

## 解説

# 小さなタンパク質の構造相転移を解析する

本田真也

(受取日: 2005年7月19日, 受理日: 2005年8月1日)

## Analysis of Structural Phase Transition of a Small Protein

Shinya Honda

(Received July 19, 2005; Accepted August 1, 2005)

This review describes the analytical techniques for evaluating the structural phase transition of a small protein. First, it outlines the significance of thermal analyses in protein research. Next, a practical limitation of micro DSC to detect the structural phase transition of a small protein is mentioned, though this method is adequate for ordinary proteins. We then introduce the strategy for analyzing a small protein combining the optical measurements using chemometrics and the atomic level analyses by NMR, which were conducted by us to overcome the above problem. Finally, the meaning of the thermodynamic result obtained from these analyses is discussed.

### 1. はじめに

最近, 筆者らは, アミノ酸10残基のみからなる「最小のタンパク質」の設計合成に成功した。<sup>1)</sup> シニョリンと名づけたこのタンパク質は, 天然型の $\alpha$ アミノ酸のみで構成されており, D体などの非天然アミノ酸は含まない。また, その配列にシステインは含まれず化学構造式の上では直鎖状のオリゴペプチドである。一般に, このような短い直鎖状ペプチドは, 生理的な溶媒環境下において, 不定形なコンホメーションのアンサンブルとして溶解するか, または不溶の凝集物となるかで, 規則的な構造を形成することはないと考えられていた。しかしながら, シニョリンは単量体として溶解し, 水中で固有の3次元立体構造を形成する。さらに, 加熱や変性剤の添加によって, 天然タンパク質と同じように可逆的かつ協同的な構造相転移を示す。このようなシニョリンの特筆すべき性質は, タンパク質の分子サイズに関する従来の認識を改めるものであり, タンパク質の構造安定化機構や立体構造形成(フォールディング)原

理の理解を深めるうえで重要な知見になると思われる。また, シニョリンの配列は, タンパク質の化学進化に関する独自の仮説<sup>2)</sup>にもとづき設計したものである。したがって, シニョリンが上述の特筆すべき性質を示したことは, 生命の起源と深い関連をもつタンパク質の化学進化プロセスにおいて10残基程度の小さな原始タンパク質が存在した可能性を示唆するものである。加えて, タンパク質の化学進化プロセスを原理的に模倣した新しい分子設計技術の今後の発展を期待させるものでもある。

以上のように, シニョリンはタンパク質科学のさまざまな領域に波及をもたらず貴重な成果となった。ただし, これらの点に関しては, 本誌の守備範囲を離れる内容でもあり, また一部については他誌<sup>2,3)</sup>で解説していることもあって, ここでは深く触れないことにする。本稿では, 上記の結論を導く過程で用いた小さなタンパク質の構造相転移を評価するための解析手法に関して焦点を絞って紹介する。

## 2. タンパク質研究における熱測定的重要性

熱測定の意義は、たとえ対象がタンパク質であっても基本的に変わるものではない。熱測定によって得られる情報は、たとえば対象の純度や安定性についてであり、また状態変化や反応機構に関する知見である。これらは対象がセラミックス材料であろうと食品添加物であろうと変わらず、同一の論理にもとづいて解釈することができる。ただ、筆者が、タンパク質研究における熱測定の役割としてひとつ加えて強調したいのは、熱測定がタンパク質のタンパク質たる本性を見極めるための重要な方法論のひとつである点である。

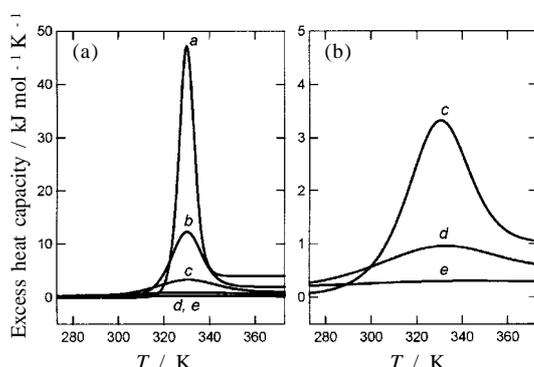
周知のごとくタンパク質はアミノ酸が重縮合した高分子、すなわちポリペプチドである。しかし、すべてのポリペプチドがタンパク質になれるわけではない。いったいどのようなポリペプチドがタンパク質に値し、どのようなポリペプチドが不適とされるのだろうか。鎖状の高分子であるタンパク質は、生理的条件下でつねに一定の空間的配置にフォールディングし、原子レベルで同一の固有の立体構造を自発的に形成する。この固有の構造がタンパク質の機能発現に不可欠である。したがって、タンパク質とそれ以外のポリペプチドを区別するひとつの指標として、固有の立体構造が挙げられるであろう。タンパク質の立体構造を原子レベルで解析するための分析法としては、X線結晶解析やNMRが代表的である。一方、固有の立体構造が静的ではなく、動的なものであることも見逃すことのできない点である。タンパク質の機能に重要な構造の動的性にはいくつかの時空間スケールの緩和モードが存在するが、これらの中で最大のモードが変性と再生であろう。つまり、タンパク質は、分子単独で可逆的かつ協同的に自身の構造を転移する能力を保持しているのである。これにより、分泌タンパク質の膜透過や中古タンパク質の分解管理を効率的に実現している。したがって、固有の立体構造に加えて、可逆的かつ協同的な構造相転移もタンパク質を区別するための重要な指標となろう。筆者は、タンパク質を物質科学の対象としてより深く理解するためには、それを進化的な文脈で捉えることなしに（つまり分類学を用いることなく）、物理と化学のことばのみでタンパク質を定義することが重要と考えている。ここで、仮に進化的な影響を除いた実体を“タンパク質”と表記するなら、“タンパク質”の定義として、固有の立体構造と可逆的かつ協同的な構造相転移の2点は欠かすことのできない要件と言えるだろう。以上の観点において、熱測定は、“タンパク質”の定義の第2点、可逆的かつ協同的な構造相転移を解析するための分析法としての重要性を有しているのである。

話を具体的に述べれば次のようになる。筆者らは、自ら

の作業仮説に従いアミノ酸10残基のシニョリンを合成した。そして、これをタンパク質だと“証明”したかったのである。シニョリンのアミノ酸配列は人工的に設計したものである。したがって、既知のタンパク質の配列との比較は意味を成さない。なぜなら、もし同一の配列が存在すれば、あらたな配列を設計したことにならないからである。そこで、筆者らは、物理と化学のことばのみで規定しうる“タンパク質”を定義し、物理的/化学的特性解析によってシニョリンを“タンパク質”だと“証明”することを課題として設定したのである。まず、シニョリンの<sup>1</sup>H-NMR測定を行った。その結果、コンパクトな構造の存在を示すNOEクロスピークが多数観測された。そのクロスピークの単位鎖長あたりの数は、天然の球状タンパク質に匹敵するものであった。そこで、それらを拘束条件とした構造解析計算を行い、最終的にシニョリンの原子座標を精度良く求めることに成功した。この時点で、定義の第1点、固有の立体構造の存在が確認された。残された課題は、定義の第2点、可逆的かつ協同的な構造相転移の存否であった。つまり、熱測定によってその存在を明示することができれば、シニョリンが“タンパク質”であると“証明”できる状況になったのである。

## 3. マイクロDSCの限界

相転移現象は、熱測定が得意とする解析対象のひとつであろう。潜熱を伴う現象であれば、カロリメトリ等によって、そのメカニズムを詳細に解析することが可能である。ただし、タンパク質を分析対象とする場合、やや異質な側面がある。それは、多くの場合、タンパク質の分析が、生理的な溶媒環境下での分子内相転移現象に着目する点である。このため、溶質分子間の影響を無視できるまで希釈した希薄なタンパク質溶液を測定試料としなければならない。これは、分子間相互作用や金属結合で構築されるマクロな構造体である液晶や合金の構造相転移を対象とした場合と比べて顕著な差となり、いくつかの現実的な問題が生じる。ひとつは感度である。タンパク質の分子内非共有結合の生成に伴うわずかな潜熱を、水という熱容量の大きな媒質中で有意に測定するためには、十分な検出感度を伴った測定装置が必要になる。もうひとつは理論である。タンパク質の解析では、分子内相転移というあまり耳慣れない現象を扱うことになる。したがって、相転移する構造体が無限のサイズを有しているとする古典的近似は不適となる。これは、すなわち、相転移する単位構造の大きさを考慮した理論が必要なことを意味する。しかしながら、幸い我々はこれらの難問に頭を悩ませる必要はない。前者に関してはPrivalov型と呼ばれる断熱型入力補償方式のマイクロDSCの発展によって、後者についてはFreireらの統計力学にも



**Fig.1** Simulated DSC curves of a protein. The curves (a, b, c, d and e) were computed on the assumption of the two-state phase transition theory using following parameters respectively:  $\Delta H_m^{cal} = \Delta H_m^{vH} = 400, 200, 100, 50$  and  $25 \text{ kJ mol}^{-1}$ ;  $\Delta C_p = 4, 2, 1, 0.5$  and  $0.25 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ;  $T_m = 330 \text{ K}$ .

とづく導出などによって、必要な装置と理論体系は基本的に整備されているからである。これらの点に関しては、本誌の読者にとっておそらく周知のことであろう。タンパク質等の生体高分子を対象としたカロリメトリについては、本誌に限っても、高橋<sup>4,6)</sup> 深田<sup>7)</sup> 城所<sup>8)</sup> 上平<sup>9)</sup>らにより詳述されており、したがって本稿ではこれ以上言及しない。にもかかわらず、以上の背景をここであえて述べたわけは、これらの進歩をふまえても、なおも小さいタンパク質の構造相転移の測定は難しいという状況を説明する準備のためである。

現在では、上述の理論にもとづき、我々はタンパク質の構造相転移に伴うDSCカーブをいくつかのパラメータを仮定することで、測定に先立ってシミュレーションすることが可能である。Fig.1にその一例を示す。まず、曲線aを見ていただきたい。これは、リゾチーム等の球状タンパク質の典型的なDSCカーブに相当するもので、タンパク質の変性に伴う顕著な吸熱ピークが確認できる。ここで、ピークが一定の温度幅を有するのは、先に述べた相転移する単位構造が有限の大きさを持つことに由来する。これに対し、氷の融解のように単位構造の大きさを無限と仮定できるような場合には、理論上、ピークは幅を持たず高さは無限大になる。ところで、ここに示したすべてのDSCカーブは二状態相転移、すなわち測定系には天然状態のタンパク質と変性したタンパク質の二つの熱力学的状態のみしか存在しないという仮定にもとづいて計算したものである。別の言い方をすれば、段階的な構造変化による中間状態、分子間相互作用にもとづく多量体形成、非特異的相互作用による凝集化などが熱変性過程で生じないことを仮定している。

したがって、この仮定は、タンパク質分子の大きさそのものが相転移する単位構造の大きさに相当すると仮定することに等しい。それゆえ、Fig.1のシミュレーションでは、いわゆるファントホッフエンタルピー差 ( $\Delta H^{vH}$ ) とモル当たりのカロリメトリックエンタルピー差 ( $\Delta H^{cal}$ ) は等しいと仮定して計算している。ところで、タンパク質の場合、 $\Delta H^{cal}$  や  $\Delta C_p$  の値は分子の大きさと概ね線形の相関を示すことが知られている(後述) 従って、 $\Delta H^{cal}$  と  $\Delta C_p$  に適当な値を代入することによって、ある大きさのタンパク質が理想的な二状態相転移をした場合のDSCカーブをあらかじめ推定することは可能になっている。ここで、あらためてFig.1(a)の曲線b,c,d,eを見ていただきたい。これらは、エンタルピー差を段階的に半減してみたときの一連のDSCカーブである。すなわち、小さいタンパク質のDSCカーブである。明瞭化のため、Fig.1(b)では同じカーブを縦軸10倍に拡大して描画している。これを見ると、エンタルピー差の減少に伴い吸熱ピークが急激に低くかつ幅広く変化していくことがわかる。もはや曲線dにおいては、氷点で既にピークが始まり沸点でも終結しないというブロードな転移となる。さらに、曲線eにおいては、これが吸熱ピークであることを認識することすら難しい状態になる。

このような曲線を実験的に測定し有意な分析を行うことは、いかに発展したマイクロDSC装置をもってしても、相当困難な作業であることは想像に難くないだろう。筆者らは、以前の研究で、曲線dにほぼ相当する  $\Delta H^{cal} = 53 \text{ kJ mol}^{-1}$  の試料のDSC測定を報告しているが<sup>10)</sup> その経験から  $50 \text{ kJ mol}^{-1}$  前後が(少なくとも筆者らが所有している装置では) DSC分析の下限であることを実感していた。つまり、仮にあるタンパク質が協同的な分子内構造相転移を呈していたとしても、そのエンタルピー差が著しく小さい場合は、一般的な球状タンパク質で定法となっているマイクロDSC装置を用いた分析では十分な情報を得ることが期待できないということである。一方、筆者らが設計合成した人工タンパク質のエンタルピー差は  $50 \text{ kJ mol}^{-1}$  より小さいことがその分子サイズから予想されていた。このことはつまり、前節に述べた残された課題、すなわちシニョリンの可逆的かつ協同的な構造相転移の存否を確かめるためには、DSCとは異なる何らかの代替する方法論を模索する必要があることを意味していた。<sup>\*1</sup>

#### 4. ケモメトリックスを利用した熱力学的状態数の解析

球状タンパク質の構造相転移に関しては、マイクロDSC装置を用いた解析が定法となっている現状を鑑みれば、これを代替する方法論がそう都合よく存在するわけではないことはすぐわかる。同質の情報を得るためにはいくつかの異なる分析を行い複合して評価する必要があるだろう。ま

た、代替する方法論には、前節で推定された広い温度範囲にわたるブロードな転移においても有意な解析を行えるポテンシャルが求められる。そのための条件としては、天然状態のタンパク質と変性したタンパク質間のシグナル変化が大きい分析法であること、シグナルのS/N比および再現性が極めて良好な分析法であることが望ましい。

円偏光二色性 (CD) 法は、左右円偏光の吸収の差を測定する分光学的方法で、通常キラルな物質の分析に用いられる。天然状態のタンパク質と変性したタンパク質のCDは大きく異なることから、タンパク質の立体構造の解析にも頻りに利用される測定法である。ただし、シグナルのS/N比および再現性はあまりよくないという欠点をもつ。筆者らは、この欠点を補うために、単一波長の測定ではなく、異なる波長で測定した複数のCD強度 (正しくはモル楕円率) の温度変化データを同時に解析することにした。複数の温度変化データの解析とは、すなわち、測定データを行列として扱うことに相当するが、このような解析にはケモトリックスと呼ばれる統計学的手法が有効である。ケモトリックスとは、化学の分野に特化した多変量解析をはじめとする複数の手法の総称のことであるが、その全容については成書<sup>11)</sup>に譲り、ここでは筆者らが行ったケモトリックスの一手法である特異値分解 (SVD) を簡単に解説する。

ある熱力学的状態  $i$  の波長  $\lambda$  における単位モル濃度あたりのCD強度を  $K_i(\lambda)$ 、状態  $i$  の温度  $T$  におけるモル濃度を  $C_{i,T}$  とすると、溶液全体のCD強度  $X_T(\lambda)$  は、

$$X_T(\lambda) = \sum_i^N C_{i,T} K_i(\lambda) \quad (1)$$

とあらわすことができる。ここで、 $N$  は溶液全体に存在する熱力学的状態の総数である。これは、いわゆるランベルト・ベールの法則に対応する関係である。ところで、式(1)は以下のように行列で書きあらわすこともでき、

$$\mathbf{X} = \mathbf{C}\mathbf{K}^T \quad (2)$$

ここで  $\mathbf{X}$ 、 $\mathbf{C}$ 、 $\mathbf{K}$  は、それぞれ  $T$  と  $\lambda$ 、 $T$  と  $i$ 、 $\lambda$  と  $i$  を行ベクトルと列ベクトルとしてもつ行列である。また、 $\mathbf{K}^T$  は  $\mathbf{K}$  の転置行列を意味する。 $\mathbf{C}$  または  $\mathbf{K}$  のどちらかが既知であれば、測定したデータ  $\mathbf{X}$  を  $\mathbf{C}$  と  $\mathbf{K}^T$  の積の形に分けることが可能であり、これをスペクトル分解と呼ぶ。しかし、双方とも不明な場合は分解することはできない。

ところで、 $\mathbf{X}$  が任意の直交成分  $p$  の和であるとみなすと、 $\mathbf{X}$  は式(2)と同形で表現することができる。

$$X_T(\lambda) = \sum_j t_{Tj} p_{j\lambda} \quad (3)$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T \quad (4)$$

この場合は、入力行列  $\mathbf{X}$  のみから数学的に  $\mathbf{T}$  と  $\mathbf{P}^T$  に展開す

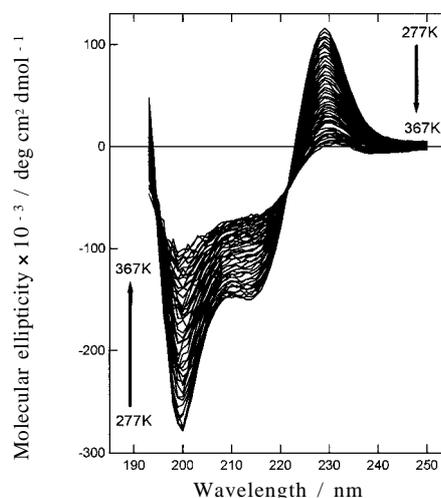


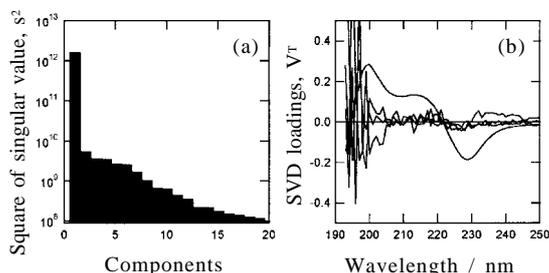
Fig.2 CD spectra of chignolin at various temperatures. The protein was dissolved at 0.98 mM in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5).

ることが可能になる。この操作を主成分分析と呼び、 $\mathbf{T}$  をスコア、 $\mathbf{P}$  をローディングという。同じ積の形であるが  $\mathbf{T}$  と  $\mathbf{P}^T$  は  $\mathbf{C}$  と  $\mathbf{K}^T$  に直接対応するものではない。しかし、ある熱力学的状態の純スペクトルと別の状態の純スペクトルの間に線形従属関係が成立することは通常ないので、これらのスペクトル群は互いに一次独立になる。その結果、直交条件で求めた  $\mathbf{T}$  や  $\mathbf{P}^T$  における有効な階数と、 $\mathbf{C}$  や  $\mathbf{K}^T$  での独立な成分の総数は等しくなる。これはつまり、 $\mathbf{X}$  の主成分分析によって  $N$  を見積もることができること意味する。主成分分析を行う実用的アルゴリズムとしてはNIPALSやSVDが知られている。SVDに従えば、 $\mathbf{X}$  は

$$\mathbf{X} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T \quad (5)$$

のように展開される。式(4)との関係では、 $\mathbf{T} = \mathbf{U}\mathbf{S}$ 、 $\mathbf{P}^T = \mathbf{V}^T$  の対応が成立する。また、 $\mathbf{S}$  は対角行列でその対角成分  $s$  は特異値と呼ばれ、正方行列  $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$  の固有値の平方根に等しくなることが知られている。

以下、実際の解析に即して紹介しよう。ケモトリックスの解析に先立ち、まず、緩衝液中のシニョリンのCDスペクトルを室温、高温、室温と変化させ測定した。その結果、加熱前後のスペクトルはほぼ一致し、シニョリンの構造相転移が可逆であることを確認した。加えて、シニョリンが高温でも化学的に安定で、平衡状態のデータを取得するための長時間の測定が問題ないことも明らかになった。そこで、シニョリンのCDスペクトルを複数の異なる温度で測定した (Fig.2)。この一連のスペクトル群が、ケモトリックス解析での入力行列となる。温度は277 K から 367

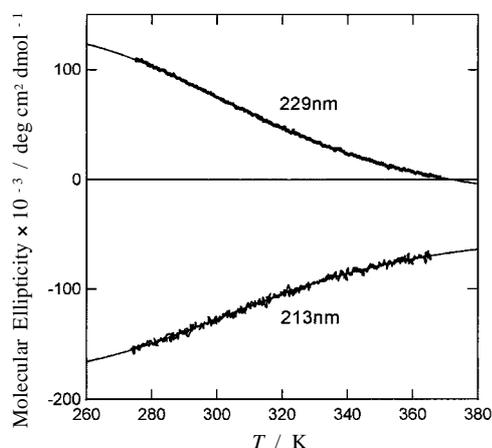


**Fig.3** Results of singular value decomposition (SVD) analysis of CD spectra. Twenty highest singular values (a) and four most important loading spectra (b) are shown, respectively.

Kまで2度刻みで計46ポイント、波長は193～250 nmの範囲を1 nmステップで計58ポイントを記録した(したがって、 $X$ は46×58行列となる) ついで、測定データのスケールングを行った。スケールング処理は必須ではないが、場合により、解析結果の質が改善することが知られている。対象の化学データの種類や条件によっていくつかのスケールング法があるが、ここでは最もシンプルな中心化処理のみを行った。これは、平均スペクトル(すべてのスペクトルを各波長点で算術平均したもの)との差分をとる方法である。中心化によりデータ群の重心を原点に変換することができ、これによりデータの次元をひとつ下げることができる。中心化を施した入力行列 $X'$ のSVDは、

$$X' = X - \bar{X} = USV^T \quad (6)$$

と表記される。実際のSVD計算は、市販の統計ソフトウェアやフリーソフトウェアのRなどを用いれば比較的容易に行うことができる。結果の一部をFig.3に示す。Fig.3(a)は、特異値 $s_i$ の平方を示している。実際には、 $X$ の成分数に依存して46個の特異値が求まるが、ここではその上位20個を表示している。これをみると、 $s_1^2$ は他と比べて2オーダー以上大きく、明らかに第一成分のみが顕著であることがわかる。各成分の寄与率に相当する%VAR値を計算すると、第一成分のみで98%に達する。また、Fig.3(b)では、上位4成分のローディングスペクトルを示しているが、第2スペクトル以降はノイズであることがわかる。これらの結果は、中心化で次元をひとつ下げたことを考慮すると、入力した測定データ行列は、直交する2成分のみで有意に記述しうることを意味している。これより $N$ は2であること、すなわち、シニョリン溶液には、フォールディングした天然状態の分子と完全にアンフォールディングした変性状態の分子に対応する二つの熱力学的状態しか存在しないことが強く推定される。以上のように、シグナルのS/N比と再現性



**Fig.4** CD melting curves of chignolin monitored at 213 and 229 nm. The solution condition is the same as Fig.2. Two theoretical curves (thin line) are calculated using the averaged parameters in Table 1.

**Table 1** Thermodynamic parameters of chignolin upon unfolding.

method	$T_m$ /K	$\Delta H_m$ /kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta S_m$ /J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ /J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
CD (213 nm)	311	25.9	83.5	0 (fixed)*
CD (229 nm)	314	29.3	93.2	0 (fixed)*
NMR	315	26.0	82.3	0 (fixed)*
average	313	27.1	86.3	

\*Analysis was carried out under the both conditions of variable and fixed  $\Delta C_p$ . Yet, the differences between resultant values were not significant.<sup>1)</sup>

に欠点をもつといわれるCDスペクトルの測定からでも、ケモトリックスの手法を利用することによって熱力学的状態数を有意に求めることができた。<sup>\*2)</sup>

熱力学的状態数が2と推定されたことより、二状態相転移モデルを用いて熱力学パラメータの決定を続けて行った。この目的においてはスペクトルではなく、強度変化の大きかった213 nmと229 nmに波長を固定し、溶液の温度を1 K min<sup>-1</sup>で連続的に昇温させCDを測定した。波長の固定により、Fig.2では46ポイントであった温度変化データを、数千ポイント以上で記録することが可能になり、解析の精度を向上させることができる。結果をFig.4に示す。太線が測定データで、細線が最小二乗回帰法により求めた理論曲線である。二つの波長とも良好にフィットしていることが確認できる。また、それぞれの波長から独立に求めたパラメータはお互いに非常に近い値を示した (Table 1)

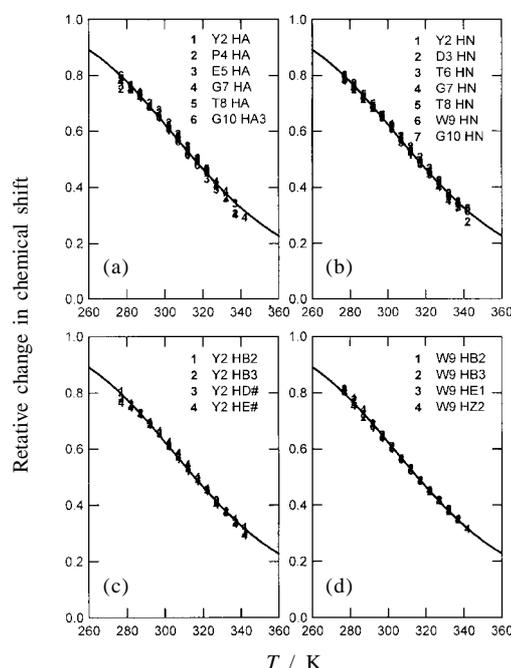
### 5. NMR を利用した原子レベルの協同性解析

NMR はシグナルのS/N が良く、化学シフト値の再現性も非常に高いことが知られている。一方、タンパク質の変性に伴う化学シフト値の変位はそれほど大きくない。これらの特徴はちょうどCD と相補的な関係にある。したがって、CD での結果にNMR の解析を加えて解釈することは有効であると思われる。加えて、NMR の化学シフト値は、分子の構造が変化しない限りほとんど温度の影響を受けず、広い温度範囲でほぼ一定である。この特徴は、逆に、化学シフト値の変位は分子構造の変化のみを反映する良質のパラメータであることを意味する。さらに、タンパク質の相転移挙動を個々の原子ごとに区別して観測できるという大きなメリットをもつ。そこで、CD 測定と同様に、複数の異なる温度でシニョリンの1D <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した。

シニョリンの変性/再生のダイナミクスは、NMR の測定緩和時間に比べて十分に速いため、いわゆる化学交換に伴うピークの多重化は生じない。観測されるNMR ピークは、天然状態と変性状態の量比に依存した化学シフト値を与える。したがって、化学シフト値の温度依存性を解析することによって、シニョリンの構造相転移を定量的に評価することが可能である。既に<sup>1</sup>H-NMR のすべてのピークのアサインメントは、シニョリンの立体構造を決定した際に完了していたので、分子内のどのプロトンがどのように変化するかを原子レベルで追跡できる準備は整っていた。そこで、測定したNMR スペクトルから、シニョリンの主鎖のH<sub>α</sub>、H<sub>N</sub>プロトン、側鎖のH<sub>β</sub>プロトン、芳香族残基の側鎖プロトンの計39個の化学シフト値を読み取り、これを温度に対してプロットした。これらはNMR で観測可能な全プロトンのうちの7割以上に相当する。温度変化(277–342 K)に伴う変位の大きさはプロトンによってさまざま、0.007 ppm しか変わらないものがある一方、大きく0.8 ppm 以上も変わるものもあった。しかし、これらの変位をそれぞれの最大変化量で規格化して相対変位量としてプロットすると、ほぼすべてのプロトンは同一の傾向を示すことが明らかになった (Fig.5)。この結果は、シニョリンではすべての原子が同期して協同的に構造変化している事実を示している。さらに、これらのNMR データを前節と同じ二状態相転移モデルを用いて解析したところ、得られた熱力学パラメータはCD 解析の結果とほぼ同じ値であった (Table 1)。

### 6. シニョリンの熱力学的解析が意味すること

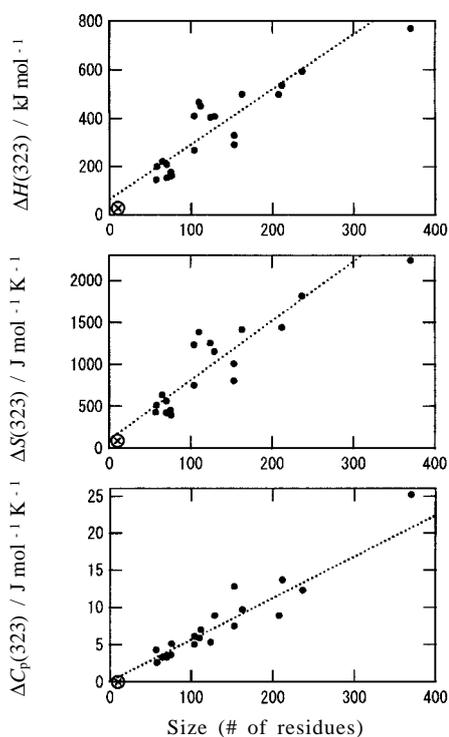
CD 測定の解析から、シニョリンの熱変性は可逆であり系内の熱力学的状態数は2であることが示された。またNMR の解析から、シニョリンは原子レベルで同期した単一



**Fig.5** NMR melting curves chignolin monitored at various protons. Backbone H<sub>α</sub> protons (a), backbone H<sub>N</sub> protons (b), Y2 side chain protons (c), and W9 side chain protons (d) are illustrated. Relative changes in chemical shift values are rescaled to correspond to the molar fraction of the folded state. Four theoretical curves (solid line) are calculated using the averaged parameters in Table 1.

のモードの構造変化を示すことが明らかとなった。これらの結果は本質的に同一の事象を意味しており、かつその事象を異なる側面から記述することで互いの結論を強固なものとしている。その事象とは、シニョリンの変性は可逆的かつ協同的な構造相転移であるということである。これに至り、筆者らが目指した、シニョリンが“タンパク質”であるという“証明”が完遂された。

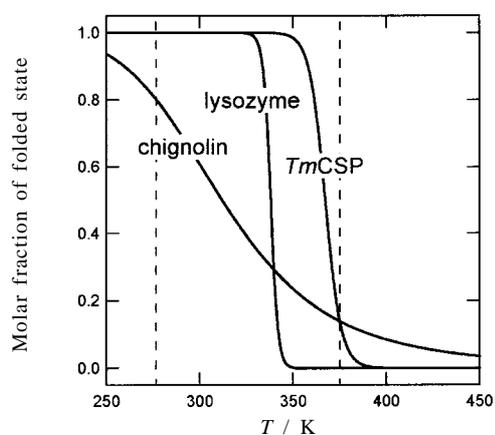
ここに紹介した解析の最大の目的は上記の結論を得ることであった。そして、その結論は序説でふれた議論へとつながっていく。しかし、本稿ではあえてその最大の目的に関する議論は除外して、付加的に得られるいくつかの論点・考察を簡単に紹介したい。まずは、マイクロDSCの限界の話である。CD とNMR から求めたシニョリンのエンタルピー差は、Table 1 に示すように27 kJ mol<sup>-1</sup>程度であった。この値は、先に記したFig.1の曲線cにほぼ相当する。このことは、少なくとも実質的にはマイクロDSCで解析困難と予想される測定対象を、紹介した手法ならば解析可能



**Fig.6** Size dependence of thermodynamic parameters of proteins. Changes in enthalpy, entropy, heat capacity at 313 or 323 K of chignolin (open circle) and various proteins (dot) are plotted as the function of their chain lengths. Parameters except chignolin are cited from a literature.<sup>12)</sup>

であることを意味している。また、タンパク質の協同性に関して、DSCでは $\Delta H^{cal}$ と $\Delta H^{cal}$ の比較にもとづき評価するのに、本手法は全く別の観点からの多角的な検討で評価し、結果的に同等の情報をもたらしている。さらに、今回は小さなタンパク質を解析する目的で用いたが、本手法は原理的に対象を限定するものではない。これらの点に鑑み、本稿で紹介した解析手法は、熱測定を補強し、時には代替することも可能な方法論として、今後さまざまな場面で活用されることを期待したい。<sup>\*3</sup>

第二は、シニョリンの熱力学パラメータである。精度良く得ることができたこれらの値に、どのような意味があるのだろうか。Fig.6に、シニョリンの値と、報告されているいくつかのタンパク質の値とをあわせて図示する。これより、シニョリンの値は、どのパラメータにおいても極めて小さいことがわかる。しかし、それと同時に、多くの天然タンパク質間で成立する相関を外挿した同じ直線上にシニョリンが位置していることもわかる。これはつまり、仮に分子のサイズで規格化すれば、シニョリンの熱力学的特性



**Fig.7** Molar fractions of the folded state of chignolin, human lysozyme, and *Thermotoga maritime* cold shock protein (*TmCSP*). Freezing and boiling points of water are indicated with broken lines. Parameters for lysozyme and *TmCSP* are cited from literatures.<sup>14,15)</sup> All three proteins are reported to exhibit a two-state phase transition.

は何ら特別のものではないことを意味している。言い換えれば、これらの熱力学パラメータは、シニョリンが特異な原理に則った例外的な存在ではなく、多くの天然タンパク質と同様の安定化機構にもとづいて構造化した“タンパク質”であるという事実を物語っている。絶妙のエンタルピー・エントロピー相殺 (thermodynamic homeostasis) の結果として実現するぎりぎりの安定性 (marginal stability)、および分子内の相互作用のフラストレーションを最小化することによりもたらされる all-or-none タイプの構造協同性は、“タンパク質”の原則として、シニョリンにおいても変わることなく厳として成立している。

第三は、タンパク質の化学進化に関する示唆である。生命の起源は、現代科学の最大の難問のひとつと思うが、そのシナリオとして近年最も支持を得ているものが海底熱水噴出孔仮説である。ここを生命の起源とする根拠は、600 Kにまで達する熱水エネルギーの存在と、種々の酸化還元反応を無酸素環境で促すことができる硫化水素やメタンの存在に因る。そして、何より光の届かないこの数千メートルの深海底で現実にさまざまな生物が噴出孔の周囲で生存しているという事実である。これまで、この熱水噴出孔を模したフローリアクターと呼ばれる非平衡の高温高压装置を用いて、2~10残基程度のオリゴペプチドがアミノ酸水溶液を原料として合成されることが実験室レベルで確認されている。<sup>13)</sup> しかし、現存する天然タンパク質の平均鎖長に相当する100残基前後のポリペプチドは確認されていないことから、オリゴペプチド以上の重合反応は原理的に進

まないのでないかという批判がある。また、仮にこの長さのタンパク質が合成されたとしても、この極限条件のもとでは立体構造は安定に存在できないことから、特異的な分子認識や自己触媒といった生命の発生に必要とされる次のステップに進むことができないのではないかという批判もある。

さて、ここで、Fig.7を見ていただきたい。これは、フォールディングした天然状態の分子のモル分率を示したもので、実験的に決定したシニョリン、ヒトリゾチーム、高度好熱菌由来のcold shock protein ( $TmCSP$ )の熱力学パラメータにもとづいて計算している。これを見ると、リゾチームや $TmCSP$ に比べてシニョリンの相転移は著しくブロードであることが改めてわかる。ここで、念のため確認しておく、このブロードな曲線は、シニョリンの分子構造が連続的に変化している様子を表すものではない。 $\Delta H$ が小さいということは、 $\Delta G$ の温度依存性が小さいということであり、このことは、転移点から大きく離れた温度においてもシニョリンでは天然状態と変性状態の化学ポテンシャルにあまり差が生じないことを意味する。この結果、シニョリンの場合、沸点以上の温度においても天然状態の分子がある一定割合、平衡論的に存在することを許す。これは、同じ温度でリゾチーム分子のほとんどが変性している状況と比較すると極めて興味深い。つまり、天然状態のモル分率という指標で評価するならば、エンタルピー差の小さい、すなわちサイズのより小さいタンパク質のほうが高温で安定だということだ。小さいタンパク質のほうが安定であるという命題は、一見逆説的に感じるが、熱力学的に整理して考えれば当然の帰結にも思える。

以上の考察をふまえると、上述の海底熱水噴出孔仮説への批判に対し、別の見かたが可能になる。つまり、現存する100残基前後のタンパク質にとっては存在が困難な苛酷な環境であっても、小さいタンパク質なら生きながらえる可能性があることというのだ。加えて、わずか10アミノ酸残基のシニョリンが固有の構造を形成した事実は、この程度のサイズの分子でも特異的な分子認識や自己触媒といった化学進化の次のステップに進むことが不可能ではないことを示唆している。

## 7. おわりに

熱測定は、多くの現象に共通する「熱」という性質に着目する分析法であることから、分野を問わない幅広い利用が可能である。実際、物理学、化学、地球科学、生物学等の基礎応用研究で、また産業分野においても、品質管理や工程管理、標準化や規格化などの目的で広範に活用されている。しかし、マクロな情報である「熱」のみからその由来を一義的に求めることは容易ではなく、個別事象やミク

ロなメカニズムの解釈は一般的に困難を伴うことが多い。したがって、「熱」とは異なる性質の分析を熱測定とあわせて行うことが望ましい。

本稿では、小さなタンパク質の構造相転移を評価するための解析手法として、ケモトリックスを利用した分光学的分析法とNMRによる原子レベルの解析法を組み合わせた例を紹介した。これら一つひとつについては特別新しい工夫があるわけではないが、それらを合理的に組み合わせることで、マイクロDSCでは限界と思われる対象の分析に成功した意義は少なくないだろう。筆者にとって、物性測定はデータハンドブックをつくるための作業ではない。求めた物性値の中にどのような意味を見出せるか、それによってどのような理解を進めることができるかに価値があると考えている。したがって、苦慮の末に得たシニョリンの熱力学パラメータに、構造安定化機構の普遍性と化学進化に対するあらたな視点という意味を見出すことができたのは筆者らにとって収穫であった。ところで、上に熱測定とあわせて別の分析法を行うことが望ましいと述べたが、今回のケースは、熱測定とあわせてというより熱測定に代えてという文脈の紹介になった。しかし、本稿に熱測定の重要性を軽視する意図は毛頭ない。シニョリンの分析に際しての問題点の明確化と戦略の立案に、先達の研究と筆者自身のこれまでのDSC測定の経験は不可欠であった。その意味では、今回の研究も熱測定とあわせて進めたものと理解している。

## 謝 辞

執筆にあたりケモトリックスに関する有益なコメントをいただいた産業技術総合研究所生物機能工学研究部門の澤田義人氏に感謝します。

## 文 献

- 1) S. Honda, K. Yamasaki, Y. Sawada, and H. Morii, *Structure* **12**, 1507 (2004).
- 2) 本田真也, 蛋白質核酸酵素 **50**, 427 (2005).
- 3) 本田真也, 化学と工業 **58**, 940 (2005).
- 4) 高橋克忠, 熱測定 **1**, 61 (1974).
- 5) 高橋克忠, 深田はるみ, 熱測定 **4**, 165 (1977).
- 6) 高橋克忠, 深田はるみ, 熱測定 **14**, 20 (1987).
- 7) 深田はるみ, 高橋克忠, 熱測定 **4**, 117 (1977).
- 8) 城所俊一, 熱測定 **14**, 143 (1987).
- 9) 上平初穂, 熱測定 **15**, 130 (1988).
- 10) S. Honda, N. Kobayashi, and E. Munekata, *J. Mol. Biol.* **295**, 269 (2000).
- 11) 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄, 「化学者のための多変量解析」, 講談社サイエンティフィック (2002).

## 小さなタンパク質の構造相転移を解析する

- 12) G. I. Makhatadze and P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **47**, 307 (1995).
- 13) T. Goto, Y. Futamura, Y. Yamaguchi, and K. Yamamoto, *J. Chem. Eng. Jpn.* **38**, 295 (2005).
- 14) K. Takano, K. Ogasahara, H. Kaneda, Y. Yamagata, S. Fujii, E. Kanaya, M. Kikuchi, M. Oobatake, and K. Yutani, *J. Mol. Biol.* **254**, 62 (1995).
- 15) D. Wassenberg, C. Welker, and R. Jaenicke, *J. Mol. Biol.* **289**, 187 (1999).
- 16) S. Nakamura and S. Kidokoro, *Biophys. Chem.* **109**, 229 (2004).
- 17) S. Nakamura and S. Kidokoro, *Biophys. Chem.* **113**, 161 (2005).

### 脚 注

- \*1 補足すると、本節の「マイクロDSCの限界」はDSCの原理的可能性を否定するものではない。現行装置の性能にもとづく事実上の限界のことであり、特に感度よりも精度の限界を意図している。試料溶液の入れ替えに伴うベースラインの再現性が実質的に数 $\mu\text{J K}^{-1}$ に納まる極めて安定な装置であれば、曲線 $e$ の解析も不可能でないかもしれない。
- \*2 本節では、複雑さを避けるため、純スペクトル $K_i(\lambda)$ は温度に依存しないとの前提のもとに論を進めたが、温度変化を考慮した解析を行うことも可能である。純スペクトルが温度変化する場合の主成分分析は、変化量がもとの純スペクトルに対し線形従属となるか否かで、その結果が分かれる。前者の場合(たとえば相似形のスペクトルが単に拡大・縮小するような場合)、主成分分析から得られる階数に変化はない。一方、後者の場合(たとえば温度依存性が波長により異なり結果として純スペクトルの形が大きく変わる場合)、主成分分析から得られる階数は増加する。したがって、純スペクトルが温度に依存する可能性がある場合は、主成分分析のみから熱力学的状態数を求めることは一義的にはできず、他の情報と総合して判断することが必要になる。シニョリンの場合は、得られた階数が2であったので、これを熱力学的状態数1 + 温度変化成分1

とみなすことも数学的には可能であったが、この解釈は分子論的には合理性を欠くこと、また、Fig.2で示される明瞭な等吸収点を根拠に純スペクトルの温度変化を棄却できることから、階数2を熱力学的状態数2 + 温度変化成分0として解釈した。

- \*3 最近、城所らは、等温滴定型熱量計を利用した酸滴定でタンパク質の構造相転移を評価するあらたな方法を開発し<sup>16)</sup>シトクロムcの天然状態 - モルテングロビュール状態間の転移のエンタルピー差が $30 \text{ kJ mol}^{-1}$ 程度であることを報告しているが<sup>17)</sup>この方法もマイクロDSCの限界を回避するアプローチのひとつといえる。これらの方法の発展は、従来困難であったエンタルピー差の小さい転移現象の解析を可能にし、より進んだ理解を促す契機となると思われる。

### 要 旨

小さなタンパク質の構造相転移を評価するための解析手法に関して解説する。まず、タンパク質の研究における熱測定的重要性について概説する。ついで、タンパク質の構造相転移の解析法としては定法となっているマイクロDSC分析が、タンパク質のサイズが小さくなると解析困難になる状況を説明する。そして、この問題を克服するために行った、ケモトリックスを利用した分光学的分析とNMRによる原子レベルの分析について紹介する。最後に、これらの解析から得られた熱力学的結果の意味について考察する。

本田真也 Shinya Honda  
独立行政法人産業技術総合研究所,  
National Institute of Advanced Industrial  
Science and Technology, TEL. 029-861-  
6184, FAX. 029-858-9200, e-mail:  
s.honda@aist.go.jp  
研究テーマ: タンパク質における部分と  
全体  
趣味: 読書, テレビ