

Title	蛋白質結晶のガラス転移
Author(s)	宮崎, 裕司
Citation	大阪大学低温センターだより. 1994, 86, p. 1-5
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/5699
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

蛋白質結晶のガラス転移

理学部 宮崎裕司(豊中4361)

1. はじめに

蛋白質分子は20種類の α -アミノ酸残基を繰り返し単位とするポリペプチド鎖からなる生体高分子で、その取り得るコンホメーションの極めて多くの可能な組み合わせの中でほとんど唯一の構造をとっているという特異性を有している。

蛋白質分子についてはこれまでに非常に多くの研究が行われているが、最近では蛋白質結晶の低温物性の研究が注目を集めている。蛋白質結晶では、蛋白質分子は3次元周期格子を形成するが、分子自身はエネルギーが近接した多数のコンホメーションをもつため、高温ではあたかも液体のように揺らいでいる。温度を低下させるとこれらの運動は凍結し、ガラス転移点を経て非平衡状態に移ることが期待される。蛋白質結晶のガラス転移はこれまで多くの指摘が行われながら¹⁾、誰も直接的証拠を得ることに成功していない。

ガラス転移の研究には断熱型カロリメータによる熱容量測定が非常に有効な手段であるが、この方法は数gないし十数gという多量の試料量を要するので、多量に得るのが困難な蛋白質結晶に対しては不適当であった。しかし、最近数百mgの試料量で高精度な熱容量測定を可能とする断熱型マイクロカロリメータが開発され^{5,6)}、蛋白質結晶のような微少試料に対しても測定できるようになった。ここでは2種類の蛋白質結晶の低温熱容量測定の結果について紹介することにする。

2. 正方晶系リゾチーム結晶⁶⁾

リゾチームは分子量約14,000の酵素蛋白質で、ムコ多糖やキチンなどの多糖類を加水分解する。正方晶系リゾチーム結晶は卵白リゾチームをNaClで塩析することによって得た⁷⁾。熱容量測定は45.7%、41.0%、36.4%、31.6%、24.0%、13.6%、7.4%、0% (乾燥) 含水結晶について行った。

図1に45.7%、13.6%、乾燥結晶の熱容量を代表的に示す。45.7%試料を急冷したところ、148 Kにガラス転移による熱容量ジャンプが見い出された。そしてガラス転移点よりも高い温度で、過冷却した結晶水の結晶化による発熱が生じた。この発熱がなくなるまでアニールして再び熱容量を測定すると、熱容量ジャンプは小さくなったものの、急冷試料とほぼ同じ152 Kにガラス転移が観測された。この試料ではさらにNaCl \cdot 2H₂Oと水による共融解および水の融解が見られた。含水量の少ない13.6%試料では、急冷すると45.7%試料よりも高い165 Kにガラス転移を生じた。しかし結晶水の結晶化による発熱は観測されなかった。乾燥試料については何も熱異常は見い出されなかった。

リゾチーム結晶で見られたガラス転移は通常のガラス性物質で見られるような発熱から吸熱に転じる温度ドリフトを生じず、幅広い温度領域にわたって吸熱ドリフトのみが観測された。このことはこれらのガラス転移が非常にブロードな緩和時間の分布をもっていることを意味する。アニールすることによ

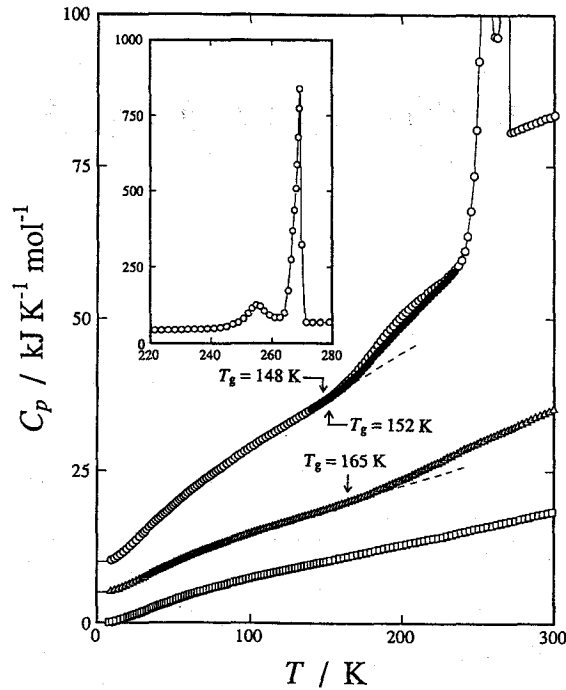


図1 リゾチーム結晶の熱容量曲線。○、●：45.7 %含水結晶（急冷、216 Kでアニール）；△：13.6 %含水結晶；□：乾燥結晶。

てガラス転移点での熱容量ジャンプが小さくなることから、リゾチーム結晶のガラス転移が結晶水に関係するものであることは容易にわかるであろう。ではこれらのガラス転移は一体何によるものであろうか？ 図2はガラス転移温度の含水量依存性を示したものである。この図からわかることは、含水量が増加するにつれてガラス転移温度が降下するということである。この効果は可塑効果と呼ばれ^{8,9)}、リゾチーム分子と結晶水との間の協同性を表す。したがって観測されたガラス転移はリゾチーム分子と結晶水の協同的な運動の凍結によるものと結論付けられる。

3. 単斜晶系ミオグロビン結晶^{6,10)}

ミオグロビンは筋肉中に含まれる分子量約17,000の酸素貯蔵蛋白質である。単斜晶系ミオグロビン結晶は馬ミオグロビンの NaH_2PO_4 と K_2HPO_4 による塩析法で精製した^{11,12)}。結晶は2週間で析出した粉末結晶Aと半年間で析出した結晶Bの2種類が得られた。熱容量測定は結晶Aでは48.9 %、38.7 %、27.3 %、19.0 %、10.4 %、0 %（乾燥）の含水量、結晶Bでは44.4 %、3.0 %、0 %（乾燥）の含水量について行った。

図3は48.9 %、19.0 %、乾燥結晶Aの熱容量を代表的に示したものである。急冷した48.9 %試料では、188 Kに典型的なガラス転移による熱容量ジャンプが観測された。またガラス転移点より高温で過冷却した結晶水の結晶化による発熱が生じた。この発熱がなくなるまでアニールしたところ、ガラス転移温度が172 Kと降下し、熱容量ジャンプも小さくなった。さらにリン酸塩水和物と水の共融解やリン酸塩水和物の溶解による熱異常などが見られた。含水量を減らした19.0 %試料Aでは、48.9 %試料

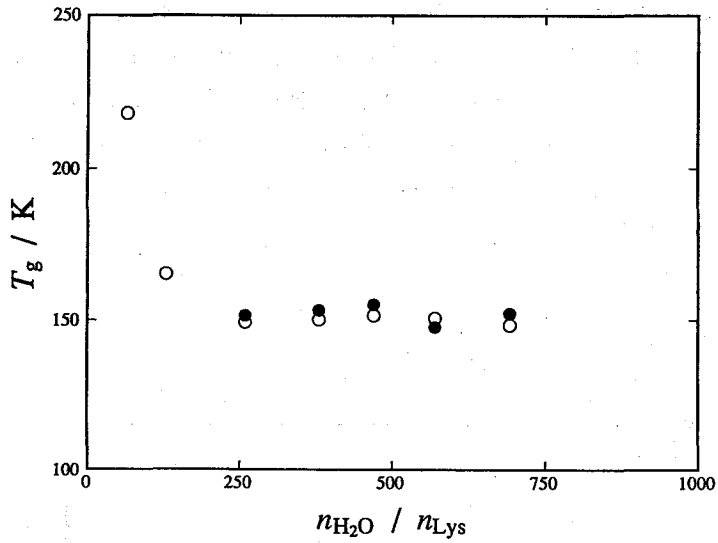


図2 リゾチーム結晶におけるガラス転移温度の含水量依存性。○：急冷結晶；●：アニール結晶。

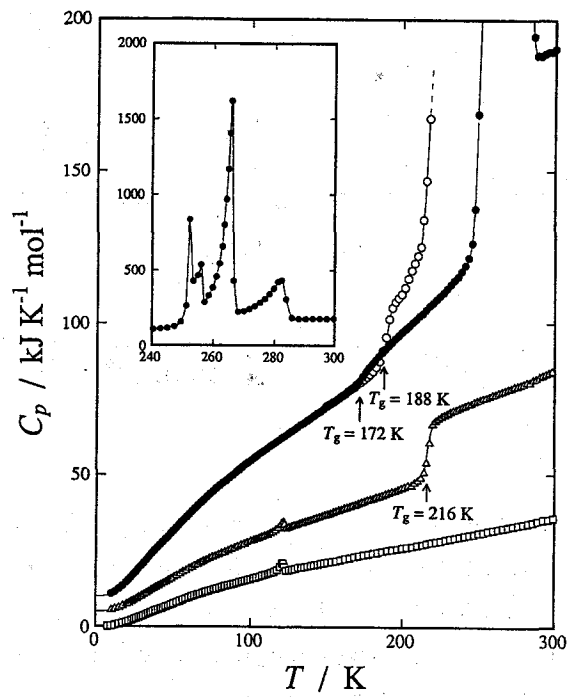


図3 ミオグロビン結晶の熱容量曲線。○、●：48.9%含水結晶A（急冷、230 Kでアニール）；△：19.0%含水結晶A；□：乾燥結晶A。

Aよりも高い216 Kにガラス転移が見い出された。しかし結晶水の結晶化による発熱は観測されなかった。この試料では120 K付近に小さなピークが見られるが、これは塩析に使用したリン酸塩から生じた KH_2PO_4 の相転移である¹³⁾。乾燥試料Aでは KH_2PO_4 の相転移以外には何も熱異常を生じなかった。

ミオグロビン結晶で観測されたガラス転移はリゾチーム結晶のガラス転移と比べてかなりシャープなものであった。この違いはおそらくミオグロビン結晶を精製する際に高濃度のリン酸塩を使用したために生じたのであろう。図4にガラス転移温度の含水量依存性を示す。含水量が増加するにつれてガラス転移温度が低下しているのがわかるであろう。すなわち可塑効果が見られることから^{8,9)}、リゾチーム結晶の場合と同様、ミオグロビン結晶のガラス転移はミオグロビン分子と結晶水の協同的運動の凍結によるものであることが理解できる。

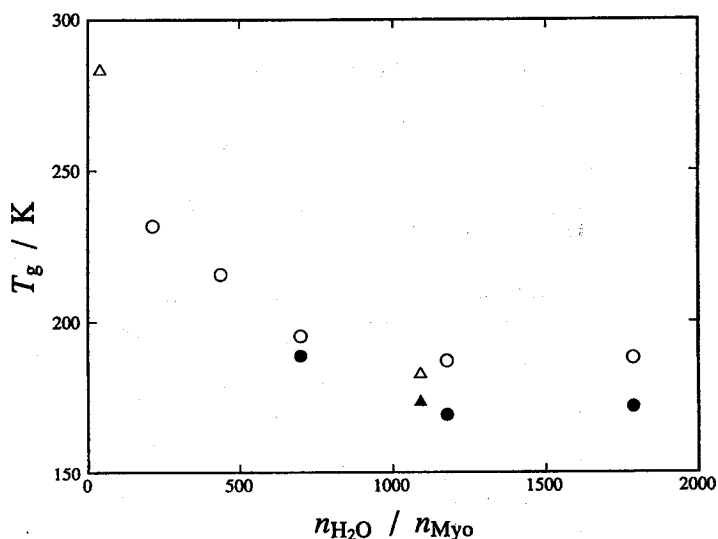


図4 ミオグロビン結晶におけるガラス転移温度の含水量依存性。○、●：結晶A（急冷、アニール）；△、▲：結晶B（急冷、アニール）。

4. おわりに

以上蛋白質結晶の低温熱容量の研究について2例ほど紹介したが、今回の研究で初めて蛋白質結晶がガラス転移を示すという直接的証拠を提出することができた。したがってこれらの蛋白質結晶は蛋白質-水-塩の多成分からなる新しい範疇のガラス性結晶に属すると言えるであろう。

このような結晶状態の蛋白質の研究は、熱物性の側面と構造の側面を直接比較できるという点で非常に重要な意味をもつものと考えている。今後ヘモグロビン、チトクロームcなどの他の蛋白質結晶やDNAなどの核酸結晶の低温熱容量測定を行っていく予定である。

参考文献

- 1) F. Parak, E. W. Knapp, and D. Kucheida, *J. Mol. Biol.* **161**, 177 (1982).
- 2) W. Doster, A. Bachleitner, R. Dunau, M. Hiebl, and E. Lüscher, *Biophys. J.* **50**, 213 (1986).
- 3) W. Doster, S. Cusack, and W. Petry, *Nature* **337**, 754 (1989).
- 4) R. F. Tilton, Jr., J. C. Dewan, and G. A. Petsko, *Biochemistry* **31**, 2469 (1992).
- 5) Y. Kume, Y. Miyazaki, T. Matsuo, and H. Suga, *J. Phys. Chem. Solids* **53**, 1297 (1992).
- 6) Y. Miyazaki, Doctoral Thesis, Osaka University (1993).
- 7) F. T. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 854 (1946).
- 8) S. Bone and R. Pethig, *J. Mol. Biol.* **157**, 571 (1982).
- 9) S. Bone and R. Pethig, *J. Mol. Biol.* **181**, 323 (1982).
- 10) Y. Miyazaki, T. Matsuo, and H. Suga, *Chem. Phys. Lett.* **213**, 303 (1993).
- 11) J. C. Kendrew, *Proc. R. Soc. Lond. A* **201**, 62 (1950).
- 12) J. Keilin and K. Schmid, *Nature* **162**, 496 (1948).
- 13) C. C. Stephenson and J. G. Hooley, *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 1397 (1944).