

メリチンの構造と安定性の熱測定による研究

蛋白質は生理的条件下では特異的な立体構造（ネイティブ構造）をとっていますが、熱を加えると特定の温度で相転移を起こして変性します。蛋白質の変性を調べることににより、ネイティブ構造の安定化の熱力学的機構を明らかにしようとする試みが盛んに行われてきました。微小示差走査熱量計が開発されることで溶液中の蛋白質の変性にともなう熱力学的パラメータを直接的に求めることが可能になり、熱測定は蛋白質の物性研究に欠かせない研究手段となっています。炭化水素などの疎水性物質が水溶液に溶けにくい現象は疎水性効果と呼ばれていますが、蛋白質のネイティブ構造の安定化には疎水性効果が最も重要であることが示され、熱測定の結果を基にその詳細な分子機構が議論されるようになっていきます。

ミツバチの主要な毒成分であるメリチンは26個のアミノ酸残基からなる塩基性ペプチドです（図1 A）。すなわち、6個の塩基性解離基を含むのに対して酸性解離基は存在しません。低濃度（ μM 程度）のメリチンは中性pH、低イオン強度の条件ではランダムコイルに近い構造をとっていますが、高濃度の塩を加えたり、pHをアルカリにすると四量体の α -ヘリックス構造を形成することが知られています（図1 B）。

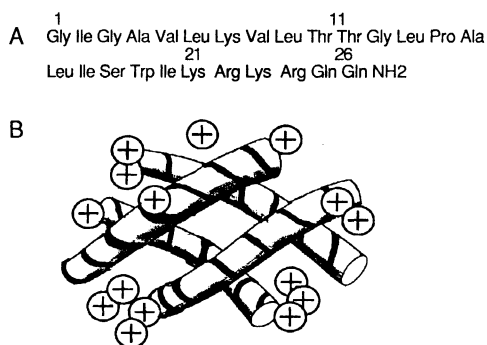


Fig.1 Primary structure of melittin (A) and three dimensional structure of tetrameric melittin (B).

四量体を形成する反応ですからメリチンの濃度を上げることによって α -ヘリックス構造は安定化されます。私たちはメリチンのランダムコイルから α -ヘリックスへの構造転移反応は蛋白質の立体構造の形成機構を明らかにするよいモデルであると考えてその機構を研究してきました。メリチンの α -ヘリックス構造の安定化にも蛋白質の場合と同様に疎水的相互作用が寄与していることが予想されていますが、メリチンのような小さなペプチドの溶液中での構造転移を熱測定により研究した例はありません。そこで私たちは DASM 4 型示差走査熱量計を用いてメリチンの熱測定を行い、蛋白質の場合と比較してみました。

図2はさまざまな塩濃度の条件下でのメリチンの熱測定結果を示しています。これらの測定と平行して、蛋白質の二次構造を反映する円二色性 (CD) スペクトルを用いた熱変性の測定も行いました。塩が存在しないとメリチンは全ての温度範囲においてランダムコイルであることが CD スペクトルから示されました。20°Cで塩を添加していくとメリチンは α -ヘリックス構造に転移します。しかし温度を上げると α -ヘリックス構造が壊れランダムコイルに変性すること、また塩濃度が高いほど変性の温度が上昇することが CD スペクトルから示されました。図2に示されるように塩の存在しないランダムコイルの条件では熱吸収はありませんでしたが、塩を添加すると低温側での比熱は減少して、熱吸収ピークが観測されるようになりました。塩濃度を増すと吸収ピークは増大すると共に高温側にシフトしました。またピークの後の比熱は塩が存在しない場合の値とほぼ一致しました。このようなメリチンの結果は蛋白質の熱測定の結果とよく似ており、メリチンのヘリックス構造の安定化にも蛋白質の場合と同様な機構が働いていることが示唆されました。

CD スペクトルをはじめとするいくつかの光学測定からメリチンの構造転移はランダム

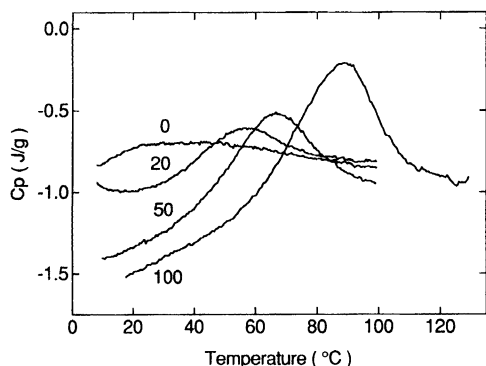


Fig.2 Differential scanning calorimetric (DSC) curves for the unfolding transition of tetrameric melittin at various concentration of NaClO_4 in 10mM Na acetate at pH 4.7. The numbers refer to the NaClO_4 concentration.

コイルと四量体ヘリックスの二状態で近似できることが示されています。そこで二状態転移を仮定して図2に示される熱吸収曲線を解析して構造転移に伴うエンタルピー変化(ΔH)を求めました。なおメリチンは四量体平衡ですから解析に用いた式は単量体平衡の球状蛋白質の場合とは少し異なります。メリチンは濃度を増すことによってもヘリックス構造が安定化されます。そこでメリチンの濃度をさまざまに変化させた条件下でも熱測定を行い、図2に示したものとよく似た結果を得ました。熱吸収曲線及びCDから得られた熱転移曲線を解析して熱変性の ΔH を計算し、その結果を変性の midpoint 温度に対してプロットしたのが図3です。異なった実験から求めた ΔH はほぼ一致しており、20°Cから80°Cの範囲では直線で近似することができました。

多くの球状蛋白質の場合、図3と同様なプロットは直線となり、その傾きからネイティブ状態と変性状態の比熱の差(ΔC_p)が求められます。そして ΔC_p が正であることは蛋白質のネイティブ構造の安定化に疎水的相互作用が働いている証拠と考えられています。更に最近では ΔC_p はネイティブ状態と変性状態の溶媒に露出した表面積の差に比例することが示され、蛋白質の結晶構造と低分子有機物質の基礎データに基づ

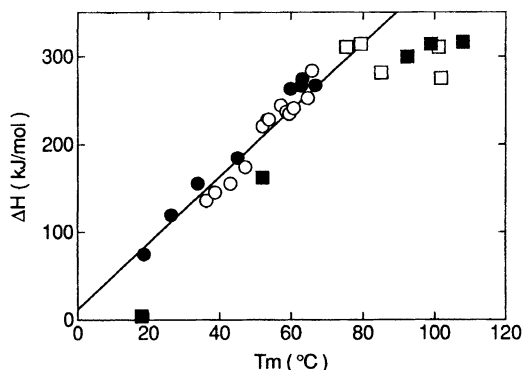


Fig.3 Dependence of ΔH on T_m . Open symbols are under different melittin concentrations and closed symbols are under different concentrations of NaClO_4 . Circles and squares are data from CD and DSC, respectively.

いて ΔC_p を予想する試みも行われています。メリチンの結晶構造を基に大畠らの方法によって四量体ヘリックス構造から単量体ランダムコイルへの構造転移に伴う ΔC_p を計算したところ 9 kJmol^{-1} でした。図3から実測された値は約 4 kJmol^{-1} と計算値の約 $1/2$ でした。大畠らの方法は蛋白質については極めてよい一致を与えています。そこで、この結果はメリチンの溶液中でのヘリックス構造は結晶中の構造に比べてより疎水面が溶媒に露出した構造であることを示唆しています。

メリチンの変性に於ける熱吸収曲線は球状蛋白質のものに較べると相当にブロードであるため解析はいくつかの問題点を含んでいます。しかし、このような小さなペプチドにおいても極めてはっきりとした熱吸収が観測されたことは大変興味深い成果です。更に研究を進めることによりメリチンの溶液中での構造の安定化の熱力学的機構を明確にしたいと考えています。

参考文献

Y. Goto, and Y. Hagihara, *Biochem.* **31**, 732 (1992).

Y. Hagihara, and Y. Goto, *Biochem.*, (印刷中).