

リゾチームの Unfolding に対する分子鎖内架橋結合の影響

リゾチームは129個のアミノ酸からなる鎖状の高分子です。通常、水溶液中で鎖は折りたたまれコンパクトな球状構造をとる Native 状態 (N状態) にありますが、溶液の温度を上げると、鎖がほどこけてランダムコイルで近似される Unfolded 状態 (U状態) になります。この現象を蛋白質の Unfolding 転移と呼んでいます。天然リゾチームの Unfolding 転移に伴うエンタルピー変化量は P. L. Privalov 等によって詳細に研究され、蛋白質立体構造の安定化の機構について考察されてきました。ここで私達は一つの興味ある化学修飾リゾチームに注目しました。つまり、Glu35残基と Trp108残基の間に新しく一本エステル結合を形成したヨウ素酸化リゾチームです。この架橋リゾチームの Unfolding の転移温度 (転移の中点温度) は天然のリゾチームに比べ約20℃高温側に移動していて、新しく導入された架橋結合が蛋白質の立体構造の安定化に大きく寄与していることは明らかです。この分子の立体構造はX線結晶解析によって天然リゾチームのものと殆ど同じであること

が分かっています。私達はこの安定化の機構を詳しく調べるために架橋リゾチームの Unfolding 転移のエンタルピー変化量を種々の濃度の *n*-プロパノール (1-PrOH) 存在下で測定し、同じ溶媒条件下で測定された天然リゾチームのものと比較しました。図1は示差走査型熱量計による架橋リゾチームの過剰熱容量曲線を表しています。ピークの位置と面積から転移温度 T_d^* と転移エンタルピー ΔH_{un}^c が求められました。転移前のベースラインが少し歪んでいるのは架橋リゾチームを精製するさい未反応の天然リゾチームが僅かに混入したためと思われます。all-or-none 型の転移を仮定して、図1の曲線を van't Hoff プロットして得られる転移エンタルピー ΔH_{vH}^c と ΔH_{un}^c はほぼ一致しており、all-or-none 型の転移が架橋リゾチームに対しても良い近似であることを示しています。同じ溶媒条件下にある天然リゾチームと比較すると (表1) 1-PrOH の濃度に依らず転移温度がほぼ17–19℃上昇しています。Unfolding 転移のエンタルピー変化量を天然と架橋リゾチームで比較して架橋結合の安定化への寄与を評価しようとすると、転移エンタルピーの温度依存性を考慮しなければなりません。架橋リゾチームの転移温度 T_d^* における天然リゾチームの転移に伴う熱力学量変化を以下の式に従って、測定値の ΔC_p を用いて計算しました。

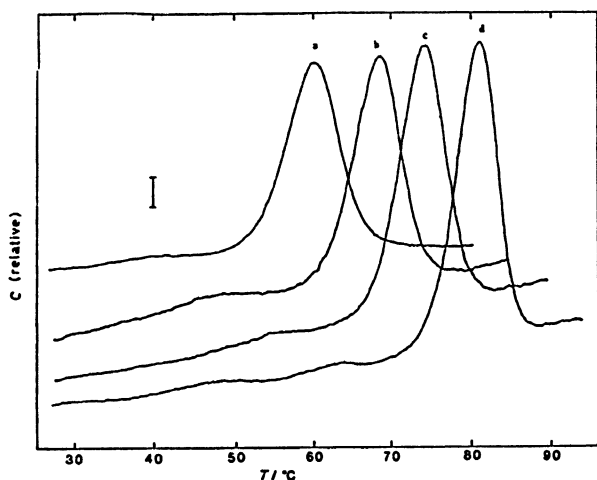


Fig. 1 DSC curves for the unfolding transition of cross-linked lysozyme at various concentrations of 1-PrOH at pH3.7. Concentrations of cross-linked lysozyme are (a)0.48, (b)0.48, (c)0.46, and (d)0.48 mM. 1-PrOH concentrations are (a)4.00, (b)2.67, (c)2.00, and (d)1.34 M. The heating rates are (a)0.62, (b)0.66, (c)0.66, and (d)0.64 K·min⁻¹. The sample volume is 0.860mL. The magnitude of a segment along the ordinate axis corresponds to 10 kJ·K⁻¹·mol⁻¹.

すると、転移エンタルピーの温度依存性を考慮しなければなりません。架橋リゾチームの転移温度 T_d^* における天然リゾチームの転移に伴う熱力学量変化を以下の式に従って、測定値の ΔC_p を用いて計算しました。

$$\Delta H(T_d^*) = \Delta H(T_d) + \Delta C_p \delta T ;$$

ここで、

$$\delta T = T_d^* - T_d \quad \text{とする、}$$

$$\Delta S(T_d^*) = \Delta S(T_d) + \Delta C_p \ln(T_d^*/T_d),$$

$$\Delta G(T_d^*) = -\Delta H(T_d) \delta T / T_d + \Delta C_p (\delta T - T_d^* \ln T_d^*/T_d).$$

Table 1 Thermodynamic quantities of the unfolding transition of intact and cross-linked lysozymes in solutions of various concentrations of 1-PrOH.

	c^a (M)	T_d (°C)	ΔH_{cal} (kJ · mol ⁻¹)	ΔH_{vH} (kJ · mol ⁻¹)	$\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$
Intact	0.67	70.2	541	551	0.98
	1.34	63.3	506	558	0.91
	2.00	56.8	473	503	0.94
	2.67	49.5	435	476	0.91
	4.00	40.0	393	401	0.98
Cross-linked	1.34	80.5	608	667	0.91
	2.00	73.9	591	582	1.02
	2.67	68.2	532	530	1.00
	4.00	59.7	506	439	1.15

^aConcentration of 1-PrOH.

Table 2 Changes in thermodynamic quantities upon unfolding of intact lysozyme at the transition temperature of the cross-linked one, and their comparison with those of the cross-linked one.

c^a (M)	δT_d (°C)	$\Delta G(T_d^\circ)$ (kJ · mol ⁻¹)	$\Delta H(T_d^\circ)$ (kJ · mol ⁻¹)	$\Delta H^\circ(T_d^\circ)$ (kJ · mol ⁻¹)	$\Delta S(T_d^\circ)$ (kJ · K ⁻¹ mol ⁻¹)	$\Delta S^\circ(T_d^\circ)$ (kJ · K ⁻¹ mol ⁻¹)
1.34	17.2	-28	597	608	1.77	1.72
2.00	17.1	-27	559	591	1.69	1.70
2.67	18.7	-28	521	532	1.61	1.56
4.00	19.7	-27	470	506	1.49	1.52

^aConcentration of 1-PrOH.

表2に T_d° における熱力学量の比較を示しました。肩字のcは架橋リゾチームに対する変化量であることを示しています。これから二つの興味ある事実を指摘することが出来ます。第一は、種々の濃度の1-PrOH存在下で、架橋による安定化を表すギブズの自由エネルギー変化量 $\Delta G(T_d^\circ)$ がいつも約-27 kJ · mol⁻¹と一定であるという点です。これは架橋による安定化の機構が溶媒に依存しないことを示唆しています。第二は、天然と架橋リゾチームで転移エンタルピーが大きく異なるという点です。表2は ΔH° の方が平均すると約23 kJ · mol⁻¹だけ ΔH より大きいことを示していますが、 ΔH_{cal} の測定誤差が約3%でもその絶対値が大きいため上記の数値は ΔH_{cal} の測定誤差の範囲に入ってしまいます。同じ理由から天然リゾチームの ΔS と架橋リゾチームの ΔS° を比較すると1-PrOH濃度に依存して、大小関係が逆転しています。つまりこの結果のみでは、架橋による安定化の自由エネルギー変化量がエンタルピーとエントロピーのどちらからもたらされた

のかを決定することが困難です。むしろ私達は、架橋を導入したことによって ΔH に積極的に大きな変化がなかったことを測定値が示しているという事実に注目する価値があると考えています。実際、他の蛋白質の場合には、アミノ酸置換や、ジスルフィド結合の欠損というような修飾分子と天然分子のあいだで顕著にUnfoldingエンタルピーが変化する例が報告されています。私達の研究したリゾチームに対する架橋結合の影響はそれ等に比べ ΔH が殆ど変化しないと言うのが特徴です。以上の二つの特徴は、ランダムコイル状の鎖状分子に導入された架橋による鎖のエントロピーの減少が安定化の重要な要因であることを強く示唆しているように思われます。

参考文献

S. Segawa, M. Sugihara, T. Maeda, Y. Mitsuhsa, M. Kodama, S. Seki and M. Sakiyama, *Biopolymers* 28, 1033 (1989).