

蛋白質の中間的構造の熱測定

本来は一次元的存在である蛋白質はどのような機構により特異的な立体構造(ネイティブ構造)を形成するのでしょうか。これまで多くの研究がなされてきましたが、本質的な理解は得られていません。蛋白質の構造形成の機構を明らかにするためには構造形成の中間状態を調べることが近道です。一般にタンパク質の状態転移はネイティブ構造とランダムコイルに近い高度な変性状態の二状態で近似できると考えられてきました。ところが最近では変性状態にもいくつかの形態の存在することが明らかとなり、中でもモルテン・グロビュール状態と呼ばれる中間的構造が注目されています。モルテン・グロビュールは分子のコンパクトさと二次構造は比較的ネイティブ状態に近いが、側鎖の自由度などの三次構造的性質は崩壊した構造状態です。モルテン・グロビュールは今回用いたアポミオグロビンををはじめいくつかの蛋白質で見いだされ、構造形成反応の主要な中間状態ではないかと考えられています。そこでその構造と物性を明らかにすることは重要です。これまでの実験からモルテン・グロビュール状態は熱的には変性状態の範疇に含まれるものであり、モルテン・グロビュールから更に高度な変性状態への構造転移にともなう熱吸収は観測されないと考えられてきました。

アポミオグロビンは、ミオグロビンから非共有的に結合しているヘムを取り去ることによって簡単に調製することができます。ミオグロビンやアポミオグロビンの熱測定は既に P. L. Privalov らによって詳細に行われ、低温変性など興味深い現象が報告されています。アポミオグロビンは中性条件下ではネイティブ状態をとります。塩の存在しない条件で酸性にすると pH 3 以下では、正電荷間の静電的反発力により、ランダムコイルに匹敵する構造に高度に変性します。ところが pH 2 で NaCl などの塩を添加すると静電的反発力が弱まり、その結果、前述のモルテン・グロビュール状態をとるようになります。モルテン・グロビュール構造を安定化する力として疎水の相互作用の重要性が示唆されています。疎水の相互作用が重要であると

すると、モルテン・グロビュールからさらに高度な変性状態に熱転移する際に比熱の増加と熱吸収を伴うことが期待されます。しかし、前述のようにモルテン・グロビュールでは共同的な熱転移や熱吸収は観測されないと報告されており、これらの統一的な理解は得られていません。遠紫外部の円二色性(CD)スペクトルは蛋白質の二次構造を反映します。アポミオグロビンのモルテン・グロビュール状態は約30%の α -ヘリックスを含みます。図1はpH 2においてさまざまな濃度のNaCl存在下でアポミオグロビンの熱転移を測定したものです。20°Cで塩濃度を増すとランダムコイル状態からモルテン・グロビュール状態に転移しました。塩によって安定化されたモルテン・グロビュール構造は熱を加えることにより可逆的に高度な変性状態に転移しました。異なった塩濃度条件での熱による構造転移曲線は、ネイティブ状態に比べれば低いものの、モルテン・グロビュールの熱転移は協同的に起きていることを示唆します。

そこでこのような二次構造の崩壊に対応した熱吸収が実際に存在するかどうかを確かめるために、DASM 4 型示差走査熱量計で熱測定を行いました。図2は低温においてモルテン・グロ

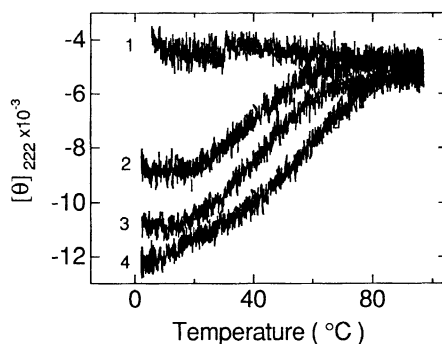


Fig.1 Dependence of the ellipticity of apo-myoglobin at 222 nm on the temperature in the presence of various concentrations of NaCl at pH 2. NaCl concentration: 1, 0mM; 2, 85mM; 3, 100mM; 4, 250 mM.

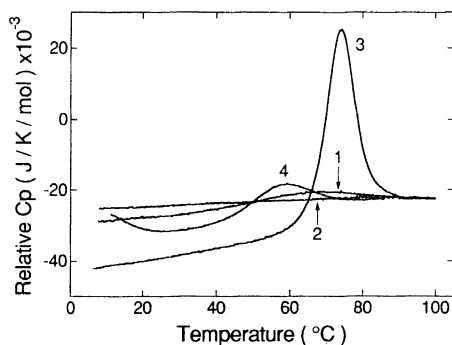


Fig.2 Differential scanning calorimetry (DSC) curves for the unfolding transition of apomyoglobin (1, 2, 4) and myoglobin. Conditions: 1, pH2 in 0.1 M NaCl; 2, pH 2 in the absence of salt; 3, pH 7; 4, pH 5. The heating rate was 1 Kmin⁻¹.

ビュールが安定な条件(曲線 1)と、ランダムコイル状態が安定な条件(曲線 2)での熱測定を比較したものです。参考に示したミオグロビンのネイティブ状態(曲線 3)あるいはアポミオグロビンのネイティブ状態(曲線 4)の熱転移に比べると非常に小さくまたブロードですが、熱転移にともなう熱吸収ピークの存在することがあきらかです。そこでこれを確認するため塩濃度を変えて熱測定を行った結果が図 3 です。熱吸収ピークの位置は塩濃度の上昇に伴って上昇しており、図 1 の CD で測定した構造変化と対応していることがわかります。蛋白質溶液をセルから取り出さずに繰り返して測定したところほとんど同じ熱吸収カーブが観測され、構造転移は可逆的であることも示されました。

モルテン・グロビュール状態と高度に変性した状態との二状態転移反応を仮定してこれらの熱測定の結果を解析しました。表 1 はこのようにして求めた構造転移にともなう熱容量の増加と、構造転移の中間温度でのエンタルピー変化を示しています。表にはミオグロビン、アポミオグロビンのネイティブ状態の対応する値も示

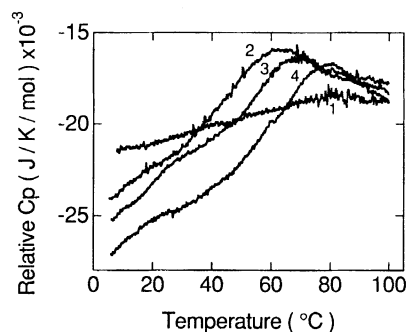


Fig.3 DSC curves for the unfolding transition of apomyoglobin in the presence of various concentrations of NaCl at pH 2. NaCl concentration: 1, 0mM; 2, 85mM; 3, 100mM; 4, 250mM.

されています。これらの値はすべて CD 測定から求めたものに近い値でした。また、表には各構造状態の α -ヘリックス含量も示しています。ミオグロビンのネイティブ、アポミオグロビンのネイティブ、アポミオグロビンのモルテン・グロビュールの順番で α -ヘリックス含量は減少しています。これに対応して変性に伴う比熱の変化も減少していることがわかります。

蛋白質の熱変性にともなう比熱の増加は疎水性残基の溶媒への露出を反映したものです。以上の結果は、モルテン・グロビュール状態の安定化に、ネイティブ状態に比べると弱いながらも疎水的相互作用が寄与していることを示しています。これまでモルテン・グロビュール状態の熱による構造転移にともなう熱吸収はないと考えられてきましたが、その理由のひとつはここで明らかになったように吸収ピークがブロードで小さいため観測できなかったことにあるようです。今後、これらの研究を発展させ蛋白質の構造形成の中間状態の安定性の熱力学的機構を明らかにしたいと考えています。

Table 1 Properties of different conformational states of myoglobin and apomyoglobin.

			condition	α -helix content (%)	ΔC_p kJK ⁻¹ mol ⁻¹	$\Delta H(T_m)$ kJmol ⁻¹
myoglobin	(native)		pH4.7	65.3	8.3	570(74°C)
apomyoglobin	(native)		pH5.2	56.7	6.5	334(61°C)
apomyoglobin	(molten-globule)		250mMNaCl, pH2.0	29.1	1.1	82(81°C)