タンパク質の安定性 ——水溶性タンパク質と膜タンパク質の比較——

東京農工大学工学部 美宅 成 樹

This paper describes the analysis of amino acid sequence as well as the denaturation experiment of soluble globular and membrane proteins. The two kinds of proteins were discriminated by amino acid sequence almost completely, using only the hydrophobicity. The denaturation measurements lead to the conclusion that the hydrophobic interaction determines the form of proteins (i. e. globular or membrane proteins), while the polar interactions play major role in the tertiary structure formation.

protein / amino acid sequence / denaturation / hydrophobic interaction / hydrogen bond

1. はじめに

タンパク質はアミノ酸が重合した巨大分子であり、本来的には自由に形を変えることのできる一種の紐である。しかし、この紐は各部分同士に働く分子内相互作用（静電相互作用、水素結合、ファンデルワールスカ、疎水性相互作用）により構造が制限され、折りたたまってしまふ。最終的には特定の立体構造を取るようになるのである。個々のタンパク質構造の美しさとタンパク質全体の多様性は見事なコントラストを示しており、私達研究者にとって大変な魅力となっている。この美しさと多様性を兼ね備えたタンパク質構造の秘密は実はタンパク質という紐がまだらの紐であるということにある。タンパク質は20種類のアミノ酸からなっており、各タンパク質は異なるアミノ酸配列を持っている。タンパク質によってまだら模様が違うのである。そして、各アミノ酸は他のアミノ酸または溶媒と異なる相互作用をしているので、大きな構造の多様性が生まれてくるわけである。¹⁾

これまで多くの人たちがまだらの紐の謎に取り組み、その美しさと多様性の前に涙を飲んだ。また、実力と好運を持ち合わせた人たちは、謎を解くための重要なキーワードのいくつかを見つけてことができた。しかし、まだらの紐の謎は深く、まだだれも決定的な結論に達していない。そこで、私達も一つくらいはキー

ワードを見い出したいと研究を進めているところである。私達の戦略は二つある。膜タンパク質と水溶性タンパク質を比較すること、および各分子内相互作用の性質の差に注目することである。以下はこれまでに私達が得た成果とその解釈である。何しろ謎の全貌はまだわかっていないのだから、解釈に関しては批判的に読むことをお奨めする。そして、何か気が付いたことがあれば、是非知らせていただきたい。

2. まだら模様のパターンから膜タンパク質と水溶性タンパク質を判別できるか

タンパク質構造の階層としては一次構造、二次構造、三次構造を考えるのが普通である。しかし、任意のポリペプチドがランダムコイルからタンパク質に折りたたまる過程を考えると、二次構造をつくる以前に（または二次構造形成と同時にかも知れないが）、水中で球状になるか膜に入って膜タンパク質になるかの分岐点があるはずである。つまり、タンパク質の立体構造形成の筋道を最も簡単に示せば、図1のようになる。もし最初の方岐を支配する分子内相互作用がわかれば、任意のタンパク質（合成ポリペプチドでも良い）が水溶性タンパク質になるか膜タンパク質になるかを判別できるようになるだろう。

これに関連して、2つの事実が重要である。①多くの水溶性タンパク質の分子構造が報告されているが、それらは例外なく疎水性的な内部構造で特徴付けられている。このことは水溶性タンパク質が水の中で球状になるうえで、疎水性相互作用が本質的な役割を果たしていることを示唆している。²⁾②最近次々と膜タンパク質のアミノ酸配列が明らかになっているが、それらは

Stability of Protein Structure—Comparison between Soluble and Membrane Proteins—

Shigeki MITAKU

Tokyo University of Agriculture and Technology, Faculty of Technology

図1. 蛋白質構造形成の過程. ポリペプチドが折りたたまれて立体構造ができるとき, 球状になるか膜状になるかの分岐がある.

図2. 水溶性蛋白質と膜タンパク質の判別. 一次構造はNBRF蛋白質データベースから100種類以上の膜タンパク質(▲)とすべてのグロビンタイプの水溶性蛋白質(○)を選んだ. 他の水溶性蛋白質でも結果はほとんど同じである.

必ず膜を横切るとおぼしき疎水性セグメントを含んでいる. 膜タンパク質で唯一分子構造がわかっている光合成反応中心の場合を見ても, 実際にきわめて疎水的な数本のヘリックスが膜を横切っており, その推測を確証している³⁾. つまり, あるポリペプチドが水溶性タンパク質になるか膜タンパク質になるかには疎水性相互作用の寄与が大変大きいように思われるのである.

そこで私たちは次のような考え方でタンパク質判別を試みてみた. 図2の中に示した模式図をみていただきたい. 膜タンパク質を構成する数本のヘリックスの長さは, 脂質膜の厚さによって規定されているので, 20~30残基の疎水性セグメントからなっている. ヘリックスとヘリックスをつなぐ親水性セグメントの長

さはものによりまちまちであるが, ポリペプチドが膜内に入り出す必要性から平均40残基程度の周期性が現れることになる⁴⁾. これに対して水溶性タンパク質の場合は, そういう疎水性の周期がでることは, 論理的に考えて少ないと思われる⁵⁾. タンパク質全体の平均の疎水性だけでは膜タンパク質と水溶性タンパク質を十分に判別しにくいことが既にわかっているが, 私達はそれに30残基より長い疎水性の周期を併用してみたところほとんど完全な判別が可能となった⁶⁾.

図2の散布図がその例でNBRFタンパク質一次構造データベースから膜タンパク質(複数のヘリックスが膜を貫通しているもの)とグロビンタイプの水溶性タンパク質を抜き出し, 判別を試みたものである. 疎水性を示すアミノ酸のインデックスはいろいろ工夫されている. ここでは水と非極性媒質の間の移動自由エネルギーとタンパク質構造における水への露出度を組み合わせたKyte & Doolittle (1982)⁷⁾のインデックスを用いた. 各タンパク質の一次構造から疎水性数値列を作り, 平均の疎水性とその周期性を計算した. 周期性の計算には最大エントロピー法によるフーリエ変換を使用し, 30残基より長い領域におけるパワースペクトル密度の最大値を判別の指標とした. グラフの横軸は平均の疎水性インデックス, 縦軸は一次構造全体から得られた30残基より長いパワースペクトル密度である. 膜タンパク質(黒三角)とグロビンタイプの水溶性タンパク質(白丸)は画然と分かれている. ここではグラフは示さないが, 別のタイプの水溶性タンパク質を用いてもほとんどグロビンタイプのタンパク質と同じ領域にプロットされる. その判別率を簡単に計算してみるとほぼ95%という高率の判別が可能であることがわかった. 非常に単純な考え方で膜タンパク質と水溶性タンパク質を判別できた訳である. つまり, タンパク質が立体構造を形成する最初の段階では疎水性相互作用が選択的に働き, 水の中で球状になるか, あるいは膜に侵入するかがまず決定されると考えられる.

3. 水溶性タンパク質の不完全変性状態はどのような力で維持されているか

上記の一次構造解析についての解釈を実験的に確かめるにはどうすればいいだろうか. 私達はこう考えた. 本当に疎水性相互作用で水溶性タンパク質の球状構造ができるのであれば, うまく変性を起こさせることによって高次構造だけを壊し, 球状構造を残すことができるのではないか. このとき, 変性した球状構造は疎

水性相互作用で安定化されているわけだから、その内部はネイティブなタンパク質のものと同じくらい疎水的になっていなければならない。そういう問題意識で私達はウシ炭酸脱水酵素 B の変性実験を行ってきた。炭酸脱水酵素はグアニジン塩酸塩により不完全変性を起こすことがよく知られている。⁸⁾ 不完全変性状態というのは球状ではあるが、三次構造の壊れた状態である。⁹⁾ (不完全変性状態では一般に二次構造がある程度保たれていると考えられている。) 私達がこの炭酸脱水酵素の変性に注目した理由は、この不完全変性状態が実は疎水性相互作用によって形成されているのではないかと考えたからである。また、炭酸脱水酵素は分子量 29000 の単一タンパク質で、S-S 結合を持たないので、実験結果の解釈に曖昧さが少ないという利点もあるのである。

実験結果の要点を述べよう。不完全変性状態の内部の疎水性を調べるためには、ミクロな環境によって敏感に性質を変える蛍光性プローブ (ピレン) を使った。ピレンの蛍光スペクトルは溶媒中で容易に識別できる 3 つのピークを示す (短波長側から順に 1, 3, 5 とする)。ピーク 1 と 3 の蛍光強度比が溶媒の疎水性により大きく変化するので、蛍光色素の濃度や量子収率の変化には関係なく、疎水性の評価が可能となる。(強度比は水中で約 0.6, 多くの有機溶媒中で 0.8 ~ 1.2 である。) 図 3 は炭酸脱水酵素 B の水溶液にピレンを加え、30℃ で強度比を測定したものである。グアニジン塩酸塩の濃度を増やして行くと、1.5 ~ 2.5 M の領域で強度比の増大が見られる。これはちょうど炭

酸脱水酵素 B の不完全変性が起こる濃度に対応している。このことはピレンが不完全に変性した球状構造の中に分配される事を示している。¹⁰⁾ ネイティブな炭酸脱水酵素 B の立体構造を見ると、もちろんその内部は非常に疎水的になっている。しかし、ネイティブ状態では構造はしっかりと形成されており、ピレンは内部に入り込めないと考えられる。また、ランダムコイル状態では疎水性の環境自体が無くなってしまふ。したがって、ネイティブ状態でもランダム状態でもピレンの強度比は低く、水中の値と同じである。これに対し、不完全変性状態は三次構造が壊れ、ピレンが入る自由度がある。しかも、不完全変性状態の内部が極めて疎水的であるため、ピレンは選択的に不完全変性状態の内部に分配されると考えられるのである。(ピレンの水から有機溶媒への分配係数は 10^4 以上である。) タンパク質の立体構造は色々な力のバランスでできており、不完全変性状態を示さない水溶性タンパク質も多い。しかし、炭酸脱水酵素の変性実験は、水溶性タンパク質が球状になるのに疎水性相互作用が本質的な役割を果たしていることの良い例を示していると考えられる。

4. 膜タンパク質のアルコール変性は不完全変性か

炭酸脱水酵素の不完全変性に対応するような不完全変性は膜タンパク質でも起こるだろうか。バクテリオロドプシンは好塩菌ハロバクテリウムハロビウムの膜内にある典型的の内在性膜タンパク質であるが、8 M グアニジン塩酸塩中でも変性せず、機能を保っている。しかし、EISENBACH ら (1979)¹¹⁾ は多くの有機溶媒によるバクテリオロドプシン構造の変化を調べ、アルコールを始めとした水素結合性の有機溶媒が効果的にバクテリオロドプシンを変性させることを報告している。そこで私達は、有機溶媒によるバクテリオロドプシンの変性が不完全変性であるかどうか、またそれが疎水性相互作用で安定化されているかどうかについて調べた^{12), 13)}。その要点をまとめると以下の通りである。

(1) 変性自体はバクテリオロドプシンに含まれるレチナールの光吸収スペクトルから容易にわかる。変性するとリジン 216 に Schiff 塩基結合していたレチナールが外れるので、吸収ピークは本来の 570 nm から 390 nm に移動する。円二色性スペクトルを用いてネイティブなバクテリオロドプシンと 15 M メタノールで変性させたタンパク質の立体構造の変化を調べたの

図 3. ウシ炭酸脱水酵素 B の変性挙動。不完全変性状態では疎水性蛍光プローブ (ピレン) が内部に分配された。

図4. バクテリオロドプシンの円偏光二色性スペクトル (実線はネイティブ状態、破線はメタノールによる変性状態)。

が図4である。ネイティブなバクテリオロドプシンはオプシンのヘリックス構造からくる222nmの負ピークとレチナールに由来する257nmの正ピーク、315nmの負ピークおよび570nmの異常分散を示す。さらに、少し小さいが280nmにシグナルがみられ、これが三次構造から生じることがバクテリオオプシンの測定からわかった。これに対して、15Mメタノールでバクテリオロドプシンを変性させると222nmのピークは全く影響を受けないが、他のピークはすべて消失した。レチナールはタンパク質から遊離することがわかっているから、レチナールによるシグナルが無くなるのは当然として、三次構造も壊れてしまうのである。(最近のバクテリオオプシンの変性実験はより明確な証拠を示している)¹⁴⁾

(2) アルコールによるバクテリオロドプシンの変性ではヘリックス構造が保たれており、これが不完全変性であることは間違いない。ではタンパク質と膜構造との関係はどうなっているだろうか。バクテリオロドプシンは紫膜というパッチ状の膜として取れてくるので、ネイティブな状態では10⁴rpmという比較的低い回転数で沈殿する。もし変性して分子分散するようであれば、このような遠心条件では沈殿することはない。実際には、ネイティブなタンパク質と変性したタンパク質が同じ遠心条件で沈殿することから、膜の状態は保たれていると推測された。

(3) 一次構造中には8個のトリプトファン残基があり、膜の中心付近に分布している。トリプトファンの蛍光は環境の極性によって大きく変わるので、構造の特徴を調べるのに便利である。ただ、トリプトファンからレチナールへのエネルギー移動があると、結果の解釈が曖昧になるので、私達はレチナールを外したバ

クテリオオプシンを用いて、トリプトファンの蛍光測定を行ってみた。その結果、トリプトファンの蛍光スペクトルのピーク波長は、メタノール添加によって変化せず約335nmのままであった。つまり、バクテリオオプシンのメタノール変性にもかかわらず(バクテリオオプシンにおける変性メタノール濃度は3~4Mである)、トリプトファンの環境の極性はほとんど変化していない。

これらの結果からバクテリオロドプシンのアルコール変性は不完全変性であり、疎水性セグメントが膜内に侵入した状態で、三次構造が壊れていることがわかった。結局、タンパク質の形態は違うが、炭酸脱水酵素とバクテリオロドプシンは非常に良く似た変性を起こしている。一次構造の解析と不完全変性の実験は、いずれもタンパク質構造形成の最初の段階が疎水性作用によって支配されていることを示しているのである。

5. どのような結合が切れると三次構造が壊れるか

種々の変性剤を用いて調べてみると、水溶性タンパク質より膜タンパク質の方が容易に不完全変性を起こす。例えば、バクテリオロドプシンの場合、アルコール類、アルデヒド類などほとんどの水素結合性有機溶媒は、メタノールと全く同じ変性を引き起こす。従って、不完全変性において(言い換えれば三次構造が壊れるときに)、どのような性質の力が切れているかを推測するのに膜タンパク質の方が有利だと考えられる。私達は20種類近くの有機溶媒で変性の測定を行い、それを比較してみた^{12), 13)}。その結果は以下の通りで、変性剤の有機溶媒は3つのグループに分けることができた。

- ①親水性の溶媒：2個以上の水酸基を持つジオール、グリセロール、それにグアニジン塩酸塩などを含むグループで、高濃度でも変性を起こさなかった。
- ②疎水性の溶媒：ヘキサンやクロロホルムなどきわめて非極性のグループで、水が存在しないと変性しなかった。水の存在下では相分離に伴い、界面変性を示した。
- ③中間的な疎水性を示す両親媒性の溶媒：アルコール、アルデヒド、ケトン、エステルなど1個の水素結合性基を持つグループで、ある濃度以上で変性が起こった。

ここで、両親媒性のグループが示す変性が不完全変性であり、三次構造だけが壊れていることは既に述べた。その変性濃度を比較してみると、変性剤分子の疎

図5. 12種類の有機溶媒によるバクテリオロドプシンの変性濃度と分配係数の関係 (●: アルコール類, ■: アルデヒド類, ○: エステル類, ▲: アセトン). 分配係数は一般に二つの溶媒の間に分配された第3の物質の濃度比である. ここでは変性剤を第3の物質とした水と非常に疎水的な炭化水素鎖間の分配係数である.

水性と非常に相関が良いことが判った. 図5は12種類のアルコール, アルデヒド, その他の変性剤の分配係数を, 変性濃度に対してプロットしたものである. 両対数のプロットで傾きマイナス1の直線になっているので, 分配係数と変性濃度は反比例の関係にあることが判る. 分配係数というのは水と非極性媒質(この場合膜内部)の間に分配された分子の濃度比である. 従って, 図5の意味するところは, 変性剤の種類を変えても変性に必要な膜内濃度は一定であるということである. そして, その濃度はおよそ2Mであった.

変性剤は, タンパク質の立体構造を作る力のいずれかを切断して変性を引き起こしているはずである. しかも, バクテリオロドプシンの有機溶媒変性は不完全変性であるから, 上記の変性挙動は三次構造形成に関わる力についての情報を与えてくれる. グループ②の変性挙動からわかるように, 水素結合性基の無い有機溶媒が変性能力を持たないことは, 三次構造形成に水素結合が本質的であることを明確に示している. そして, ヘリックス間の結合は膜内の疎水性環境下で起こるのであるから, 膜内に分配したアルコールなどの水素結合性基の濃度が一定値(2M)を越えると変性が起こるということは, 意外にも単純な三次構造形成機構を導いてくれる. 三次構造形成には水素結合を中心とした極性の結合が本質的なのである(図6). グループ①の分子が変性を起こさないこともこの機構で容易に理解できる. グリセロールはもちろん, ジオー

図6. アルコールによる膜タンパク質の変性機構.

膜を横切るヘリックスは側鎖間水素結合で安定化されている. アルコールは膜内に分配され, その水酸基が三次構造を破壊すると考えられる.

ル類も親水的であるため, 膜内に1M以上溶解込むことができないのである(分配係数, 分子量, 密度から簡単に計算することができる).

7. おわりに

タンパク質はまだらの紐であると述べた. しかも, まだら模様は1種類ではない. 1つのポリペプチドに対して, いくつかのまだら模様が重なっているのである. 疎水性相互作用のパターン, 荷電のパターン, 水素結合性側鎖のパターン——最初は疎水性相互作用のまだら模様が紐の上に浮き出している. そして, 疎水的な色が膜内へ入っていく(あるいは, 球状構造の内側へ折れたたまっていく). 疎水性環境が形成されるに従って, その中にある紐の模様が変わってくる. 水素結合や荷電のまだら模様が次第にはっきりしてくるのである. 疎水性環境下では誘電率が低いので, 荷電同士の結合が強くなってからである. ひと通り極性の結合が形成されると, そこにはネイティブな構造がいつの間にか出現している. ——これは, この5年間で行った実験と計算の結果を眺めながら見た, 私の白昼夢である. これからもやりたいことがたくさんある. 中でも, まだらの紐の統計物理はどうしても考えなければならない問題だと思っている.

研究に協力していただいた方は幾田一哉, 柳原憲邦, 石堂佐代子, 諏訪牧子, 片岡良一, 伊藤博康, その他十指に余る. 深く感謝致します.

文 献

- 1) Shultz, G. E., Schirmer, R. H. (1980)
(1980) タンパク質 一次構造. 機能. 進化,
(大井龍夫監訳) 化学同人, 京都.
- 2) PDB データベースを用いれば, 自分で簡単に確かめら

- れる。例えば、磯見次郎 (1987) バソングラフィックス タンパク質・核酸、講談社サイエンティフィック、東京。
- 3) Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., Michel, H. (1985) *Nature*, 318, 618-624.
 - 4) Mitaku, S., Hoshi, S., Abe, T., Kataoka, R. (1984) *J. Phys. Soc. Jpn.*, 53, 4083-4090.
 - 5) Mitaku, S., Hoshi, S., Kataoka, R. (1985) *J. Phys. Soc. Jpn.* 54, 2047-2054.
 - 6) Yanagihara, N., Suwa, M., Mitaku, S. (1987) *Rept. Progr. Polymer Phys. Japan* 30, 719-720.
 - 7) Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
 - 8) Ikai, A., Tanaka, S., Noda, H. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 35-45.
 - 9) Ohgushi, N., Wada, A. (1983) *FEBS Letter*, 164, 21-24.
 - 10) Ishidoh, S., Hirano, Y., Mitaku, S. (1987) *Rept. Progr. Polymer Phys. Japan*, 30, 727-728.
 - 11) Eisenbach, M., Caplan, S. R., Tanny, G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 544, 269-280.
 - 12) Mitaku, S., Ikuta, K., Itoh, H., Kataoka, R., Naka, M., Yamada, M., Suwa, M. (1988) *Biophys. Chem.*, 30, 69-79.
 - 13) 美宅成樹, 幾多一哉, 柳原憲邦, 諏訪牧子, 片岡良一, 伊藤博康 (1988) 蛋白質核酸酵素, 印刷中.
 - 14) Ikuta, K., Mitaku, S. (1988) *Rept. Progr. Polymer Phys. Japan* 31, 613-614.

みたく しげき

出身は東京大学理学部物理学科。現在の所属は東京農工大学工学部材料科システム工学科、要するに化学系の学科。今興味を持っているのは蛋白質の構造形成である。そういう訳で、物理と化学と生物の間で何時もうろろしている。生物物理学会が一番性が合っていると、健康上の問題もあって、今では他の学会をほとんどやめてしまった。趣味は日曜大工と囲碁(強くないけど何時でも相手します)。

☎ 0423-81-4221 内線317