

アポミオグロビンのモルテン・グロビュール状態の安定化機構

今日、X線結晶解析や核磁気共鳴により蛋白質のネイティブ構造の詳細な構造解析ができるようになりました。しかし、蛋白質がネイティブ構造を獲得する機構（フォールディング機構）は未だに明らかではありません。モルテン・グロビュール（MG）状態は蛋白質のフォールディングの普遍的な中間状態であると考えられており、その安定化機構を研究することは蛋白質のフォールディング機構を理解する上で重要です。MG状態はネイティブ状態に似た二次構造を持つが三次構造的には壊れたコンパクトな中間状態です。いくつかの塩基性蛋白質は酸性条件下で塩を添加するとMG状態を形成することが知られています。従来、示差走査型熱量計（DSC）などの熱による構造転移（アンフォールディング）を測定することがMG状態の主要な研究方法の一つでした。しかし、一般にMG状態のアンフォールディングに伴うエンタルピー変化（ ΔH_U ）は小さくDSCで観測することは困難です。前回、我々はチトクロムcのMG形成反応を等温滴定型熱量計（ITC）を用いて測定

し、高度な変性（U）状態からMG状態への転移が一次の相転移であることを明らかにしました。

アポミオグロビンも酸性条件下、高塩濃度下においてMG状態を形成する蛋白質です。同時に、アポミオグロビンはpH 4付近で塩がなくてもMG状態を形成します。Griko と Privalov はpH 4付近でのアポミオグロビンのMG状態のアンフォールディングは過剰熱吸収を伴わない、比熱の変化のみが伴う二次の相転移であると報告しています（Griko & Privalov, 1994, *J. Mol. Biol.*, 235, 1318-1325）。一方、我々はアポミオグロビンのpH 2、高塩濃度下におけるMG状態のアンフォールディング反応をDSCにより測定しました。図1のように、pH 2で塩化ナトリウムにより安定化したアポミオグロビンのMG状態の熱変性は明らかに熱吸収ピークを伴うものです。このことは、塩によって形成したアポミオグロビンのMG状態のアンフォールディングがMG状態からU状態への一次の相転移であることを示唆しています。このようにアポミオグロビンの場合、溶媒条件をかえることで異なる熱力学的性質が観測されており、こ

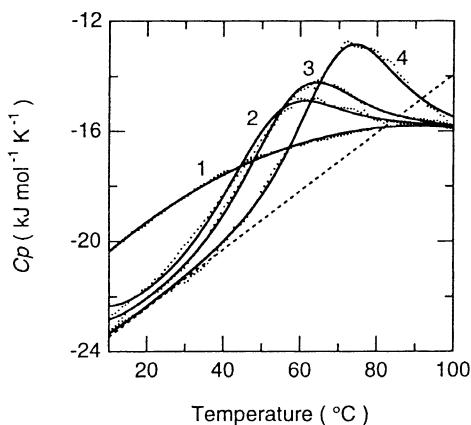


Fig.1 DSC of the molten globule state of horse apomyoglobin at pH 2 in the presence of various concentrations of sodium chloride. (1), 0 ; (2), 85 ; (3), 100 ; (4), 250mM sodium chloride.

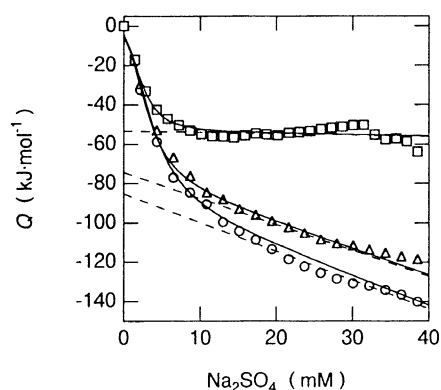


Fig.2 Sodium sulfate-induced transition of apomyoglobin obtained by ITC in 10 mM HCl (pH 2). $\square$, 25°C ; $\triangle$, 30°C ; $\circ$, 35°C.

れらを統一して解釈することは現在のところ困難です。今回、我々はアポミオグロビンのMG状態の安定化機構を探るため、塩によるMG形成反応をITCを用いて測定しました。

図2にアポミオグロビンの硫酸ナトリウムによるMG形成反応をITCを用いて調べた結果を示します。これからアポミオグロビンの転移反応は協同的なものであることがわかりました。チトクロム*c*の実験から*Q*の大部分は蛋白質の構造転移に起因することがわかっています。故に、アポミオグロビンの塩によるMG形成反応がU状態からMG状態への一次の相転移であることが示唆されました。図2の破線で示されるベースラインを仮定し、この転移曲線からMG形成のエンタルピー変化(ΔH_F)を見積もった所、DSCで観測された ΔH_U にほぼ一致する値が得られました(図3)。このこともアポミオグロビンの塩による構造転移がU状態から

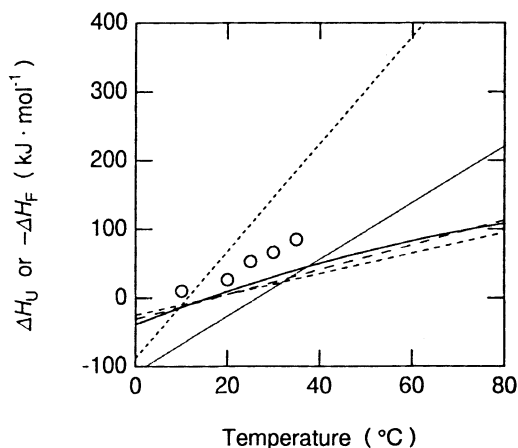


Fig.3 Temperature dependence of ΔH_F and ΔH_U detected by ITC (open circles), DSC or circular dichroism (lines). ΔH_F values are obtained by calorimetric titration with Na_2SO_4 (○). Temperature dependencies of ΔH_U are obtained from the thermal unfolding of the NaCl -(- - - -), NaTCA -(---) and Na_2SO_4 -(—) stabilized molten globule state or the native states of apo-(· · · · ·) and holo-(-----) myoglobin.

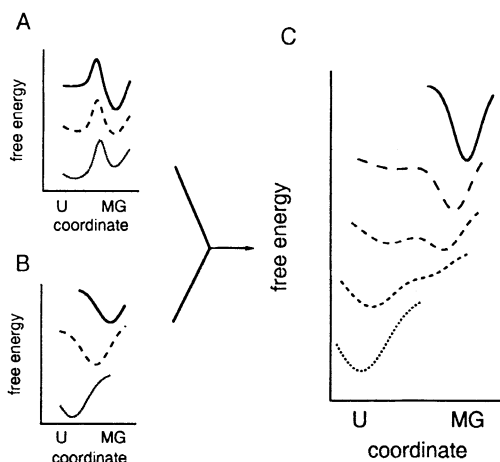


Fig.4 Free energy profiles between molten globule and unfolded states.

(A) first-order transition. (B) second-order transition. (C) mixed transition.

MG状態への一次の相転移であることを示しています。

Griko と Privalov の結果と我々のものを統一的に解釈することはできないでしょうか。図4に一般的な解釈のためのモデルを提唱します。U状態からMG状態への転移は単純な一次の相転移(図4A)や二次の相転移(図4B)ではなく、これらが混ざった形(図4C)で説明できると思われます。図4Cの構造転移の途中で現れる障壁が大きければ一次の相転移として、小さければ二次の相転移として状態転移が近似されと考えられます。これに似たモデルが統計力学的計算から予測されているのは興味深いことです(Alonso *et al.*, 1991, *Biopolymers*, 31, 1631-1649)。

以上の考察はあくまでもモデルですが、今後DSCやITCによる測定によりMG状態の安定化機構が更によく理解されるものと期待されます。

(浜田大三, 後藤祐児)

参考文献

D. Hamada, S. Kidokoro, H. Fukada, K. Takahashi and Y. Goto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* (印刷中)