特集 — 蛋白質と圧力 —

液体論でみるタンパク質の体積とその水和効果

Partial Molar Volume and Hydration of Proteins Studied by the Molecular Theory of Solvation

今井 隆志

Takashi IMAI

The partial molar volume (PMV) is the most fundamental thermodynamic quantity in considering the pressure effects on protein stability and function. The PMV is determined by the hydration as well as the geometry of the solute. However, it is difficult to extract the hydration effects from the PMV by the conventional methods. The 3D-RISM theory, which is a modern statistical-mechanical theory of molecular solvation, enables us to analyze the PMV in terms of hydration. In this article, recent applications of the 3D-RISM theory to some subjects concerning the PMV of protein are reviewed. The topics include the volume difference between low- and high-pressure structures, the volume change associated with the helix-coil transition, and the volume change accompanying ligand-protein binding.

[partial molar volume, pressure, protein, hydration, 3D-RISM theory]

1. はじめに

タンパク質の部分モル体積は、第一に、そのおよその大きさや構造の指標となる熱力学量である。X線によりタンパク質の構造が明らかにされる以前は、その構造を知る手掛かりとして非常に重要な熱力学量であった。現在では、そのような意味合いは少し薄れてきたが、それでも、準安定状態やフォールディングの中間体など立体構造が簡単には得られないものについては、それらと天然状態の体積差は、現在でも、それらの構造の情報を与える重要な量として用いられている。タンパク質の部分モル体積のもう一つの重要性は、それが、化学平衡（天然－非天然間の平衡など）の圧力依存性を決定するパラメータであるということである。詳しくは次章で述べるが、タンパク質の高圧変性や圧力効果は、すなわち、タンパク質の部分モル体積の問題として捉えなおすことができる。

タンパク質の部分モル体積は、タンパク質の化学としては最も古い問題の一つであるが、現在でもなおその分子描像については決定版と呼べるようなものはない。それは、タンパク質の部分モル体積における水和の効果についてまだ十分な理解がなされていないのが原因の一つであろう。筆者らは、ここ数

年、タンパク質の部分モル体積の分子描像（特に水和効果）を得るために、液体論によるアプローチを試みてきた。本稿では、その研究について紹介する。しかし、その前に、タンパク質に対する圧力効果と部分モル体積の関係およびタンパク質の部分モル体積とその水和効果について簡単に復習しておくことにしよう。

2. タンパク質の高圧変性と部分モル体積

「タンパク質は高圧下で変性する」という事実は古くから知られているが、その分子メカニズムについてはまだ結論がでていない。しかし、「なぜタンパク質は圧力をかけると変性するか？」と問われれば、その答えの一つは「それは変性構造のほうが天然構造よりも部分モル体積が小さいからである」であろう。それは次の熱力学的関係式に基づいている[1]。

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta \bar{V}}{RT} \quad (1)$$

この式で、 K は天然状態と変性状態の間の平衡定数、 $\Delta \bar{V}$ は天然状態と変性状態の間の部分モル体積差を表す。つまり、系に圧力をかけると化学平衡は部分

モル体積の小さいほうに移動する。しかし、よく考えると、「変性構造のほうが天然構造よりも部分モル体積が小さい」は式(1)を使って「タンパク質は高圧下で変性する」を言い換えているだけであり、「なぜ？」に答えていることにはならない。つまり、高圧変性の問題を体積の問題に置き換えたのである。(ただし、式(1)はあくまで圧力に対する平衡定数の微係数を言っているにすぎないので、高圧下の平衡定数そのものを予言するものではないことには注意が必要である。また、高圧下の構造がいかなるものか(どんな変性構造との平衡を考えればよいか)は別の問題である。これらの点については、ここでは詳しく述べないことにする。)

では、なぜ変性構造のほうが天然構造よりも部分モル体積が小さいのだろうか？ 実は、これについてもまだ答えはでない。単純に考えると、変性構造は天然構造が壊れて広がった構造であるから、体積が大きくなるように思われる。しかし、これは事実と反する。(高圧変性構造が広がった構造であるということが間違っているのか、広がった構造のほうが体積が大きいということが間違っているのかは分からないが、とにかく、この考え方では矛盾することは確かである。)別の視点で見ると、天然構造が壊れて広がれば、天然構造の内部にあった空洞が開放されその分体積が小さくなるとも考えられる。これは一見事実と一致するが、実は、このようにして見積もった体積変化は実際の部分モル体積変化に比べてずっと大きいことが分かっている。それはともかく、ここでいう体積とは、本来、熱力学量である部分モル体積のことである。したがって、まじめに議論しようとするれば、このような幾何学的な考察だけでは話は済まず、溶媒としての水の効果も考えなければならないはずである。例えば、変性に伴い荷電基が水に露出すれば、いわゆる電縮という現象(イオンがその電場によって周りの水を収縮させる現象[2])がおこり部分モル体積は小さくなる。また、疎水基の露出もその水和に関係したなんらかの体積変化を伴う。(一般には部分モル体積を減少させると言われている[3]が、増加させる可能性も示唆されている[4]。)タンパク質の体積変化の分子メカニズムを明らかにする一つのポイントは、このような体積要素をうまくまとめたモデルを構築することであろう。次の章では、現時点で最も受け入れられているタンパク質の体積モデルについて少し詳しく説明する。

3. タンパク質の部分モル体積のモデル

前章でも少し触れたように、タンパク質(あるいは一般に溶質)の部分モル体積 $\bar{V}$ は、タンパク質自体の体積 V_M とタンパク質が存在することによって変化する水(溶媒)の体積変化 ΔV_h とに概念的に分離できる[3, 5]。

$$\bar{V} = V_M + \Delta V_h \quad (2)$$

“タンパク質自体の体積”とは一般に分子体積(molecular volume)を指し、それはタンパク質を構成する原子が占める体積(ファンデルワールス体積: van der Waals volume) V_w とタンパク質の内部や表面に存在する水が入り込めない隙間(空隙体積: void volume) V_v の和であると考える(Fig. 1)。(空隙体積には水が入り込めるタンパク質内の空洞(空洞体積: cavity volume) V_c は含めない。)図中の分子表面(molecular surface)はタンパク質と水が接触する表面を表し、その内側が分子体積である。一方、溶媒接触表面(solvent-accessible surface)は水の重心がタンパク質に最も近づく点の軌跡であり、その内側は排除体積(solvent-excluded volume)と呼ばれている。(このあたりの用語はまだ完全に統一されていないので、それぞれが何を指しているか注意が必要である。)

タンパク質の部分モル体積に対する水和効果 ΔV_h としては2つの寄与が考えられている。一つは、前章で触れた電縮に代表されるようなタンパク質と水の相互作用(主に静電的相互作用)に起因する水の体積変化の寄与である。それを相互作用体積(interaction volume) V_i と呼ぶ。もう一つは熱体積(thermal volume) V_T と呼ばれる寄与である。例えば、メ

Fig. 1. Two-dimensional illustration of the geometric volumes: the van der Waals volume (V_w), the void volume (V_v), and the cavity volume (V_c). Also indicated are two surfaces with different definitions: molecular surface and solvent-accessible surface.

タンの分子体積は $17 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ であるが、その部分モル体積は $36 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ である。メタンのような非極性分子では相互作用体積はほとんど寄与しないと考えられるので、この差を熱体積と帰属できるだろう。熱体積は次のようにイメージすることができる。メタンを水に入れると、メタンのまわりにみっちり隙間なく水が水和するわけではなく、その熱揺らぎによってメタンと水の間に隙間ができる。その隙間が熱体積に対応すると考えられる。(熱体積は本来熱力学的な寄与であるから、メタンと水の間の隙間というのはあくまでイメージにすぎないことは忘れてはならない。)

式(2)ではあらわに表現されていないが、実は、もう一つ部分モル体積への寄与がある。それは、理想気体溶質の部分モル体積(理想項: ideal term) V_{id} に当たるもので、溶媒の等温圧縮率 χ_T を用いて、 $V_{id} = \chi_T RT$ で与えられる。(これが溶媒の圧縮率と関係していることは、次のように考えれば分かりやすい。系に理想気体が増えるとその分(理想気体が壁を押し)系の圧力が増加する。その圧力をもとに戻すには系の体積を増加させなければならない。その増加分が理想項であり、どれだけ体積を増加させれば圧力がもとに戻るかが溶媒の圧縮率 ($\chi_T = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial p} \right)_T$) で決まるのである。) 理想項は、 25°C の水の場合、約 $1 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ と小さいうえに、溶質のいかなる性質(構造や相互作用)にも依存しないので、たいいていの場合(解離などで溶質の分子数が変わらない限り)無視できる。

以上をまとめると、タンパク質の部分モル体積 $\bar{V}$ は、次式のように表される[5]。

$$\bar{V} = V_w + V_v + V_T + V_i + \chi_T RT \quad (3)$$

前の2項はファンデルワールス体積と空隙体積であり、タンパク質の幾何形状から決まる。残りの項は熱体積と相互作用体積および理想項であり、これらはタンパク質-水間の相互作用や水自体の性質によって決まる。

式(3)は、概念としてはよくまとまったものであるが、実用としてはどうだろうか。例えば、熱体積や相互作用体積を実験から求めることができるだろうか。おそらく、よほど大胆な近似をおかない限りそれは無理だろう。そこで我々は、3次元 RISM 理論という最新の液体論[6-8]を用いることにより、これらの概念を生かしつつタンパク質の部分モル体

積を解析することを試みた。次の章で、3次元 RISM 理論とその理論に基づく部分モル体積の計算について概説し、その次の章で、ここ数年我々が行ってきた3次元 RISM 理論によるタンパク質の部分モル体積の計算および解析の実例を紹介したいと思う。

4. 3次元 RISM 理論と部分モル体積の計算

RISM 理論は分子性液体の統計力学理論であり、与えられた原子間ポテンシャルから各原子間の動径分布関数を求めることができる[6]。3次元 RISM 理論はそれを3次元空間に拡張したものであり、溶質のまわりの溶媒の3次元分布を求めることができる[6-8]。現在広く用いられている分子シミュレーションでは、与えられたポテンシャルのもとで分子の配置を時々刻々変化させ、その結果の平均として分布関数を求めるが、RISM 理論では、統計力学から導き出されるポテンシャルと分布関数の関係式を直接解くことにより分布関数を求める。分子シミュレーションのようなサンプリングをしないでよいかわりに、計算可能な方程式にするためにある近似が含まれる。

3次元 RISM 方程式は、3次元空間上の溶媒サイト γ (例えば、水の酸素原子と水素原子) の全相関関数 $h_\gamma(\mathbf{r})$ (3次元分布関数 $g_\gamma(\mathbf{r})$ と $h_\gamma(\mathbf{r}) = g_\gamma(\mathbf{r}) - 1$ の関係にある) と直接相関関数 $c_\gamma(\mathbf{r})$ の関係を定義する式であり、

$$h_\gamma(\mathbf{r}) = \sum_{\gamma'} c_{\gamma'}(\mathbf{r}) * [w_{\gamma\gamma'}^{vv}(\mathbf{r}) + \rho h_{\gamma\gamma'}^{vv}(\mathbf{r})] \quad (4)$$

で与えられる。ここで、最後の項は溶媒の相関関数(ρ は溶媒密度)であり、あらかじめ純溶媒系の RISM 理論を用いて求めておく。“*” は畳み込み積分である。3次元 RISM 方程式から $h_\gamma(\mathbf{r})$ と $c_\gamma(\mathbf{r})$ を求めるには、もう一つの関係式が必要であり、通常、3次元に拡張された HNC 式(近似式)

$$h_\gamma(\mathbf{r}) = \exp[-\beta u_\gamma(\mathbf{r}) + h_\gamma(\mathbf{r}) - c_\gamma(\mathbf{r})] - 1 \quad (5)$$

を用いる。ここで、 $u_\gamma(\mathbf{r})$ は3次元空間上に与えられた溶質全体と溶媒サイト γ とのポテンシャルである。3次元 RISM 理論では、与えられた溶質-溶媒間ポテンシャルと溶媒の密度と温度から、3次元 RISM と HNC の連立方程式を解くことにより、3次元空間上の各溶媒サイトの全相関関数と直接相関関数を求めることになる。

溶質-溶媒間ポテンシャルとしては、分子シミュレーションで通常用いられるポテンシャルパラメータセットを用いればよく、3次元 RISM 理論用の特殊なパラメータは必要としない。例えば、タンパク質については、Amber や Charmm など、水については、SPC/E や TIP3P を用いることができる。

3次元 RISM 理論から得られる分布関数の一例として、Fig. 2 に 3次元 RISM 理論で求めたリゾチーム周辺の水の 3次元分布を示す。3次元分布は、3次元空間における分布を表すため 4次元データになるのですべての情報を図示するのは難しい。そこで、Fig. 2 では、 $g_o(\mathbf{r}) > 2$ (および 4) となる等値面 (つまり、水の (酸素の) 密度がバルク密度の 2 倍 (および 4 倍) 以上ある領域) を図示してある。

部分モル体積 $\bar{V}$ は得られた分布関数 (あるいは直接相関関数) を積分することにより、多原子および 3次元に拡張された Kirkwood-Buff の式[9, 10]

$$\begin{aligned}\bar{V} &= k_B T \chi_T - \int_{V_{\text{cell}}} (g(\mathbf{r}) - 1) d\mathbf{r} \\ &= k_B T \chi_T \left(1 - \rho \sum_{\gamma} \int_{V_{\text{cell}}} c_{\gamma}(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \right) \quad (6)\end{aligned}$$

を用いて計算することができる。(ここで、 $g(\mathbf{r})$ は任意のサイトの 3次元分布関数である。なお、第 1 項は前章で説明した理想項にあたる。) 分布関数は、タンパク質が存在するため水が全く存在しない内側

部分と水和構造を反映した外側部分から成り立っているわけであるから、式(6)からも、部分モル体積がタンパク質の幾何形状と水和の状態によって決まることが分かる。

まとめると、3次元 RISM 理論と Kirkwood-Buff 理論を組み合わせれば、与えられた任意のタンパク質の構造に対して、溶質-溶媒間ポテンシャルと系の熱力学条件 (温度、密度) から部分モル体積が計算できるということである。

5. 3次元 RISM 理論によるタンパク質の部分モル体積の計算と解析

5.1 タンパク質の部分モル体積の計算

我々は、3次元 RISM 理論がどの程度定量的にタンパク質の部分モル体積を再現できるかを検証するために、部分モル体積の実験値が得られている 5 つの代表的なタンパク質を選び、それらの部分モル体積を計算した[11]。(ここで、各タンパク質の立体構造は PDB から得た。) 得られた計算結果と対応する実験値を比較すると (Fig. 3), 3次元 RISM 理論がタンパク質の部分モル体積の実験データをほぼ完全に再現できることが分かる。

タンパク質の部分モル体積は、その大部分が (ポテンシャルの斥力で決まる) タンパク質自体の体積であるから、これぐらい合うのは当たり前だと思う

Fig. 2. Isosurface representation of the three-dimensional distribution function of water oxygen around lysozyme calculated by the 3D-RISM theory. The green surfaces show the areas where the distribution function $g(\mathbf{r})$ is larger than 2 (left) and 4 (right). The lysozyme molecule is represented by the standard space-filling model.

人がいるかもしれない。しかし、液体論の立場からしてみれば必ずしもそうではないのである。事実、動径分布関数を扱う従来の RISM 理論では、溶質の排除効果（溶質の占める空間から溶媒を排除する効果）が完全に反映されず、タンパク質の部分モル体積について非現実的な値を（ときには負の値さえ）与えることもある。ここに示す定量性は、分布関数（に内在する溶質の排除効果）を 3 次元的に取り扱うことのできる 3 次元 RISM 理論を用いてはじめて実現できるものである。

タンパク質の部分モル体積の大部分がタンパク質自体の体積であるという事実は、従来よく利用されてきた幾何学計算によっても見かけの定量性を得ることができる原因になっている。しかし、幾何学計算だけを頼りにすれば、もちろん、本当の水和効果の情報はなにも得られない。3 次元 RISM 理論のすぐれた点は、幾何学的な体積と水和の寄与を同じ理論そして同じモデルの枠組みで同じ分子レベルで扱うことができるところにあることを改めて強調しておく。

5.2 タンパク質の常圧構造と高圧構造の体積差

3 次元 RISM 理論がタンパク質の部分モル体積を定量的に計算できることが分かったので、次に、そ

Fig. 3. Partial molar volumes of five representative proteins, bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI), bovine pancreatic ribonuclease (RNase) A, hen egg-white lysozyme, bovine milk β -lactoglobulin, and bovine pancreatic α -chymotrypsinogen A, calculated by the 3D-RISM theory ($\bar{V}_{\text{theor}}$), plotted against the corresponding experimental data ($\bar{V}_{\text{expt}}$). The solid line marks the exact coincidence.

れを圧力によるタンパク質の構造変化に伴う部分モル体積変化の問題に応用した。それを行うには高圧下でのタンパク質の構造が必要である。水溶液中でのタンパク質の高圧構造を求めること自体が一つの大きな課題であるので、現在得られているタンパク質の高圧溶液構造は非常に限られている。その数少ない例の一つが、高圧 NMR で決定されたニワトリ卵白リゾチームの構造である[12]。我々は、そのリゾチームの常圧（3 MPa）構造と高圧（200 MPa）構造の部分モル体積を（式(1)の観点から常圧下で）3 次元 RISM 理論を用いて計算した[13]（Table 1）。計算の結果、高圧構造のほうが $120 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ だけ体積が小さいことが分かった。この $\Delta \bar{V} = -120 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ という値は、以下のように考えても妥当な値である。常圧構造と高圧構造の体積差 $\Delta \bar{V} = -120 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ が圧力に依存しないとする、圧力が $p_0 = 3 \text{ MPa}$ から $p = 200 \text{ MPa}$ に変化したときの自由エネルギー変化は $(p - p_0)\Delta \bar{V} = -24 \text{ kJ mol}^{-1}$ である。つまり、高圧構造が相対的に 24 kJ mol^{-1} だけ安定化する。通常、天然構造とある非天然構造の自由エネルギー差は熱エネルギー（ $RT = 2.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ）の数倍程度であるので、 $(p - p_0)\Delta \bar{V} = -24 \text{ kJ mol}^{-1}$ の寄与によって常圧（天然）構造と高圧構造の相対的安定性が逆転するというのは十分ありそうなことである。

それでは、この体積変化 $\Delta \bar{V} = -120 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ はどのような寄与によるものだろうか。それを明らかにするために、式(3)に基づく体積の分割を試みた。3 章でも述べたように、式(3)はもともと概念的な分割であるためはっきりとした定義は与えられていない。そこで、我々は、式(3)の各項を 3 次元 RISM 理論の計算の枠組みの中で再定義した[13, 14]。ファンデルワールス体積 V_w と空隙体積 V_v は、用いたポテンシャルから定義される原子半径から（通常の）幾何学計算により求めた。熱体積 V_T は、3 章で述べたメタンの熱体積のアナロジーとして、すべての部分電荷を取り除いた仮想的なタンパク質の部分モル体積 $\bar{V}_{q=0}$ （厳密には、そのうちの理想項を除く部分 $\bar{V}_{q=0}^{\text{ex}} = \bar{V}_{q=0} - \chi_T RT$ ）と幾何体積 $V_M = V_w + V_v$ の差として定義した（ $V_T = \bar{V}_{q=0}^{\text{ex}} - V_M$ ）。相互作用体積 V_l は、電縮効果のアナロジーとして、その仮想タンパク質に部分電荷を導入したときの体積変化とした（ $V_l = \bar{V} - \bar{V}_{q=0}$ ）。

そのようにして分割したときの各体積項（Table 1）を見てみると、結果的に、この体積変化

は幾何学的な体積，特に，空隙体積の減少によるものであることが分かった。つまり，圧力によってタンパク質内部または表面に存在する空隙が一部消滅することによって体積が減少するという分子描像を得た。ただし，ここで用いたリゾチームの高圧構造は，かなり常圧（天然）構造に近いものであり，そういう意味では，高圧変性のかかなり初期の段階をみたということになるだろう。もう少し構造が変化すると熱体積や相互作用体積といった水和の効果が効いてくると考えられる。（最近発表されたユビキチンの高圧構造[15]はもっと構造変化が顕著であるのだが，その構造を用いて同様の解析を行ってみると，熱体積や相互作用体積もその体積変化に効いているようだ。詳細は現在解析中である。）

5.3 ヘリックス-コイル転移に伴う体積変化

それでは，構造が完全に壊れてしまうような場合の体積変化はどのようになるだろうか。我々は，アラニンとリジンを基本配列としてもつ16残基の人工ペプチド（AK16）について，ヘリックス-コイル転移に伴う体積変化を調べた[16]。ヘリックス構造としては理想的な α ヘリックス構造を，コイル構造についてはランダムに生成した64個の構造を用いた。3次元RISM理論を用いて各構造の部分モル体積を計算した結果，平均として， $13.0 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ だけコイル構造の体積が大きいことが分かった。（この値は，対応する実験値 $14.9 \pm$

$0.5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ とよく一致している。）

その内訳（Table 2）を見てみると，空隙の体積増加（ ΔV_v ）が一番大きく，水和の体積変化（ ΔV_t および ΔV_i ）がそれを相殺するかたちで寄与していた。ただし，これはあくまで平均としての描像である。コイルの構造によっては，空隙体積 V_v が減少し熱体積 V_t が増加する場合もある。しかし，Fig. 4に示すように，空隙体積の変化と熱体積の変化が相殺する傾向にあることは確かである。この相殺傾向は，次のように考えると理解しやすい。3章で述べたように，熱体積は，本来，熱力学的な寄与であるが，第一近似としては溶質と溶媒の間の隙間という幾何学的な描像を与えることができる。その概念を適用すると，空隙体積の変化と熱体積の変化の相殺はペプチド内部の空隙とペプチド-水間の隙間の交換とみることができる。つまり，ヘリックス構造が壊れたときに，ペプチド内部の空隙が露出しペプチド-水間の隙間になった，あるいは逆の変化が起こったと考えることができる。（平均的には， $\Delta V_v > 0$ であるので後者の寄与が大きい。）しかし，Fig. 4から分かるように，空隙体積の変化と熱体積の変化は対等ではなく，両者の和は常に正である。また， ΔV_v が大きいほど $\Delta V_v + \Delta V_t$ が大きくなる。その意味では，ヘリックス-コイル転移に伴う体積変化では空隙体積の変化が支配的であるといってもよいかもしれない。

この研究からもう一つ興味深いことが分かった。

Table 1. Partial molar volume $\bar{V}$ ($\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) of hen egg-white lysozyme for the low-pressure (3 MPa) and high-pressure (200 MPa) structures, calculated by the 3D-RISM theory, and its components.

	$\bar{V}$	V_{id}	V_w	V_v	V_t	V_i
3 MPa	9416	1	6082	2581	809	-57
200 MPa	9296	1	6048	2493	803	-49
Difference	-120	0	-34	-88	-6	8

Table 2. Partial molar volume $\bar{V}$ ($\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) of AK16 for the helix and coil structures, calculated by the 3D-RISM theory, and its components.

	$\bar{V}$	V_{id}	V_w	V_v	V_t	V_i
helix	1017.2	1.3	645.1	159.9	203.8	7.1
coil						
Average ^a	1030.2	1.3	645.5	187.5	198.4	-2.7
Difference	13.0	0.0	0.4	27.5	-5.4	-9.6
Standard deviation	7.8	0.0	0.2	18.8	14.3	4.4

^a Average value for 64 random coil structures.

先に述べたように、平均的には、ヘリックスからコイルに転移するときの体積変化は正であるが、各コイル構造についてその体積変化を調べてみると、比較的伸びたコイル構造については、逆に、負の体積変化を伴うことがある。つまり、同じコイル状態といっても、体積の観点から見れば、より体積（空隙）の大きい比較的コンパクトなコイル構造と、より体積（空隙）の小さい比較的伸びたコイル構造が存在するということが分かった。この2種類のコイル構造の存在は、タンパク質の高圧変性構造を考える上でのヒントになるかもしれない。

Fig. 4. Correlation between the void volume change ΔV_v and the thermal volume change ΔV_T associated with the helix-to-coil transition of AK16. The solid line is the least-square fitting. The dotted line indicates $\Delta V_v + \Delta V_T = 0$.

5.4 タンパク質へのリガンド結合に伴う体積変化

タンパク質にリガンドが結合する際の体積変化は、タンパク質の構造変化に伴う体積変化と同じぐらいあるいはそれ以上に重要である。なぜなら、タンパク質へのリガンド結合はタンパク質がその機能を発揮するための最も基本的な素過程であり、そのときの体積変化はすなわちタンパク質の機能に対する圧力効果（圧力制御）と等価な意味を持つからである。

我々は、その最も単純な系として、キセノン-リゾチームの結合に伴う体積変化を調べた[17]。この系は、単にリガンド結合のモデルとしてではなく、麻酔の圧拮抗のモデル系として取り上げた。（キセノンは麻酔分子の一つとして知られている。）麻酔作用の分子メカニズムはいまだ明らかになっていないが、麻酔は圧力をかけることにより効果が薄れることは古くから知られている。もし、麻酔現象が、麻酔分子がタンパク質に吸着することにより引き起こされるのであれば、式(1)により、麻酔分子の吸着は体積を増加させるはずである。実際に、リゾチームにおける2つの既知のキセノン結合部位（基質結合部位（Fig. 2の分子模型における左上部の窪み部分）およびタンパク質内部の空洞）[18]にキセノンを結合させたときの体積変化を3次元RISM理論で計算してみると、基質結合部位への結合では体積が増加したが、内部の空洞への結合では体積はほとんど変化しなかった（Table 3）。その体積変化のメカニズムは、前節でみた構造変化に伴う体積変化の場合とよく似ている。つまり、空隙体積 V_v の増加が熱体積 V_T の減少と拮抗し、結果的に、基質結合部位では空隙体積の増加が打ち勝ち、内部の空洞では両者が相殺する。この過程では、相互作用体積 V_i の変化はそれほど大きくない。

Table 3. Partial molar volume $\bar{V}$ ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$) of xenon, lysozyme, and two complexes, calculated by the 3D-RISM theory, and its components.

	$\bar{V}$	V_{id}	V_w	V_v	V_T	V_i
xenon	28.6	1.3	13.7	0.0	13.6	0.0
lysozyme	9413.8	1.3	6082.4	2580.4	804.4	-54.8
xenon + lysozyme ^a	9442.4	2.7	6096.1	2580.4	818.1	-54.8
complex (substrate binding site)	9451.9	1.3	6096.1	2603.8	802.3	-51.6
ΔV^b	9.5	-1.3	0.0	23.4	-15.7	3.2
complex (internal site)	9440.6	1.3	6096.0	2600.3	789.9	-56.0
ΔV^b	-1.8	-1.3	0.0	19.9	-19.1	-1.2

^a $V_{\text{xenon}} + V_{\text{lysozyme}}$

^b $V_{\text{complex}} - (V_{\text{xenon}} + V_{\text{lysozyme}})$

我々は、さらに、この基質結合部位での体積増加を水和状態の変化からも考察した。Fig. 5はキセノン結合前および結合後の基質結合部位における水和構造（水の動径分布関数およびそれを積分することにより得られる積算水和数）を示している。（動径分布関数は、3次元分布関数を動径方向に平均化することにより求めた。）図から分かるように、基質

結合部位にキセノン1分子が結合することによって、そこから水2分子が排除されている。先の結果と合せて見ると、キセノン1分子が水2分子と入れ替わるときに余分の隙間ができたということが言える。一方、内部の空洞では、キセノン1分子は水1分子と入れ替わるだけであり、余分の隙間は生じない（図は省略した）。これらの結果を総合すると、麻酔の圧拮抗現象は、麻酔分子がタンパク質にゆるく結合するために起こる現象ではないかと推測される。

(a)

(b)

Fig. 5. Radial distribution function $g(r)$ and the running coordination function $N(r)$ viewed from the main-chain oxygen of Gln57 in the substrate binding site: (a) dotted line, $g(r)$ for lysozyme; solid line, $g(r)$ for the xenon-lysozyme complex; dot-dashed line, the difference; (b) dotted line, $N(r)$ for lysozyme; solid line, $N(r)$ for the xenon-lysozyme complex; dot-dashed line, the difference.

5.5 まとめ

これまでの解析結果から、タンパク質の体積変化にはタンパク質内の空隙の体積が大きくかかわっていることが分かってきた。また、その寄与が水和の寄与によって相殺される傾向にあることも分かってきた。しかしながら、それらのバランスと構造変化との関係など、まだまだ分からない点も多い。タンパク質の部分モル体積（変化）の一般的な分子描像を得るには、今後、もっと様々な系の体積変化を調べることが必要だろう。また、これまでの、歴史的な流れに乗り、専ら式(3)のモデルに基づく解析を行ってきた。しかし、そのモデルが決定版というわけではないので、今後、異なる視点からの考察、そして新しい概念の創生も必要になるだろう。

6. おわりに

部分モル体積は、エンタルピーやエントロピーと同様に熱力学量であるが、体積という視覚的なイメージが先行するためであろうか、比較的簡単な問題と捉えられがちである。しかし、実際のところ、タンパク質の体積変化を簡単に説明できるかといえばそうではない。水和効果は幾何学的な体積変化と同じレベルでの重要性をもっており、タンパク質の体積変化を考える上で本質的な寄与をもたらす。本稿では、3次元 RISM 理論を用いたタンパク質の部分モル体積とその水和効果の研究について紹介した。第一に、3次元 RISM 理論のような液体論がタンパク質の水和や熱力学を扱えるようになったこと自体、液体論にとってもタンパク質化学にとっても、大きな一歩である。さらに、それを用いて実験では決して知り得なかったタンパク質の体積に及ぼす水和効果を明らかにできるようになったことにより、タンパク質の体積や圧力効果に関する研究の発展に大きく寄与できると確信している。本稿では体積の問題

だけを取り上げたが、3次元RISM理論は普遍的な統計力学理論であり、水和[19]や分子認識[20]、あるいは水和自由エネルギーをはじめとする他の熱力学量[21]の問題にも応用できる。今後、3次元RISM理論によりタンパク質の水和や熱力学に関する様々な問題が解き明かされると期待している。

謝 辞

筆者が部分モル体積の研究を始めたのは、大学院博士後期課程のときであった。当時の指導教官であり現在も引き続きご支援・ご指導いただいている分子科学研究所・平田文男先生に深く感謝の意を表します。また、本稿で紹介できなかった研究も含め長年にわたり共同研究者としてご助言・ご協力いただいている京都大学・木下正弘先生、NINTおよびアルバート大学・Prof. Andriy Kovalenkoに深く感謝いたします。なお、本稿で紹介したヘリックス・コイル転移の研究は、立命館大学・谷口吉弘先生、加藤稔先生、竹清貴浩氏（現・防衛大）、キセノン・リゾチーム結合の研究は、滋賀医科大学・瀬戸倫義先生、立命館大学・磯貝秀人氏との共同研究の成果であり、ここで改めて謝意を表します。

参考文献

- [1] C. Balny, P. Masson, K. Heremans: *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 3 (2002).
- [2] F.J. Millero: *Chem. Rev.*, **71**, 147 (1971).
- [3] W. Kauzmann: *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1 (1959).
- [4] T. Imai, F. Hirata: *J. Chem. Phys.*, **122**, 094509 (2005).
- [5] T.V. Chalikian, K.J. Breslauer: *Biopolymers*, **39**, 619 (1996).
- [6] F. Hirata, ed.: *Molecular Theory of Solvation* (Kluwer Academic, Dordrecht, 2003).
- [7] A. Kovalenko, F. Hirata: *Chem. Phys. Lett.*, **290**, 237 (1998).
- [8] D. Beglov, B. Roux: *J. Phys. Chem. B*, **101**, 7821 (1997).
- [9] T. Imai, M. Kinoshita, F. Hirata: *J. Chem. Phys.*, **112**, 9469 (2000).
- [10] Y. Harano, T. Imai, A. Kovalenko, M. Kinoshita, F. Hirata: *J. Chem. Phys.*, **114**, 9506 (2001).
- [11] T. Imai, A. Kovalenko, F. Hirata: *Chem. Phys. Lett.*, **395**, 1 (2004).
- [12] M. Refaee, T. Tezuka, K. Akasaka, M.P. Williamson: *J. Mol. Biol.*, **327**, 857 (2003).
- [13] T. Imai, A. Kovalenko, F. Hirata: *J. Phys. Chem. B*, **109**, 6658 (2005).
- [14] T. Imai, Y. Harano, A. Kovalenko, F. Hirata: *Biopolymers*, **59**, 512 (2001).
- [15] R. Kitahara, S. Yokoyama, K. Akasaka: *J. Mol. Biol.*, **347**, 277 (2005).
- [16] T. Imai, T. Takekiyo, A. Kovalenko, F. Hirata, M. Kato, Y. Taniguchi: *Biopolymers*, **79**, 97 (2005).
- [17] T. Imai, H. Isogai, T. Seto, A. Kovalenko, F. Hirata: *J. Phys. Chem. B*, **110**, 12149 (2006).
- [18] T. Prange, M. Schiltz, L. Pernot, N. Colloc'h, S. Longhi, W. Bourguet, R. Fourme: *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **30**, 61 (1998).
- [19] T. Imai, R. Hiraoka, A. Kovalenko, F. Hirata: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15334 (2005).
- [20] N. Yoshida, S. Phongphanphane, Y. Maruyama, T. Imai, F. Hirata: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 12042 (2006).
- [21] T. Imai, Y. Harano, M. Kinoshita, A. Kovalenko, F. Hirata: *J. Chem. Phys.*, **125**, 024911 (2006).

[2006年10月10日受理]

© 2007 日本高圧力学会