

解説

タンパク質の水和と分子体積・圧縮率

月向邦彦

(受取日：2004年7月22日，受理日：2004年8月11日)

Effect of Hydration on the Volume and Compressibility of Protein Molecules

Kunihiko Gekko

(Received July 22, 2004; Accepted August 11, 2004)

This review is devoted to illustrate how the hydration of proteins is related to their volume and compressibility. Partial volume and partial compressibility are thermodynamic (macroscopic) quantities but they are uniquely sensitive to the structures of proteins because the hydration and the atomic packing (cavity) have counteractive effects on these parameters. Compressibility data give important information on the flexibility of the native structure and the conformation of denatured states. Viewing a protein from both the temperature and pressure axes should lead to a new paradigm in protein science.

1. はじめに

タンパク質は生命現象をつかさどる重要な生体高分子であるが，その構造安定性や機能発現には溶媒である水との相互作用（水和）が深く関わっている。言うまでもなく，物質の状態を決定しているのは温度・圧力・体積であり，水溶液中のタンパク質の性質を理解する上でも，熱力学データは欠かせないものとなっている。これまで，変性やリガンド結合などによる熱容量やエンタルピー変化など，温度の効果については多くのデータが蓄積されてきた。¹⁾ 体積や圧縮率など圧力効果については，主として実験上の制約から情報は限られているが，これらは水和の寄与を敏感に反映することから，データの重要性が見直されつつある。水溶液中のタンパク質の熱力学的性質を理解するためには，熱測定の結果と相補して，部分体積や部分圧縮率についての深い理解が必要となる。本稿では，我々の研究を中心に，タンパク質の水和や構造が，体積や圧縮率とどのように関わっているかについて解説する。²⁾

2. タンパク質の水和

部分体積について述べる前に，タンパク質の水和について簡単に触れておこう。タンパク質を水に溶かすと，その電離基の周りには電縮による水和，極性基の周りには水素結合による水和，疎水基の周りには疎水性水和が起こり，タンパク質の周りにはいわゆる水和層が形成される。この水和量の総和は，タンパク質1グラム当たり0.2～0.4 gで，これはタンパク質表面を1～2分子の水分子で覆った量に相当する。この水和水は少なくともタンパク質に強く結合した水（A層）と，弱く結合した水（B層）の2層から成り立っている。³⁾ A層の水は主として電離基や極性基に直接配向した水で，その熱運動は強く束縛されており，回転の相関時間 τ_c は 10^{-6} 秒のオーダーである。一方，B層の水はA層の水との水素結合によりある程度配向した水で（ τ_c は 10^{-9} 秒のオーダー），バルク中の自由水（ $\tau_c \sim 10^{-12}$ 秒）に比べていくぶん動きにくくなっている。通常の水が0℃で凍るのに対し，B層の水は-25℃付近まで，A層の水は-70

Table 1 Assumed values of molar volume (V_w) and adiabatic compressibility ($\beta_{s,w}$) of water of hydration.

State of water	V_w ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)	$\beta_{s,w}$ (Mbar^{-1})
Free water	18	45
Ice	19.6	18
Water around ionic group	15 ~ 15.3	~ 0
Water around polar group	16 ~ 17	~ 18
Water around nonpolar group	~ 17.5	35 ~ 40

付近まで凍らない。しかし、これらの水和層の間には明確な境界があるわけではなく、それぞれの水分子は常に熱運動により入れ替わっている。一般に、変性や解離など分子表面積が増加する反応では、水和量も増加する。言うまでもなく、水和は熱力学的現象であり、水和水の量・構造・性質は、温度・圧力・添加物により敏感に影響を受ける。当然、圧力効果に対しては水和水の体積と圧縮率が問題となる。水の構造の複雑さもあり、これらの値を定量的に見積もることは難しいが、種々のモデル化合物を用いて予測された電離基、極性基、疎水基の周りの水和水の見かけのモル容積と断熱圧縮率の値を **Table 1** に示す。^{2,4)} いずれの水和水も、自由水に比べて体積と圧縮率が減少している。これらの値は常温・常圧下におけるものであり、温度・圧力により変化することを忘れてはならない。また、タンパク質水溶液に塩類や糖などの第3成分が添加されると、タンパク質の水和構造は摂動を受け、タンパク質の周りには水と添加物を含んだ新たな溶媒層が形成される。このような選択的溶媒層も部分体積に反映されるため、混合溶媒を用いる実験では注意が必要である。⁵⁾

3. 部分体積

タンパク質の分子体積は、X線結晶構造をもとにいくつかの解析ソフトを用いて計算することができるが、溶液中で熱力学的に重要な体積は部分体積である。部分体積は、タンパク質自身の体積のほかに溶媒との相互作用（水和）の寄与を含んでおり、温度や圧力の影響を敏感に受け、それぞれ熱膨張率や圧縮率などの熱力学量に反映される。

タンパク質の無限希釈における部分比容 \bar{v}° は、温度・圧力および他のすべての成分の濃度を一定にして、加えたタンパク質1グラム当たりの全体積の変化量として定義される。タンパク質の分子量がわかれば、 \bar{v}° にその値を掛けることにより部分モル体積が得られる。今、タンパク質1グラム当たりの構成原子の van der Waals 体積の和を v_c 、それらが完全にパッキングできないために生じる空隙（キ

Table 2 Partial specific volume, compressibility, and volume fluctuation of proteins in water at 25 °C.

Protein	\bar{v}° ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	$\bar{\beta}_{s^\circ}$ (Mbar^{-1})	$\bar{\beta}_{T^\circ}^b$ (Mbar^{-1})	δV_{rms}^c ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)
Globular proteins				
Soybean trypsin inhibitor	0.713	0.17	4.44	41.1 (0.20)
Trypsin	0.719	0.92	5.16	46.0 (0.28)
Ribonuclease A	0.704	1.12	5.48 (5)	36.2 (0.38)
Peroxidase	0.702	2.36	6.70	68.3 (0.24)
α -Chymotrypsin	0.717	4.15	8.32	62.2 (0.33)
Lysozyme	0.712	4.67	7.73 (12.3)	44.2 (0.43)
Carbonic anhydrase	0.742	6.37	10.5	76.0 (0.34)
α -Lactalbumin	0.736	8.27	12.4	56.9 (0.54)
β -Lactoglobulin	0.751	8.45	11.8	63.6 (0.46)
Myoglobin	0.747	8.98	13.1	64.1 (0.51)
Ovalbumin	0.746	9.18	12.1	101 (0.30)
BSA	0.735	10.5	14.6 (13.4)	135 (0.27)
Fibrous proteins				
Gelatin	0.689	- 2.5		
F-actin	0.720	- 6.3 (20)		
Myosin	0.724	- 18 (20)		
Tropomyosin	0.733	- 41 (20)		

a Taken from Refs.2,4, and 7.

b The values in parentheses represent the experimental data.

c The values in parentheses represent the ratio (%) of δV_{rms} to total protein volume.

ャビティー)の体積を v_{cav} 、それに水和による水の体積変化を Δv_{sol} とすると、 \bar{v}° はこれらの和として次のように表される。^{4,6)}

$$\bar{v}^\circ = v_c + v_{cav} + \Delta v_{sol} \quad (1)$$

前述のように、電離基、極性基、疎水基の水和過程は水の体積減少をともなうため、常温・常圧下では Δv_{sol} は負の値となる。しかし、 v_{cav} とほとんど相殺するため、 \bar{v}° は v_c に近い値になる。タンパク質の解離会合や変性、基質やリガンドの結合などでは、 v_c は変化しないが v_{cav} や Δv_{sol} が影響を受けるため、体積変化が生じることになる。**Table 2** に種々のタンパク質の \bar{v}° の値を示す。多くのタンパク質で \bar{v}° は $0.7 \sim 0.75 \text{ cm}^3 \text{g}^{-1}$ の値をとる。^{4,7)}

4. 部分圧縮率

タンパク質の等温圧縮率 β_T を求めるには、静水圧あるいは超遠心力下で部分比容の圧力依存性を測定する必要がある。しかし、タンパク質は比容の圧力係数が小さいうえ、高圧下では変性や会合、溶媒の選択的吸着などが起こるため、 β_T を実験的に求めることは難しい。一方、断熱圧縮率

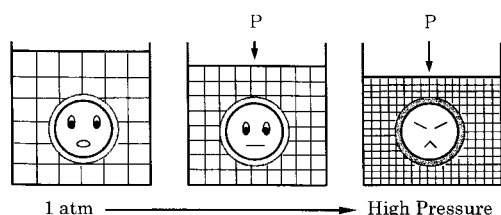


Fig.1 Schematic view of protein compression in water. Water of hydration (dotted region), bulk water (lattice), and cavity in protein molecule are compressed depending on their respective compressibility.

β_s は、音速 u と密度 d の測定から、Laplace の式 ($\beta_s = 1/u^2 d$) を用いて比較的精度よく求めることができる。このため、タンパク質の圧縮率はほとんどこの方法で測定されている。^{4,7-10)}

溶液中のタンパク質の無限希釈における部分比断熱圧縮率 β_s^0 は、部分比容の圧力微分として次のように定義される。

$$\beta_s^0 = - (1/\bar{v}^0)(\delta \bar{v}^0/\delta P)_s \quad (2)$$

\bar{v}^0 は(1)式で示すように三つの寄与を含んでいるが、それぞれの圧縮率に応じてタンパク質は圧縮される (Fig.1)。構成原子の体積や原子間共有結合の距離・角度は通常の圧力では圧縮されたり曲がったりすることはないと考えられるため、 v_c への圧力効果は無視でき、観測される β_s^0 はタンパク質内部のキャピティーと分子表面の水和への圧力効果によって決定されている。^{4,7)}

$$\beta_s^0 = - (1/\bar{v}^0)(\delta \bar{v}^0/\delta P)_s = (1/\bar{v}^0)[(\delta v_{cav}/\delta P) + (\delta \Delta v_{sol}/\delta P)]_s \quad (3)$$

ここで P は圧力を示す。キャピティーは加圧により収縮するが ($\delta v_{cav}/\delta P < 0$)、水和水はバルクの自由水に比べて圧縮されにくい (Table 1)、高圧下では水和による体積減少、すなわち、水和水と自由水の見かけのモル体積の差は小さくなる ($\delta \Delta v_{sol}/\delta P > 0$)。こうして、 β_s^0 に対してキャピティーは正、水和は負の寄与をしており、両者の兼ね合いで β_s^0 は正にも負にもなりうる。負の圧縮率は一見不思議に思えるが、これは体積として部分体積を用いるためである。

上述のように、タンパク質の等温圧縮率 β_T を実測することは難しいが、定圧熱容量 C_p 、熱膨張係数 α がわかれば、次式を用いて β_s の値から β_T を推定することができる。

$$\beta_T = \beta_s + T\alpha^2/C_p d \quad (4)$$

等温圧縮率 β_T と体積 V の平均値のまわりのゆらぎの二乗平均 δV_{rms} の間には、統計熱力学により次の関係が知られている。¹¹⁾

$$\delta V_{rms} = (\kappa T \beta_T V)^{1/2} \quad (5)$$

ここで κ はボルツマン定数、 T は絶対温度である。厳密にはこれらの式は均一系を対象としたものであり、部分体積や部分圧縮率に対しては補正が必要であるが、¹²⁾ β_s^0 の測定から近似的に等温圧縮率や体積のゆらぎについての情報を得ることができる。

5. 天然タンパク質の構造・体積・圧縮率

これまで50種以上のタンパク質の断熱圧縮率が報告されているが、その多くは筆者らのグループと Sarvazyan, Kharakoz, Chalikian らのグループにより測定されたものである。⁷⁻¹⁰⁾ それらの一部を部分比容の値とともに Table 2 に示す。アクチンやミオシンのような繊維状タンパク質は負の β_s^0 を与えるが、ほとんどの球状タンパク質の β_s^0 は正の値となっており、水和効果に比べて分子内部の原子のパッキング効果が支配的となる。興味あることに、同じ球状タンパク質でも β_s^0 の値はかなり広い範囲にわたって変化しており、圧縮率はタンパク質の個性を敏感に反映している。(4)式を用いて β_s^0 から求めた β_T^0 の値は、 β_s^0 より (3~4) Mbar⁻¹ だけ大きくなっている。 β_T^0 の実測が難しいだけに、これらのデータは有用なものと思われる。得られた β_T^0 を用いて(5)式から計算した体積のゆらぎ δV_{rms} を Table 2 の最後の欄に示した。 δV_{rms} はタンパク質1モル当たり 30~200 cm³ で、全体積の0.3%程度と見積もられる。 β_T^0 には水和の寄与も含まれているため、タンパク質自身のゆらぎはこれより数10%高い値になるものと推定される。

5.1 水和とキャピティーの寄与

実測されたタンパク質の β_s^0 に、水和とキャピティーはどの程度寄与しているのだろうか？これらの寄与を分離して見積もることは必ずしも容易ではないが、水和量がわかれば、いくつかの仮定のもとに(1)式の Δv_{sol} と(3)式の ($\delta \Delta v_{sol}/\delta P$) の値を見積もることができる。^{4,7,10)} こうして求めたキャピティーの体積 v_{cav} は、分子全体積の2~5%で、ほぼ水和による体積減少 Δv_{sol} により相殺されている。($\delta v_{cav}/\delta P$) は -(10~20) cm³ g⁻¹ Mbar⁻¹ で、やはり水和による同程度の正の ($\delta \Delta v_{sol}/\delta P$) により相殺されている。しかし、キャピティーの寄与がわずかに勝り、 β_s^0 を正の値にしている。水和水を除いたタンパク質分子自身の圧縮率 β_p は (10~30) Mbar⁻¹ と見積もられている。これは通常の氷の圧縮率 18 Mbar⁻¹ に近いことから、タンパク質分子

自身の固さは水と同程度のもとと推察される。キャビティーの見かけの圧縮率 β_{cav} は $\beta_{cav} = -(1/V_{cav})(\delta V_{cav}/\delta P)$ として計算することができ、数百Mbar⁻¹、例えばウシ血清アルブミンでは(430~530)Mbar⁻¹と見積もられている。この値は常温の水の圧縮率45 Mbar⁻¹の10倍以上も大きく、わずかなキャビティーもタンパク質の構造を柔らかくする効果があることがわかる。Chalikianらは、タンパク質のX線結晶構造をもとに、溶媒露出表面積ASAと β_{s^0} との相関をとおして、圧縮率に及ぼす水和の寄与を考察している。¹³⁾ X線結晶構造からGRASPなどの解析ソフトを用いて直接 V_{cav} を計算することもできる。タンパク質分子内に一定サイズの球状プローブを転がし、その中心の軌跡によって囲まれた体積としてキャビティーが定義される。プローブサイズとしては通常1.2 nm程度の値が用いられる。この方法では小さなキャビティーは検出できないため、キャビティー体積は実際の値よりかなり少なめに見積もられる。最近、筆者らはこうして求めた種々のタンパク質のキャビティー体積と β_{s^0} の関係から、キャビティーの平均の圧縮率として450 Mbar⁻¹の値を得ている[未発表]

Fig.2は圧縮率の温度依存性から、天然リゾチームの P - \bar{v}^0 - T 状態図をシミュレートしたものである。¹⁴⁾ 低温・高圧領域で部分比容が反転する様子がわかる。タンパク質への圧力効果においてしばしば200 MPa付近で反転現象が見られるのは、こうした部分体積の温度・圧力依存性によるものと考えられる。キャビティーは低温・高圧になるほど収縮するので、このような反転は水和、特に疎水性水和への圧力効果に起因するものと思われる。

5.2 圧縮率に影響を及ぼす構造因子

タンパク質の構造は複雑であるが、X線結晶構造と β_{s^0} との相関をとおして圧縮率に及ぼす構造因子を知ることができる。^{2,7)} タンパク質の露出表面積・体積・分子量の関係からは、分子量が大きいほど β_{s^0} は大きくなるものと期待される。しかし、 β_{s^0} と分子量の間には明確な相関は認められず、むしろ \bar{v}^0 が大きいほど β_{s^0} は大きくなる。タンパク質の平均疎水性と β_{s^0} の間には正の相関が認められる。疎水性アミノ酸残基は主として分子内部に局在することから、疎水性側鎖の不十分なパッキングがキャビティーの生成に大きく寄与しているものと思われる。 α -ヘリックスや β -シートそれ自身は水素結合からなる固い構造であるが、かさばった構造のため分子内部へのパッキングが不十分となり、圧縮率を大きくする方向に寄与している。優らは基準振動解析法により、ミオグロビンのヘリックス内部は圧縮されにくい、ヘリックス間が大きく圧縮されることを見出している。¹⁵⁾ アミノ酸組成との相関からも、疎水性と二次構造は圧縮率を決める重要な因子であることがわかる。

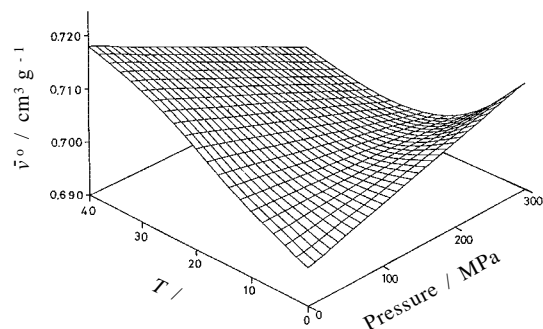


Fig.2 P - \bar{v}^0 - T diagram of lysozyme simulated from the temperature dependence of the compressibility. Ref.14.

ジスルフィド結合(S-S結合)が多いほど、また、一次構造上で遠く離れた位置で架橋されるほど圧縮率は小さく、S-S結合はコンホメーションのエントロピー効果をとおして分子のゆらぎを抑制している。¹⁶⁾ このように、タンパク質の圧縮率はいくつかの構造因子とかなり高い相関をもっており、これらの関係から未知タンパク質の圧縮率をある程度予測することができる。

5.3 リガンド結合の影響

一般にタンパク質とリガンドが結合する際には、それぞれの分子の脱水和をとまなうため、 \bar{v}^0 と β_{s^0} の増加が期待される。しかし、リゾチームと阻害剤であるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の結合では、(GlcNAc)₂、(GlcNAc)₃と鎖長が長くなるにつれ \bar{v}^0 と β_{s^0} は減少する(Table 3)。¹⁷⁾ これは、阻害剤の結合の際に、脱水和の効果を上回る原子のパッキングが起こったことを示しており、主として二つの結合ドメイン間のゆらぎが減少した結果と考えられる。これらの結果は、重水素交換速度に及ぼす阻害剤の影響ともよく対応している。大腸菌のジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)は、159個のアミノ酸からなるジスルフィド結合を持たない単量体酵素で、補酵素NADPHを水素供与体としてジヒドロ葉酸(DHF)をテトラヒドロ葉酸(THF)に還元する反応を触媒する。その反応は五つの中間複合体、DHFR・NADPH、DHFR・NADPH・DHF、DHFR・NADP・THF、DHFR・THF、DHFR・NADPH・THFを経由して進んでいる。DHFRの各種リガンド複合体の \bar{v}^0 と β_{s^0} を、X線結晶構造から計算された溶媒露出表面積ASA、分子内キャビティーの総体積 V_{cav} とともにTable 3に示す。¹⁸⁾ \bar{v}^0 および β_{s^0} とASAや V_{cav} の間にはそれぞれ負および正の相関が見られる。しかし、ここでもリガンドの結合により \bar{v}^0 と β_{s^0} が減少するものが多く、原子のパッ

Table 3 Effects of ligand binding on \bar{v}° and β_s° of proteins.

Ligand	\bar{v}° (cm ³ g ⁻¹)	β_s° (Mbar ⁻¹)	ASA (²)	V_{cav} (³)
Lysozyme (pH 5.5, 25 °C) ^a				
Apo	0.715	5.6		
GlcNAc	0.711	5.2		
(GlcNAc) ₂	0.706	4.2		
(GlcNAc) ₃	0.705	3.1		
Dihydrofolate reductase (pH 7.0, 30 °C) ^b				
Apo	0.741	8.1	8350	250
NADPH	0.741	7.3	8397	224
NADP	0.743	8.0	7982	283
DHF	0.754	8.7	8105	262
THF	0.736	8.0	8138	152
THF·NADPH	0.741	8.3	8180	326
THF·NADP	0.733	6.6	7871	264
MTX·NADPH	0.754	9.8	7979	341

a Ref.17.

b Ref.18. V_{cav} was calculated with a probe radius of 0.9 Å.

キングが重要な役割を演じていることがわかる。実際、ASAは最大でも6%程度しか変化しないのに対し、 V_{cav} は40%も変化している。

5.4 アミノ酸置換の影響

圧縮率に及ぼすアミノ酸置換の影響は興味ある課題であるが、最近、筆者らは大腸菌由来の3種のタンパク質について、一連の変異体の圧縮率測定に世界で初めて成功した。これらの値をTable 4に示す。アスパラギン酸アミノ転移酵素(AspAT)の39位でのアミノ酸置換により β_s° は大きく変化している。この酵素の基質に対する k_{cat}/K_m 値を β_s° に対してプロットすると正の強い相関が見られ、この部位ではゆらぎを大きくする変異ほど酵素機能を上昇させることが期待される。¹⁹⁾ ジヒドロ葉酸還元酵素の活性部位から遠く離れたループ上に存在するGly67, Gly121, Ala145位を置換した場合も、両パラメータは大きく変化している。²⁰⁾ \bar{v}° と β_s° の間には正の相関が見られるが、体積の大きいアミノ酸を導入することにより、むしろ圧縮率は減少する傾向にある。 k_{cat}/K_m 値を β_s° に対してプロットすると、やはり正の相関が見られ、ゆらぎを大きくする変異は活性の上昇をもたらしている。

cAMP受容蛋白質(CRP)は209個のアミノ酸からなるサブユニット2個が会合したホモダイマーで、代表的なアロステリックタンパク質である。DNA結合に直接関与しない種々の部位でのアミノ酸置換により、やはり \bar{v}° と β_s° は

Table 4 Partial specific volume and adiabatic compressibility of mutant proteins.

Mutant	\bar{v}° (cm ³ g ⁻¹)	β_s° (Mbar ⁻¹)
Aspartate aminotransferase (holo, pH 8.0, 25 °C) ^a		
Wild	0.731	4.3
V39A	0.729	4.5
V39L	0.732	5.3
V39F	0.721	1.1
V39Y	0.735	5.2
Dihydrofolate reductase (apo, pH 7.0, 15 °C) ^b		
Wild	0.723	1.7
G67A	0.721	-0.1
G67D	0.724	3.0
G121S	0.721	0.7
G121Y	0.724	-0.7
A145G	0.726	3.1
A145H	0.728	3.8
cAMP receptor protein (holo, pH 7.8, 25 °C) ^c		
Wild	0.750	8.0
K52N	0.752	7.6
D53H	0.756	9.2
S62F	0.749	6.9
G141Q	0.756	9.0
L148R	0.753	9.4
H159L	0.750	7.6
K52N/H159L	0.747	6.9

a Ref.19. b Ref.20. c Ref.21.

大きく変化している。²¹⁾ Fig.3に示すように、CRPに2分子のcAMPが結合するときのそれぞれの結合自由エネルギーの差 $\Delta\Delta G$ と β_s° の間には直線関係が見られ、ゆらぎがアロステリック効果に直接関与していることがわかる。また、 β_s° の大きい変異体はDNA結合の自由エネルギー ΔG_{DNA} も大きく、ゆらぎの大きい変異体ほどDNA結合能も増加している。このように、タンパク質の圧縮率はわずか1アミノ酸置換により大きく変化し、局所構造の変化が分子全体のゆらぎの改変をとおして機能にまで及んでいる。アミノ酸置換により分子表面積は大きくは変化しないことから、このような圧縮率の違いは、水和よりも原子のパッキング状態の改変によりもたらされたものと考えられる。アミノ酸置換により安定性や機能が大きく変化するにもかかわらず、X線構造解析において明確に立体構造の変化が確認された例が少ないだけに、圧縮率のデータは、タンパク質の機能発現にゆらぎがどのように関わっているかを解明するための糸口を与えるものと思われる。

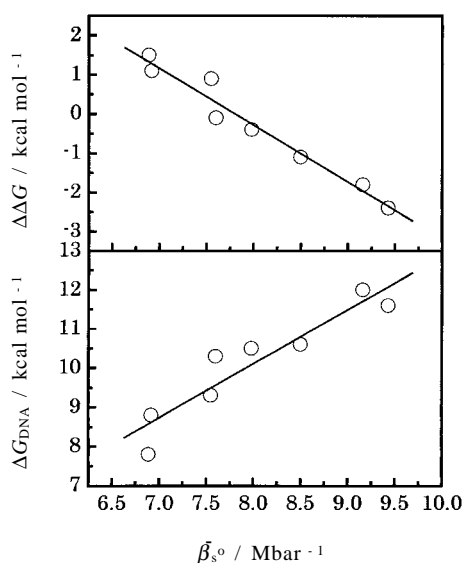


Fig.3 Plots of cAMP binding cooperativity ($\Delta\Delta G$) and the free energy of DNA binding (ΔG_{DNA}) against β_s° of cAMP receptor protein. Ref.21.

6. 非天然タンパク質の構造・体積・圧縮率

近年、タンパク質の立体構造構築原理の解明に向けて、タンパク質の変性状態や折りたたみ中間体、モルテングロビュール (MG) 状態について詳細な研究が行われている。しかし、これらの非天然状態の構造については、X線小角散乱の研究が進められているものの、まだ実験データも少なく不明な点が多く残されている。圧縮率は原子のパッキング状態や分子表面の水和を敏感に反映するため、コンパクトさの重要な指標となる。いくつかの非天然タンパク質の \bar{v}° と β_s° を Table 5 に示す。リボヌクレアーゼA やリゾチームの塩酸グアニジン変性では、これらの値は天然状態に比べて大きく減少しており、構造がランダムコイルに近い状態にまでほどけていることがわかる。^{22,23} しかし、熱変性では、 \bar{v}° は減少するにもかかわらず β_s° は増加している。圧力変性においても、体積の減少と等温圧縮率の増加が観測されている。^{24,25} このような結果は、変性により内部の疎水基が露出し、水に取り囲まれるようになるという単純な変性モデルでは説明できない。変性により露出した疎水基が濃厚溶液状態にあり、その部分にキャビティーが形成されれば、キャビティーの圧縮率は水の10倍以上大きいため、水和量の増加による圧縮率減少を相殺して、全体として圧縮率の増加をもたらすものと考えられる (Fig.4)。こうして、熱や圧力による変性では、ポリペプチド鎖は完全にはほどけておらず、変性の中間段階で留まっている。

Table 5 Partial specific volume and adiabatic compressibility of non-native states of proteins.^a

State	\bar{v}° (cm ³ g ⁻¹)	β_s° (Mbar ⁻¹)
Ribonuclease A		
Native (25)	0.704	1.1
Unfolded by GuHCl (pH 2, 15)	0.630	- 29.1
Unfolded by heat (pH 2.08, 25)	0.666	4.0
Reduced (pH 7, 25)	0.667	- 11.2
Reduced (pH 2, 25)	0.661	- 11.4
Lysozyme		
Native (25)	0.712	4.6
Unfolded by GuHCl (pH 4, 25)	0.579	- 19.9
Reduced (pH 7, 25)	0.704	- 3.4
Reduced (pH 2, 25)	0.682	- 7.0
Cytochrome c		
Native (25)	0.738	3.6
Acid unfolded (pH 2, 25)	0.751	0.3
Molten globule induced by sorbitol (20)	0.748	15.0
Molten globule induced by CsCl (25)	0.751	7.5

a Taken from Refs.10,22,23 and 26.

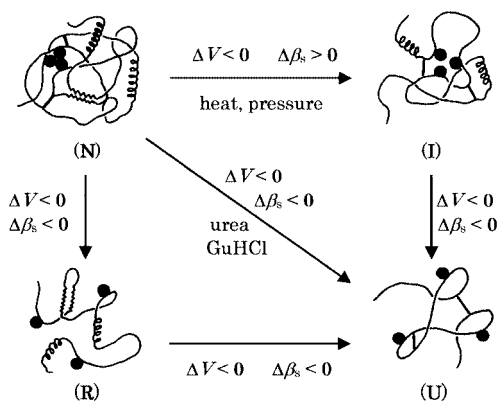


Fig.4 Schematic view of unfolded proteins as predicted by volume and compressibility changes (ΔV and $\Delta\beta_s$). (N) Native state; (I) Weakly unfolded state by heat and pressure; (U) Fully unfolded state by urea and guanidine hydrochloride (GuHCl); (R) Reduced state of disulfide bonds. nonpolar side chain; α -helix; β -strand; -- S-S bond.

シトクロム c の MG 状態では、天然状態に比べて \bar{v}° も β_s° も大きく増加しており、MG 状態はゆらぎの大きい構造と

いえる。^{10,26)}

S-S結合の還元によっても、 \bar{v}° と β_{s° は大きく変化する。リゾチームとリボヌクレアーゼAの4本のS-S結合をすべてカルボキシメチル化したとき、中性pHでは \bar{v}° と β_{s° とも減少し、アンフォールディングによる水和の増加を反映している。¹⁶⁾ pH2ではプラス荷電の反発により構造は大きくほぐれ、 \bar{v}° と β_{s° もさらに減少する。もちろん、 \bar{v}° と β_{s° に及ぼす還元の影響はタンパク質に依存している。S-S結合が多いほど、また、一次構造上で遠く離れた位置に架橋されるほど、還元したときの \bar{v}° と β_{s° の変化量も大きい。こうして、S-S結合はコンホメーションのエントロピー効果をとおして分子のコンパクトさに大きく寄与していることがわかる。

7. おわりに

タンパク質の部分体積や部分圧縮率は、巨視的な熱力学量であるにもかかわらず、溶液中のタンパク質の構造を敏感に反映している。これは、分子表面の水和と分子内キャビティーが相殺するかたちで寄与しているためである。熱容量やエンタルピーなどの温度効果による熱力学量と比較して、体積や圧縮率は視覚的にタンパク質の構造をとらえることができる点で特徴がある。体積や圧縮率は、高圧下でのタンパク質の挙動を理解するためだけでなく、立体構造のゆらぎについても重要な情報を提供する。ここでは省略したが、赤坂氏らによる高圧NMRは、高圧下でタンパク質の構造を原子レベルで評価でき、水和やキャビティーの役割をマイクロなレベルで理解できる道を拓きつつある。²⁷⁾ 温度と圧力の両軸をとおしてタンパク質を眺めることで、タンパク質の新たな描像が見えてくるものと期待される。近年、コンピュータを使った溶液構造の理論計算も活発に進められており、タンパク質の熱力学量の計算が可能になりつつある。実験結果をこれらの計算結果と比較することにより、タンパク質の水和やキャビティーについても新しい知見が得られるものと期待される。本稿が、タンパク質の熱力学的研究の今後の発展に少しでも貢献できれば幸いである。

文 献

- 1) Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology (H. J. Hinz, ed.), Springer-Verlag, Berlin (1986).
- 2) 本稿の内容の補足として筆者の以下の総説・解説を参照ください。月向邦彦, 高圧力の科学と技術 **10**, 101 (2000); 蛋白質・核酸・酵素 **41**, 2025 (1996); 蛋白質・核酸・酵素 **40**, 2461 (1995); 高圧力の科学と技術 **1**, 204 (1992); 生物物理 **24**, 91 (1984); The

Encyclopedia of Molecular Biology (T. E. Creighton, ed.), John Wiley & Sons (1999).

- 3) 曾田邦嗣, タンパク質のかたちと物性 (中村春樹, 有坂文雄編), p.153, 共立出版 (1997); 上平 恒, 逢坂 昭, 生体系の水, 講談社サイエンティフィック (1989); 鈴木啓三, 水および水溶液, 共立出版 (1980); I. D., Kuntz and W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **28**, 239 (1974).
- 4) K. Gekko and H. Noguchi, *J. Phys. Chem.* **83**, 2706 (1979).
- 5) 月向邦彦, 水と生命 - 熱力学から生理学へ - (永山国昭編), 共立出版, p.66 (2000); J. C. Lee, K. Gekko, and S. N. Timasheff, *Methods Enzymol.* **61**, 26 (1979).
- 6) W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **14**, 1 (1959).
- 7) K. Gekko and Y. Hasegawa, *Biochemistry* **25**, 6563 (1986).
- 8) D. P. Kharakoz, *Biochemistry* **36**, 10276 (1997).
- 9) A. P. Sarvazyan, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **20**, 321 (1991).
- 10) N. Taulier and T. V. Chalikian, *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 48 (2002).
- 11) A. Cooper, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 2740 (1976).
- 12) M. J. Blandamer, M. I. Davis, G. Douheret, and J. C. R. Reis, *Chem. Soc. Rev.* **30**, 8 (2001).
- 13) T. V. Chalikian, M. Totrov, R. Abagyan, and K. J. Breslauer, *J. Mol. Biol.* **26**, 588 (1996).
- 14) K. Gekko and Y. Hasegawa, *J. Phys. Chem.* **93**, 426 (1989).
- 15) T. Yamato, J. Higo, Y. Seno, and N. Go, *Proteins* **16**, 327 (1993).
- 16) K. Gekko, A. Kimoto, and H. Kamiyama, *Biochemistry* **42**, 13746 (2003).
- 17) K. Gekko and K. Yamagami, *Chem. Lett.* 839 (1998).
- 18) T. Kamiyama and K. Gekko, *Biochim. Biophys. Acta* **1478**, 257 (2000).
- 19) K. Gekko, Y. Tamura, E. Ohmae, H. Hayashi, H. Kagamiyama, and H. Ueno, *Protein Sci.* **5**, 542 (1996).
- 20) K. Gekko, T. Kamiyama, E. Ohmae, and K. Katayanagi, *J. Biochem.* **128**, 21 (2000).
- 21) K. Gekko, N. Obu, J. Li, and J. C. Lee, *Biochemistry* **43**, 3844 (2004).
- 22) Y. Tamura and K. Gekko, *Biochemistry* **34**, 1878 (1995).
- 23) T. Kamiyama and K. Gekko, *Chem. Lett.* 1063 (1997).
- 24) J. F. Brandts, R. J. Oliveira, and C. Westort,

タンパク質の水和と分子体積・圧縮率

- Biochemistry* **9**, 1038 (1970).
25) S. A. Hawley, *Biochemistry* **10**, 2436 (1971).
26) T. Kamiyama and K. Gekko, *Biochim. Biophys. Acta* **1434**, 44 (1999).
27) K. Akasaka, *Biochemistry* (Current Topics) **42**, 10875 (2003); 赤坂一之, *生物物理* **42**, 206 (2002); 高圧力の科学と技術 **13**, 328 (2003).

要 旨

タンパク質の水和や構造が、体積や圧縮率とどのように関わっているかについて解説した。タンパク質の部分体積や部分圧縮率は、巨視的な熱力学量であるにもかかわらず、溶液中のタンパク質の構造を敏感に反映している。これは、分子表面の水和と分子内キャビティーが相殺するかたちで寄与しているからである。体積や圧縮率は、高圧下でのタ

ンパク質の挙動を理解するためだけでなく、天然状態における立体構造のゆらぎや、非天然状態のコンホメーションについても重要な情報を提供する。温度と圧力の両軸をとおしてタンパク質を眺めることで、タンパク質の新たな描像が見えてくる。

月向邦彦 Kunihiko Gekko
広島大学大学院理学研究科, Graduate
School of Science, Hiroshima Univ.,
Tel.&Fax. 082-424-7387,
e-mail: gekko@sci.hiroshima-u.ac.jp
研究テーマ: 生体高分子溶液の熱力学的
研究
趣味: 囲碁, クラシックギター