

蛋白質結晶のガラス転移 (3) —斜方晶系インシュリン結晶の低温熱容量—

蛋白質は二十種類ものアミノ酸がペプチド結合によって一次元的につながってできた生体高分子の一種です。蛋白質はアミノ酸配列の順序によってそれぞれ特異な立体構造をとり、それが機能の発現に役立っています。しかし蛋白質の機能発現は立体構造だけではなく、分子運動も重要な因子になっていることが中性子散乱実験などから最近わかってきました。ですから蛋白質分子の運動状態を研究することは蛋白質の機能発現の機構、ひいては生物の生命活動の本質を理解する上で非常に重要です。特に結晶状態での蛋白質分子の運動状態を熱力学的立場から調べることは、構造の側面からの研究と直接比較できるという点で大変興味深いと言えます。

私たちはこれまでに正方晶系リゾチーム結晶および単斜晶系ミオグロビン結晶の低温熱容量測定を行い、それぞれ約 150K と 180K にガラス転移を見出しました。そしてこれらが蛋白質分子と束縛水の協同的な運動の凍結現象であることを突き止めました。このことは本レポート No.13 と No.14 ですでに報告しました。しかしこれまでの研究には多少問題がありました。一般に蛋白質を結晶化するには塩などの沈殿剤を必要とします。そのため得られる蛋白質結晶はどうしても沈殿剤を含んでしまい、純粋な蛋白質-水系を実現しているとはいえませんでした。私たちは結晶中の蛋白質分子の運動状態と水和状態の関係をより厳密に調べるために、できるだけ純粋な蛋白質-水系に近い蛋白質結晶の低温熱容量を行いたいと思いました。今回の斜方晶系インシュリン結晶は私たちの求めていたものに非常に近い蛋白質結晶でした。本レポートではこのインシュリン結晶の低温熱物性について述べたいと思います。

インシュリンの結晶化には非常に薄い濃度の H_2SO_4 と Na_2SO_4 が用いられました。分析の結果、乾燥結晶中に含まれている Na_2SO_4 の量は 0.03% でしたので、今回得られた結晶は純粋な蛋白質-水系に非常に近いものであることがわかります。熱容量測定は含水量がそれぞれ 52.9

%, 36.5%, 19.7%, 8.4%, 4.9%, 0% (乾燥) の結晶について行いました。何れの試料も量が少なかったため、本研究室既設の微量試料用断熱型熱量計を用いて 7~300K の温度範囲で行いました。

図 1 と図 2 はそれぞれ 52.9%, 8.4%, および乾燥結晶の熱容量とその温度微分係数を代表的に示したものです。図には示していませんが、52.9% 試料では 271.0K と 273.1K に水の融解が観測されました。36.5%, 19.7% 試料でも同様にそれぞれ 268.7K と 271.7K, 258.0K に水の融解が見られました。また急冷した 19.7% 以上の含水試料では約 150K に非常に nadir かなガラス転移が観測されました。そして 200K 以上では過冷却した結晶水の結晶化によるものと思われる発熱が生じました。245K で発熱がなくなるまでアニールして再び冷却すると、熱容量のジャンプは小さくなったものの、同じ 150K にガラス転移が見られました。8.4% および 4.9% 含水試料ではそれぞれ約 200K, 250K

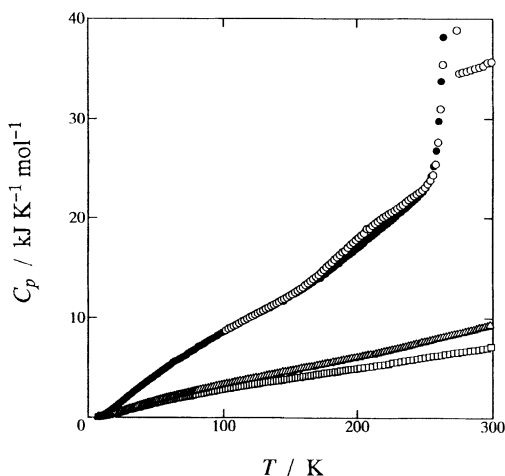


Fig.1 Heat capacities of orthorhombic insulin crystals. ○, ●: Sample of 52.9% water content (quenched, annealed at 245 K). △: Sample of 8.4% water content. □: Dried sample.

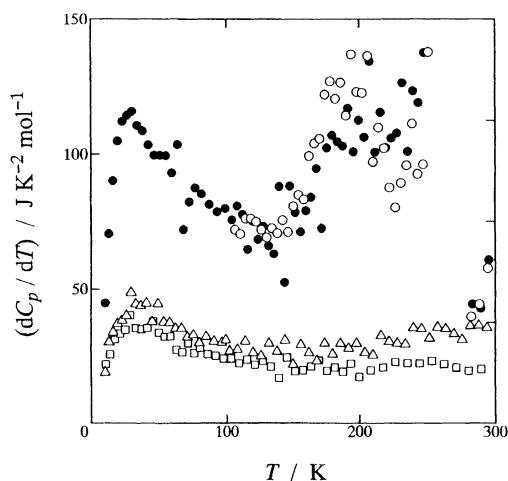


Fig.2 Differential coefficients of heat capacities of orthorhombic insulin crystals with respect to temperature. ○, ●: Sample of 52.9 % water content (quenched, annealed at 245 K). △: Sample of 8.4 % water content. □: Dried sample.

にガラス転移が観測されました。しかし結晶水の結晶化の発熱は見られませんでした。乾燥試料には何も熱異常はありませんでした。

結晶水の融解エンタルピーの値と結晶化による発熱が生じたことから、インシュリン結晶に

もリゾチーム結晶やミオグロビン結晶と同じく、すぐに結晶化する水とゆっくり結晶化する水(自由水),そして結晶化しない水(束縛水)の少なくとも3種類の水が存在することがわかりました。しかし36.5%以上の含水結晶では水の融解が2段階で見られたことから、すぐに結晶化する水に2種類あることがうかがえます。またインシュリン結晶のガラス転移の含水量依存性に可塑効果が見られることから、このガラス転移はインシュリン分子と束縛水の協同的な運動の凍結によるものと結論されます。

ところで、インシュリン結晶で観測されたガラス転移は比較的純粋な蛋白質-水系に近いリゾチーム結晶のガラス転移に類似しています。このことは蛋白質の種類にかかわらず、純粋な蛋白質-水系の結晶は150K付近になだかなガラス転移を持つことを示しているように思われます。今後、球状蛋白質と立体構造の異なる膜蛋白質や分子量の小さいホルモンなどの結晶の低温熱容量測定を行い、この点についてさらに詳しく研究していこうと思っています。

(山田晃司, 宮崎裕司)

参考文献

山田晃司, 宮崎裕司, 徂徠道夫, 第32回熱測定討論会(筑波), A301 (1996).