

姿をかえるタンパク質

平野 篤*・白木 賢太郎

「卵は加熱すると茹で卵になる。これが熱変性だ」高校生が研究室の見学に来ると、このように説明することがある。タンパク質変性は生活のいたるところに見いだされる身近な物理現象なのである。興味深い点は、さまざまな条件のもとで、タンパク質の姿が大きく変化するところにある。茹で卵は熱変性させた凝集体であるし、ピータンは卵をpH変性（ここではアルカリ変性）させた凝集体であるし、メレンゲは卵白を表面変性（もしくは界面変性）させたものである。本稿では、このようにさまざまに姿をかえるタンパク質の変性の原理を熱力学的安定性という視点から紹介したい。取り上げるタンパク質変性は熱変性、圧力変性、溶質添加による変性、pH変性、界面での変性である。最後にタンパク質の凝集にも触れたい。

ギリギリの安定性

タンパク質の変性の原理を理解するためには、まずタンパク質分子そのものの安定性を理解する必要がある。熱力学の分野では安定性という言葉は状態間の自由エネルギーの差を意味する。つまり、タンパク質の安定性とは立体構造を有した天然状態と立体構造を失った変性状態の間の自由エネルギーの差である。したがって、熱力学的には、タンパク質の変性とはすなわち変性状態の自由エネルギーが天然状態の自由エネルギーを下回ることを意味する。仮に、天然状態の自由エネルギーが増加したとしても、変性状態の自由エネルギーも同じだけ増加すれば、結果的にタンパク質は変性しない。このようにタンパク質変性の原理を理解するためには状態間の自由エネルギーの差 (ΔG) を正しく理解する必要がある。

タンパク質は分子内の非共有結合によって固有の立体構造を形成する。タンパク質はこれらの非共有結合によって、わずかに数kcal/mol～数十kcal/molというギリギリの安定性 (marginal stability) を有している点が興味深い。

タンパク質の安定性は、水中で疎水性相互作用をすることで獲得しているといわれることがある。では、水が存在しない真空中ではタンパク質は不安定なのだろうか？ 実は、タンパク質は真空中の方が安定である。水

中でのタンパク質のギリギリの安定性は、真空中での大きな安定性が水和によって失われた結果なのである。その証拠として、タンパク質の化学構造の多くの領域が（芳香族側鎖でさえ）水和によって安定化される事実がある。極性基は主として水との水素結合やイオン結合によって安定化され、芳香族側鎖は主として水とのファンデルワールス相互作用によって安定化される。変性状態は天然状態に比べて溶媒に露出する表面積が広いために、水和によってより大きく安定化される。その結果、変性状態と天然状態の安定性の差は縮まり、タンパク質にはギリギリの安定性が残るのである（図1）。言い換えれば、水溶液中でのタンパク質の安定性は疎水性相互作用によって獲得されたものではなく、分子内の水素結合やファンデルワールス相互作用に支えられていると考えるべきである。このようなギリギリの安定性が以下で見られるようにさまざまな条件下でのタンパク質の変性をもたらすわけである。それでは、各種のタンパク質変性の仕組みについてタンパク質の安定性という視点から見ていこう。

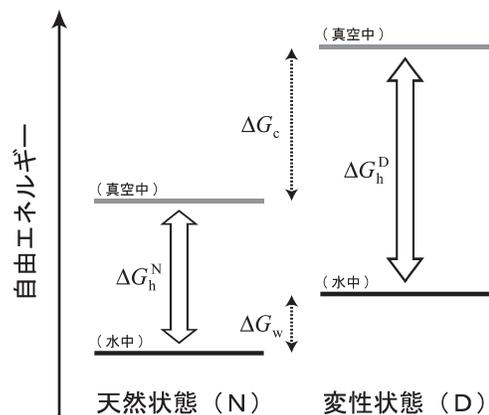


図1. 真空中と水中でのタンパク質の熱力学的安定性. ΔG_c と ΔG_w はそれぞれ真空中（灰色）と水中（黒色）でのタンパク質の安定性を示している. ΔG_h^N と ΔG_h^D はそれぞれ天然状態と変性状態の水和による自由エネルギー変化を示している. 水中のタンパク質の安定性 (ΔG_w) は真空中の安定性 (ΔG_c) に比べて著しく小さい。

* 著者紹介 筑波大学大学院数理物質科学研究科 ((独)日本学術振興会特別研究員) E-mail: bk200412349@s.bk.tsukuba.ac.jp

熱変性

タンパク質は高温にさらされると変性する。これが熱変性である。好熱菌に由来するタンパク質などの特殊なタンパク質を除くと、多くのタンパク質は100°C以下で変性する。タンパク質の安定性の指標である天然状態と変性状態の自由エネルギー差 (ΔG) は、定圧条件下で次のように記述される²⁾。

$$\begin{aligned} \Delta G(T) &= \Delta H_m - \Delta C_p (T_m - T) - T \left[\Delta S_m + \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \\ &= \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) - \Delta C_p \left[(T_m - T) + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \end{aligned} \quad (1)$$

ここで、 ΔH_m と ΔS_m はそれぞれ変性温度 (T_m) における変性のエンタルピー変化とエントロピー変化である。 ΔC_p は状態間の定圧熱容量差であり、 T は絶対温度である。ただし簡単のため、 ΔC_p は温度に依存せず一定であると考えた。 ΔC_p は常に正なので、 ΔG には極大値が存在する(図2)。仮に同じ変性温度をもつ2種類のタンパク質を考えた場合、 ΔH が大きなタンパク質は ΔG が高くなり(つまり安定化され)、 ΔC_p が大きなタンパク質は ΔG が低くなる(つまり不安定化される)。

ΔG は次のようにも記述される²⁾。

$$\begin{aligned} \Delta G(T) &= \Delta H(T_x) - \Delta C_p (T_x - T) - T \left(\Delta S(T_x) + \Delta C_p \ln \frac{T}{T_x} \right) \\ &\approx \Delta H(T_x) - T \Delta S(T_x) - \Delta C_p \frac{(T - T_x)^2}{2T} \end{aligned} \quad (2)$$

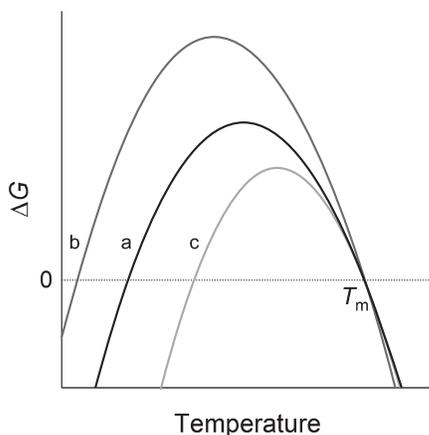


図2. ΔG の温度依存性. ΔH の増加によって曲線はaからbへ移る. 一方、 ΔC_p の増加によって曲線はaからcへ移る. ΔG は高温 (T_m 以上) だけでなく低温でも負になる。

ここで、 ΔH , ΔS , ΔC_p , T はそれぞれ状態間のエンタルピー差, エントロピー差, 定圧熱容量差, 絶対温度をあらわす。 T_x は非極性基の水和の寄与が無視できる温度 (110~140°C) である。右辺の第1項は分子内相互作用のエンタルピー, 第2項は構造のエントロピー, そして第3項は非極性基の水和エネルギーを示しており、これらのバランスがタンパク質の安定性を支配している。第2項が温度に対して線形であることから、高温条件下でのタンパク質の変性はタンパク質の構造のエントロピーの増加に起因すると考えられる。

さて、タンパク質は高温で変性するが、低温でも変性することが知られている(図2)。いわゆる低温変性である。低温変性はタンパク質の非極性基の水和に起因すると考えられる。確かに式(2)の第3項は温度の低下に従って負に大きくなる。つまり、低温では非極性基が水和によって安定化されるのである。このように、安定化因子と不安定化因子の寄与のバランスによって、タンパク質は高温でも低温でも変性する。以上がタンパク質の熱変性の原理である。

蛇足であるが、タンパク質は真空中では100°C以上でも容易には変性しないし、低温変性はあり得ない。なぜなら、先に述べたようにタンパク質のギリギリの安定性は水和によってもたらされるからである(図1)。真空中では水和しえないために、タンパク質の天然構造は広い温度領域で安定である。

圧力変性

タンパク質は静水圧が加わることで変性する。しかし、人類が現れるまで、タンパク質は圧力変性を経験したことがなかっただろう。タンパク質を変性させるためには、マリアナ海溝の海底の1100気圧よりも高い数千気圧もの静水圧を加えなければならないからである。現在ではタンパク質の圧力変性が実験的に確かめられている。

等温条件下でのタンパク質の安定性 (ΔG) は圧力の関数として次のように記述される³⁾。

$$\Delta G(p) = \Delta G^0 + \Delta V^0 (p - p^0) - \frac{\Delta \kappa}{2} (p - p^0)^2 \quad (3)$$

ここで、 ΔV , $\Delta \kappa$, p はそれぞれ状態間の部分モル体積差, 等温圧縮率差, 圧力である。変数の添え字の0は常温・常圧を意味する。

第3項の等温圧縮率差を含む項は、数千気圧の圧力領域では、第2項の部分モル体積差の項に比べて十分に小さいために無視できる。したがって、圧力によるタンパク質の変性のおもな原因は天然状態と変性状態の間の部

分モル体積の差 (ΔV^0) にある。多くの球状タンパク質の天然状態は立体構造の内部に空隙を持ち、変性状態は天然状態よりも大きな水和体積を持つ。これらの2つの寄与によって、通常、変性状態は天然状態よりも小さい部分モル体積を有する。つまり、天然状態と変性状態の間の負の部分モル体積差が、加圧による変性状態の安定化に関与するのである。こうして、圧力変性の原理は体積や圧縮率という「サイズ」に関する物理量で説明された。圧力変性は大きかりな装置が必要であるために実験が困難であるが、原理は熱変性よりむしろイメージしやすいのが興味深い。

溶質添加による変性

温度や圧力を変えなくても、溶質を添加することでタンパク質の安定性は変化する。なかでもグアニジン塩や尿素はタンパク質を変性させる性質を持っており、「変性剤」と呼ばれる。一般に、溶質を添加した溶液中のタンパク質の安定性 (ΔG) は、タンパク質の構成要素であるペプチド結合の主鎖とアミノ酸側鎖の安定性を用いて、次のように関係付けられる⁴⁾。

$$\Delta G(c) = \Delta G^0 + \sum \alpha_i n_i \Delta g_{tr,i}(c) \quad (4)$$

ここで、 ΔG^0 は水中でのタンパク質の安定性を示している。 i はタンパク質の主鎖および各アミノ酸側鎖の種類を意味している。 α_i は天然状態と変性状態の間の i の溶媒露出度の差であり、通常は正の値をとる。 n_i はタンパク質に存在する i の残基数であり、 $\Delta g_{tr,i}(c)$ は水中から溶質濃度 c の溶液への i の自由エネルギーの変化量（移相エネルギー）である。グアニジン塩や尿素などの変性剤は、主鎖と疎水性アミノ酸側鎖に対する安定化効果 ($\Delta g_{tr} < 0$) を有している。つまり、変性剤は天然状態と変性状態の両者の自由エネルギーを低下させる。いずれも安定化させるのである。

結局のところ、変性剤によるタンパク質の変性は、天然状態と変性状態の溶媒露出度の違いに起因する。これとは対照的に、硫酸アンモニウムなどのいわゆるタンパク質結晶化剤の多くは、疎水性基に対する不安定化効果 ($\Delta g_{tr} > 0$) を有しており、タンパク質の安定化に寄与する。このように中性塩は種類によってタンパク質を不安定化させるものから安定化させるものまであり、その一部の塩はホフマイスター塩として知られている⁵⁾。

アルコールもタンパク質を変性させる働きがある。しかしアルコールがもつタンパク質の変性効果は他の溶液添加剤と比べて特殊である。アルコール溶液中では、タ

ンパク質は α -ヘリックスに富んだ変性構造を作る。誘電率の低いアルコールは、容易に推測されるように、疎水性アミノ酸の側鎖を安定化させる。一方で、アルコール溶液中では主鎖は不安定化する⁴⁾。したがって、アルコール溶液中では、いわゆるランダムコイル状の変性状態が天然状態よりも不安定になる。こうして、溶媒への主鎖の露出が少ない α -ヘリックス構造が、アルコール溶液中でのタンパク質の安定な変性状態になる。

pH 変性

タンパク質の溶液に塩酸や水酸化ナトリウムなどの酸や塩基を滴下するとタンパク質は変性する。これが pH 変性である。pH 変性のおもな原因として、タンパク質の荷電アミノ酸側鎖の解離定数が天然状態と変性状態とで大きく異なることが挙げられる。変性状態のタンパク質の解離基の解離定数は、遊離アミノ酸のそれと同程度であるが、一方で、天然状態の内部に存在する解離基の解離定数は他の解離基とイオン結合を形成するために異常な値を示すことが知られている。天然状態と変性状態の解離定数の差が結果としてタンパク質の天然状態と変性状態の自由エネルギーの差 (ΔG) の pH 依存性を生みだすのである。 ΔG の pH 依存性は次の式で与えられる⁴⁾。

$$\Delta G(\text{pH}) = \Delta G^0 - RT \sum_i \ln \frac{(1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a,i}^D})}{(1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a,i}^N})} \quad (5)$$

ここで、 ΔG^0 は解離基が十分にプロトン化された低い pH でのタンパク質の安定性を示している。 R と T はそれぞれ気体定数と絶対温度である。 $\text{p}K_{a,i}^D$ と $\text{p}K_{a,i}^N$ はそれぞれ変性状態と天然状態のタンパク質の解離基 i の解離定数である。タンパク質工学では、天然状態の安定化のために解離定数の異なる解離基を導入した変異型を作製することが多い。

界面での変性

気液界面や固液界面でもタンパク質は変性する。タンパク質は疎水性と親水性のアミノ酸残基を有しており、一種の界面活性剤と見なすことができるだろう。溶液中のタンパク質が気体や固体の表面に吸着すると、親水性残基が表面に多く存在する天然状態のタンパク質は水素結合やイオン結合を形成することができず、自由エネルギーが増大する。したがって、疎水性領域の界面への露出がタンパク質の安定化につながる。つまり、界面でのタンパク質の変性は、疎水部を露出させた変性状態の自由エネルギーが天然状態の自由エネルギーを下回ることによって起因する。

タンパク質は容器などの曲率が小さい固液界面だけでなくナノ粒子の表面にも吸着して変性する。ナノ粒子の表面へのタンパク質の吸着は毒性と関わりと考えられている⁶⁾。筆者らも最近、カーボンナノチューブなどのナノ粒子の表面へのタンパク質の吸着や、吸着にともなう変性に注目している⁷⁾。このように界面でのタンパク質の変性は界面の性質に強く依存する。ナノ粒子を用いた材料研究やドラッグ・デリバリー技術の発展にともない、界面での変性に関する研究はますます重要になっていくだろう。

変性の先にあるもの一凝集

以上でタンパク質のさまざまな変性を見てきた。タンパク質の変性は、変性状態の自由エネルギーが天然状態の自由エネルギーよりも低くなることに起因するが、変性状態の自由エネルギーがタンパク質の構造空間の中でいつも最小値になるわけではない。極小値は必ずしも最小値ではないのである。変性状態よりも低い自由エネルギーをもつ可能性を有しているのがタンパク質の凝集状態である。

凝集状態とは変性状態の複数のタンパク質分子が不可逆に会合した状態をいう。このタンパク質の凝集状態について最後に簡単に触れたい。タンパク質はさまざまな条件下で変性して凝集する。高温にさらされるとタンパク質は熱凝集するし、特殊な条件下ではアミロイド線維と呼ばれる一次元状の凝集体を形成する。また、界面に吸着して変性したタンパク質は会合して単分子膜や二分子膜だけでなく多層膜を形成することもある⁸⁾。このように、タンパク質の凝集状態は変性状態から続く過程に存在する安定状態のひとつだといえる。このようにギリギリの安定性を持つタンパク質は変性しやすく同時に凝集しやすいのである。抗体などの不安定なタンパク質を扱う分野では、今でもタンパク質の凝集の抑制が難しい課題として残されている。

タンパク質凝集は変性状態が天然状態よりも安定な条件下で観察される会合反応であるが、天然状態が変性状態よりも安定な条件下ではどうだろうか。実際、このような条件下で形成される構造は、タンパク質の結晶や非

晶質沈殿体である。結晶や非晶質沈殿体は、いわば天然状態を保持した一種の凝集状態である。ただし、天然状態の会合反応は一般に可逆的であることが多い。ちなみに、圧力はタンパク質の会合を抑制する場合もあれば、促進する場合もある^{9,10)}。

おわりに

タンパク質を構成する20種類の天然アミノ酸は、親疎水性や電荷などさまざまな性質を持つ。このようなアミノ酸残基の物性が、本稿で述べてきたタンパク質の多様な構造変化を生み出す。この構造の多様性こそがタンパク質の特徴である。自然の中に見いだされるすべての分子の中でタンパク質ほど表情豊かで楽しませてくれるものはないだろう。

本稿では、熱変性、圧力変性、添加剤による変性、pH変性、界面での変性の原理を熱力学に立脚して述べた。その他に、化学反応によるタンパク質の変性もあるが、興味のある方は下記の総説を参照されたい¹¹⁾。こうして、タンパク質の変性や凝集の原理を正しく理解すれば、日々実験室で扱っている不安定なタンパク質の取り扱い方も改善できるかもしれない。たとえそうでなくても、メレンゲを作るときには、キレイなボウルを忘れずに済むだろう。

文 献

- 1) 永山國昭：生命と物質—生物物理学入門，東京大学出版会 (1999).
- 2) Privalov, P. L. and Gill, S. J.: *Adv. Protein Chem.*, **39**, 191 (1988).
- 3) 谷口吉弘：蛋白質核酸酵素, **34**, 98 (1989).
- 4) Tanford, C.: *Adv. Protein Chem.*, **24**, 1 (1970).
- 5) Pegram, L. M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7716 (2010).
- 6) Lynch, I. and Dawson, K. A.: *Nano Today*, **3**, 40 (2008).
- 7) Hirano, A. *et al.*: *Chem. Eur. J.*, **16**, 12221 (2010).
- 8) 矢野陽子ら： *Bunseki kagaku*, **59**, 437 (2010).
- 9) 鎌足雄司：生物物理, **47**, 12 (2007)
- 10) Niraula T. N. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4089 (2004).
- 11) 富田峻介, 白木賢太郎： *J. Jpn. Soc. Extremophiles*, **9**, 81 (2010).