

## ウシインスリンのDSC測定

深田はるみ, 高橋克忠

(平成8年1月29日受理)

## Differential Scanning Calorimetric Study of Bovine Insulin

Harumi Fukada and Katsutada Takahashi

(Received January 29, 1996)

The thermal unfolding of insulin was studied at various pHs by an adiabatic DSC. The involvement of self-association of insulin in both folded and unfolded states caused complex profiles in DSC curves. The exothermic heat effect due to the aggregation of the unfolded molecule was found to be associated with the endothermic heat effect due to the unfolding of native insulin at neutral pH and at pHs below 2. At a pH range from 2 to 4.5, the unfolding was quantitatively reversible. DSC curves observed in acetic acid solution where the molecular association is negligible showed a broad peak indicating that the monomeric insulin has a relatively loose structure in the aspect of thermodynamic cooperativity.

## 1. はじめに

インスリンはA鎖(21アミノ酸残基)とB鎖(30残基)が2本のS-S結合で結ばれた分子量5,700の最も小さい蛋白質である。X線結晶構造解析<sup>1), 2)</sup>やNMR解析<sup>3), 5)</sup>などにより結晶および溶液中の立体構造の詳細が明らかにされている。非常に会合しやすく、0.1%前後の濃度において単量体として存在するのは、アルコールの添加<sup>6)</sup>や酢酸水溶液<sup>7)</sup>、あるいはpH 9.5以上のアルカリ溶液中のみである<sup>8), 9)</sup>。X線解析では6量体として結晶化され、溶液中では2量体~4量体~6量体~それ以上の会合体の存在が認められている<sup>10), 12)</sup>。

小さい蛋白質分子の場合、変性エンタルピー変化は小さく、したがって、DSCカーブはかなりブロードになることがvan't Hoff式により予測される。一方、会合体を形成し、それらが協同的に変性すると、みかけの分子量が大きくな

るためにエンタルピー変化も大きくなり、その結果、よりシャープなピークが観測されるはずである。会合体形成とDSCカーブとの対応を検討するためのモデル系にもなり得ることから、インスリンの変性挙動をpHを変えてDSCにより測定した。

## 2. 実験

ウシインスリン(亜鉛0.5%含有)をSigma社より購入し、亜鉛を除去するために10mM HCl<sup>13)</sup>に溶解後、同じHCl溶液を交換しながら5°Cで十分に透析を続けた。さらに、測定緩衝液で透析し、試料とした。緩衝液は、グリシン-塩酸(pH 1.5~3.5)、酢酸(pH 4~4.5)、リン酸(pH 7~8)、炭酸(pH 9.6)を用いた。インスリン濃度は276 nmにおける紫外吸収測定より吸光係数 $A = 1.05 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ を用いて決定した<sup>14)</sup>。断熱型DSC DASM-4<sup>15)</sup>を用い、昇温速度 $1 \text{ K min}^{-1}$ で測定した。比較セルには透析外液を入

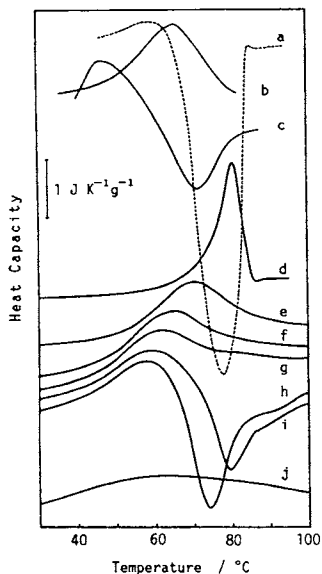
大阪府立大学農学部生物物理化学研究室：〒593 堺市学園町1-1

Laboratory of Biophysical Chemistry, College of Agriculture, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 593, Japan

れた。一部の測定には、DASM-1M<sup>16)</sup>も使用した。

### 3. 結果および考察

種々のpHにおけるDSC測定結果を、上方向を吸熱としてFig.1に示す。濃度は各pHで約2 mg ml<sup>-1</sup>である。吸・発熱ピークが観測され、複雑なpH依存性を示している。発熱過程は他の多くの蛋白質の熱変性でも知られているように凝集に基づくと考えられる。pH 8になるとこの効果は小さく、明確な吸熱ピークが見られる。さらに、pH 2以下でもpH 7と同様のカーブを描くが、測定後の溶液に白濁が認められ、これも凝集による発熱と解釈される。10%酢酸のpHは約2であるが吸熱ピークしか観測されないことから、イオン強度あるいは塩素イオン濃度の増大が凝集を促しているのかもしれない。pH 9.6では単量体として存在するが<sup>8)</sup>、大きな発熱ピークしか得られなかった。この場合には、凝集以外に、アルカリ領域のために変性と同時にS-S結合の切断や他の修飾反応が並行して起こっている可能性もある。アルカリpHでも凝集するのはチロシンやリジンのプロトン解離が起り始めることによる正味の正電荷の減少がもたらす現象であろう。pH 2.5~4.5の範囲では、通常の立体構造のほどける反応に伴う吸熱として捉えることができる。この



**Fig.1** DSC curves of insulin observed for the thermal transition at various pHs. Insulin concentration was ca. 2 mg ml<sup>-1</sup>. a : pH 9.6, b : pH 8.0, c : pH 7.0, d : pH 4.5, e : pH 3.5, f : pH 3.0, g : pH 2.5, h : pH 2.0 and i : pH 1.5, j : 10% acetic acid, pH 2.

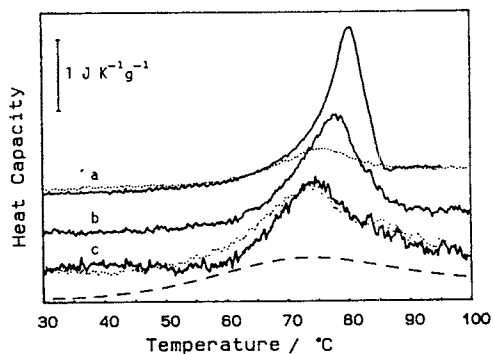
濃度ではいずれのpHでも会合状態にある<sup>10)・12)・17)</sup>。

pH 4.5においてインスリン濃度を変えて測定した結果がFig.2である。わずか2~0.5 mg ml<sup>-1</sup>の範囲で変化させるだけでピークの形状に顕著な濃度依存性が見られる。低濃度ではほぼ対称的なピークであるが、濃度が高くなればピークを過ぎて急激にベースラインへ戻る特徴的なカーブを示す。昇温させた後、室温に戻し、再度昇温させたときの結果が図中の点線のカーブである。低濃度ではほぼ可逆変性であるが、濃度を高くすると低温側に対称な小さいピークが現れるのみである。変性後の溶液には白濁が認められることから、昇温後溶液中に溶解していた分子が可逆性を示したものと考えられる。その分子は会合状態が小さく、より低温で変性すると推測される。図中にインスリン単量体が独立に変性すると仮定した場合に得られるDSCカーブを破線で描いた。測定されたピーク面積より得られるエンタルピー変化を用い、van't Hoff式 ( $d \ln K / dT = \Delta H / RT^2$ ) に基づいて過剰熱容量曲線  $C_p(T)$  が与えられる<sup>9)</sup>。ここで、変性を二状態転移  $N \rightleftharpoons D$  とし、温度  $T$  における変性状態  $D$  の割合を  $\alpha$  で表すと、

$$C_p(T) = \frac{\alpha(1-\alpha)\Delta H^2}{RT^2}$$

により変性に伴う過剰熱容量曲線を描くことができる<sup>18)</sup>。

Fig.2には、変性の $\Delta H$ を100 kJ mol<sup>-1</sup>、変性熱容量変化 $\Delta C_p$ を0.6 kJ K<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>として導いた曲線が破線で描かれている。理論曲線の方がブロードであることから、低濃度の



**Fig.2** DSC curves of insulin observed for the thermal transition at pH 4.5. Insulin concentrations were 2.5 (a), 1.0 (b) and 0.5 (c) mg ml<sup>-1</sup>. The dotted lines are reheating curves of a and c. The broken line was drawn with  $\Delta H = 100$  kJ mol<sup>-1</sup> and  $\Delta C_p = 0.6$  kJ K<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup> on the basis of van't Hoff equation.

場合でも単量体ではなく、会合体が協同的に構造転移し、しかも、ピークがほぼ対称形であることから変性後も会合していることが示唆される。なお、このpHではインスリンは2量体～6量体以上のいくつかの会合状態にあることが知られている<sup>1), 8)</sup>。

さらに酸性のpH 2.5における結果をFig.3に示す。濃度を変化させても形状や位置にほとんど変化が見られない。ただし、110℃以上に昇温させると発熱ピークが現れ、これは濃度に依存した。ピークから得られる変性のエンタルピー変化 $\Delta H = 110 \text{ kJ mol}^{-1}$ を用いて描いた理論曲線(図中の破線)とよく一致しているように見える。しかし、このpHにおいてもまだ会合体の形成があり、この濃度領域では単量体と2量体あるいはそれ以上の会合体との平衡にあることが超遠心法や円偏光二色性測定など<sup>10), 17), 19)</sup>から明らかにされている。したがって単量体の二状態転移に一致することは必ずしも単量体で存在することを意味しない。会合体が中間体を経て変性するか、あるいは会合体が会合体のまま単量体ごとに独立に変性するよう解釈され得る。

会合体の形成が抑えられる10%酢酸中では非常にブロードなピークを与える(Fig.4)。変性前後のベースラインが明確に決められず正確さに欠けるが、変性エンタルピー変化は $125 \text{ kJ mol}^{-1}$ 程度と見積られる。二状態転移すると仮定して得られた理論曲線をFig.4に破線で示した。それと比較すると実測曲線が広がっていることがよくわかる。酢酸溶液中では疎水性相互作用が弱められるために単量体の割合が大きくなる<sup>7)</sup>と同時に分子の協同性が弱くなり、部分的に分子構造の安定性が異なる(異なった温度で変性

する)ように変化したと考えられ、すなわち多状態転移することが示唆される。

会合体を形成しないようB鎖のN末端5残基を除去したヒトインスリンについて20%酢酸中の構造がNMRにより解析<sup>4), 20), 21)</sup>され、X線結晶構造解析より得られている6量体における構造と同様の規則構造を持つが、非常に動きやすい構造をとっていると報告されている。同じ溶媒条件下でDSC測定<sup>22)</sup>も行われ、我々の得た結果と同様に60℃付近に変性温度のある非常にブロードなDSC曲線が得られている。これらのことから単量体では熱力学的にも構造上もかなり緩んでいることが想像される。pH 9においても2量体の形成によりコンホメーション変化することがNMR測定より示され<sup>23)</sup>、単量体と会合体とで分子内パッキングの様子が異なるのかもしれない。しかし、最近、会合しないようアミノ酸を1カ所変異させたヒトインスリンのpH 2.4水溶液中におけるNMR解析より、結晶構造との違いはわずかであることが明らかにされた<sup>5)</sup>。溶媒条件による構造の違いの可能性もあるが、いずれにしても、ここで得られたDSC曲線の多様性は、主としてインスリンの会合状態の違い(天然・変性状態ともに)に起因すると考えて良いであろう。ピーク温度の違いはpHよりもむしろ会合状態の違いすなわち濃度により大きく影響を受けることがpH 4.5における濃度依存性の結果より判断される。ヒトインスリンにおいて、単量体の塩酸ゲアニジン変性の円偏光二色性測定より、pH 6以下では構造安定性に变化のない<sup>6)</sup>ことが示される一方、変性過程に中間体の存在する<sup>24)</sup>ことが示されている。変性中間体の存在は、熱変性においてもDSC曲線

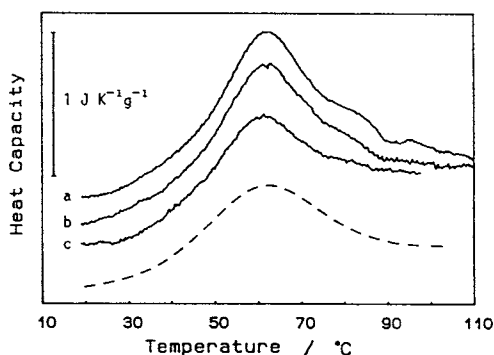


Fig.3 DSC curves of insulin observed for the thermal transition at pH 2.5. Insulin concentrations were 4.1 (a), 3.0 (b) and 2.0 (c)  $\text{mg ml}^{-1}$ . The broken line was drawn with  $\Delta H = 110 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $\Delta C_p = 0.6 \text{ kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$  on the basis of van't Hoff equation.

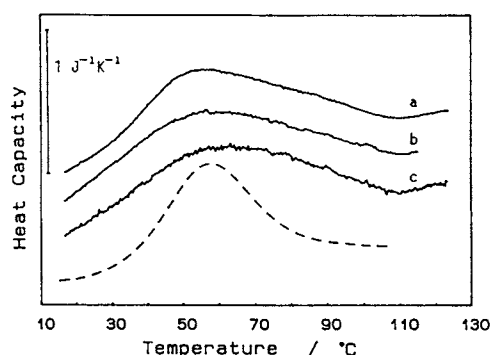


Fig.4 DSC curves of insulin observed for the thermal transition in 10% acetic acid. Insulin concentrations were 6.9 (a), 3.5 (b) and 2.3 (c)  $\text{mg ml}^{-1}$ . The broken line was drawn with  $\Delta H = 125 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $\Delta C_p = 0.6 \text{ kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$  on the basis of van't Hoff equation.

と理論曲線との比較から示唆される。

インスリンの熱安定性の違いは会合状態の違いとして捉えることができ、会合により協同性を示す単位が大きくなるとともに変性温度も高くなると思われる。実際、pH 4.5～2の範囲でpHが高くなるほどピーク温度が高温側へ移りよりシャープな形状を示すようになる (Fig.1)。しかし、一方、単量体モル当たりの $\Delta H$ は実験誤差範囲内で一定かあるいはむしろ小さくなる傾向が見られる。会合体で存在する場合、変性温度は単量体に比べて高くなるが、変性後も完全に単量体へ解離した状態ではなく分子間相互作用が残っているために $\Delta H$ が小さいと考えられる。

### 謝 辞

DASM-1Mによる測定をさせて頂いた米国Yale大学Sturtevant教授に感謝します。

### 文 献

- 1) T.L. Blundell, G.G. Dodson, D.C. Hodgkin and D.A. Mercola, *Adv. Protein Chem.* **26**, 279-402 (1972) .
- 2) E.N. Baker, T.L. Blundell, J.F. Cutfield, S.M. Cutfield, E.J. Dodson, G.G. Dodson, D.M. Hodgkin, R.E. Hubbard, N.W. Isaacs, D.D. Reynolds, K. Sakabe, N. Sakabe and N.M. Vijayan, *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* **319**, 369-456 (1988) .
- 3) M.A. Weiss, Q.-X. Hua, C.S. Lynch, B.H. Frank and S.E. Shoelson, *Biochemistry* **30**, 7373-7389 (1991) .
- 4) Q.-H. Hua and M.A. Weiss, *Biochemistry* **30**, 5505-5515 (1991) .
- 5) S. Ludvigsen, M. Roy, H. Thoegersen and N.C. Kaarsholm, *Biochemistry* **33**, 7998-8006 (1994) .
- 6) C. Bryant, D.B. Spencer, A. Miller, D.L. Bakaysa, K.S. McCune, S.R. Maple, A.H. Pekar and D.N. Brems, *Biochemistry* **32**, 8075-8082 (1993) .
- 7) M.A. Weiss, D.T. Nguyen, I. Khait, K. Inouye, B.H. Frank, M. Beckage, E. O'Shea, S.E. Shoelson, M. Karplus and L.J. Neuringer, *Biochemistry* **28**, 9855-9873 (1989) .
- 8) E. Fredericq, *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 218-228 (1956) .
- 9) W. Kadima, L. Oegendal, R. Bauer, N. Kaarsholm, K. Brodersen, J.F. Hansen and P. Porting, *Biopoly-*

- mers* **33**, 1643-1657 (1993) .
- 10) D.D. Jeffrey and J.H. Coates, *Biochemistry* **5**, 489-498 (1966) .
- 11) H. Pekar and B.H. Frank, *Biochemistry* **11**, 4013-4016 (1972) .
- 12) S. Hvidt, *Biophys. Chem.* **39**, 205-213 (1991) .
- 13) L.W. Cunningham, R.L. Fisher and C.S. Vestling, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5703-5707 (1955) .
- 14) B.H. Frank and J. Veros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 155-160 (1968) .
- 15) P.L. Privalov and S.A. Potekhin, *Methods Enzymol.* **131**, 4-51 (1986) .
- 16) P.L. Privalov, V.V. Plotnikov and V.V. Filimonov, *J. Chem. Thermodyn.* **7**, 41-47 (1975) .
- 17) A.E. Mark, L.W. Nichol and P.D. Jeffrey, *Biophys. Chem.* **27**, 103-117 (1987) .
- 18) P.L. Privalov and N.N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* **86**, 665-684 (1974) .
- 19) R.S. Lord, F. Gubensek and J.A. Rupley, *Biochemistry* **12**, 4385-4392 (1973) .
- 20) Q.-X. Hua, M. Kochoyan and M.A. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2379-2383 (1992) .
- 21) R. Boelens, M.L. Ganadu, P. Verheyden and R. Kaptein, *Eur. J. Biochem.* **191**, 147-153 (1990) .
- 22) Q.-X. Hua, J.E. Ladbury and M.A. Weiss, *Biochemistry* **32**, 1433-1442 (1993) .
- 23) K.L. Williamson and R.J.P. Williams, *Biochemistry* **18**, 5966-5972 (1979) .
- 24) R.L. Millican and D.N. Brems, *Biochemistry* **33**, 1116-1124 (1994) .

### 要 旨

水溶液中におけるインスリンの構造の熱転移を断熱型DSCを用いて種々のpHで調べた。インスリンは非常に会合しやすく、その会合状態の違いがDSC曲線に鋭敏に反映されていた。中性pHおよびpH 2以下では変性による吸熱ピークの出現と同時に変性後の凝集に伴う発熱ピークが観測され、pH 2～4.5ではほぼ可逆の吸熱ピークが得られた。分子会合が弱い酢酸水溶液中では非常にブロードな曲線になり、単量体の状態ではインスリン分子の熱力学的協同性はかなり低いことが示唆された。