

蛋白質の分子運動

—トリプシンの酵素活性への障害が熱容量に及ぼす影響—

代謝、運動、免疫、遺伝などのあらゆる生命活動は、すべて生体中の蛋白質によって担われています。その蛋白質がさまざまな機能を発現できるのは、構成要素のアミノ酸残基の親水性・疎水性や置換基の立体効果、およびアミノ酸残基間の複雑な相互作用によって蛋白質が特異的な立体構造をとっているからです。その上、硬い構造を保ったままではなく、振幅の大きいゆっくりとした分子運動を行うことが、蛋白質の機能発現にとって重要です。これらの立体構造や分子運動は水があって初めて実現されるので、水は蛋白質の機能発現に欠かせない存在です。蛋白質の一種である酵素は2つの球状ドメインに分かれており、それらをつなぐフレキシブルなペプチド鎖がちょうつがいとなって2つのドメインを開け閉めする「ちょうつがい運動」を行っています。ちょうつがい運動は、ドメイン間の溝の奥に存在する活性部位に基質を結合し、加水分解を行い、分解生成物を放出するという酵素の機能に密接に関係していると考えられています。誘電緩和測定から、蛋白質分解酵素であるトリプシンのちょうつがい運動がトリプシンインヒビターによって束縛されることが示唆されています (N. Miura, Y. Hayashi, and S. Mashimo, *Biopolymers*, **39**, 183(1996)). 今回私たちは、熱力学的立場からトリプシンの酵素活性への障害がトリプシンの分子運動に及ぼす影響を調べようと、本研究に取り掛かりました。

熱容量測定は、牛膵臓トリプシン、ダイズトリプシンインヒビター、およびそれらの複合体の乾燥試料および95 wt% 含水試料について行いました。ダイズトリプシンインヒビターの分子量は20095で、分子量が23302のトリプシンとはほぼ同じ大きさであるというのが特徴的です。熱容量測定には研究室既設の微量試料用断熱型熱量計を用いて、6~300 Kの温度範囲で行いました。

Fig. 1に、95 wt% 含水試料の熱容量から水の熱容量と乾燥試料の熱容量を差し引いた蛋白

質 1 mol当たりの過剰熱容量を示します。273 K 付近の氷の融解ピークは差し引くことができず残っています。300 K から1分間に2~3 Kの冷却速度で冷却して測定した急冷試料では、150 K 付近にガラス転移によるブロードな熱異常と、200 K 以上で過冷却した一部の水の結晶化による発熱が観測されました。発熱が最大であった235 K で1日以上アニールしてから測定したアニール試料でも150 K 付近にガラス転移が観測されました。それに対して、乾燥試料では何も熱異常は観測されませんでした。過剰熱容量は、ガラス転移温度以下ではほぼ零ですが、ガラス転移温度以上では正の値を示しました。このことは、ガラス転移が蛋白質分子と水分子との協同的な運動の凍結現象であることを示唆しています。

トリプシンとインヒビターの過剰熱容量を合計したものから複合体の過剰熱容量を差し引くことによって、活性なトリプシンと酵素活性を

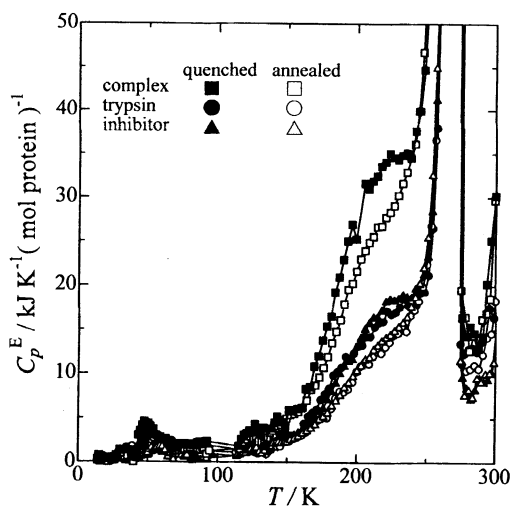


Fig. 1. Excess heat capacities of trypsin, trypsin inhibitor, and their complex. All samples exhibit broad glass transitions around 150 K. Excess heat capacities due to the cooperative motion of protein and water arise above 150 K.

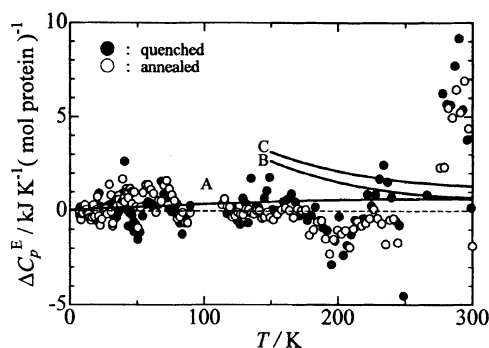


Fig. 2. Comparison between active trypsin and inhibited trypsin. Plots show the difference between the sum of the excess heat capacities of trypsin and trypsin inhibitor and the excess heat capacity of their complex. Curve A and B show the differences of the heat capacities of dried samples, and of the heat capacities of hydration. Curve C is the sum of curves A and B. Positive values indicate that the heat capacity of native trypsin is larger than that of inhibited trypsin.

阻害されているトリプシンの過剰熱容量を比較しました。その結果をFig. 2に示します。過剰熱容量を生じていない150 K以下では、当然ながら両者に差はほとんどありませんが、150 Kから250 Kの間では活性なトリプシンの過剰熱容量の方が小さくなり、逆に250 Kから300 Kの間では活性なトリプシンの方が大きくなりました。

このように2つの状態のトリプシンで過剰熱容量に差が生じる原因について次のように考えました。まず、乾燥試料における熱容量の差を考えました。これについては、Fig. 2の曲線Aに示すように活性なトリプシンの方が大きくなりました。次に、蛋白質表面の水和状態の違いを考慮して水和熱容量の差を見積もりました。複合体を形成するとトリプシンとインヒビター

が個別に存在する時よりも表面積が減少するので、曲線Bに示すように、活性なトリプシンの方が大きくなりました。この2つの効果を合計したものを曲線Cで表しました。曲線Cと過剰熱容量の差を比較すると、この2つ以外に過剰熱容量に差を生じる原因が存在することは明らかです。活性なトリプシンの過剰熱容量の方が大きくなるのは、酵素活性が阻害されているトリプシンではインヒビターの結合によってちょうつがい運動が束縛されていると考えれば説明できます。どちらのトリプシンでも構成しているアミノ酸残基の総数は変わらないので、揺らぎの自由度の総数も同じはずです。250 Kから300 Kの間でちょうつがい運動に相当する揺らぎが励起されているとすれば活性なトリプシンの方が自由度の数が多くなるので、その分150 Kから250 Kの間で励起される自由度の数は少なくなると考えられます。そうすると、150 Kから250 Kの間では活性なトリプシンの過剰熱容量の方が小さくなることも説明できます。今回の結果から、トリプシンの酵素活性の阻害によって分子運動の束縛が生じていることが示唆されました。今後、含水量を変えて測定を行い、さらに酵素活性と分子運動の関係について探っていきたいと考えています。

(中西加奈, 宮崎裕司)

発表

中西加奈, 宮崎裕司, 妻鹿友弘, 長谷純宏, 徂徠道夫 日本物理学会第57回年次大会(草津), 27aPS-85(2002).

中西加奈, 宮崎裕司, 妻鹿友弘, 長谷純宏, 徂徠道夫 第37回熱測定討論会(金沢), 2C1530(2002)

Molecular Motion of Protein: Influence of Inhibition to Enzyme Activity of Trypsin on Heat Capacity

The heat capacities of trypsin, trypsin inhibitor, and their complex with water content of 95 and 0 (dried) wt% were measured to investigate the influence of inhibition of the enzyme activity by trypsin inhibitor on the molecular motion of trypsin. The samples with 95 wt% water content exhibited broad glass transitions around 150 K. The sum of the excess heat capacities of trypsin and trypsin inhibitor was larger than the excess heat capacity of their complex above 250 K. The difference between the excess heat capacities is attributed to the molecular motion of trypsin related to enzyme activity such as hinge-bending motion which is restricted by trypsin inhibitor.

(by K. Nakanishi & Y. Miyazaki)