

平成21年6月5日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18570148  
 研究課題名(和文) 超高压ACナノカロリメーターの開発とそれを用いた蛋白質の熱容量の  
 圧力依存性の研究  
 研究課題名(英文) Development of an ultra-high-pressure AC nanocalorimeter and its  
 application to the studies on the pressure dependence of heat capacity in protein  
 研究代表者  
 八尾 晴彦 (YAO HARUHIKO)  
 京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授  
 研究者番号：60212271

## 研究成果の概要：

一万気圧という超高压力下における蛋白質の熱容量を測定するための交流法熱量計を試作した。測定精度を高くするために試料セルとして用いる高压ステンレス鋼チューブの中央部分を均一に削る方法を確立した。性能を試験をした結果、熱容量の測定精度は±0.06%と当初期待していたほど高精度は出ないことがわかった。そこで、2個の試料セルの差を測定することによって精度の向上が可能な示差交流法を試みた。その結果、熱容量の測定精度を±0.0015%にできることがわかった。この装置を用いて、標準的な蛋白質の圧力変性における熱容量の測定を試みた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,000,000	0	3,000,000
2007年度	500,000	150,000	650,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	300,000	4,300,000

研究分野：生物物理・ソフトマテリアルの物理

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：(1) 蛋白質 (2) 生物物理 (3) 生化学 (4) 圧力変性 (5) 熱測定

## 1. 研究開始当初の背景

多くの生物においてゲノムプロジェクトが進み、蛋白質の一次構造が次々と明らかになっている。しかし、蛋白質がどのように天然の立体構造に折りた

まれるかというフォールディングの問題が解決しておらず、現段階では一次構造から天然の立体構造を正確に予想することができない。立体構造予測において、ホモロジーが弱い場合にはスレッド

ィング (3D-1D法) が用いられているが、予測の精度を高めるには精度の高い安定性評価関数が必要となる。蛋白質の立体構造はGibbs自由エネルギーの微妙なバランスで形成されているので、Gibbs自由エネルギー、エンタルピー、エントロピーなどの熱力学的関数は、立体構造の安定性を評価するときの基本的な情報となる。アミノ酸置換した蛋白質の熱力学的関数は、一次構造、立体構造と安定性評価関数の関係を考察、検証するための指標となる。

蛋白質の熱力学的関数は、断熱型示差走査熱量計によりその温度依存性についてはよく調べられている。ところが、熱力学的関数は温度  $T$  と圧力  $p$  の2つのパラメーターに依存する。そのため、温度依存性からは、温度に共役なエントロピーに関する情報しかわからない。圧力依存性が測定できれば、圧力に共役な体積に関する情報を引き出すことができ、蛋白質の熱力学的関数の全体像がわかる。このことは、一次構造、立体構造と熱力学関数、延いては安定性評価関数の関係を仮説、検証するときの新たな切り口を提供する。

蛋白質の圧力変性の研究は国内外で注目されており、高圧核磁気共鳴、高圧X線小角散乱、高圧紫外分光法などを用いて行われている。しかし、従来の断熱型示差走査熱量計では低い圧力しか加えることができないため、熱力学関数の圧力依存性はまだ測定されていない。蛋白質の圧力変性における熱容量が測定できれば、核磁気共鳴、X線小角散乱、紫外分光法などによる立体構造の圧力依存性の情報と比較することにより、蛋白質の一次構造、立体構造と熱力学的関

数の関係をより詳細に仮説、検証するための新たな情報をもたらす研究になる

と考える。

## 2. 研究の目的

蛋白質は数千気圧程度の圧力で圧力変性するため、蛋白質の熱力学的関数の圧力依存性を測定するには一万気圧程度まで測定する必要がある。ところが、従来の断熱型示差走査熱量計は数気圧までしか測定することができず、蛋白質の熱力学的関数の圧力依存性は明らかになっていない。そこで、本研究の第一の目的は、研究代表者らが開発した生体高分子希薄溶液用 AC ナノカロリメーター (H. Yao et al.: "ac nanocalorimeter for measuring heat capacity of biological macromolecules in solution" Rev. Sci. Instrum. 74[9], 4164(2003)) を発展させて、蛋白質の圧力依存性を一万気圧まで測定可能にして、蛋白質の熱力学的関数の圧力依存性の基本像を明らかにすることである。第二の目的は、将来的にはこの装置を普及させ、圧力変性の研究を発展させることである。

蛋白質が酵素活性などの機能を発現するためには立体構造の揺らぎが重要であるが、蛋白質が柔らかすぎると構造を保てなくなり機能できなくなる。そのため、蛋白質には機能を最大にするちょうどよい硬さがあるはずであり、Gibbs自由エネルギーはある圧力で最大になると予想される。蛋白質の熱力学関数の圧力依存性を調べることにより、この仮説を検証することができる。

また、圧力による蛋白質のアンプォールディング機構はまだ十分に解明されていないが、蛋白質内部のキャビティや疎水性側鎖の露出による水和が重要な

因子であると考えられている。圧力変性による熱容量変化を測定することによって、水分子と露出される疎水性残基の相互作用などが分かり、この仮説を検証できると考える。

更に、ACカロリメトリーの特長として、熱容量の周波数依存性を測定することにより、フォールディングやアンフォールディングにおける緩和時間などのダイナミクスを研究することができる。

### 3. 研究の方法

図1に研究代表者らが開発したACナノカロリメーターの概略図を示す。試料セルはステンレス鋼管Aで、テフロンスペーサーを介して熱浴に固定されている。ステンレス鋼管Aに交流電流を流すことにより、試料に角周波数 $\omega$ の交流熱流 $P_{ac}$ を加える。液体試料はAの両端に付けた管Cを通して外部から導入する。試料の温度はAの中央に接着した直径0.13 mmのサーミスタBで検出する。Bの抵抗を交流ブリッジ法により精度良く測定し、試料に生じる温度振動の振幅 $T_{ac}$ と位相

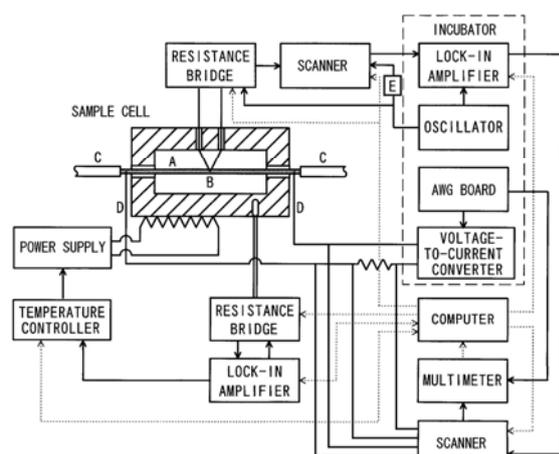


図1. 装置の概略図. A: ステンレス鋼チューブ、B: サーミスタ、C: 試料をセルに導入するための管、D: ステンレス鋼チューブに交流電流を流すためのリード線。

$\phi$ を測定する。これらから、試料の熱容量を高精度で求める。

超高圧を加えられるようなACナノカロリメーターを試作した。試料セルのステンレス鋼チューブAとCを一万気圧に耐えられる外径3 mm、内径0.3 mmの耐圧ステンレス鋼管にした。高圧ステンレス鋼チューブの一端は高圧三方バルブ、逆止排出弁と超高圧ポンプに接続する。他方は蛋白質希薄溶液を試料セル内に導入するための高圧バルブに接続する。これらを行なうため、試料セル周りを試作した。超高圧ポンプで常圧から一万気圧までの圧力を発生させて、逆止排出弁によりその圧力を保持できるようにする。圧力の値はブルドン管式圧力計によって測定できるようにした。

試作した超高圧ACナノカロリメーターを用いて、リゾチームなどの最も良く研究されている標準的ないくつかの蛋白質でまず圧力変性前後における熱容量を測定し、その圧力依存性を明らかにする。次に、ペプシノーゲンなどの多状態転移を示すより複雑な蛋白質について圧力変性前後における熱容量を測定し、その圧力依存性を明らかにする。ACカロリメトリーでは誘電率における誘電分散のように測定周波数を変えることにより、蛋白質のフォールディングとアンフォールディングにおける緩和時間を過剰熱容量の周波数依存性として測定することができる。緩和現象を示すリボヌクレアーゼAなどの蛋白質のフォールディングとアンフォールディングにおける過剰熱容量の周波数依存性をいくつかの圧力で測定し、フォールディングとアンフォール

ルディングの緩和時間とその圧力依存性を調べる。

#### 4. 研究成果

試料セルとしては一万気圧に耐えられる直径約 3 mm の高圧ステンレス鋼チューブを用いる予定であったが、チューブが細いためにチューブを高圧バルブにつなぐ高圧フィッティングが、一万気圧に耐えられないことがわかった。そこで、直径約 5 mm の高圧ステンレス鋼チューブを用いることにしたが、肉厚であるため、試料の熱容量と比べて試料セルの熱容量が非常に大きくなり、熱容量の測定精度が非常に悪くなる。そこで、高圧ステンレス鋼チューブの中央部分を約 3 mm まで削ることとした。ところが旋盤加工では、旋盤の回転中心をチューブの中心に精度良く合わせる事が困難なことから、チューブの長さが 150 mm と長いためにバイトで押すとチューブがたわんで均一に削ることが難しいことがわかった。試行錯誤の結果、電解研磨により高圧チューブの中央部分を削る方法を確立した。

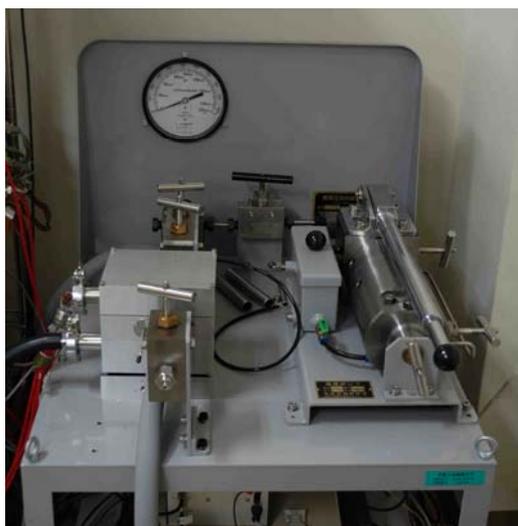


写真 1. 試作した超高圧 AC ナノカロリメーターの概観。

一万気圧の超高圧を加えられるように写真 1 に示す超高圧 AC ナノカロリメーターを試作し、性能試験を行った。高圧用ステンレス鋼チューブ (Harwood Engineering, Inc., 2M-0.025, 外径 3.2 mm, 内径 0.6 mm) にサーミスタ (芝浦電子, PSB-S9) を取り付けた。測定周波数 0.033 Hz、温度振幅約 0.1 K、常圧の条件で平均温度を一定にして、AC カロリメトリーで測定した。その結果、図 2 に示すように、熱容量の測定精度は  $\pm 0.06\%$  と当初期待していたほど高い精度は出ないことがわかった。この精度では、希薄溶液中の蛋白質の圧力変性における過剰熱容量を測定することは困難である。そこで、2 個の試料セルを用いて、一方を未知試料、他方を参照試料とし、その差を測定することによって測定精度の向上が期待できる示差 AC カロリメトリーという方法を試みた。

示差 AC カロリメトリーは過去に他の

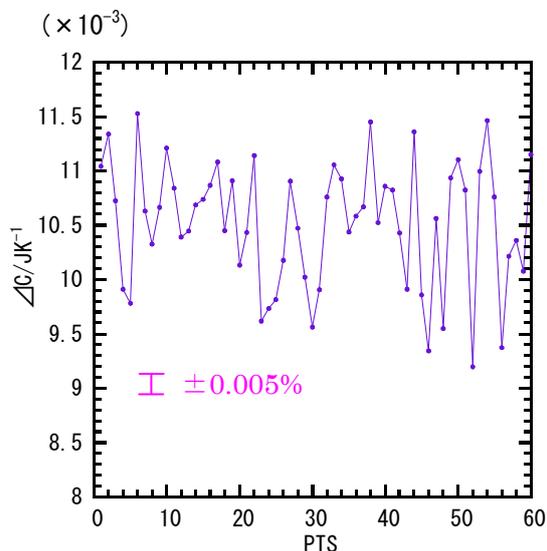


図 2. AC カロリメトリーによる結果. 温度 300 K において試料の熱容量を繰り返し測定した. 縦線 I は  $\pm 0.005\%$  の大きさを示す.

研究者によって試みられているが、良い結果は得られていなかった。これは2つの試料セルを高い精度で等しくすることが困難であるためと思われた。そこで、この点に注意を払って、示差 AC カロリメトリーの装置を試作した。性能試験の結果、図3に示すように熱容量の測定精度を $\pm 0.0015\%$ と通常の40倍まで向上できることがわかった。これで、蛋白質の圧力変性における過剰熱容量を測定できる目処が立った。現在、標準的な蛋白質であるリゾチームの圧力変性前後における過剰熱容量の測定を試みているが、圧力媒体が試料と混じる問題が起こるので、解決法を模索している。この問題を解決して、測定結果を発表する予定である。

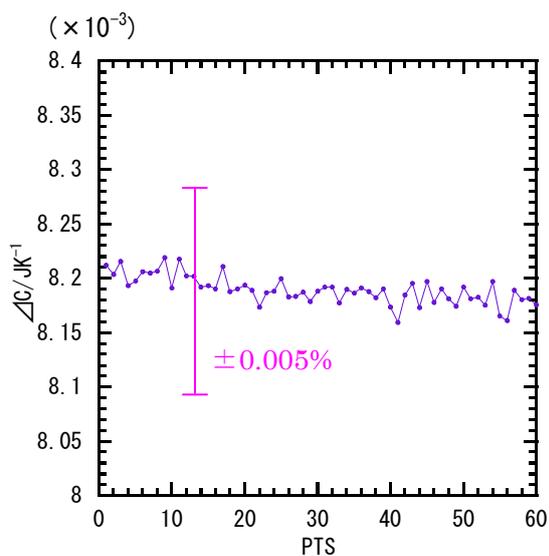


図3. 示差 AC カロリメトリーによる性能試験の結果. 温度 300 K において未知試料と参照試料の熱容量の差を繰り返して測定した. 縦線 I は図2と同じ $\pm 0.005\%$ の大きさを示す.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

①和田将大、猿山靖夫、八尾晴彦: 蛋白質の熱容量測定のための超高压ACカロリメーターの開発、日本熱測定学会、2008年10月17日、つくば国際会議場.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

八尾 晴彦 (YAO HARUHIKO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・  
准教授

研究者番号: 60212271

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者