

解 説

## 溶液中におけるタンパク質の熱物性

神山 匡  
近畿大学 理工学部

(受取日 : 2012 年 2 月 22 日, 受理日 : 2012 年 4 月 3 日)

### Thermodynamic Properties of Protein in Solution

Tadashi Kamiyama  
Department of Chemistry, Kinki University

(Received Feb. 22, 2012; Accepted Apr. 3, 2012)

To reveal the relationships between structure, property, and function of protein, we have determined the various thermodynamic properties (partial specific volume, compressibility, expansibility coefficient, intrinsic viscosity, activation free energy for viscous flow, preferential solvation, and  $T_m$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ , and  $\Delta C_p$  for conformational change) of proteins in solution with various conditions as temperature, pressure, solvents, additives, and protein modifications. The cyclodextrin (CD) destabilized the folded state of lysozyme by stabilizing the unfolded state by including hydrophobic part of unfolded state into interior of CD. The destabilization effect of CD was weaker than guanidine hydrochloride and was dependent on the interior diameter and the substituent. The strong water-dimethyl sulfoxide (DMSO) interaction caused lysozyme unfolding with increasing partial specific volume and intrinsic viscosity. DMSO was bound to lysozyme at low DMSO concentration and was preferentially excluded from lysozyme at high DMSO concentration. The sorbitol stabilizes protein through enhancing the hydrophobic interaction in protein. The molten globule state induced by sorbitol had thermodynamic properties somewhat like native state by preferential solvent interactions and osmotic pressure of the medium. Thus, thermodynamic properties can sensitively reflect the conformational changes and interactions with solvent, and hence will be an effective approach to give quantitative and valuable index to protein.

Keywords: protein, stability, partial specific volume, compressibility, viscosity, cyclodextrin.



神山 匡  
Kamiyama Tadashi  
E-mail: Kamiyama@chem.kindai.ac.jp

## 1. はじめに

電離性高分子であるタンパク質はそれぞれが固有のミノ酸配列を持ち、規則正しく折れたたまった固有の立体構造を形成している。X線結晶構造解析で決定されるタンパク質の構造はある瞬間の安定構造（スナップショット）であり、溶液という溶媒分子の海に浮かぶタンパク質の構造は熱振動の影響を受けて大きく揺らいでいる。酵素活性の至適温度や反応速度に反映されるように、タンパク質が十分に機能するためには安定性やダイナミクス（揺らぎ）などの物理化学的性質（物性）を無視することはできず、近年ではアミロイドに代表されるようなタンパク質由来の疾患に注目が集まるなど、タンパク質の物性が一層重要視されている。どのような“物性”がどのような“構造”に起因し、どのような“機能”に有効なのか。この“構造”と“物性”と“機能”の相関を解明することが新しい機能を持つタンパク質の設計、機能改変などタンパク質工学や医薬品開発において重要な課題となっている。<sup>1)</sup>

タンパク質には多くの疎水性部位が存在しており、天然状態において疎水性残基の多くは水との接触を避けるためいわゆる疎水性相互作用によってタンパク質内部に埋もれ、疎水コアを形成している。このような疎水性相互作用に加え、ペプチド結合、ジスルフィド結合などの共有結合や、水素結合、静電的相互作用などの非共有結合のエンタルピー的安定化と構造や溶媒和に起因するエントロピー的効果の微妙なバランスによって僅かな安定性でタンパク質の立体構造は形成されている。そのため、温度や圧力、溶媒などの外的環境の変化によって、タンパク質の立体構造を形成している相互作用が直接的・間接的に影響を受け、タンパク質は容易に構造変化する。このような外的環境に対する応答はタンパク質の個性を反映しており、個々の熱力学量変化を明らかにすることがタンパク質の“物性”解明につながる。

筆者はこれまでタンパク質の“構造”、“物性”、“機能”の相関解明を目指し、種々の外的環境やタンパク質改変によるタンパク質の構造変化や熱力学量を測定し、“変性剤、糖、ポリオールなどの添加物効果”<sup>2-10)</sup> “タンパク質の温度-部分比容-部分圧縮率の相関”<sup>11,12)</sup> “アミノ酸置換・基質結合の効果”<sup>13-16)</sup> “ジスルフィド結合の効果”<sup>17)</sup> “熱測定によるタンパク質の劣化速度解析”<sup>18)</sup> などについて明らかにしてきた。本解説ではいくつかの例をもとに、溶液中のタンパク質物性の測定方法と外的環境がタンパク質の構造や熱力学的性質に与える影響について紹介する。

## 2. 実験

### 2.1 断熱型示差走査微小熱量計 (DSC)

タンパク質の熱分析は、温度を変化（昇温・降温）させた際に生じるタンパク質の立体構造変化に伴う熱の出入りを測定するものである。タンパク質溶液と溶媒との差からタンパク質の見かけの熱容量 $\Delta C_p^{app}$ の温度依存性が決定され、構造転移に伴うエンタルピー変化 $\Delta H_{cal}$ や熱容量変化 $\Delta C_p$ 、転移温度 $T_m$ 、半値幅 $T_{1/2}$ が求まり、間接的には構造転移に伴う自由エネルギー変化 $\Delta G$ やエントロピー変化 $\Delta S$ を決定することができる。一般にタンパク質の構造転移は吸熱反応であり、また、変性状態のほうが天然状態よりも溶媒露出表面が増加（水和量が増加）するため $\Delta C_p$ は正になる。ギブズ・ヘルムホルツ式（(1)式）より $\Delta G$ （または平衡定数 $K$ ）の温度依存性から求まるファンツホッフ・エンタルピー（ $\Delta H_{cal}$ ）と $\Delta H_{cal}$ を比較することで、熱変性過程の状態数に関する情報が得られ、ドメイン数、中間体の決定

に利用できる。<sup>19)</sup>

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta H_{cal}}{RT^2} \quad (1)$$

DSCのセルは体積一定であるため、セル中のタンパク質溶液にはタンパク質の体積に対応する量の溶媒が少なくなり、 $\Delta C_p^{app}$ は小さくなる。そこで、溶媒の部分モル体積 $V_{sol}$ 、溶質の部分モル体積 $V_{solute}$ 、溶媒の熱容量 $C_{sol}$ 、セル内の溶質の物質質量 $m_{solute}$ を用い、タンパク質の熱容量 $C_p$ を見積もることができる。

$$C_p = \frac{\Delta C_p^{app}}{m_{solute}} + \frac{C_{sol}}{V_{sol}} V_{solute} \quad (2)$$

$C_{sol}/V_{sol}$ は $4.0 \sim 4.2 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ 程度の値であり、蛋白質の部分比容はおよそ $0.70 \sim 0.72 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ である。そのため、右辺の第二項はおよそ $3.0 \times M_w$ （蛋白質の分子量） $\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ <sup>19)</sup>と見積もることができるが、より正確な決定には後述のような密度測定から $V_{solute}$ を求める必要がある。

### 2.2 部分比容

温度・圧力が一定の条件下で、溶液に溶質（タンパク質）を溶解した時の溶質単位質量あたりの溶液体積の変化量を部分比容（partial specific volume,  $v^0$ ）といい、溶液中におけるタンパク質のコンパクトさを反映する。実験的には下式を用いて無限希釈における部分比容 $\bar{v}^0$ が決定できる。<sup>20)</sup>

$$\bar{v}^0 = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \left( 1 - \frac{\rho - c}{\rho_0} \right) \quad (3)$$

ここで、 $\rho_0$ 、 $\rho$ は溶媒、溶液の密度（ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ）、 $c$ はタンパク質の濃度（ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ）であり、 $(\rho - c)/\rho_0$ の項は溶液体積中の溶媒体積を反映している。タンパク質の部分比容を決定するためには溶液の正確な密度測定と濃度決定が必要不可欠であり、筆者は小数以下6桁まで測定可能なAnton Paar社製の振動式密度計(DMA02C, DMA512)を用いている。水溶液中のタンパク質の部分比容は(i)タンパク質の構成原子のvan der Waals体積の和 $v_c$ 、(ii)不完全なパッキングによって生じる分子内の空間(cavity)  $v_{cav}$ 、(iii)水和や溶媒和によって生じる体積変化 $\Delta v_{sol}$ 、(iv)分子の熱振動に起因する“熱的(thermal)体積 $v_T$ ”<sup>21)</sup>の和として表される。

$$v = v_c + v_{cav} + \Delta v_{sol} + v_T \quad (4)$$

一般に水和水はバルク水よりも圧縮されているため密度が高く、 $\Delta v_{sol}$ は部分比容を減少させる方向に寄与し、 $v_c$ と $v_{cav}$ と $v_T$ は増加させる方向に寄与する。平均的な球状タンパク質の $v_T$ は統計的に $2.83 \times M_w^{-0.24} (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1})$ と見積もられている<sup>21)</sup>。 $v_c$ はタンパク質の立体構造の変化に際してほとんど変化しないため、タンパク質の変性、解離会合、基質や補酵素との結合など、構造変化に伴う部分比容の変化は他の項の変化に帰属される。

### 2.3 熱膨張率・圧縮率

異なる温度や圧力で部分比容を決定することにより、タンパク質の熱膨張率 $\alpha$ と等温圧縮率 $\beta_T$ が求まる。

$$\alpha = \frac{1}{v} \left( \frac{\partial v}{\partial T} \right)_p \quad (5)$$

$$\beta_T = -\frac{1}{v} \left( \frac{\partial v}{\partial P} \right)_T \quad (6)$$

$\alpha$ と $\beta_T$ からは熱力学的に体積-エントロピー揺らぎと体積揺らぎを見積もることが出来る。

$$\langle SV - \langle S \rangle \langle V \rangle \rangle = kTV\alpha \quad (7)$$

$$\left\langle (V - \langle V \rangle)^2 \right\rangle = kTV\beta_T \quad (8)$$

ここで、 $k$  はボルツマン定数、 $V$  は一分子あたりの体積である。

温度や圧力による部分比容の変化においても  $v_c$  はほとんど変化しないと見なせることから、結果として熱膨張率と等温圧縮率は  $v_{cav}$  と  $\Delta v_{sol}$  と  $v_T$  の変化に帰属される。水和水よりもバルク水の圧縮率が大きいため、高圧下ではバルク水から水和水への体積減少は小さくなり、タンパク質の部分比容の減少が小さくなる。そのため、水和水はタンパク質の圧縮率に対して負の寄与を示すことになる。しかし、溶媒が二成分系の場合、タンパク質への選択的な水和水や溶媒和の結果、バルク溶媒にモル分率の変化が生じるため、水和水効果の見積もりは複雑になる。<sup>4)</sup>

タンパク質の圧縮率は  $\sim 10 \times 10^{-11} \text{ Pa}^{-1}$  程度<sup>22)</sup> であるため、加圧による部分比容変化は  $10 \text{ MPa}$  あたり  $7 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  程度であり、等温圧縮率の決定には高圧下での高精度の密度測定が必要になる。また、精度を上げるために高濃度化することで会合が生じるなど実験的な難点も多い。そこで、音速  $u$  の測定 (sing-around pulse 法, 精度  $1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) と密度測定からラプラスの式  $\beta = \rho^{-1} u^{-2}$  を用いて溶媒と溶液の断熱圧縮率  $\beta_0$  と  $\beta$  を決定し、(9)式よりタンパク質の断熱圧縮率  $\beta_s^0$  を決定する方法が一般に用いられる。<sup>20-22)</sup> 熱力学的に  $\beta_T$  と  $\beta_s$  は (10) 式のように関連付けられ、実験値と比較がなされている。<sup>11)</sup>

$$\beta_s^0 = \left( \frac{\beta_0}{v^*} \right) \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \left( \frac{\beta}{\beta_0} - \frac{\rho - c}{\rho_0} \right) \quad (9)$$

$$\beta_T = \beta_s + \frac{\alpha^2 T}{C_p \rho} \quad (10)$$

#### 2.4 固有粘度

粘度は流体の粘りの度合いであり、タンパク質を含む溶液の粘度測定から求まる固有粘度  $[\eta]$  は溶液中におけるタンパク質の構造的広がりを反映することから、高分子の構造変化を調べる上で効果的な物理量である。<sup>23)</sup>

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \left( \frac{\eta}{\eta_0} - 1 \right) = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \left( \frac{\rho t}{\rho_0 t_0} - 1 \right) \quad (11)$$

ここで、 $\eta_{sp}$  は比粘度、 $\eta_0$  と  $\eta$  は溶媒と溶液の粘性率、 $\rho_0$  と  $\rho$  は溶媒と溶液の密度、 $t_0$  と  $t$  は毛細管粘度計における溶媒と溶液の流下時間である。筆者はウベローデ型粘度計や希釈効率の良いハート型粘度計を自動流下測定装置 iVisc (Lauda 社製) に接続することにより、流下時間の自動測定と精度の向上を行っている。(11)式において濃度 0 に外挿する方法には Huggins 式<sup>24)</sup> ( $\eta_{sp}/c = [\eta] + k'[\eta]^2 c$ ,  $k'$ : Huggins 定数) や Mead-Fuoss 式<sup>25)</sup> ( $(\ln(\eta_{sp}+1))/c = [\eta] - k''[\eta]^2 c$ ,  $k''$ : 定数) などが用いられる。球状タンパク質のようなコイル状の高分子を剛体球と見なすと、タンパク質分子の両末端間距離  $\langle R^2 \rangle^{1/2}$  と  $[\eta]$  には  $[\eta] = \Phi \langle R^2 \rangle^{3/2} / M_w$  ( $\Phi$ : 比例定数) の関係が成り立つ。

#### 2.5 粘性流動に対する活性化自由エネルギー

流動をある位置から隣り合う位置への移動の連続と考えると、粘性流動に対して活性化自由エネルギーの概念を用いることができる。<sup>26)</sup> ある空間に存在する溶質が隣り合う空間に移動するためには、(i) 適度な大きさの空間 (ii) 溶質-溶媒間の相互作用の切断、が必要になる。(i)は溶質のモル体積に、(ii)は溶質の溶媒露出表面積に比する値となる。溶媒の粘性流動に対する活性化自由エネルギー  $\Delta \mu_{solv}^*$  は溶媒体積や溶媒-溶媒間相互作用、溶媒分子の自由度の変化を反映し以下の式で定義される。<sup>26)</sup>

$$\Delta \mu_{solv}^* = RT \ln \left( \frac{\eta_0 V_{solv}^0}{hN} \right) \quad (12)$$

$R$ ,  $T$ ,  $h$ ,  $N$ ,  $V_{solv}^0$  はそれぞれ気体定数、絶対温度、プランク定数、アボガドロ数、溶媒のモル体積 ( $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) である。二成分溶液の場合は理想溶液からの差として求まる過剰活性化自由エネルギーを指標にして二成分溶液分子間の相互作用について情報を得ることが出来る。<sup>5)</sup>

溶液中の溶質の粘性流動に対する活性化自由エネルギー  $\Delta \mu_{solute}^*$  は溶媒-溶質間相互作用と溶質の流体力学的な体積、自由度の変化を反映し、下式で表される。<sup>27)</sup>

$$\Delta \mu_{solute}^* = \Delta \mu_{solv}^* + \left( \frac{RT}{V_{solv}^0} \right) \left[ B - (V_{solv}^0 - V_{solute}^0) \right] \quad (13)$$

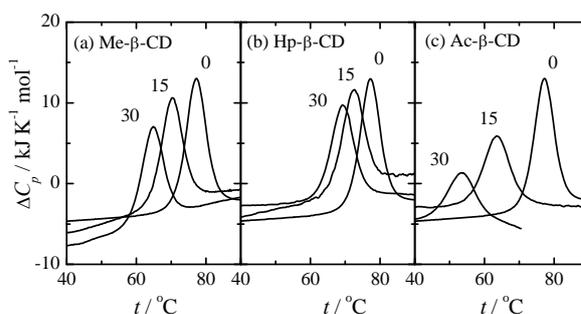
ここで、 $V_{solute}^0$  は溶質のモル体積 ( $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) であり、 $B$  は Jones-Doll 式 ( $\eta/\eta_0 = 1 + Ac^{0.5} + Bc$ ) より求まる。<sup>28)</sup>  $\Delta \mu_{solute}^*$  やモル体積で規格化した  $\Delta \mu_{solute}^* / V_{solute}^0$  をタンパク質に適用することにより、溶液中におけるタンパク質の広がりや溶媒との相互作用に関する情報を得ることが出来る。

### 3. 結果

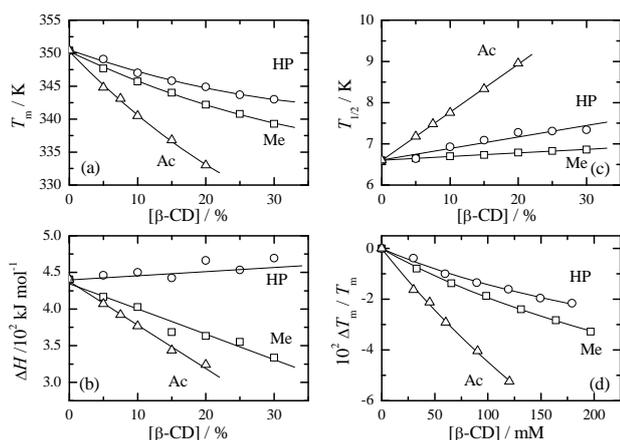
#### 3.1 環状オリゴ糖 (シクロデキストリン) の添加効果<sup>2, 30)</sup>

疎水性空孔に適度な大きさの疎水性物質を包接する性質を持つシクロデキストリン (Cyclodextrin, CD) は、グルコピラノース単位からなる  $\alpha$ -1,4 結合で連なった環状オリゴ糖であり、 $\alpha$ -CD (6 量体)、 $\beta$ -CD (7 量体)、 $\gamma$ -CD (8 量体) が一般的である。 $\beta$ -CD は分子間の水素結合により溶解度が  $1.6 \text{ g} \cdot \text{dL}^{-1}$  と低いため、ヒドロキシ基の水素を種々の置換基に置換することで溶解度を向上させた修飾化 CD が多く用いられている。<sup>29)</sup> CD と疎水性分子の包接に伴う熱力学量は、ITC や分光測定、浸透圧測定、ストップフロー法などを用いてエンタルピー項とエントロピー項に分けて決定されており、このような包接機能を持つ CD を水溶液中のタンパク質に添加することによって、直接的にタンパク質の疎水性相互作用に摂動を与えることができる。以下に、空孔径の違いや修飾化 CD が典型的な球状タンパク質であるリゾチームの安定性や構造に及ぼす影響について示す。

**Fig. 1** は異なる濃度の修飾化  $\beta$ -CD 水溶液中 (pH 4) におけるリゾチームの DSC 曲線の一例である。置換基には、構造が小さく規準系となる Methyl 基 (Me)、構造が大きく疎水性部位の大きな 2-Hydroxypropyl 基 (Hp)、親水性の高い Acetyl 基 (Ac) を用いた。いずれの系でも天然状態から変性状態への構造転移に対応する吸熱反応が見られている。これらの構造転移は可逆的で、ヘリックス含量を反映する  $222 \text{ nm}$  のモル楕円率  $[\theta]_{222}$  においても同様な転移が観測されている。<sup>2)</sup> 解析より得られた変性中点温度  $T_m$ 、エンタルピー変化  $\Delta H$ 、半値幅  $T_{1/2}$  を **Fig. 2(a), (b), (c)** に示す。いずれ



**Fig.1** Typical DSC thermograms of lysozyme in aqueous modified  $\beta$ -CD solutions at 0, 15, and 30 w/v%. (a) Me-, (b) Hp-, (c) Ac- $\beta$ -CD.



**Fig.2** Dependence of (a)  $T_m$ , (b)  $\Delta H$ , (c)  $T_{1/2}$ , and (d)  $\Delta T_m/T_m$  of lysozyme on the modified  $\beta$ -CD concentrations.

の系でも CD 濃度の増加に伴って  $T_m$  は減少しており, CD の添加によってリゾチームが不安定化していることが分かる。CD の構成単位であるグルコース添加系では  $T_m$  が増加<sup>31)</sup>していることから, 環状構造による包接能が不安定化の要因であると考えられ, 変性によって溶媒に露出したリゾチームの疎水性部位を CD が包接することによって変性状態の自由エネルギーが低くなり, 相対的に天然状態が不安定化していると考えられる。天然状態と変性状態の CD 結合数の差  $n$  と, 結合定数  $K$  を用いると, CD による変性中点温度変化  $\Delta T_m (=T_m - T_{m,0})$  は下式で表される。<sup>32)</sup>

$$\frac{\Delta T_m}{T_m} = - \left( \frac{nRT_{m,0}}{\Delta H_0} \right) \ln(1 + [CD]K) \quad (14)$$

ここで,  $T_{m,0}$  と  $\Delta H_0$  は CD 非存在下での変性中点温度とエンタルピー変化,  $[CD]$  は CD のモル濃度,  $R$  は気体定数である。非線形最小二乗法を用いて決定した結果を **Fig.2(d)** と **Table 1** に示す。  $K$  はおよそ  $4\text{--}7 \text{ M}^{-1}$  であり, CD の一般的なゲスト分子であるアルキル基を持つアルコール類との結合定数  $K = (1\text{--}16) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  (25°C)<sup>33)</sup> と比べると弱い結合であると言える。一般的な変性剤である塩酸グアニジンや尿素のタンパク質に対する  $K$  はそれぞれ  $0.6 \text{ M}^{-1}$  と  $0.1\text{--}0.3 \text{ M}^{-1}$ <sup>34,35)</sup> と見積もられており, CD はタンパク質に対して変性剤よりも強い結合性を持っていると言える。しかし, **Fig.2(d)** より見積もられる常温における Me- $\beta$ -CD の変性中点濃度はおよそ  $9.5 \text{ M}$  であり, 塩酸グアニジン ( $3.3\text{--}4.0 \text{ M}$ )<sup>10)</sup> と比べると大きな結合定数の割に数倍弱い変性作用しか示さない。これは, CD の大きな分子量に伴う立体障害や CD の包接能が疎水性部位にのみ作用するため, 結合サイトが限定されるためである。実際, **Table 1** に示すように結合数は Me 系では  $6.7 \pm 0.7$  であり, 塩酸グアニジン (28.0)<sup>34)</sup> と比較すると非常に少ない。しかし, Ac 系の結合数 ( $18.6 \pm 4.3$ ) は他の CD に比べると非常に大きく, 包接による不安定化効果に加えて, Acetyl 基の C=O によってペプチド主鎖間の水素結合 (C=O...H-N) が阻害され二次構造が崩壊していると考えられる。実際, **Fig.2** の各パラメータに見られるように Ac 系は  $T_m$ ,  $\Delta H$ ,  $T_{1/2}$  の変化も最も大きく, 不安定化効果が

**Table 1** The binding constants and number of modified- $\beta$ -CD.

$\beta$ -CD	$K / \text{M}^{-1}$	$n$
Me	$5.5 \pm 0.8$	$6.7 \pm 0.7$
Hp	$6.7 \pm 2.4$	$4.2 \pm 1.1$
Ac	$4.4 \pm 1.2$	$18.6 \pm 4.3$

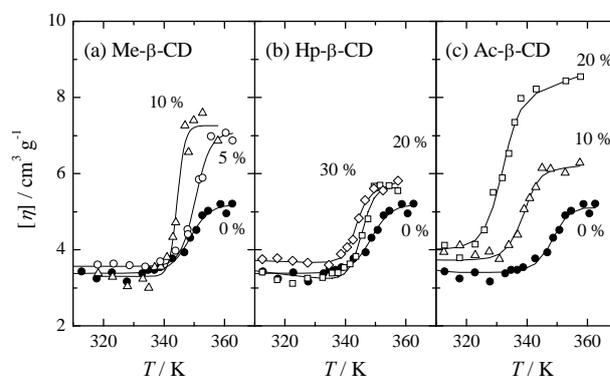
他の CD に比べて強い。逆に Hp- $\beta$ -CD の不安定化効果は小さく, 置換基の立体障害によって結合数が減少している。

**Fig.3** は各修飾化 $\beta$ -CD 水溶液中におけるリゾチームの固有粘度の温度依存性である。いずれの系でも固有粘度は温度の上昇と共に増加し, 変性によって構造が広がっていることが分かる。また, 変性温度は DSC や円二色性の結果と同様に CD 濃度の増加に伴い低温側にシフトしている。

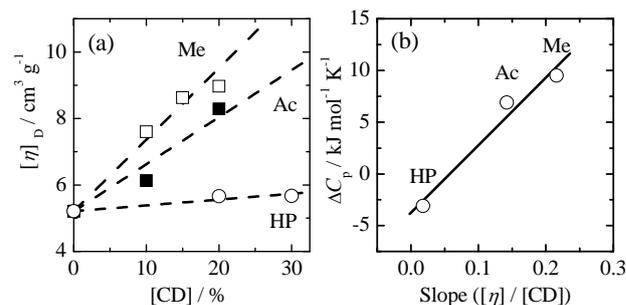
**Fig.4(a)** は変性状態の固有粘度  $[\eta]_D$  の CD 濃度依存性であり, いずれの系でも CD 濃度の増加に伴って  $[\eta]_D$  が増加している。これは, **Fig.5** に示すように変性状態に存在している疎水コアが CD の添加によって崩壊し, 変性状態がより広がっていることを示唆している。特に二次構造の崩壊を含む Ac 系や立体障害の少ない Me 系は広がりが大きく, 一方 Hp 系は弱い不安定化に反映されるようにほとんど変化が見られない。 $\Delta C_p = d\Delta H/dT_m$  から求まる変性における熱容量変化  $\Delta C_p$  と **Fig.4(a)** の傾き  $[\eta]_D/[CD]$  との相関 (**Fig.4(b)**) は有意な正の相関を示しており, より構造が広がったことによつて表面積が増え, 水和量の増加に伴って熱容量変化が増えたことが分かる。

不安定化効果は CD の包接に起因するため, その効果は CD 内径にも依存する。**Fig. 6(a)** は同濃度の  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD ( $\beta$ -CD は溶解度が低いため Me- $\beta$ -CD を使用),  $\gamma$ -CD 水溶液中における  $[\theta]_{222}$  の温度依存性であり, **Fig.6(b)** は転移温度変化  $\Delta T_m$  と CD 空孔径の相関である。不安定化は内径の順ではなく  $\beta$ -CD >  $\alpha$ -CD >  $\gamma$ -CD の順に大きかった。疎水性アミノ酸の一種であるトリプトファンと CD の包接複体の安定性を計算機実験で求めた結果,  $\beta$ -CD 系が最も安定性が高く (unpublished data), タンパク質へ相互作用する上で適度な内径を持つ  $\beta$ -CD 系が有効であると思われる。

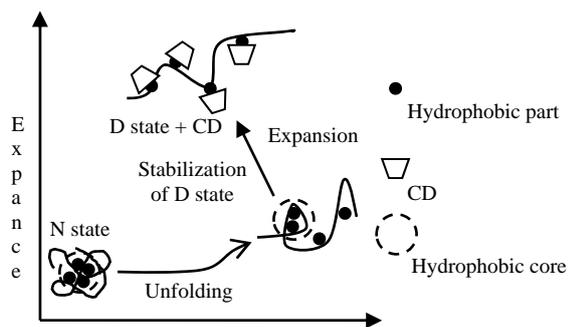
以上のように, 熱力学量を指標とすることでリゾチームの構造や安定性に及ぼす CD の不安定化効果は空孔径や修



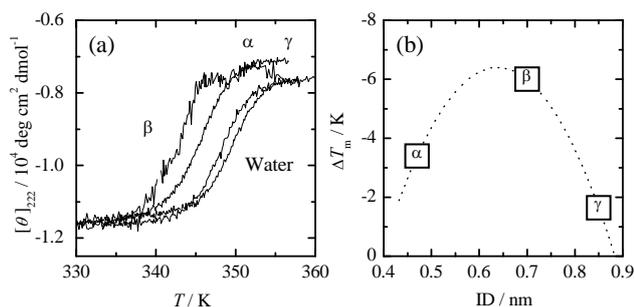
**Fig.3** Temperature dependences of intrinsic viscosities of lysozyme in aqueous modified  $\beta$ -CD solutions at various concentrations. (a) Me-, (b) Hp-, (c) Ac- $\beta$ -CD.



**Fig.4** (a) Dependences of intrinsic viscosities of lysozyme at unfolded state on the CD concentration (b) Relationship between  $\Delta C_p$  and slope  $[\eta]_D/[CD]$  in (a).



**Fig.5** The structure model of lysozyme in CD solution against temperature. N state, Native (folded) state; D state, Denatured (unfolded) state.



**Fig.6** (a) Temperature dependence of  $[\theta]_{222}$  of lysozyme in water,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, and  $\gamma$ -CD solutions at same concentration. (b) Dependence of  $\Delta T_m$  of lysozyme on the inner diameter of CDs at same concentration.

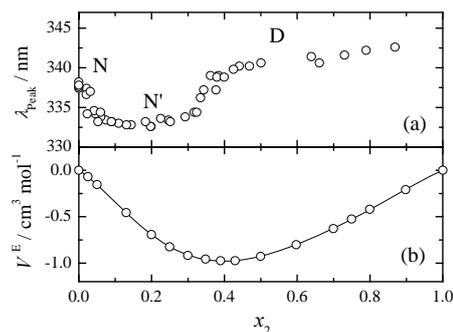
飾基の水素結合性や疎水性に依存することが明らかとなった。異なるタンパク質に対する CD の効果については文献 30 をご参照いただきたい。現在、選択的溶媒和量を指標にした CD の不安定化効果の解明を進めており、従来の変性剤とは異なる新しい安定性調整剤や機能調整剤としての役割が期待される。

### 3.2 二成分溶液中のリゾチームの熱物性<sup>3-7)</sup>

二成分溶液は最も単純な混合溶媒であり、“場”としての溶媒の熱力学的特性を考慮しタンパク質の構造や安定性への影響を分子論的な視点で捉える上で最も単純なモデルである。以下に水と任意の比率で混合する非プロトン性極性溶媒であるジメチルスルホキシド (DMSO,  $\text{CH}_3\text{-SO-CH}_3$ ) の二成分溶液中 (水+DMSO) で得られたリゾチームの構造変化やその熱力学的特性について示す。

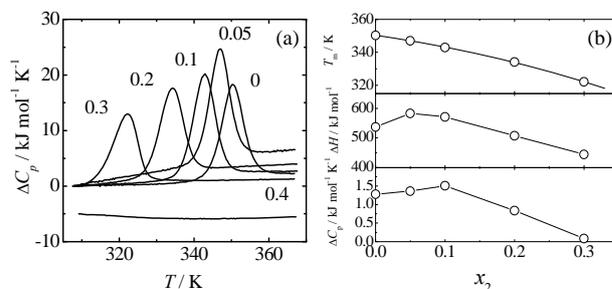
**Fig.7** は DMSO 水溶液中におけるリゾチームの極大蛍光波長  $\lambda_{\text{peak}}$  (励起波長 290 nm) であり、芳香族アミノ酸であるトリプトファンの極性環境を指標にしたリゾチームの三次構造変化を表している。DMSO によってリゾチームは水中での天然状態(N), DMSO モル分率  $x_2=0.2$  付近での中間状態 (N'), モル分率 0.4 以降の変性状態 (D) の 3 状態 (N  $\leftrightarrow$  N'  $\leftrightarrow$  D) で可逆的に転移することが分かった。変性の起こるモル分率 0.3-0.4 では、大きな過剰エンタルピー (-2.97 kJ $\cdot$ mol<sup>-1</sup>) や過剰体積 (-1.00 cm<sup>3</sup> $\cdot$ mol<sup>-1</sup>), 過剰粘性率 (2.5 mPa $\cdot$ s), 粘性流動に対する過剰活性化自由エネルギー (3.4 kJ $\cdot$ mol<sup>-1</sup>) などの過剰熱力学量の極大・極小に反映されるように DMSO 分子と水分子の強い相互作用が示されており、リゾチームの変性の一因になっている。<sup>3)</sup>

**Fig.8** に DMSO モル分率  $x_2=0-0.4$  におけるリゾチームの DSC 曲線と構造転移に関する各熱力学量 ( $T_m$ ,  $\Delta H_{\text{cal}}$ ,  $\Delta C_p$ ) を示した。蛍光測定で示されたように  $x_2=0.4$  では室温で変



**Fig.7** (a) Peak wavelength of fluorescence spectra of lysozyme in water + DMSO. (b) Excess volumes of water + DMSO at 298.15 K.

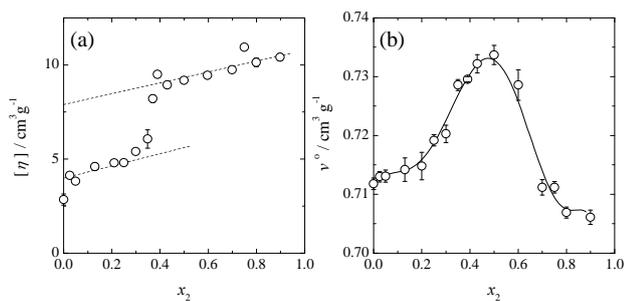
性しているため、構造転移に伴う吸熱ピークは観測されない。DMSO 濃度の増加に伴って安定性は減少しているが、低モル分率 ( $x_2=0.05-0.10$ ) においてエタノールやアセトン系<sup>36)</sup>と同様に  $\Delta H_{\text{cal}}$  はいったん増加した後に減少している。また、 $\Delta H_{\text{vh}}/\Delta H_{\text{cal}}$  の値はモル分率の増加と共に 1.01 から 0.91 に減少<sup>4)</sup>しており、DMSO 分子の局所的なリゾチームへの結合による脱水和や安定な中間体の存在を示唆している。



**Fig.8** (a) DSC thermograms of lysozyme in aqueous DMSO solutions. (b) Dependence of thermodynamic properties of lysozyme on the mole fraction of DMSO,  $x_2$ .

二成分溶液では構成分子のタンパク質への親和性が分子種によって異なるため、タンパク質に対して選択的な水和や溶媒和が起こる。結果として、二成分溶液中のタンパク質の部分比容のタンパク質濃度依存性は大きく変化する。<sup>4,7)</sup> 濃度依存性より見積もった単位質量あたりのリゾチームに対する選択的な DMSO の結合量は、低モル分率において最大 0.09 (g/g) の正の値を示しており、 $\Delta H$  や  $\Delta C_p$  の増加に反映されるように、DMSO 分子が部位特異的に結合している。<sup>4)</sup> 一方、高モル分率においては負の値を示しており、尿素のような変性剤が正の値を示す<sup>37)</sup>のに対し、DMSO 分子は変性状態に対して選択的に排斥 (水分子が選択的に水和) していることが明らかとなった。これらの結果は、尿素分子はタンパク質に選択的に結合することにより、タンパク質を形成する上で重要な水素結合や疎水性相互作用を弱めているのに対し、DMSO 分子は水との大きな過剰エンタルピーに反映される水分子との強い相互作用を介して、リゾチームと水の相互作用を阻害し、リゾチームの構造変化を誘起するという変性機構であることを示唆している。

**Fig.9** に無限希釈におけるリゾチームの固有粘度と部分比容の DMSO モル分率依存性を示した。DMSO 濃度の増加に伴いリゾチームの固有粘度は増加しており、三次構造が崩壊して構造が広がっていることが示唆される。蛍光測定の結果と同様にモル分率 0.05 以下と 0.35 付近に転移点が存在しており、分光学的な構造変化が流体力学的にも敏感に反映されていることが分かる。DMSO 濃度ゼロへの外挿で得られる天然状態、中間体、変性状態の固有粘度はそれぞれ

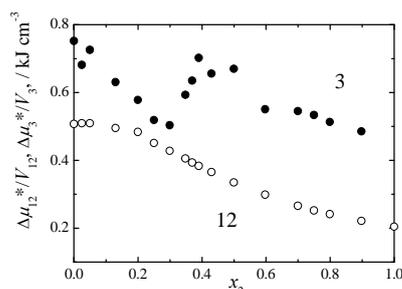


**Fig.9** (a) Intrinsic viscosities and (b) partial specific volumes of lysozyme against mole fraction of DMSO  $x_2$  at 298.15 K.

れ,  $2.8 \pm 0.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $4.0 \pm 0.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $7.9 \pm 0.6 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  であり, 変性作用の強い塩酸グアニジンによるリゾチームの変性状態での固有粘度  $6.6 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  よりも大きいことから,  $x_2 > 0.4$  での固有粘度の増加は変性だけでなく会合を伴っていることが示唆される。Ma ら<sup>38)</sup>は光散乱測定から DMSO モル分率の増加に伴いリゾチーム分子の可逆的な凝集化が起こることを指摘しており, 本実験の結果と一致する。

水中でのタンパク質の変性は一般に cavity 体積の減少と表面積の増加による水和量の増加を引き起こし, (4)式に従えば変性タンパク質の部分比容は減少する。<sup>20)</sup>しかし, モル分率 0.2 から 0.42 における構造転移では部分比容は大きく増加していた ( $+0.023 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ )。これは, 二成分溶液の大きな負の過剰体積  $V^E$  (Fig.7(b))に反映されるように溶媒密度が高いため, 相対的に水和や溶媒和による  $\Delta v_{\text{sol}}$  の負の効果が小さくなった (または体積増加に寄与した) ことに加え, 固有粘度に見られる凝集によって分子間の cavity 形成や, 構造の崩壊に伴う熱的振動 ( $v_T$ ) の増加が生じていると考えられる。高モル分率 ( $x_2 > 0.5$ ) における部分比容の減少は, 過剰体積の減少に伴い  $\Delta v_{\text{sol}}$  項の負の効果が大きくなったことや, 疎水コア内の cavity への DMSO 分子の浸透の可能性が示唆されるが, 前述したように cavity と水和への帰属は複雑であり, これらの体積変化の更なる解析には各アミノ酸の広いモル分率範囲での部分比容の決定が必要である。

(12)(13)式より求まる溶媒 (DMSO 水溶液) と溶質 (リゾチーム) の各 DMSO モル分率における単位モル体積あたりの粘性流動に対する活性化自由エネルギー  $\Delta\mu_{12}^*/V_{12}^0$  と  $\Delta\mu_{12}^*/V_3$  を Fig.10 に示した。全モル分率範囲において  $\Delta\mu_{12}^*/V_3$  は  $\Delta\mu_{12}^*/V_{12}^0$  よりも大きく, 溶媒は溶媒間よりも水和や溶媒和としてリゾチームと選択的に相互作用していることを示している。 $\Delta\mu_{12}^*/V_3$  は部分比容や固有粘度と同様にモル分率 0.3 から 0.4 にかけて増加, つまり溶媒-リゾチーム相互作用が増加しており, 増加率からリゾチームの表面積は十数%増加したと推測される。Dash らは DMSO 水溶液中 ( $x_2 = 0.2$ ) におけるモノマー疎水性アミノ酸の  $\Delta\mu_{12}^*$  を  $14.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Gly),  $15.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $\alpha$ -Ala),  $15.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$



**Fig.10** Plots of  $\Delta\mu_{12}^*$  and  $\Delta\mu_{12}^*$  normalized by molar volume  $V_{12}^0$  and  $V_3$  of binary solvent and lysozyme against mole fraction of DMSO,  $x_2$ , at 298.15 K, respectively.

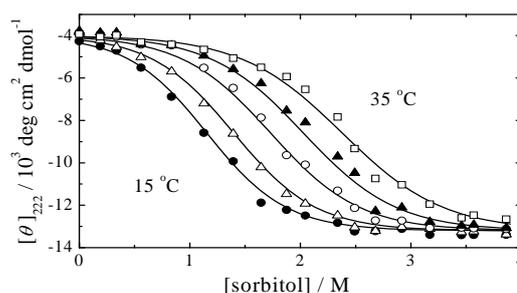
( $\beta$ -Ala) と見積もっている。<sup>39)</sup> 本研究で求めたリゾチーム (残基数 129) の 1 アミノ酸あたりの平均  $\Delta\mu_{12}^*$  は約  $45.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $x_2 = 0.1998$ ) であり, モノマーアミノ酸より約 3 倍大きな値 ( $\Delta\mu_{12}^*/V_3$  で比較すると約 1.5 倍) であった。立体構造を持つリゾチームの 1 アミノ酸あたりの表面積はモノマーアミノ酸よりも小さいことを考慮すると, この大きな  $\Delta\mu_{12}^*$  や  $\Delta\mu_{12}^*/V_3$  はタンパク質表面に多く存在している親水性アミノ酸が疎水性アミノ酸よりも強く溶媒 (特に水) と相互作用していることを示唆している。

以上のように, 二成分溶媒の過剰熱力学量に反映される溶媒分子間の強い相互作用の影響を受けてリゾチームの構造や熱力学的性質は敏感に変化した。水中とは異なり各物性値変化の帰属は複雑ではあるが, 選択的溶媒和量を用いることで変性機構に定量的な指標を与えることができる。

### 3.3 ポリオールの添加効果<sup>8)</sup>

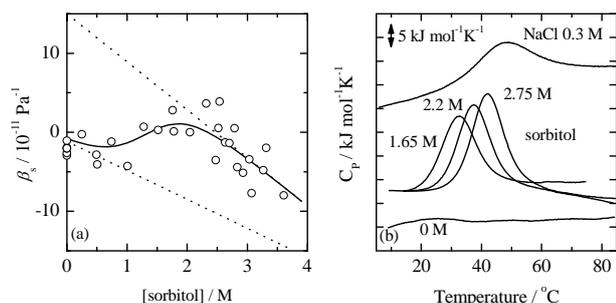
疎水性相互作用を強める作用を持つポリオールを添加することにより, 塩による静電遮蔽効果とは異なる変性中間体 (モルテングロビュール, MG 状態) の構造と物性を, シトクロム *c* をモデルに, DSC, 部分比容, 部分断熱圧縮率, 円二色性, 選択的溶媒和量を指標にして明らかにした。

酸変性したシトクロム *c* に各種ポリオールを添加すると, 水酸基が多いポリオール (メタノールを除く) ほどシトクロム *c* が巻き戻ることが明らかとなった。6 個の水酸基を持つソルビトールを添加すると, 天然状態とは異なる変性中間体 (MG 状態) に二状態転移で巻き戻った。Fig.11 は異なる温度における巻き戻り過程を  $[\theta]_{222}$  を指標にして測定した結果であり, 低温ほどより低濃度で巻き戻りが起きていることが分かる。 $\Delta H_{\text{vh}}$  の温度依存性から求めた  $\Delta C_p$  はほぼゼロであり, 水中 (pH 2) での MG 状態が水和量の多い膨潤した構造であることを示している。温度依存性より見積もったシトクロム *c* の酸変性状態と MG 状態へのソルビトール分子の選択的溶媒和量変化  $\Delta\xi_3$  は正の値を示しており, MG 状態への転移はシトクロム *c* の変性状態に対するポリオール分子の選択的な排斥に起因することが明らかとなった。



**Fig.11** Plots of  $[\theta]_{222}$  as a function of sorbitol concentration at 15, 20, 25, 30, and 35 °C.

MG 状態への巻き戻りに対応してシトクロム *c* の断熱圧縮率  $\beta_s^0$  も変化した (Fig.12(a))。ソルビトール濃度ゼロへの外挿で得られる MG 状態の  $\beta_s^0$  ( $15.0 \times 10^{-11} \text{ Pa}^{-1}$ ) は酸変性状態 ( $0.3 \times 10^{-11} \text{ Pa}^{-1}$ ) や天然状態 ( $3.6 \times 10^{-11} \text{ Pa}^{-1}$ ) よりも大きく, MG 状態は揺らぎが大きな膨潤した構造であることが分かる。しかし, 2 M 以降の大きな負のソルビトール濃度依存性に反映されるように, ソルビトール高濃度中での MG 状態は浸透圧効果によって脱水したコンパクトな構造になっている。実際, DSC 測定によって求められたソルビトール誘起 MG 状態の  $\Delta H_{\text{cal}}$ ,  $\Delta C_p$ ,  $T_{1/2}$  はそれぞれ  $243 \pm 1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $3.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ,  $12.2 \text{ }^\circ\text{C}$  であり, 塩誘起の MG 状態の値  $116 \pm 9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $1.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ,  $18.1 \text{ }^\circ\text{C}$  と比べ天



**Fig.12** (a) Plots of  $\beta_s$  of cytochrome *c* as a function of sorbitol concentration at pH 2 and 20 °C. (b) DSC thermograms of cytochrome *c* at pH 2 in the presence of 0, 1.65, 2.2, and 2.75 M sorbitol, and 0.3 M NaCl.

然状態のような協同性の高い構造転移を示している。

このように、ポリオール（疎水性効果）誘起の MG 状態は、添加物による疎水性相互作用や浸透圧効果によって塩（静電遮蔽効果）誘起の MG 状態よりも天然状態に近い熱力学的性質を持つことが分かった。

#### 4. おわりに

以上、筆者が行ってきた研究を中心に、溶液中のタンパク質物性の測定方法とタンパク質の構造や熱力学的性質に与える溶媒と添加物の影響について紹介してきた。誌面の関係上省略させていただいた点は各文献をご参照いただきたい。複雑で簡明という二面性を持つタンパク質には未だ解明されていない点が多く残されているが、種々の熱力学量を指標とすることで、安定性やコンパクトさ、柔軟性など分光学的に得ることの出来ない描像をタンパク質に与えることができる。また、タンパク質の構造や溶媒との相互作用を敏感に反映することから溶媒分子や添加物分子の直接的・間接的な影響の定量的な評価が可能となる。今後も種々の熱力学量を指標として多角的な視点でタンパク質の構造・物性・機能の相関解明に努めていきたい。

#### 謝 辞

本稿で紹介した研究には多くの協同研究者の協力をいただきました。近畿大学の木村隆良教授には溶液化学の視点からご助言を賜るとともに、熱測定の重要性を改めて認識させていただきました。同大学の藤澤雅夫准教授には計算機実験においてデータ解釈を含めご協力を賜りました。広島大学大学院教授の月向邦彦先生には修士時代からご指導を賜り、圧縮率や選択的溶媒和量など、溶液中におけるタンパク質の物性研究の重要性をご教授いただきました。また、ドイツ Westfälische Wilhelms 大学の Prof. Hans-Jürgen Hinz 先生には留学中、公私ともに大変お世話になりました。多くの学生さんの成長と共に楽しく研究を続けてこられたことが今回の奨励賞受賞につながったものと思います。末筆ながら全ての関わってきた方々にこの場をお借りしてお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 後藤祐児・谷澤克行・桑島邦博編「タンパク質科学構造・物性・機能」, 化学同人 (2005).
- 2) T. Kamiyama, M. Satoh, T. Tateishi, T. Nojiri, D. Takeuchi, and T. Kimura, *Thermochimica Acta (Special issue of ICCT-2010)*, 532, 10-14 (2012).

- 3) 神山 匡, 熱測定 **36**, 263-270 (2009).
- 4) T. Kamiyama, H. Liu, and T. Kimura, *J. Therm. Anal. Cal.* **95**, 353 (2009).
- 5) T. Kamiyama, M. Morita, and T. Kimura, *J. Sol. Chem.* **37**, 27 (2008).
- 6) T. Kamiyama, M. Morita, and T. Kimura, *J. Chem. Eng. Data* **49**, 1350 (2004).
- 7) T. Kamiyama, T. Matsushita, and T. Kimura, *J. Chem. Eng. Data* **48**, 1301 (2003).
- 8) T. Kamiyama, Y. Sadahide, Y. Nogusa, and K. Gekko, *Biochim. Biophys. Acta* **1434**, 44 (1999).
- 9) K. Boehm, J. Guddorf, A. Albers, T. Kamiyama, S. Fetzner, and H.-J. Hinz, *Biochemistry* **47**, 7116 (2008).
- 10) T. Kamiyama and K. Gekko, *Chem. Lett.* **10**, 1063 (1997).
- 11) K. Gekko, M. Araga, T. Kamiyama, E. Ohmae, and K. Akasaka, *Biophys. Chem.* **144**, 67 (2009).
- 12) T. Kamiyama, E. Ohmae, and K. Gekko, *Chem. Lett.* **6**, 507 (1999).
- 13) M. Iwakura, K. Maki, N. Takahashi, T. Takenawa, A. Yokota, K. Katayanagi, T. Kamiyama, and K. Gekko, *J. Biol. Chem.* **281**, 13234 (2006).
- 14) K. Gekko, T. Kamiyama, E. Ohmae, and K. Katayanagi, *J. Biochem.* **128**, 21 (2000).
- 15) K. Gekko, T. Kamiyama, E. Ohmae, and K. Katayanagi, *Prog. Biotech.* **19**, 63 (2002).
- 16) T. Kamiyama and K. Gekko, *Biochim. Biophys. Acta*, **1478**, 257 (2000).
- 17) K. Gekko, A. Kimoto, and T. Kamiyama, *Biochemistry* **42**, 13746 (2003).
- 18) T. Kamiyama, Y. Toshima, T. Matsushita, and T. Kimura, *J. Therm. Anal. Cal.* **82**, 207 (2005).
- 19) 日本熱測定学会編, 「熱量測定・熱分析ハンドブック (第2版)」丸善, 47-49, 122-128 (2009).
- 20) 月向邦彦, 熱測定 **31**, 186 (2004); *タンパク質核酸酵素* **40**, 2461 (1995).
- 21) T. V. Chalikian, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 207 (2003).
- 22) K. Gekko and H. Noguchi, *J. Phys. Chem.* **83**, 2706 (1979).
- 23) C. Tanford, K. Kawahara, and S. Lapanje, *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 729 (1967).
- 24) M. L. Huggins, *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 2716 (1942).
- 25) D. F. Mead and M. Fuoss, *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 277 (1942).
- 26) H. Eyring, *J. Chem. Phys.* **4**, 283 (1936); S. Glasstone, K. J. Laidler, and H. Eyring, "The Theory of Rate Processes" McGraw-Hill, (1941); 「絶対反応速度論 (上) (下)」, 長谷川繁夫, 平井西夫, 後藤春雄共訳, 吉岡書店(1964).
- 27) D. Feakins, W.E. Waghorne, and K.G. Lawrence, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **82**, 563 (1986).
- 28) G. Jones and M. Dole, *J. Am. Chem. Soc.* **51**, 1073 (1929).
- 29) V. T. D' Souza and K. B. Lipkowitz (ed.), *Cyclodextrins*, *Chem. Rev.* **98**, 1919 (1998).
- 30) T. Kamiyama and T. Kimura, *Netsu sokutei e-journal (Special issue of CATS-2011)* **W39**, 1-5 (2012).
- 31) H. Uedaira and H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **53**, 2451 (1980).
- 32) A. Cooper, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9208 (1992).
- 33) 戸田不二緒監, 上野昭彦編「シクロデキストリン<基礎と応用>」産業図書 (1995).
- 34) C.N. Pace, *Methods Enzymol.* **131**, 266 (1986).
- 35) E. Liepinsh and G. Otting, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9670 (1994).
- 36) A. L. Jacobson, C. L. Turner, *Biochemistry* **19**, 4354 (1980).
- 37) 月向邦彦 著, 永山國昭 編「水と生命」2-1 章「タンパク質の選択的溶媒和」共立出版(2000).
- 38) R. J. Ma, and C. H. Wang, *J. Phys. Chem.* **87**, 679 (1983).
- 39) U. N. Dash and N. N. Pasupalak, *Ind. J. Chem.* **36**, 834 (1997).