

## 架橋リパーゼ結晶—水系の低温熱容量とガラス転移

蛋白質は生物の生命活動を司る上で最も重要な生体高分子です。蛋白質の機能の発現には、蛋白質分子自身のもつ特異なアミノ酸配列や立体構造ばかりでなく、その周りに存在する水やゆっくりとした分子運動も重要であることが指摘されています。

私たちはこれまでにリゾチーム、ミオグロビン、インシュリン、バクテリオロドプシンの含水結晶の低温熱容量測定を行ってきました（本レポート No. 13, 14, 17, 19 参照）。そして全ての含水結晶で蛋白質分子とその周りの束縛水分子の協同的分子運動の凍結によるガラス転移を見出しました。また蛋白質の水和状態についても、蛋白質分子の周りの水には 3, 4 種類の水が存在することを突き止めました。

このように、熱容量測定によって周りの水と強い相関をもつ蛋白質の分子運動がガラス転移や過剰熱容量としてとらえることができます。そこで次に興味もたれるのが、蛋白質分子の安定性に深く関わっている疎水性相互作用と分子運動との関係です。例えば蛋白質分子の周りを水の代わりに有機溶媒で置き換えたなら、運動状態はどのように変化するのでしょうか。しかし、一般に蛋白質を有機溶媒中に投入すると変性してしまい、活性を失ってしまいます。ところが、蛋白質をある架橋剤を用いて化学修飾してやると、有機溶媒中でも変性せずに活性を保てるようになります。私たちはこの点に着目して、化学修飾した蛋白質の研究を始めることにしました。

まず化学修飾した蛋白質の水共存下での低温挙動を熱容量測定によって調べ、化学修飾していない場合との違いを見ることにしました。今回使用した試料は市販のグルタルアルデヒドで架橋したリパーゼ結晶です。本レポートではいろいろな含水量での架橋リパーゼ結晶—水系の低温熱容量について紹介します。

最初に市販の架橋リパーゼ結晶を透析せずに真空乾燥だけした状態で熱容量を測定しました。その結果を Fig. 1 に示します。なお熱容量は

架橋リパーゼ結晶 1g 当たりで表します。200 K 以上に未反応のグルタルアルデヒドによると思われる熱異常が観測されました。そこで試料を透析して真空乾燥後、再度測定しました。Fig. 1 からわかるように、熱容量の絶対値が幾分小さくなり、200 K 以上の熱異常も小さくなりました。しかし依然として不純物が残っています。時間の都合上、今回の実験には透析後の乾燥試料を用いました。含水試料の測定は 58.7%, 29.2%, 11.4%, および 5.8% の合計 4 種類の含水試料について行いました。

Fig. 2 に 58.7%, 29.2%, 11.4%, および 5.8% の含水試料の熱容量の測定結果を示します。300 K から冷却した 58.7% と 29.2% の含水試料（急冷試料）では 170 K 付近からなだらかなガラス転移が観測されました。このガラス転移温度は次のレポートで紹介する架橋していないリパーゼ—水系のガラス転移温度約 150 K よりも 20 K ほど高くなりました。これは架橋によってリパーゼの分子運動が束縛されたためだと考えられます。さらに 200 K 以上で過冷却した水の結晶化による発熱と乾燥試料に含まれる不純物の熱異常が見られました。270 K 付近には水の大きな融解ピークが観測されました。発熱が最大の 220 K 付近で発熱

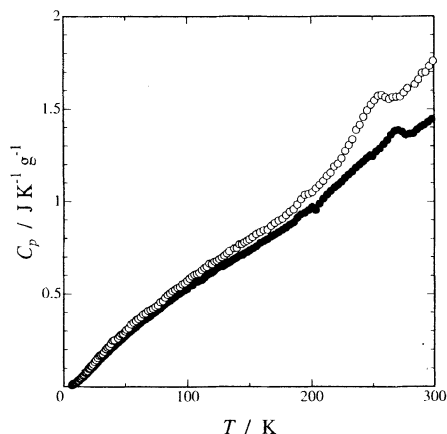


Fig. 1. Heat capacities of dried cross-linked lipase crystals without dialysing (○) and with dialysing (●).

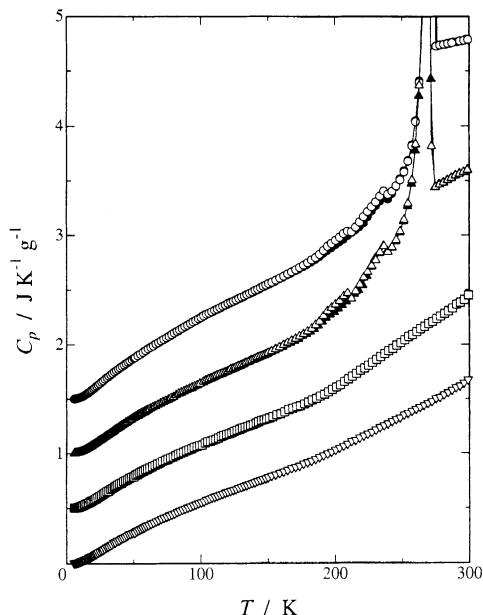


Fig. 2. Heat capacities of cross-linked lipase crystal-water systems with water content of 58.9 (○, ●), 29.2 (△, ▲), 11.4 (□, ▣), and 5.8 % (▽). Heat capacities of samples with water content of 58.9, 29.2, and 11.4 % are shifted upward by 1.5, 1, and 0.5 J K<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>. Open and solid marks indicate heat capacities of quenched and annealed samples.

がなくなるまでアニールして冷却した試料（アニール試料）でも約 170 K にガラス転移が見出されました。11.4% および 5.8% 含水試料ではそれぞれ約 190 K にガラス転移が観測されました。しかし過冷却水の発熱や水の融解は見られませんでした。

水の融解ピークから結晶化した水の量を求め、全体の水の量から差し引くことにより、結晶化

Table 1. Glass transition temperature for cross-linked lipase crystal-water systems

water content	$T_g(\text{quenched}) / \text{K}$	$T_g(\text{annealed}) / \text{K}$
58.7 %	171	171
29.2 %	170	170
11.4 %	189	
5.8 %	193	

しない水の量、すなわち束縛水量を求めたところ、リパーゼ結晶 1g 当たり約 0.27g となりました。この値は球状蛋白質 1g 当たりの束縛水量 0.3~0.5g と比べると、若干小さくなりました。これは恐らくリパーゼ分子の親水性基が架橋されたことにより、水分子の束縛される部分が減少したためでしょう。

各含水量に対するガラス転移温度を Table 1 にまとめました。ガラス転移温度の含水量依存性が他の蛋白質-水系の場合と同様に可塑効果を示すことから、観測されたガラス転移はリパーゼ分子と束縛水分子との協同的な運動の凍結によるものであると言えます。

このように架橋することによって、リパーゼの低温挙動が変化することが今回の実験によって明らかになりました。しかし測定試料にまだ若干不純物が混入しているので、不純物を完全に除いた試料で同様の実験を行おうと思っています。さらに有機溶媒共存下での実験も進めたいと思います。

(清水由隆, 宮崎裕司)

#### 発表

清水由隆, 宮崎裕司, 徂徠道夫, 第 35 回熱測定討論会 (東京), 2B1140 (1999).

## Low-Temperature Heat Capacities and Glass Transitions of Cross-Linked Lipase Crystal-Water Systems

The heat capacities of cross-linked lipase crystal-water systems with water content of 58.7, 29.2, 11.4, 5.8, and 0 %. The quenched crystals with 58.7 and 29.2 % water content exhibited a glass transition around 170 K. An exothermic effect due to the crystallization of supercooled water and a fusion of ice was found above 200 K and around 270 K, respectively. The samples annealed around 220 K until the exothermic effect disappeared also showed a glass transition around 170 K. The crystals containing 11.4 and 5.8 % of water gave rise to only a glass transition at about 190 K. In the dried crystal, a small thermal anomaly due to impurity was observed above 200 K in spite of dialysis. The amount of bound water was determined to be about 0.27 g per gram of lipase. The water content dependence of the glass transition temperatures revealed that the glass transitions are attributed to the freezing of the cooperative motion between the lipase and the bound water molecules.

(by Y. Shimizu & Y. Miyazaki)