

蛋白质变性中的熵-焓互补现象

刘磊 杨超 郭庆祥*

(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026, * 联系人, Email: qxguo@ustc.edu.cn)

摘要 根据 3 000 多组热力学实验数据发现, 在蛋白质变性过程中普遍存在熵-焓互补现象. 研究表明, 伴随蛋白质变性发生的水分子重组是这种熵-焓互补现象的根源. 熵-焓互补使蛋白质变性只发生小范围的自由能变化, 既满足了生理过程的要求, 又不必牺牲蛋白质的生物多样性. 此外, 熵-焓互补理论对于理解蛋白质变性的 Privalov 熵-焓收敛之谜具有重要意义.

关键词 熵-焓互补 蛋白质变性 水分子重组

作为在分子水平上理解生命现象的中心问题之一, 蛋白质变性一直吸引着科学家的研究兴趣^[1]. 蛋白质变性在医药科学、食品科学、生物技术乃至人们日常生活中都占有重要地位. 尽管该领域的研究已取得很大进展, 但人们对于诸如天然蛋白质稳定性的驱动力^[2]以及 Privalov 熵-焓收敛之谜^[3]等一些问题仍然知之甚少.

物理化学研究为蛋白质变性提供了基本数据^[4]. 迄今为止, 对于各种蛋白质在不同条件下的变性, 已经积累了大量精确的热力学数据, 并对这些数据开展了系统的研究^[5~7]. 本文报道蛋白质变性中的熵-焓互补现象及其理论解释.

我们共收集了 3 089 组有关蛋白质变性的热力学数据, 每组数据包括焓变(ΔH_T)、熵变(ΔS_T)、自由能变化(ΔG_T)以及热容变化(ΔC_p). 这些数据全部按照(1)~(3)式转化成 298 K 时的数值, 其中假设 ΔC_p 不随温度变化.

$$\Delta H_{298K} = \Delta H_T + \Delta C_p (T_{298K} - T), \quad (1)$$

$$\Delta S_{298K} = \Delta S_T + \Delta C_p \ln \frac{T_{298K}}{T}, \quad (2)$$

$$\Delta G_{298K} = \Delta H_{298K} - 298 \Delta S_{298K}. \quad (3)$$

ΔH_{298K} 与 $T_{298K} \Delta S_{298K}$ 之间, 以及 ΔH_{298K} 与 ΔG_{298K} 之间线性回归给出了如下结果(图 1):

$$T_{298K} \Delta S_{298K} = 0.910 \Delta H_{298K} - 12.76 \quad (r = 0.991, sd = 15.75, n = 3089, P < 0.0001), \quad (4)$$

$$\Delta G_{298K} = 0.090 \Delta H_{298K} + 12.76 \quad (r = 0.595, sd = 15.75, n = 3089, P < 0.0001). \quad (5)$$

在 $\Delta H_{298K} - T \Delta S_{298K}$ 回归方程(4)中, 对于如此庞大的样本($n = 3089$), 相关系数达到了 0.991, 的确十分惊人. 其中, 0.910 的斜率表明 ΔH_{298K} 的变化中有 91% 被相应 ΔS_{298K} 的变化所抵消, 结果只有 9% 贡献于 ΔG_{298K} . 相比之下, 在 $\Delta H_{298K} - \Delta G_{298K}$ 回归方程(5)中, 相关系数只有 0.595. 有趣的是, 0.090 的直线斜率表明只有 9% 的焓变对自由能变化作出贡献, 与(4)式对应, 其余 91% 的焓变被熵变抵消(或互补). 线性回归结果显示蛋白质变性中熵变和焓变发生了互补. 在化学和生物学中熵-焓互补是一个十分有趣的研究课题^[8~12].

目前, 对于蛋白质变性中熵-焓互补的本质还缺乏理论解释. 这里, 我们提出了一种描述蛋白质变性中熵-焓互补现象的模型. 考虑一个含有一定量蛋白质的水溶液体系, 溶液中有 5 种可分辨的物种达到了平衡^[13], 即 W/w, N/w, W/n, U/w 和 W/u. 其中, 大写字母表示某一物种的化学本质, 如水(W)、天然蛋白质(N)和变性蛋白质(U); 之后的小写字母描述某一物种所感受到的环境约束. 例如, W/w 表示了一个在水溶液本体中的水分子, 它仅被其他水分子所包

围. 然而, W/u 表示一个处于变性蛋白质分子的水合壳层中的水分子, 它与该蛋白质分子直接接触. 这样, 该溶液体系在常温(T)、常压(P)下的焓值(H)为

$$H = h_{N/w} n_{N/w} + h_{U/w} n_{U/w} + h_{W/n} n_{W/n} + h_{W/u} n_{W/u} + h_{W/w} n_{W/w}, \quad (6)$$

其中, h 表示偏摩尔焓, n 表示某一物种的量.

考虑到蛋白质的变性由一系列准静态过程构成. 其中每一微元过程的焓变(dH)对应着微元量($dn_{N/w}$)的天然蛋白质发生了变性. 根据 Gibbs-Duhem 方程, 整个蛋白质变性的焓变(DH)可以表达为

$$\begin{aligned} \Delta H &= \int dH = \int (h_{N/w} dn_{N/w} + h_{U/w} dn_{U/w} + h_{W/n} dn_{W/n} + h_{W/u} dn_{W/u} + h_{W/w} dn_{W/w}) \\ &= \int [(h_{N/w} - h_{U/w}) dn_{N/w} + h_{W/n} dn_{W/n} + h_{W/u} dn_{W/u} + h_{W/w} dn_{W/w}]. \end{aligned} \quad (7)$$

类似地, 熵变(ΔS)和自由能变化(ΔG)分别为

$$\Delta S = \int [(s_{N/w} - s_{U/w}) dn_{N/w} + s_{W/n} dn_{W/n} + s_{W/u} dn_{W/u} + s_{W/w} dn_{W/w}] \quad (8)$$

和

$$\begin{aligned} \Delta G &= \int [(m_{N/w} - m_{U/w}) dn_{N/w} + m_{W/n} dn_{W/n} + m_{W/u} dn_{W/u} + m_{W/w} dn_{W/w}] \\ &= \int (m_{N/w} - m_{U/w}) dn_{N/w}, \end{aligned} \quad (9)$$

这里, s 和 m 分别代表了偏摩尔熵和化学势. 有趣的是, 自由能变化中的末 3 项可以被消去. 这是由于整个系统在准静态过程的每一步中处于热力学平衡, 因此, 下列化学势始终相等^[14]:

$$m_{W/n} = m_{W/u} = m_{W/w}. \quad (10)$$

同时, 水分子总量在蛋白质变性过程中保持不变, 即

$$dn_{W/n} + dn_{W/u} + dn_{W/w} = 0. \quad (11)$$

(9)式中被消去的 3 项所描述的正是在蛋白质变性过程中水分子的重组引起的自由能变化, 可见, 水分子的重组对于蛋白质变性过程的自由能变化没有贡献. 但是, 水分子的重组对蛋白质变性的焓变和熵变都有贡献. 这是由于在热力学平衡时, 同一物质由于环境约束不同而造成的多个不同种类, 它们的偏摩尔熵和偏摩尔焓一般是有差异的. 在水溶液中, 由于强烈的溶剂间氢键作用, 这种差异甚至会变得很大^[15]. 鉴于不同的蛋白质或同一蛋白质在不同条件下的变性所引起水分子重组的程度很不相同^[16], 因此, 在这些过程中熵变和焓变的差异也很大. 但是, 由于水分子重组对蛋白质变性的自由能变化没有贡献, 因而, 自由能变化不会随着水分子重组程度的不同而变化. 简言之, 水分子重组在蛋白质变性中显著地贡献于 ΔH_{298K} 和 ΔS_{298K} 而不影响到 ΔG_{298K} , 这一性质构成了熵-焓互补现象的物理本质.

近期研究显示大多数天然蛋白质的稳定性既不很强也不很弱^[17]. 这一结果也可以由图 1 中不同的蛋白质具有相似的 ΔG_{298K} 所证实. 显然, 稳定性太弱是有害的, 它使得蛋白质对微小变化过于敏感. 然而, 稳定性太强也是不利的, 它使得蛋白质不易降解或难以发挥生理功能. 此外, 过于稳定的蛋白质还容易陷入错误甚至致命的变性状态. 由于 ΔH_{298K} 和 ΔS_{298K} 的变化范围远大于 ΔG_{298K} , 因此, 使得 ΔG_{298K} 能够限于一个小范围的物理因素对生命现象十分重要. 熵-焓互补正好起到了这样的作用.

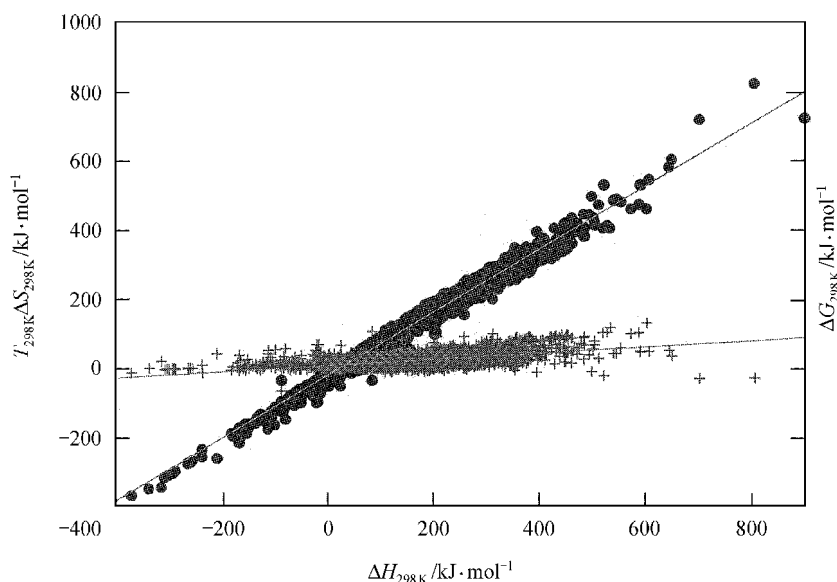


图1 蛋白质变性的熵-焓和自由能-焓的关系

●——熵-焓, + ——自由能-焓

但是, 由于小的 ΔG_{298K} 也可以起因于小的 ΔH_{298K} 和 ΔS_{298K} , 因此, 奇怪的是生命进化为何使得蛋白质变性的 ΔH_{298K} 和 ΔS_{298K} 数值较大而且变化剧烈. 首先, 这样可以满足生物多样性的要求. 其次, 由于焓变与过程的热交换有关, 因此, 大的焓变将使得蛋白质在变性时需要大量的热能, 从而在一定程度上稳定了蛋白质. 这也增强了生命承受环境变化尤其是外界温度变化的能力. 所以, 熵-焓互补在满足生物对蛋白质变性小的自由能变化的要求的同时, 不必牺牲蛋白质的生物多样性.

本文的这一发现还给解释 Privalov 熵-焓收敛之谜, 即蛋白质变性的熵变和焓变在进行氨基酸残基数目校正后在 110 °C 附近收敛^[3], 提供了新的信息. 这一问题尽管得到大量的研究, 但迄今仍然缺乏微观解释^[17~24]. 大多数研究只关注热力学性质的基团加和性质, 但是这样的模型停留在唯象阶段. 图2给出了 298 和 383 K^[3]时蛋白质变性中每摩尔氨基酸残基的熵变与焓变之间的回归结果. 显然, 在 298 K 时蛋白质变性表现出很好的熵-焓互补, 相关系数达到了 0.979. 但是, 在 383 K 时, 即在发生熵-焓收敛的温度下, 蛋白质变性表现出很差的熵-焓互补. 由于互补现象起因于水分子重组, 383 K 时差的熵-焓互补可能是由于在此温度下水分子重组既不贡献于自由能变化, 也不贡献于焓变和熵变. 这意味着在 383 K 时蛋白质的熵变和焓变完全依赖于蛋白质自身的分子内作用力. 由于不同的蛋白质同样都是由氨基酸构成, 故蛋白质分子间作用力在进行氨基酸残基数目校正后应该相似. 所以, 在 383 K 时蛋白质变性表现为熵-焓收敛现象. 这一解释包含了基于疏水作用的熵-焓收敛理论, 但是它更加简明. 由于这一解释完全基于实验事实, 因而显得更为可靠.

综上所述, 大量实验结果表明蛋白质变性的熵变和焓变互补, 水分子重组是导致这一现象的原因. 熵-焓互补在不牺牲生物多样性的同时满足了自然进化的需要, 即蛋白质变性应具有小的自由能变化. 在 383 K 时水分子重组不再贡献于蛋白质变性的熵变和焓变, 导致了在

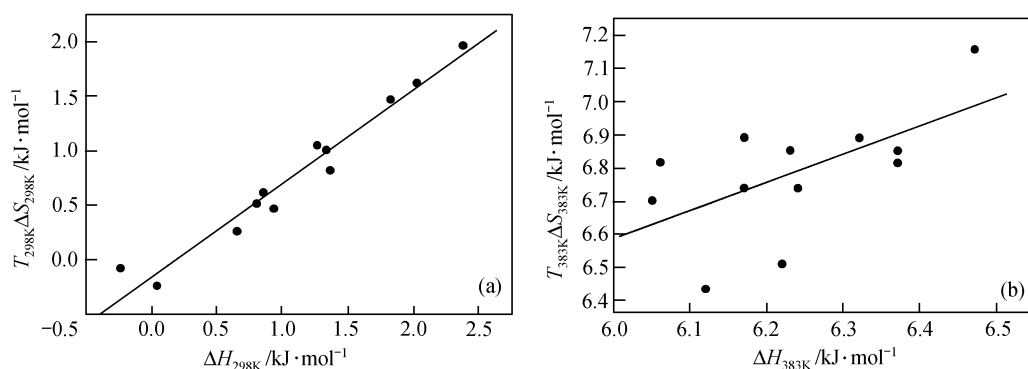


图 2 蛋白质在 298 K (a) 和 383 K (b)变性的熵-焓互补关系

线性关系符合下列方程: $T_{298K}\Delta S_{298K} = 0.871 \Delta H_{298K} - 0.155$ ($r = 0.979$, $sd = 0.146$, $n = 12$, $P < 0.0001$),

$T_{383K}\Delta S_{383K} = 0.868 \Delta H_{383K} + 1.378$ ($r = 0.601$, $sd = 0.157$, $n = 12$, $P = 0.0387$)

该温度下差的熵-焓互补, 但同时也导致了在该温度下熵-焓收敛。

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 29772031)。

参 考 文 献

- 1 Dobson C M, Šali A, Karplus M. Protein folding: a perspective from theory and experiment. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1998, 37 (7): 868~893
- 2 Dill K A. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 1990, 29 (31): 7133~7155
- 3 Privalov P L, Gill S J. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv Protein Chem*, 1988, 39 (1): 191~233
- 4 Eftink M R, Ionescu R. Thermodynamics of protein unfolding: questions pertinent to testing the validity of the two-state model. *Biophys Chem*, 1997, 64 (1-3): 175~197
- 5 Murphy K P, Privalov P L, Gill S J. Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds. *Science*, 1990, 247 (4942): 559~561
- 6 Gomez J, Hilser V J, Xie D, et al. The heat capacity of proteins. *Proteins*, 1995, 22(4): 404~412
- 7 Makhatadze G, Privalov P L. On the entropy of protein folding. *Protein Sci*, 1996, 5(3): 507~510
- 8 Lumry R, Rajender S. Enthalpy-entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules: a ubiquitous property of water. *Biopolymers*, 1970, 9(10): 1125~1227
- 9 Linert W, Jameson R F. The isokinetic relationship. *Chem Soc Rev*, 1989, 18(4): 477~505
- 10 Dunitz J D. Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem Biol*, 1995, 2: 709~712
- 11 Galliccio E, Kubo M M, Levy R M. Enthalpy-entropy compensation in solvation and ligand binding revisited. *J Am Chem Soc*, 1998, 120 (18): 4526~4527
- 12 Rekharsky M V, Inoue Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chem Rev*, 1998, 98(5): 1875~1917
- 13 Grunwald E, Steel C. Solvent reorganization and thermodynamic enthalpy-entropy compensation. *J Am Chem Soc*, 1995, 117(21): 5687~5692
- 14 Qian H. Enthalpy-entropy compensation: conformational fluctuation and induce-fit. *J Chem Phys*, 1998, 109(22): 10015~10017
- 15 Pimentel C C, McClennan A L. Hydrogen bonding. *Ann Rev Phys Chem*, 1971, 22: 347~385
- 16 Makhatadze G I, Privalov P L. Hydration effects in protein unfolding. *Biophys Chem*, 1994, 51 (2-3): 291~309
- 17 Doig A J, William D H. Why water-soluble, compact, globular proteins have similar specific enthalpies of unfolding at 110°C. *Biochemistry*, 1992, 31(39): 9371~9375

- 18 Baldwin R L. Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(21): 8069~8072
- 19 Lee B. Isoenthalpic and isoentropic temperatures and the thermodynamics of protein denaturation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(12): 5154~5158
- 20 Murphy K P, Gill S J. Solid model compounds and the thermodynamics of protein unfolding. *J Mol Biol*, 1991, 222(3): 699~709
- 21 Baldwin R L, Muller N. Relation between the convergence temperature T_h^* and T_s^* in protein unfolding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(15): 7110~7113
- 22 Fu L, Freire E. On the origin of the enthalpy and entropy convergence temperature in protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(19): 9335~9338
- 23 Ragone R, Colonna G. Enthalpy-entropy balance and convergence temperatures in protein unfolding. *J Biol Chem*, 1994, 269(6): 4047~4049
- 24 Garde S, Hummer G, Garcia A E, et al. Origin of entropy convergence in hydrophobic hydration and protein folding. *Phys Rev Lett*, 1996, 77(24): 4966~4968

(1999-10-09 收稿, 2000-02-03 收修改稿)