

## タンパク質の部分比容、圧縮率、熱膨張率

Partial specific volume, compressibility, and coefficient of thermal expansion  
of protein in solution

近畿大学 理工学部 神山 匡

## 1. 序論

タンパク質の構造と機能の相関を明らかにする上でタンパク質の立体構造構築機構の解明は不可欠な課題となっている。X線結晶構造解析は天然状態の立体構造を原子レベルで可視化し、タンパク質分子内の原子が有機分子結晶並みに充填されていることを明らかにした。また、X線小角散乱やNMR、一分子計測をはじめとする物理化学的研究により、タンパク質の構造がかなり揺らいでいることが明らかとなってきている[1]-[3]。このようなタンパク質のもつ「固い」と同時に「柔らかい」という二面的な性質は構造安定性及び機能発現に大きく関わっていると考えられており、“揺らぎ”の検出や機能との相関について、様々な角度から研究が進められている[4]。本稿では、我々が行ってきた、溶液中におけるタンパク質の体積と揺らぎの測定結果について紹介する。

## 2. 実験

## 2-1. 部分比容

溶液中の溶質の単位質量あたりの体積である部分比容は、分子量に大きく依存する部分モル体積とは異なり、分子のかさ張り具合を反映する指標として用いられる。タンパク質の溶液中の体積は、タンパク質を構成する原子のファンデルワールス体積、不完全なパッキングによって生じるタンパク質内部の隙間(cavity)、溶媒和による体積変化や熱的な揺らぎによる排除体積によって決定されるため、タンパク質の構造を敏感に反映する。実験的には、溶媒の密度  $\rho_0$  とタンパク質溶液の密度  $\rho$  (精度  $10^{-6}$  g/cm<sup>3</sup>)、タンパク質の濃度  $c$  (精度  $10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>) から(1)式を用いて求めることができる。

$$\bar{v}^{\circ} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \left( 1 - \frac{\rho - c}{\rho_0} \right) \quad (1)$$

## 2-2. 部分圧縮率

圧縮率には等温圧縮率  $\beta_T$  と断熱圧縮率  $\beta_S$  があり、 $\beta_T$  は(2)式に示すように部分比容の圧力依存性から、 $\beta_S$  は密度と音速  $u$  (精度 1 cm/s) を用いたラプラスの式  $\beta = 1/\rho u^2$  と(3)式から求められる。 $\beta_T$  は(4)式のように体積揺らぎと関連付けられており、物質の柔らかさを表す指標となる。ここで、 $k$  はボルツマン定数、 $\alpha$  は熱膨張率、 $C_p$  は熱容量、 $\beta_0$  と  $\beta$  は溶媒と溶液の断熱圧縮率である。

$$\beta_T = -\frac{1}{\bar{v}^{\circ}} \left( \frac{\partial \bar{v}^{\circ}}{\partial P} \right)_T = \beta_S + \frac{\alpha^2 T}{C_p \rho} \quad (2)$$

$$\beta_S = \left( \frac{\beta_0}{\bar{v}^{\circ}} \right) \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \left( \frac{\beta}{\beta_0} - \frac{\rho - c}{\rho_0} \right) \quad (3)$$

$$\delta V_{rms}^2 = kTV \beta_T \quad (4)$$

### 3. 結果

#### 3-1. 天然状態、変性状態、中間状態の体積と揺らぎ

タンパク質の立体構造は、水素結合や疎水的相互作用などのエンタルピー項と、構造や溶媒に起因するエントロピー項の微妙なバランスの上に成り立っており、極めて小さな安定化力で構造が維持されている。そのため、タンパク質の安定化機構を理解する上で変性状態や変性中間体 (Molten Globule) などの非天然状態の構造機構を明らかにすることが重要な課題となっている。Fig. 1 は酸性条件下で表面電荷の静電反発力により酸変性 (Acidic Unfolding) した Cytochrome c に、ソルビトールを添加することで疎水性相互作用を強め、中間体 (MG) に巻き戻る過程の部分比容と部分断熱圧縮率である[5]。

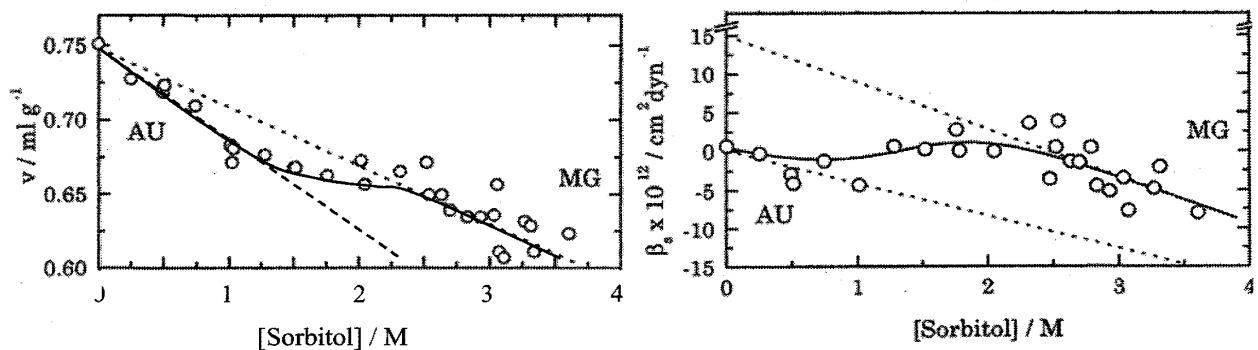


Fig. 1 Dependence of  $v$  and  $\beta_s$  of cytochrome c on sorbitol concentration. AU: Acidic Unfolding, MG: Molten

酸変性した cytochrome c は中間体 (MG) への巻き戻りにおいて部分比容が減少し、よりコンパクトな構造に転移していることがわかる。ゼロ濃度外挿より求まる酸性水溶液中における cytochrome c の中間体の  $\beta_s$  は  $(15.0 \times 10^5 \text{ MPa}^{-1})$  であり、変性状態  $(0.3 \times 10^5 \text{ MPa}^{-1})$  や天然状態  $(3.6 \times 10^5 \text{ MPa}^{-1})$  よりも大きかった。これらの結果は、膨潤した中間体は揺らぎの大きな構造であり、ソルビトール濃度の増加によってタンパク質内外に生じる浸透圧の増加により、膨潤した疎水コアから脱水していることを示唆している。塩添加で誘起した中間体の  $\beta_s$  は  $(7.5 \times 10^5 \text{ MPa}^{-1})$  であり、静電遮蔽効果よりも疎水性相互作用のほうがよりタンパク質構造を巻き戻らせていることがわかった。

#### 3-2. ジスルフィド結合の体積、揺らぎへの効果

ジスルフィド結合 (S-S 結合) は、システイン残基の側鎖間に架かる共有結合であり、タンパク質構造の広がりを抑えるエントロピー的効果で天然状態の安定化に寄与している。S-S 結合を持つ数種のタンパク質について化学的修飾により S-S 結合を切断することで、部分比容、熱膨張率、圧縮率に及ぼす S-S 結合の影響について調べた[6]。いずれのタンパク質においても S-S 結合を切断することによって構造が部分的に崩壊し、部分比容が減少した (Fig. 2)。この減少は、構造崩壊に伴う cavity の減少と水和量の増加を表しており、S-S 結合が構造の維持に寄与していることを示している。熱膨張量の増加や圧縮量の減少に見られるように、S-S 結合は構造の自由度を抑えるとともに、タンパク質内部に揺らぎの場 (cavity) を保持する役割を有していると考えられる。単位アミノ酸あたりに S-S 結合を多く有しているタンパク質ほど、S-S 結合を失った時の圧縮率減少や熱膨張率の増加が大きく、天然状態を維持するための S-S 結合の役割が相対的に大きくなっていることが明らかとなった (Fig. 3)。

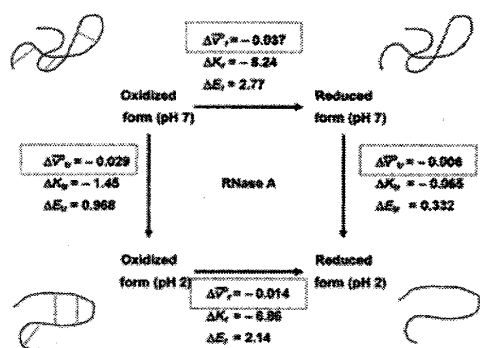


Fig. 2 Plots of  $\Delta V_{tr}$ ,  $\Delta K_{tr}$ , and  $\Delta E_{tr}$  of ribonuclease A between the oxidized and reduced form at pH 7 and pH 2.

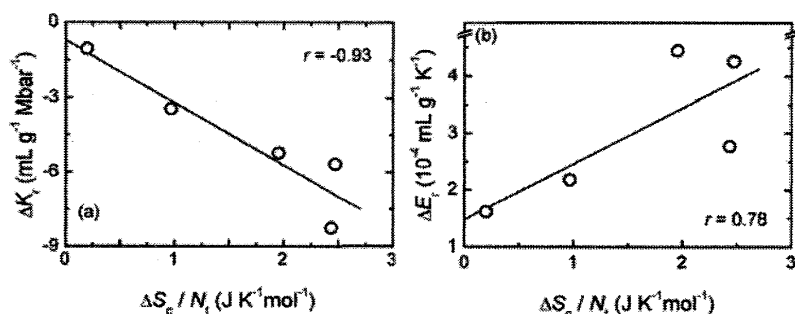


Fig. 3 Plots of  $\Delta K_r$  (a) and  $\Delta E_r$  (b) of the five proteins (pH7) at a function of  $\Delta S_c/N_i$ .  $\Delta S_c/N_i$  is expressed in units per mole of amino acid residues.

#### 4. まとめ

本稿では、溶液中におけるタンパク質の部分比容や圧縮率、熱膨張率が、タンパク質の cavity 量や水和量の変化を敏感に反映することを用いて、タンパク質構造に及ぼす糖添加や S-S 結合の効果について、示してきた。溶液中のタンパク質の部分比容や圧縮率については、ぜひ月向の文献[11]-[14]をご一読いただきたい。シンポジウムでは本稿で示した内容以外にも、タンパク質の部分比容と圧縮率の統計的解析、シクロデキストリン包接化合物の実験値とシミュレーション比較、酵素基質反応における体積と揺らぎの関係[7]、アミノ酸置換が及ぼす体積と揺らぎへの影響[8][9]、部分比容を指標にした選択的溶媒和による変性機構の解明[10]、について報告したが、ページの関係で割愛させていただく。本稿で示した実験的手法によるタンパク質の体積や揺らぎは、cavity、水和、熱振動、の効果を分離して捉えることが難しく、今後、計算機実験の面からも溶液中の部分比容や圧縮率に関する理解が進むことが期待される。

#### 参考文献

- [1] G.A. Petsko, D. Ringe (1984) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **13**, 331-371.
- [2] K. Kuwajima, F.X. Schmid (1984) *Adv. Biophys.* **18**, 43-74.
- [3] M. Karplus, G.a. Petsko (1990) *Nature* **347**, 631-639.
- [4] 「揺らぎが機能を定める生命分子の科学」新学術領域研究 (平成 20-24 年度)
- [5] T. Kamiyama, Y. Sadahide, Y. Nogusa, K. Gekko (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1434**, 44-57.
- [6] K. Gekko, A. Kimoto, T. Kamiyama (2003) *Biochemistry* **42**, 13746-13753.
- [7] T. Kamiyama, K. Gekko, (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1478**, 257-266.
- [8] K. Gekko, T. Kamiyama, E. Ohmae, K. Katayanagi, (2000) *J. Biochem.* **128**, 21-27.
- [9] M. Iwakura et. al. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 13234-13246.
- [10] T. Kamiyama, H. L. Liu, T. Kimura, (2009) *J. Therm. Anal. Cal.* **95**, 353-359.
- [11] 月向邦彦 (2004) 熱測定 **31**, 186-193.
- [12] 月向邦彦 (1995) 蛋白質・核酸・酵素 **40**, 2461-2465.
- [13] 月向邦彦 (1996) 蛋白質・核酸・酵素 **41**, 2025-2036.
- [14] 月向邦彦 (1985) 蛋白質・核酸・酵素 **30**, 1115-1126.