

最終講義

熱測定で楽しむ！ 蛋白質物性の不思議

長岡技術科学大学 物質生物系
分子生物物理学研究室
城所俊一

最終講義・序

チェロで楽しむ！ J. S. バッハの音楽

無伴奏チェロ組曲 第1番ト長調
(BWV 1007)より
プレリュード(前奏曲)

最終講義

熱測定で楽しむ！ 蛋白質物性の不思議

長岡技術科学大学 物質生物系
分子生物物理学研究室
城所俊一

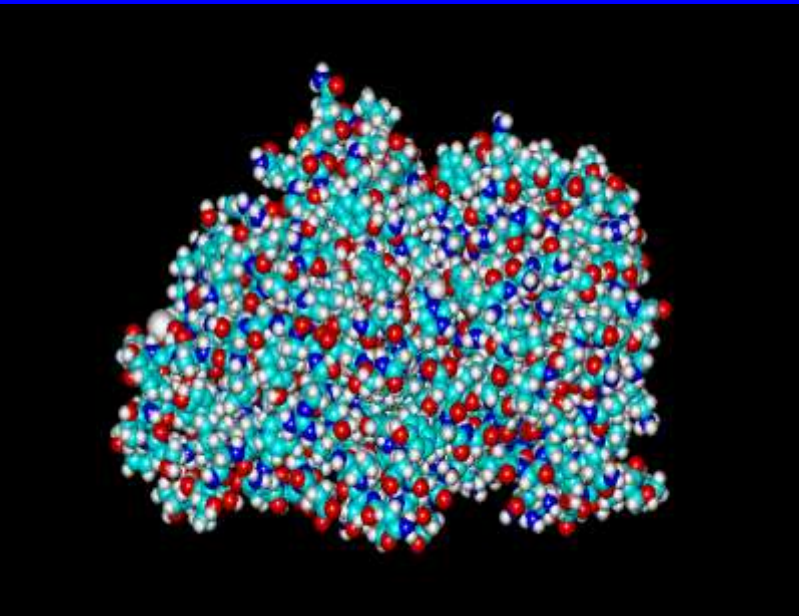
本日の内容

1. 熱測定・蛋白質物性との出会い
(東大・物理学教室)
2. 産業用酵素機能の研究への挑戦
(相模中央化学研究所)
3. 熱測定で蛋白質物性を楽しむ！
(長岡技科大・生物系～物質生物系)
 - (1) 変性状態の可逆的会合体(RO)の研究
 - (2) 高安定・高結合性を持つ低温ショック
蛋白質の創製
 - (3) 産業用酵素の産物阻害効果の研究

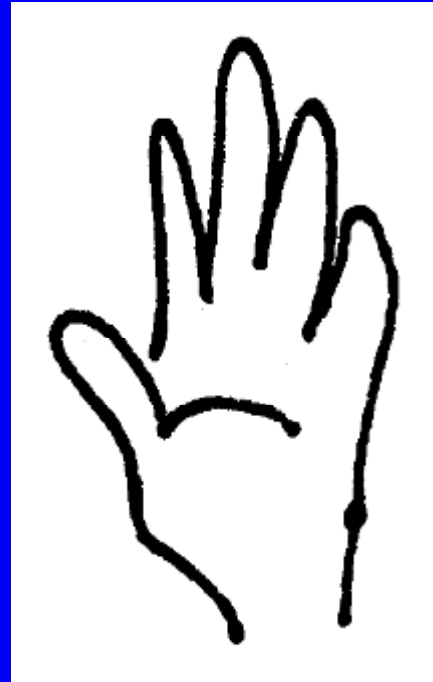
1. 熱測定・蛋白質物性との 出会い

(東大・物理学教室
大学院～助手)
1982～1990年

「蛋白質」と「手のひら」と「地球」の 関係



1 nm



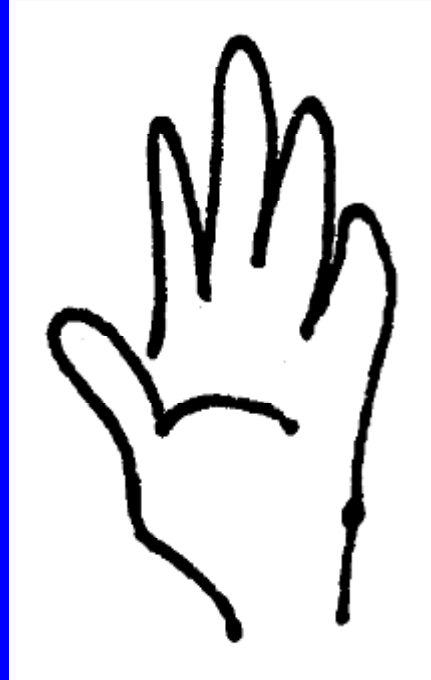
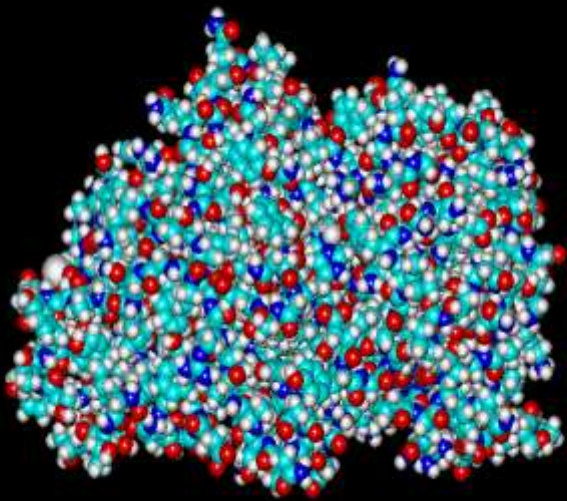
10 cm



10,000 km

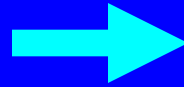
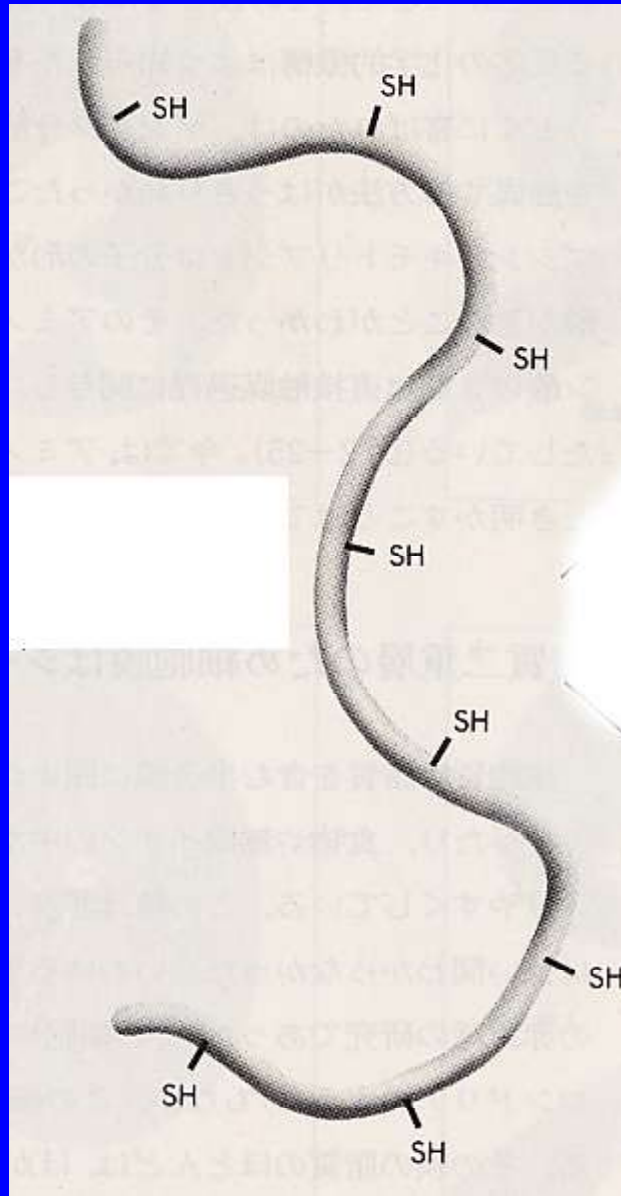
→ 大きさが1億倍ずつ異なる

「蛋白質」と「手のひら」と「地球」の 関係

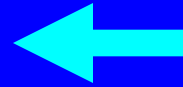
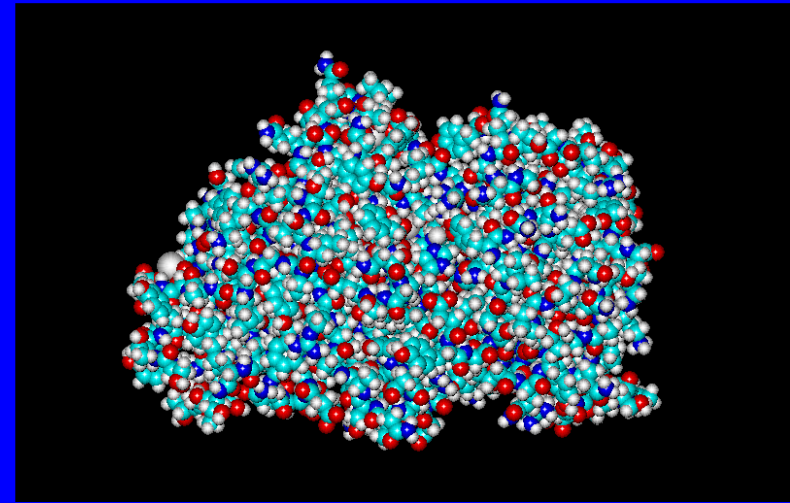


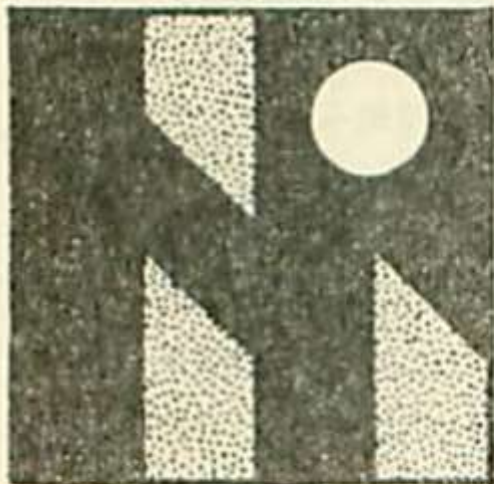
→ 蛋白質は1分子を扱うことができる手のひらである。

自動的に折れたたむ魔法の “ひも”



自動的に折れたたむ魔法の “ひも”





生体高分子計測における データ処理の自動化

城所俊一・猿渡 茂・陶山 明・和田昭允

Shun-ichi Kidokoro · Shigeru Endo · Akira Suyama · Akiyoshi Wada
東京大学理学部



城所俊一 東京大学理学部物理学教室 (113 東京都文京区本郷 7-3-1)
理学系研究科博士課程在学 (写真前列左)

陶山 明 同上, 助手・理博 (写真後列左)

昭和 52 年東大理学部卒, 57 年東大大学院理学系研究科博士課程修了。
58 年より現職。

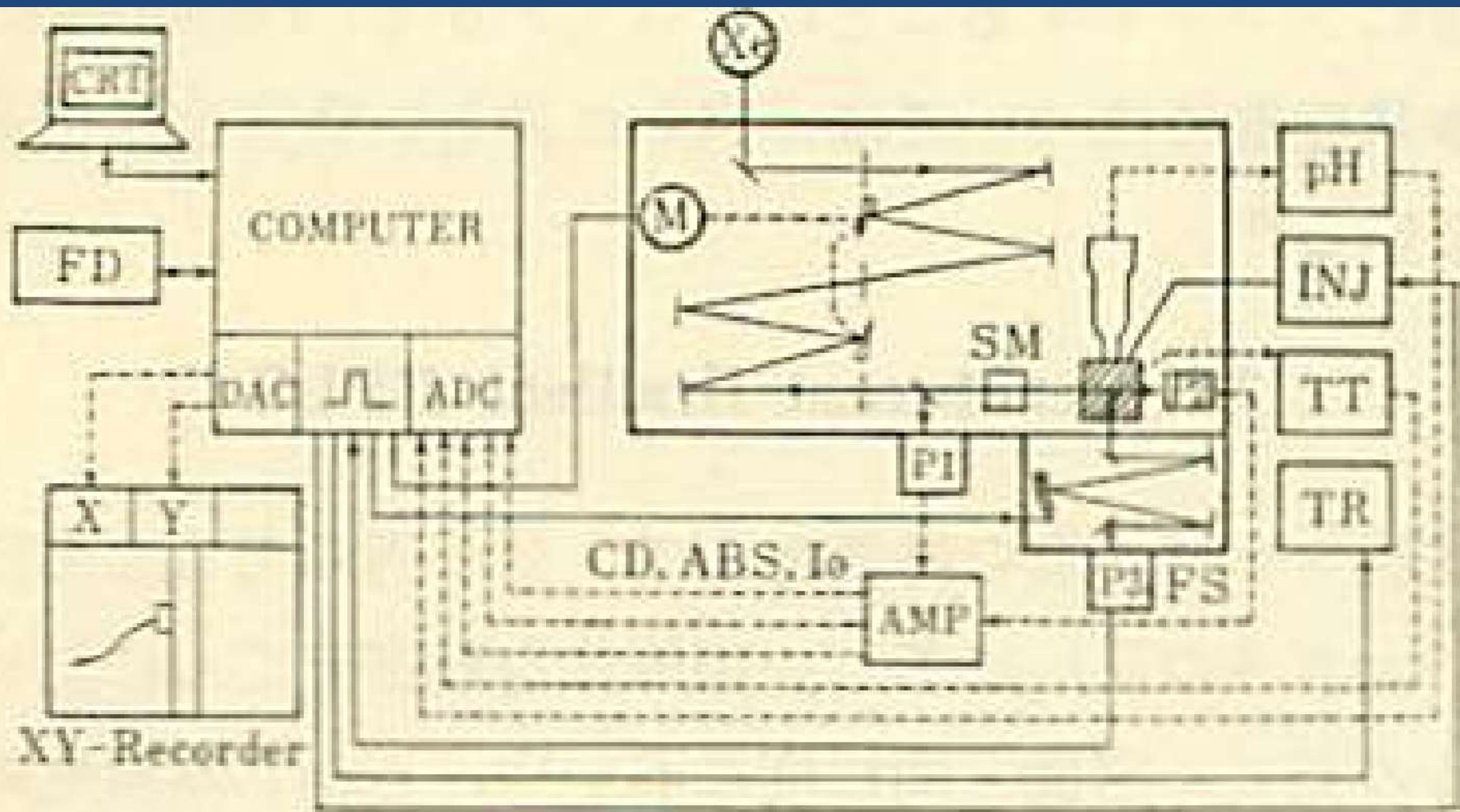
和田昭允 同上, 教授・理博 (写真前列右)

昭和 27 年東大理学部卒, 27 年東大理学部助手, 29 年ハーバード大研
究員, 31 年お茶の水大理学部講師, 助教授, 36 年東大理学部助教授,
46 年より現職。

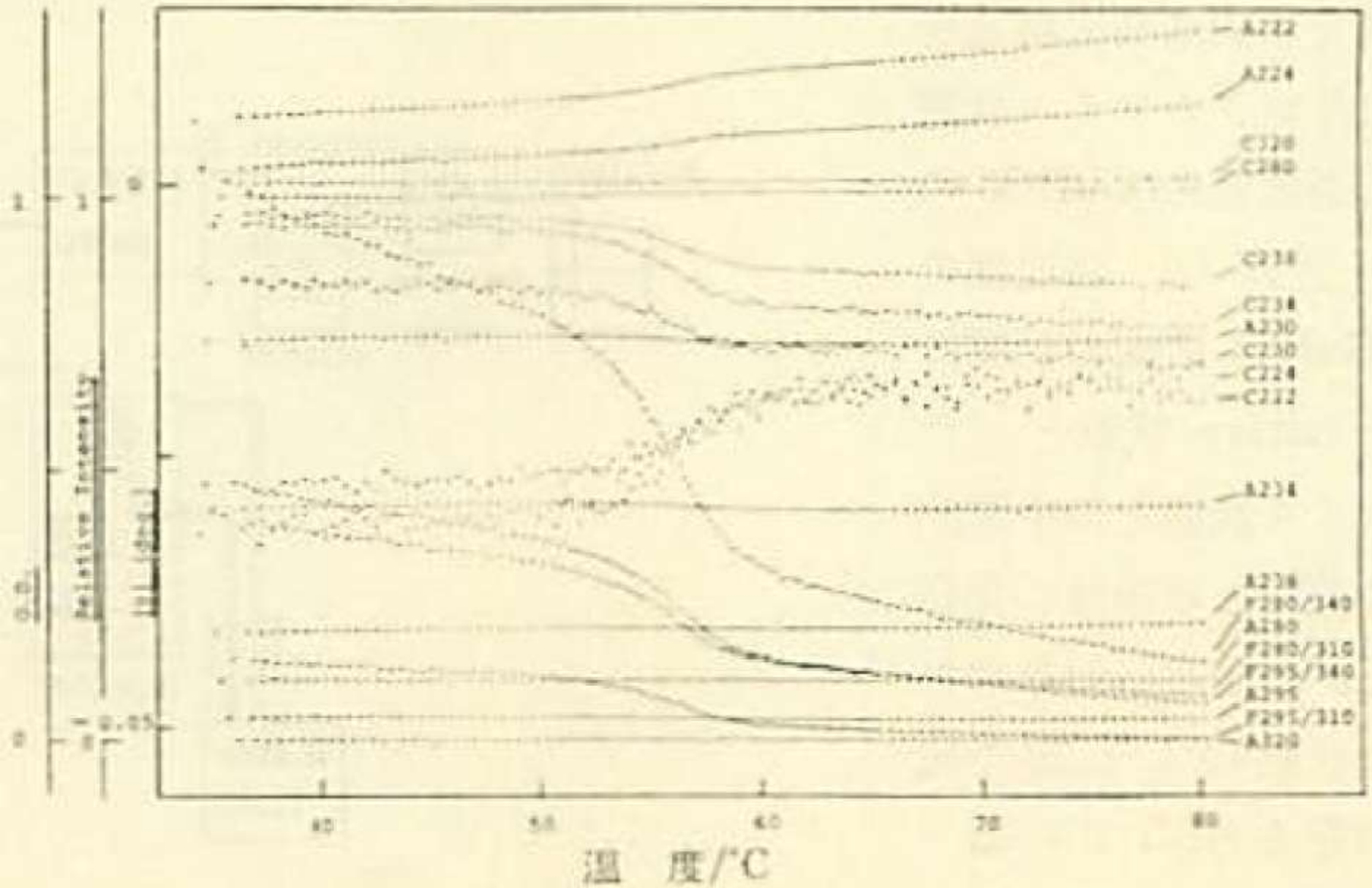
猿渡 茂 日本電子(株)生体計測学研究室 (196 昭島市中神町 1418)
理博 (写真後列右)

昭和 54 年東大理学部卒, 59 年東大大学院理学系研究科博士課程修了。
59 年日本学術振興会奨励研究員を経て日本電子(株)入社。

人生最初の総説執筆 [城所ほか、高分子 34, 966 (1985)]



多次元分光同時測定装置の構成図(城所、高分子1985より)



多次元分光同時測定法によるpepsinogenの熱変性の測定例
(城所、高分子1985より)

「熱測定」とは？

日本熱測定学会・会則より

The Japan Society of Calorimetry
and Thermal Analysis



日本熱測定学会ロゴ

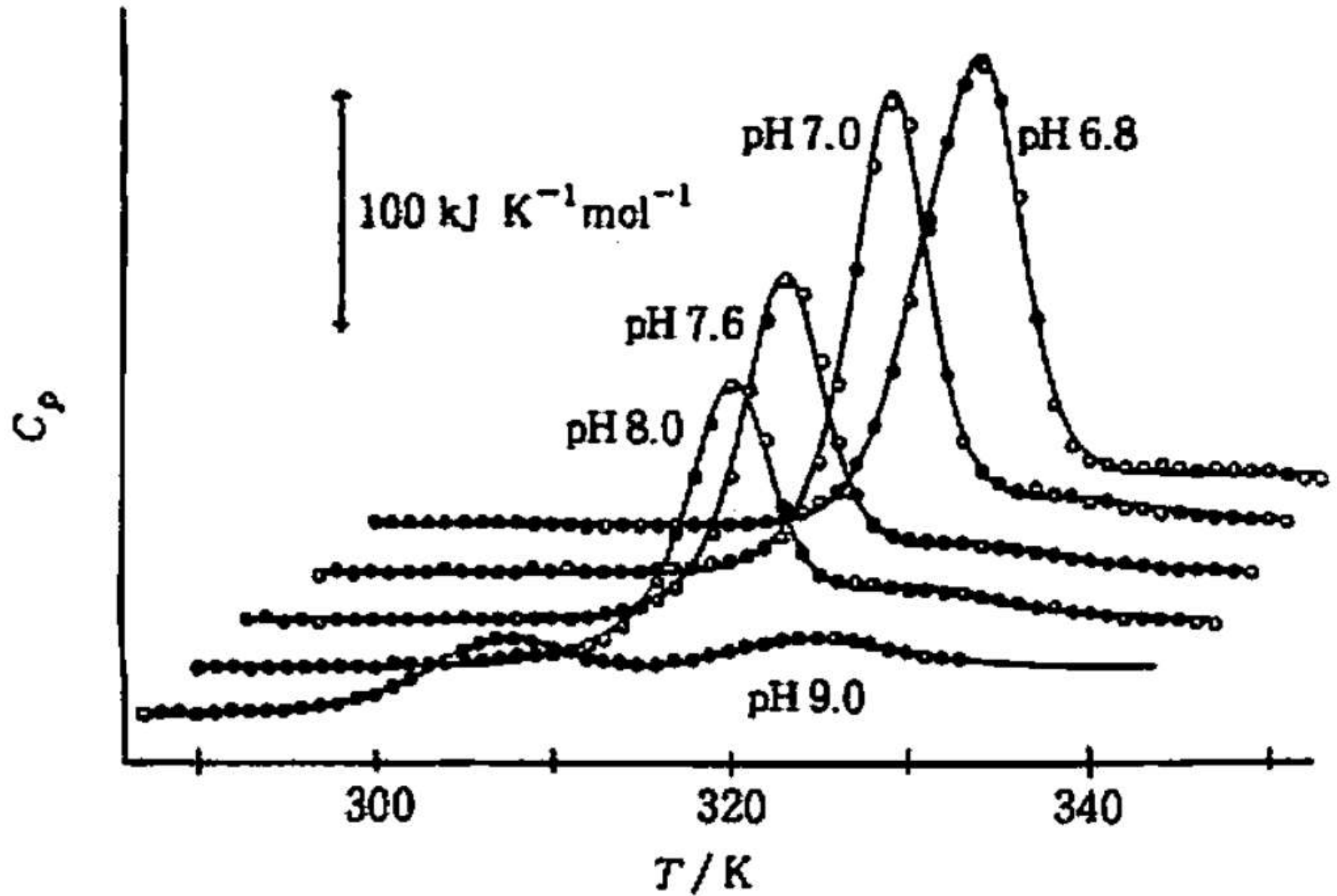
熱測定（熱量測定・熱分析・その他の熱力学
諸量と熱物性値測定）



高精度示差走査熱量計DASM-1M(1985-1990,
工業技術院・繊維高分子材料研究所)



人生最初のDSC測定チャート (pepsinogen, pH 8.3,
1985年1月24日、工技院・織高研 DASM-1M)



Pepsinogen(pH6.8~9.0)の可逆的熱変性の4状態解析
(S. Kidokoro, *Netsu Sokutei* 14, 143 (1987)より)

2. 産業用酵素の機能研究への 挑戦

[(財)相模中央化学研究所]

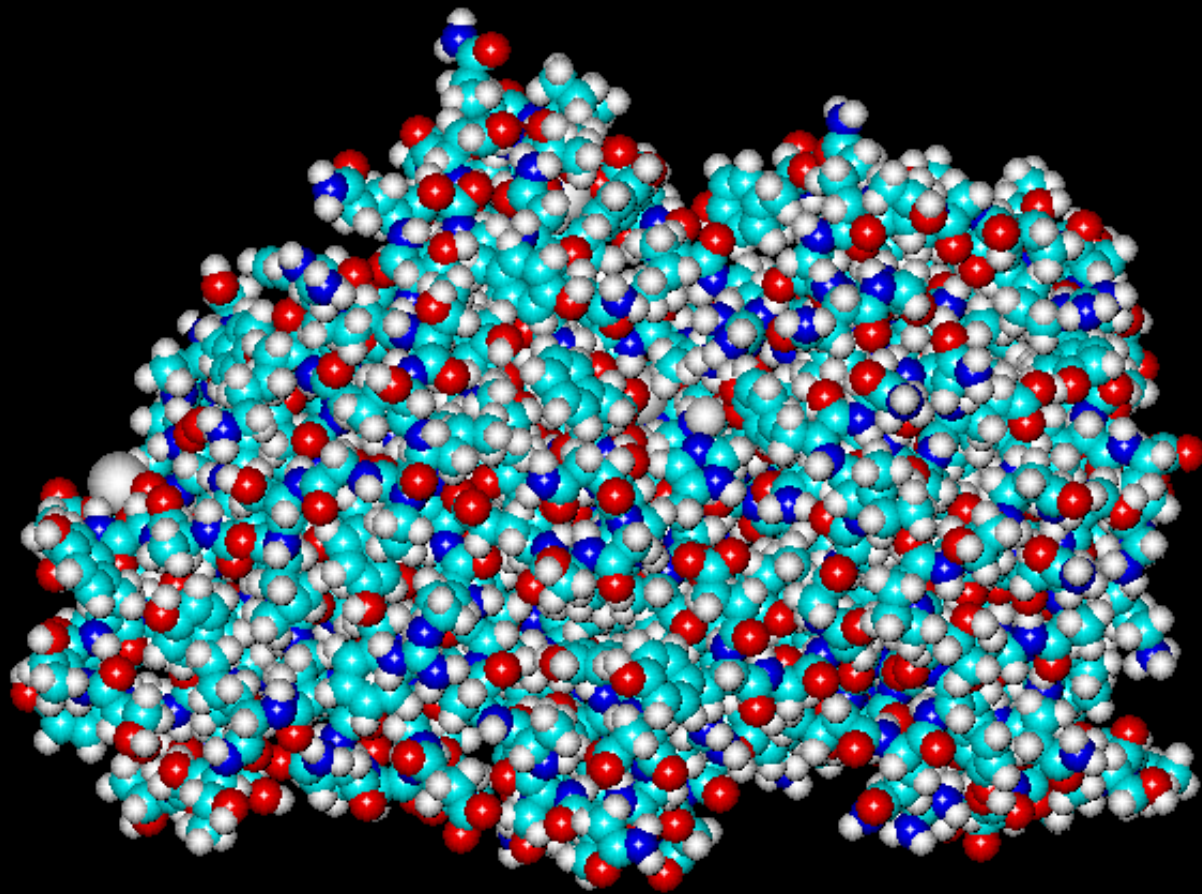
1990～1998年

自分の研究室を持つ

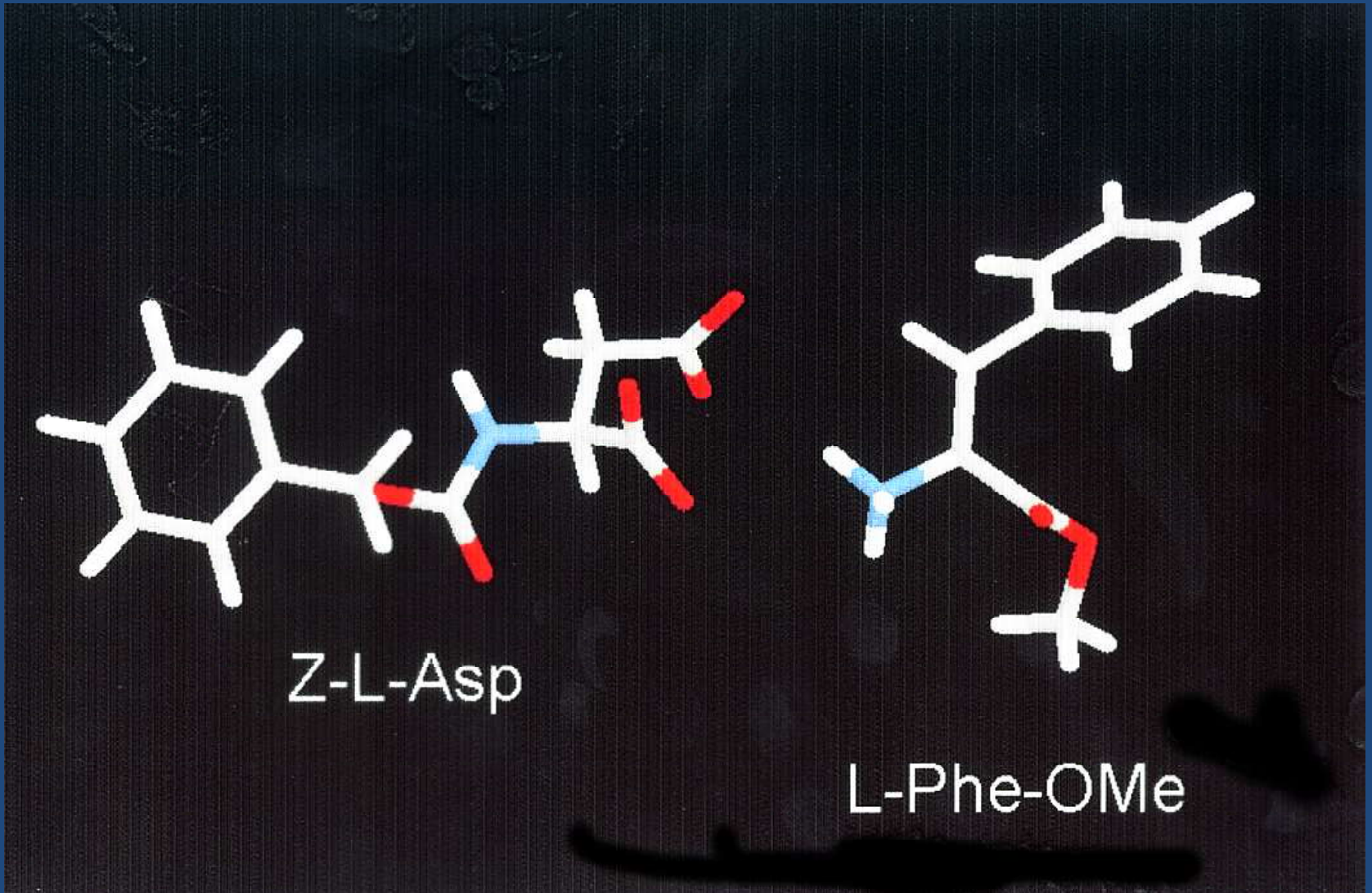
酵素機能研究との出会い

「物理的摂動法」による分子設計

蛋白質分解酵素サーモライシン



人工甘味料アスパルテームの原料



アスパルテーム前駆体

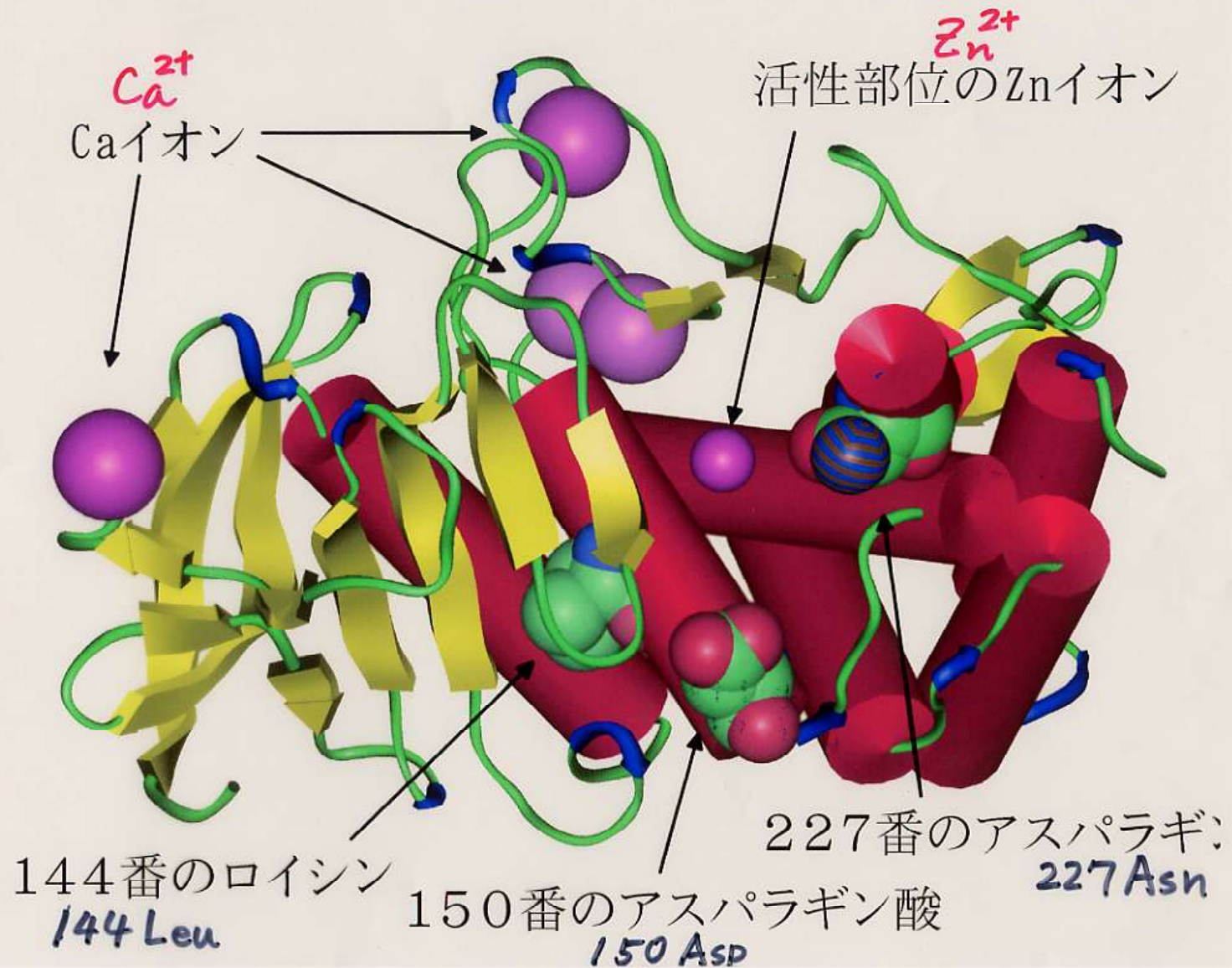


DESIGN OF PROTEIN FUNCTION BY PHYSICAL PERTURBATION METHOD

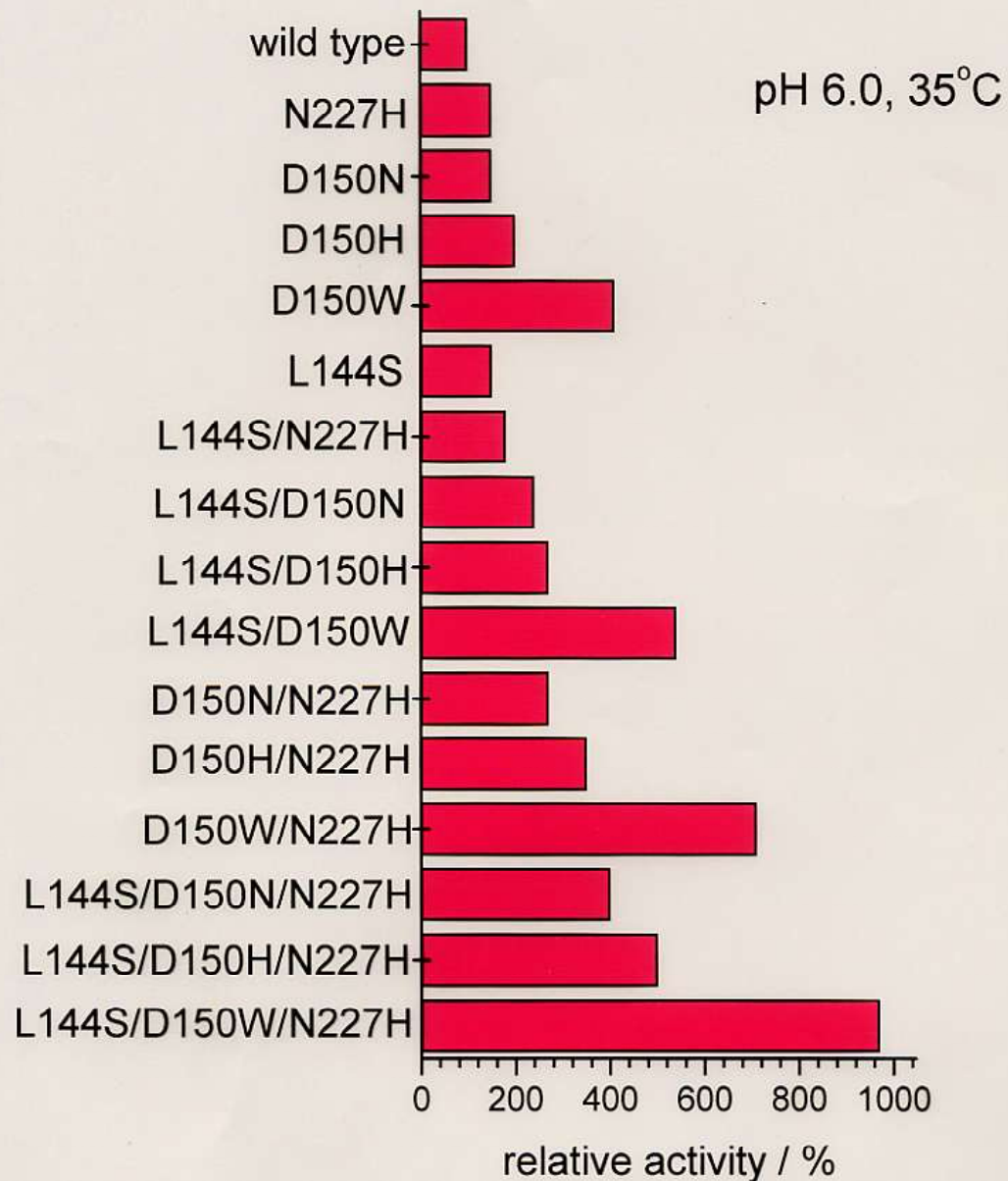
SHUN-ICHI KIDOKORO

*Sagami Chemical Research Center, Sagamihara,
Kanagawa 229-0012, Japan*

サーモライシンの高活性化



Catalytic Activity of Thermolysin Mutants for Z-Asp-Phe-OMe Synthesis



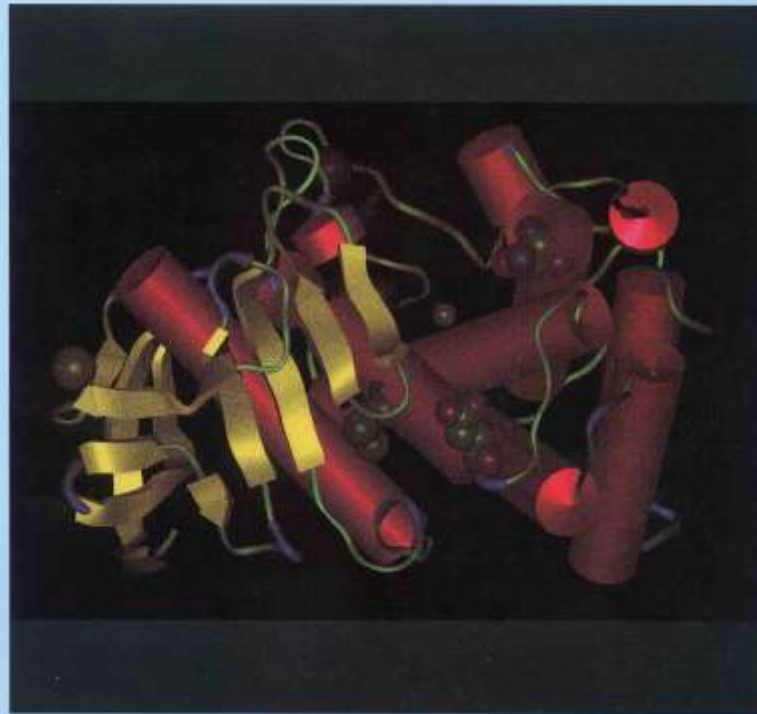
シリーズ・ニューバイオフィジックスⅡ — 9

生体ナノマシンの分子設計

担当編集委員
城所俊一

日本生物物理学会

シリーズ・ニューバイオフィジックス刊行委員会 編



共立出版株式会社

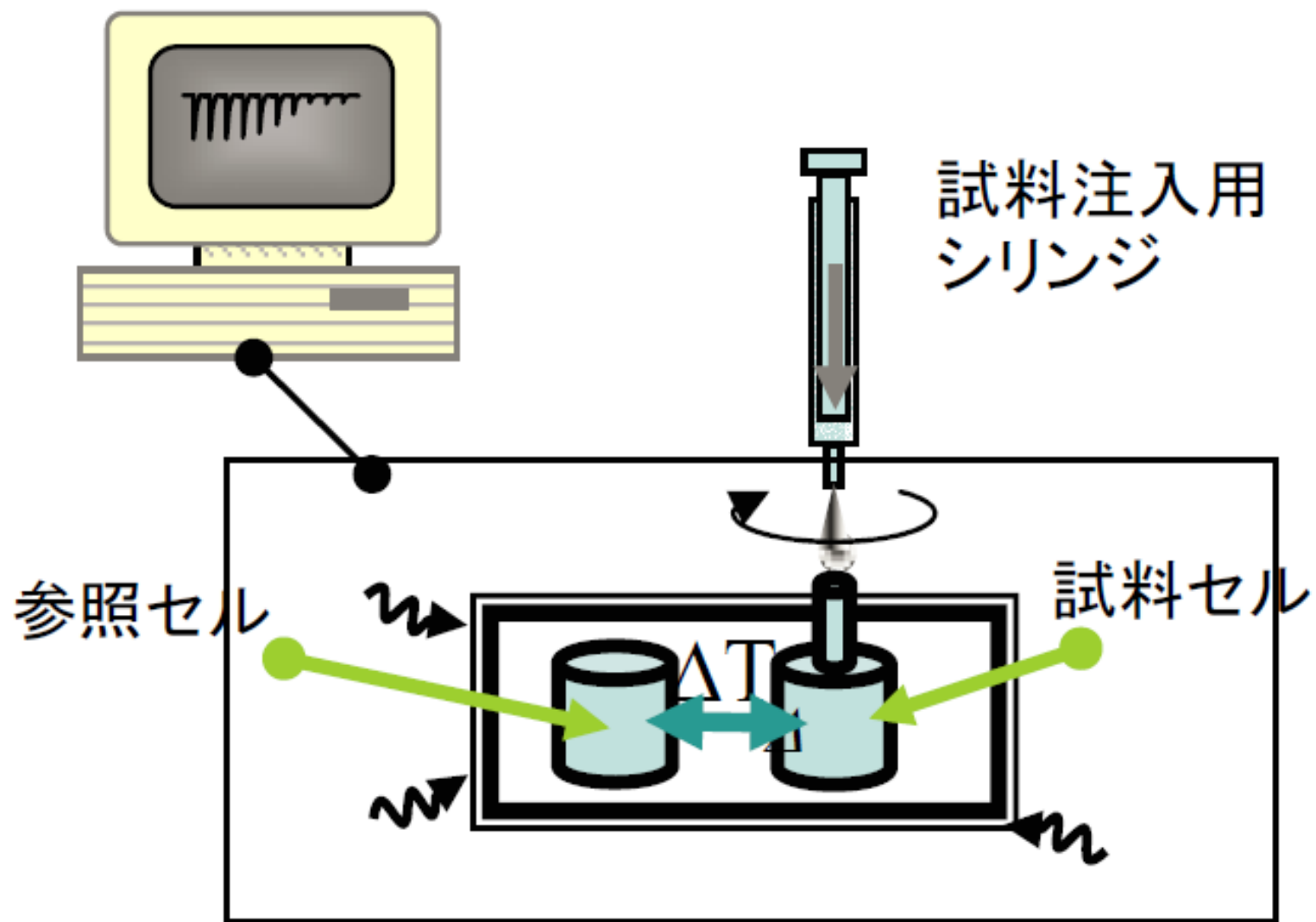
蛋白質工学の教科書:「物理的摂動法」を紹介



高精度示差走査熱量計MicroCal MC-2
(1990-1992, 相模中央化学研究所)

等温滴定型熱量計(MCS-ITC)と示差走査型熱量計(MCS-DSC)(1992-2016, 相模中研-長岡技大)





等温滴定型熱量計 (ITC)

3. 熱測定で蛋白質物性を楽しむ (長岡技術科学大学・ 生物系～物質生物系) (1999～2024年)

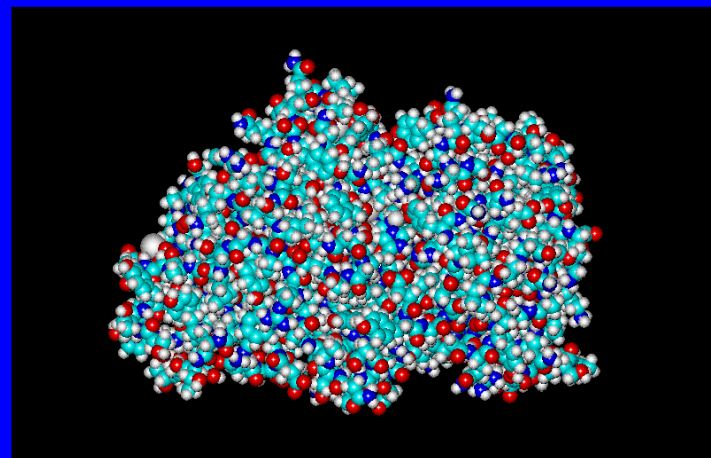
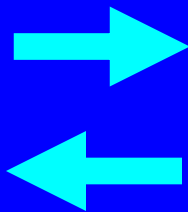
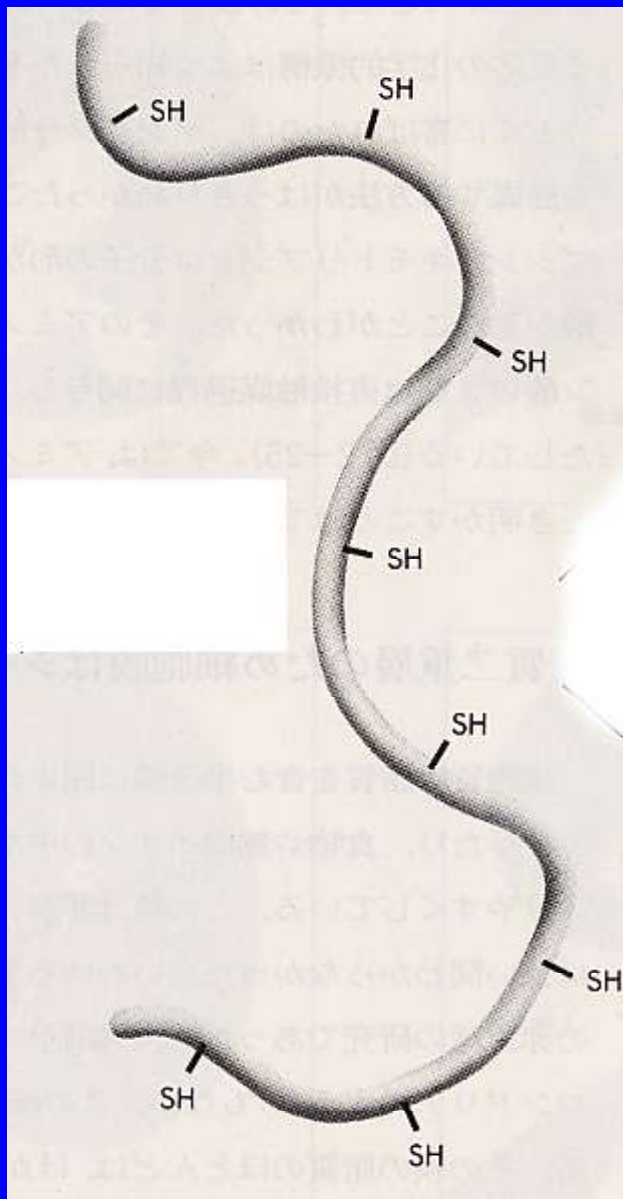
- (1) 変性状態の可逆的会合体(RO)の研究
- (2) 高安定・高結合性を持つ低温ショック
蛋白質の創製
- (3) 産業用酵素の産物阻害効果の研究



高精度示差走査熱量計VP-DSC
(長岡技大1999-2024)

3. 1 変性状態の可逆的 会合体(RO)の研究

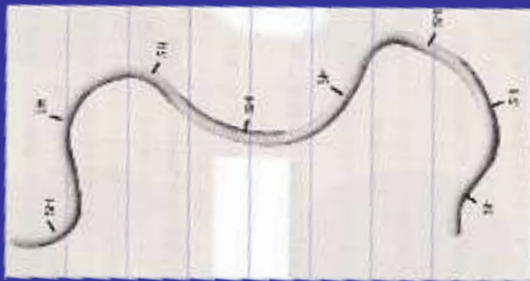
自動的に折れたたむ魔法の “ひも”



モルテングロビュール(MG)状態

- 多くの蛋白質の立体構造形成過程で、過渡的な中間体としてモルテングロビュール(MG)状態が観測される[立体構造形成中間体]
- 膜を通過する際の立体構造や、native状態で大きな立体構造揺らぎを持つ多数の蛋白質の存在などとの関連でも、MG状態の立体構造安定化機構が注目されている。
- cytochrome c のは、酸性pH, 高塩濃度で平衡論的MG状態が安定に存在する

変性状態



MG状態



native





3D structure of native cytochrome c

Isothermal acid-titration calorimetry for evaluating the pH dependence of protein stability

Shigeyoshi Nakamura^a, Shun-ichi Kidokoro^{a,b,c,*}

^a*Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomioka, Nagaoka 940-2188, Japan*

^b*Precision and Intelligence Laboratory, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Midori-Ku, Yokohama 226-8501, Japan*

^c*Genome Science Center, Riken, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan*

Received 2 October 2003; received in revised form 19 November 2003; accepted 20 November 2003

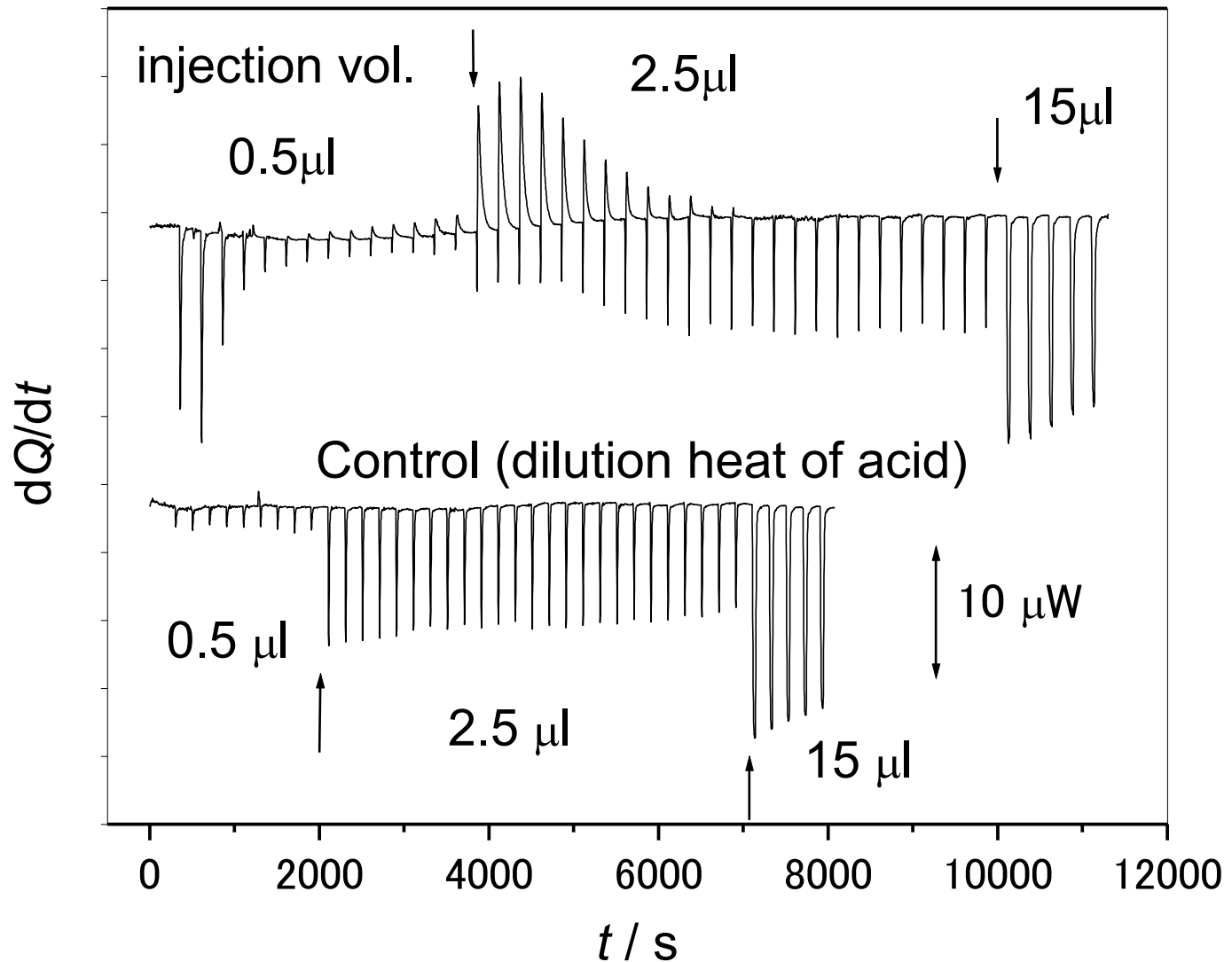
等温酸滴定熱量測定(IATC)法の開発(*Biophys. Chem.*, 2004)
蛋白質のエンタルピーのpH依存性の直接測定が可能！

Raw data of sample and control titration

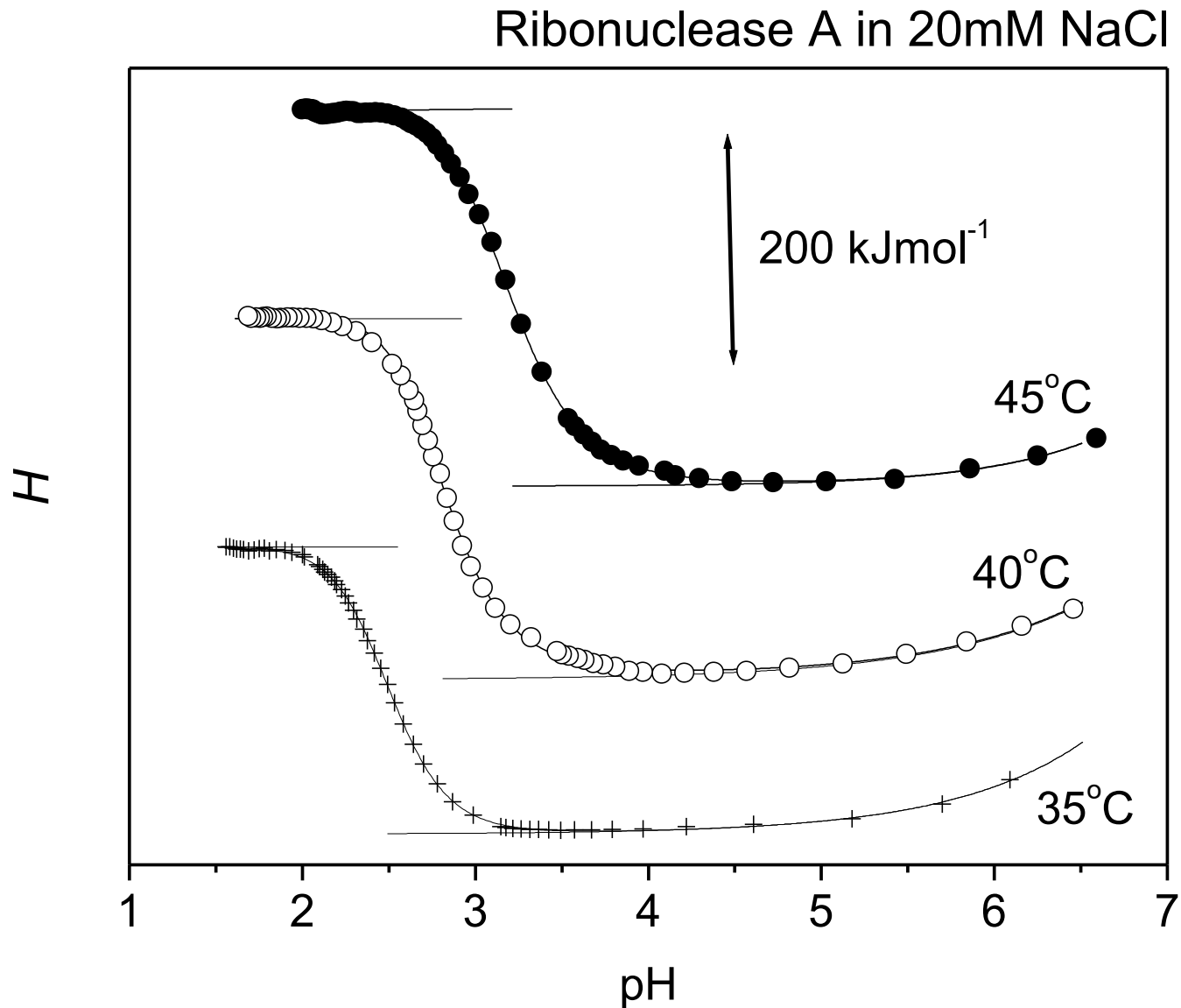
protein: 0.5mg/ml RNase A in 20mM NaCl

acid: 200mM HCl in 20mM NaCl

at 40 °C

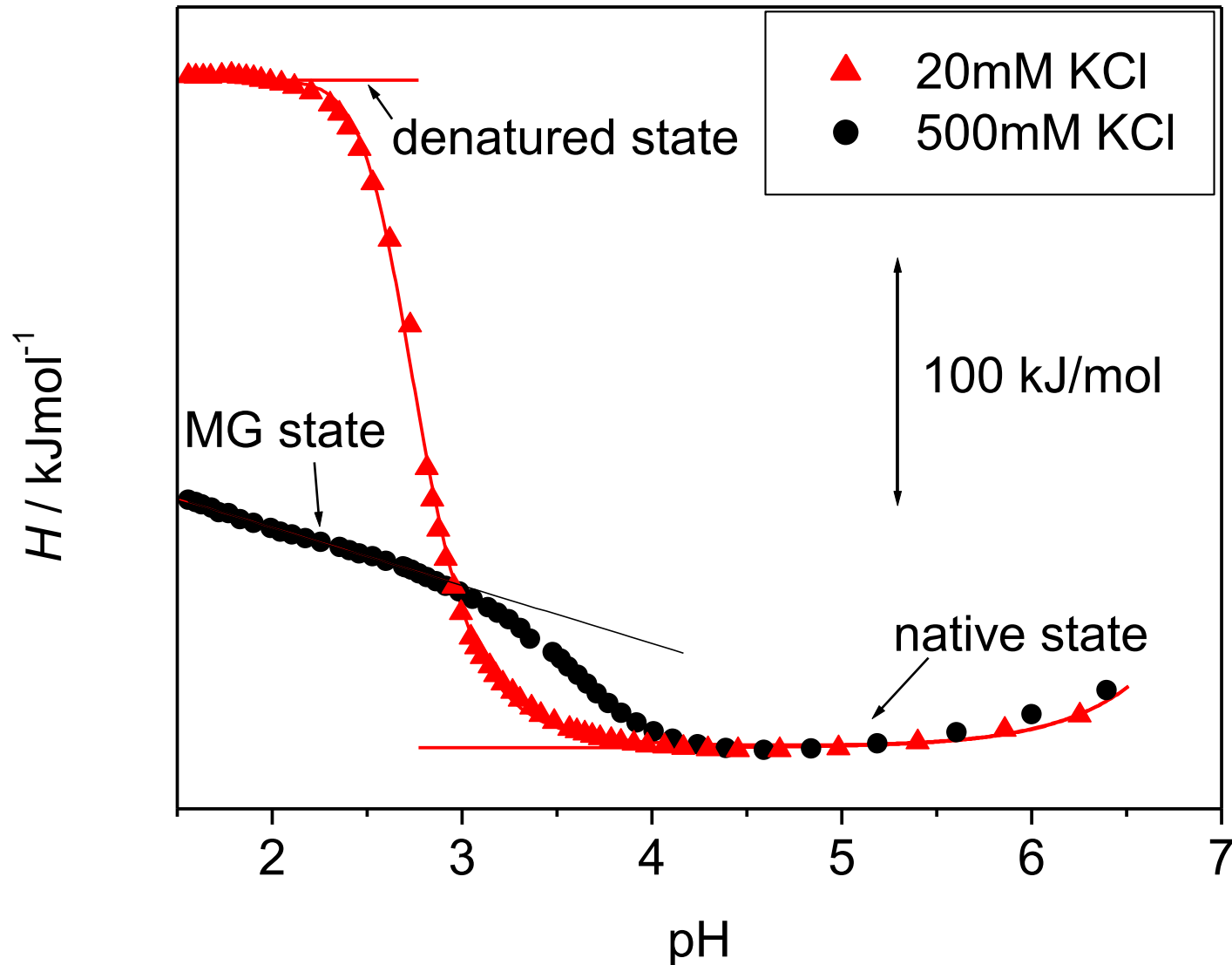


pH transition at several temperatures

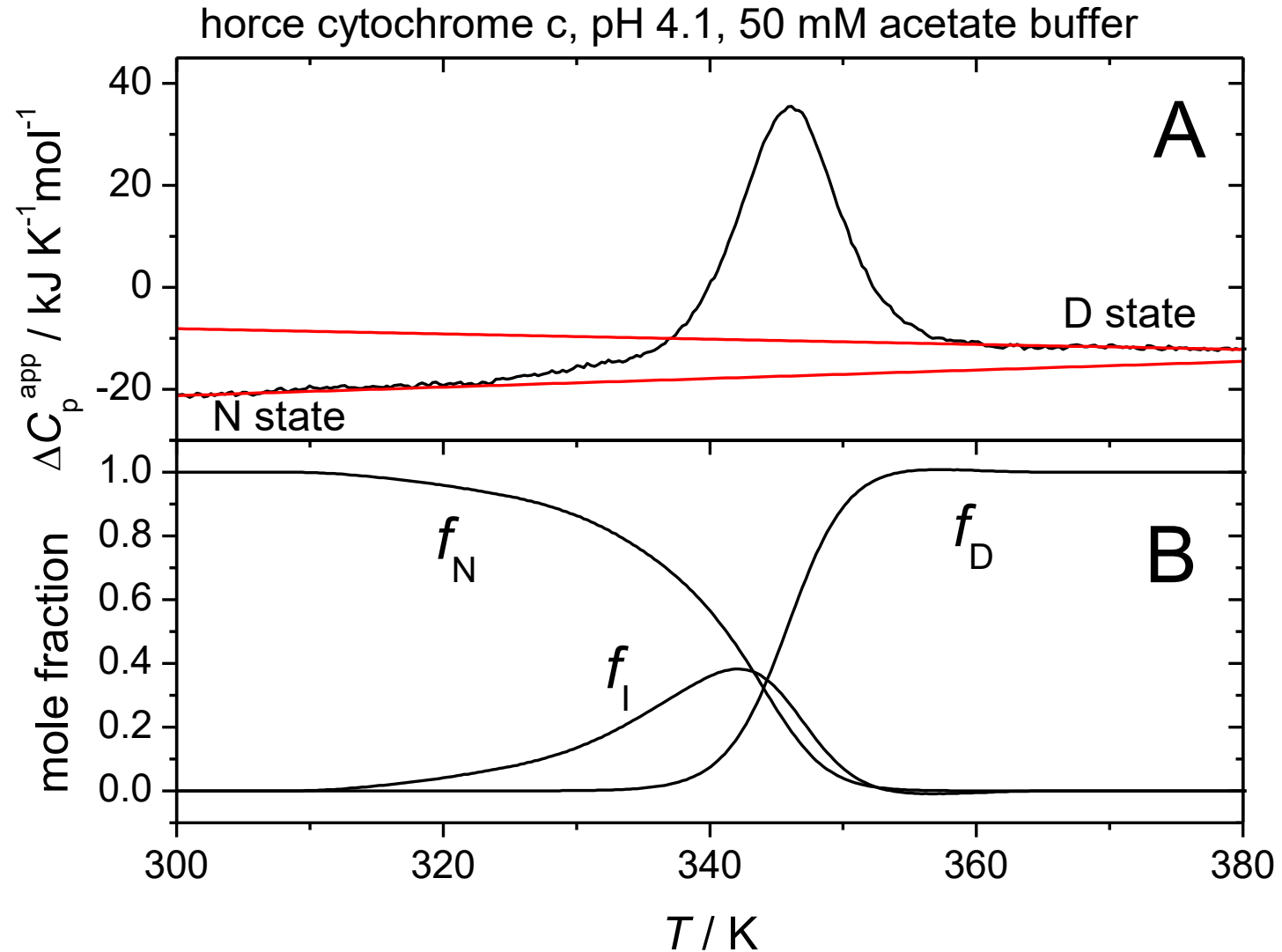


等温酸滴定熱量測定(IATC)で測定した シトクロム *c* の N-D 転移と N-MG 転移

cytochrome *c* at 40 °C

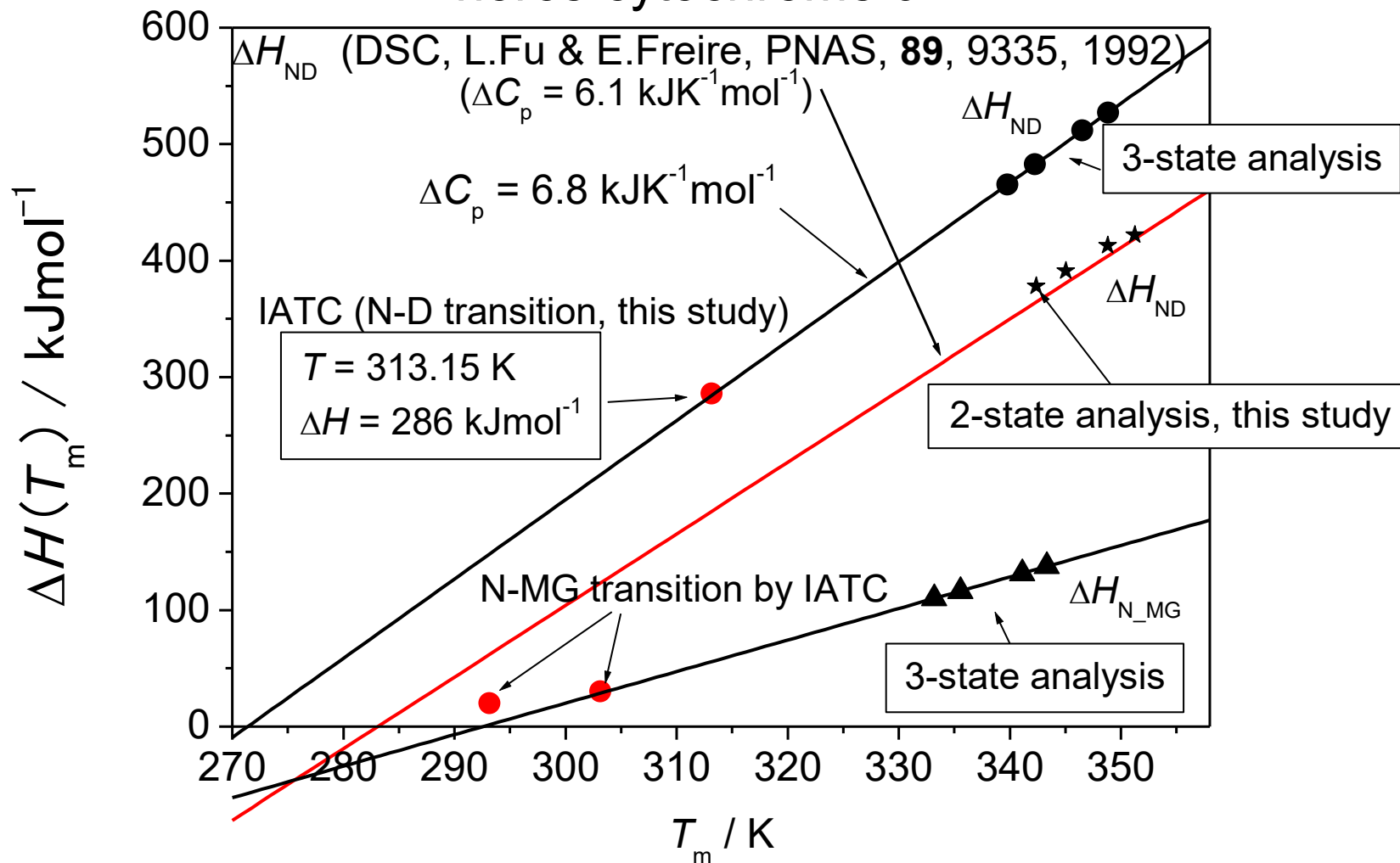


シトクロム *c* の N-D 転移の DSC と double deconvolution 解析

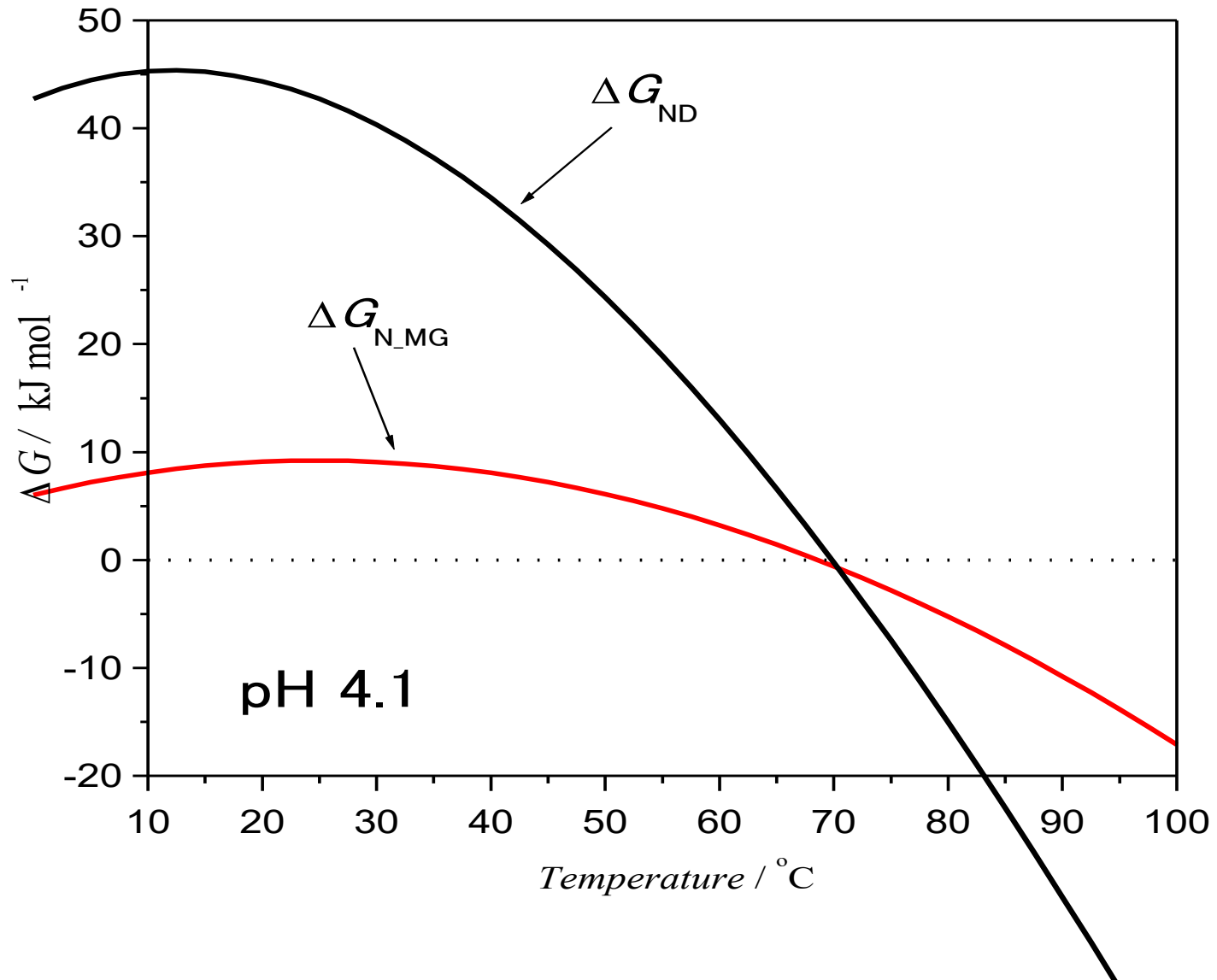


IATCとDSC(3状態解析)の結果 は良く一致する

horse cytochrome c



Gibbs 自由エネルギー変化の温度依存性



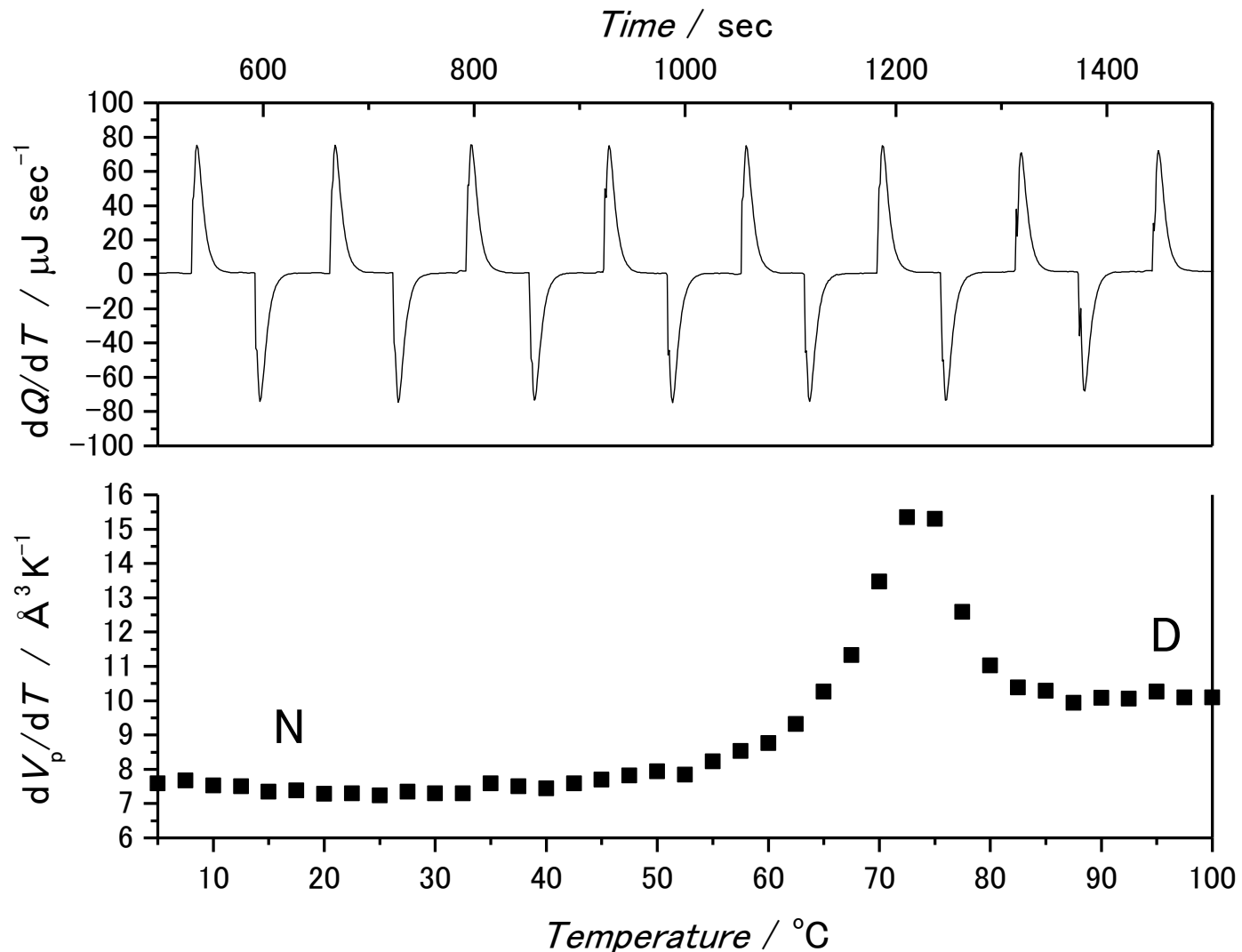
圧力摂動法熱量測定ユニット (MicroCal VP-DSC with PPC)



Pressure Perturbation Calorimetry (PPC) of cytochrome c at pH 4.1

$\Delta p = 0.5$ M Pa, VP-DSC (Micro Cal) with PPC unit

$$\left(\frac{\partial Q}{\partial P}\right)_T$$



圧力摂動熱量測定

$$\left(\frac{d'Q}{dP}\right)_T = -T \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P$$

$$\alpha = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P$$

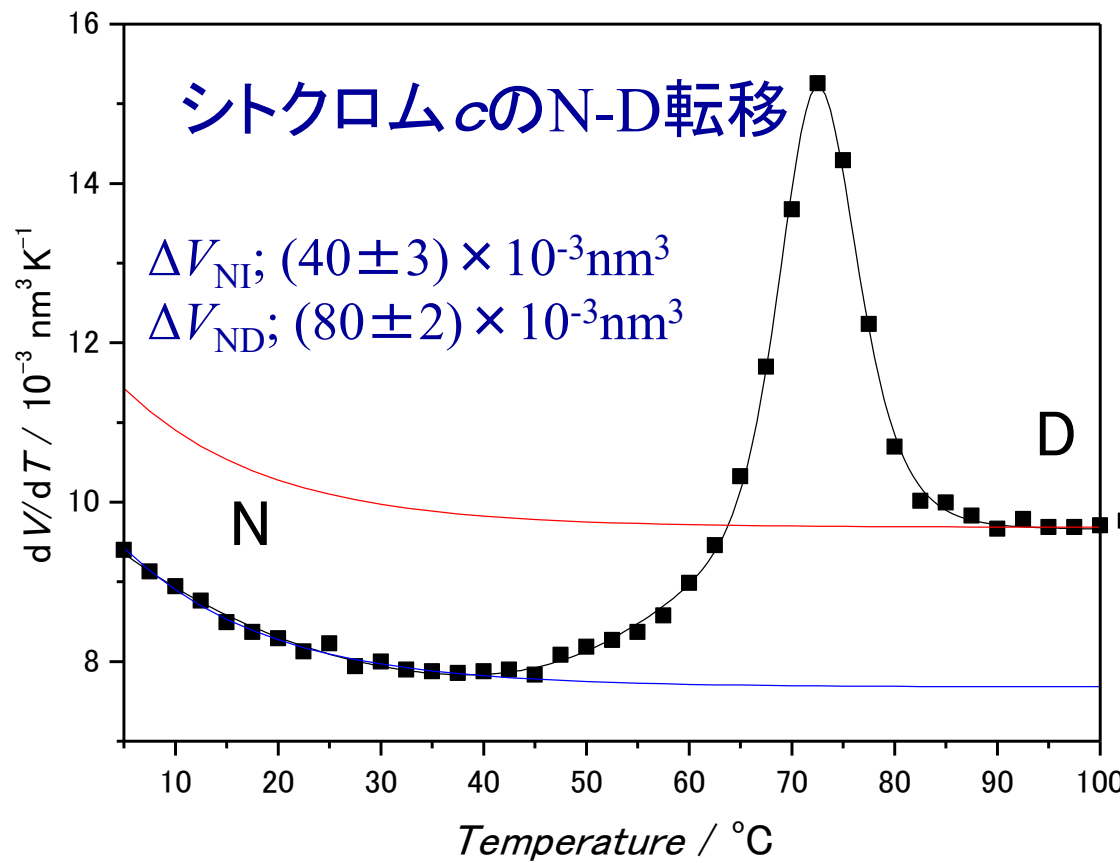
多状態解析

$$V_p(T) = \sum V_{p,i}(T) f_i(T)$$

$$\left(\frac{\partial V_p}{\partial T}\right)_P = \sum_i \left(\frac{\partial V_{p,i}}{\partial T}\right)_P f_i + \frac{\sum_{i \neq j} \Delta V_{ij}(T) \Delta H_{ij}(T) f_j(T) f_i(T)}{RT^2}$$

各状態のベースライン; 指数関数近似

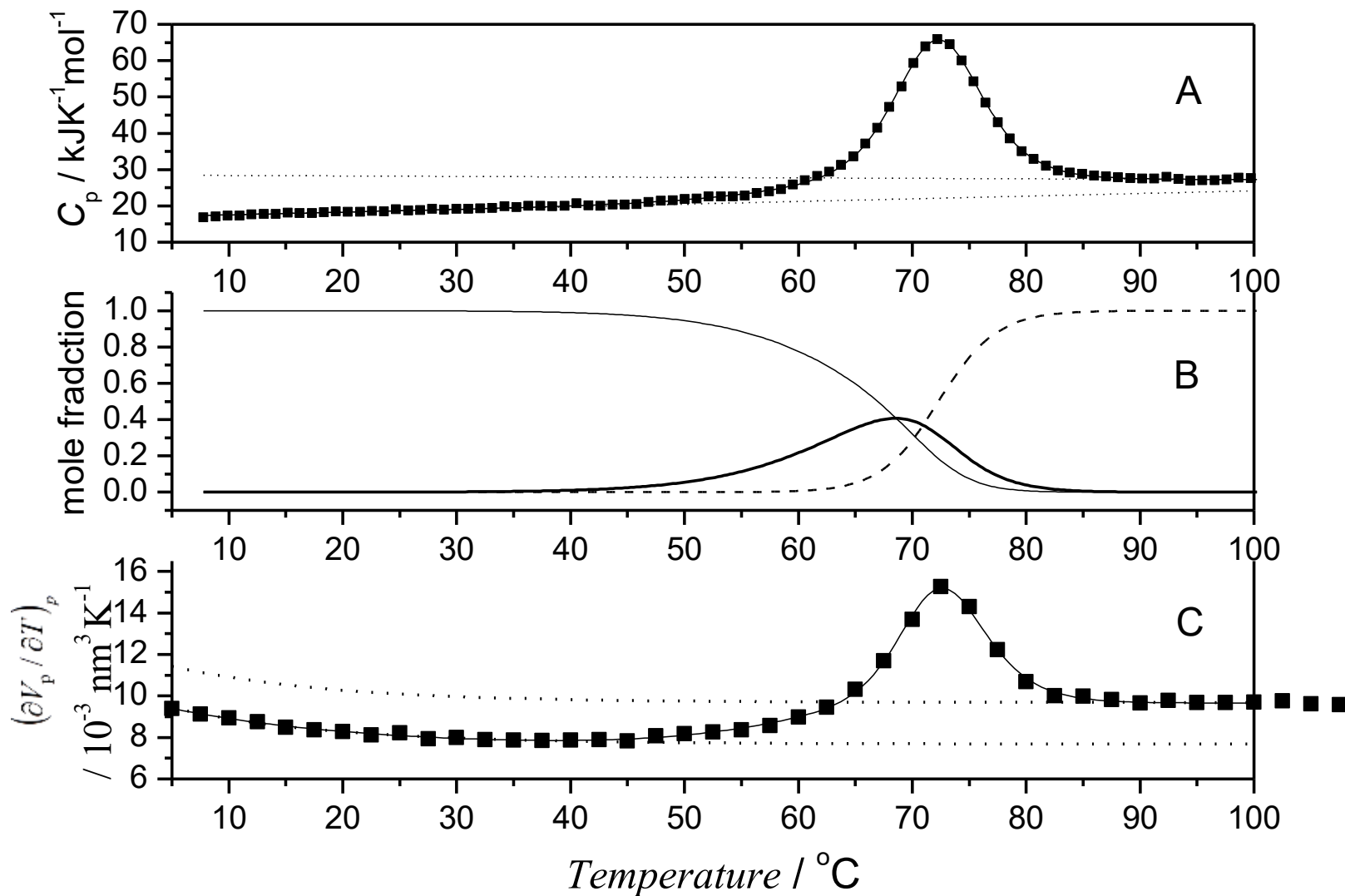
$$\left(\frac{dV_{p,i}}{dT}\right)_P = b_{1,i} \left[\exp \left\{ -b_{2,i} (T - T_0) \right\} - 1 \right] + b_{3,i}$$



☆DSCにより決定した熱力学パラメータを使用し、 ΔV を精度よく評価可能

(2) N-to-D transition of cytochrome c

protein: 15 mg/ml cytochrome c at pH 4.1

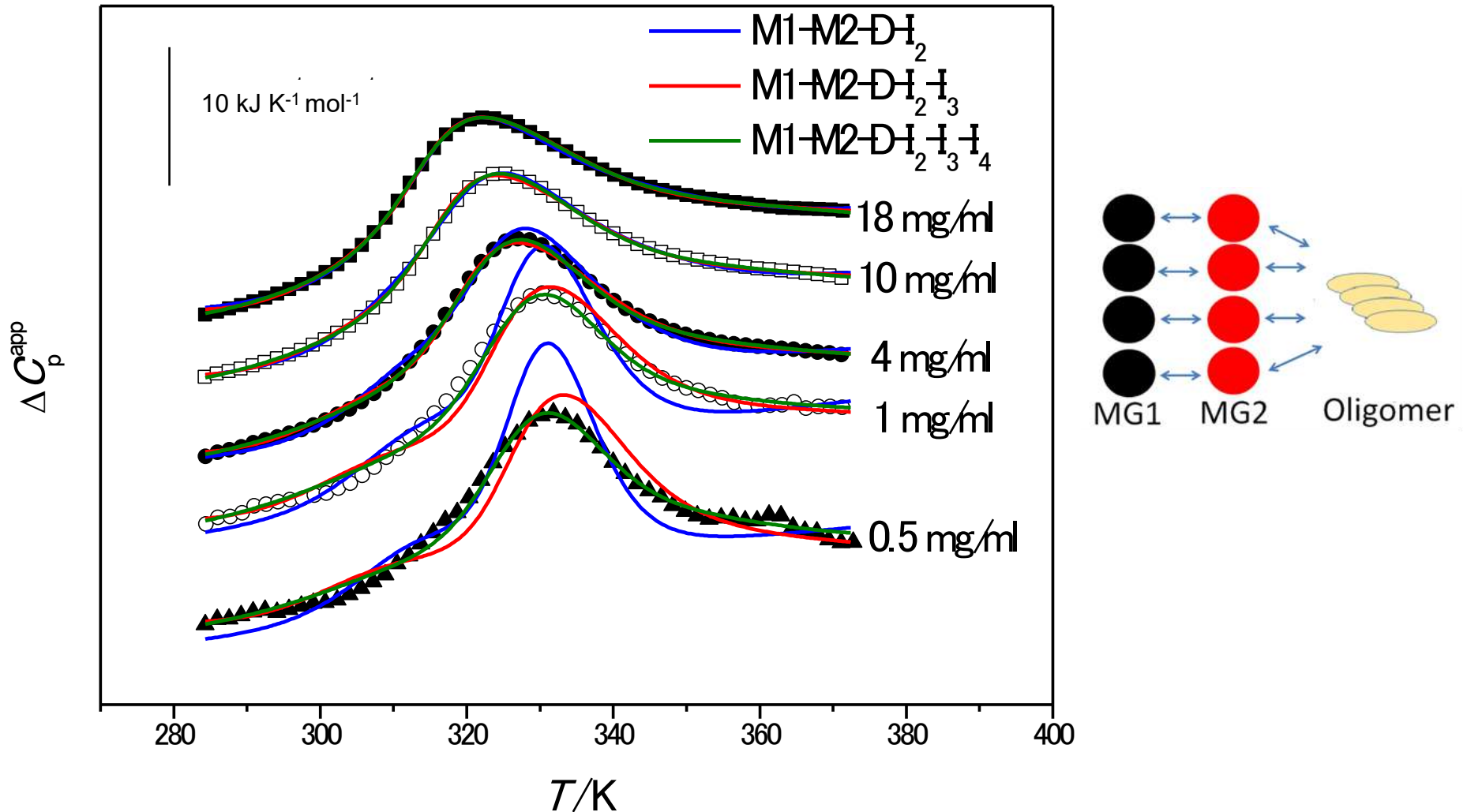


熱測定で観測した
変性蛋白質の
迅速で可逆的なオリゴマー形成

Thermal MG-D transition of cytochrome c

protein: 0.5~18 mg/ml cytochrome c at pH 2.5 and 500mM KCl

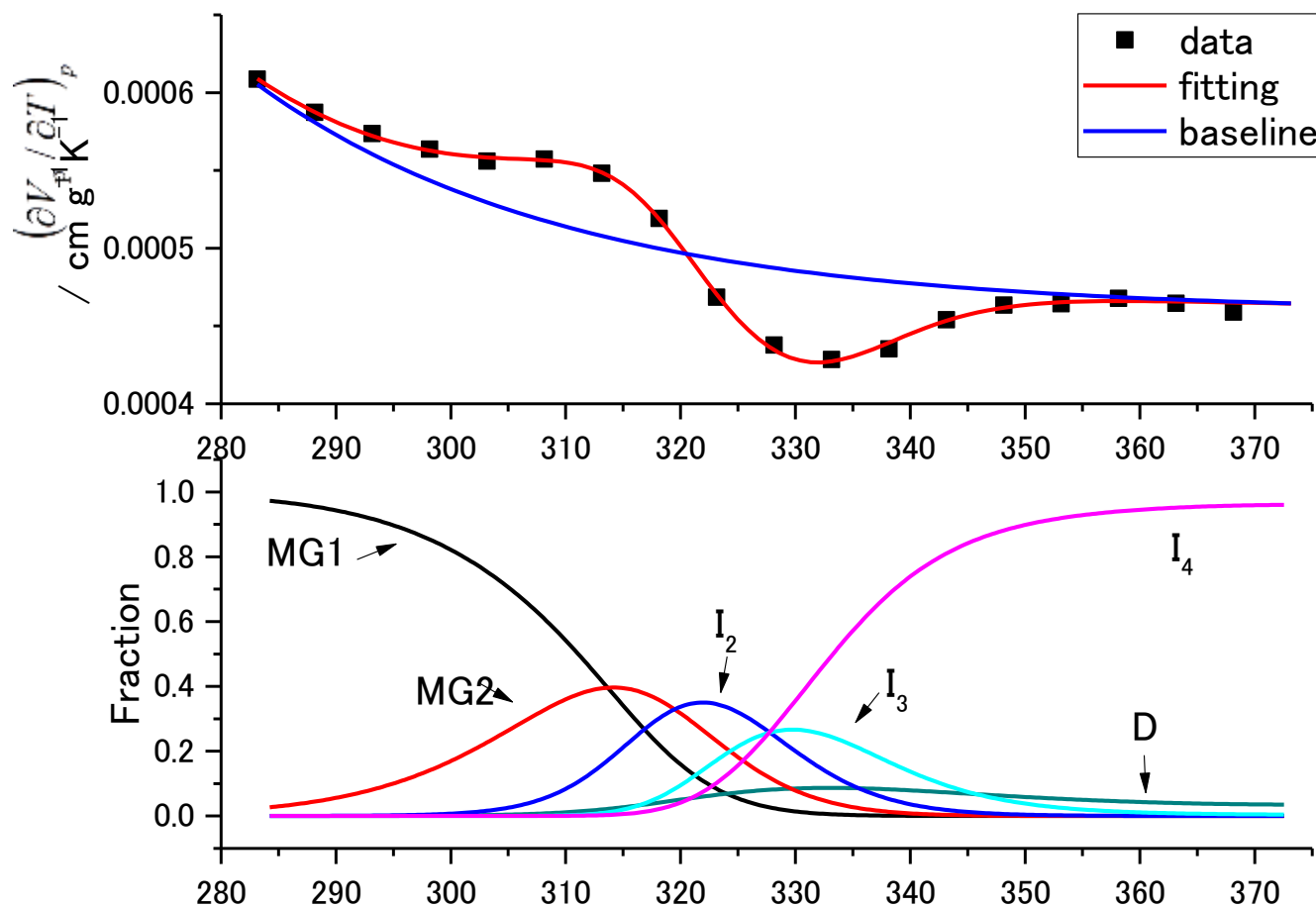
DSC data analysis considering self-dissociation/association [S. Kidokoro et al., 1988]



At least, three oligomeric intermediates other than three monomeric states, MG1, MG2, and D are necessary to explain DSC data

PPC of MG1-D transition of cytochrome c

protein: 11 mg/ml cytochrome c at pH 2.5 and 500mM KCl



Complex transition including positive and negative volume change was observed by PPC

(Biochemistry, 2016)

Unusual Reversible Oligomerization of Unfolded Dengue Envelope Protein Domain 3 at High Temperatures and Its Abolition by a Point Mutation

Tomonori Saotome,[†] Shigeyoshi Nakamura,^{‡,§} Mohammad M. Islam,^{†,@} Akiko Nakazawa,[‡]
Mariano Dellarole,^{||,#} Fumio Arisaka,¹ Shun-ichi Kidokoro,[‡] and Yutaka Kuroda^{*,†}

(Biochemistry, 2020)

Reversible Oligomerization and Reverse Hydrophobic Effect Induced by Isoleucine Tags Attached at the C-Terminus of a Simplified BPTI Variant

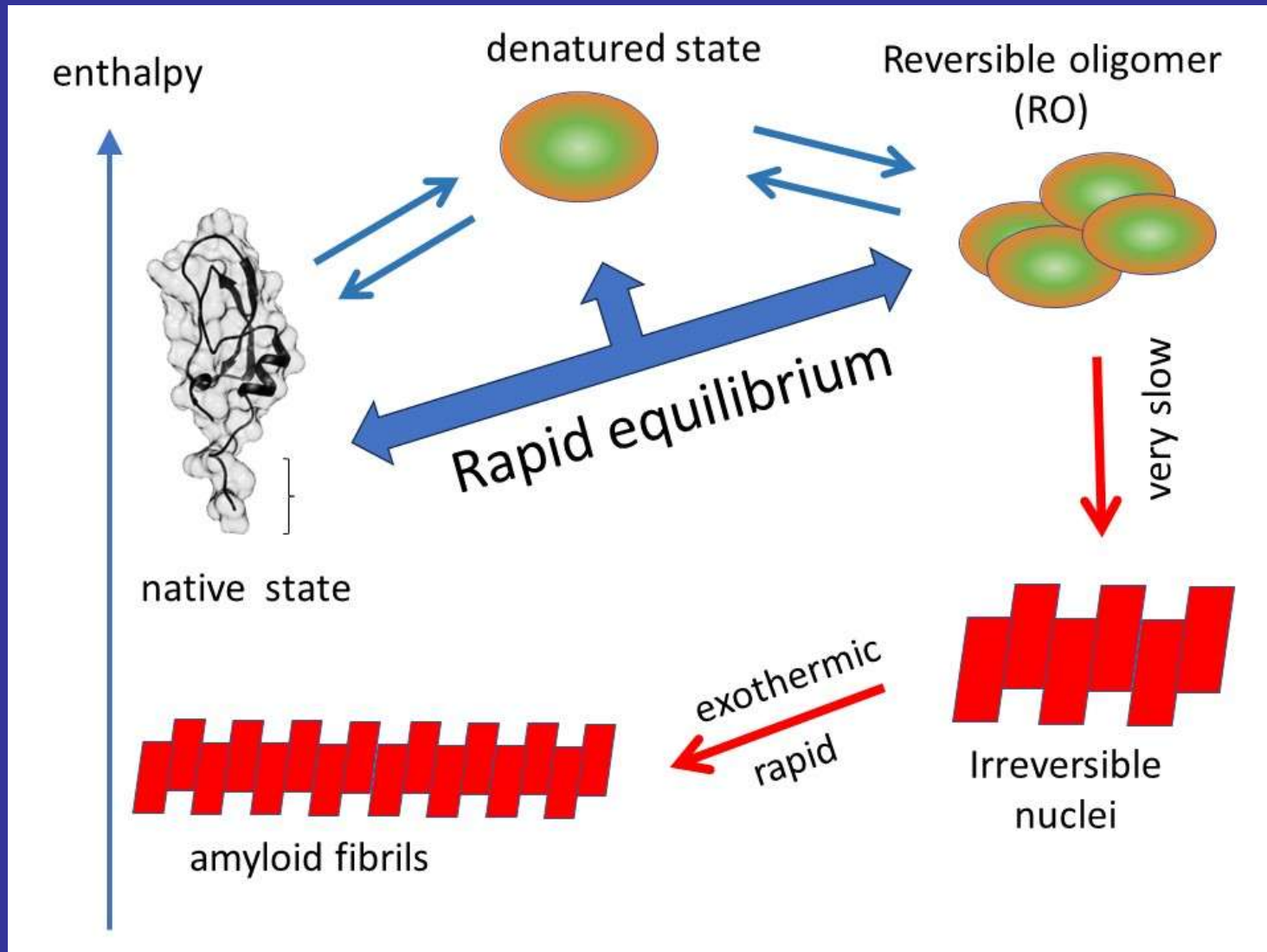
Shigeyoshi Nakamura, Md. Golam Kibria, Satoru Unzai, Yutaka Kuroda, and Shun-ichi Kidokoro^{*}

(Biophys. J, 2020)

Thermodynamic Analysis of Point Mutations Inhibiting High-Temperature Reversible Oligomerization of PDZ3

Tomonori Saotome,^{1,2} Taichi Mezaki,³ Subbaian Brindha,¹ Satoru Unzai,⁴ Jose C. Martinez,⁵ Shun-ichi Kidokoro,^{1,*} and Yutaka Kuroda^{1,*}

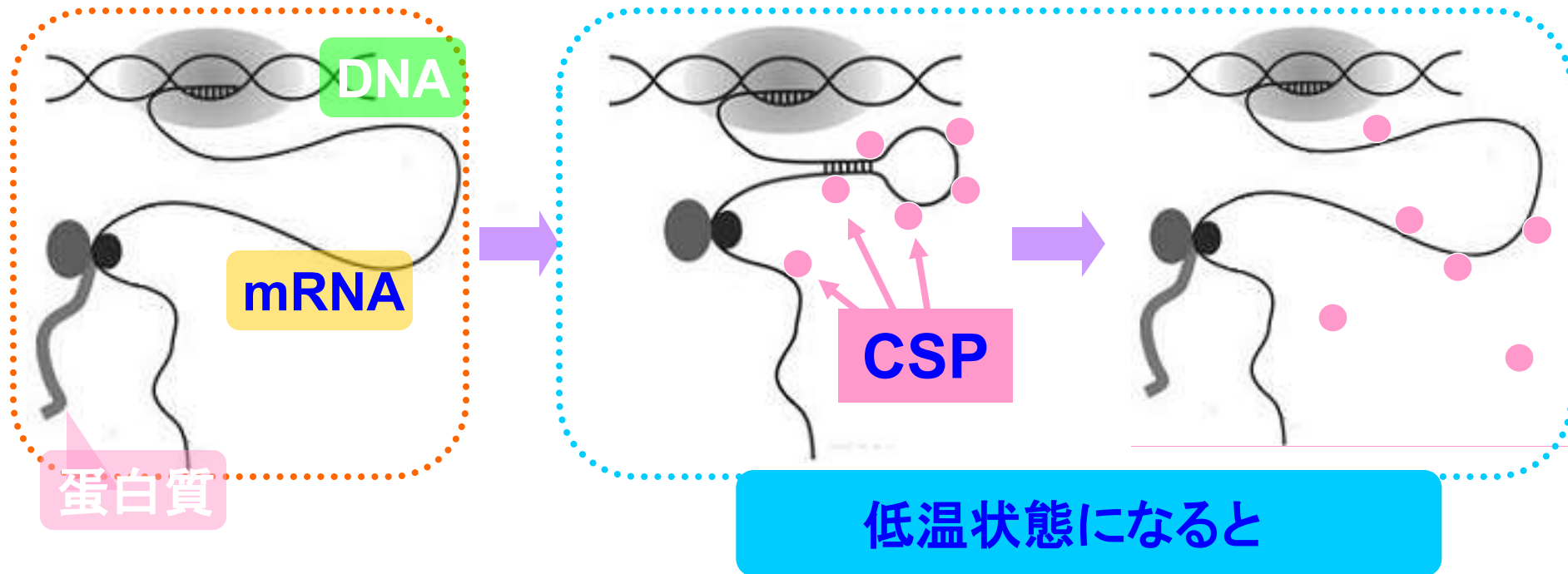
K変性状態の可逆的多量体 (RO) は アミロイド形成の前駆体か？



・3. 2 高安定で高い結合性を持つ低温ショック蛋白質の創製

低温ショック蛋白質とは？

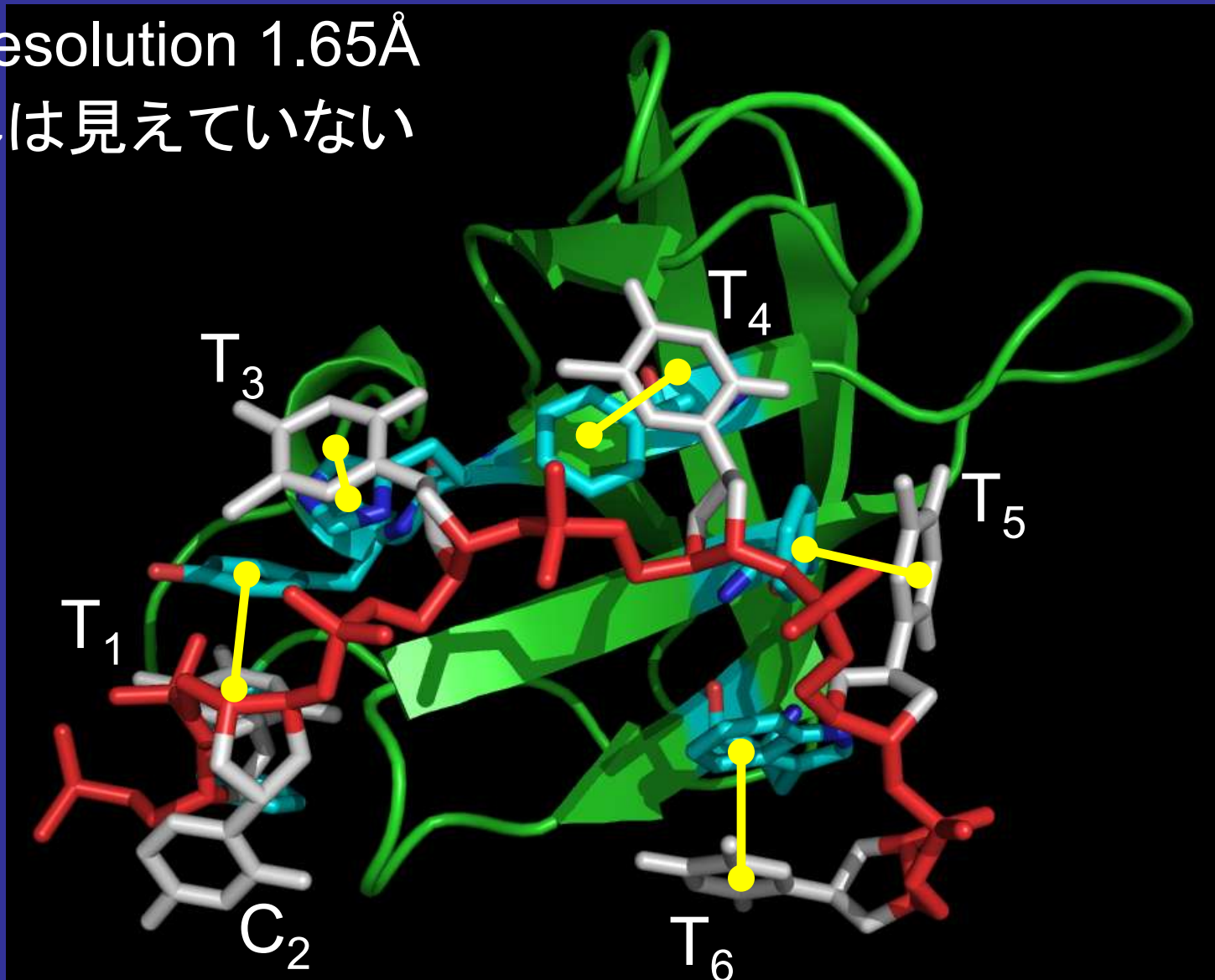
(Cold Shock Protein; Csp)



- 生物が低温ショックにさらされたとき、細胞内で大量に発現する蛋白質
- 低温下でmRNAが構成する2次構造を解消することで、翻訳停止を抑制されている。(Jones, P. *et.al* 1987)

TC(T)₅-*Tt*CSP立体構造①

- Resolution 1.65Å
- T₇は見えていない



1対1の結合(7塩基)

ITC測定条件

サンプルセル: dT(pT)₆ (1.4~6.6 μM)

滴定シリンジ: *Tt* Csp (21.9~103 μM)

滴定量: 2 μL × 1回 + 7 μL × 25回滴定

測定温度: 20~35°C

エンタルピー変化

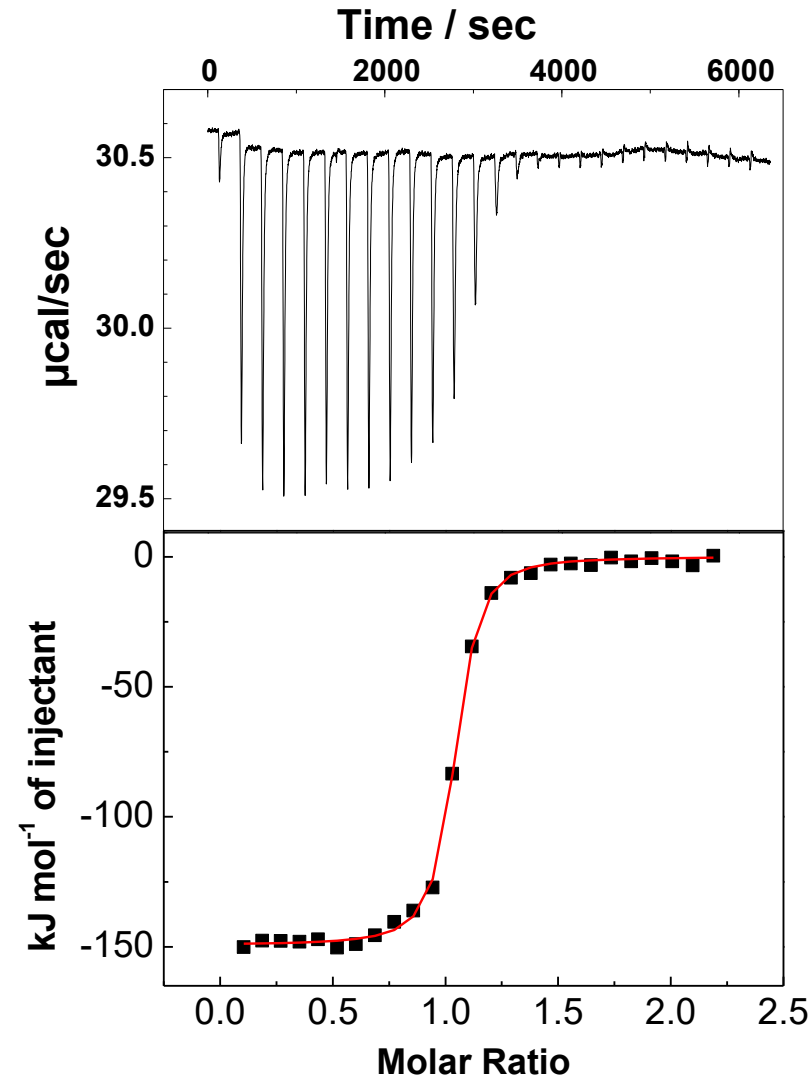
$$\Delta H = -149.4 \pm 0.6 \text{ kJ mol}^{-1}$$

結合定数

$$K_a = 4.82 \pm 0.34 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$$

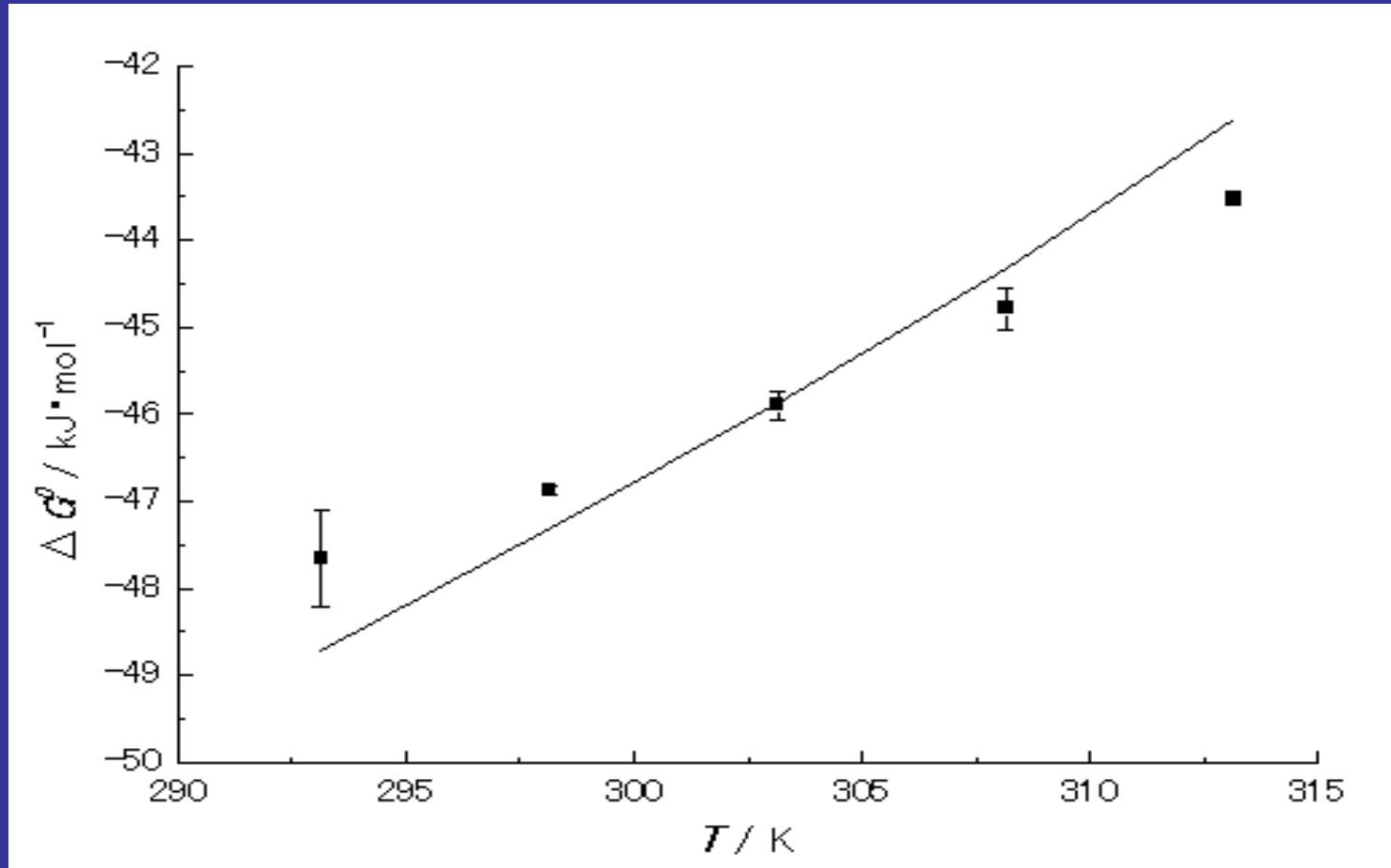
結合比

$$N = 1.048 \pm 0.002$$



30°CでのITC測定結果

2状態モデルでの解析



•2状態モデルでの解析では ΔG^0 の温度依存性を十分に説明できない →別のモデルで検討する必要がある

解析モデルの検討

状態A

$TtCSP$

$TtCSP$

状態B

$TtCSP$

$TtCSP$

ssDNA

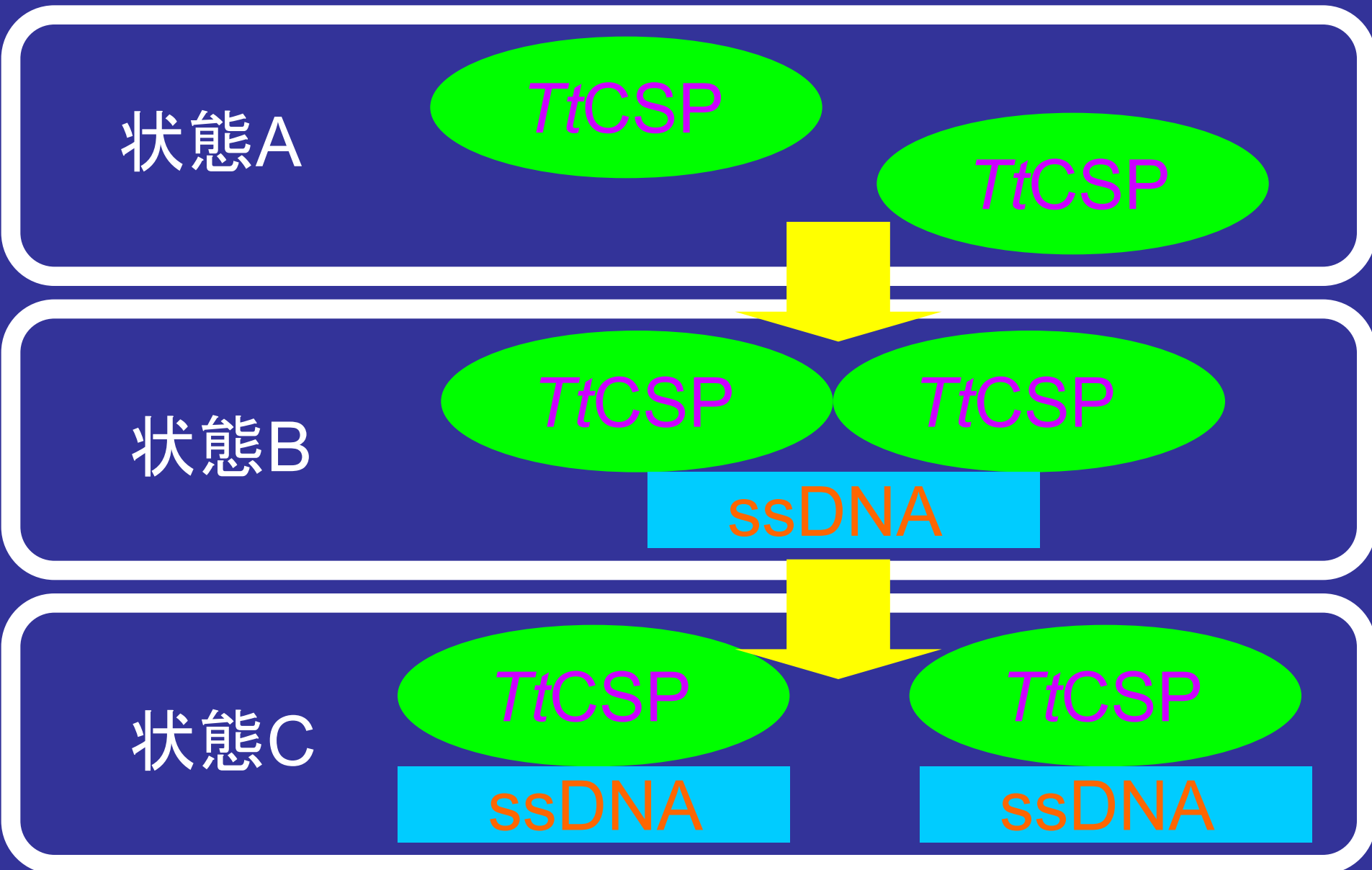
状態C

$TtCSP$

ssDNA

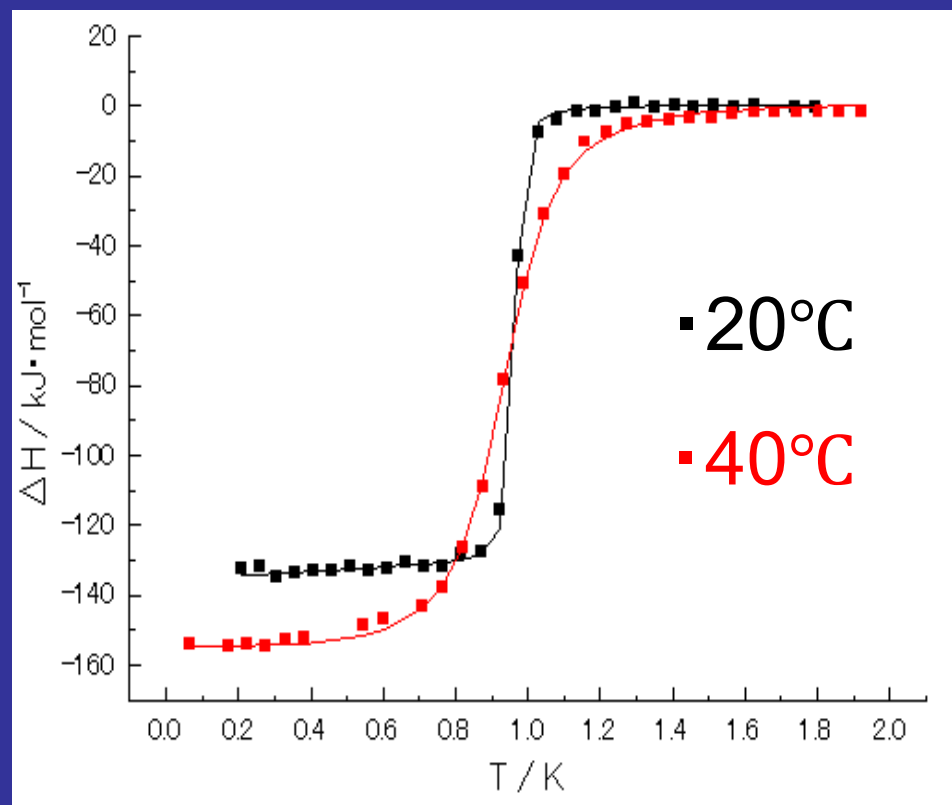
$TtCSP$

ssDNA

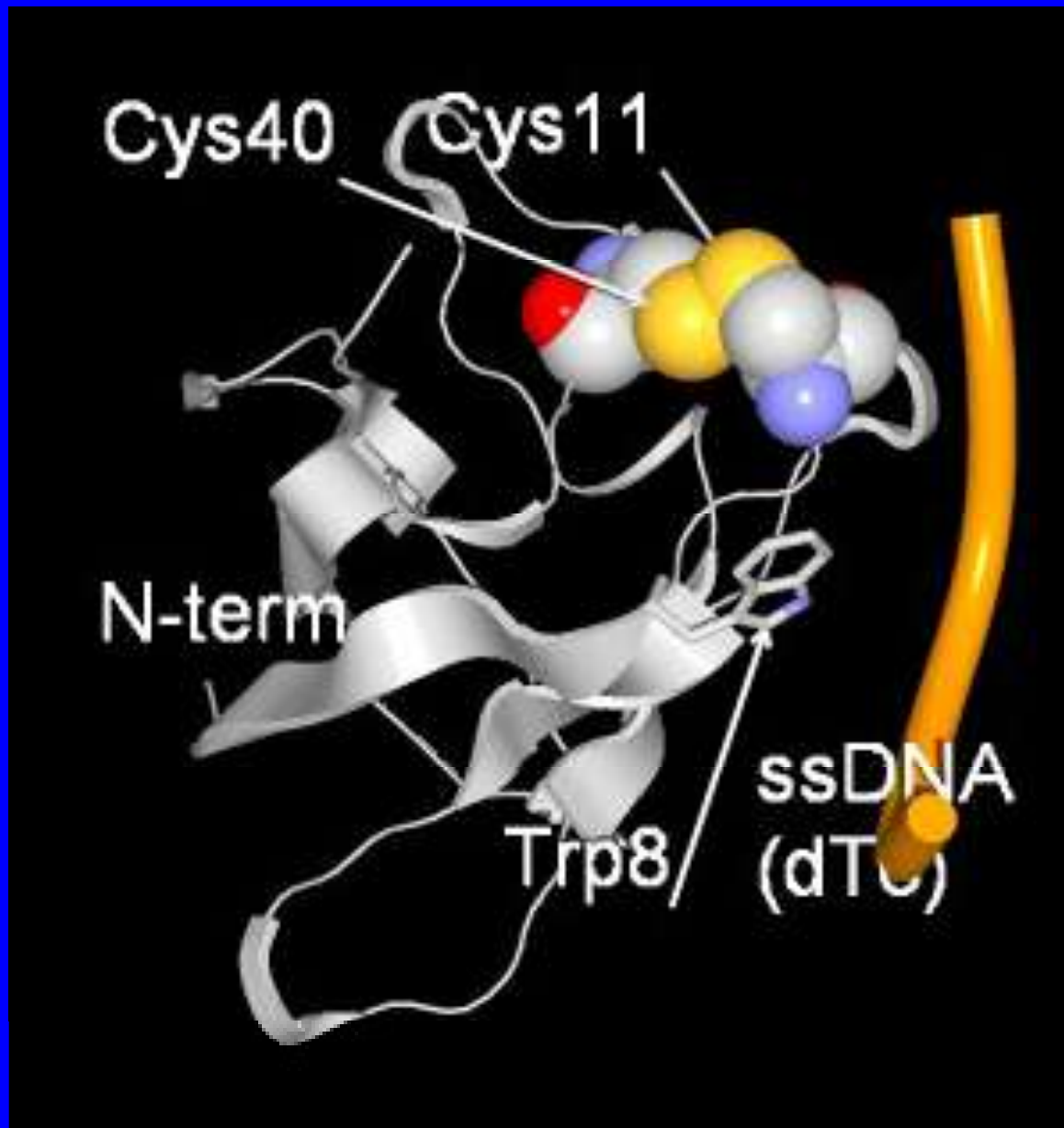


グローバルフィッティング

- グローバルフィッティングですべてのデータから ΔH の2次微分, ΔC , ΔH , ΔG を決定した。
- 3状態のグローバルフィッティングの結果は各温度の実験値を良く説明できた。



低温ショック蛋白質 (*Tt*CSP)の分子設計



等温滴定型熱量計による解析方法

ITC測定条件

サンプルセル: $dT(pT)_6$ (1.4~
6.6 μM)

滴定シリンジ: $Tt Csp$ (21.9~
103 μM)

滴定量: $2 \mu L \times 1回 + 7 \mu L \times 25回滴$

エンタルピー変化

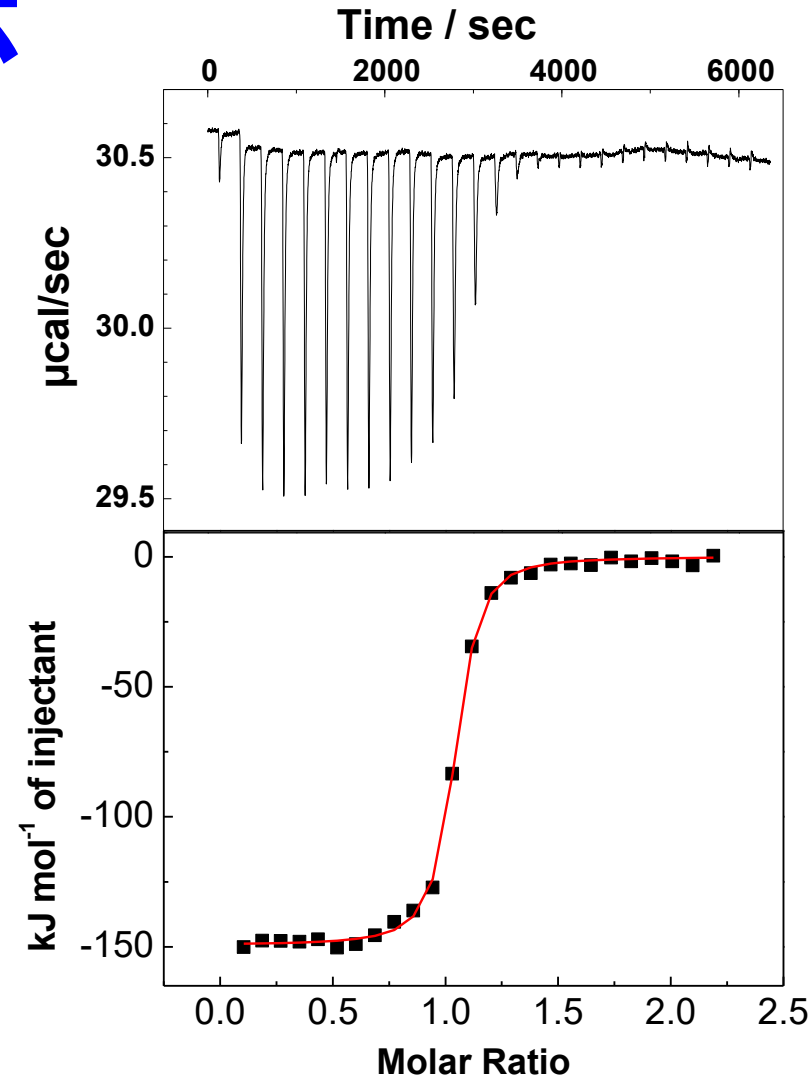
$$\Delta H = -149.4 \pm 0.6 \text{ kJ mol}^{-1}$$

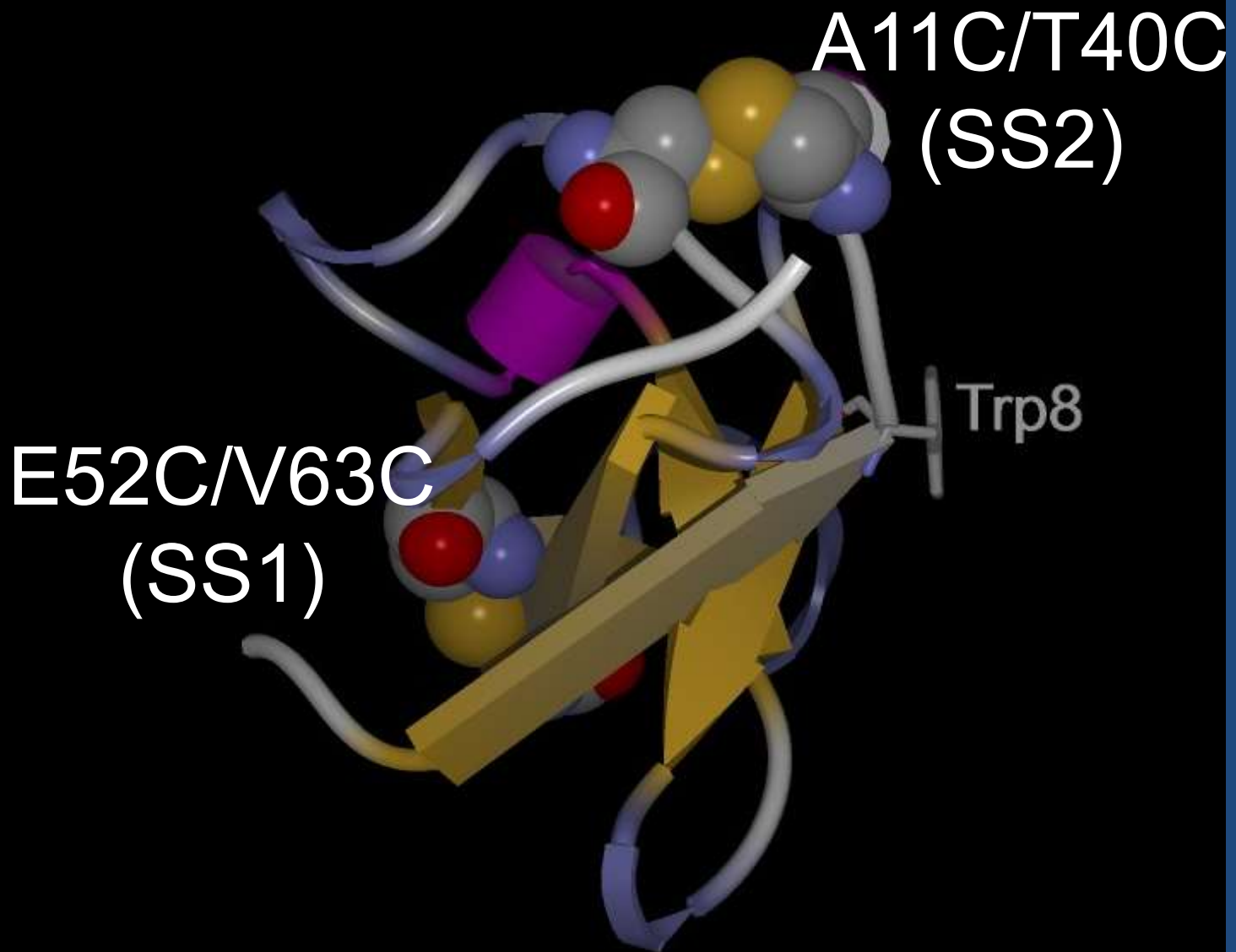
結合定数

$$K_a = 4.82 \pm 0.34 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$$

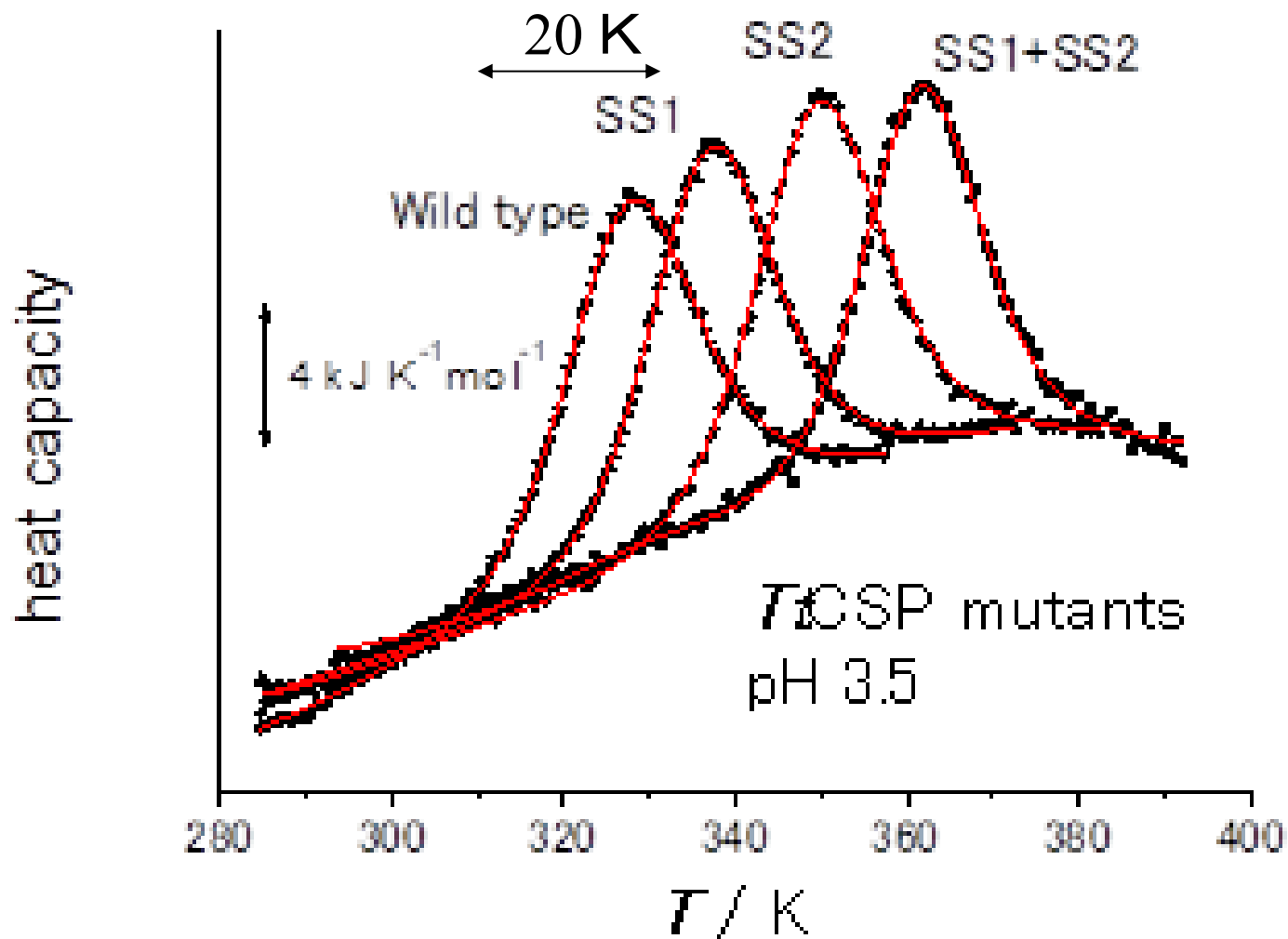
結合比

$$N = 1.048 \pm 0.002$$



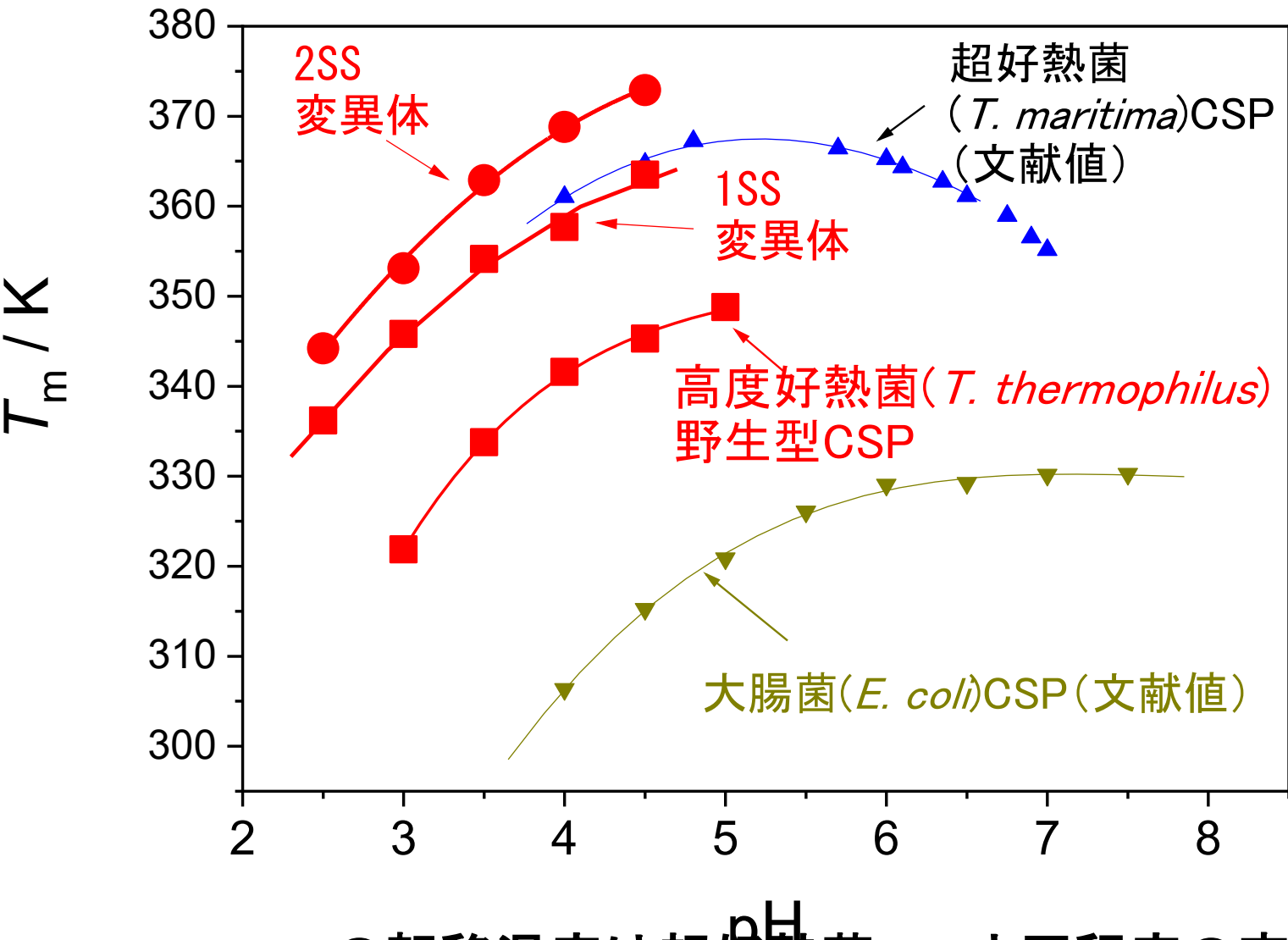


低温ショック蛋白質に高い安定性を持たせるための
分子表面へのジスルフィド結合導入



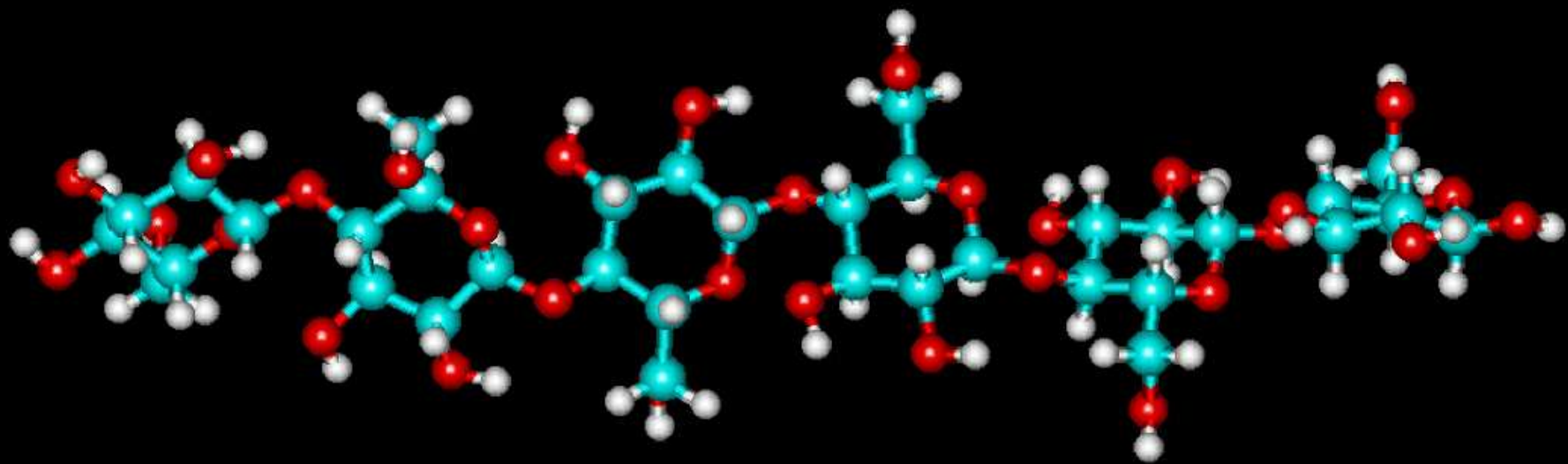
立体構造に基づいて、ジスルフィド結合を導入した高安定化変異体を設計し、大腸菌で大量発現・精製して安定性を測定した。図は、熱測定法(DSC法)を使って、分子設計した蛋白質の熱安定性をpH 3.5で実際に測定したもの。実線は2状態モデルによる理論曲線。

各種CSPの熱転移温度のpH依存性



A11C/T40Cの転移温度は超好熱菌CSPと同程度の安定性を持つ

・3. 3 産業用酵素の 産物阻害効果の研究



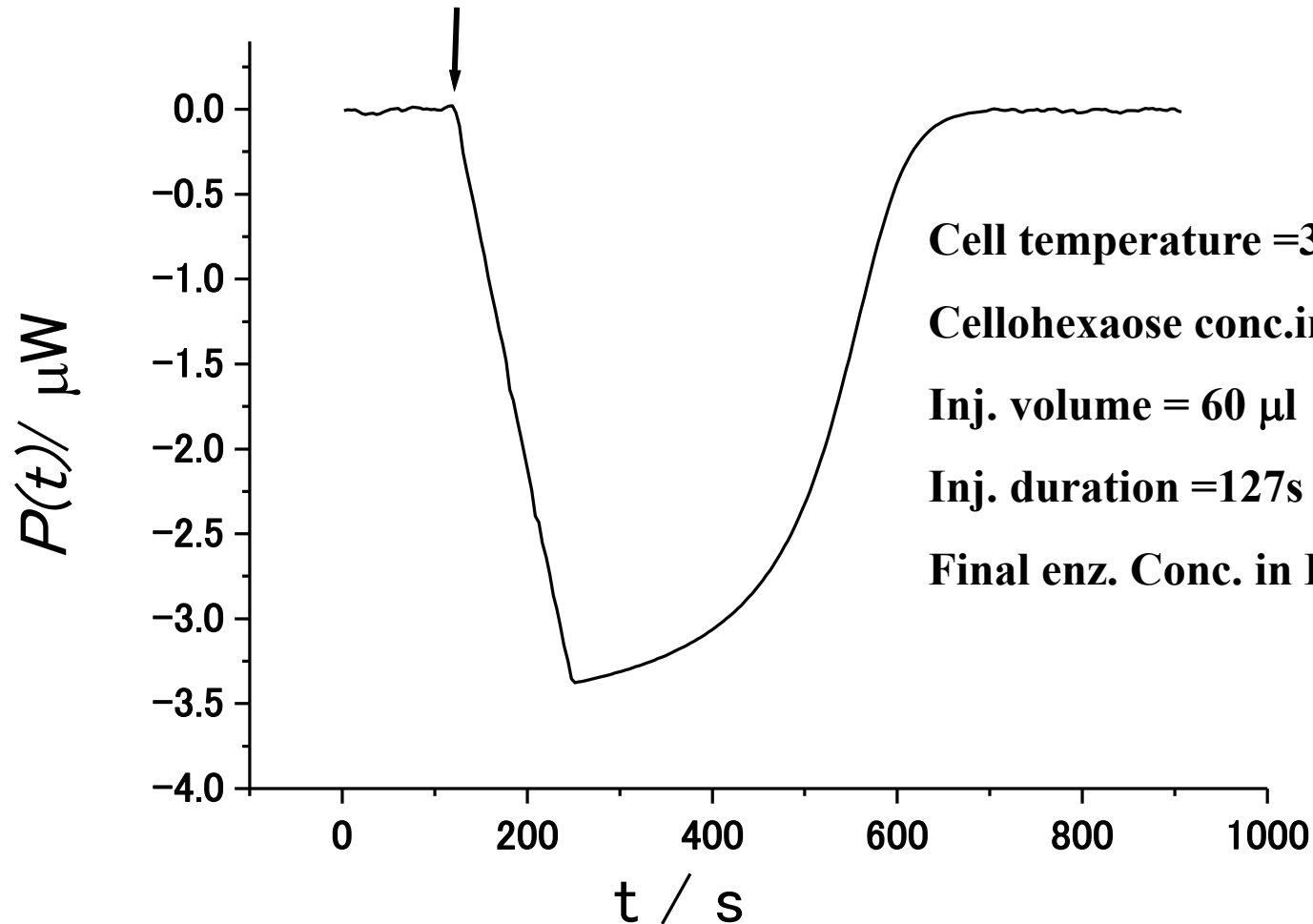
cellohexaose

Hydrolysis of cellohexaose by Inverting-type endoglucanase observed in ITC.

pH = 4.0



$t_0 = 122s$



Cell temperature = 30 °C

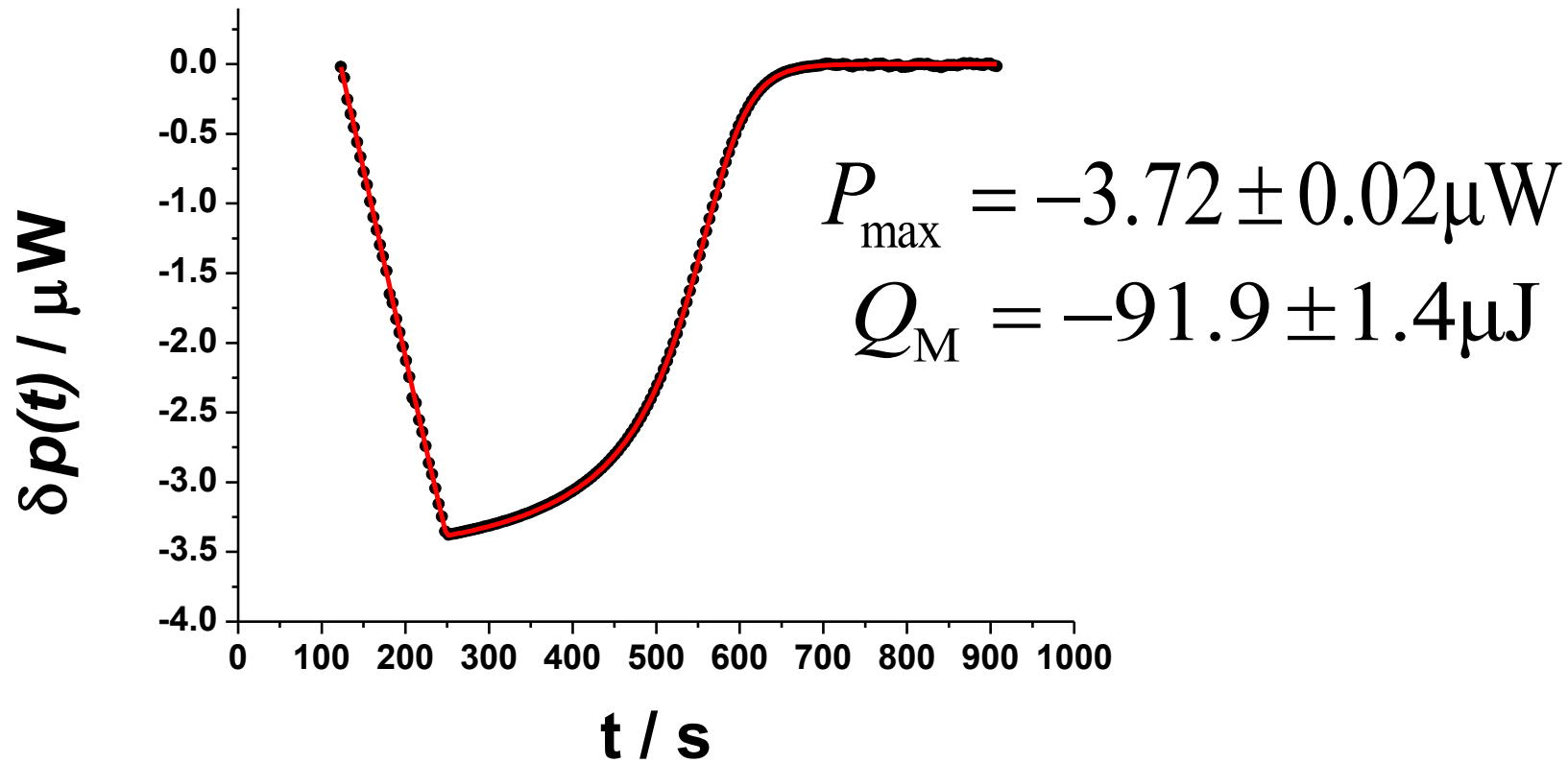
Cellohexaose conc.in ITC cell= 1.0 mM

Inj. volume = 60 μl

Inj. duration = 127s

Final enz. Conc. in ITC cell = 0.27 μM

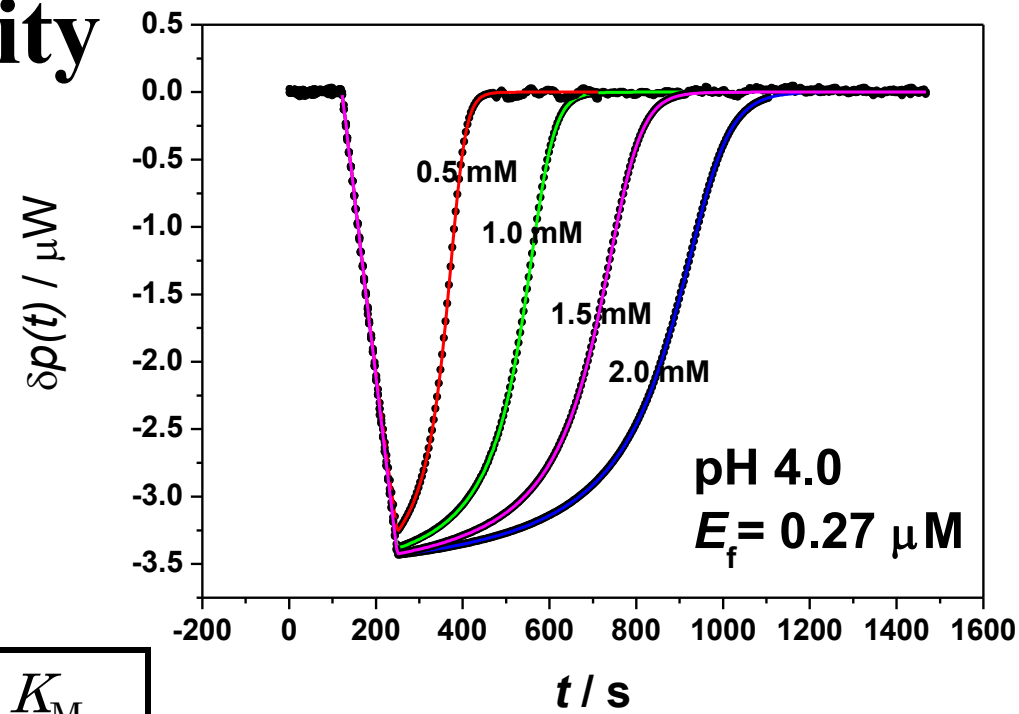
Kinetic parameters from fitted model



$$\delta Q_0 = -1138 \mu\text{J}$$
$$\& \Delta H = -847 \text{ J/mol}$$

$$k_{\text{cat}} = 12.1 \text{ s}^{-1}$$
$$\& K_{\text{M}} = 0.081 \text{ mM}$$

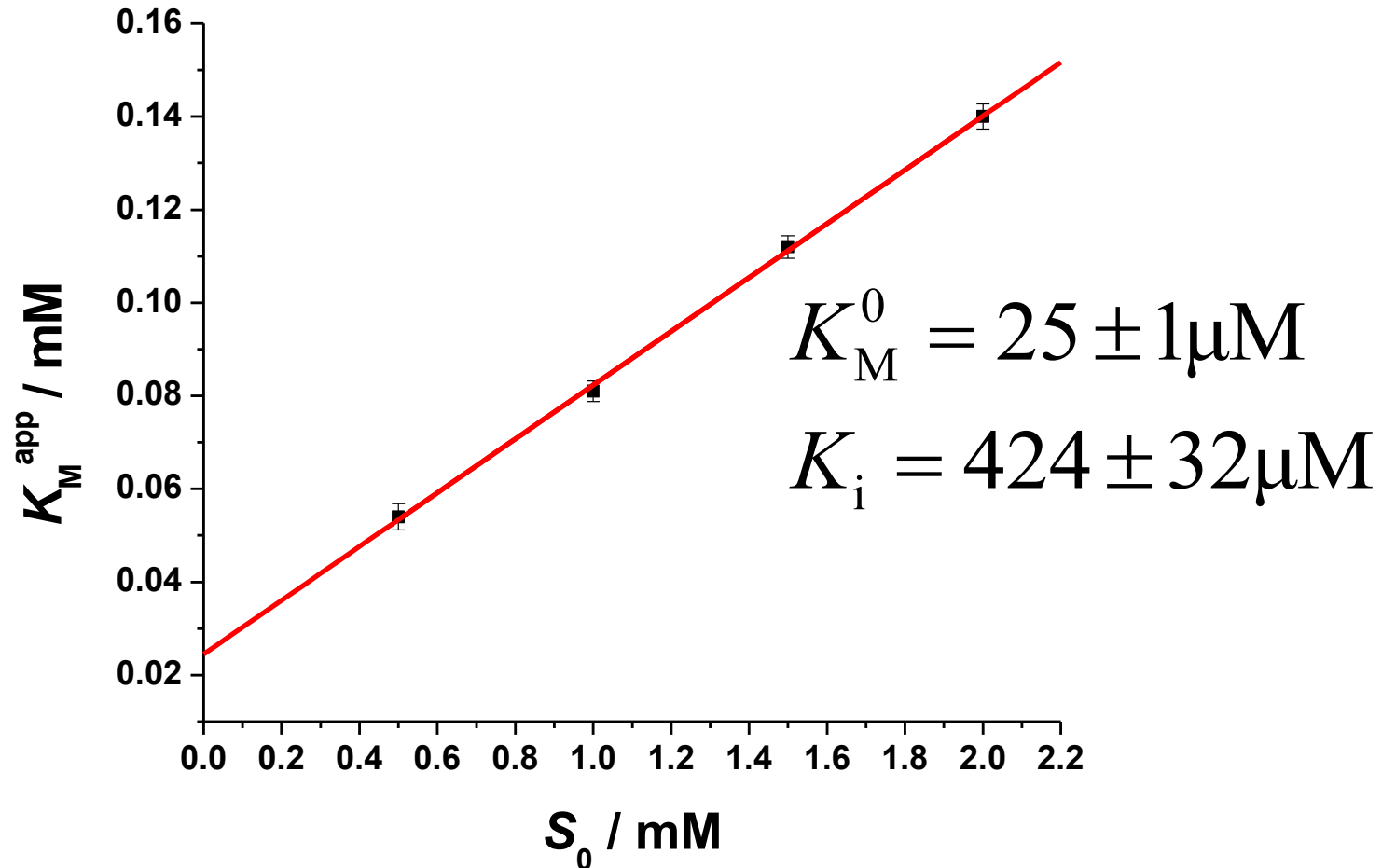
Substrate concentration dependence of endoglucanase activity



Inv-type Endoglu. (μM)	Cellohex. (mM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)
0.27	0.5	11.9	0.054
	1.0	12.1	0.081
	1.5	12.2	0.110
	2.0	12.1	0.140

Substrate/product inhibition

$$K_M^{\text{app}} = K_M^0 (1 + S_0 / K_i)$$



産業用酵素の産物阻害効果

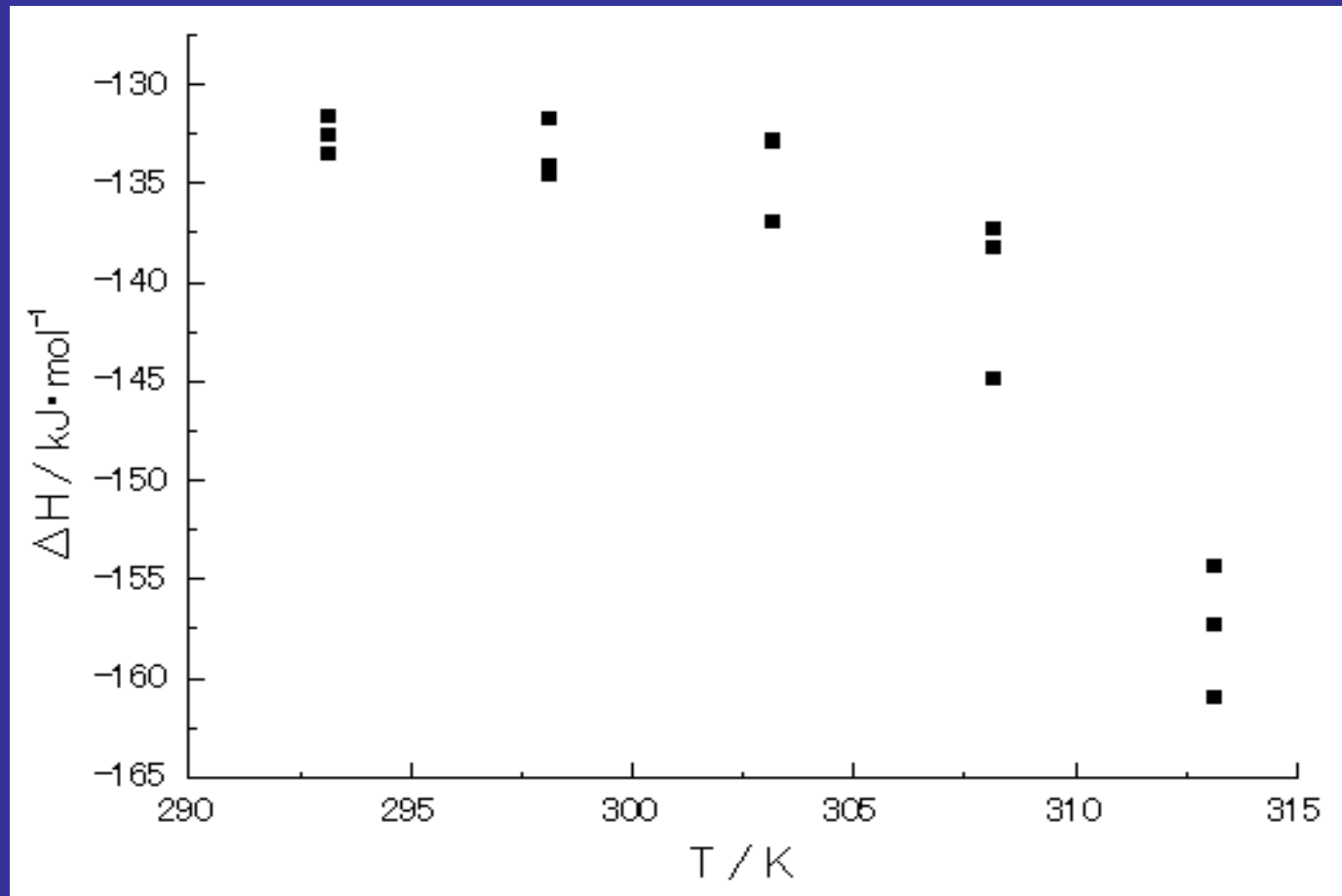
- 基質初濃度を変え、酵素反応中の基質または産物濃度の時間経過を測定することで評価できる。
- セルラーゼ、プロテアーゼなどの様々な産業用酵素やヘリカーゼ等ATP加水分解酵素で産物阻害効果が確認された。
- 酵素の産業利用のためには、産物阻害効果の評価が重要と考えられる。

まとめと謝辞

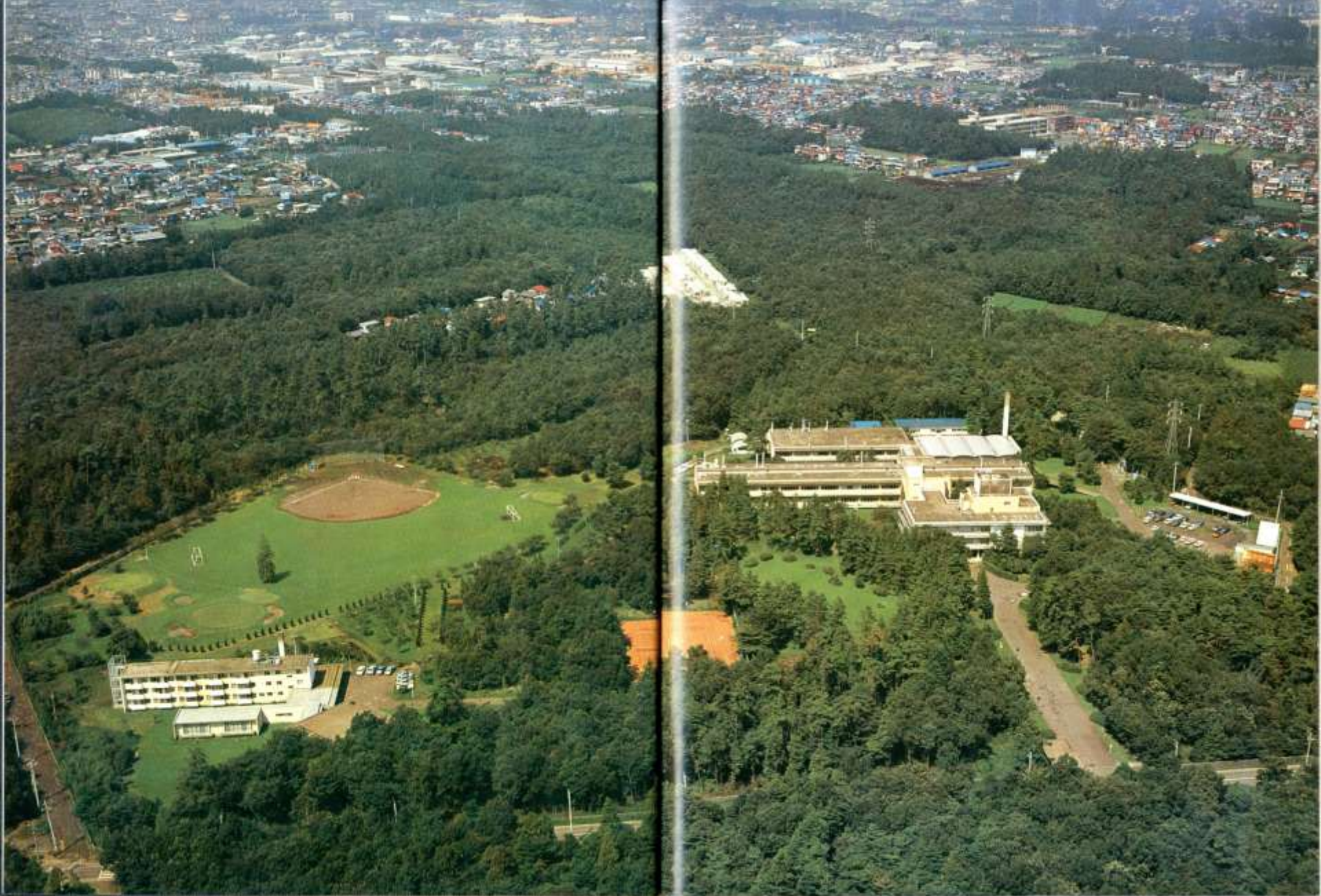
- この約40年間の、バイオテクノロジーの進歩、コンピュータの発展、熱測定装置の進展があり、蛋白質物性研究(立体構造変化・安定性、酵素活性、分子間相互作用など)に取り組み、大いに楽しむことができました。お世話になりました諸先生方、学生の皆様、友人、両親や家族に心より感謝いたします。
- 今後は、これまで培った技術や知見を活かして、少しでも社会の役に立てるよう努力してゆきたいと思います。

ご清聴ありがとうございました

結合エンタルピーの温度依存性



→ 熱容量変化が温度依存性を示す



財団法人 相模中央化学研究所（神奈川県相模原市）