タンパク質の水和と溶質の結合： 選択的相互作用 (Preferential Interaction) との関係

Alliance Protein Laboratories 荒川 力

慶応大学医学部 喜多淑子

Solutes at high concentration, e.g., above 0.1-0.5 M, are often required during purification, storage and analysis of proteins. The fact that high concentrations are required implies that the interactions of the solutes with the proteins are weak, yet play a major role in these processes of the proteins. Interactions that occur at such high concentrations are called “preferential interactions” and are related to hydration and solute binding of the proteins. This short chapter describes the relation between preferential interaction and binding of water and solutes with the proteins.

preferential interaction / solute / hydration / solute exclusion / protein / stability

1. はじめに

薬品候補として、あるいは遺伝子・タンパク質の機能解析の試料として、純度が高く安定なタンパク質がますます必要とされている。タンパク質の安定性が悪く変性や会合を起こすと、薬の場合は毒性の原因となり、試薬の場合は信憑性の低いデータの原因ともなりかねない。タンパク質の生産、精製、保存、解析には、タンパク質溶液に添加されるさまざまな溶質の存在が不可欠である。例えば、疎水クロマトグラフィーにおける硫酸や、不安定なタンパク質の精製、保存に使用されるグリセロールのような安定化剤があげられる。このように使われる高濃度の塩やポリマー、リフォールディングに使われるアルギニン、安定化剤として使われる糖やアミノ酸、解析に使用される有機溶媒等はタンパク質と何らかの相互作用を起こす。このような高濃度の溶質とタンパク質との相互作用の理解は、溶質を適切に活用する際に必須である。また、溶質が予想外の影響を示すことがあるが、その原因究明にも役立つ。

タンパク質と溶媒成分との結合を表すのに「選択的相互作用 (preferential interaction)」という言葉がある。例えば、ショ糖とタンパク質との結合を結合といわずに選択的相互作用と呼ぶ。それは、タンパク質の安定化に有効な高濃度では、ショ糖とタンパク質の結合だけでなく、水とタンパク質との結合も寄与してくるた

めである。そのために、たとえショ糖の結合が起こっていても、透析平衡の実験（タンパク質溶液を溶質を含む溶液と平衡化する実験）によるとその結合は負となる場合がある¹⁾。原因はともかく、このように負の値を表すのに結合という言葉を使うのはいかにもおかしい。なぜショ糖がたとえ結合していても透析平衡で負になるかという、それはタンパク質表面に対する親和性が水のほうがショ糖よりも強いからである。呼び方はどうであれ、このタンパク質と溶質との選択的相互作用の理解が、溶質のタンパク質への影響の理解に必須である。

選択的相互作用は透析平衡の結果を表すのに使われてきた。一方、溶質のタンパク質への結合は透析平衡よりも放射能ラベルや蛍光ラベルを使う測定や、酵素活性等のタンパク質機能への添加溶質の影響等から調べられてきた。このような結合実験とは異なり、透析平衡実験では、タンパク質と溶質、あるいは水との多様な相互作用の結果が測定値として現れる。具体的に溶質（先に述べたショ糖にあたる）がタンパク質とどのように結合しているのかわからないが、この多様な相互作用の様式を結合として表した方が実感しやすいのも事実である。ここでは、結合と選択的相互作用との関係を具体的に述べることで、透析平衡で得られる選択的相互作用の意味をよりわかりやすくすることを試みた。

Hydration and Solute Binding of Protein: Relation to Preferential Interaction

Tsutomu ARAKAWA¹ and Yoshiko KITA²¹Alliance Protein Laboratories²Keio University Medical School

2. 選択的相互作用と結合との関係

選択的相互作用のパラメーター、 ξ_3 は(1)式によって表される^{2), 3)}.

$$\xi_3 = A_3 - g_3 A_1 \quad (1)$$

ここで ξ_3 がタンパク質（成分2）と溶質（成分3）との選択的相互作用を表す。 A_3 はタンパク質1gに結合する溶質の量、 A_1 は水の結合量である。ここで結合と違うのは第2項目の存在である。すなわち、 ξ_3 は溶質の結合量 A_3 のみならず、水の結合量（水和量） A_1 や溶質の溶液中での濃度 g_3 にも依存する。通常放射能ラベルや蛍光ラベル等を使って測定するような結合では第2項の存在を無視している。しかし、透析平衡実験で測定すれば、放射能ラベルした溶質であろうが、蛍光ラベルした溶質であろうが、第2項の寄与は多かれ少なかれある。ただし溶質濃度が小さくても結合が起こるときは第2項を無視できる。

このことをもう少し詳しく述べる。式(1)に戻ると、先に述べたように A_3 は溶質の結合量、 A_1 は水の結合量である。いずれも単位をgで表すことにする。 g_3 は溶質の濃度、すなわち水1gに溶けている溶質のグラム数である。溶質の濃度が低いところ、すなわち $g_3 \sim 0$ の条件でも結合が起こるなら、 $g_3 A_1 \sim 0$ となって、 $\xi_3 = A_3$ となる。すなわち結合が強い溶質の場合、その濃度が低いところでも $A_3 > 0$ となるので、選択的相互作用は結合とほぼ等しくなる。問題は溶質の結合が濃度の高いところでしか起こらない場合である。その場合、 $g_3 > 0$ すなわち $g_3 A_1 > 0$ となり、第2項の存在を無視できなくなる。もちろん透析平衡ではなく放射能ラベルで結合を測定すれば、タンパク質に直接結合した放射能量を測るので、 ξ_3 ではなく A_3 が測定されることになる。第2項が無視できない理由は次に述べる水和 A_1 の存在である。

3. 水和

A_1 は水の結合量である。タンパク質は水溶液中では水を結合している。タンパク質溶液を乾燥させても、この結合している水を完全にとり除くのは難しい。それほど強く結合している。結合水の存在はいくつかの実験で証明されている。その1つが凍結NMRである^{4), 5)}。タンパク質溶液を凍結すると凍結しない水の存在がNMRの実験で明らかになる。尿素の存在下でも凍らない水の存在が認められる。そのような水の量は1gのタンパク質あたり大体0.3gである。

乾燥したタンパク質を水蒸気と平衡にするとタンパク質は蒸気圧に依存して水を結合する。この水の結合

量をタンパク質の機能、例えば酵素活性に対してプロットすると、結合量が0.3gぐらいのところで機能回復が起こる⁶⁾。すなわちタンパク質の機能回復にはこの程度の水の結合が必須である。また、タンパク質の物性もこの結合量を境に大きく変化する⁷⁾。これ以上の水の添加はタンパク質に結合しない水（自由水）の増加につながることを意味している。

尿素や塩酸グアニジンとタンパク質との結合量を計算する時、変性タンパク質の水の結合量を0.3g程度とすると、結合量の理論値と実測値とが比較よく合致する。すなわち水の結合を仮定することにより、変性した状態のタンパク質への尿素や塩酸グアニジンの結合量を適切に計算できることになる^{8), 9)}。

4. 選択的相互作用の例

4.1 溶質の結合がない場合

ここでタンパク質は水だけを結合するものとして、すなわち水和のみがあるとすると、溶質の結合と選択的相互作用の関係は次のようになる。式(1)より $A_3 = 0$ なので

$$\xi_3 = -g_3 A_1 \quad (2)$$

となり、溶質の結合量は0だが、その選択的相互作用、 ξ_3 は負となる。しかもこの負の値は溶質の濃度とともにより一層負となる。

この関係を模式的に表してみる。ここでタンパク質の濃度 g_2 、溶質の濃度 g_3 を水1gあたりの量として定義しているので、わかりやすくするためにタンパク質1gの表面には1gの水があると仮定する（Fig. 1, 点線で囲まれた部分）。ここでタンパク質は A_1 gの水を結合しているので（黒枠内の部分）、水和していない水

Fig. 1 Diagram of protein surface in the absence of solute binding. Note that neither hydration nor solute binding is discrete at the protein surface, different from the simple illustration shown in this and the following figures. In particular hydration is continuous over the entire protein surface.

Fig. 2 Preferential interaction (no solute binding).

(自由水)の量は $(1-A_1)g$ となる。タンパク質表面の水 1 g 中、この $(1-A_1)g$ だけが溶質が自由に活動できる水の量である。溶質濃度は g_3 であるから、 $(1-A_1)g$ の水に含まれる溶質量は $(1-A_1)g_3g$ である。よって溶質の表面濃度は

$$(1-A_1)g_3 / \{A_1 + (1-A_1)\} \quad (3)$$

で、これから溶質の外液濃度 g_3 を引くと $-g_3A_1$ となり、もちろん式 (1) で $A_3 = 0$ とした場合の値と一致する。このときの溶質濃度をタンパク質表面からの距離に対してプロットしたのが Fig. 2 である。すなわちタンパク質表面の溶質の濃度は $(1-A_1)g_3$ となり表面の外側では g_3 に上昇する。

これから明かなように、 ξ_3 の負の値は溶質濃度が

Fig. 3 Preferential interaction in the absence of solute binding.

上がるとより負となる。これは g_3 が大きくなればなるほど、水量の相対的寄与が大きくなるためである。 A_1 を 0.3 として簡単な計算をしてみたのが Fig. 3 である。上は g_3 が 0.1 の場合の計算で、溶質のタンパク質表面濃度は 0.07 となり外液濃度 0.1 を引いた -0.03 が選択的相互作用の値である。下の図は $g_3 = 1$ としたときの計算である。溶質の表面濃度はこの場合 0.7 で、よって選択的相互作用の値は -0.3 である。溶質の結合量はどちらも 0 としているが、溶質濃度に依存して選択的相互作用の値は 10 倍になる。

4.2 溶質の結合が起こる場合

A_3 が 0 でない場合、タンパク質は水と溶質の両方を結合している。水量を A_1 (黒枠内) とし、溶質の結合量を A_3 (斜線内) とすると、その状態は Fig. 4 及び Fig. 5 で表される。ここでもタンパク質 1 g の表面の水の量 (点線内) を 1 g とすると、 $(1-A_1)g$ が自由水である。よってその中の溶質の量は $(1-A_1)g_3g$ で、これと結合量 A_3g を足したものが表面に存在する溶質量である。これから外液濃度 g_3 を引くと

Fig. 4 Diagram of protein surface in the presence of solute binding.

Fig. 5 Preferential interaction in the presence of solute binding.

Table 1 Model calculation of preferential interaction (constant solute binding)

	Hydration	Free water	A_3	ξ_3
$g_3 = 0.1$	0.3	0.7	0.1	$(0.1 + 0.7 \times 0.1) - 0.1 = 0.07$
$g_3 = 0.2$	0.3	0.7	0.1	$(0.1 + 0.7 \times 0.2) - 0.2 = 0.04$
$g_3 = 0.5$	0.3	0.7	0.1	$(0.1 + 0.7 \times 0.5) - 0.5 = -0.05$

$$\{A_3 + (1 - A_1)g_3\} - g_3 = A_3 - g_3A_1 \quad (4)$$

となり、式（1）と同じになる。この式から、結合量 A_3 が $(A_3/A_1) > g_3$ の関係を満たさない限り選択的相互作用、 ξ_3 の値は正にならない。逆に言えば、いくら溶質が結合していても、溶質の外液濃度と水和量に依存して選択的相互作用は負となってしまうことがある。

もっと具体的にこの関係を表すと Table 1 のようになる。 g_3 を 0.1, 0.2, 0.5 とした場合の計算結果である。ここでは A_1 を 0.3 とし、 A_3 を溶質濃度に関係なく 0.1 と仮定した。すなわち $g_3 = 0.1$ ですでに結合が飽和している場合を仮定した。そのような条件では、 g_3 が 0.1 のとき選択的相互作用は 0.07、 $g_3 = 0.2$ のとき 0.04 と、溶質濃度上昇にともない選択的相互作用は減少するものの正の値をとる。しかし、 g_3 が 0.5 まで上昇すると -0.05 と負の値になる。これは溶質濃度が上昇しても結合量が増えないと仮定したためである。

このような選択的相互作用を溶質濃度に対してプロットすると Fig. 6 のようになる。結合を一定とすると、選択的相互作用は溶質濃度が低いところで正だが、高いところで負に変わる。もちろん Fig. 6 は溶質濃度が 0 の

Fig. 6 Preferential interaction as a function of solute concentration at constant hydration and solute binding.

ところでも A_3 を 0.1 としているので、厳密には正しくない。非常に低い溶質濃度でも結合量が 0.1 であることを意味している。

次に、溶質濃度が高くなると結合が 2 倍になる場合を考える。すなわち上と同じように $g_3 = 0.1$ のときは $A_3 = 0.1$ で、溶質濃度 g_3 が 0.2, 0.5, 1 になると結合量が 2 倍になる場合を考えてみる。この計算結果を Table 2 に示す。これからわかるように、 $g_3 = 0.2$ で結合が 2 倍になる場合、 ξ_3 も増加する。しかし、 $g_3 = 0.5$ で結合が 2 倍になるとき、 ξ_3 は正ではあるが $g_3 = 0.1$ のときよりも小さくなる。結合量が 2 倍になるのに g_3 を 1 まで上げる必要があれば、Table 2 の最後に示すように結果として選択的相互作用は負になってしまう。

4.3 溶質がタンパク質表面から排除される場合

溶質がタンパク質表面から排除される場合とはどのような状態を指すのであろうか。そのもっとも明瞭な例は排除体積効果である^{10), 11)}。Fig. 7 に示すように、溶質分子の動的半径 R_s が水分子のそれよりも大きくなると、溶質分子の中心がタンパク質表面から R_s の距離内

Fig. 7 Schematic presentation of solute exclusion.

Table 2 Model calculation of preferential interaction (2-fold increase in solute binding)

	Hydration	Free water	A_3	ξ_3
$g_3 = 0.1$	0.3	0.7	0.1	$(0.1 + 0.7 \times 0.1) - 0.1 = 0.07$
$g_3 = 0.2$	0.3	0.7	0.2	$(0.2 + 0.7 \times 0.2) - 0.2 = 0.14$
$g_3 = 0.5$	0.3	0.7	0.2	$(0.2 + 0.7 \times 0.5) - 0.5 = 0.05$
$g_3 = 1$	0.3	0.7	0.2	$(0.2 + 0.7 \times 1) - 1 = -0.1$

に近づくことができなくなる。結果的にその分だけ水和（たとえ直接結合していなくても）が増えることになる。

有機溶媒のような非極性分子でも同様のことがある¹²⁾。非極性分子は誘電率が低いので親水性の強い分子、特に電荷をもっているものとは反発する傾向がある。天然状態のタンパク質の表面はきわめて親水性に富み、多くの電荷が露出している。非極性分子はこのような親水性の強い表面から遠ざかるようにするので水和が増える。

最後に挙げられるのは表面張力である。Gibbsは水の表面張力を上昇させる溶質は気・液界面における濃度が低下することを示した¹³⁾。これは界面活性剤と全く逆である。界面活性剤は表面張力を低下させ、気・液界面に吸着する。もしタンパク質表面が気・液界面と同様の性質を示せば、表面張力を上昇させる溶質はタンパク質表面から遠ざかることになる。一般に水の表面張力を高める分子は水中での溶解度がきわめて高い。よってそのような溶質はタンパク質表面との接触を避け、水分子と最大の接触を保とうとする。この効果も水和を大きくする。

5. 選択的相互作用とタンパク質の安定性

タンパク質の安定性は溶質、特に高濃度の溶質の存在に強い影響を受ける。タンパク質が天然状態、Nから、変性状態、Dへと可逆的に変性を起こす場合、

その平衡定数、 $K = [N]/[D]$ は溶質の選択的相互作用、 ξ_3 と次の関係をもつ。

- ① N と D の選択的相互作用、 ξ_3 の値が同じとき：この場合、天然状態のタンパク質も変性状態のタンパク質も溶質と同様の選択的相互作用をもつ。このとき、溶質はタンパク質の安定性に影響を与えない。
- ② 選択的相互作用、 ξ_3 が変性によって減少する場合：この場合Nの方が安定化される。 ξ_3 が正の場合、天然状態のほうがより正の選択的相互作用を示すことになる。これには、変性によって水和が変化せず、溶質の結合量が減少する場合が考えられる。これは溶質が天然状態のタンパク質に特異的に結合するような場合に起こる。 ξ_3 が負の場合、変性状態のタンパク質の選択的相互作用のほうがより大きな負の値を示すことになる。この例として変性によって溶質の結合量が変化せず、水和量が増大する場合が考えられる。実際に水和が増大する

場合と、溶質との反発が増え、結果的に A_1 が大きくなる場合が考えられる。多くのタンパク質の安定化剤の作用がこれに該当する^{11), 14-17)}。

- ③ 選択的相互作用、 ξ_3 が変性によって増大する場合：この場合Dの方が安定化される。 ξ_3 が正の場合、変性状態のタンパク質のほうがより大きな選択的相互作用を示す。これには水和が変性によって変化せず、溶質の結合量が増加する場合が挙げられる。塩酸グアニジン、尿素やSDSのようなタンパク質の変性剤がこの範ちゅうに入る^{8), 9)}。 ξ_3 が負の場合でも次のような場合には ξ_3 が変性によって増大する。すなわち天然状態のタンパク質には結合しないが、変性すれば結合可能になる場合である。2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) のような非極性分子がこれに該当する¹²⁾。MPDは天然状態の親水性表面には結合せず、むしろ反発力で見かけの水和を高めるが、タンパク質が変性すると疎水性領域が露出し結合を起こすようになる。MPDはタンパク質の安定性を大きく低下させる。

6. 選択的相互作用とタンパク質の会合

タンパク質の可逆会合は、精製の過程における相分離・塩析の基本原則である。また、結晶化には溶質による塩析操作が不可欠である。一方、会合がタンパク質の保存中に起これば、薬品の場合には不純物となり、試薬の場合には実験データのノイズとなる。会合反応は

のように単量体が可逆的または不可逆的に会合体へと変化する反応である。

可逆的会合を考えると、 ξ_3 が会合によって大きくなるなら、その溶質は会合を促進する。 ξ_3 が正の場合、 ξ_3 が増えるためには会合体の ξ_3 はより大きな正の値をとらなければならない。 ξ_3 が正になるためには、もちろん溶質はタンパク質に結合しなければならない。会合によって溶質の結合も水和量も減少すると考えられるから、両者の変化量のバランスによって溶質の影響が決まる。 ξ_3 が負の場合、例えば溶質がタンパク質に結合しないような場合 ($A_3 = 0$)、 A_3 はタンパク質が会合しても零のままだが、水和量が減少するので ξ_3 は増大しより小さな絶対値をとる。このような例としてPEGのようなポリマーや塩析塩が存在する^{11), 15)}。

逆に、 ξ_3 が会合によって減少する場合はどうであろうか。もちろんこのような溶質は解離を促進する。会合による A_1 の減少は避けられないので、溶質の結合量の減少が水和量の減少を上まわらなければ、 ξ_3 の減少

は起こらない。そのような溶質として可溶化効果のある塩化マグネシウムやアルギニンがあげられる¹⁵⁾。理由は不明であるが、これらの溶質はタンパク質の会合サイトに結合する性質がある¹⁸⁾。

7. まとめ

これ以外にも溶質の存在が影響する反応として、タンパク質の表面吸着、カラムへの結合、基質や阻害剤との反応等があげられる。これらの反応はすべて水中で起こるので、水の結合、溶質の結合・反発は多かれ少なかれ起こる。タンパク質の安定性や溶解度のみならず、高濃度の溶質が存在するときには、溶質の選択的作用の理解がこのようなタンパク質の反応に対する溶質の影響を理解するのに必須である。

文 献

- 1) Lee, J. C. and Timasheff, S. N. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7193-7201.
- 2) Lee, J. C., Gekko, K. and Timasheff, S. N. (1979) *Methods Enzymol.* **61**, 26-49.
- 3) Inoue, H. and Timasheff, S. N. (1972) *Biopolymers* **11**, 737-743.
- 4) Kuntz, I. D., Brassfield, T. S., Law, G. D. and Purcell, G. V. (1969) *Science* **163**, 1327-1331.
- 5) Kuntz, I. D. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 514-516.
- 6) Rupley, J. A., Gratton, E. and Careri, G. (1983) *Trends Biochem. Sci.* **3**, 18-22.
- 7) Yang, P. and Rupley, J. A. (1979) *Biochemistry* **18**, 2654-2661.
- 8) Lee, J. C. and Timasheff, S. N. (1974) *Biochemistry* **13**, 257-265.
- 9) Prakash, V., Loucheux, C., Scheufele, S., Gorbunoff, M. J. and Timasheff, S. N. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 435-464.
- 10) Sasahara, K., McPhie, P. and Minton, A. P. (2003) *J. Mol. Biol.* **326**, 1227-1237.
- 11) Arakawa, T. and Timasheff, S. N. (1985) *Biochemistry* **24**, 6756-6762.
- 12) Pittz, E. P. and Timasheff, S. N. (1978) *Biochemistry* **17**, 615-623.
- 13) Gibbs, J. W. (1878) *Conn. Acad. Arts Sci.* **3**, 343-524.
- 14) Arakawa, T. and Timasheff, S. N. (1982) *Biochemistry* **21**, 6536-6544.
- 15) Arakawa, T. and Timasheff, S. N. (1982) *Biochemistry* **21**, 6545-6552.
- 16) Arakawa, T. and Timasheff, S. N. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* **224**, 169-177.
- 17) Gekko, K. and Timasheff, S. N. (1981) *Biochemistry* **20**, 4667-4676.
- 18) Arakawa, T. and Tsumoto, K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 148-152.

荒川 力

荒川 力（あらかわ つとむ）

Alliance Protein Laboratories 社社長

1977年大阪府大にて農学博士。1977-1982年ブランダイス大、1982-1984年ワシントン大にてポストドクトラルフェロー。1984-1998年Amgen社にて研究員。1998年から現職

研究内容：一貫してタンパク質の安定性について研究を遂行

連絡先：3957 Corte Cancion, Thousand Oaks, CA 91360, USA

E-mail: tarakawa2@aol.com

喜多淑子（きた よしこ）

慶応大学医学部

連絡先：〒160-0004 東京都新宿区信濃町35

E-mail: kitayo@sc.itc.keio.ac.jp