

## タンパク質変性データの熱力学的解析

小島 正樹<sup>1</sup> 松村 義隆<sup>1</sup>

タンパク質の**変性**とは、熱や特殊な薬剤（酸・アルカリや尿素など）によって固有の機能（生理活性）が失われること（denaturation）で、その原因は天然状態の分子の立体構造が破壊されること（unfolding）にあることは古くから知られていた[1]。現在の変性研究は主に、1) 変性の逆過程であるフォールディング（立体構造形成）の解析を通じて立体構造の構築原理を解明すること、2) 変性に伴う熱力学量（エンタルピーやエントロピーなど）変化に基づいて分子の安定性を解析し、タンパク質工学に応用すること、などを目的として行われている。本稿の目的は、変性の多様な形態を整理し、個々の事例に応じた解析原理を示すことにあるが、近年注目されている **natively unfolded protein** のリガンド結合に伴う構造形成過程や、アミロイド線維の凝集過程の解析にも有用な知見を与え得ると思われる。

## 1. 構造転移の2つのモデル

立体構造変化を熱力学の**相転移**と捉えると、構造転移には2つのモデルが考えられる。1つは図1aのように、1個の分子内で構造形成部位と未形成部位が共存し、構造形成部位の含量が増加することによって分子全体の立体構造が形成されるというモデル（2次相転移）で、もう1つは図1bのように、個々の分子は既に構造形成している（天然状態）か未形成か（変性状態）のどちらかの状態にあり、各状態をとる分子の割合（population）が増減することにより、フォールディングまたは変性が進むというモデル（1次相転移）である。最初のモデルの代表例がペプチド鎖のヘリックス-コイル転移、2番目のモデルの代表例がタンパク質分子の変性である。

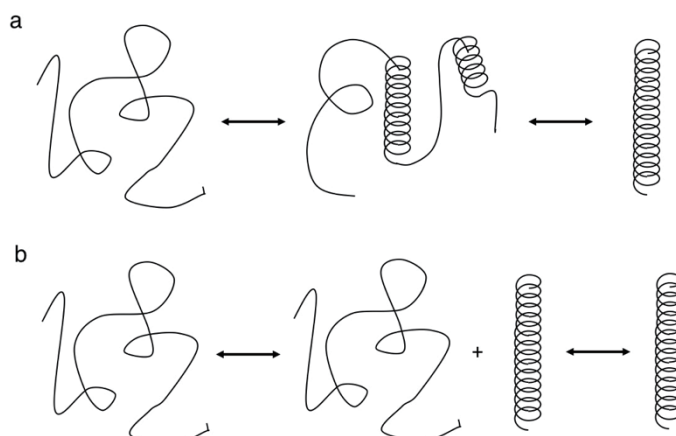


図1. らせんは構造形成部位（ヘリックス）を、それ以外は構造未形成部位（コイル）を表す。

## 1.1 ヘリックス-コイル転移

同一のアミノ酸から成るペプチド鎖（homopolyptide）は、条件によって構造がランダムコイル[2]からヘリックスに転移する。Zimm と Bragg はこの現象を、1次元強磁性体モデルを参考に統計力学的に扱い、秩序性のパラメータ  $s = \frac{z_i^h}{z_i^c}$ （ただし  $z_i^h$  と  $z_i^c$  は  $i$  番目の残基がヘリックスまたはコイルをとる統計重率）と協同性のパラメータ  $\sigma$  を用いて説明した[3]。この種の相転移の理論[4]によると、1次元の系では2相が共存することはない、またヘリックスやコイルの長さは有限であるため、

<sup>1</sup>生命科学部生物情報科学研究室

1) 転移中点は1分子中にヘリックスとコイルが共存している状態 (図 1a) であり、2) 完全なヘリックス分子と完全なコイル分子が共存する状態 (図 1b) は存在しない、ことが導かれる。

なお上記のパラメータ  $s$  と  $\sigma$  は、ヘリックスの伸長と核形成を反映しているとも考えられるが、この「初期の核形成とその後の伸長」という考え方は、アミノ酸配列からの二次構造予測[5]やアクチンやチューブリンなど球状タンパク質の重合モデル[6]の指導原理にも受け継がれている。

## 1.2 タンパク質の変性

Tanford らは、当時の種々のタンパク質の変性に関する実験結果から、タンパク質の変性は原則として天然状態から変性状態への2状態転移により近似できる (図 1b) ことを示した[7]。この場合、変性中点は天然状態の分子と変性状態の分子の **population** が等しい状態に対応し、変性データを平衡論・速度論に関する熱力学の諸式を用いて解析することができる。

その後、天然状態と変性状態の中間的な構造的特徴を有する状態が**モルテングロビュール**として同定された[8,9]。さらにモルテングロビュールは変性中間体としてだけでなく、フォールディングの中間体としても存在することが確認され[10]、**DSC** (示差走査熱量測定) [11]や**SAXS** (X線溶液散乱) [12]などを観測プローブとして、モルテングロビュール固有の特徴づけ (**characterization**) がなされた。現在は複数の中間状態を仮定した変性解析も行われるが、このような場合でも個々の分子は各状態のいずれかにあつてその **population** が推移する、というモデルは変わらない。

## 2. 変性の平衡論的解析

天然状態を  $N$ 、変性状態を  $U$  として、図 1b のモデルに基づく**可逆的変性過程**は、



という反応式で表せる。このとき、ある条件に試料を置いて十分に時間が経過すると  $N$  と  $U$  の平衡状態に達し、**平衡定数**  $K$  は、各状態の分子の割合 (モル分率や濃度など) を  $f_N$ ,  $f_U$  として

$$K = \frac{f_U}{f_N} \quad (\text{ただし } f_N + f_U = 1) \quad (2)$$

で表される。いまある状態の観測量がその状態に存在する分子の数や濃度に比例する (**Beer の法則**) ならば、観測量  $A$  は、 $N$ ,  $U$  固有の (**intrinsic**) 観測量  $A_N$ ,  $A_U$  と、 $f_N$ ,  $f_U$  を用いて、

$$A = f_N A_N + f_U A_U \quad (3)$$

のように、 $A_N$ ,  $A_U$  を**基底**とする**線形結合**で表せる (図 2)。このとき、図の  $A - A_U$  は  $f_N$  に比例し、 $A_N - A$  は  $f_U$  に比例するので、式(2)は、

$$K = \frac{A_N - A}{A - A_U} \quad (4)$$

と変形でき、平衡定数を観測量のみで表すことができる。

また反応式(1)の**標準 Gibbs 自由エネルギー変化**を  $\Delta G^0$  とすると、

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (5)$$

が成り立つ ( $R$  は気体定数で  $T$  は絶対温度)。

### 2-1. 変性剤による変性

図 2 の  $x$  が変性剤 (尿素や塩酸グアニジンなど) のモル濃度  $C$  の場合、通常は、

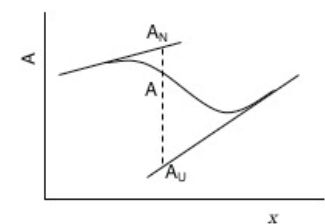


図 2.  $A$  は観測量で  $x$  は変性条件。

$$\Delta G^0 = \Delta G_{\text{H}_2\text{O}}^0 - \mu C \quad (6)$$

が成り立つ。ここで $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}^0$ は $C = 0$ すなわち変性剤の存在しない条件に外挿したときの $\Delta G^0$ で、タンパク質の**安定性**の指標として用いられる。また $\mu$ は変性の**協同性**を表すパラメータで、この値が大きいほど変性が協同的 (cooperative) に起こる。以上の式(4)~(6)を用いて、観測データのデータから変性パラメータ $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}^0$ と $\mu$ を求めることができる。

著者の具体的な解析事例を文献[13,14]に示す。また本学部創立時にタンパク質の立体構造に関する実習を当時の水島昭二学部長が要望され、設備・時間・履修人数を勘案したうえで、吸光度 $A_{298}$ の溶媒効果を観測プローブとしたリゾチームの変性解析を3年次の実習に導入した経緯がある[15]。

## 2-2. pH 依存的変性

図 2 の  $x$  が pH の場合、**Henderson-Hasselbalch** の式より、

$$K = 10^{v(\text{pH} - \text{p}K_a)} \quad (7)$$

が得られる。ここで $\text{p}K_a$ は**変性中点** ( $f_N = f_U$  のとき) の pH で、**Hill 係数** $v$ は変性の協同性を表すために導入したパラメータであり、いずれも複数の水素解離基の協同的な解離が変性に関与するという前提に基づく。式(4), (7)を用いて、観測データのデータから変性パラメータ $\text{p}K_a$ と $v$ を求めることができる。著者の解析事例を文献[16]に示す。

## 2-3. 熱変性

図 2 の  $x$  が絶対温度  $T$  の場合、

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (8)$$

が成り立つ。ここで $\Delta H^0$ と $\Delta S^0$ は各々変性に伴う標準状態の**エンタルピー変化**と**エントロピー変化**である。 $\Delta H^0$ と $\Delta S^0$ がほぼ一定の場合、式(4), (5),(8)を用いて、観測データのデータから変性パラメータ $\Delta H^0$ と $\Delta S^0$ を求めることができる[17, 18]。

なおプローブが DSC の場合は、観測量は熱容量  $c_p$  のため、

$$\Delta H = \int c_p dT, \quad \Delta S = \int \frac{c_p}{T} dT \quad (9)$$

として、変性に伴う熱力学量変化が直接得られる[19]。

## 3. 変性の速度論的解析

図 1b のモデルに基づく**不可逆的変性過程**は、



という反応式で表すことができ、変性曲線の横軸は反応開始からの経過時間  $t$  となる (図 3)。このとき、反応式(10)の**速度定数**を  $k$  とすると、

速度式 $\frac{df_N}{dt} = -kf_N$ より、

$$f_N(t) = \exp(-kt), \quad f_U(t) = 1 - f_N(t) \quad (11)$$

と表すことができ、式(3), (11)から、

$$A(t) = (A_0 - A_\infty)\exp(-kt) + A_\infty \quad (12)$$

が得られる。ここで $A_0$ と $A_\infty$ は、各々初期状態 ( $t = 0$ ) と最終状態 ( $t \rightarrow \infty$ ) のベースラインで、通常は  $N$  と  $U$  の固有観測量

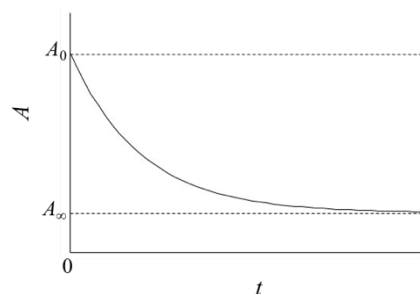


図 3.  $A$  は観測量で  $t$  は経過時間

で問題ないが、非常に速い反応 (burst phase) や 非常に遅い反応 (lag phase) が存在する可能性のあるときは、各ベースラインを独立に測定する必要がある。

速度論に基づく著者の変性解析の事例を文献[14, 20]に、タンパク質の線維化初期過程の解析事例を文献[21]に示す。また速度定数の温度依存性 (Arrhenius の式や Eyring の式など) を用いると、観測プローブの組み合わせにより、さらに詳細な情報を得ることができる[22, 23]。

#### 4. 多状態転移の解析

##### 4-1. 2 状態転移と等吸収点

最近の変性実験では、プローブとして単一波長の吸光度だけでなく、ある波長範囲のスペクトルをモニターすることが多くなった。図 4 のように、もし  $N$  固有のスペクトルと  $U$  固有のスペクトルが交わるならば、式 (3) より両者の交点を、任意の状態 (図では  $x_1$  や  $x_2$ ) の観測スペクトルが通ることになる。この交点を**等吸収点 (isosbestic point)** という。実際には観測誤差を考慮して判断することになるが、等吸収点 (SAXS の場合は等散乱点) の存在は、2 状態転移の可能性を強く示唆している。

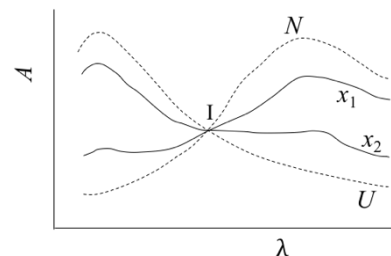


図 4. I が等吸収点。横軸の波長  $\lambda$  は SAXS では  $q$ 。

##### 4-2. 特異値分解

複数の中間状態を含む変性解析を行う場合、まず前提として、各状態固有のスペクトルが観測プローブにより独立に区別できなければならない。例えば、多くのタンパク質の変性状態では、高分子科学で厳密に定義されたランダムコイル (Gauss 鎖) [2]とは異なり、若干の残余構造 (residual structure) が存在すると考えられる[18]が、SAXS などを除く通常の分光プローブでは、両者を峻別することは難しい。このような場合は、通常の変性状態を完全なランダムコイルと同じとみなして解析を進めることになる。

以上の前提のもとで、もし観測量について Beer の法則が成り立つならば、多状態転移の場合も式 (3)と同様、各状態の固有観測量を基底とした線形結合で表されることになる。したがって観測データを線形結合で表すときに必要な基底の数、すなわちデータ空間を**線形空間**と見立てたときの次元がわかれば、変性過程に関わる独立な状態の数を数学的に見積もることができる。特に観測量が単一波長の値でなくスペクトルの場合は、データ系列を**行列** (各行が  $\lambda$  または  $q$  で各列が  $x$ ) として整形したうえでデータ行列の**階数 (rank)** を求めることに帰着する。この線形代数の手法を**特異値分解 (SVD)** [24]という。

観測データに SVD を適用するにあたって注意すべき点は、1) 実際のデータはノイズを含むので、次元を超えた基底スペクトルの値が完全に 0 になることはなく、見極めが必要になること、2) SVD の基底スペクトルは、各状態の固有スペクトルに対応している訳ではないので、適当な平衡論・速度論のモデルに基づいて後者を再構築する必要があること、である。著者の解析事例を文献[16, 18, 21, 25, 26, 27]に示す。また SVD によるデータ解析手法は、タンパク質の **CD** (円偏光二色性) スペクトルから二次構造含量を計算する際にも用いられている[28]。

参考文献

1. Anfinsen, *Science* **181**, 223-230 (1973)
2. Flory, *Principles of Polymer Chemistry* (1953); 岡・金丸訳「高分子化学 下」丸善 pp.366-395 (1956)
3. Zimm & Bragg, *J. Chem. Phys.* **31**, 526 (1959)
4. Landau & Lifshitz, *Statistical Physics* (1958); 小林・小川・富永・浜田・横田訳「統計物理学 (第3版) 下」, 岩波書店 pp.560-646 (1980)
5. Chou & Fasman, *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 251-276 (1978)
6. Oosawa & Kasai, *J. Mol. Biol.* **4**, 10-21 (1962)
7. Tanford, *Adv. Protein Chem.* **24**, 1-95 (1970)
8. Ogushi & Wada, *FEBS Lett.* **164**, 21-24 (1983)
9. Ptitsyn, *J. Protein Chem.* **6**, 273-293 (1987)
10. Kuwajima, Hiraoka, Ikeguchi, Sugai, *Biochemistry* **24**, 874-881 (1985)
11. Griko, Gittis, Lattman, Privalov *J. Mol. Biol.* **243**, 93-99 (1994)
12. Kataoka, Kuwajima, Tokunaga, Goto, *Protein Sci.* **6**, 422-430 (1997)
13. Kogo, Takeuchi, Inoue, Kihara, Kojima, Takahashi, *Biochem. Biophys. Acta* **1794**, 70-74 (2009)
14. Matsumura, Shinjo, Mahajan, Tsai, Kihara, *Biochimie* **92**, 1031-1039 (2010)
15. 東京薬科大学生命科学部「生命科学実験書」 pp.6-7 (1996)
16. Kojima, Tanokura, Maeda, Kimura, Amemiya, Kihara, Takahashi, *Biochemistry* **39**, 1364-1372 (2000)
17. Kojima, Mizukoshi, Miyano, Suzuki, Tanokura, Takahashi, *FEBS Lett.* **351**, 389-392 (1994)
18. Matsuura, Shimotakahara, Sakuma, Tashiro, Shindo, Mochizuki, Yamagishi, Kojima, Takahashi, *Biol. Chem.* **385**, 1157-1164 (2004)
19. Fukada, Takahashi, Sorai, Kojima, Tanokura, Takahashi, *Thermochim. Acta.* **267**, 373-378 (1995)
20. Maeda, Takeuchi, Kojima, Tanokura, Kimura, Amemiya, Kihara, Takahashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 745-750 (2003)
21. Tashiro, Kojima, Kihara, Kasai, Kamiyoshihara, Ueda, Shimotakahara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 910-914 (2008)
22. Fujita, Gō, Imahori, *Biochemistry* **19**, 24-28 (1979)
23. Matsumura, Li, Ikeguchi, Kihara, *Biophys. Chem.* **134**, 84-92 (2008)
24. 柳井晴夫・竹内啓, 「射影行列・一般逆行列・特異値分解 (UP 応用数学選書)」東京大学出版会 pp.111-131 (1983)
25. Goda, Kojima, Nishikawa, Kujo, Kawakami, Kuramitsu, Sakuraba, Hiragi, Ohshima, *Biochemistry* **44**, 15304-15313 (2005)
26. Kamiyoshihara, Kojima, Ueda, Tashiro, Shimotakahara, *Biochem. Biophys. Acta* **355**, 398-403 (2007)
27. Li, Matsumura, Shinjo, Kojima, Kihara, *J. Mol. Biol.* **372**, 747-755 (2007)
28. van Holde, Johnson, Ho, *Principles of Physical Biochemistry* (1998); 田之倉・有坂監訳「物理生化学」, 医学出版 pp.527-538 (2002)