

# 蛋白質の水和と熱安定性

大 畠 玄 久, 大 井 龍 夫\*

(平成3年8月22日受理)

## Hydration and Heat Stability Effects on Protein Unfolding

Motohisa Oobatake and Tatsuo Ooi\*

(Received August 22, 1991)

The conformational stability of a protein in an aqueous solution is described by the Gibbs free energy of unfolding between the native and random conformation.

The free energy of unfolding consists of two contributions: the hydration around the molecule, and the intramolecular interactions. A method to calculate the free energy of hydration from the accessible surface area (ASA) of the constituent atomic groups in a protein has been developed assuming a proportionality of the free energy to ASA. Similarly, the free energy of unfolding for the chain *in vacuo* can also be calculated from the ASA, using the unfolding thermodynamics derived from the experimental data of 10 proteins. Thus, our method can predict the unfolding thermodynamics of a protein with a known tertiary structure. The predicted values of 4 other proteins agreed well with the experimentally derived values. This method also accounted for the temperature dependences of the free energy of unfolding and the enthalpy changes of T4 lysozyme, and the occurrence of cold denaturation at a low temperature. This method was applied to the unfolding thermodynamics of the poly (L-alanine) helix. The calculated enthalpy change is close to the value determined in a recent calorimetric study of a 50-residue alanine-rich helix, and the results suggest that helix formation is enthalpy-driven.

### 1. はじめに

X線構造解析によって明らかにされたタンパク質分子の立体構造は近年数百個になり、その芸術的なポリ

蛋白質工学研究所：大阪府吹田市古江台6丁目2番3号  
〒565

\* 京都女子大学：京都市東山区今熊野北日吉町35番地  
〒605

Protein Engineering Research Institute 6-2-3, Furuedai, Suita, Osaka 565, Japan

\* Kyoto Women's University, 35 Kitahiyoshi-cho, Imakumano, Higashiyamaku, Kyoto 605, Japan

ペプチド鎖の折れたたみを解明することは研究者にとって、非常に魅力的な対象である<sup>1)</sup>。それではどのようにしてこの折れたたみ方が決められているのであろうか。それを理解するためには、遺伝情報によって決められたアミノ酸配列をもつタンパク質のポリペプチド鎖が、生合成された時のほどけた状態から天然の立体構造に折れたたまる過程や、またその逆の天然状態の立体構造が崩れて鎖がランダムな変性状態になる過程の熱力学量を知る必要がある。実験的には温度を上げることによってタンパク質のポリペプチド鎖は可逆的にほどけるので、この熱変性に伴う熱力学量の変化を定量的に測定することができる。近年精巧な断熱型示差熱量計 (DSC, Differential Scanning Calo-

rimetry)が開発され、タンパク質が変性する時のエンタルピー変化、比熱の変化、変性温度のデータが蓄積されつつある。この熱測定に関しては優れた総説が書かれているので参照されたい<sup>2-5)</sup>。また現代の水と水溶液に関する膨大な研究もまとめられている<sup>6-8)</sup>。ここではタンパク質の変性に関する熱測定の実験値とX線解析による立体構造を定量的にどう結びつけていくかを中心に紹介する。この研究の総説も既に出されているので参考にされたい<sup>9,10)</sup>。

## 2. 熱力学量とエネルギー計算

タンパク質の変性 (unfolding) に伴う熱力学量はそのタンパク質に特有な立体構造へ正確に折りたたまれた天然 (native) のN状態 (Gibbsの自由エネルギーの  $G^N$ ) からランダムにほどけた変性 (denaturation) のD状態 ( $G^D$ ) への自由エネルギー変化

$$\Delta G^0 = G^D - G^N \quad (1)$$

で表される。この差は変性によるエンタルピー変化  $\Delta H^0$  とエントロピー変化 (無秩序の程度)  $\Delta S^0$  に分けられ、

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (2)$$

と表される。最初に真空中でホリヘフチド鎖 (chain) が変性する場合の自由エネルギー変化  $\Delta G^0_c$  について考えてみる。常温では水素結合と van der Waals の引力によりN状態のタンパク質の原子が高密度に折れたたまっており、その結果N状態のエンタルピー  $H^N_c$  がD状態の  $H^D_c$  よりも低い値を持つので  $\Delta H^0_c$  は正の値になる。一方D状態はN状態にくらべてホリヘフチド鎖は動きやすくより無秩序 (エントロピーが大) であるので、 $\Delta S^0_c$  は正の値になる。温度を上げるとこのエントロピーの寄与  $T\Delta S^0_c$  が増大し、やがてエンタルピー項をうまわりN状態よりD状態が安定になることが期待される。しかし実際の生体中ではタンパク質は溶媒である水に溶けているので、真空中での自由エネルギーに溶媒による効果をつけ加えねばならない。即ち、真空中の分子が水溶液中に溶けたとき水と相互作用するので、変性に伴う水和 (hydration) の自由エネルギー変化を  $\Delta G^0_h$  とすると、全体の自由エネルギー変化は

$$\Delta G^0 = \Delta G^0_c + \Delta G^0_h \quad (3)$$

となる。ここでの変性に伴う水和の自由エネルギー変化には鎖と水との相互作用だけではなく、N状態からD状態に変化したとき束縛をうける結合水の自由エネルギー変化も含まれている。

タンパク質を対象として作られた分子力場のプログラムパッケージである ECEPP, AMBER, CHARMM 等によって計算されるタンパク質分子のエネルギーは真空中の分子のN状態におけるエンタルピー  $H^N_c$  に対応している。X線構造解析によるタンパク質の構造は自由エネルギー最小の構造に対応すると考えられるので、エネルギー最小化の方法により計算された安定構造から真空中でのエンタルピーが求まることになる。しかし真空中のエネルギー最小化の計算の時に、基質が結合するタンパク質の溝の中には何も入っていないためにその部分がつぶれる可能性があるので、現実の系を反映するためには水を含めた計算をしなければならない。また、熱力学量を計算するためにはN状態だけではなくD状態のエンタルピー項と両状態のエントロピー項も求める必要がある。

我々の開発した変性に伴う熱力学量を求める方法はX線構造解析の構造をN状態として取扱うので最小化に伴ういろいろな問題、例えば求められた構造が最小かどうか等の問題を避けることができ、また鎖による自由エネルギー変化をN状態とD状態の差として定義することによって、変性状態の自由エネルギーを考慮することができる。

## 3. 水和のエネルギー

### 3. a 水和エネルギーの計算方法

真空中から水溶液中に溶質分子を溶かしたときの水和について考えてみる。この時のモデルのたてかたには二通りある。最初の考え方は、その溶質のまわりに水分子を配置し、お互いの相互作用のエネルギーを計算する方法である。この方法では、水のモデルとして何を採用するか、そして溶質と水分子との相互作用のパラメータの選択または決定を行い、溶質分子のまわりに何層まで水分子を配置するか等の問題を解決しなければならない<sup>11)</sup>。二番目として、これらの問題をさけるため、実際の水分子を配置するかわりに、溶質分子の原子団に水和エネルギーをつけ加える方法がある。この方法の利点は水和エネルギーが溶質分子に平均的に繰り込まれるので、水分子そのものを考慮する必要がないことである。この時の水和エネルギーを求めるために、いろいろな中性の有機化合物が気体中から希薄な水溶液中に溶けた時の熱力学量を基礎的な実験的データとして利用することができる<sup>12)</sup>。この中でCabaniらは中性の物質の熱力学量  $Z$  の値をその物質を構成する  $j$  番目の原子団からの寄与  $B_j$  の和とし

て、 $Z = A_2 + \sum n_j B_j$  のように実験値を整理している。ここで  $A_2$  は、物質によらない定数項で  $n_j$  はその原子団の個数である。水和の自由エネルギー、エンタルピー、熱容量の原子団による寄与  $B_j$  はその原子団が親水性か疎水性であるかで大きく違っている。その中で、水素を含んでいる親水性の原子団は水素を含んでいない親水性の原子よりも負の大きな水和のエンタルピー値をもち、水和がより強いことを示している。一方、水和のエントロピーはいつも負の値をとっておりグループの違いによってあまり変化しておらず、疎水基のまわりよりも親水基のまわりのほうがエントロピーの減少が大きくなっている。炭素についている水素の個数の違い ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ ) によってこれらの熱力学量に大きな差が見られないことは水素を炭素に含める結合原子 (united atom) の近似が妥当であることを意味している。

実験から得られたこの水合エネルギーをタンパク質に適用することを考えてみよう。まず、タンパク質を構成している20種類のアミノ酸を次の7種類の原子団、即ち脂肪族の炭素 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ 、芳香族の炭素、水酸基の酸素 ( $\text{OH}$ )、アミドまたはアミノ基の窒素、カルボニルまたはカルボキシル基の炭素と酸素 ( $\text{C}=\text{O}$ )、硫黄原子等における。ここで水素は重原子に含める結合原子の近似を採用している。ある分子における水和の Gibbs の自由エネルギー  $\Delta G_h$  を表すために次のように仮定する。すなわち、分子中のある原子団と水との接触表面積  $A_i$  はその原子団と周囲の水との相互作用に比例すると考え、その原子団毎の水との相互作用の強さをその比例定数  $g_{hi}$  で表すと、25°C で

$$\Delta G_h^0 = \sum g_{hi} A_i \quad (4)$$

となる。ここで原子団と水との接触表面積 ASA (Accessible Surface Area) は水の半径  $1.4 \text{ \AA}$  を持った球を分子の原子団の表面に沿ってころがした時、球の中心の軌跡から得られる表面積から計算される。分子の中で完全に埋もれている原子団は表面積が0になるので、水合エネルギーの寄与が0になり実験式の定数項  $A_2$  は0になるとと思われる。実際、水の半径を  $1.4 \text{ \AA}$  にとり最小二乗法を行うことによってこの項を0にすることが可能である。水和の自由エネルギーだけではなく、水和のエンタルピー  $\Delta H_h$ 、水和の熱容量  $\Delta C_{p,h}$  も接触表面積に比例すると仮定すると同様に、25°C で

$$\Delta H_h^0 = \sum h_{hi} A_i \quad (5)$$

$$\Delta C_{p,h}^0 = \sum c_{p,hi} A_i \quad (6)$$

となる。7種の原子団の比例定数  $g_{hi}$ ,  $h_{hi}$ ,  $c_{p,hi}$  は中性

の22個の有機化合物について気体状態から水溶液中への実験値を再現するように、最小二乗法によって7個の原子団について求められ<sup>12)</sup>、その値は Table 1 に示される<sup>13)</sup>。最小二乗法の標準誤差はデータベースの有機化合物について  $\Delta G_h^0$  で  $0.3 \text{ kcal/mol}$  ( $1 \text{ kcal} = 4.183 \text{ kJ}$ )、 $\Delta H_h^0$  で  $0.4 \text{ kcal/mol}$ 、 $\Delta C_{p,h}^0$  で  $6 \text{ cal/mol K}$  とよい精度で一致したが、データベース以外の物質については、 $\Delta G_h^0$  と  $\Delta H_h^0$  で  $2 \text{ kcal/mol}$ 、 $\Delta C_{p,h}^0$  で  $20 \text{ cal/mol/K}$  と精度が悪くなったのでさらに改善する必要がある。Eisenberg と McLachlan も同様の仮定のもとで、アミノ酸のオクタノールから水中への移相エネルギーにより原子団のハラメータを求めている<sup>15)</sup>。4式)の取扱いは真空から水中への移相エネルギーであるため、ECEPP 等によって計算した真空中のエネルギーにこの値をたせば水中での分子のエネルギーが求められる。しかし、Eisenberg の値を使用するときには、真空中からオクタノール中への移相エネルギーをさらにつけ加えねば、水中のエネルギーにならないので注意する必要がある。

### 3. b アミノ酸の水和エネルギー

N 端と C 端がそれぞれ acetyl 基と methylamide 基で保護されている20種類のアミノ酸に対して水溶液中における水和の自由エネルギーを求めてみる<sup>12)</sup>。このアミノ酸分子がとるいろいろなエネルギー極小値の構造が求められているので<sup>16)</sup>、これらの構造に対して平均した各アミノ酸の水和エネルギーの値を Table 2 に

Table 1 Parameters of hydration free energy ( $g_h$ ), hydration enthalpy ( $h_h$ ), hydration entropy ( $s_h$ ), hydration heat capacity ( $c_{p,h}$ )<sup>12,13)</sup>, unfolding chain free energy ( $g_c$ ), unfolding chain enthalpy ( $h_c$ ) and unfolding chain entropy ( $s_c$ )<sup>14)</sup> at 25°C. Units are :  $g_h, h_h, g_c, h_c$  (kcal mol/ $\text{\AA}^2$ ),  $c_{p,h}, s_h, s_c$  (cal/mol/ $\text{K}/\text{\AA}^2$ ).

Atoms	$g_h$	$h_h$	$s_h$	$c_{p,h}$	$g_c$	$h_c$	$s_c$
Aliphatic C	0.008	-0.026	-0.114	0.370	-0.009	0.020	0.100
Aromatic C	-0.008	-0.038	-0.099	0.296	0.030	0.101	0.239
Hydroxyl O	-0.172	-0.238	-0.222	0.008	0.151	0.198	0.158
Amide N	-0.132	-0.192	-0.203	-0.012	0.113	0.071	-0.140
Carbonyl C	0.427	0.413	-0.046	0.613	-0.243	-1.528	-4.308
Carbonyl O	-0.038	-0.032	0.020	-0.228	0.041	0.089	0.161
Sulfur S	-0.021	-0.031	-0.035	-0.001	0.037	0.104	0.224

示す。疎水性の残基 Ile, Leu は正の  $\Delta G_h^0$  の値をもち、水に溶けにくいことを示すが、絶対値は今まで言われてきたよりもずっと小さい値である。また、親水性の残基は負の非常に大きな値をとっていることから、よく水に溶けやすいことがわかり、なかでも Arg の値がとびぬけて大きな値になっている。これらのことから、水和の自由エネルギーとエンタルピーは主に親水性の残基によって決定され、疎水性の残基にはあまり左右されないことがわかる。一方、真空中のアラニンについて二面角 ( $\phi$ ,  $\psi$ ) を変数としたエネルギーマップの計算を行うと、通常のタンパク質にはあまり見られない  $C^\alpha$  の構造が分子内部の水素結合により ( $\phi$ ,  $\psi$ )  $\sim (-80, 80)$  の付近で非常に低いエネルギー値を持っている。しかし、水和エネルギーをつけ加えるとペプチドの NH や CO と水との相互作用のために、 $C^\alpha$  の構造がエネルギー的に非常に安定であるということがなくなり、現実の ( $\phi$ ,  $\psi$ ) の分布と似てくる。最近、Scheraga らは、Gly-Gly-X-Gly のテトラペプチドの13種類の X 残基の NMR からの  $J$  coupling の値をこれらの構造から再現するように、水和エネルギーのパラメータを提出している。カルボニル、水酸基、芳香族の炭素の水和エネルギーが強くなっているのが特徴的である<sup>17)</sup>。

### 3. c タンパク質の水和エネルギー

タンパク質の N 状態と D 状態の水和エネルギーを(4)~(6)式によって見積もってみる。このために次のような仮定を行う。N 状態としてエネルギーを最小化した構造ではなく、X 線構造解析の構造を採用する。次に、D 状態は原子間の衝突がないランダムな多くの構造の集団平均で表される。このランダムな鎖は二面角が各自独立に変化する時の構造の積の集合であるが、その近似としてこれらの構造の和の集合であるジペプチド近似がとられる。実際には、二面角 ( $\phi$ ,  $\psi$ ) =  $(-155^\circ, 160^\circ)$  の一つの伸びた分子内につかりのない構造を ECEPP より作り、水和を求めるための D 状態の代表点とする。側鎖の回転角は伸びた構造の各アミノ酸のエネルギーの低い値をもつ構造<sup>16)</sup>から選んでいる<sup>18)</sup>。水和エネルギーを表す時に、この構造が D 状態のいろいろな集団の平均を表しているかどうか問題が残る。しかし、Table 2 の集団平均から得られたアミノ酸の水和エネルギーが一個の構造から得られた構造の132個のタンパク質に対して平均をとった各アミノ酸の水和エネルギーと似たような値を示していることから(文献10の Fig. 3)、この一つの構造を水和エネルギー

を求めるため D 状態の代表点として選んだことはそう間違っていないことになる。その理由として、伸びた状態のいろいろな構造はあまり違わない表面積のため似た水和エネルギーを持つので、水和エネルギーの値から見るとこの代表点はいろいろな構造の平均的な構造になっていると考えられる。Table 3 に14種類のタンパク質の接触表面積と水和エネルギーの計算値を示す。D 状態は N 状態よりも表面積が大きい分だけ、全体の水和エネルギーは強くなっている。しかし、N 状態では疎水性の残基が内側に、親水性の残基が外側に向いているため、N 状態の表面積当たりの水和エネルギーは D 状態よりも大きくなっている。また、両状態の表面積の比より N 状態は D 状態に比べて30~40%露出していることがわかる。

Table 2 Computed free energy ( $\Delta G_h^0$ ), enthalpy ( $\Delta H_h^0$ ) and entropy ( $\Delta S_h^0$ ) of hydration at 25°C for the N-acetyl-N'methylamides of 20 amino acids. Units are :  $\Delta G_h^0$ ,  $\Delta H_h^0$  (kcal/mol),  $\Delta S_h^0$  (kcal/mol/K)<sup>12)</sup>.

	$\Delta G_h^0$	$\Delta H_h^0$	$\Delta S_h^0$
1. Ile	0.30	-11.77	-0.0405
2. Leu	0.19	-11.87	-0.0404
3. Val	-0.06	-11.36	-0.0379
4. Ala	-0.62	-10.08	-0.0317
5. Pro	-0.70	-10.33	-0.0323
6. Met	-1.12	-11.25	-0.0340
7. Gly	-1.22	-9.71	-0.0285
8. Phe	-2.10	-14.05	-0.0401
9. Cys	-2.45	-8.83	-0.0241
10. Thr	-4.63	-15.90	-0.0378
11. Trp	-5.42	-19.18	-0.0461
12. Lys	-6.14	-20.23	-0.0473
13. Ser	-6.37	-17.25	-0.0365
14. His	-6.78	-19.62	-0.0431
15. Asn	-7.86	-18.82	-0.0368
16. Gln	-7.91	-19.57	-0.0391
17. Asp	-7.98	-18.75	-0.0361
18. Glu	-8.15	-19.74	-0.0389
19. Tyr	-9.17	-23.08	-0.0467
20. Arg	-14.01	-30.74	-0.0561

Table 3 Accessible surface areas and hydration free energies at 25°C for 14 proteins. NR : residue number, ASA<sup>N</sup>, ASA<sup>D</sup> (Å<sup>2</sup>) : accessible surface area, ΔG<sub>h</sub><sup>N</sup>, ΔG<sub>h</sub><sup>D</sup> (kcal/mol) : hydration free energy for native and denatured states, respectively, ΔG<sub>h</sub><sup>u</sup> (kcal/mol) : hydration free energy of unfolding, and fraction of ASA<sup>N</sup> on unfolding (%).

Name* NR	ASA <sup>D</sup>	ΔG <sub>h</sub> <sup>D</sup>	ΔG <sub>h</sub> <sup>D</sup> /ASA <sup>D</sup>	ASA <sup>N</sup>	ΔG <sub>h</sub> <sup>N</sup>	ΔG <sub>h</sub> <sup>N</sup> /ASA <sup>N</sup>	ΔG <sub>h</sub> <sup>u</sup>	ASA <sup>N</sup> /ASA <sup>D</sup>
4PTI 58	8758	- 241.8	- 0.02761	3976	- 142.3	- 0.03579	- 99.5	45.4
3CYT 103	15591	- 389.3	- 0.02497	5932	- 173.5	- 0.02925	- 215.8	38.0
1RNT 104	14389	- 429.5	- 0.02985	5596	- 186.0	- 0.03324	- 243.5	38.9
1CPV 108	15727	- 347.1	- 0.02207	5897	- 136.0	- 0.02307	- 211.1	37.5
5RSA 124	18350	- 534.0	- 0.02910	6775	- 240.6	- 0.03551	- 293.5	36.9
2LYZ 129	18970	- 534.8	- 0.02820	6596	- 250.6	- 0.03799	- 284.4	34.8
2MBN 153	23223	- 530.9	- 0.02286	8082	- 231.7	- 0.02867	- 299.2	34.8
2LZM 164	25098	- 665.9	- 0.02653	8504	- 304.4	- 0.03580	- 361.5	33.9
8PAP 212	30911	- 817.3	- 0.02644	9433	- 361.3	- 0.03830	- 456.0	30.5
2SSI 214	29655	- 627.8	- 0.02117	10825	- 280.6	- 0.02642	- 332.9	36.5
4CHA 239	33586	- 755.4	- 0.02249	10394	- 359.2	- 0.03456	- 396.2	30.9
2CAB 256	37411	- 964.0	- 0.02577	10993	- 368.3	- 0.03350	- 595.7	29.4
1ABP 306	44754	- 985.9	- 0.02203	13782	- 458.0	- 0.03324	- 527.8	30.8
2TAA 478	68766	- 1716.2	- 0.02496	18396	- 666.6	- 0.03623	- 1049.7	26.8

\* Identified by Protein Data Bank code : 4PTI (bovine trypsin inhibitor), 3CYT (albacore tuna cytochrome c), 1RNT (ribonuclease T<sub>1</sub> (Glu<sup>25</sup>)), 1CPV (carp parvalbumin), 5RSA (ribonuclease A), 2LYZ (hen egg-white lysozyme), 2MBN (sperm whale myoglobin), 2LZM (bacteriophage T4 lysozyme), 8PAP (papain), 2SSI (*streptomyces* subtilisin inhibitor dimer), 4CHA (α-chymotrypsin), 2CAB (carbonic anhydrase B), 1ABP (L-arabinose-binding protein), and 2TAA (taka-amylase A).

3. d タンパク質中のアミノ酸に対する平均の水和エネルギー

Protein Data Bank に登録されている113個のタンパク質に対してD状態とN状態の水和エネルギーを計算して、その差から変性の水合エネルギーを求め、各アミノ酸について平均を行ったのが Table 4 である<sup>19)</sup>。この絶対値が疎水性の残基では小さく親水性の残基では大きいことから、変性の水合の自由エネルギーに寄与しているのは親水性の残基であるといえる。この値をDとN状態に分離したのが Fig. 1 で、疎水性残基の値はN状態のその残基の露出度の違いによって左右されないが、親水性残基の値は内部へ埋められると負の大きな値をとる<sup>19)</sup>。一般に(1)式より変性の自由エネルギーΔG<sup>u</sup>が正の値になるとN状態がD状態より安定になる。変性の水合エネルギーΔG<sub>h</sub><sup>u</sup>が負の

大きな値をとると(3)式からΔG<sup>u</sup>が減少するのでN状態がD状態より不安定になる。即ち、親水性残基が内側に埋められるとN状態の水和エネルギーの損失によりN状態がD状態より不安定になる。このことは定性的に常識であるが、定量的に一残基の水和エネルギーの値が非常に大きいことに注目したい。つまりタンパク質全体の自由エネルギー変化は数十 kcal/molなので、数残基のアミノ酸置換とその露出度によって、水合エネルギーを通して全体の自由エネルギーが大きく変化して安定性に強い影響を与える。同様に、水合による変性の熱容量のアミノ酸の平均を Table 4 に示す。水合エネルギーとは逆に疎水性残基が熱容量変化に寄与している。Fig. 1 より疎水性残基が内側に埋められるほどその変化は大きくなる。

Table 4 Hydration free energy on unfolding  $\Delta G_h^u$  (kcal/mol), hydration heat capacity on unfolding  $\Delta C_{p,h}^u$  (cal/mol/K) and their standard deviations (SD) of 20 amino acid residues at 25°C averaged over 113 proteins. Av means the average value for 20 amino acids<sup>19)</sup>.

$\Delta G_h^u$ SD		$\Delta C_{p,h}^u$ SD	
1. Pro	0.32 0.38	1. Asp	2.73 5.47
2. Ile	0.32 0.38	2. Glu	3.17 7.07
3. Leu	0.27 0.38	3. Gln	3.74 6.02
4. Val	0.13 0.36	4. Asn	3.91 4.86
5. Ala	-0.54 0.39	5. Gly	4.88 5.61
6. Gly	-0.59 0.46	6. Ser	6.14 7.15
7. Met	-0.60 0.39	7. Cys	9.41 3.26
8. Phe	-1.06 0.46	8. Ala	14.22 9.22
9. Cys	-1.64 0.50	9. Thr	16.11 9.93
10. Thr	-1.97 1.78	10. Arg	16.66 9.42
11. Lys	-2.19 1.87	11. Lys	17.68 11.62
Av	-2.22 1.44	Av	19.71 9.39
12. Asp	-2.97 2.50	12. His	20.05 9.83
13. His	-3.38 1.78	13. Pro	23.69 13.06
14. Asn	-3.55 2.33	14. Tyr	30.54 10.05
15. Glu	-3.71 2.46	15. Met	31.67 12.91
16. Trp	-3.80 1.13	16. Val	32.58 11.54
17. Ser	-3.82 2.12	17. Trp	37.69 12.93
18. Gln	-3.92 2.40	18. Leu	38.26 13.08
19. Tyr	-5.64 2.60	19. Phe	39.06 11.92
20. Arg	-5.96 4.08	20. Ile	41.98 12.86

4. 真空中のエネルギー

4. a 真空中のポリペプチド鎖に対する変性の自由エネルギーの見積り

真空中のポリペプチド鎖に対する変性の自由エネルギーが実際にどの程度の値であるか、変性の実験値と水相のエネルギーを使って見積ることができる<sup>13)</sup>。実験から得られる転移温度  $T_m$  における転移のエントルピーを  $\Delta H_m(T_m)$  とすると、転移温度では、 $\Delta G^u = 0$ 、 $\Delta H^u = \Delta H_m$  になるので、

$$\Delta G_c^u(T_m) = -\Delta G_h^u(T_m) \tag{7}$$

$$\Delta H_c^u(T_m) = \Delta H_m(T_m) - \Delta H_h^u(T_m) \tag{8}$$

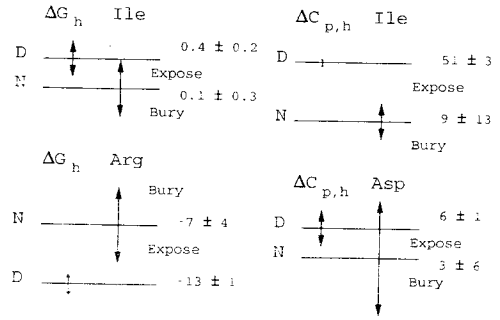


Fig. 1 Hydration free energies ( $\Delta G_h$ , kcal/mol) and hydration heat capacities ( $\Delta C_{p,h}$ , cal/mol/K) of two typical amino acid residues with high and low values for native (N) and denatured (D) states, respectively, averaged over 113 proteins at 25°C<sup>18)</sup>. The terms, expose and bury, mean more exposed and more buried residues than a residue located at the average position at native state, respectively. Arrows indicate the standard deviations.

$$\Delta S_c^u(T_m) = (\Delta H_c^u(T_m) - \Delta G_c^u(T_m)) / T_m \tag{9}$$

となる。式(4)と(5)から水相エネルギーは求められるので、(7)~(9)式によって真空中のポリペプチド鎖の変性の自由エネルギーを計算することができ、これらの値は Table 5 に示してある。変性に伴い分子間相互作用が弱くなることにより、鎖のエントルピー変化は正の値をとり、その絶対値は変性に伴って水との相互作用が増えることによる水相のエントルピーと似た値になる。一方、変性のため自由度が増大して鎖のエントロピーは正の大きな値になるが、この量も変性に伴う水との相互作用の増大による水相のエントロピーの減少と絶対値が似た値になる。このように、実験値の数倍もある鎖のエントルピーが似た大きさの絶対値をもつ水相のエントルピーに打ち勝つことによって実験値が生じることがわかる。このような微妙なバランスにより常温で RNase A について N 状態が安定になっていることを Table 6 に示す。即ち、常温で N 状態が D 状態より 2 kcal/mol 安定なのは真空中の分子間相互作用の強さ  $\Delta G_c^u$  が水相エネルギー  $\Delta G_h^u$  より少しだけ優ることによっておこっている。一方、変性に伴う鎖のエントロピーは全回転角の個数を ND とすると、N 状態をとる確率  $W_N$  と D 状態をとる確率  $W_D$  の比  $W$

Table 5 Estimation of unfolding enthalpy and entropy for chain and hydration, respectively, at transition temperature on 14 proteins. NR : residue number, NA : number of heavy atoms, ND : number of effective dihedral angles,  $T_m$  : transition temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $\Delta H_m$  : experimental unfolding enthalpy (kcal/mol),  $\Delta H^u_c$ ,  $\Delta H^u_h$  : unfolding enthalpy for chain and hydration, respectively (kcal/mol),  $\Delta S^u_c$ ,  $\Delta S^u_h$  : unfolding entropy for chain and hydration, respectively (kcal/mol/K),  $\Delta C^u_{pc}$ ,  $\Delta C^u_{ph}$  : unfolding heat capacity for experiment and hydration, respectively (kcal/mol/K),  $W$  : statistical weight computed from  $\exp(\Delta S^u_c/k \text{ND})$ , where  $k$  represents Boltzmann's constant<sup>13)</sup>.

Name	NR	NA	ND	pH	$T_m$	$\Delta H_m$	$\Delta H^u_c$	$\Delta H^u_h$	$\Delta S^u_c$	$\Delta S^u_h$	$\Delta C^u_{pc}$	$\Delta C^u_{ph}$	$W$
4 PTI	58	454	271	4.0	100.0	103	268	-165	0.518	-0.241	0.7	0.83	2.6
3 CYT	103	803	485	4.8	78.0	106	503	-397	0.933	-0.632	1.8	1.78	2.6
1 RNT	104	781	444	5.0	56.7	117	565	-448	1.048	-0.693	1.7	1.46	3.3
1 CPV	108	810	491	7.0	90.0	120	486	-366	0.886	-0.556	1.1	1.77	2.5
5 RSA	124	951	590	2.5	36.0	69	663	-594	1.234	-1.011	2.0	1.92	2.9
2 LYZ	129	1001	616	4.5	78.5	140	656	-516	1.207	-0.809	1.6	2.25	2.7
2 MBN	153	1217	745	10.5	78.5	150	724	-574	1.393	-0.966	2.8	3.04	2.6
2 LZM	164	1329	838	3.0	56.8	100	841	-741	1.595	-1.292	2.3	3.18	2.6
8 PAP	212	1655	984	3.8	83.8	216	1050	-834	1.946	-1.341	3.3	4.19	2.7
2 SSI	214	1528	904	7.0	83.0	122	779	-657	1.464	-1.121	1.1	3.85	2.3
4 CHA	239	1756	1053	3.8	57.0	164	1063	-899	2.208	-1.713	3.0	4.75	2.8
2 CAB	256	2009	1191	-	57.0	180	1387	-1207	2.625	-2.080	4.0	5.13	3.0
1 ABP	306	2335	1441	7.4	53.5	152	1371	-1219	2.814	-2.349	3.2	6.25	2.7
2 TAA	478	3690	2197	7.0	62.0	537	2669	-2132	5.304	-3.702	8.7	9.87	3.4

Table 6 A marginal stability of RNase A at 25 $^{\circ}\text{C}$ . Calculation of unfolding free energy from chain and hydration energy. Units are :  $\Delta G^u$ ,  $\Delta H^u$  (kcal/mol),  $\Delta S^u$  (kcal/mol $^{\circ}\text{K}$ ).

	$\Delta G^u$	$\Delta H^u$	$-T\Delta S^u$ ( $T \times \Delta S^u$ )
Chain	289.8	654.6	-364.8 (293 $\times$ 1.224)
Hydration	-287.7	-607.6	319.8 (293 $\times$ -1.073)
Total	2.1	47.0	-44.9 (293 $\times$ 0.151)

と関連づけられ、 $k$  をボルツマン定数とすると

$$W = W_h / W_c = \exp(\Delta S^u_c / k \text{ND}) \quad (10)$$

となる。この値は Table 5 の最後の列に示されるように、平均として 2.7 になっている。一般に C-C のまわりの回転による自由度の増加は 3 なので、この値とよい相関を示している。なお、ECEPP を使って誘電率が 2

の環境の中で変性の鎖のエンタルピーの計算をおこなった結果、BPTI・4PTI で 254kcal/mol、RNase A・5RSA で 651kcal/mol の値が得られ<sup>12)</sup>、Table 5 の実験値から見積もった 268kcal/mol、663kcal/mol とそれぞれよい一致を示している<sup>13)</sup>。

#### 4. b 真空中のポリペプチド鎖に対する変性の自由エネルギーの計算方法

タンパク質の N 状態と D 状態のエントロピーを見積もることが困難なので、真空中のポリペプチド鎖に対する変性の自由エネルギーを変性の実験値から導き出すことを試みる。具体的には(8)と(9)式で鎖のエンタルピーとエントロピー変化が求まるので、これらの量が各原子団の表面積に比例すると仮定すると、

$$\Delta H^u_c = \sum k_{ij} (A_{Dij} - A_{Nij}) = H^u_D - H^u_N \quad (11)$$

$$\Delta S^u_c = \sum s_{ij} (A_{Dij} - A_{Nij}) = S^u_D - S^u_N \quad (12)$$

となる。10種類のタンパク質について変性の実験値から見積もられた  $\Delta H^u_c$  と  $\Delta S^u_c$  がわかっているので、最小二乗法によって 7 種類の原子団についての  $k_{ij}$  と  $s_{ij}$

が決定されその値を Table 1 に示す<sup>19)</sup>。表面積と変性の鎖の自由エネルギーの比例関係は、次のように考えると理解しやすい。即ち、露出している親水性残基ではN状態とD状態で露出度の変化が少なく、内部に埋まっている疎水性残基では両者の露出度の変化は大きいと思われる。この結果、外側へ完全に露出している親水性残基ではDとN状態の表面積はほぼ等しくなり ( $A_{D_i} \sim A_{N_i}$ )、両状態間の変性のエンタルヒーとエントロピー変化は0に近くなる。一方、内部に埋もれている疎水性残基ではN状態の表面積が0になり、ハラメータの  $h_i$  と  $s_i$  が正なので変性のエンタルヒーとエントロピー変化はそれぞれ正の値になる。実際のタン

パク質では親水性残基で50%、疎水性残基で20%の露出度なので<sup>18)</sup>、上記の理想状態の間にあると考えられる。

#### 4. c タンパク質中のアミノ酸に対する平均の鎖の変性の自由エネルギー

Protein Data Bank に登録されている113個のタンパク質からNとD状態の鎖の変性の自由エネルギー計算を行い、全アミノ酸残基に対して平均を行ったのが Table 7 である。芳香族のアミノ酸の鎖の変性の自由エネルギーが正の値で特に大きく、タンパク質の安定化に寄与していることがわかる。意外なことに疎水性残基の  $\Delta G^u_i$  は負の値になっている。この原因はD状態の鎖のエントロピー項がエンタルヒー項を上回っているためである

### 5. 変性の自由エネルギー

#### 5. a タンパク質の変性の自由エネルギー

タンパク質全体の変性の自由エネルギーは(3)式で求められる。その中の真空中の鎖の自由エネルギー  $\Delta G^u_i$  と水相の自由エネルギー  $\Delta G^u_{h_i}$  がそれぞれ  $i$  種の原子団のN状態の表面積  $A_{N_i}$  とD状態の表面積  $A_{D_i}$  から求められる。7種類の原子団の和として

$$\Delta G^u_c = \sum g_{N_i} (A_{D_i} - A_{N_i}) \quad (13)$$

$$\Delta G^u_h = \sum g_{h_i} (A_{D_i} - A_{N_i}) \quad (14)$$

と表される<sup>20)</sup>。エンタルヒーも同様にして表される。14種類のタンパク質について求めた変性の熱力学量の25℃の値を示したのが Table 8 である。Fig. 2 に実験値と計算値の相関を示す。タンパク質は鎖のエントロピーとエントロピーのハラメータを求める時に使用した10種類 (Table 8 の上部) と使用しない4種類 (下の部分) に分類した。両者について実験値と予測値の違いは同じ程度であり、この取扱いが鎖のエネルギーのハラメータを決定するために使用したデータベース以外のタンパク質にも適用できることを示唆している。

実験値と計算値の違いは実際に計算された  $\Delta G^u_c$  や  $\Delta G^u_h$  で比較を行うのが妥当である。たとえば、T4リゾチームで  $\Delta G^u$  の違いは  $-4.1 \text{ kcal/mol}$  であるが、これは  $\Delta G^u_c$  ( $360.4 \text{ kcal/mol}$ )、 $\Delta G^u_h$  ( $-358.5 \text{ kcal/mol}$ ) の1.1%にあたる。同じように  $\Delta H^u$  の違いの  $-11.0 \text{ kcal/mol}$  は、 $\Delta H^u_c$ 、 $\Delta H^u_h$  ( $\sim 850 \text{ kcal/mol}$ ) の1.3%である。立体構造がわかっている変性の熱力学量が決まっているタンパク質の数が少ないことと、後で述べる特別な相互作用がこの方法には含まれていない

Table 7 Unfolding chain free energy  $\Delta G^u_c$  (kcal/mol), unfolding chain enthalpy  $\Delta H^u_c$  (kcal/mol), and unfolding chain entropy  $\Delta S^u_c$  (cal/mol/K) of 20 amino acid residues at 25°C averaged over 113 proteins. Av means the average value for 20 amino acids.

	$\Delta G^u_c$	$\Delta H^u_c$	$-T\Delta S^u_c$	$\Delta S^u_c$
1. Tyr	6.56	14.41	-7.95	26.33
2. Trp	5.59	13.46	-7.87	26.39
3. Arg	5.25	6.03	-0.78	2.61
4. His	3.95	7.64	-3.69	12.36
5. Gln	3.69	4.47	-0.78	2.62
6. Glu	3.58	5.69	-2.11	7.08
7. Ser	3.42	5.80	-2.38	7.97
8. Asn	3.26	3.64	-0.39	1.30
9. Phe	3.22	11.93	-8.71	29.22
10. Asp	2.89	4.72	-1.83	6.13
11. Cys	2.71	8.64	-5.92	19.87
Av	2.44	5.93	3.49	11.72
12. Lys	1.87	3.57	-1.70	5.71
13. Thr	1.74	4.42	-2.68	9.00
14. Met	1.13	7.06	-5.93	19.87
15. Gly	0.68	1.23	-0.55	1.85
16. Ala	0.51	2.77	-2.25	7.55
17. Val	-0.19	3.45	-3.64	12.20
18. Leu	-0.35	3.69	-4.04	13.57
19. Pro	-0.39	1.97	-2.36	7.91
20. Ile	-0.40	4.03	-4.42	14.84



Table 8 Comparison between predicted (Cal) and experimental (Exp) values of  $\Delta G^u$ ,  $\Delta H^u$ , and  $\Delta S^u$  for 14 proteins at 25°C<sup>20)</sup>.

Name	NR	$\Delta G^u$ , kcal/mol			$\Delta H^u$ , kcal/mol			$\Delta S^u$ , cal/mol/K		
		Cal	Exp	$\Delta$	Cal	Exp	$\Delta$	Cal	Exp	$\Delta$
4 PTI	58	15.8	15.0	0.8	57.7	50.5	7.2	141	119	22
1 CPV	108	10.1	14.7	-4.6	42.6	48.5	-5.9	109	113	-4
5 RSA	124	8.2	2.1	6.1	61.2	47.0	14.2	178	151	27
2 LYZ	129	10.0	14.4	-4.4	51.3	54.4	-3.1	139	134	5
2 MBN	153	7.0	10.8	-3.8	36.7	0.2	36.5	100	-36	136
2 LZM	164	1.9	6.0	-4.1	15.9	26.9	-11.0	47	70	-23
8 PAP	212	16.6	18.6	-2.0	25.9	22.0	3.9	31	11	20
2 CAB	256	17.5	11.0	6.5	54.5	52.0	2.5	124	137	-13
1 ABP	306	12.7	9.2	3.5	60.6	60.8	-0.2	161	173	-12
2 TAA	478	39.8	40.8	-1.0	208.1	215.1	-7.0	565	585	-20
3 CYT	103	6.3	9.4	-3.1	21.9	16.0	5.9	52	22	30
1 RNT	104	13.8	8.7	5.1	54.4	64.7	-10.3	136	188	-52
2 SSI	214	11.5	14.4	-2.9	75.9	58.2	17.7	216	147	69
4 CHA	239	18.2	11.2	7.0	91.7	72.0	19.7	246	204	42

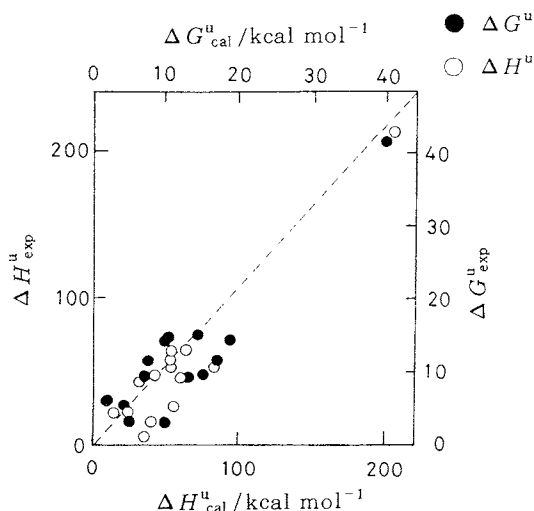


Fig. 2 Correlation of calculated and experimental unfolding free energies ( $\Delta G_{cal}^u$  and  $\Delta G_{exp}^u$ , ●) and enthalpies ( $\Delta H_{cal}^u$  and  $\Delta H_{exp}^u$ , ○) for 14 proteins at 25°C<sup>20)</sup>.

ので、実験と予測値の相違を詳細には議論できない。

### 5. b タンパク質における変性の自由エネルギーの温度依存性

T4リゾチームについて  $\Delta G^u$  と  $\Delta H^u$  の温度依存性の実験値と計算値を Fig. 3 に示す<sup>20)</sup>。これらの温度依存性は、D と N 状態の熱容量差  $\Delta C_p^u$  の値によって左右され、 $\Delta C_p^u$  が温度に依存しなければ一般的に

$$\Delta H^u(T) = \Delta H^u(T_0) + \Delta C_p^u(T - T_0) \quad (15)$$

$$\Delta S^u(T) = \Delta S^u(T_0) + \Delta C_p^u \ln(T/T_0) \quad (16)$$

と表される。ここで、Fig. 3 の実験値は実験から得られた  $\Delta C_p^u$ 、計算値は水和による  $\Delta C_{p,h}^u$  を使用している。計算値は N と D 状態の表面積より、7 種類の原子団の和として

$$\Delta C_{p,h}^u = \sum c_{p,hi} (A_{Di} - A_{Ni}) \quad (17)$$

から求められる。14 個のタンパク質について実験値の  $\Delta C_{p,h}^u$  は水和による  $\Delta C_{p,h}^u$  が大部分の寄与を占めていることが Table 5 からわかるので<sup>10,13)</sup>、Fig. 3 に示す温度依存性は実験、計算共に似たカーブを示す。T4 リゾチームの変異体は 3M グアニジン塩酸溶液中で温度を下げることによって 0°C 付近で変性する低温変性が観測されるか<sup>21)</sup>、実際計算でもその温度付近で  $\Delta G^u$  が 0 近くになり低温変性が予測される。低温変性の自由

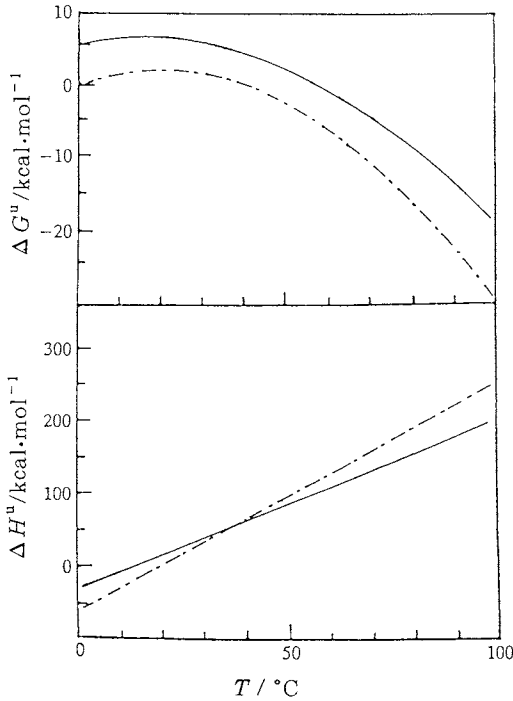


Fig. 3 Computed  $\Delta G^u$  and  $\Delta H^u$  (broken lines) for T4 lysozyme are shown as a function of temperature. The experimental curves are given by solid lines<sup>20)</sup>.

Table 9 Unfolding free energy  $\Delta G^u$  (kcal/mol), unfolding enthalpy  $\Delta H^u$  (kcal/mol), and unfolding entropy  $\Delta S^u$  (cal/mol/K) of 20 amino acid residues at 25°C averaged over 113 proteins. Av means the average value for 20 amino acids.

	$\Delta G^u$	$\Delta H^u$	$-T\Delta S^u$	$\Delta S^u$
1. Phe	2.16	6.82	-4.66	15.64
2. Trp	1.78	4.47	-2.69	9.00
3. Cys	1.08	5.21	-4.14	13.85
4. Tyr	0.91	3.73	-2.82	9.46
5. His	0.56	0.79	-0.23	0.75
6. Met	0.53	2.89	-2.36	7.93
Av	0.22	0.77	-0.55	1.83
7. Gly	0.09	-0.23	0.31	-1.07
8. Ala	-0.02	0.51	-0.54	1.82
9. Val	-0.06	0.30	-0.36	1.20
10. Pro	-0.06	0.02	-0.08	0.30
11. Ile	-0.08	0.19	-0.27	0.89
12. Leu	-0.08	0.17	-0.24	0.81
13. Asp	-0.08	0.18	-0.26	0.86
14. Glu	-0.13	0.05	-0.19	0.65
15. Gln	-0.23	-1.76	1.53	-5.13
16. Thr	-0.24	0.04	-0.28	0.89
17. Asn	-0.30	-2.03	1.74	-5.83
18. Lys	-0.32	-1.45	1.13	-3.78
19. Ser	-0.40	-0.16	-0.24	0.84
20. Arg	-0.71	-4.40	3.69	-12.38

エネルギーの内訳を見ても、D状態の水相の自由エネルギーがN状態の鎖の自由エネルギーより低くなることによって生じている。この低温変性の温度  $T_c$  は、高温変性の温度  $T_m$  から近似に求められ<sup>13)</sup>、

$$T_c \sim T_m - 2 (\Delta H_m(T_m) / \Delta C_p^u) \quad (18)$$

となる。pH3.83で低温変性がおこっているミオグロビンでは<sup>22)</sup>、 $\Delta H_m(T_m) = 53 \text{ kcal/mol}$ 、 $\Delta C_p^u = 2.55 \text{ kcal/mol/K}$ 、 $T_m = 57.5^\circ\text{C}$ を代入すると、 $T_c = 16^\circ\text{C}$ となる。実験値は6°Cなので10°C高く計算されているが、低温変性の温度を簡単に得られる利点がある。上式からpHを低くして、高温変性の転移温度を下げることによって転移エンタルピーを下げるのが低温変性を起こさせる簡単な方法であることがわかる。

5. c タンパク質中のアミノ酸に対する平均の変性の自由エネルギー

Protein Data Bankに登録されている113個のタンパク質からNとD状態の全体の変性の自由エネルギー計算を行い、20種類のアミノ酸残基に対して平均を行ったのがTable 9である。 $\Delta G^u$ の値をみるとN状態

をD状態より安定にしているアミノ酸残基は芳香族のグループで、その次に疎水性残基が続いている。親水性残基は水相エネルギーの寄与のためN状態を不安定にしているアミノ酸残基になっている

5. d ポリ-L-アラニンのヘリックス-コイル転移

球状タンパク質に対して満足する結果が得られた今までの計算が、単純なポリペプチドであるポリ-L-アラニンのヘリックス-コイル転移に適用できるか検討する<sup>20)</sup>。長い間、短いL-アラニンは水溶液中で部分的にも $\alpha$ -ヘリックスを形成できないと考えられてきた。しかし、20残基のポリ-L-Glu<sup>231)</sup>や20残基のポリ

Table 10 Predicted values for helix-coil transition of the L-alanine helices (Ac (Ala)<sub>n</sub>NHMe) at 25°C<sup>20)</sup>.

n	ΔG <sup>0</sup>	ΔH <sup>0</sup>	(ΔH <sup>0</sup> <sub>h</sub> · ΔH <sup>0</sup> <sub>c</sub> )	ΔS <sup>0</sup>	(ΔS <sup>0</sup> <sub>h</sub> + ΔS <sup>0</sup> <sub>c</sub> )	ΔC <sup>0</sup> <sub>p,h</sub>
	cal/res	cal/res	cal/res	cal/res	cal/res	cal/res/K
10	2.4	630	( 2240 1610 )	2.1	( 4.2 2.1 )	1.7
20	1.0	780	( 2470 - 1690 )	2.6	( 4.8 2.2 )	1.9
30	0.7	830	( 2540 1710 )	2.8	( 5.0 2.2 )	1.9
40	0.3	860	( 2580 1720 )	2.9	( 5.1 2.2 )	2.0

L-Lys<sup>29)</sup>が末端についた20残基のポリL-アラニン  
は室温で部分的なα-ヘリックスをとっていることが  
明らかになった。さらに3個のLysを鎖内に挿入する  
ことによって水に溶けやすくした13個のL-アラニン  
からなる16残基のポリヘフチドも水溶液中で部分的な  
ヘリックスをとることがわかった<sup>20)</sup>。タンパク質に対  
して使用された今までの方法を10, 20, 30, 40個の長  
さをもつポリL-アラニンのヘリックス-コイル転移  
に対して適用した結果、自由エネルギーの温度依存性  
より25°Cで50%, 0°Cで90%近くのα-ヘリックスが水  
中で形成されることが予測された。Table 10に示され  
るようにα-ヘリックスを形成する真空中のエンタル  
ピー(ΔH<sup>0</sup><sub>h</sub>)が、コイルを安定にしている水相エネル  
ギー(ΔH<sup>0</sup><sub>c</sub>)に打ち勝っている。またこの転移に伴う  
比熱の水和による寄与(ΔC<sup>0</sup><sub>p,h</sub>)は2 cal res/Kとタン  
パク質のアラニン残基に対して得られる平均値(4  
cal/res/K<sup>19)</sup>に比べると一けた小さく、転移エンタル  
ピーの温度依存性は少ないと考えられる。一方、Ac-Y  
(AEAKA)<sub>5</sub>F-NH<sub>2</sub>の50残基からなるL-アラニンを  
主としたポリヘフチドのDSCによるエンタルピー変  
化の測定値は1.2kcal/resと報告されており<sup>20)</sup>、予測  
値の0.86kcal/resと実験誤差の範囲で一致している。  
このことからα-ヘリックスの形成はエンタルピー駆  
動型でおこることが実験と理論で確かめられた。

6. おわりに

立体構造が決定されたタンパク質の原子座標から構  
成原子の表面積を計算することにより、そのタンパク  
質の変性の熱力学量を求める方法を紹介してきた。こ  
の方法はタンパク質の構造安定性を説明する大きな道  
筋を示した段階なので、途中で用いたいくつかの仮定  
は再吟味しなければならない。たとえば計算に表面積  
を使っているため、N状態の残基間の特別な相互作用、  
特に電荷を持っている残基間の静電相互作用が表面積

考慮されていないことが挙げられる。また水素原子の  
イオン化の自由エネルギーも考慮していないので、電  
荷を持たない中性のアミノ酸から構成されているタン  
パク質がこの計算のモデルであると考えられる。この  
ことは、基本的には水相エネルギーを求めるときに使用  
した原子団が電荷を持たない中性の原子からなり  
たっているためである。しかし、鎖の変性の自由エネ  
ルギーを求めるときに実際のタンパク質による実験値  
を用いたので、電荷の効果は平均的に取り込まれてい  
ると思われる。一方、イオン化の自由エネルギーを考  
慮していない問題はこの項を両状態につけ加えたとし  
ても、ΔG<sup>0</sup>はN状態とD状態の差で定義されるので、  
両者がおなじpK<sub>a</sub>を持つならば、両状態でお互い相殺  
しあってそれ程大きな影響を及ぼさないであろう。

タンパク質のX線構造解析により、数百個の構造が  
知られているが、その中で変性に関する熱力学量がわ  
かっているのはわずか数十個に過ぎない。最近のDSC  
の進歩により、この方面のデータが増えることがタン  
パク質の立体構造の形成の仕組みを知るうえで、飛躍  
的な進歩をもたらすものと期待している。

文 献

- 1 C. Branden and J. Tooze, "Introduction to Protein Structure", Garland Publishing, Inc., New York (1991).
- 2 P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **33**, 167 (1979).
- 3 深田はるみ, 熱測定の進歩 **2**, 67 (1984).
- 4 城所俊一, 熱測定 **14**, 143 (1987).
- 5 高橋克忠, 蛋白質核酸酵素 **33**, 337 (1988).
- 6 D. Eisenberg and W. Kauzmann, "Structure and Properties of Water", Oxford Univ. Press, London (1969).
- 7 F. Franks (ed.), "Water-A Comprehensive Treatise", Vols. 1~7, Plenum, New York (1972~1982).
- 8 F. Franks (ed.), "Water Science Review", Vols 1~5, Cambridge Univ. Press, Cambridge (1985~1990).
- 9 大井龍夫, 生物物理 **28**, 6 (1988).
- 10 T. Ooi and M. Oobatake, *Comments Mol. Cell. Biophys.* **5**, 233 (1988).
- 11 S. Cabani, P. Gianni, V. Mollica and L. Lepori,

*J. Solution Chem.* **10**, 563 (1981).  
 12) T. Ooi, M. Oobatake, G. Némethy and H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3086 (1987).  
 13) T. Ooi and M. Oobatake, *J. Biochem.* (Tokyo) **103**, 114 (1988).  
 14) T. Ooi and M. Oobatake, *J. Biochem.* (Tokyo) **104**, 440 (1988).  
 15) D. Eisenberg and A. D. McLachlan, *Nature* **319**, 199 (1986).  
 16) M. Vásquez, G. Némethy and H. A. Scheraga, *Macromolecules* **16**, 1043 (1983).  
 17) J. Vila, R. L. Williams, M. Vásquez and H. A. Scheraga, *Proteins* **10**, 199 (1991).  
 18) M. Oobatake and T. Ooi, *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.* **66**, 433 (1989).  
 19) M. Oobatake and T. Ooi, *J. Biochem.* (Tokyo) **104**, 433 (1988).  
 20) T. Ooi and M. Oobatake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2859 (1991).  
 21) B. Chen and J. A. Schellman, *Biochemistry* **28**, 685 (1989).  
 22) P. L. Privalov, Y. V. Griko, S. Y. Venyaminov and V. P. Kutysenko, *J. Mol. Biol.* **190**, 487 (1986).  
 23) S. Ihara, T. Ooi and S. Takahashi, *Biopolymers* **21**, 131 (1982).  
 24) S. Takahashi, E. H. Kim, T. Hibino and T. Ooi, *Biopolymers* **28**, 995 (1989).  
 25) S. Marqusee, V. H. Robbins and R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5286 (1989).  
 26) J. M. Scholtz, S. Marqusee, R. L. Baldwin, E. J.

York, J. M. Stewart, M. Santoro and D. B. Bolen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2854 (1991).

要 旨

水溶液中におけるタンパク質の構造の安定性は天然状態とランダムにほどけた状態間で記述される変性の自由エネルギーで表される。この変性の自由エネルギーはタンパク質とまわりの溶液分子との相互作用による水相の自由エネルギーと真空中の分子内相互作用からの自由エネルギーの2成分の寄与に分けられる。水相の自由エネルギーは低分子の熱力学量から決定されたパラメータを使ってタンパク質を構成している原子団と水の接触表面積から計算される。同様に、真空中の分子内相互作用も10個のタンパク質の変性データから決定された真空中の自由エネルギーを使って表面積から計算することができる。我々の方法は変性の熱力学量をタンパク質の立体構造から計算することを可能にした。データベースに含まれていない別の4個のタンパク質に対しても適用できたので、この方法は一般性があると思われる。変性の自由エネルギーとエンタルピーの温度依存性の予測も行うことができT4リゾチームに対して適用した。この予測された温度依存性は観測された温度依存性と似ており、また計算値は温度を下げることによって生ずる低温変性を予測している。また、この方法をポリ(L-アラニン)の $\alpha$ -ヘリックスに対してヘリックス-コイル転移の熱力学に適用した。予測されたエンタルピー変化は50残基からなるアラニンが主成分の $\alpha$ -ヘリックスに対する最近の熱容量による測定値と似た値になり、 $\alpha$ -ヘリックスの形成はエンタルピー駆動型で起こることが実験的に知られているが理論的にも確かめられた。