

蛋白質と水との相互作用：架橋および 非架橋リパーゼ-水系の低温熱容量

生物の体の大部分は蛋白質と水から成り立っています。したがって蛋白質と水の関係を解明することは生物の生命活動を理解するために重要です。蛋白質はとても大きな分子であり、生体中での形状は水に対するアミノ酸残基の親水性・疎水性の大小や置換基の立体効果、さらにまわりのアミノ酸残基の複雑な相互作用によって特異な立体構造をとっています。蛋白質は、この特異な立体構造や振幅の大きいゆっくりとした分子運動を利用して他の物質と結合したり、様々な化学反応の触媒として働いています。このことから、生命活動には蛋白質の立体構造や分子運動、水との相互作用（水和状態）がいかに重要であるかがわかります。

一方、蛋白質を化学的に架橋修飾することによって、天然状態では活性を示さない条件下でも、蛋白質が機能することが知られています。最近私たちの研究グループは、微量試料用断熱型熱量計を用いて *Candida Rugosa* 由来のリパーゼをグルタルアルデヒドで架橋した架橋リパーゼ結晶と水の系の低温熱容量測定を行い、それぞれの低温挙動の含水量依存性と架橋の低温挙動への影響について調べて本レポート No.21 で紹介しました。その研究紹介記事では、リパーゼを架橋することによってガラス転移温度や水和状態が若干変化したと報告しました。しかし、この時の架橋リパーゼ結晶の化学的純度に少しばかり問題があったため、この結果が本当に架橋によるものかどうか確信がもてていませんでした。今回私たちはほぼ不純物を含まない架橋リパーゼ結晶を得ることに成功しましたので、本レポートでは改めて測定した架橋リパーゼ結晶-水系の結果を非架橋リパーゼ-水系の測定結果と共に紹介したいと思います。本研究で用いたリパーゼはエステラーゼの一種で、動物の胃液・膵液・腸液・血清などに見出される球状蛋白質です。動物の体内において中性脂肪（グリセロールエステル）を加水分解して、脂肪酸とグリセロールに分解する反応を可逆的に触媒

する機能をもっています。

架橋リパーゼ結晶-水系および非架橋リパーゼ-水系についてそれぞれ6種類の含水量の試料について熱容量測定を行いました。含水量は重量法を用いて決定し、測定は本研究室既設の微量試料用断熱型熱量計を用いて行いました。

Fig. 1 に各試料の熱容量曲線を示します。架橋・非架橋リパーゼ-水系の自由水が存在する試料については150 K 付近にガラス転移が観測され、さらに急冷試料では200 K 以上のところで過冷却した水の結晶化による発熱が観測されました。Fig. 2 に示したガラス転移温度の含水量依存性からわかるように、自由水が存在しない試料ではガラス転移が低濃度になるにつれ高温側にシフトする現象が観測されました。このような傾向を可塑効果と呼び、ガラス転移がリパーゼ分子と束縛水分子との協同的運動の凍結現象であることを示唆していると考えられます。

自由水が存在する含水試料の水の融解エンタルピーから架橋リパーゼ結晶の束縛水量は架橋リパーゼ結晶1 g 当り 0.33 ± 0.02 g, 非架橋リパーゼについては1 g 当り 0.29 ± 0.01 g と求まりました。架橋リパーゼ結晶、非架橋リパーゼの束縛水量は一般的な球状蛋白質の束縛水量0.3~0.5g とよく一致し、両者の差はほとんどないので、架橋によってリパーゼ分子を取り巻く水和状態はほとんど変化していないと思われます。また、Fig. 2 に示したように水が存在する状態では架橋・非架橋リパーゼのガラス転移温度に差はありませんでした。水のガラス転移温度以上ではリパーゼ分子と水分子との協同的分子運動によると思われる過剰熱容量が観測されました。また水の融解温度以上で、この過剰熱容量は自由水が存在する環境下では一定値をとる一方、束縛水量減少にともない減少することからも、蛋白質の分子運動は束縛水分子との協同的な現象であり、運動に必要な水分子が不足することで活性化エネルギーが増加し、その結果、運動の鈍化が起こっているものと思わ

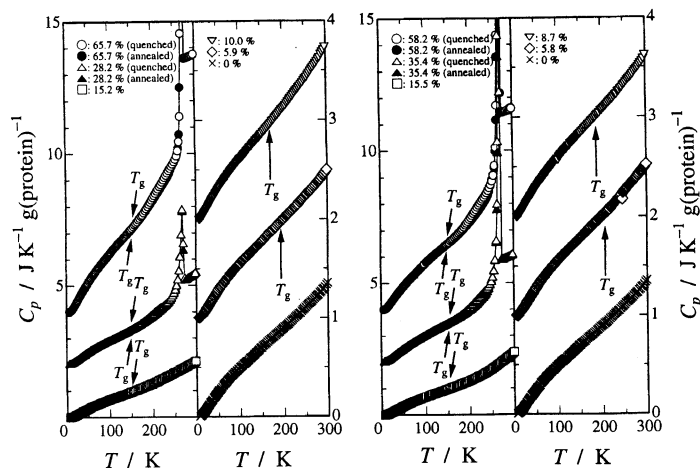


Fig. 1. Heat capacities of cross-linked lipase crystal-water systems (left) and noncross-linked lipase-water systems (right).

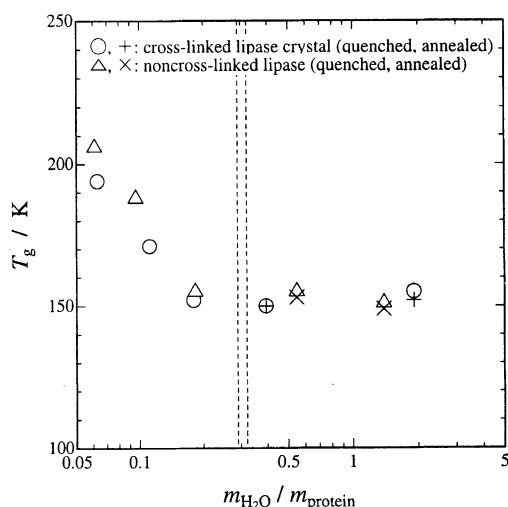


Fig. 2. Relationship between glass transition temperature and water content.

れます。しかし過剰熱容量からも架橋による顕著な影響は観測されませんでした。したがって、熱測定の見点からは、架橋による蛋白質分子の水の状態や水分子との協同的分子運動への影響はほとんどないのではないかと推測されます。

(菊池響, 宮崎裕司)

発表

菊池響, 清水由隆, 宮崎裕司, 徂徠道夫 第39回 日本生物物理学会 (大阪), 3P018 (2001)
菊池響, 清水由隆, 宮崎裕司, 徂徠道夫 第36回 熱測定討論会 (仙台), 2B0920 (2001)

Interaction Between Protein and Water: Low-Temperature Heat Capacities of Cross-Linked and Noncross-Linked Lipase-Water Systems

Heat capacities of cross-linked and noncross-linked lipase-water systems with different water contents were measured. From the enthalpy of melting of ice, the amounts of the bound waters of the cross-linked and noncross-linked samples were determined to be 0.33 ± 0.02 and 0.29 ± 0.01 g water / g protein respectively. Furthermore we observed glass transition temperatures and excess heat capacities for both systems, but no remarkable difference appeared between the cross-linked and noncross-linked lipase-water systems. Therefore it is suggested that the influence of cross-linking on the hydrated state and the molecular dynamics is quite small.

(by K. Kikuchi & Y. Miyazaki)