

熱測定による蛋白質のモルテン・グロビュール状態の研究

今日、X線結晶解析や多次元の核磁気共鳴の発展によって、蛋白質の機能的状態（ネイティブ状態）の原子座標レベルでの解析が可能となっています。しかしながら、「アミノ酸の直鎖状重合体である蛋白質がどのような仕組みによってネイティブ状態に折れたたまって行くのか」という問題はいまだに解明されていません。モルテン・グロビュール状態は分子のコンパクトさと二次構造はネイティブ状態に近いのに対して三次構造は大きく崩れた中間の状態です。モルテン・グロビュール状態は蛋白質の折れたたみの普遍的で主要な中間状態であると考えられており、その安定化機構を解き明かすことは重要な課題です。これまで、マイクロ示差走査型熱量計（DSC）による解析から見積もられる変性に伴う定圧比熱の変化（ ΔC_p ）が正であることから、蛋白質のネイティブ状態はいわゆる疎

水的な相互作用によって安定化されていると考えられています。一方、モルテン・グロビュール状態の場合、チトクロム *c* のように DSC によって明らかな ΔC_p が観測されるものもあれば、 α -ラクトアルブミンのように観測されないものもあり、安定化に対する疎水的相互作用の役割は曖昧です。モルテン・グロビュール状態の熱力学的安定化機構をさまざまな側面から研究することが必要とされています。

最近、等温滴定型熱量計（Isothermal Titration Calorimetry ; ITC）により蛋白質とそのリガンド分子との結合反応を簡便にかつ精度良く解析することができるようになりました。我々は ITC をモルテン・グロビュール状態形成反応の測定に適用できるのではないかと考えました。チトクロム *c* などの塩基性蛋白質は酸性 pH において低イオン強度では高度に変性しています。

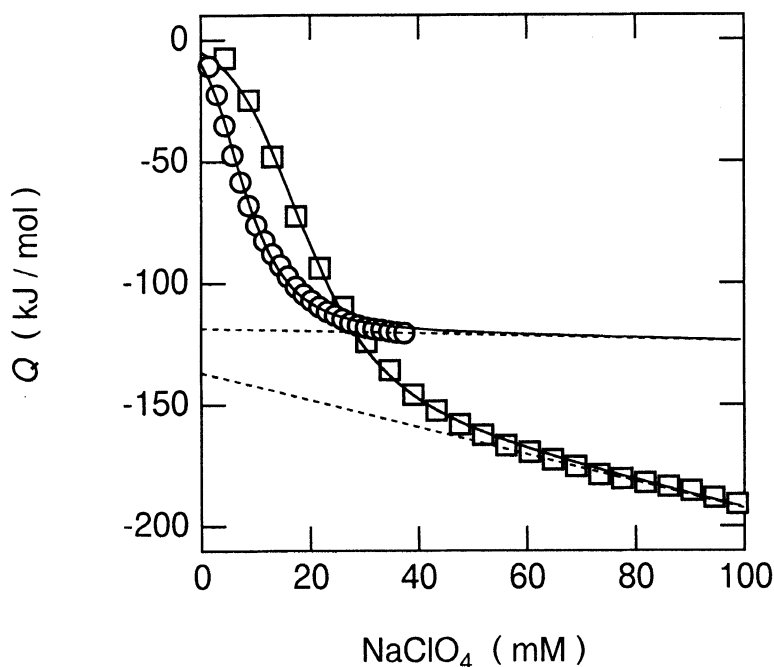


Fig.1 Heat of titration of acid-unfolded cytochrome *c* by NaClO_4 at pH2.
○, 20°C ; □, 35°C.

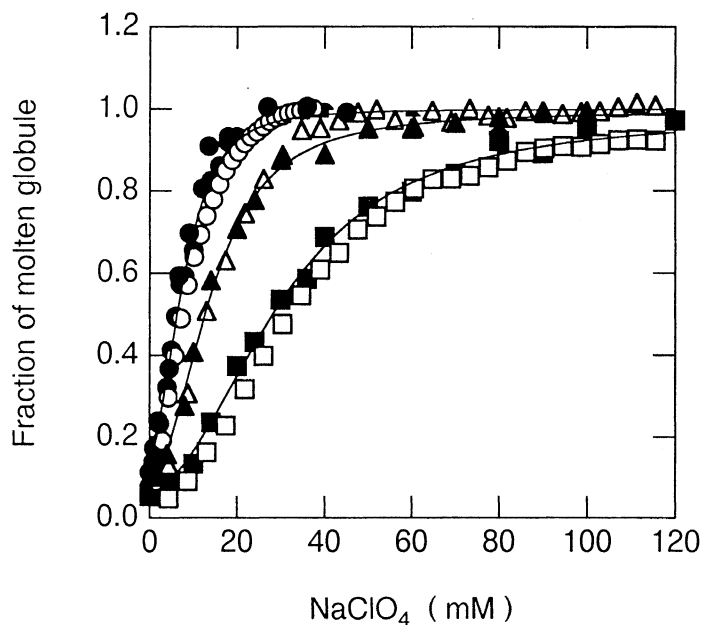


Fig.2 NaClO_4 -dependent conformational transition of cytochrome c at pH 2, detected by heat (open symbols) and ellipticity at 222nm (closed symbols).
 $\bigcirc$, $\bullet$, 20°C ; $\triangle$, $\blacktriangle$, 30°C ; $\square$, $\blacksquare$, 40°C.

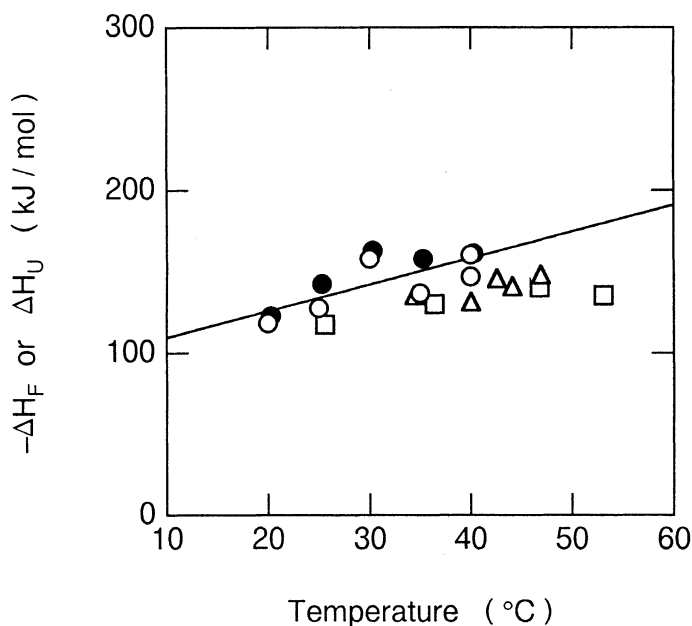


Fig.3 Dependence of ΔH_F and ΔH_U on temperature, detected by ITC ($\bigcirc$, $\bullet$), DSC ($\triangle$) or CD ($\square$). Open circle and closed circle indicate the ΔH_F determined by NaClO_4 - and Na_2SO_4 -dependent conformational transitions at pH 2, respectively. Open triangle and open square indicate the ΔH_U determined by thermal unfolding of the NaClO_4 -induced molten globule state at pH 2. The solid line is obtained by the least square fittings of ITC data.

ところがそこに塩を添加すると、蛋白質の正電荷に陰イオンが結合して電荷間の反発が抑えられ、モルテン・グロビュール状態が安定化します。塩の添加によって引き起こされるモルテン・グロビュール形成反応をITCを用いて測定することを試みました。

pH 2においてチトクロム *c* の溶液中に過塩素酸ナトリウムを添加した時の熱量変化を図1に示しました。ここでは塩の希釈による熱を差し引いたものが示してあります。このように、モルテン・グロビュール状態形成にともなう発熱反応がITCによって測定されました。図1に破線で示してある様なベースラインを仮定してモルテン・グロビュール状態の分率を求めたものが図2です。図2には、円偏光二色性(CD)スペクトルから見積もられたモルテン・グロビュール状態の分率も示してあります。図より明らかなように熱量変化から求めた転移曲線とCDから求めた転移曲線はよく一致しました。観測された熱量の大部分がモルテン・グロビュール状態形成反応によるものであることを強く示唆しています。そこで、塩濃度0に外挿した熱量をモルテン・グロビュール状態形成反応のエンタルピー変化(ΔH_F)と考え、その温度依存性を調べました。図3に示されるようにITCにより測定された各温度での ΔH_F は、直線的な相関を示しました。この直線の傾きから見積もられる ΔC_p は約1.6 kJ/mol/Kとなりました。

ITCでは高度な変性状態からモルテン・グロビュール状態への折たたみ反応のエンタルピー変化が測定されます。この逆の反応をDSCあるいはCDを用いて測定することが可能です。図4 AとBは過塩素酸ナトリウムにより形成されるモルテン・グロビュール状態の熱によるアンフォールディング反応をDSCおよびCDによって測定した結果をそれぞれ示しています。これらを解析して求めた転移の midpoint のエンタルピー変化(ΔH_U)を図3に示しています。DSCやCDで求めた ΔH_U はITCの結果と非常によく対応していました。

以上示した結果から、ITCを用いてチトクロム *c* のモルテン・グロビュール状態のアンフォールディングのエンタルピー変化や ΔC_p などを

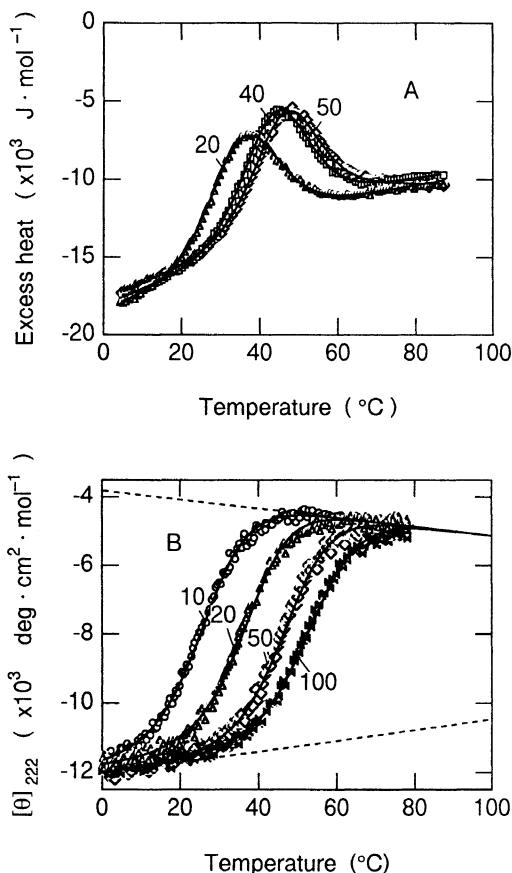


Fig.4 Thermal unfolding of the molten globule state of cytochrome *c* at pH 2 measured by DSC (A) or ellipticity at 222 nm (B). The numbers refer to the concentration of NaClO₄ in millimolar units.

見積もることができました。今回、用いたチトクロム *c* はDSCやCDにより既に ΔH_U や ΔC_p が存在することが報告されていました。ITCの感度が比較的良好なことから、DSCやCDによる測定が困難な場合にも、ITCが有効な測定手段となることが予想されます。今後、ITCやDSCを併用することにより、モルテン・グロビュール状態の安定化機構をさらに明らかにして行きたいと考えています。

(浜田大三, 後藤祐児)