は以下で表される。

$$\Delta V^\circ = \Delta V_V + \Delta V_H \quad (4)$$

$V_V$ は分子構造（座標）から計算可能であるが、大きな問題は変性状態の構造の取り扱いにある。ChenとMakhatadze<sup>18)</sup>は、変性構造の問題に関しては複数の統計モデルに基づく高速アルゴリズムにより1000個の変性構造をサンプリングした。ただし、これらの構造は統計力学的な重みはかかっていない。これらの構造すべてに対して計算された $V_V$ の平均値と天然構造の $V_V$ との差から $\Delta V_V$ を算出した。次に問題となるのが、 $\Delta V_H$ の計算である。 $V_H$ は溶媒と構造に依存する物理量であり、現状では理論的方法では算出困難な熱力学量である。彼らは $V_H$ は水と接触したタンパク質表面積に比例すると仮定し、比例定数を様々な種類の低分子化合物の部分モル体積から見積もった。この比例定数を用いて天然構造および変性構造の表面積から $\Delta V_H$ を計算した。200種類を超えるタンパク質を対象とした計算から、 $\Delta V^\circ$ は $\Delta V_V$ の大きな負の値と $\Delta V_H$ の大きな正の値のバランスの結果によることを明らかにした。さらに、 $\Delta V_H$ において疎水基の寄与が支配的であることを示した。 $\Delta V_H$ の寄与はこれまで度々議論されてきたが、初めて具体的な結果を示したといえる。

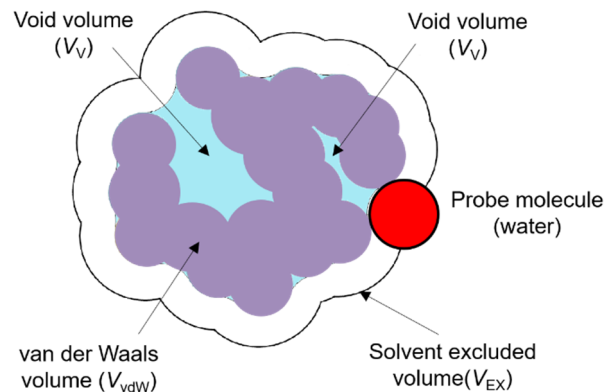


Fig.5 Schematic drawings for defining various types of volumes of proteins.

## 6. おわりに

以上のように圧力変性の鍵を握る変性の $\Delta V$ の起源に関する研究は、まだまだ議論の途上ではあるが、その分子論的描像は、徐々にぼやっとした輪郭がみえてきたのではないだろうか。上記2例目の研究は基本的には実験研究であるが、理論的方法（分子シミュレーション）の活用により分子論的解析が可能となった。すべての化学平衡は熱力学に従う。理論的研究ではマクロな量である熱力学量を取り扱

うのは困難であるが、理論的アプローチは分子論的モデルの構築に不可欠である。今後、実験と理論との統合的研究がこの分野でも益々進展することを期待したい。

## 文 献

- 1) A. Kessel, N. Ben-Tal, Introduction to Proteins (Chapman & Hall/CRC Computational Biology Series) Chap.4, CRC Press (2018).
- 2) K. A. Dill, S. Ozkan, Shell, and T. R. Weikl, *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 289-316 (2008).
- 3) F. Catanzano *et al.*, *Biochemistry* **36**, 14403-14408 (1997).
- 4) S. J. Gill and I. Wadsö, *Proc Natl. Acad.* **73**, 2955-2958 (1976).
- 5) W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **14**, 1-63 (1959).
- 6) G. I. Makhatadze and P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **47**, 307-425 (1995).
- 7) P. L. Privalov, *Pure Appl. Chem.* **79**, 1445-1462 (2007).
- 8) R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* **371**, 283-301 (2007).
- 9) C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 201-209 (2002).
- 10) S. Hawley, *Biochemistry* **10**, 2436-2442 (1971).
- 11) S. Sawamura, K. Kitamura, and Y. Taniguchi, *J. Phys. Chem.* **93**, 4931-4935 (1989).
- 12) W. Kauzmann, *Nature* **325**, 763 (1987).
- 13) T. Yamaguchi, H. Yamada, and K. Akasaka, *J. Mol. Biol.* **250**, 689-694 (1995).
- 14) M. W. Lassalle, H. Yamada, and K. Akasaka, *Journal of Mol. Biol.* **298**, 293-302 (2000).
- 15) H. Lesch, H. Stadlbauer, J. Friedrich, and J. M. Vanderkooi, *Biophys. J.* **82**, 1644-1653 (2002).
- 16) G. Hummer, S. Garde, A. E. García, M. E. Paulaitis, and L. R. Pratt, *Proc. Natl. Acad. Sci* **95**, 1552-1555 (1998).
- 17) B. Harish *et al.*, *Biophys J.* **120**, 2592-2598 (2021), and references therein.
- 18) C. R. Chen and G. I. Makhatadze, *Nature Communications* **8**, 14561 (2017).
- 19) T. V. Chalikian and K. J. Bresiauer, *Biopolymers* **39**, 619-626 (1996).



加藤 稔  
Minoru Kato  
E-mail: kato-m@ph.ritsumei.ac.jp



山本 翼  
Yamamoto Tsubasa  
E-mail: 22v00009@gst.ritsumei.ac.jp