

# 熱測定法によるタンパク質の構造と機能の解析

杉本華幸

(平成23年7月25日受付)

## 要約

熱測定は、反応や状態変化に伴う熱量変化を精度よく測定し、熱力学量を決定するための手法である。熱測定によりタンパク質を解析する場合、示差走査熱量測定と等温滴定熱量測定が主に用いられる。前者は、タンパク質の熱変性時の吸熱反応を測定することで、タンパク質の安定性に係る諸熱力学量を決定することができる。後者は、タンパク質とリガンドの結合熱を測定することで、結合における諸熱力学量を評価することができる。本稿では、熱測定によるタンパク質構造、機能の解析例として、ジスルフィド結合がグルコアミラーゼのデンブリン結合ドメインの構造安定性や機能に及ぼす影響について解析した例を記した。

新大農研報, 64(1):80-85, 2011

キーワード: DSC、ITC、タンパク質、熱測定、熱力学

生体系における熱測定（カロリーメトリー）の出自は18世紀まで遡る（高橋, 2010）。熱量変化は普遍的な現象であるため、その測定対象は多岐にわたり、対象に応じて多くの熱量計が開発されてきた。熱測定はある反応に伴って起こる熱の出入りを測定することで、エンタルピー変化をはじめとする種々の熱力学量を直接かつ精度よく評価することができる。熱測定は対象とする系全体の熱量変化を測定するため、熱測定の結果に矛盾するような解釈は許されない。現在熱測定の対象は、タンパク質、脂質などの生体高分子をはじめとするミクロな系から（Sturtevant, 1987; Ladbury *et al.*, 2010）、細胞増殖、微生物による食品の腐敗過程の解析、土壌微生物活性の測定などマクロな系まで（坂宮と田中, 2009; 田中と坂宮, 2009）、その範囲は広い。

本稿では主としてタンパク質の熱測定を取り上げるが、1990年代後半に $\mu\text{W}$ の桁の熱の出入りを検出できる高感度熱量計が開発されたことを受け、比較的容易に測定を行うことが可能となり、熱測定を用いたタンパク質の解析が進んだ。タンパク質研究において最もよく用いられる（1）断熱型DSCと（2）ITCについて、測定原理の概要について以下に述べる。

### （1）断熱型DSC

DSCはDifferential Scanning Calorimetry/Calorimeterの略で、日本語では示差走査熱量測定（熱測定装置）と訳される。タンパク質を測定対象とする場合、通常プラスチックなどの固体を測定するとき使用されるDSCとは異なり、断熱型の装置を用いるため、ここでは断熱型DSCと記す。断熱型DSCでは、一定の速度で温度を走査しながらそのときの物質の状態変化に伴う熱の出入り、すなわち熱容量を高感度で測定する。バイオ系では主にタンパク質の熱変性の測定に用いられるが、このほかにも脂質の相転移、核酸の変性など温度による構造転移が測定対象となる。

装置には断熱壁に囲まれた1対のセルがあり、一方の試料セルには試料溶液を、参照セルには試料を溶解している緩衝液を

入れる。一定速度（ $0.5 \sim 1.5^\circ\text{Cmin}^{-1}$ 程度）で昇温もしくは降温しながら、両者のセル間の温度差をゼロにするように熱補償が行われる。この時の補償熱流が、観測される熱容量に対応する。タンパク質の熱変性を測定する場合、熱変性は吸熱反応であるので、変性がおこる温度領域では温度を上げるのに余分に熱を投入しなければならず、これが過剰熱容量として記録される。得られたDSC曲線を解析すると、変性の中点温度（変性反応が半分終了する温度）、変性のエンタルピー変化（立体構造がこわれるのに要するエネルギー）、変性に伴うタンパク質の比熱の変化などの各種熱力学量を求めることができる。球状タンパク質の変性のエンタルピー変化は、通常 $20 \sim 40 \text{ J g}^{-1}$ である（Pfeil, 1998）。変性温度が高いほど安定性も高い。現在までに報告されているなかで、史上最高の熱安定性をもつタンパク質の変性の中点温度はおよそ $150^\circ\text{C}$ である（Tanaka *et al.*, 2006）。

断熱型DSCは平衡系を対象としており、少しずつ温度を変化させながら平衡反応を測定している。したがって各温度における平衡定数を定義することができ、平衡定数の温度変化から求められるエンタルピー変化（ファントホッフエンタルピー変化）も評価することができる。熱測定から直接求められるエンタルピー変化のほか、ファントホッフエンタルピー変化を同時に得られるのは、本測定法の大きな特徴である。詳細は後述する。また、野生型とアミノ酸置換を導入した変異型タンパク質など、異なるタンパク質において変性の熱力学量を比較することで、アミノ酸置換のタンパク質構造への影響を定量的に評価することができる。断熱型DSCはタンパク質の安定化機構の解明に重要な役割を果たしている。

### （2）ITC

ITCはIsothermal Titration Calorimetry/Calorimeterの略で、日本語では等温滴定熱量測定（熱測定装置）と訳される。ITCは試料の化学修飾や固定化を必要としない溶液法による測定法で、2種類の溶液を混合したときの反応熱を観測する。

DSCの場合とは異なり一定温度で測定する。タンパク質-リガンド結合反応のほか、抗体-抗原反応、酵素-基質(阻害剤)結合、タンパク質-医薬分子相互作用、DNA-DNA相互作用など適用範囲は広く、ドラッグデザインの研究においても用いられている。また、生体分子間の相互作用の測定にとどまらず、ITCを用いて酵素のミカエリスパラメータの評価も行われている(深田, 2010)。

測定装置は、DSCの場合と同様に1対のセルがあり、試料セルには試料溶液を、参照セルには試料を溶かした緩衝液を入れる。また、結合物質を溶かした溶液は滴定用シリンジに入れ、一定間隔で一定量ずつ試料溶液へ混合し攪拌する。結合反応によって発熱もしくは吸熱が生じると、両セル間の温度差がゼロになるように熱補償され、この熱補償電力が時間の関数として記録される。ITCデータを解析して得られる熱力学量は、結合定数(解離定数)、結合比、結合エンタルピー、ギブズエネルギー変化、およびエントロピー変化である。これら5つのパラメータは、一度の測定で評価することができる。また温度を変えて測定することで、結合反応における比熱の変化やファントホッフエンタルピーも評価することができる。なお、ITCで測定できる解離定数の範囲はnM~0.1mM程度である。

次節以降の項では、断熱型DSCを用いたタンパク質の熱安定性の解析およびITCを用いたタンパク質-リガンド結合の解析について、筆者の研究を具体例として紹介し(Sugimoto *et al.*, 2007; Sugimoto *et al.*, 2009)、その特徴や利点を述べる。

## 実験材料と方法

### 試料の調製

黒コウジカビ由来グルコアミラーゼのデンブリン結合ドメインを測定対象とした。対象タンパク質は、大腸菌による発現系を用いて調製した。タンパク質濃度は280nmにおけるモル吸光係数  $\epsilon_{280} = 30,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を用いて計算した。緩衝液は、20mMのリン酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。

### 熱量測定

熱変性反応の測定にはMicroCal社製断熱型DSC(VP-DSC)を用い、走査速度  $0.5^\circ\text{Cmin}^{-1}$  で測定した。得られたDSC曲線はKitamuraとSturtevantの方法に基づき解析を行った(Takahashi and Sturtevant, 1981; Kitamura and Sturtevant, 1989; Tanaka *et al.*, 1995)。リガンド結合の測定には、MicroCal社製ITC(VP-ITC)を用いた。ITCデータの解析には、装置付属のソフトウェア(Origin 5.0)を用いた。

## 結果と考察

### 断熱型DSC

黒コウジカビ由来グルコアミラーゼのデンブリン結合ドメインを測定対象とした。このタンパク質は、110アミノ酸残基からなる小型球状タンパク質で、両端を結ぶ位置にジスルフィド結合(C3-C98)が存在する(Sorimachi *et al.*, 1996)。このジスルフィド結合が本タンパク質の構造安定性に及ぼす影響を断熱型DSCにより解析した。図1に、野生型デンブリン結合ドメインおよびジスルフィド結合を欠損させた変異型タンパク質、C3G/C98G、のDSC曲線を示す。pH 7.0、0.1 mg/mLのタンパク質溶液を、走査速度  $0.5^\circ\text{Cmin}^{-1}$  で昇温した。市販装置によって異なるが、通常、0.1 mg/mL程度の濃度のタンパク質溶液

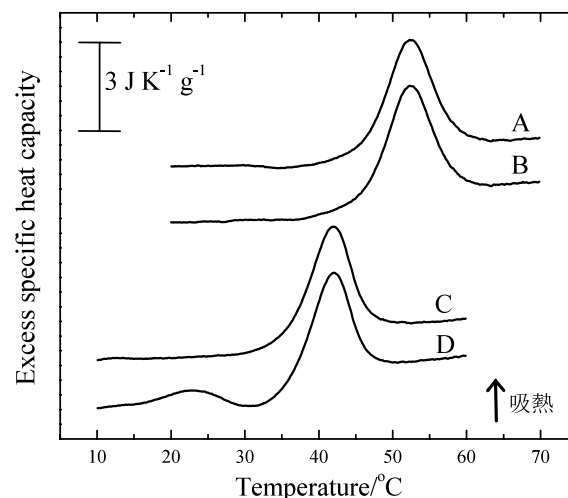


図1 野生型および変異型デンブリン結合ドメインのDSC曲線  
A、Bは野生型、C、Dは変異型タンパク質(C3G/C98G)のDSC曲線を示す。AとCは初回走査、BとDは再走査のDSC曲線を示す。タンパク質濃度0.1 mg/mL、pH 7.0、走査速度  $0.5^\circ\text{Cmin}^{-1}$  で測定した。

が1.5 mLあれば測定可能である。図1の縦軸は比熱、横軸は温度を表す。野生型タンパク質の場合(図1A)、 $40^\circ\text{C}$ 付近から変性に伴う吸熱がみられ、 $52^\circ\text{C}$ で変性のピークをむかえ、 $60^\circ\text{C}$ でほぼ変性が終了していることがわかった。変性がおこる温度領域では、タンパク質の立体構造を形成する非共有結合を切断するのにエネルギーを要するため、すなわち、変性反応に要する熱をタンパク質が余分に吸収するため上向きのピークが観測される。他方、変異型タンパク質の場合、変性のピーク温度はおよそ  $42^\circ\text{C}$ で(図1C)、ジスルフィド結合欠損により、熱安定性が  $10^\circ\text{C}$ 低下した。初回走査終了後、装置内でタンパク質溶液を冷却し再び走査を行ったところ、野生型、変異型タンパク質とも初回走査と同様に変性ピークが観測され(図1B、D)、変性は可逆であることがわかった。なお、変異型タンパク質の場合、 $23^\circ\text{C}$ 付近にも小さなピークが観測された(図1D)。本稿では詳細を記述することは省くが、変異型タンパク質は、変性状態からいったん中間体状態に折りたたまれ、その後天然状態へ移行する(Sugimoto *et al.*, 2009)。  $23^\circ\text{C}$ 付近の小さなピークは、中間体状態から天然状態への移行過程を反映していた。

各タンパク質の変性について、単純な二状態転移  $N \rightleftharpoons U$  ( $N$ は天然状態、 $U$ は変性状態を表す)を仮定し、最小二乗法によって変性の中点温度  $t_{1/2}$  (変性反応が半分終了する温度で、 $[U]/[N] = 1$ となる)、変性のエンタルピー変化  $\Delta h_{\text{cal}}$  ( $\text{J g}^{-1}$ )、ファントホッフエンタルピー変化  $\Delta H_{\text{vH}}$  と  $\Delta H_{\text{cal}}$  ( $\Delta h_{\text{cal}} \times \text{分子量}$ )の比、 $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ 、変性に伴う比熱の変化  $\Delta c_p$  ( $\text{J K}^{-1} \text{ g}^{-1}$ )を求めた。その結果を表1にまとめた。図2に、変異型タンパク質のDSC曲線と(黒丸)と、解析の結果得られた理論曲線(実線)を示す。DSC解析からは、 $\Delta H_{\text{cal}}$  と  $\Delta H_{\text{vH}}$  という2種類のエンタルピー変化が同時に得られる。 $\Delta H_{\text{cal}}$ は、DSC曲線とベースラインで囲まれた面積から求められる  $\Delta h_{\text{cal}}$ に分子量をかけたもので、タンパク質分子1モルあたりのエンタルピー変化を表す。 $\Delta H_{\text{cal}}$ は変性機構に無関係に測定できる量である。他方、DSC曲線のピーク途中の各温度までの面積は変性分子

表1 野生型および変異型デンブリン結合ドメインの熱変性の熱力学量 (pH 7.0)

	$t_{1/2}/^{\circ}\text{C}^a$	$\Delta h_{\text{cal}}/\text{J g}^{-1a}$	$\Delta H_{\text{vH}}/\text{kJ mol}^{-1a}$	$\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}^a$	$\Delta c_p/\text{J K}^{-1}\text{g}^{-1a}$
野生型	52.0 ± 0.0	32.7 ± 1.1	426 ± 21	1.08 ± 0.05	0.77 ± 0.26
変異型	41.5 ± 0.1	27.9 ± 0.5	439 ± 12	1.30 ± 0.04	0.74 ± 0.20

a 複数回 DSC 曲線の測定を行い、各々の解析で得られた熱力学量の平均値と標準偏差を示す

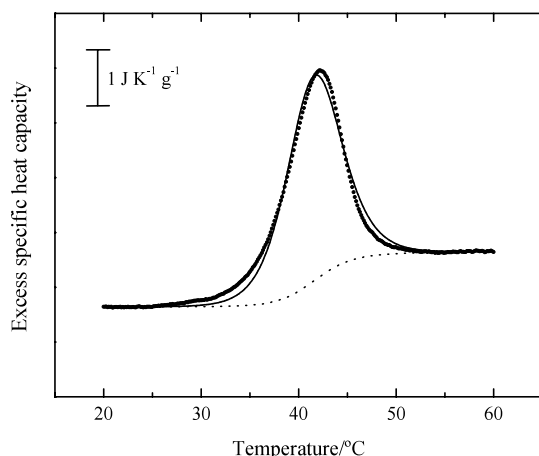


図2 DSC 曲線の解析例

変異型デンブリン結合ドメインの DSC 曲線の解析例を示す。黒丸は実測値を、実線は解析の結果得られた理論曲線を示す。また、点線はベースラインを表す。測定条件は、タンパク質濃度 0.1 mg/mL、pH 7.0、走査速度 0.5°C min<sup>-1</sup>。

種の量に対応し、これを温度に関して積分すれば各温度における平衡定数  $K$  が求められる。各温度での  $K$  の温度依存性(ファントホッフの式)から  $\Delta H$  を評価することができる。このようにして得られるエンタルピー変化をファントホッフエンタルピー変化といい、 $\Delta H_{\text{vH}}$  と表す。 $\Delta H_{\text{vH}}$  は変性機構に依存する量で、すなわち、変性機構を仮定して解析しなければ評価することができない量である。これらの測定原理の異なる 2 つのエンタルピー変化の比  $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$  が 1 であれば、熱変性反応が二状態転移 ( $N \rightleftharpoons U$ ) であることの実験的根拠となる (Sturtevant, 1987) (注1)。野生型および変異型デンブリン結合ドメインの場合、 $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$  はそれぞれ、1.08、1.30 でほぼ 1 に近い値となり (表1)、変性反応には解離や会合を伴わず、N と U の単純な二状態転移であることがわかった。また DSC により、変性の前後でのタンパク質の比熱の差  $\Delta c_p$  を評価することができる。これは変性の前後でのベースラインの差であり、一般に変性状態における比熱が天然状態のそれよりも大きい。天然状態では分子内部に埋もれていた疎水性アミノ酸残基が、変性に伴って溶媒の水に露出することが、変性状態における比熱の増大の要因であると考えられている (Makhatadze and Privalov, 1995)。

上記で得られた変性の熱力学量を用いて、変性のギブズエネルギーの温度依存性を次式より評価することができる。

$$\Delta G^0 = \Delta H_{\text{cal}} \left( 1 - \frac{T}{T_{1/2}} \right) - \Delta C_p \left( T_{1/2} - T + T \ln \frac{T}{T_{1/2}} \right)$$

$T_{1/2}/\text{K} = t_{1/2}/^{\circ}\text{C} + 273.15$ 、また、 $\Delta C_p = \Delta c_p \times$  分子量である (注2)。異なるタンパク質の安定性を比較するには、変性のギブズエネルギーの差を求める、すなわち、 $\Delta \Delta G^0 = \Delta G^0_{(\text{変異型})} - \Delta G^0_{(\text{野生型})}$  を算出することが指標となる。熱力学量は温度に依存して変化する量なので、複数のタンパク質の間で安定性を比較する場合、一定温度で比較しなければならない。デンブリン結合ドメインの場合、野生型タンパク質の変性温度 (52.0°C) で、野生型と変異型のギブズエネルギーを比較すると、 $\Delta \Delta G^0 = -16 \text{ kJ mol}^{-1}$  となった。つまり、ジスルフィド結合を欠損させたことで、タンパク質の安定性はギブズエネルギーとして 16 kJ mol<sup>-1</sup> 不安定化したことがわかった。 $\Delta \Delta H$  と  $T \Delta \Delta S^0$  についても各々、35.6 kJ mol<sup>-1</sup>、51.6 kJ mol<sup>-1</sup> と求められた。この結果、変異型タンパク質においてエンタルピー変化は増大しており ( $\Delta \Delta H > 0$ )、変異型タンパク質はエンタルピー的にはむしろ安定化していた。しかし、それを上回るエントロピー変化の増大 ( $T \Delta \Delta S^0 > \Delta \Delta H$ ) が不安定化の要因になっていることがわかった。

熱測定による解析だけでは、これらの熱力学量の変化がタンパク質の天然状態の変化に起因するのか、それとも変性状態の変化に起因するのかわからない。そこで、ジスルフィド結合欠損がタンパク質の天然状態に及ぼす影響について調べるため、円二色性スペクトル測定および等温滴定熱量測定によるリガンド結合能の評価 (次節に詳細を記述) を行った。両測定において、野生型と変異型デンブリン結合ドメインにおいて差異はなかったことから、ジスルフィド結合を欠損させても、タンパク質の天然状態の構造に影響はないことが分かった。この結果から、デンブリン結合ドメインではジスルフィド結合を保持することで、変性状態の構造の自由度 (エントロピー) を減少させ、これが安定化に寄与していると考えられた。

## ITC

ジスルフィド結合がデンブリン結合ドメインのリガンド結合能に与える影響を調べるため、野生型および変異型タンパク質と基質アナログ、 $\beta$ -シクロデキストリン ( $\beta$ -CD) の結合の熱力学量を等温滴定熱量測定により評価した。図3に、変異型デンブリン結合ドメインと  $\beta$ -CD との結合を ITC で測定した例を示す。pH 7.0、5°C で測定した。パネル上図は観測シグナル、下図は解析結果を示す。本測定では、55  $\mu\text{M}$  のタンパク質溶液 (1.4 mL) に 2 mM の  $\beta$ -CD 溶液を 10  $\mu\text{L}$  ずつ 29 回滴定した (注3)。 $\beta$ -CD 溶液を滴定し始めると、デンブリン結合ドメインと  $\beta$ -CD の複合体が形成され、それに伴う発熱が観測される。滴定が進むと形成される複合体が減少するため、観測されるシグナルは徐々に小さくなり、最後には希釈熱のみが観測されるようになる。希釈熱を補正後、解析に供して得られた諸熱力学量を表2に示す。ITC データから直接評価できるのは、結合比  $n$ 、解離定数  $K_d$ 、エンタルピー変化  $\Delta H$  である。ギブズエネルギー変化  $\Delta G^0$  とエントロピー変化  $\Delta S^0$  は、熱力学基本式  $\Delta G^0 = -RT \ln (1/K_d)$ 、 $\Delta G^0 = \Delta H - T \Delta S^0$  ( $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度) から算出される。この場合、結合比は 2 となった。これは 1 分子のタンパク質に 2 分子の  $\beta$ -CD が結合することを意味する。また、エンタルピー変化、エントロピー項 ( $T \Delta S^0$ ) とともに負の値となり、デンブリン結合ドメインと

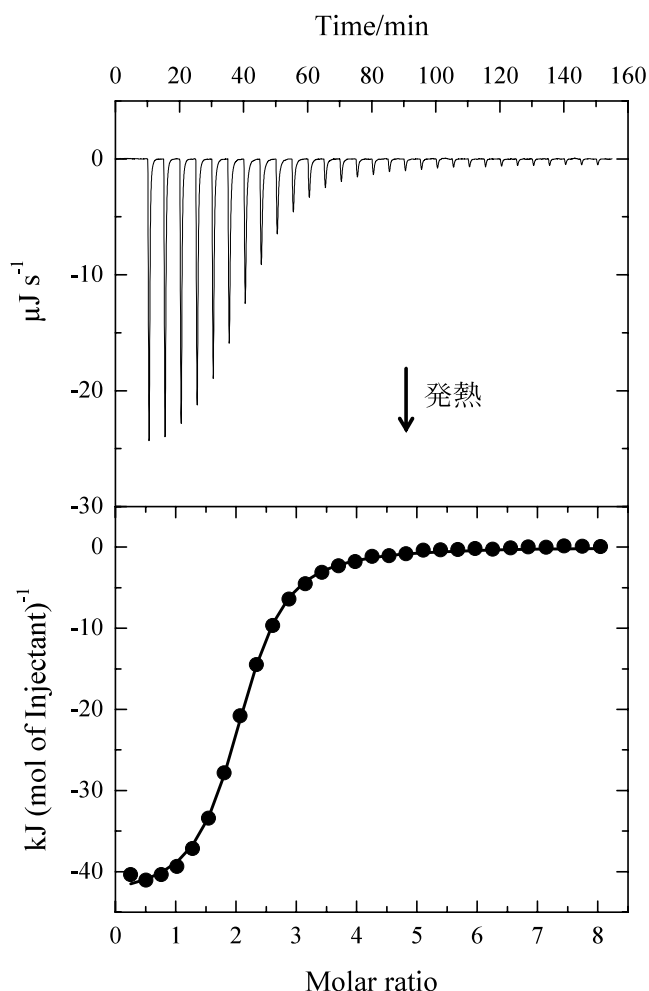


図3 変異型デンブレン結合ドメインとβ-シクロデキストリンの結合反応のITCによる解析  
変異型デンブレン結合ドメイン溶液 (55 μM) にβ-シクロデキストリン溶液 (2 mM) を10 μLずつ29回滴定した (pH 7.0、5℃)。上図は観測データ、下図は解析例を示す。下図の黒丸は実測値を、実線は表2で得られた熱力学量を用いて描いた理論曲線を示す。

表2 野生型および変異型デンブレン結合ドメインとβ-シクロデキストリンの結合の熱力学量 (pH 7.0、5℃)

	$n^a$	$K_d/\mu\text{M}^a$	$\Delta H/\text{kJ mol}^{-1a}$	$\Delta G^0/\text{kJ mol}^{-1b}$	$T\Delta S^0/\text{kJ mol}^{-1b}$
野生型	2.01 ± 0.01	4.66 ± 0.16	-44.5 ± 0.2	-28.4	-16.1
変異型	2.01 ± 0.01	4.14 ± 0.19	-43.3 ± 0.2	-28.7	-14.6

a ±に続く値は標準誤差を表す。

b 値は、 $\Delta G^0 = -RT\ln(1/K_d)$ 、 $T\Delta S^0 = \Delta H - \Delta G^0$ より各々求めた。

β-CDの結合反応はエンタルピー駆動型であることがわかった。複合体のNMR溶液構造では、結合部位では糖とタンパク質の間で複数の水素結合が形成されており (Sorimachi *et al.*, 1997)、これが負のエンタルピー変化に寄与していると考えら

れる。

野生型と変異型デンブレン結合ドメインの結合の熱力学量に差異はみられなかった(表2)。ジスルフィド結合を欠損させても、β-CDとの結合に影響はないことが分かった。

おわりに

以上、断熱型DSCやITCを用いた研究を紹介した。この手法を用いて解析することで、タンパク質の構造安定性、機能の定量的評価ならびに熱力学原理の理解が可能となる。本稿ではジスルフィド結合がタンパク質の安定性に及ぼす効果について記したが、同じジスルフィド結合の効果調べた研究でも異なる結果が得られた例もある (Kuroki *et al.*, 1992)。これは熱測定によって得られた熱力学量をもとにした詳細な議論により、初めて明らかになったことである。熱測定を用いた解析により、タンパク質の構造安定性や結合反応を支配する熱力学原理は思いのほか多様であることがわかってきている。立体構造や機能が似たタンパク質でも、反応の熱力学はさまざまである。これらの多様な現象に答えを与える統一的原理があるのか、それはいったいどのようなものなのかを明らかにすることが研究課題であるが、熱測定で得られた知見とX線結晶構造解析やNMR解析によって得られる立体構造情報と併せて議論することで解明されることが期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究は、筆者が三重大学大学院在籍時に行ったものである。共同研究者の同大学院教授、田中晶善先生に深謝する。

注釈

(注1) タンパク質が2量体を形成し、 $N_2 \rightleftharpoons U_2$ のように変性する場合、平衡定数は  $[U_2]/[N_2]$  と表され、 $\Delta H_{vH}$  は2量体1モルあたりの量である。したがって、 $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$  は2となる。 $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal} > 1$ であった場合、分子間の相互作用 (多量体化) を示す (Sturtevant, 1987)。他方、分子内にいくつかのドメインを持ち、各ドメインが変性の単位としてふるまう場合や、変性反応に中間体を伴う場合 ( $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$ , Iは変性中間体) は、 $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal} < 1$ となる (Sturtevant, 1987)。 $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ の値は、'変性反応における分子の挙動単位'を示す指標となる。

(注2) 式から明らかなように、正確な熱力学量の評価には正確な  $\Delta C_p$  ( $\Delta c_p$ ) の評価が不可欠である。通常pHを変えて熱変性を測定すると  $t_{1/2}$ 、 $\Delta h_{cal}$ が変化するため、 $\Delta h_{cal}$ の温度依存性から  $\Delta c_p$ を評価することができる。デンブレン結合ドメインの場合、pHを変えて測定すると沈殿を生じたため、この方法を用いることができなかった。本研究では、複数回測定したDSC曲線の解析で得られた値を用いた (表1)。

(注3) 現在、使用サンプル量が従来の1/7まで減少した小型ITC (実効セル体積が200 μL)が開発されている。

## 引用文献

- 深田はるみ . 2010. 酵素活性 . pp. 306. 日本熱測定学会編 . 熱量測定・熱分析ハンドブック 第2版 . 丸善 . 東京 .
- Kitamura, S. and J. M. Sturtevant. 1989. A scanning calorimetric study of the thermal denaturation of the lysozyme of phage T4 and the Arg 96 → His mutant form from thereof. *Biochemistry*, **28**: 3788-3792.
- Kuroki, R., K. Inaka, Y. Taniyama, S. Kidokoro, M. Matsushima, K. Kikuchi and K. Yutani. 1992. Enthalpic destabilization of a mutant human lysozyme lacking a disulfide bridge between cysteine-77 and cysteine-95. *Biochemistry* **31**: 8323-8328.
- Ladbury, J. E., G. Klebe and E. Freire E. 2010. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**:23-27.
- Makhatadze, G. I. and P. I. Privalov. 1995. Energetics of protein structure. *Adv. Protein Chem.*, **47**: 308-425.
- Pfeil, W. 1998. *Protein stability and folding: A collection of thermodynamic data*. Springer, Berlin Heiderberg.
- 坂宮章世・田中晶善 . 2009. 微生物熱測定と、その食品微生物学および土壌微生物学への応用 . 熱測定 , **36**: 31-37.
- Sorimachi, K., A. J. Jacks, M. F. Le Gal Coëffet, G. Williamson, D. B. Archer and M. P. Williamson. 1996. Solution structure of the granular starch-binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, **259**:970-987.
- Sorimachi, K., M. F. Le Gal Coëffet, G. Williamson, D. B. Archer and M. P. Williamson. 1997. Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to  $\beta$ -cyclodextrin. *Structure*, **5**: 647-661.
- Sturtevant, J. M. 1987. Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **38**: 463-488.
- Sugimoto, H., M. Nakaura, Y. Kosuge, K. Imai, H. Miyake, S. Karita and A. Tanaka. 2007. Thermodynamic effects of disulfide bond on thermal unfolding of the starch-binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**: 1535-1541.
- Sugimoto, H., M. Nakaura, S. Nishimura, S. Karita, H. Miyake and A. Tanaka. 2009. Kinetically trapped metastable intermediate of a disulfide-deficient mutant of the starch-binding domain of glucoamylase. *Protein Sci.*, **18**: 1715-1723.
- Takahashi, K. and J. M. Sturtevant. 1981. Thermal denaturation of *Streptomyces* subtilisin inhibitor, subtilisin BPN<sup>I</sup>, and the inhibitor-subtilisin complex. *Biochemistry* **20**: 6185-6190.
- 高橋克忠 . 2010. 生物と熱力学 . pp. 16-17. 日本熱測定学会編 . 熱量測定・熱分析ハンドブック 第2版 . 丸善 . 東京 .
- Tanaka, A., H. Fukada and K. Takahashi. 1995. Differential scanning calorimetric studies on the domain structure of *Aspergillus* glucoamylase. *J. Biochem.*, **117**: 1024-1028.
- 田中晶善・坂宮章世 . 2009. 熱測定法による食品腐敗過程と防腐効果の解析 . *FFI ジャーナル* , **214**: 28-34.
- Tanaka, T., M. Sawano, K. Ogasahara, Y. Sakaguchi, B. Bagautdinov, E. Katoh, C. Kuroishi, A. Shinkai, S. Yokoyama and K. Yutani. 2006. Hyper-thermostability of CutA1 protein, with a denaturation temperature of nearly 150°C . *FEBS Lett.*, **580**: 4224-4230.

## Calorimetric Analysis of Protein Structure and Function

Hayuki SUGIMOTO

(Received July 25, 2011)

### Summary

Calorimetry is an experimental technique that directly measures the heat released or absorbed during thermal transition and binding equilibrium for samples and provides a large amount information on the thermodynamics of these reactions. Differential scanning calorimetry (DSC) and isothermal titration calorimetry (ITC) is mainly used in the field of protein chemistry. While DSC measures the heat energy uptake that occurs in a protein molecule during thermal unfolding, ITC is used to measure the heat of binding of a protein to its ligand. The calorimetric approach enables accurate determination of the thermodynamic parameters for thermal unfolding and binding reactions of proteins. In this manuscript, calorimetric analysis of the effect of the disulfide bond on the structural stability and ligand binding capacity of the starch-binding domain of glucoamylase is described as an example.

*Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 64(1):80-85, 2011*

**Key words** : DSC, ITC, proteins, calorimetry, thermodynamics