

9629 光駆動塩素イオンポンプ、ハロロドプシンの構造安定性に及ぼす塩の効果

助成研究者：杉山 康雄(名古屋大学 大学院理学研究科)

1. 研究目的：高度好塩菌は殆ど飽和の食塩水中で増殖する。細胞内には4MのKClを蓄積して浸透圧のバランスをとる。従って、すべての細胞内成分はそれらの機能を果たすため高塩環境下で構造を安定化する機構を獲得している。一方、細胞膜に埋め込まれたタンパク質の高塩環境下での構造安定化機構についての知見は少ない。我々は、光駆動塩素イオンポンプ(ハロロドプシン；hR)の大量発現株から調製したhR紫膜は保存に伴い徐々にレチナールを遊離して変性すること、低塩濃度と高温はこの変性過程を促進することを報告してきた。本研究では、この原因を明らかにするため、hR紫膜に対するカオトロピックイオン、種々のタンパク質変性剤、及び、SDSの作用を調べた。

2. 研究方法：hRを大量に発現する組み換え好塩菌を40度Cで5日間培養した。集菌後、紫膜調製法に準じた方法で紫画分を得た(hR紫膜)。hR紫膜を2M NaClと5%コール酸ナトリウムで可溶化し、疎水性カラムクロマトグラフィーで精製hRを調製した。hR紫膜と精製hRは4度Cで保存した。精製hRからMEGA-9を透析除去した試料も調製した。これらの試料を様々な溶液に懸濁し、その吸収スペクトル、CDスペクトルを測定した。

3. 研究結果：bR紫膜は蒸留水からあらゆる飽和無機塩溶液、及び、7M グアニジン塩酸や8M 尿素中で安定である。また、cmc以下のSDS中では吸収のレッドシフトが見られるだけで変性しないが、cmc以上では、中間体(450 nm)を経てレチナールが遊離(変性)することが知られている。

hR紫膜も蒸留水からあらゆる飽和無機塩溶液、及び、7M グアニジン塩酸や8M 尿素中で比較的安定であった。調べたタンパク質変性剤の中では、唯一、3M以上のグアニジンチオシアン酸中では変性の中間体(450 nm)を経てレチナールが遊離した。同様の変性過程(変性の中間体を経る)はcmc以上のSDS中で見られた。一方、bR紫膜と異なり、cmc以下のSDS中では、徐々にレチナールを遊離して390 nmの吸収が増加した。この過程には中間体が認められなかったため、モノマーのSDSの結合が保存に伴う変性過程を促進している様に思われた。

これらの結果から、1) hRはbRより膜外ループ領域の熱的ゆらぎが大きく、そのため高温や低塩環境で不安定になる。2) hRの膜貫通ヘリックス間のパッキングもbRより弱いと推察した。今後この作業仮説を基にハイブリッドポンプを作成し、その構造安定性を評価する予定である。

9629 光駆動塩素イオンポンプ、ハロロドプシンの構造安定性に及ぼす塩の効果

助成研究者：杉山 康雄(名古屋大学 大学院理学研究科)

1. 研究目的

一般に生物の細胞機能はその構成成分間の相互作用の微妙なバランスの上に成り立っているので、細胞の置かれた物理化学的状态(生理学的条件)のわずかな変動によって細胞機能は多大な影響を受ける。さらに大きな変動が起こると、膜構造の破壊、タンパク質やDNA分子の変性が生じて細胞は死ぬ。このように現存の生物は比較的狭い範囲の生理学的条件下でしか生きられないが、その条件は決して進化的に最初から固定されたものではない。即ち、始原生物はその誕生以来様々に変化する地球環境(温度、光、空気組成、圧、pH、イオン組成、湿度)に適応することによって、多種多様な生物へ進化したと考えられ、実際、現在の地球上のあらゆる場所に生物が生息している。従って、この生物の環境適応機構を知れば、進化の仕組みの解明のみならず、様々な環境に適応させた有用な農作物の育種、及び、農工業製品の高効率な生産プロセスを開発のための基礎的知見が得られると予想される。

常温常圧に棲む通常の生物の生理学的条件はよく似ているが、塩濃度、pH、温度や圧力が極端な環境に生育する生物も知られている。これらの生物の適応機構は2種類ある。一つは内部環境を極端な外部環境から保護する機構であり、もう一つはすべての細胞の生化学的装置を極端環境で機能させることである。高塩環境を例にすれば、好塩性真正細菌や好塩性真核生物は細胞内で有機小分子を合成し、細胞外へ無機イオンを放出する(1)。従って、細胞内は通常の低塩濃度に保たれる。一方、高度好塩菌は殆ど飽和の食塩水中で増殖し細胞内には4MのKClを蓄積して浸透圧のバランスをとる(2)。従って、すべての細胞内成分はそれらの機能を果たすため高塩濃度下で構造を安定化する機構を獲得している。最近、好塩性酵素の立体構造が解明され、低塩濃度環境で働く類縁酵素との構造比較から高塩濃度下で水溶性の酵素がその構造を安定化する機構が分かってきた(3,4)。

一方、細胞膜に埋め込まれた好塩菌のタンパク質が高塩濃度環境下で立体構造を安定化させる機構についての知見は殆どない。翻って、好塩菌に限らず、一般に、膜タンパク質の構造を安定化する機構、及び、それに及ぼす塩や温度の影響等についての知見は殆どない。様々な細胞機能を担う膜タンパク質の構造形成機構や構造安定化に及ぼす諸因子についての研究は膜タンパク質の大量発現系や単離精製法の開発に必要である。我々は、光駆動塩素イオンポンプ(ハロロドプシン; hR)を大量に発現する好塩菌株からhR紫膜を調製した。そしてhR紫膜は保存に伴い徐々にレチナール

を遊離して変性すること、低塩濃度と高温はこの変性過程を促進することを報告してきた。本研究では、その原因を明らかにするため、hR 紫膜に対するカオトロピックイオン、種々のタンパク質変性剤、SDS の作用、及び、hR 紫膜の熱安定性を詳しく調べた。

2. 研究方法

hR を大量に発現する組み換え好塩菌を 40℃ で 5 日間培養した。集菌後、紫膜調製法に準じた方法で紫画分を得た (hR 紫膜)。hR 紫膜を 2M NaCl と 5% コール酸ナトリウムで可溶化し、疎水性カラムクロマトグラフィーで精製 hR を調製した。hR 紫膜と精製 hR は 4℃ で保存した。精製 hR から MEGA-9 を透析除去した試料も調製した。これらの試料を様々な溶液に懸濁し、その吸収スペクトル、CD スペクトルを測定した。熱変性過程は種々の温度に保った試料の吸収スペクトルを経時的に測定して追跡した。

3. 研究結果

3-1. hR 紫膜の吸収スペクトルに及ぼす様々な無機塩イオンの影響

bR 紫膜は蒸留水、飽和無機塩溶液、及び、7M グアニジン塩酸や 8M 尿素中で安定であることが知られている。bR 紫膜と同様に、hR 紫膜の可視部吸収スペクトルは、蒸留水から次の様な無機塩溶液、即ち、NaCl、NaF、NaBr、NaI、NaNO₃、KCl、KBr、K₂SO₄、MgCl₂、CaCl₂、MnCl₂、MnSO₄、NH₄Cl 中で 10 nm 程度の吸収極大波長の移動は起こるものの、レチナールが瞬時に遊離することはなかった。また、4 M 過塩素酸ナトリウム、4 M チオシアン酸ナトリウム、4 M トリクロロ酢酸ナトリウム、7M グアニジン塩酸や 8M 尿素中でも安定であった。これらの試薬はカオトロピックイオンとして、タンパク質の疎水結合を壊し水溶性タンパク質を変性させることが知られている。従って、これらの結果は 1) 内在の脂質に覆われている bR や hR のヘリックス領域へはカオトロピックイオンは侵入できない 2) bR 紫膜や hR 紫膜の膜外にあってヘリックスを繋ぐループ領域の構造は疎水結合やイオン結合によって安定化されているのではない、あるいは、溶媒と接していないことを示唆している。

3-2. hR 紫膜に及ぼすグアニジンチオシアン酸の影響

調べた塩のうち、唯一グアニジンチオシアン酸は、hR 紫膜を退色 (レチナールの遊離) させた。図 1 に示した様に、3 M グアニジンチオシアン酸中に置くと、hR 紫膜の 570 nm の吸収の減少と同時に 450 nm の吸収の増加が起こった。1 時間後には、450 nm の吸収が減少し、380 nm の吸収が増加した。即ち、グアニジンチオシアン酸による変性 (レチナールの遊離) は中間体を経て起こった。退色した試料のグアニジンチオシアン酸を希釈しても、570 nm のクロモホアの再生は起こらなかったため、この変性は不可逆であった。高濃度 (3.5-5 M) のグアニジンチオシアン酸は退色速度を速めた。変性を起こすグアニジンチオシアン酸には臨界濃度があった。即ち、2 M 以下のグアニジンチオシアン酸は退色を起こさなかった。上述の様に、グアニジウム

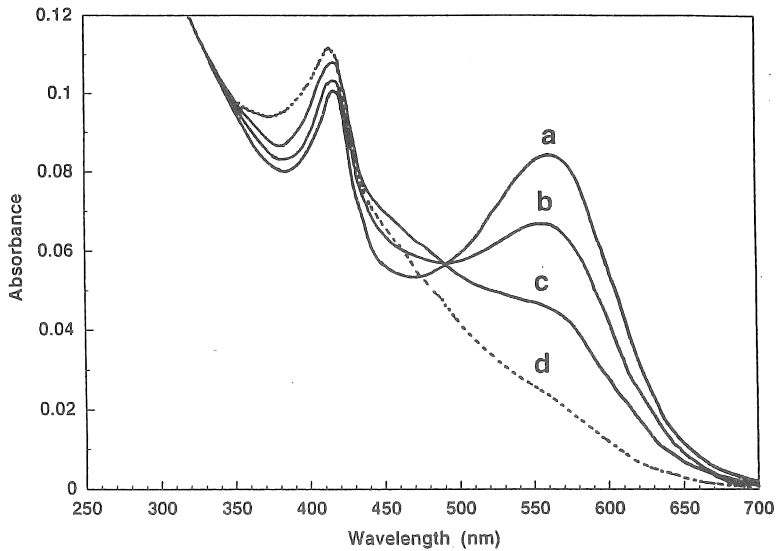


図1. hR 紫膜を 3 M (終濃度) グアニジンチオシアン酸と混合して直ちに吸収スペクトルを 25°C で測定した (スペクトル a)。スペクトル b, c, d は、それぞれ、5 分、20 分、60 分後に測定した。

イオン、あるいは、チオシアン酸イオン単独では変性を起こさなかったため、両イオンの共同作用で変性すると考えられる。現在のところ、その共同作用は不明である。

3-3. SDS による hR 紫膜の変性

bR 紫膜は CMC 以下の SDS 中では吸収のレッドシフトあるいは分子吸光係数の減少が見られるだけで変性しない (図 2A) が、CMC 以上 SDS 中では、中間体 (450 nm) を経てレチナールが遊離することが知られている (図 2B) (5)。この変性の中間体のシッフ塩基はまだプロトン化しているが、レチナール結合ポケットの構造が乱れてポリエン鎖やイオン環との相互作用が弱まった状態であると考えられている (5)。

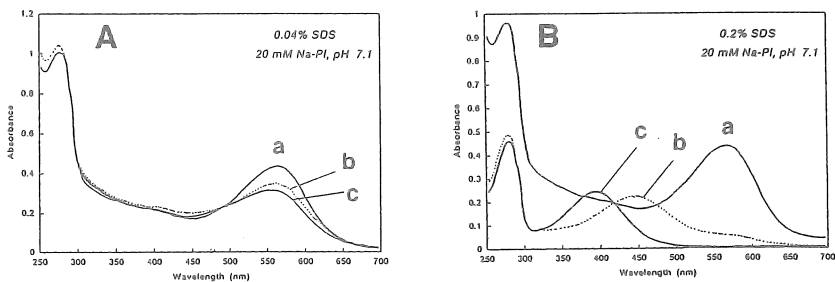


図2. SDS が bR 紫膜に与える影響。bR 紫膜 (A、スペクトル a) へ 0.04% SDS を加えた直後 (スペクトル b) と 90 分 (スペクトル c) 後に吸収スペクトルを測定した。同様に、bR 紫膜 (B、スペクトル a) へ 0.2% SDS を加えた直後 (スペクトル b) と 80 分 (スペクトル c) 後に吸収スペクトルを測定した。

bR 紫膜と異なり、hR 紫膜は CMC 以下の SDS 中でも、570 nm の吸収が徐々に減少すると同時にレチナールを遊離して 390 nm の吸収が増加した。この過程には中間体が認められなかった (図 3A, C)。一方、CMC 以上の SDS 中では、hR 紫膜は中間体 (450 nm) を経てレチナールを遊離した (図 3B, D)。従って、モノマー状態とミセル状態で SDS の作用様式が異なることが分かった。一般に、モノマーの SDS はタンパク質の表面へ水素結合や塩結合によって結合し局所的にタンパク質の構造変化を引き起こす、そして、ミセルの SDS はその疎水性部分がタンパク質の内部へ浸透したりタンパク質の疎水的領域を包みこむことによってタンパク質の構造を大きく変える、即ち、変性させると考えられている。この考えに立てば、モノマーの SDS は hR 紫膜の膜外ループ領域へ結合する。その結果、ループ領域の構造が乱れシッフ塩基が加水分解されると思われる。

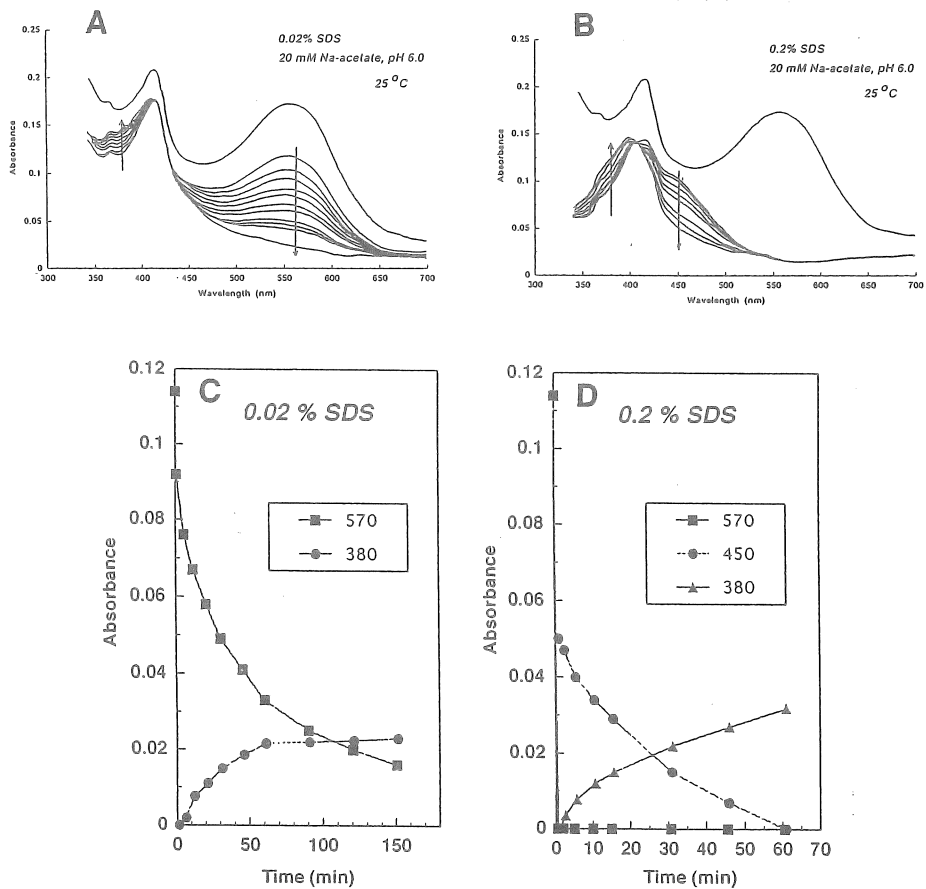


図3. hR 紫膜に及ぼす SDS の影響。hR 紫膜を 0.02% (A, C) と 0.2% SDS (B, D) で懸濁し、吸収スペクトルを経時的に測定した (A 及び B)。570 nm, 450 nm, 380 nm の吸光度を時間に対してプロットした (図 3C と D)。

3-5. SDS 中の hO の構造

bR やアーキロドプシン-1 (bR とアミノ酸配列が 40%異なる光駆動プロトンポンプ、aR-1 (6)) を SDS で変性させて得たバクテリオオプシン (bO) とアーキオプシン-1 (aO-1) はリン脂質 DMPC、洗剤 CHAPS と SDS の混合ミセル中でレチナールを加えるとクロモホアを再生する (7)。我々はこの *in vitro* での膜タンパク質のリフォールディング過程を解析し、DMPC と CHAPS の役割を明らかにした (8)。一方、bR と殆ど同じ 7 本ヘリックス構造をとる hR (9,10) を SDS で変性させて得た hO は DMPC、CHAPS と SDS の混合ミセル中へ移行してもクロモホアを形成しなかった。そこで SDS 変性 hO の CD スペクトルを測定した。SDS 中の hO と aO-1 の遠紫外 CD スペクトルの形と大きさは殆ど同じであった (図 4) ので、hO は aO-1 や bO と同様に SDS 中で α -ヘリックス構造をとっていると思われる。SDS 中の hO を CHAPS/SDS 中や DMPC/CHAPS/SDS 中へ移行する CD スペクトルの形は変化した。aO-1 や bO の場合と異なり、 α -ヘリックス含量の増加は認められなかった。さらに、aO-1 や bO の場合と異なり、hO を CHAPS/SDS 中に長時間放置しても β 構造様の CD スペクトルへ変わっていくことはなかった (図 4)。これらの違いが DMPC/CHAPS/SDS 中でも hO はクロモホアを形成できない要因であろう。

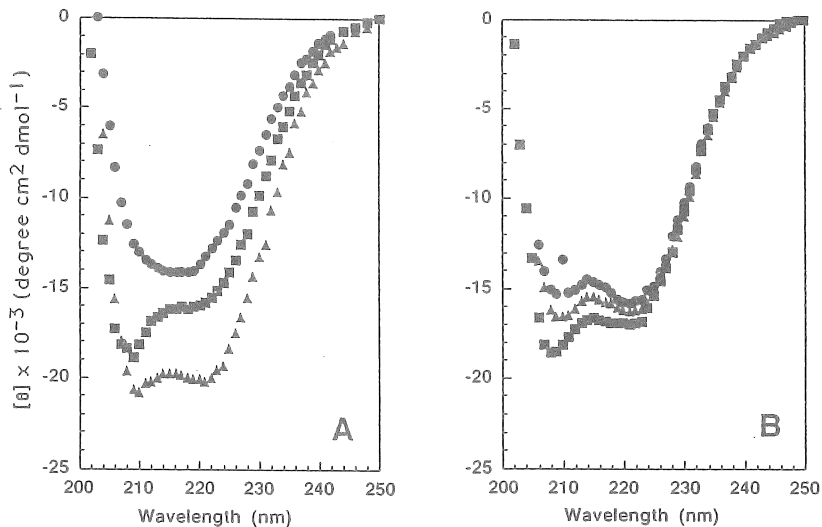


図 4. aO-1 と hO の遠紫外 CD スペクトル。aO-1 の CD スペクトル (A) は 0.08% SDS (■), 0.2% CHAPS/0.08% SDS (●), 0.2% DMPC/0.2% CHAPS/0.08% SDS (▲) 中で、hO の CD スペクトル (B) は 0.08% SDS (■), 0.5% CHAPS/0.08% SDS (●), 0.5% DMPC/0.5% CHAPS/0.08% SDS (▲) 中で測定した。測定温度は 20℃ である。

SDS 中、及び、DMPC/CHAPS/SDS 中の hO と aO-1 の近紫外 CD スペクトルは全く異なっていた (図 5) が、hO も SDS 中から DMPC/CHAPS/SDS 中へ移行させると 3 次構造が変化した。この CD 変化がレチナール結合ポケットの形成を表わしているかは現在のところ不明である。

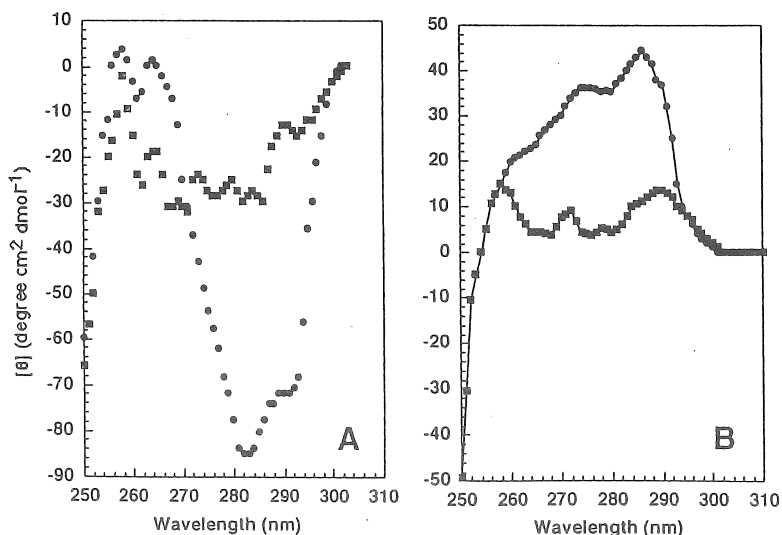


図5. aO-1とhOの近紫外CDスペクトル。aO-1のCDスペクトル(A)は0.08% SDS (■), 0.2% DMPC/0.2% CHAPS/0.08% SDS (●) 中で、hOのCDスペクトル(B)は0.08% SDS (■), 0.5% DMPC/0.5% CHAPS/0.08% SDS (●) 中で測定した。測定温度は20℃である。

3-6. hR 紫膜の等温変性過程の解析

hR 紫膜を中性 pH 室温 (暗中) に放置すると徐々にレチナールを遊離して退色する。この過程は変性の中間体を通らない。そこで hR 紫膜の吸収スペクトルの経時変化を様々な温度で測定した。この退色 (570nm の吸光度の減少) 過程は単純な一次反応ではなかった (図 6) ので、2つの独立な過程 (速い成分と遅い成分) から成るとして(1)式を用いて解析した。

$$A_{570}(t) = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t) \quad (1)$$

k_1 , k_2 は速い成分と遅い成分の速度定数、 A_1 , A_2 はそれぞれの成分の割合である。 A_1 , A_2 は温度によって変わった。即ち、温度が高くなると、速い成分の割合が増加した (図 7A)。そして、それぞれの過程のアレニウスプロット (図 7B) から活性化エネルギーを算出した。さらに、アイリングの絶対反応速度論 (遷移状態理論) を適用して、速度定数と活性化エネルギーから、60℃での、活性化エンタルピー、活性化自由エネルギー、及び、活性化エントロピーを算出した (表 1)。

| | k (s ⁻¹) | ΔH^\ddagger (kcal/mol) | ΔG^\ddagger (kcal/mol) | ΔS^\ddagger (kcal/mol) |
|----------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| fast (k_1) | 1.965×10^{-3} | 19.47 | 23.63 | -12.5 |
| slow (k_2) | 1.255×10^{-4} | 32 | 25.45 | 19.7 |

表 1. hR 紫膜の等温変性における活性化中間体の熱力学パラメーター。

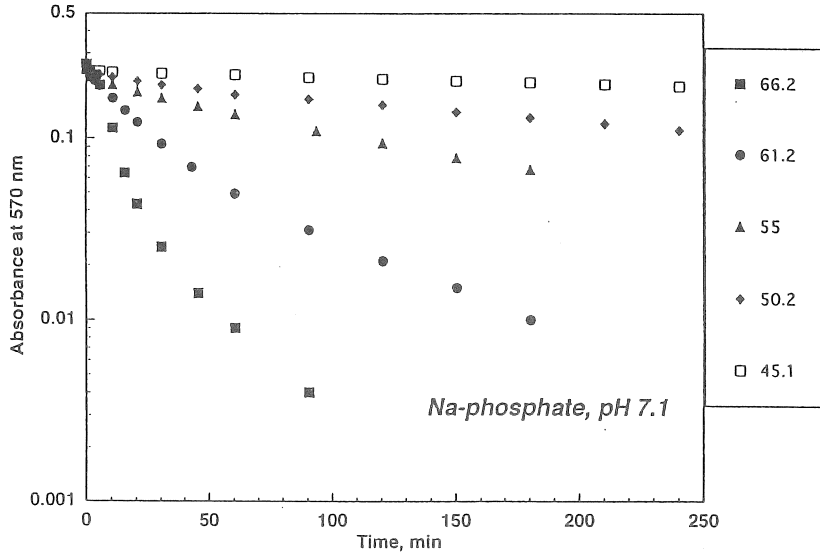


図6. hR 紫膜の等温変性過程。hR 紫膜を 50 mM sodium phosphate (pH 7.1)で懸濁し、吸収スペクトルを様々な温度で経時的に測定した。570 nm の吸光度の対数（常用）を時間に対してプロットした。

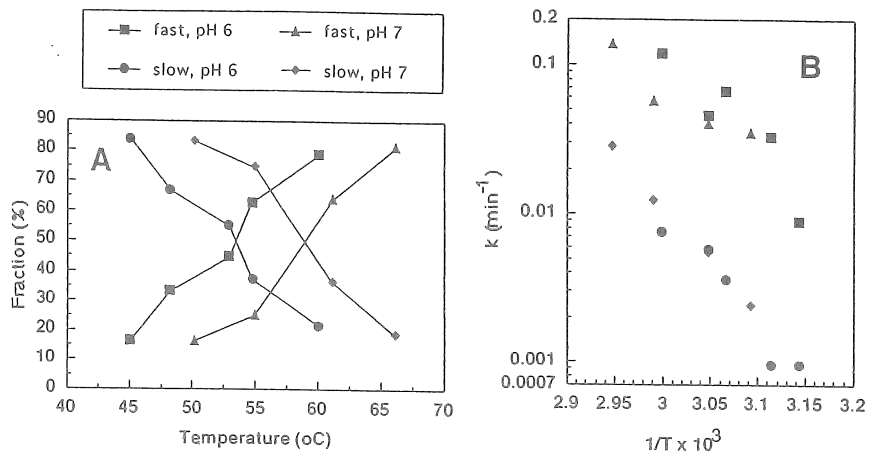


図7. 図6のデータを(1)式で解析し、それぞれの温度での A_1 (fast) と A_2 (slow) を求めた。また、同様の測定を pH 6 で行った (図7A)。図7Bは(1)式で解析して得た速度定数をアレニウスプロットしたものである。

これらの結果から、hR 紫膜の等温変性過程は



と表わされる。ここで、N、D*、DはそれぞれhR 紫膜、活性化中間体、変性hRである。変性の活性化中間体D*はすべて $k_B T/h$ (k_B 、T、 h はそれぞれボルツマン定数、絶対温度、プランク定数である) の速度でシッフ塩基結合が加水分解されると考えた。等温変性は酸性pHで促進された。図6の実験は50mMの緩衝液中で行ったが、塩(0.2M)を加えると、hR 紫膜は50℃付近では会合し、等温変性過程を測定できなかった。

3-7. 精製hRの熱安定性

精製hRを2M NaCl, 0.5% (w/v) MEGA-9, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2) 中で様々な温度下に吸収スペクトルを経時的に測定した。hR 紫膜の場合と同様に、退色過程は2相からなり、温度を上げると速い成分の速度は速くなった。一方、55℃までは遅い成分の速度定数の増加は55℃までは顕著でなく、60℃以上で急速に増加してすべて退色した(図8)。遅い成分の速度定数は塩濃度を下げると大きくなった(図9A)。高塩濃度でMEGA-9濃度を下げると高温での退色速度が非常に遅くなった(図9B)。

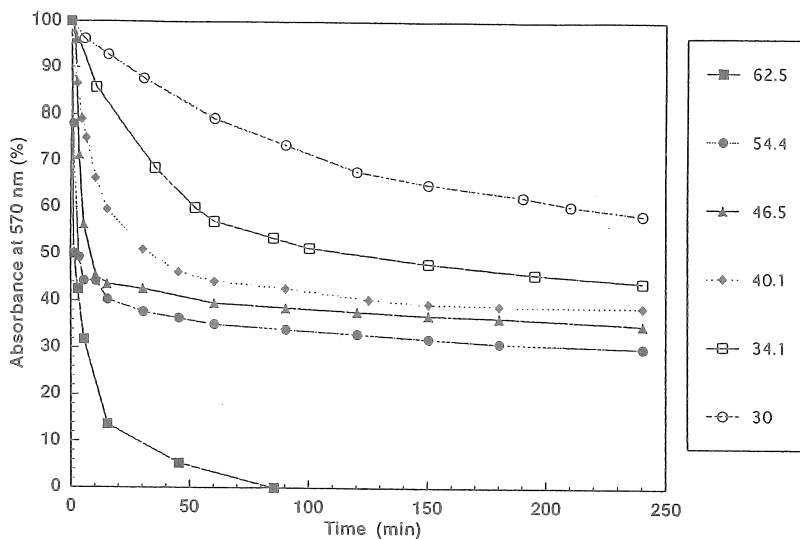


図8. 精製hRの等温変性過程。精製hR (2 M NaCl, 0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2)) の吸収スペクトルを様々な温度で経時的に測定した。そして570 nm 吸光度を時間に対してプロットした。

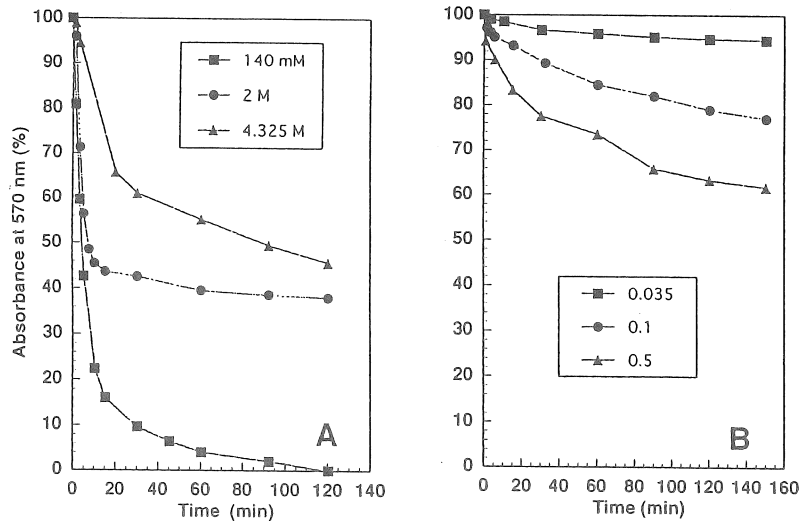


図9. 精製 hR の等温変性過程に及ぼす塩濃度 (A) と MEGA-9 濃度 (B) の影響。

(A) 精製 hR を 0.5 % MEGA-9, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2) を含む様々な NaCl 溶液へ移し、その吸収スペクトルを 46°C で経時的に測定した。そして 570 nm の吸光度を時間に対してプロットした。(B) 精製 hR を 4 M NaCl, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2) 中で MEGA-9 濃度を変えて 40°C でインキュベートし、吸収スペクトルを経時的に測定した。

4. 考察と今後の課題

4.1 hR 紫膜と bR 紫膜の構造安定性の比較

bR や hR 等のレチナールタンパク質の構造安定性は、吸収スペクトルの変化から容易に評価できる。即ち、570 nm の吸収は 7 本のヘリックスが適切にパッキングしてレチナール結合ポケット (天然 3 次構造) を形成していること、一方、380 nm の吸収はレチナール結合ポケットが崩壊していることを示す。しかしながら、現在までのところ、どの程度の構造変化が 7 本のヘリックスの束に起こるとレチナールシッフ塩基結合が加水分解される (不可逆的変性) のかは知られていない。

我々は、種々のカオトロピックイオン、SDS、及び、熱が bR や hR の 3 次構造に及ぼす影響を系統的に調べた。その結果、1) bR 紫膜は蒸留水中、及び、様々な塩溶液中でレチナールが遊離することはない。即ち、プロトン化シッフ塩基は加水分解されない。hR 紫膜の場合はどのような溶液中でも徐々にレチナールが遊離する。2) CMC より低い濃度の SDS は bR 紫膜を変性させないが、hR 紫膜にモノマー状態で結合して 3 次構造を壊す。その過程は 570 nm → 380 nm であり、中間体を経なかった。3) bR 紫膜は 80°C 程度までは安定であり、 $T_m=95^\circ\text{C}$ で熱変性する。一方、hR 紫膜は常温でも等温変性し、温度を上げると変性速度が高まった。また、いったん変性した試料の温度を下げて 570 nm の吸光度は回復しなかった。従って、hR 紫膜

の熱変性は不可逆過程であり、平衡論(2状態転移)では解析できなかった。我々は遷移状態論を適用し、活性化の熱力学量を求めた。hR 紫膜と精製 hR の変性過程は共に2相からなり、そして、この2成分の比率が温度で変わることは、レチナールの異性化、あるいは、hR 分子の会合状態が温度によって変わることを示唆している。さらに、精製 hR の熱安定性は塩濃度を上げたり(4 M 以上)界面活性剤の濃度を下げると高まることから、hR 分子に結合した界面活性剤や脂質の熱運動が hR の3次構造に大きな影響を与えると考えられる。塩はおそらく結合した界面活性剤や脂質の運動を低下させ、hR の構造を安定化させるのではないかと思われる。

4.2 今後の課題

これらの結果から、1) hR は bR より膜外ループ領域の熱的ゆらぎが大きく、そのため高温や低塩環境で不安定になる。モノマーの SDS は主として膜外ループ領域へ結合し、常温での等温変性過程を促進する。2) hR の膜貫通ヘリックス間のパッキングも bR より弱く膜外ループ領域の熱的ゆらぎの影響を受けやすいと推察した。今後この作業仮説を基にハイブリッドポンプを作成し、その構造安定性、及び、ループ領域の熱的ゆらぎがヘリックスの束のパッキングに及ぼす影響を評価する予定である。3) 変性の遷移状態論、及び、界面活性剤や脂質と膜タンパク質の相互作用に及ぼす塩の効果を詳細に検討する必要がある。

5. 参考文献

- (1) Yancey, P.H., Clark, M.E., Hard, S.C., Bowlus, R.D. and Somero, G.N. *Science* 217, 1214-1222 (1982)
- (2) Eisenberg, H., Mevarech, M. and Zaccai, G. *Adv. Protein Chem.* 43, 1-62. (1992)
- (3) Dym, O., Mevarech, M. and Sussman, J.L. *Science* 267, 1344-1346. (1995)
- (4) Frolow, F., Harel, M., Sussman, J.L., Mevarech, M. and Shoham, M. *Nature Struct. Biol.* 3, 452-458. (1995)
- (5) Pardos, E., Dunach, M. and Sabes, M. *Biochim. Biophys. Acta* 769, 1-7. (1985)
- (6) Sugiyama, Y., Maeda, M., Futai, M. and Mukohata, Y. *J. Biol. Chem.* 264, 20859-20862. (1989)
- (7) Sugiyama, Y. and Mukohata, Y. *J. Biochem.* 115, 1021-1026. (1994)
- (8) Sugiyama, Y. and Mukohata, Y. *J. Biochem.* 119, 1143-1149. (1996)
- (9) Havelka, W.A., Henderson, R., Heymann, A.W. and Oesterhelt, D. *J. Mol. Biol.* 259, 393-421. (1993)
- (10) Havelka, W.A., Henderson, R. and Oesterhelt, D. *J. Mol. Biol.* 247, 762-738. (1995)

The effects of salt on the stability of the light-driven chloride pump,
halorhodopsin.

Yasuo Sugiyama

Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University

Summary

Extremely halophilic archaeobacteria grow in a medium containing 25% (w/v) NaCl and balance the external high salt concentration by accumulating within the cell the inorganic ions such as KCl. Therefore, all the cellular components have to be adapted to function at the extremely high intracellular concentration of salt. X-ray crystallography of halophilic malate dehydrogenase and ferredoxin revealed the structural features that promote the stability of the soluble proteins at the high salt concentrations. On the other hand, little is known about the stability of the membrane-embedded proteins under the high salt conditions. To address this issue, we compared the stability of halorhodopsin/purple membrane (hR/PM) with that of bacteriorhodopsin/purple membrane (bR/PM). It was known that the chromophore of hR/PM was gradually bleached even at 4 °C. In this work, we studied the effects of chaotropic ions and SDS on hR/PM. Furthermore, the thermal stability of hR/PM and the purified hR was examined.

1. Low concentrations of SDS (<cmc) induced the blue form of bR/PM in a reversible manner. bR/PM was denatured with increasing the concentrations of SDS (>cmc). Denaturation proceeded via an intermediate with $\lambda_{\max} = 450$ nm. On the other hand, low concentrations of SDS accelerated the isothermal chromophore bleaching (denaturation) of hR/PM because the 570 nm chromophore changed to the 380 nm species without an intermediate. This indicated that the binding of SDS monomer changed the tertiary structure of hR/PM, which led to the hydrolysis of the retinal Schiff base linkage.

2. Whereas bR/PM was stable at 80 °C, hR/PM irreversibly denatured at room temperature and the denaturation rate increased with increasing the temperature. The denaturation proceeded with two independent processes (fast and slow phases) and the fraction of fast phase increased at higher temperature. Isothermal denaturation of purified hR diminished at high concentrations of salt and low concentrations of MEGA-9. Then the micellar structure of the detergents and/or lipid would affect the stability of hR and salt may restrict the thermal motion of these mixed micelle structure.