

9420 タンパク質の構造と安定性に対する塩の作用機構の研究

助成研究者：後藤 祐児 (大阪大学 理学部)

共同研究者：片岡 幹雄 (大阪大学 理学部)

【研究目的】

タンパク質の構造や安定性は、溶媒の塩環境に依存して変化する。しかし、その作用はさまざまであり、塩の効果の統一的な理解は成されていない。特に、これまでランダムコイルと画一的に考えられてきたタンパク質の変性状態が、塩の種類や塩濃度に依存して大きく構造変化することが明らかになっている。すなわち、いくつかのタンパク質は pH 2、低イオン強度では高度に変性しているが、塩が存在すると、モルテン・グロビュール状態を形成する。既に我々は、塩に依存した酸変性タンパク質の構造変化の機構を調べ、それが陰イオンの結合に起因することを明らかにした。しかし、モルテン・グロビュール状態の構造や安定化機構については不明な点が多い。塩によって起きる構造転移の熱力学的特徴を明らかにすることは、塩の作用機構を明らかにするだけでなく、タンパク質の立体構造形成機構（フォールディング機構）を解明する上でも重要である。本研究では、塩濃度に依存したアポミオグロビンやシトクロム c の酸変性状態での構造転移を、等温滴定型熱量計や示差走査熱量計、および円二色性スペクトルを用いて研究した。

【結果と考察】

シトクロム c のモルテン・グロビュール状態は協同的な熱によるアンフォールディングを示すことがよく知られている。滴定型熱量計によるモルテン・グロビュール形成反応測定モデルとして、シトクロム c を用いて実験を行った。酸でアンフォールディングしたシトクロム c (pH 2) に NaClO_4 を添加したとき、タンパク質のフォールディング反応に対応して発熱反応が観測された。熱で観測した転移反応と、 α ヘリックスの形成から観測した転移反応はよく一致した。これより滴定型熱量計で測定された熱は、おもにタンパク質のフォールディングに伴う熱（フォールディング反応のエンタルピー変化、 ΔH_F ）であると考えられる。滴定型熱量計が、モルテン・グロビュールの熱力学量を評価する有効な手段であることがわかった。

アポミオグロビンのモルテン・グロビュール状態の安定化機構は研究者によってその解釈が大きく異なっている。そこで、滴定型熱量計を用いて、塩に依存したモルテン・グロビュール形成反応を測定した。アポミオグロビンの場合にも構造転移に対応する発熱反応が観測された。熱で測定した転移曲線は、 α ヘリックス含量の指標である 222 nm の精円率を用いて測定した結果とよく一致した。これより、アポミオグロビンの場合も協同的な構造転移が起きていることがわかる。しかし、フォールディングの ΔH_F は、熱によるアンフォールディングから求めたものとは対応せず、シトクロム c の場合より複雑であった。ミオグロビンの構造転移は協同的な転移と非協同的な転移が混合したものであると推定した。

9420 タンパク質の構造と安定性に対する塩の作用機構の研究

助成研究者：後藤 祐児 (大阪大学 理学部)

共同研究者：片岡 幹雄 (大阪大学 理学部)

1. 研究目的

タンパク質の構造や安定性は溶媒の塩環境に依存して、変化する。しかし、その作用はさまざまであり、塩の効果の統一的理解は成されていない。中でも、これまでランダムコイルと画一的に考えられてきたタンパク質の変性状態が、塩の種類や塩濃度に依存して大きく構造変化することが明らかになっている。すなわち、アポミオグロビンやシトクロムcをはじめとするいくつかのタンパク質はpH2、低イオン強度では高度に変性しているが、塩が存在すると、タンパク質はモルテン・グロビュール状態と呼ばれる中間的構造を形成する(Fig.1)。モルテン・グロビュール状態はコンパクトで多くの二次構造を含むが三次構造的には変性した状態であり、タンパク質のフォールディング反応の主要で普遍的な中間体であると推定されている。

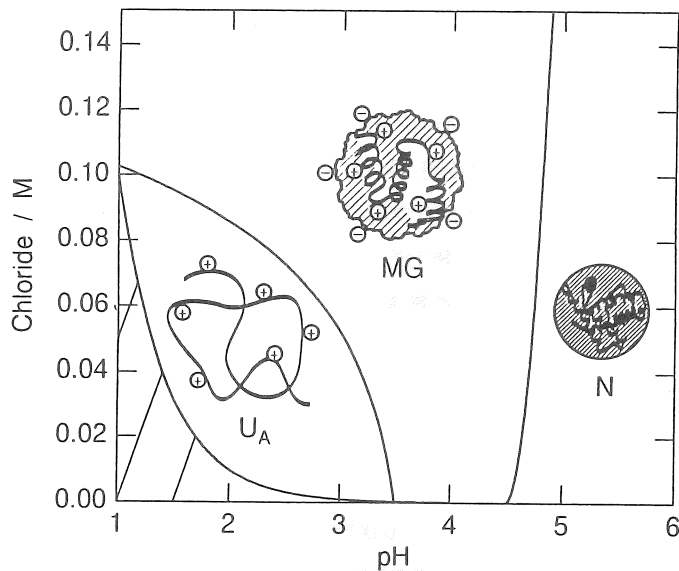


Fig. 1. Schematic representation of the pH and salt-dependent phase diagram for the native (N), and molten globule (MG) states of apomyoglobin. The lines show the boundaries between the conformational states.

既に我々は、このような塩に依存した酸変性タンパク質の構造変化の機構を調べ、それが陰イオンの結合に起因することを明らかにした(1-6)。つまり、pH 2、低イオン強度ではタンパク質の正電荷間の静電的反発力により高度に変性しているが、そこに塩を添加すると、塩から生じる陰イオンがタンパク質の正電荷に結合して静電的反発力を弱め、その結果、疎水的相互作用をはじめとするタンパク質が本来持つ構造を形成しようとする力によってモルテン・グロビュール状態が安定化される。

しかし、モルテン・グロビュール状態の構造や安定化機構の詳細については不明な点が多い。中でも、モルテン・グロビュール状態から更に高度な変性状態への構造変化が熱力学的な状態転移と見なされるか否かは、論争的となっている(7-9)。塩によって起きる構造転移の熱力学的特徴を明らかにすることは、塩の作用機構を明らかにするだけでなく、タンパク質の立体構造形成機構（フォールディング機構）を解明する上でも重要である。本研究では、塩濃度に依存したアポミオグロビンやシトクロムcの酸変性状態での構造転移を、等温滴定型熱量計や示差走査熱量計、および円二色性（CD）を用いて研究した。

2. 研究方法

ウマ・シトクロムc、ウマ・ミオグロビンはSigma社より購入した。アポミオグロビンはミオグロビンよりヘムを除去して作成した。アセチル化シトクロムcはGoto & Nishikiori (10)に従って作製した。

熱測定は滴定型熱量計(OMEGA, Microcal, Northampton, MA) および示差走査型熱量計(DASM-4, Mashpriborintorg, Moscow)を用いた。実験はすべてpH 2（10 mM HCl）で行った。滴定型熱測定では、1.3 mlのタンパク質溶液（濃度2 mg/ml）に対して2-3 Mの塩溶液を1-3 μ lずつ添加して、それに伴う熱の変化を観測した。示差走査型熱測定では、タンパク質溶液（濃度5 mg/ml）を1 K/minで昇温した。CDスペクトルは日本分光旋光分散計(J-500A)を使用した。

3. 研究結果

3. 1 シトクロム c

シトクロムcのモルテン・グロビュール状態は協同的な熱によるアンフォールディングを示すことがよく知られている(11)。滴定型熱量計によるモルテン・グロビュール形成反応測定のモデルとして、シトクロムcを用いて実験を行った。まず、滴定型熱量計の特徴として、比較的大量のタンパク質溶液（1.3 ml）を、少量（最大100 μ l）の塩で滴定することが必要である。我々の以前の実験から、塩の種類によってその効果が大きく異なることがわかっている(2)。そこで本研究では、モルテン・グロビュール安定化効果の大きい過塩素酸ナトリウム(NaClO_4)を使用した。

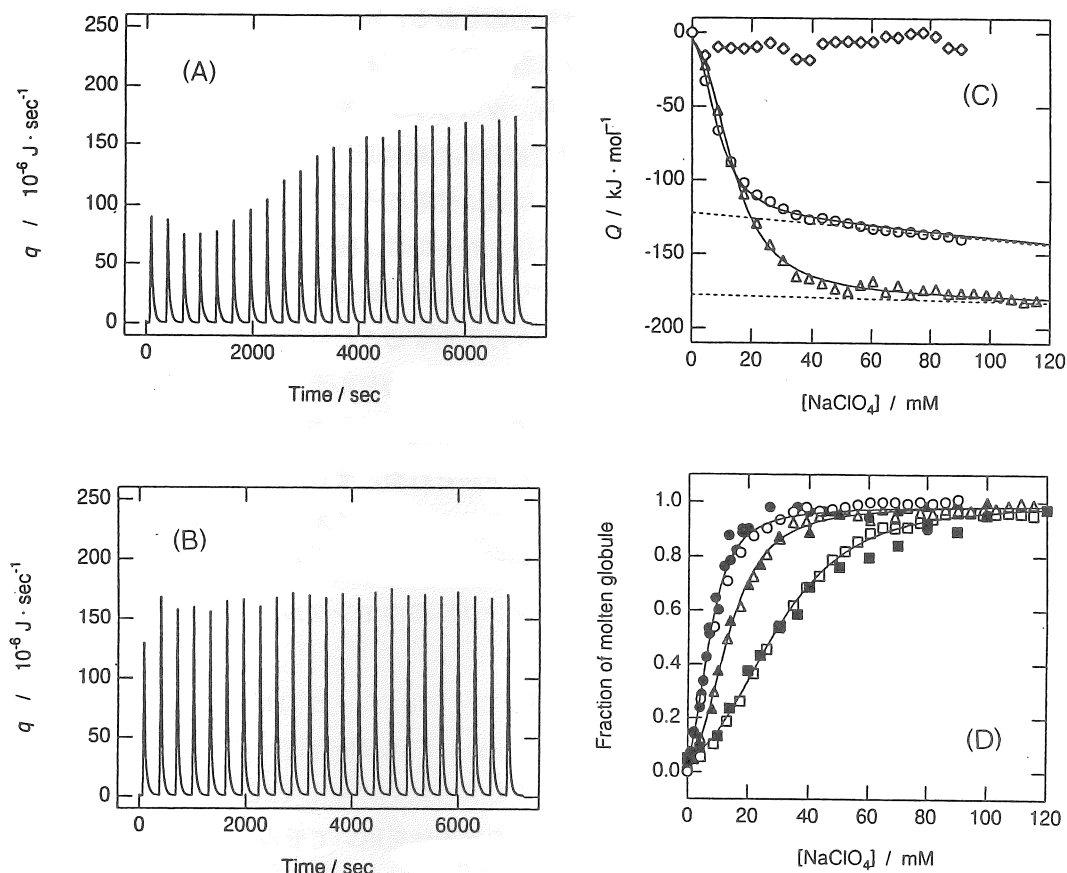


Fig. 2. (A) Typical calorimetric titration of the acid-unfolded cytochrome *c* with NaClO₄ at 20°C, pH 1.8. (B) Control titration in the absence of protein. (C) Transition curve monitored by the calorimetric titration. (D) Normalized transition curves by the calorimetric titration (clear symbols) and CD at 222 nm (solid symbols). Temperatures are 20°C (circles), 30°C (triangles), and 40°C (squares). Diamonds in C show the titration of the acetylated cytochrome *c* at 20°C.

Fig. 2は、酸でアンフォールディングしたシトクロム *c* (pH 2) に NaClO₄ を添加したときの結果を示す。Fig. 2Aはタンパク質溶液の結果であり、Fig. 2Bは対照として行ったタンパク質を含まない酸溶液の結果である。これより、塩の希釈熱は正であり（吸熱反応）、タンパク質溶液では、塩の希釈反応に発熱反応が加わっていることがわかる。なお、タンパク質のフォールディング反応は発熱反応である。Fig. 2Cはタンパク質溶液の結果から、対

照溶液を差し引いた正味の熱をたし合わせたものである。NaClO₄濃度に対して飽和曲線を描いている。我々は同じ反応を α ヘリックス含量の指標である222 nmのCDを用いて測定した。塩を添加すると、高度な変性状態から、 α ヘリックスを形成したモルテン・グロビュール状態が形成される。Fig. 2Dでは熱で観測した転移反応と、 α ヘリックスの形成から観測した転移反応を規格化して比較した。両者は見事に一致した。

塩によってモルテン・グロビュールが安定化されるのは、陰イオンがタンパク質の正電荷と選択的に結合することによって、静電的な反発力を弱めるためである。ところが、陰イオンの結合に伴う熱を、構造変化に伴う熱から区別することは容易ではない。シトクロムcのリジン残基をアセチル化すると、塩を加えなくてもモルテン・グロビュールが安定化することが知られている(10,11)。アセチル化シトクロムcのモルテン・グロビュールは、塩を添加することにより陰イオンを結合すると予想される。そこでこの反応に伴う熱を測定したが、反応熱はほとんど観測されなかった(Fig. 2C)。陰イオンの結合に伴う熱はそれほど大きくないと推定された。つまり、滴定型熱量計で測定された熱は、おもにタンパク質のフォールディングに伴う熱（フォールディング反応のエンタルピー変化、 ΔH_F ）であると考えられる。

Fig. 2Aの飽和後の熱量を塩濃度ゼロに外挿して、モルテン・グロビュール形成反応の ΔH_F を見積った。それを温度に対してプロット（ ΔH_F の温度依存性）することにより、モルテン・グロビュールのアンフォールディングに伴う比熱の変化（ $\Delta C_{p,F}$ ）は-2.4 kJ/mol/Kと見積もられた。これらの値は、示差走査熱量計を用いてモルテン・グロビュール状態のアンフォールディングから求めた値とよく一致しており、滴定型熱量計が、モルテン・グロビュールの熱力学量を評価する有効な手段であることを示している(12)。

3. 2 アポミオグロビン

アポミオグロビンのモルテン・グロビュール状態の構造は、NMR、パルスラベル交換などさまざまな手法を用いてよく研究され、ミオグロビンに存在するAからHの8本のヘリックスの内、A、G、Hのヘリックスが構成されていることがわかっている(13)。しかし、その安定化機構は論争的となっている(9, 14)。アポミオグロビンもシトクロムcと同様に、pH2、低イオン強度では高度に変性しているが、高塩濃度ではモルテン・グロビュール状態が安定化される。我々は既に、塩で安定化されたモルテン・グロビュール状態の熱によるアンフォールディング反応を測定し、モルテン・グロビュールは高温でアンフォールディングすると共に、低温でもアンフォールディングすることを明らかにしている(14)。このことはモルテン・グロビュールのアンフォールディングが正の比熱の変化を伴うものであり、また、協同的な状態転移として起きていることを示唆する。他方、GrikoとPrivalov(9)は、別の条件（pH4、低イオン強度）で形成されるモルテン・グロビュール

ル状態の熱によるアンフォールディング反応を示差走査熱量計を用いて測定した。そして、同反応が熱吸収ピークを示さないことから、モルテン・グロビュールのアンフォールディングは二次の相転移であると結論した。このような問題点を明らかにするため、滴定型熱量計を用いて、塩に依存したモルテン・グロビュール形成反応を測定した(15)。

Fig. 3は、酸でアンフォールディングしたアポミオグロビン(pH 2)に NaClO_4 を添加したときの滴定型熱測定の結果を示す。測定は 40°C で行った。Fig. 3Aはタンパク質濃度 10 mg/ml 、Fig. 3Bは 2 mg/ml であり、Fig. 3Cはタンパク質を含まない対照実験の結果である。シトクロムcの場合と同様なタンパク質の構造変化に伴う発熱反応が観察された。Fig. 3Dは塩の希釈熱を差し引いた正味の熱量をタンパク質モル当りの値として示す。モル当りの熱量はタンパク質濃度に依存しないこと、シトクロムcの場合と同様に極大値を示すことがわかる。

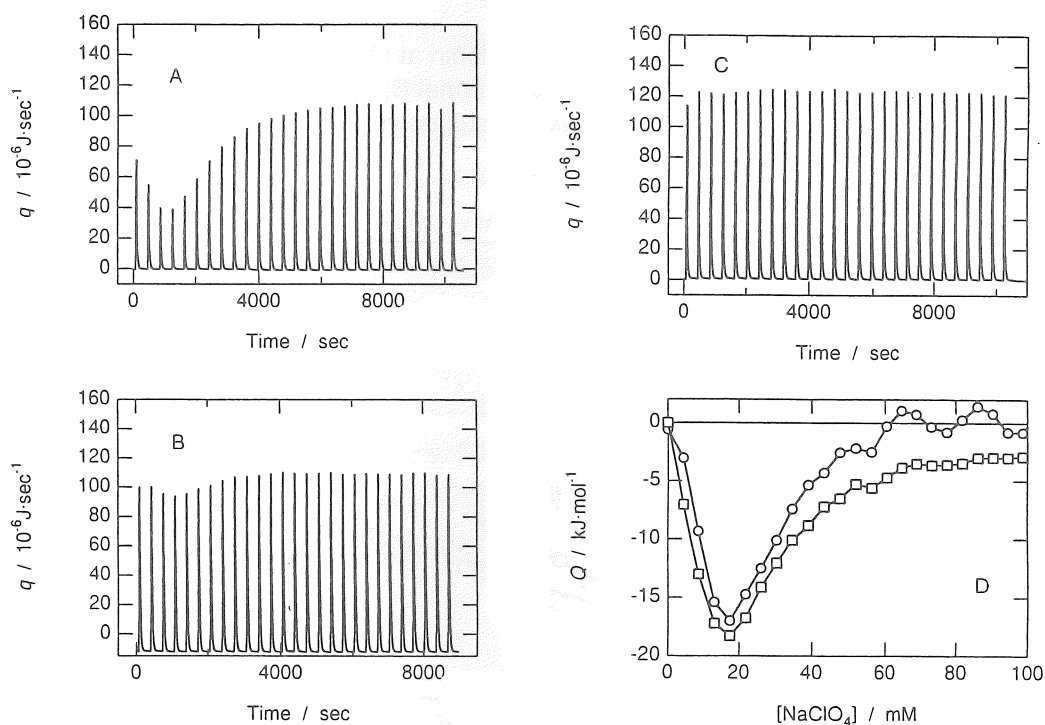


Fig. 3. Typical calorimetric titration of the acid-unfolded apomyoglobin at 10 mg/ml (panel A) and 2 mg/ml (panel B) with NaClO_4 at 40°C , pH 2. Panel C: Control titration in the absence of protein. Panel D: Net heat effect involved in each injection. Protein concentrations were 10 mg/ml (circles) and 2 mg/ml (squares).

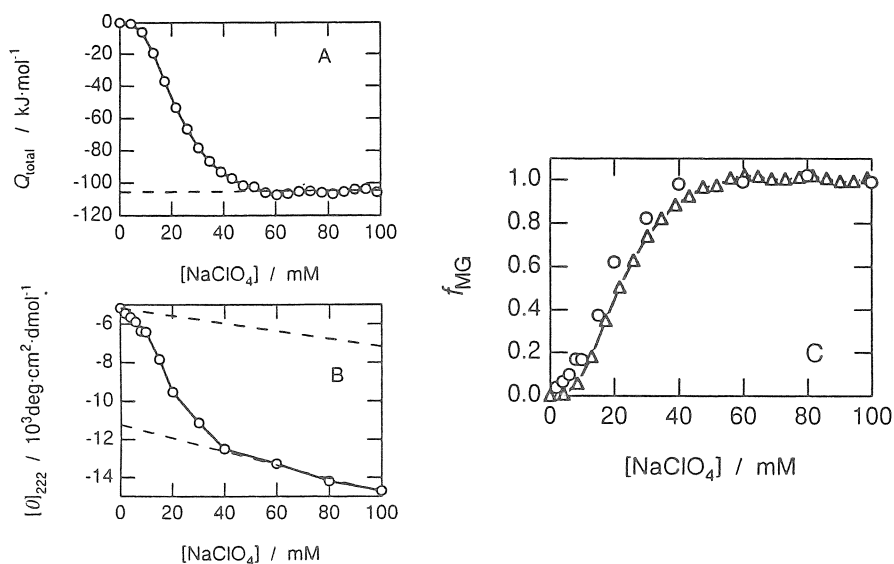


Fig. 4. NaClO₄-induced transition of apomyoglobin at pH 2 and 40°C. Panel A, transition monitored by isothermal calorimetry; panel B, transition monitored by the CD at 222 nm; panel C, normalized transition curves measured by calorimetry (triangles) and CD (circles).

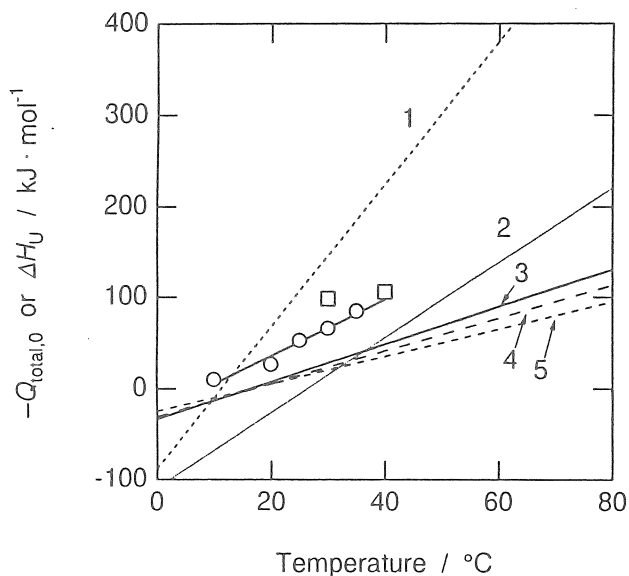


Fig. 5. Dependence on temperature of ΔH_F of apomyoglobin. For comparison, ΔH_U functions of the various conformational states are shown. Line 1, the native state of holomyoglobin; line 2, the native state of apomyoglobin; line 3 - 5, the molten globule state stabilized by Na₂SO₄ (line 3), NaCl (line 4) or Na trichloroacetate (line 5).

Fig. 4Aは個々の滴定に伴う熱をたし合わせたもの(Q)であり、 NaClO_4 濃度に対して飽和曲線を描いていることがわかる。Fig. 4Bは同じ反応を α ヘリックス含量の指標である222 nmの精円率を用いて測定した結果を示す。そして、Fig. 4Cは熱で観測した転移反応と、 α ヘリックスの形成から観測した転移反応を規格化して比較したものであり、両者は一致した。これより、アポミオグロビンの場合も協同的な構造転移が起きていることがわかる。Fig. 4Aから反応の ΔH_F は105 kJ/molと見積もられた。

さまざまな温度で滴定型熱測定実験を行って ΔH_F の温度依存性を調べた(Fig. 5)。図には、示差走査熱測定やCDを用いた実験から、二状態転移を仮定して見積もった ΔH_U の温度依存性関数も表示している。滴定型熱測定から見積もった ΔH_F は ΔH_U と同様な温度依存性を示したが、滴定型熱測定から求めた値の方が大きかった。

4. 考察

4. 1 塩による構造転移を利用した熱測定

モルテン・グロビュール状態はタンパク質のフォールディングの主要な中間状態と考えられている。しかし、その詳細な構造や安定化機構は不明である。これを理解するには、状態転移の機構（二状態転移か否か）や状態転移に伴う熱力学量を明かにすることが重要である。従来、タンパク質の安定のエンタルピー変化や比熱の変化は示差走査熱量計でのみ直接的にかつ正確に測定できると考えられてきた。しかし、モルテン・グロビュールに付随するこれらの値は、タンパク質のネイティブ状態のものに較べると小さく（約3割以下）、正確な熱測定を行うことは困難であった。本研究ではこれらの熱力学量が滴定型熱測定によって測定できることを示した。示差走査熱測定ではタンパク質のアンフォールディング反応を観測するのに対して、等温滴定型熱測定ではフォールディング反応を観測する。塩によるモルテン・グロビュール状態の安定化現象はこの他にも、 β ラクタマーゼをはじめとしていくつかのタンパク質で見られるので、本法は多くのタンパク質の中間状態の研究に応用できると考えられる。

4. 2 構造転移の機構

滴定型熱測定と示差走査熱測定から得られた ΔH_F はシトクロムcの場合には極めてよく一致した。これに対してアポミオグロビンの場合には、滴定型熱測定から得られた ΔH_F のほうが、熱変性から得られた値よりも大きかった。両タンパク質共に $\Delta C_{p,F}$ はよく一致した。このことはシトクロムcのモルテン・グロビュールのアンフォールディングは、協同的な二状態転移（一次の相転移に相当）で起きることを示している。これに対して、アポミオグロビンの状態転移は複雑であることを示している。アポミオグロビンの塩に依存した構造変化は二状態転移としてうまく説明できる。ところが、塩によって安定化されたモ

ルテン・グロビュールの熱によるアンフォールディングは厳密な二状態転移と合わないことは、我々の実験からも示唆されている。

統計力学理論によるとタンパク質の構造変化は協同的におきる場合と、非協同的に起きる場合のあることが予測されている(16)。更に、ひとつのタンパク質でも溶媒条件の変化によって協同的な転移から、非協同的な転移に変化したり、その中間的な性質を示すことが予測されている。シトクロムcのモルテン・グロビュールの状態転移は前者に相当すると思われる。他方、ミオグロビンの場合には協同的な転移と非協同的な転移が混合したものであると考えられる。

5. 今後の課題

滴定型熱量計を用いたタンパク質の構造変化の研究は今後盛んに行われると期待される。中でもここに述べたような、塩との相互作用と共役したタンパク質の構造変化は特に重要な研究対照であろう。しかし、その際に問題となるのは、現在のところ、タンパク質と塩（特に陰イオン）の相互作用に関する基礎データがあまりないことである。本研究では、間接的な証拠から、塩の結合に伴う熱は構造変化の熱に比べて小さいと推定した。今後、この方面の研究を進めるには、タンパク質と塩の相互作用の熱力学量を蓄積していくことが必要である。

タンパク質・ペプチドの中間的状态の構造や安定性は、特に塩によって大きな影響を受ける。我々はここで紹介した研究以外にも、ハチ毒メリチン(17)やマストパラン(18)に対する塩の作用機構を研究した。また、X線溶液散乱を用いて塩によって安定化されるアポミオグロビンのモルテン・グロビュール状態の分子構造を解析した(19)。これらの研究から、ここで述べたような陰イオンの効果のほか、Debye-Huckelの静電遮蔽効果や水の構造に対する効果の重要性も明らかとなった。これらを総合的に解析することにより、タンパク質に対する複雑な塩の効果を、統一的に理解することが期待される。

6. 文献

- (1) Goto, Y., Calciano, L. J. & Fink, A. L. (1990). Acid-induced folding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 573-577.
- (2) Goto, Y., Takahashi, N. & Fink, A. L. (1990). Mechanism of acid-induced folding of proteins. *Biochemistry* 29, 3480-3488.
- (3) Goto, Y. & Aimoto, S. (1991). Anion and pH-dependent conformational transition of an amphiphilic polypeptide. *J. Mol. Biol.* 218, 387-396.
- (4) Goto, Y. & Hagihara, Y. (1992). Mechanism of the conformational transition of melittin. *Biochemistry* 31, 732-738.

- (5) Hagihara, Y., Kataoka, M., Aimoto, S. & Goto, Y. (1992). Charge repulsion in the conformational stability of melittin. *Biochemistry* 31, 11908-11914.
- (6) 後藤祐児 (1993). タンパク質の立体構造形成反応 - モルテン・グロビュール状態の構造と安定性. *生化学* 65, 321-337.
- (7) Kataoka, M., Hagihara, Y., Mihara, K. & Goto, Y. (1993). Molten globule of cytochrome *c* studied by small angle X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* 229, 591-596.
- (8) Goto, Y., Hagihara, Y., Hamada, D., Hoshino, M. & Nishii, I. (1993). Acid-induced unfolding and refolding transitions of cytochrome *c*. A three-state mechanism in H₂O and D₂O. *Biochemistry* 32, 11878-11885.
- (9) Griko, Y. V. & Privalov, P. L. (1994). Thermodynamic puzzle of apomyoglobin unfolding. *J. Mol. Biol.* 235, 1318-1325.
- (10) Goto, Y. & Nishikiori, S. (1991). Role of electrostatic repulsion in the acidic molten globule of cytochrome *c*. *J. Mol. Biol.* 222, 679-686.
- (11) Hagihara, Y., Tan, Y. & Goto, Y. (1994). Comparison of the conformational stability of the molten globule and native states of horse cytochrome *c*: Effects of acetylation, heat, urea, and guanidine-hydrochloride. *J. Mol. Biol.* 237, 336-348.
- (12) Hamada, D., Kidokoro, S., Fukada, H., Takahashi, K. & Goto, Y. (1994). Salt-induced formation of the molten globule state of cytochrome *c* studied by isothermal titration calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10325-10329.
- (13) Jennings, P. A. & Wright, P. E. (1993). Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science* 262, 892-896.
- (14) Nishii, I., Kataoka, M., Tokunaga, F. & Goto, Y. (1994). Cold-denaturation of the molten globule states of apomyoglobin and a profile for protein folding. *Biochemistry* 33, 4903-4909.
- (15) Hamada, D., Fukada, H., Takahashi, K. & Goto, Y. (1995). Salt-induced formation of the molten globule state of apomyoglobin studied by isothermal titration calorimetry. *Thermochim. Acta* in press.
- (16) Alonso, D. O. V., Dill, K. A. & Stigter, D. (1991). The three states of globular proteins: Acid denaturation. *Biopolymers*, 31, 1631-1649.
- (17) Hagihara, Y., Oobatake, M. & Goto, Y. (1994). Thermal unfolding of tetrameric melittin: Comparison with the molten globule state of cytochrome *c*. *Protein Sci.* 3, 1418-1429.
- (18) Hoshino, M. & Goto, Y. (1994). Perchlorate-induced formation of the α -helical structure of mastoparan. *J. Biochem.* 116, 910-915.
- (19) Kataoka, M., Nishii, I., Fujisawa, T., Ueki, T., Tokunaga, F. & Goto, Y. (1995). Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* 249, 215-228.

Effects of salts on the conformation and stability of proteins

Yuji Goto¹ and Mikio Kataoka²

¹Department of Biology and ²Department of Space and Earth Science, Faculty of Science, Osaka University

Summary

Conformation and stability of proteins, in particular in the denatured state, critically depend on the salt conditions. Whereas several proteins including apomyoglobin and cytochrome *c* are unfolded significantly at pH 2 in the absence of salt, the addition of salts stabilizes the molten globule state. Although the molten globule (MG) state has been proposed as a major intermediate of protein folding, it has proven difficult to obtain thermodynamic data characterizing this state. To explore novel approach for characterizing the MG state, salt-induced formation of the MG states of horse cytochrome *c* and horse apomyoglobin at pH 2 was studied by isothermal titration calorimetry.

By titrating the acid-unfolded cytochrome *c* or apomyoglobin with sodium perchlorate, an exothermic reaction was observed. The titration curve obtained from the heat was cooperative and agreed well with the conformational transition curve measured by circular dichroism (CD) at 222 nm. These results indicated that the salt-induced conformational change of these proteins is well approximated by a two-state transition between the acid-unfolded and MG states and that isothermal titration calorimetry will become a useful approach for investigating the effects of salts on the conformation of proteins. In the case of cytochrome *c*, the heat for formation of the MG state estimated by isothermal titration calorimetry was consistent with the enthalpy change for unfolding of the sodium perchlorate-stabilized MG state at pH 2, which was measured by differential scanning calorimetry and CD. These indicate that the heat of titration largely reflects the enthalpy change of the conformational transition and confirm that the unfolding transition of the MG state is a two-state transition. On the other hand, in the case of apomyoglobin, the heat for formation of the MG state estimated by titration calorimetry was slightly larger in magnitude than the enthalpy change for unfolding of the salt-stabilized MG state at pH 2, suggesting a relatively small contribution of heat other than the conformational change. The conformational transition of the MG state of apomyoglobin may be explained on the basis of a mechanism involving both the cooperative and gradual characteristics.