

アルギニンを利用した化合物の可溶化と分散

平野 篤

アルギニンはタンパク質を構成するアミノ酸の一つであり、図1に示すような構造をもつ。側鎖にはグアニジニウム基と呼ばれる π 電子を有する平面構造がある。この官能基は塩基性であるため正に帯電している。したがって、アルギニンは塩基性アミノ酸である。構造から読み取れる物理化学的な特徴はその程度かもしれない。しかし、アルギニンを溶液へ「混ぜる」と、ただそれだけでさまざまな効果を発揮する。タンパク質の凝集抑制、カラムからのタンパク質の溶出、難水溶性分子の可溶化、さらにはカーボンナノチューブの分散など、「可溶化」「分散」といったキーワードを中心に多分野でアルギニンは利用されている。本稿では、分子の可溶化に関する物理化学の基礎的な考え方を土台に、アルギニンの応用例を最新の知見を交えながら紹介する。

溶解度の基礎

溶解度の測定や解析を考えると、対象物質が低分子化合物であるかタンパク質のような高分子であるかという点に留意することがまず重要である。低分子化合物であれば系は多くの場合容易に平衡に達する。ただし、固相成分には複数の結晶やアモルファスを過渡的に含む場合があり、その場合には系はもっとも溶解度が低い固相に対して平衡化する。一方で高分子、特にタンパク質の場合、固相成分の形態だけでなく、液相成分にも注意する必要がある。タンパク質は構造変化しやすく系が不安定であることが多いからだ。構造変化は平衡状態を遷移

させて溶解度を変化させるだけでなく、凝集などを引き起こし、溶解度という概念がそもそも成立しない状態に系を遷移させる可能性もある。

以上の問題点が解決すれば、溶解度や添加剤による可溶化効果を熱力学的に記述かつ理解することが可能になる。対象物質である溶質が飽和溶解した時のモル分率を水中と添加剤溶液中でそれぞれ x_w 、 x_a とすると、対象物質を水中から添加剤溶液中へ移した場合の移相自由エネルギー (ΔG_{tr}) は次のように表すことができる。

$$\Delta G_{tr} = -RT \ln(x_a / x_w) \approx -RT \ln(S_a / S_w) \quad (1)$$

ここで R は気体定数、 T は絶対温度である。溶質が希薄な場合には溶解度 S_w 、 S_a を用いて上式のように表現することも可能である。移相自由エネルギーは液相中における溶質の標準状態における標準ギブス自由エネルギー差であるが、ここで述べる標準状態とは溶質が純溶質状態（モル分率が1）であるにもかかわらず無限希釈と同じ状態にある（溶媒分子に囲まれている）という仮想状態のことである。つまり、極端な2つの状態が共存するという奇妙な状態である。溶解度を熱力学的に考えるに当たっては、標準状態をこのように仮定している点に注意が必要である。このようにして求めた移相自由エネルギーは対象物質に対する添加剤の可溶化効果を熱力学的に表しており、可溶化効果の定量的な議論が可能になる。

タンパク質の凝集抑制

アルギニンはタンパク質の凝集抑制に効果的である。変性剤によって変性したタンパク質を希釈によって元のネイティブ状態に戻すリフォールディングを行う際に、希釈液にアルギニンを共存させると、リフォールディング収率が高まることが知られている。この研究は1991年にBuchnerらによって報告された封入体からのタンパク質のリフォールディングが始まりである¹⁾。その後、アルギニンの効果に関する数多くの研究から、アルギニンはリフォールディング中間体の凝集を抑制することによってミスフォールディングを低減し、リフォールディ

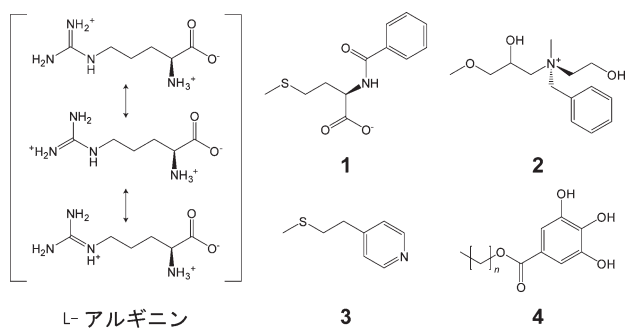


図1. アルギニンと化合物1-4の化学構造

ング収率を高めるとするモデルが提案された²⁾。

タンパク質溶液を加熱するとタンパク質は熱変性を起こして凝集することがある。溶液中へアルギニンを共存させると、このようなタンパク質の熱凝集が抑制されることを2002年にShirakiらが報告した³⁾。アルギニンはタンパク質の変性温度を下げないことから、凝集反応における中間体を不安定化することで凝集を抑制していると考えられる。

アルギニンが有するこのようなタンパク質の凝集抑制効果の理解のために、アルギニンとタンパク質の相互作用をアミノ酸残基に立脚して理解する試みがなされている。Arakawaらは式(1)を用いて、アミノ酸13種類のアルギニン溶液への移相自由エネルギーを測定した⁴⁾。アルギニンはトリプトファンやチロシンといった芳香族アミノ酸を特に安定化させたが、その他の疎水性アミノ酸にはあまり効果がなかった。つまり、アルギニンには芳香環に対する安定化効果を有するわけである。対照にはタンパク質変性剤であるグアニジンが用いられ、疎水性アミノ酸を含む多くのアミノ酸を安定化させることが示された。このようにアルギニンは数少ない特定の疎水性残基(すなわち芳香族アミノ酸残基)のみを安定化させるため、タンパク質に対する変性作用がないにもかかわらずリフォールディング中間体や熱変性状態のタンパク質の凝集を抑制するものと考えられる。ちなみに、アルギニンの誘導体であるアルギニンメチルエステル、アルギニンエチルエステル、アルギニンアミドなどはアルギニンよりも凝集抑制効果が高い。アルギニンの側鎖だけでなく、アミノ酸骨格部分も多少なりともその効果に寄与するようだ⁵⁾。

疎水性の高い物質の水の中での溶解度は溶液の表面張力に強く依存することが知られている。溶液の表面張力は塩濃度の増加や温度低下によって増大する。疎水性界面は水と水素結合を形成することが困難であるため表面エネルギーが高い。塩の添加などによって溶液の表面張力が大きくなれば、疎水性界面の表面エネルギーはさらに高くなる。表面張力によって生じる自由エネルギーはシンプルに書けば

$$\Delta G = A\gamma \quad (2)$$

と表現できる⁶⁾。ここで A は疎水性界面の面積であり、 γ は溶液の表面張力である。高濃度の塩溶液中ではタンパク質の溶解度が低下すること(塩析)が知られているが、塩の種類によるタンパク質の溶解度の差異はホフマイス

ター系列と呼ばれる順番でよく知られている。これはホフマイスター系列が塩の表面張力増加率と相関することの帰結である。アルギニン(通常はアルギニン塩酸塩)も溶液の表面張力を例外なく増加させる²⁾。しかしアルギニンの可溶性能力はこのようなネガティブな効果を凌駕するため顕在化するのである。

カラムからのタンパク質の溶出

芳香環をリガンドにもつかラムからタンパク質を溶出するのにアルギニンは有用である。近年、マルチモーダルカラムクロマトグラフィと呼ばれる複数の官能基をリガンドにもつかラムを用いてタンパク質の精製を行う手法が注目されている⁷⁾。ただし、マルチモーダルカラムクロマトグラフィではタンパク質の吸着に複数の相互作用を利用することから、タンパク質がカラムへ強固に吸着して溶出が困難な場合も多い。最近筆者らは上述のアルギニンと芳香環の相互作用に基づき、芳香環をリガンドにもつかマルチモーダルカラムクロマトグラフィからタンパク質を効率的に溶出するためにアルギニンを利用できることを実証した。

用いた担体は図1に示した3種類であり、**1**は陰イオン性、**2**は陽イオン性、**3**は中性といった電氣的性質を有するリガンドで修飾されている。抗体やウシ血清アルブミンを**1**または**2**で修飾した担体を充填させたカラムから溶出する際にアルギニンを用いることで溶出量が改善された。分子動力学計算を用いた解析から、**1**とアルギニンの相互作用には静電相互作用が支配的であり、付加的にアルギニン側鎖との相互作用(π - π 相互作用や疎水性相互作用)が働いていることが示唆された⁸⁾。**2**とアルギニンの相互作用には π - π 相互作用、疎水性相互作用のほか、水素結合などのさまざまな相互作用が総合的に働いていることを示す結果が得られている。**3**で修飾した担体を充填させたカラムからのタンパク質の溶出にもまたアルギニンが有効であることが知られている⁹⁾。**3**の担体をバッチ法でウシ血清 γ -グロブリンの吸着試験を行ったところ、アルギニン存在下では吸着が劇的に低下した¹⁰⁾。タンパク質変性剤であるグアニジン塩酸塩や尿素では吸着力の低下があまり顕著ではなく、リシンでは効果がまったくなかったことからアルギニンの特殊性が際立つ。アルギニンの誘導体であるアルギニンメチルエステルはさらに効果的に吸着力の低下を引き起こした。この結果は先述したタンパク質凝集抑制効果と共通する点である⁵⁾。

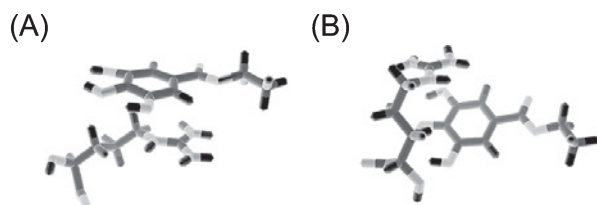


図2. アルギニンとエチルガレートとの相互作用. 結合の安定構造としてAとBの2つが見いだされた. アルギニンのグアニジニウム基とエチルガレートの芳香環が近接している.

低分子化合物の可溶化

アルギニンが有する芳香環の安定化効果を難水溶性の芳香族化合物の可溶化へ適用する研究を筆者らは2008年頃に始めた. これまでにクマリンやアルキルガレート, カフェ酸といった低分子の芳香族化合物のほか, ヘテロ芳香環を有する核酸塩基のアルギニンによる可溶化も実証している.

アルキルガレートは図1の4に示す構造の化合物であるが, さまざまな長さのアルキル鎖を用意することができる. 1 Mのアルギニン溶液中に対するアルキルガレート ($n = 0, 1, 2, 3, 7$) の移相自由エネルギーを測定したところほとんど一定であった. この結果はアルギニンがアルキルガレートの芳香環と相互作用することによって可溶化に導いていることを示している¹¹⁾. 一方で塩化ナトリウムを加えるとアルキル鎖の長さによって移相自由エネルギーが増加した. この結果は, 先述の表面張力 (γ) の増加による界面エネルギーの上昇という考え方で理解できる. つまり, アルキル鎖が長いほど疎水性界面 (A) が広いので, 自由エネルギーがより大きく増加することが原因である. アルギニンとアルキルガレートの相互作用に関する自由エネルギーとコンフォメーションの情報を得るために, 分子動力学計算を用いてアルギニン1分子とアルキルガレート1分子の間の結合の自由エネルギーを計算した. 最安定状態ではアルギニンのグアニジニウム基が芳香族化合物の芳香環と相互作用することが明らかになった (図2)¹²⁾.

アルギニン水溶液への移相自由エネルギーを核酸塩基 (アデニン, グアニン, シトシン, チミン, ウラシル) に対して調べたところ, 中性条件下ではアデニンがもっとも大きく, 溶液中で安定化しやすいことが明らかになった¹³⁾. ただし, 酸性条件下で核酸塩基がプロトン化されるとアルギニンは可溶化ではなくむしろ析出させることも明らかになった. したがって, ヘテロ芳香環

表1. 1 Mアルギニン溶液への移相自由エネルギー

化合物	移相自由エネルギー
カフェ酸	-5 kJ/mol
アルキルガレート	-3 kJ/mol
クマリン	-2 kJ/mol
トリプトファン	-2 kJ/mol
チロシン	-1 kJ/mol
フェニルアラニン	-0.5 kJ/mol
核酸塩基	-1 - -2 kJ/mol

が正に荷電するとアルギニンのグアニジニウム基の正の電荷との反発力によって, 核酸塩基は不安定化すると考えられる. 中性条件下でのデオキシリボ核酸の融解温度は高濃度のアルギニン存在下で低下することがわかっているが¹⁴⁾, この効果は以上で述べたアルギニンと核酸塩基との相互作用に起因すると考えてよいだろう. 参考までに, 表1に代表的な化合物の移相自由エネルギーを示した.

可溶化原理

アルギニンの可溶化効果は間違いなく側鎖の構造に起因する. 特に末端のグアニジニウム基が可溶化に働いていることが実験や分子動力学計算から示唆されている. それではどのような原理によってアルギニンのグアニジニウム基が可溶化に働いているのだろうか. その理解のためにはグアニジンの溶液中での物性が役立つかもしれない. MasonらはX線小角散乱や分子動力学計算からグアニジンの周囲の水分子の構造を報告している¹⁵⁾. グアニジンはアルギニンのグアニジニウム基と同様に平面構造を有しているが, 平面の直上と直下は脱水和していることを彼らは提案している. つまり, グアニジンの表面は意外にも疎水性を有しているのである (ただし, 平面の縁に相当する領域は十分に水和し, 親水性を示している). このようなグアニジンの表面の疎水性がアルギニンにも備わっていると考えられる¹⁶⁾. アルギニンのグアニジニウム基の表面の疎水性部分が化合物の芳香環と疎水性相互作用することで可溶化が起きるわけである. なお, グアニジニウム基は正電荷を有しているため, グアニジニウム基と芳香環の間にはカチオン- π 相互作用が働いている可能性も十分あるということは留意すべきであるだろう.

カーボンナノチューブの分散

以上で見てきたように、アルギニンの側鎖のグアニジニウム基は芳香環と相互作用することが明らかとなった。このような相互作用は芳香環を多く持つ高分子やナノ構造体にも適用可能であると考えられる。本項ではアルギニンのホモポリペプチド(アミノ酸のホモポリマー)であるポリアルギニンを用いてカーボンナノチューブを分散した例を紹介する。カーボンナノチューブのような数nm以上にもなる構造体は、分子間力によって一度接触すると熱運動によっては容易に解離できずに不可逆に凝集する。このようなコロイドの場合、溶液中で孤立した状態は「溶解」ではなく「分散」として表現するほうが正しい。

タンパク質を使ったカーボンナノチューブの分散に関しては2006年頃から活発に行われるようになった¹⁷⁾。特に、塩基性タンパク質には特異な分散効果が観察されることから¹⁸⁾、塩基性アミノ酸とカーボンナノチューブの相互作用は興味深い。言うまでもなくタンパク質とカーボンナノチューブの相互作用はアミノ酸残基の種類だけでなくタンパク質の三次構造にも依存する。したがってアミノ酸残基とカーボンナノチューブの相互作用を純粋に評価するためには、ホモポリペプチドを用いることが得策である。

ポリアルギニンとポリリシンを用いてカーボンナノチューブを分散させたところ、ポリアルギニンには高い分散効果が観察された¹⁹⁾。わずかではあるが、5残基のポリアルギニンにおいても分散効果が認められた。分子動力学計算を用いてカーボンナノチューブに結合したポリアルギニンのコンフォメーションと動径分布関数を調

べたところ、アルギニンのグアニジニウム基がカーボンナノチューブの表面近傍にもっとも多く存在することが明らかになった(図3)。このようにアルギニンは低分子化合物やタンパク質の可溶性だけでなく、カーボンナノチューブのような芳香環を有するナノ構造体の分散にも有用であることが明らかになった。

実際にアルギニン残基を多く有しているニワトリ卵白リゾチームはカーボンナノチューブの分散に有効である¹⁸⁾。リゾチームがカーボンナノチューブへ吸着することによって分散が可能になるわけであるが、吸着にはアルギニン残基の寄与が大きいと考えられる²⁰⁾。筆者らはグアニジンなどのタンパク質変性剤を共存させるとリゾチームがカーボンナノチューブから解離してカーボンナノチューブが再凝集する知見を得ている²¹⁾。さらに最近カーボンナノチューブへのリゾチームの吸着がアルギニン溶液中である程度抑制されることを予備的な実験により見いだしている。リゾチームのアルギニン残基と溶液中のアルギニンが置換することで吸着の抑制または脱着が起きているのではないかと考えている。

タンパク質の高濃度化剤としての可能性

最後に、本特集にも関連するタンパク質の高濃度化について触れたい。ネイティブ状態のタンパク質を高濃度に溶解させるためにアルギニンを使用することは可能であるだろうか。結論から言えば、高濃度化の可否はタンパク質の表面構造に依存する、というのが私見である。本項で述べたようにアルギニンが相手にするのは基本的に芳香環である。したがって表面が親水性・荷電性アミノ酸残基に富むタンパク質にはアルギニンの効果が原理的に期待できない。アルギニンが高濃度化に効くとすれ

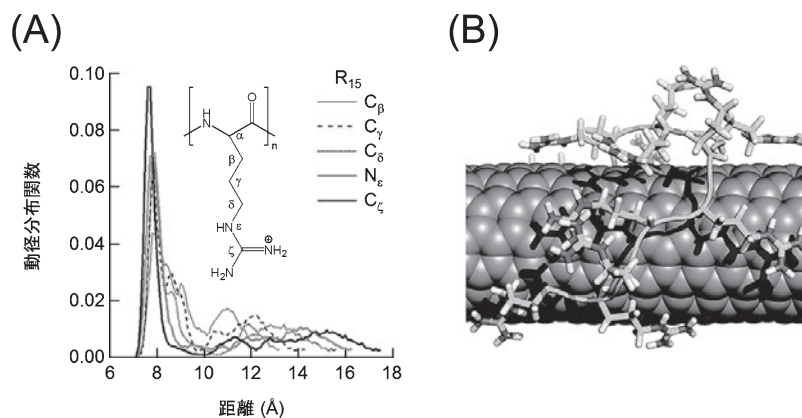


図3. カーボンナノチューブと相互作用する15残基のポリアルギニンの動径分布関数 (A) と代表的なコンフォメーション (B)。アルギニン残基のグアニジニウム基がカーボンナノチューブ表面に近接している。

ば、表面がトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンなどの芳香族アミノ酸残基に富んだ疎水性の高いタンパク質であるだろう。生物学的製剤、特に抗体医薬を高濃度化するための手段として、別項で述べられるように主に限外ろ過が用いられている。限外ろ過を行うとタンパク質濃度が不均一になり局所的に高くなる。このような局所的な高濃度状態を安定に保持するために、アルギニンを使用することが可能かもしれない(本特集, 荒川ら)。

おわりに

アルギニンは芳香環との親和性が高く、分子の可溶性に有効である。芳香環に対する界面活性剤と言うこともできるかもしれない¹⁶⁾。本稿で見てきたように、この原理を使用すれば、低分子化合物からナノ構造体まで幅広いスケールの対象物の溶解・分散やカラムクロマトグラフィにおける溶離が可能である。今後アルギニンの応用例はさらに発展すると考えられる。Shirakiらのグループは最近アルギニンが抗体などのタンパク質溶液の粘度を低下させることやポリスチレン表面へのタンパク質の吸着を抑制することを発見している^{22,23)}。これらの背後にも上記のメカニズムがあると考えられる。アルギニンがタンパク質を構成する20種類のアミノ酸の一つとして利用されてきたこと、アルギニンが他のアミノ酸と違って好塩菌の適合溶質に使用されていないことなど、生物学的な意味も含めてアルギニンそしてアルギニンを

構成要素に持つ化合物の溶液中での物性が今後さらに詳細に理解されることが望まれる。

文 献

- 1) Buchner, J. and Rudolph, R: *Nat. Biotechnol.*, **9**, 157 (1991).
- 2) Tsumoto, K. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **20**, 1301 (2004).
- 3) Shiraki, K. *et al.*: *J. Biochem.*, **132**, 591 (2002).
- 4) Arakawa, T. *et al.*: *Biophys. Chem.*, **127**, 1 (2007).
- 5) Matsuoka, T. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **25**, 1515 (2009).
- 6) Baldwin, R. L.: *Biophys. J.*, **71**, 2056 (1996).
- 7) Chung, W. K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 16811 (2010).
- 8) Hirano, A. *et al.*: *J. Chromatogr. A.*, **1338**, 58 (2014).
- 9) Arakawa, T. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **63**, 158 (2009).
- 10) Hirano, A. *et al.*: *J. Chromatogr. A.*, **1373**, 141 (2014).
- 11) Ariki, R. *et al.*: *J. Biochem.*, **149**, 389 (2011).
- 12) Hirano, A. *et al.*: *J. Phys. Chem. B*, **114**, 13455 (2010).
- 13) Hirano, A. *et al.*: *Arch. Biochem. Biophys.*, **497**, 90 (2010).
- 14) Arakawa, T. *et al.*: *Int. J. Biol. Macromol.*, **46**, 217 (2010).
- 15) Mason, P. E. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11462 (2004).
- 16) Li, J. *et al.*: *J. Chem. Phys.*, **133**, 054902 (2010).
- 17) Karajanagi, S. S. *et al.*: *Langmuir*, **22**, 1392 (2006).
- 18) Nepal, D. and Geckeler, K. E.: *Small*, **3**, 1259 (2007).
- 19) Hirano, A. *et al.*: *Chem. Eur. J.*, **20**, 4922 (2014).
- 20) Calvaresi, M. *et al.*: *Chem. Eur. J.*, **18**, 4308 (2012).
- 21) Hirano, A. *et al.*: *Chem. Eur. J.*, **16**, 12221 (2010).
- 22) Shikiya, Y. *et al.*: *PLoS ONE*, **8**, e70762 (2013).
- 23) Inoue, N. *et al.*: *Mol. Pharm.*, **11**, 1889 (2014).