

トリプシンインヒビターの熱転移

蛋白質でありながら蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）により分解されず、その酵素作用を阻害するインヒビターが広く生物界に存在することが知られています。その中の一つであるトリプシンインヒビターは特にトリプシンに強固に結合し、酵素作用を強く阻害します。ダイズには数種の蛋白質性トリプシンインヒビターが含まれ、その中でKunitz型と呼ばれる種類は3種存在しています。それぞれ、 T_i^a 、 T_i^b 、 T_i^c と命名され、 T_i^a が最も多く含まれています。各インヒビターは同一数（181個）のアミノ酸から構成されていますが、 T_i^a を基準にして、 T_i^b では8個のアミノ酸が異なり、 T_i^c ではただ1個のみが他のアミノ酸に置換されています。トリプシンに対する結合は T_i^a と T_i^c がほぼ同程度の強さですが、 T_i^b はトリプシンとの結合面にあるアミノ酸が置換していることから、結合定数が約1/100に低下しています。蛋白質性プロテアーゼインヒビターにおいては構造の安定性が非常に重要であり、骨格構造の強固さがプロテアーゼによる分解を受けない理由との解釈もあります。実際、多くのものが変性し難く、本ダイズトリプシンインヒビターも熱に対して安定であることが言われています。そこで、このインヒビターについて熱力学的な安定性を調べるために断熱型DSC（DASM-4）を用いて熱転移の測定を行いました。

インヒビターはいずれも可逆的に熱変性を起こしましたが、変性速度はかなり遅く、昇温速度 0.25 K min^{-1} 以下でなければ変性速度に追従しない、すなわち、変性反応を平衡論的に取り扱うことができないことが明らかになりました。これは変性の昇温速度依存性からわかります（図1）。しかし、 T_i^b については 0.12 K min^{-1} でもまだ速すぎて速度論的に律速された状態を観測していることになりました。変性エンタルピー変化 $\Delta H/\text{kJ mol}^{-1}$ は 60°C において T_i^a が380、 T_i^b 400、 T_i^c 420と得られ、変性熱容量変化はいずれのインヒビターについても 12 kJ

$\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ となりました。ただし、変性中点温度は 61°C (T_i^a)、 54°C (T_i^c)、 60°C 以下 (T_i^b)でした。これらの値をもとに変性Gibbsエネルギー変化を求めると、常温においても T_i^a の値が最も大きく、最も安定であるという結果を得ました。 T_i^a 、 T_i^c のDSCカーブをvan't Hoff式に基づいて解析すると、両者ともに2状態転移 ($N \rightleftharpoons D$) によく適合しました。このことは蛋白質の状態として、nativeな状態と変性した状態という2種の化学種の間で平衡が成り立っていると考えて良いことを意味します。

トリプシンインヒビターは非常に熱安定であると言われていますが、DSC測定の結果では、一般の蛋白質に比べて特に熱力学的に安定であるというわけではなく、むしろ、可逆性の良さおよび変性速度の遅いことが見掛け上高い安定性として捉えられてきたものと思われます。 T_i^a の55番目のグリシン残基がグルタミン酸に置き換わっただけの T_i^c は T_i^a に比べてかなり変性し易くなっています。この残基はトリプシンとの結合には関与していませんが、構造の維持には重要であることが示唆されます。pHを変えても T_i^a との相対的な安定性の違いには変化がなく、単にカルボキシル基の持つチャージの影響ではなく、グルタミン酸という大きな側鎖に置き換わることによる立体障害のために不安定になると考えられます。

近年、アミノ酸を置換した変異蛋白質が続々とつくられ、その安定性が議論されていますが、その変性機構については野性型蛋白質と同じであるという仮定の下に解析・議論されています。しかし、 T_i^b の結果からわかる様に必ずしも同じ測定条件下で測定したものの同士の比較のみで十分であるとは言えず、誤った結論を導きかねない場合もあると思われます。

（深田はるみ）

参考文献

深田はるみ、高橋克忠、徂徠道夫、原 三郎、第29回熱測定討論会（長岡）、1213A（1993）。

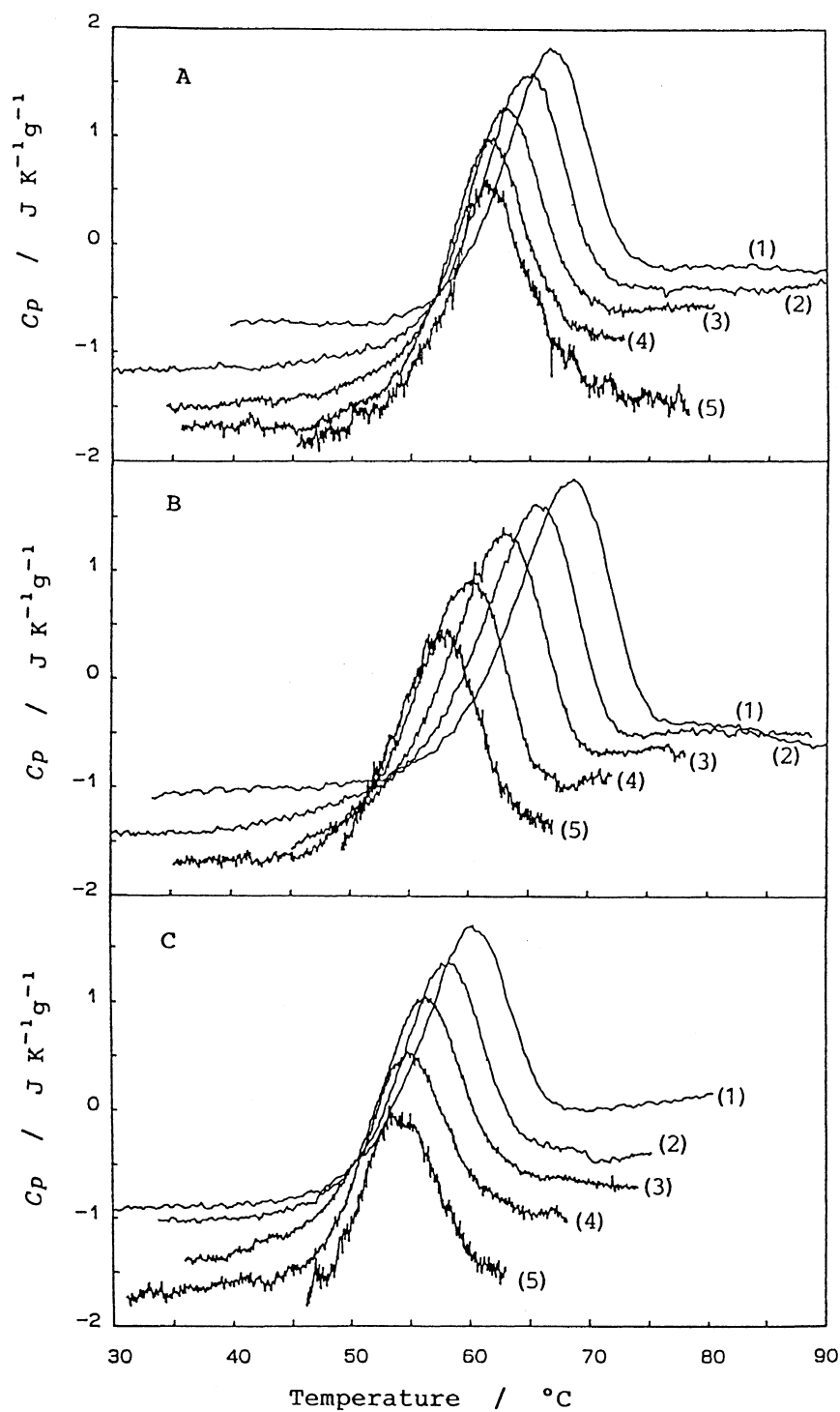


Fig.1 DSC curves of trypsin inhibitors observed at various heating rates.

A ; T_i^a , B ; T_i^b , C ; T_i^c . Heating rate/ $K \min^{-1}$ are ; (1) 2 , (2) 1 , (3) 0.5, (4) 0.25, and (5) 0.12. Protein concentration is 2 mg ml^{-1} . pH7.0 phosphate buffer.