

蛋白質結晶のガラス転移(2) — ミオグロビン結晶の低温熱容量 —

蛋白質は実に不思議な高分子です。約20種類のアミノ酸の組み合わせから、無限に近い種類の蛋白質ができます。また蛋白質は一次元的な高分子でありながら特異な立体構造を形成し、それが酵素活性などに寄与しています。しかも水と適度な温度がないと、この立体構造を保つことができません。それでは温度を下げると、蛋白質はどのような挙動を示すのでしょうか？ また含水量を変えると、この挙動はどのように影響されるのでしょうか？ 今回私たちは単斜晶系ミオグロビン結晶の低温熱容量測定により、

蛋白質結晶の低温挙動の研究を行いましたので、このことについて述べていきたいと思います。

ミオグロビン結晶は馬ミオグロビンを NaH_2PO_4 と K_2HPO_4 で塩析させることによって精製しました。結晶は2週間で析出した粉末結晶Aと半年間で析出した結晶Bの二種類が得られました。熱容量測定は48.9%, 38.7%, 27.3%, 19.0%, 10.4%, 0% (乾燥) 含水結晶Aおよび44.4%, 3.0%, 0% (乾燥) 含水結晶Bについて、本研究室既設の低温断熱型マイクロカロリメータを用いて8~300 Kの温度範囲で行いました。

図1に48.9%, 19.0%, 乾燥結晶Aの熱容量曲線を代表的に示します。48.9%急冷試料では約185 Kに発熱から吸熱を伴う典型的なガラス転移が観測されました。そしてガラス転移点より高い温度で、過冷却した結晶水の結晶化による発熱が生じました。発熱がなくなるまでアニールしたところ、ガラス転移による熱容量ジャンプが小さくなり、ガラス転移温度は約170 Kと低くなりました。さらにリン酸塩と水の共融解やリン酸塩水和物の溶解による熱異常が見られました。38.7%, 27.3%試料Aおよび44.4%試料Bにおいても同様の傾向を示しました。19.0%結晶Aでも約210 Kにガラス転移が見い出されましたが、結晶水の結晶化による発熱は観測されませんでした。120 K付近の小さなピークは KH_2PO_4 の相転移による熱異常です。10.4%試料Aおよび3.0%試料Bでも同様の結果になりました。乾燥試料AおよびBではガラス転移による熱異常は生じませんでした。

融解エンタルピーの値および結晶水の過冷却による発熱から、ミオグロビン結晶中には直ちに結晶化する水とアニールすることによってのみ結晶化する水(自由水)、そして結晶化しない水(束縛水)の三種類の水が存在することがわかりました。それでは観測されたガラス転移は何によるもののでしょうか？ 図2はガラス転移温度の含水量依存性を示したものです。含水量が増加するにつれて、ガラス転移温度が低く

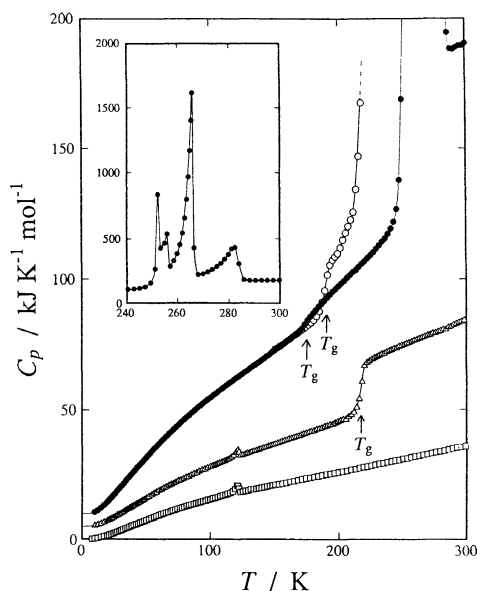


Fig.1 Heat capacities per mole of myoglobin of myoglobin crystals A containing 48.9, 19.0, and 0 (dried) % water. Open and solid circles : the quenched and annealed 48.9% samples A, open triangles : the 19.0% sample A, and open squares : the dried sample A. For the sake of clarity, the heat capacities of the 19.0 and 48.9% samples A are shifted upwards by 5 and 10 $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$, respectively. The inset shows the heat capacities of the 48.9% sample A in the vicinity of the peaks.

Table 1 Activation enthalpies of quenched and annealed monoclinic myoglobin crystals A and B.

Water content	$\Delta H_a(\text{quenched})$ kJ mol ⁻¹	$\Delta H_a(\text{annealed})$ kJ mol ⁻¹
48.9 % (A)	50	51
38.7 % (A)	61	50
27.3 % (A)	49	45
19.0 % (A)	66	—
10.4 % (A)	65	—
44.4 % (B)	56	42
3.0 % (B)	109	—

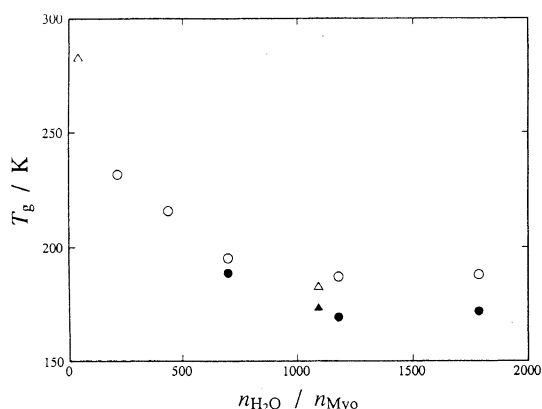


Fig.2 Water content dependence of glass transition temperatures in monoclinic myoglobin crystals A and B. Open and solid circles indicate the temperatures for the quenched and annealed samples A, respectively, and open and solid triangles those for the quenched and annealed samples B, respectively.

なっていることがわかります。このような現象は可塑効果と呼ばれますが、これはこのガラス転移がミオグロビン分子と束縛水の協同的な運動の凍結によるものであることを示唆しています。このことは活性化エンタルピーの値および含水量依存性からも言えます。表1にエンタルピー緩和時間の温度依存性から求められた活性化エンタルピーを示します。活性化エンタルピーの値は50 kJ mol⁻¹以上となっており、これは水の活性化エンタルピー約20 kJ mol⁻¹より大きな値になっています。しかも含水量の増加に伴い活性化エンタルピーが減少するという可塑効果も見られますので、この結果もミオグロビン分子と束縛水の協同的運動の証拠と言えるの

でしょう。

このように蛋白質分子の運動は取り巻く水分子の運動と密接に関係していることがわかりました。このことは蛋白質の酵素反応機構などの研究に有益な情報を与えることになるでしょう。しかしアニールすることによってガラス転移温度が降下する原因など、まだまだわからない点が幾つかあります。いろいろな種類の蛋白質結晶や他の生体高分子結晶の低温挙動の研究を行っていくことによって、さらにいろいろな点が解明されていくことでしょう。（宮崎裕司）

参考文献

宮崎裕司, 松尾隆祐, 菅 宏, 第28回熱測定討論会 (東京), 3113A (1992).