

熱容量測定から見たインヒビターの結合によるトリプシンの分子運動への影響

蛋白質は生体中における生命活動の大部分を司っています。蛋白質の機能発現には、蛋白質分子のもつ特異な立体構造（静的構造）ばかりでなく、非調和的な分子運動（動的構造）や水和が密接に関係しています。蛋白質の機能発現の機構を解明することは生物の生命現象の理解につながりますので、蛋白質の静的・動的構造、水和状態を研究することは非常に重要な意味をもちます。

蛋白質の一種である酵素は、一般に二つの球状ドメインから成り、それらをつなぐフレキシブルなペプチド鎖がちょうつがいとなって二つのドメインを開け閉めする「ちょうつがい運動」を行っていることが知られています。このちょうつがい運動は、ドメイン間の溝の奥にある活性部位に基質を結合し、加水分解を行い、分解生成物を放出するという酵素の機能に密接に関係していると考えられています。

昨年の本レポートで、牛膵臓トリプシン、大豆トリプシンインヒビター、およびそれらの複合体の 95% 含水試料の熱容量測定において、トリプシンの分子運動がトリプシンインヒビターの結合によって阻害されるのに対応するトリプシンの熱容量の減少が観測されたという記事を紹介しました。今回、さらに含水量を変えた実験と阻害剤を低分子阻害剤ベンズアミジンに変えた実験を行いましたので、これまでの実験結果と併せて紹介します。

蛋白質試料の精製については、大阪大学大学院理学研究科化学専攻の長谷純宏先生のグループにご協力いただきました。熱容量測定は、牛膵臓トリプシン、大豆トリプシンインヒビター、トリプシン-トリプシンインヒビター複合体、およびトリプシン-ベンズアミジン複合体の 95%, 50%, および 10% 含水試料、およびそれらの乾燥試料について行いました。

Fig. 1 および Fig. 2 に測定試料の熱容量の測定結果を示します。95% 試料については、熱異常をより明確にするために、水の熱容量を差

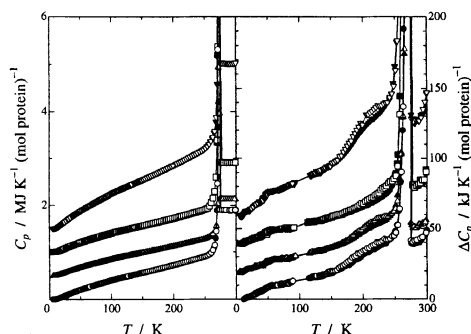


Fig. 1. Heat capacities (left) and apparent heat capacities (right) per mole trypsin (○, ●), trypsin inhibitor (△, ▲), trypsin-benzamidinium complex (□, ■), and trypsin-trypsin inhibitor complex (▽, ▼) with 95 % water content. Open and closed marks indicate samples quenched and annealed around 235 K, respectively.

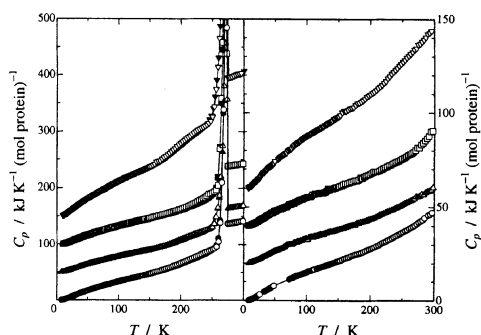


Fig. 2. Heat capacities per mole trypsin (○, ●), trypsin inhibitor (△, ▲), trypsin-benzamidinium complex (□, ■), and trypsin-trypsin inhibitor complex (▽, ▼) with 50 % (left) and 10 % (right) water contents, respectively. Open and closed marks indicate samples quenched and annealed around 235 K, respectively.

し引いた見かけの蛋白質試料の熱容量も載せています。急冷した 95% および 50% 含水試料では、150 K 付近にガラス転移と 200 K 以上で過冷却水の結晶化による発熱、および 270 K 付近に水の融解が観測されました。発熱温度領域でアニールした試料でも、急冷試料と

ほぼ同じ温度にガラス転移が生じました。10% 含水試料では、ガラス転移温度が約 200 K に上昇しました。このことは、観測されたガラス転移が蛋白質分子とその周りの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ます。

Fig. 3 は室温付近におけるトリプシンインヒビターおよびベンズアミジンのトリプシンへの結合による過剰熱容量変化を示したものです。トリプシンインヒビターに関しては、95% および 50% 試料では $-7 \sim -8 \text{ kJ mol}^{-1}$ の熱容量変化が見られます。含水量を束縛水のための 10% に減らすと、過剰熱容量変化は約 -3 kJ mol^{-1} と小さくなりました。複合体形成前後では、蛋白質の水和表面積が変化するので、水和による熱容量の寄与も変化します。トリプシンインヒビターにおいて、この水和熱容量変化を計算したところ、約 -1 kJ mol^{-1} となりました (Fig. 3 中の実線)。したがって、熱容量にして $-6 \sim -7 \text{ kJ mol}^{-1}$ に対応するトリプシンの分子運動がトリプシンインヒビターの結合によって阻害されることがわかりました。また、束縛水の減少によってもトリプシンの分子運動が抑制されることが示唆されました。一方、ベンズアミジンに関しては、全ての含水試料でほとんど熱容量変化がありませんでした。水和熱容量変化もほぼ零であることから (Fig. 3 中の破線)、ベンズアミジンの結合によってはトリプシンの分子運動は阻害されない、すなわち、トリプシンインヒビターとベンズアミジンとではトリプシンの阻害様式が異なることが熱容量測定によっ

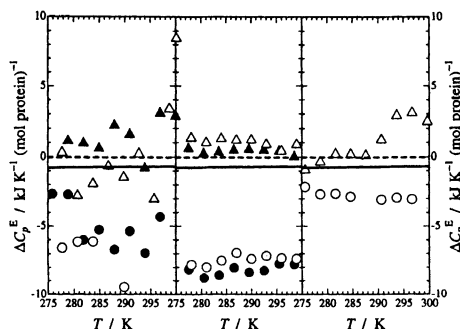


Fig. 3. Excess heat capacity differences of trypsin inhibitor ($\circ, \bullet$) and benzamidine ($\triangle, \blacktriangle$) complexes with 95 % (left), 50 % (middle), and 10 % (right), respectively, around room temperature. Open and closed marks indicate samples quenched and annealed around 235 K, respectively. Solid and broken curves indicate hydration heat capacity differences of trypsin-trypsin inhibitor and trypsin-benzamidine complexes, respectively.

て明らかになりました。

このように、熱容量測定から蛋白質のダイナミクスに関して、非常に興味深く、また重要な知見が得られることがおわかりいただけたと思います。今後、分子量が 5,000 程度の牛腓臓トリプシンインヒビターを用いて同様の実験を行うことを計画しています。

(中西加奈, 宮崎裕司)

発表

中西加奈, 宮崎裕司, 妻鹿友弘, 長谷純宏, 徂徠道夫, 第 39 回熱測定討論会 (東広島), 1A1400 (2003).

Influence on Molecular Motion of Trypsin by Binding of Inhibitor Studied by Heat Capacity Measurement

Heat capacities of trypsin, trypsin inhibitor, trypsin-trypsin inhibitor complex, and trypsin-benzamidine complex with 95 %, 50 %, and 10 % water contents and the dried samples were measured by adiabatic calorimetry. For the quenched samples with 95 % water content, glass transitions, exothermic effects due to the crystallization of supercooled water, and fusions of ice were observed around 150 K, above 200 K, and around 270 K, respectively. Glass transition temperatures of the samples with 10 % water content increased upto about 200 K, which is attributed to the freezing of the cooperative motion of protein and bound water molecules. The excess heat capacity difference on trypsin inhibitor was $-6 \sim -7 \text{ kJ mol}^{-1}$, which corresponds to the molecular motion of trypsin restricted by the binding of trypsin inhibitor. The excess heat capacity difference on benzamidine was almost zero, which suggests that the molecular motion of trypsin was not restricted by the binding of benzamidine.

(by K. Nakanishi & Y. Miyazaki)