

タンパク質の凝集と液－液相分離への添加剤の効果

白木賢太郎

タンパク質はもともと集合しやすい性質がある。細胞内にあるタンパク質も集合して機能しており、多様な生命現象を組織化していることが最近相次いで報告されている¹⁾。この集合物はドロプレット（液滴）やコンデンセート（濃縮体）、または膜のないオルガネラなどと呼ばれる。タンパク質の加熱に伴う凝集²⁾や高濃度のタンパク質溶液³⁾、凝集性の溶液製剤⁴⁾などは、添加剤の効果についてかなり理解が深まっている。本稿では、タンパク質の凝集や相分離を安定化する相互作用と、それらにおよぼす添加剤の効果を簡潔に整理したい。

タンパク質の三状態

水分子と1種類のタンパク質が含まれた溶液は、大きくわけて3種類の状態を取る（図1）。タンパク質が分散した状態と、集合してドロプレットや凝集体になった状態である⁵⁾。

気体 タンパク質分子が溶媒に分散した状態は「気体」に例えられる。タンパク質の分子間には相互作用が働かず、水分子によく溶けた状態を仮定した理想状態のことである。酵素キネティクスやタンパク質フォールディングなどの研究は基本的にこの状態になるように条件を設定して研究されてきた。しかし、実際にはタンパク質は相互作用しやすい性質があるため、これはあくまでも理想状態でのタンパク質の性質である。

液体 液－液相分離して形成されたドロプレットの状態は液体にたとえられる。ドロプレットはタンパク質分子間に相互作用があるので集まっているが、水分子もたくさん含まれており、流動性のある状態である。マイクロメートル以上のサイズのドロプレットができると白

濁した溶液が肉眼でも観察できる。ドロプレットを形成した溶液を遠心分離すると、高濃度のタンパク質溶液の層と低濃度のタンパク質の層に分離させることも可能である。

固体 凝集体は固体にたとえられる。凝集体はタンパク質の分子間に相互作用はあるが、流動性はない状態なのでドロプレットと区別できる。凝集体はいわば固－液相分離したもので水分子も内外に出入りしない。アミロイドも凝集体の一種だが、加熱によって形成されるアモルファス凝集体とは添加剤の利き方が異なる。

ここで、それ以外の中間的な状態などについて少し補足したい。

ゲル ゲルは「液体」と「固体」の中間的な状態で、分子の出入りがあるが、固体に類似した強い相互作用を持つものと考えてよい⁶⁾。たとえば、筋萎縮性側索硬化症の原因になるとされるFUS (fused in sarcoma) タンパク質は、濃縮するとゲル状になることが知られている⁷⁾。この状態の構造をNMRで調べると、6残基以下の短い長さを持ったクロスβによって安定化された特別な状態である⁸⁾。このようなケースでは、ゲルから徐々に成熟し、線維状をした不溶性の凝集体になるのではないかと考えられる⁹⁾。

混合溶液 2種類のタンパク質が含まれた溶液でも同様の考えで理解できる。ただし、2種類のタンパク質が含まれた溶液の方が、基本的にはドロプレットを形成しやすいと考えられる。1種類のタンパク質だけが含まれた水溶液はタンパク質分子間に静電的な反発力が働くので集合しにくい。2種類のタンパク質が含まれているときには、溶液のpHによっては静電的な引力も働くことがあるためである¹⁰⁾。

時間変化 時間が経つと状態が変化するケースもある。たとえば、オボアルブミンを80℃などに加熱したあと常温に戻したものをリゾチームと混合すると、白濁が見られる¹¹⁾。これは50 mMの塩で溶けるようなドロプレットである。しかし、混合したあと30分ほど置くと塩で溶けなくなる。言葉で整理すると、最初は静電相互作用で集まっていたドロプレットが、時間とともに疎水性相互作用が増えていき凝集体へと成熟したのだと考えられる。



状態	気体 (分散した状態)	液体 (ドロプレット)	固体 (凝集体)
相互作用	なし	あり	あり
流動性	あり	あり	なし

図1. タンパク質の溶液状態

ドロプレットや凝集体の安定化因子

タンパク質のドロプレットや凝集体を安定化する因子を整理すると次のようになる(図2)。

静電相互作用 電氣的な引力や反発力によって生まれる相互作用のこと。この作用は遠距離まで働く、また、50 mM程度の塩化ナトリウムなどのイオンが溶けた溶液中では遮蔽効果によって弱められるという特徴がある。静電相互作用は特にドロプレットを安定化する作用として知られている。

静電相互作用は翻訳後修飾によっても影響を受ける。天然変性タンパク質のDdx4¹²⁾やhnRNPA2¹³⁾は、リシンやアルギニンがメチル化されるとドロプレットが低温でも溶解するようになる。また、RNAポリメラーゼIIのC末端ドメインにはリン酸化される多くの部位があるが、リン酸化されるとヒスチジンに富んだ別のタンパク質と安定なドロプレットを形成できるようになる¹⁴⁾。

疎水性相互作用 水になじみにくい領域が集まった相互作用のこと。主に疎水性相互作用で安定化されたものが凝集体であり、主に疎水性相互作用ではないもので安定化されたものがドロプレットだと考えてよい。だが、このような相互作用とドロプレット・凝集体との関係は、単純に区別できるというよりも度合いの問題である。

カチオン- π 相互作用 芳香族アミノ酸の π 電子と、正電荷を持つリシンやアルギニンの側鎖のカチオン(陽イオン)との相互作用のこと。特にアルギニンは側鎖に平面的で正電荷を持ったグアニジニウム基があり、芳香環とカチオン- π 相互作用をすることが知られている。この相互作用は静電相互作用の一種だが、イオンによる遮蔽効果の影響を受けにくいので、生理的なイオン強度の溶液中でも働くことができる。そのため、ドロプレットの主な安定化因子の一つとして働いているのだと考えられる。実際に、RNA結合タンパク質の相分離を起こす低複雑性領域には、アルギニン(R)とグリシン(G)が並んだRGG配列がたくさんある¹⁵⁾。アルギニンの大きな側鎖と、ターゲットになる芳香族アミノ酸との相互

作用が起こりやすいように小さなグリシンを挟んでいるのだろう。

π - π 相互作用 芳香環が平行に並び、非局在化した π 電子の間に分散力が働いて安定化される相互作用のこと。タンパク質を構成するフェニルアラニンやチロシン、トリプトファンは側鎖に芳香環を持っており、 π - π 相互作用をすることができる¹⁶⁾。 π - π 相互作用は、ドロプレットの安定化因子の一つであり、相分離しやすい領域にはチロシンやフェニルアラニンが多いことが知られている。相分離しやすい領域にはトリプトファンが少ないのは、疎水性がきわめて高いので不可逆な凝集体を形成しやすいからだろう。

特異的な相互作用 タンパク質のRNA結合ドメインとRNAとの相互作用や、塩基の相補的な配列など、特異的に結合する領域による相互作用。ドロプレットの安定化には、複数の相互作用がある多点効果が有効であるとされる¹⁷⁾。RNA結合タンパク質はさまざまな種類のドロプレットの主要な因子になるが、なかでもRNA結合部位と天然変性領域の両方が相分離性に重要な役割を担うと考えられている¹⁸⁾。

クロス β 構造 タンパク質の分子間での β シート構造のこと。筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因となるとされるFUSタンパク質のドロプレットは、短いクロス β 構造を持つことが固体NMRや分子動力学シミュレーションで示されている⁹⁾。このようなドロプレットを安定化させるクロス β 構造は基本的には短く曲がっているのが特徴である¹⁹⁾。他方、より古くから知られているように、クロス β 構造は、安定な凝集体であるアミロイドを形成する因子でもある²⁰⁾。

立体構造 タンパク質の液-液相分離は、単純にアミノ酸組成だけで決まるのではなく、アミノ酸の並ぶ順序や長さなどの影響も受ける。1種類のタンパク質が相分離する場合には電荷が偏っている方が相分離しやすく、また、長い方が相分離しやすい性質がある²¹⁾。そのため、タンパク質やRNAが立体構造を形成する場合にはドロプレットの形成のしやすさが変化すると考えてよい。RNA顆粒に含まれるRNAは適切な立体構造を形成している場合にはドロプレットを形成する因子になるが、構造がランダムなものや立体構造を形成するものに変異が入るとドロプレットの形成因子になりにくい²²⁾。高次構造を形成することで、多点的な相互作用のしやすさが変化するためである。また、天然変性領域がたくさん並んでいるほどドロプレットを形成しやすい¹⁷⁾。

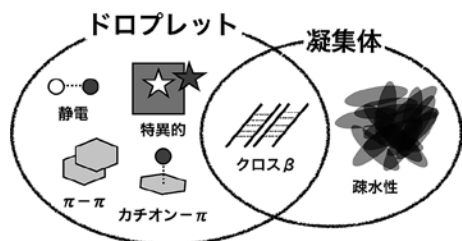


図2. タンパク質の状態を安定化する主な相互作用

添加剤の効果

塩や糖質やアミノ酸などの添加剤は、タンパク質の天然構造の安定性や、凝集のしやすさに影響を与えることが知られており、メカニズムの理解も深まっている。一方、相分離への添加剤の効果はまだ知見が少ないが、同じ考えで理解できるだろう。添加剤を合理的に使うことで凝集や相分離を制御でき、同時に安定化の原因を特定することも可能である(図3)。指針となる見方を整理すると次のようになる。

イオン 塩を水に溶かすとイオンに分かれる。イオンは静電遮蔽の効果によって、溶質の分子間の静電相互作用を弱める働きがある。塩化ナトリウムであれば50 mMも加えると、遮蔽効果が十分に現れると考えてよい。イオンはほかに、タンパク質への結合のしやすさによってコスモトロープやカオトロープの性質が生まれる。このような性質の並びをホフマイスター順列という。イオンは、コスモトロープとカオトロープに大別できる。

(i) コスモトロープ タンパク質に結合しにくいタイプのイオンのこと。コスモトロープは水によくなじむために、タンパク質と水分子との界面や、気体と水分子との界面ではなく水に溶けた状態の方が安定である。そのためコスモトロープの溶液中ではタンパク質は凝集しやすくなる。コスモトロープとしては、たとえば硫酸イオン(SO_4^{2-})やフッ化物イオン(F^-)がある。タンパク質溶液に硫酸アンモニウム(硫安)を加えていくとタンパク質が塩析するが、この原理でもある。

(ii) カオトロープ コスモトロープと反対の性質を持つイオンで、タンパク質に結合しやすい性質がある。界面を好むので表面張力を下げる働きがあり、その結果、タンパク質の構造を広げたり凝集を防いだりする。カオ

トロープの代表的なものとしてヨウ化物イオン(I^-)やチオシアン酸イオン(SCN^-)がある。

変性剤 タンパク質の立体構造を壊すほど強くタンパク質に結合する物質のこと。カオトロープの働きが強くなったもので、代表例として、塩酸グアニジンや尿素がある。疎水性相互作用を弱めて溶液になじみやすくする働きがある。タンパク質の凝集は疎水性相互作用が主な駆動力なので、タンパク質の立体構造を壊さない程度の濃度の変性剤を加えるとタンパク質の凝集を防ぐことができる。

界面活性剤 親水性と疎水性の両方の部分を持つ分子のこと。変性剤と同様に、タンパク質の立体構造を壊し、同時にタンパク質の凝集を防ぐ働きをもつ。たとえば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)のような強い界面活性剤や、アミソフトのようなアミノ酸系の弱い界面活性剤など、さまざまなものがある。グリシンエチルエステルのような分子は小さいながら両親媒性の性質を持ち、タンパク質の加熱による凝集を効果的に抑制できることが知られている²³⁾。

オスモライト 海洋性の生物の細胞内から発見された浸透圧に耐性をもたせる分子のこと²⁴⁾。たとえば、ベタインやタウリンやトリメチルアンモニウムオキシド(TMAO)などのオスモライトは、タンパク質の立体構造を安定化させる働きがある。ドロプレットの安定化因子として天然変性領域の広がった構造が重要な役割を担っている場合、オスモライトを加えるとドロプレットを溶かす働きがあると考えられる。しかし、天然変性タンパク質の一種であるTDP-43に対してTMAOはドロプレットを安定化させてアミロイド線維化を防ぐという報告があるなど²⁵⁾、オスモライトのドロプレットへの効果を説明するのは現在ではまだ難しい。

糖質 グルコースやトレハロースなどの糖質は水になじみやすい性質がある。界面エネルギーを上げるためにタンパク質の立体構造を安定化させ、同時に凝集を促進する働きがある。免疫グロブリンGとポリグルタミン酸によるドロプレットの場合、糖質を加えるとドロプレットが溶解するような働きを示す²⁶⁾。なぜなら糖質は、ポリグルタミン酸の構造をコンパクトにしようとするため、ドロプレットが溶けるからだと考えられる。天然変性タンパク質に対しても、広がった構造を小さくしようとするために同じ効果が現れるだろう。

アミン スペルミンやプトレッシンやグリシンアミドのようなアミンを含む化合物は、加熱にともなう凝集や劣化をよく防ぐ働きがある²⁾。無機イオンであるアンモニウムイオンにも同様の効果が見られる。メカニズム

主な安定化因子	 静電相互作用 カチオン- π 相互作用 広がった構造	 疎水性相互作用
安定化	アルコール クラウダー ポリイオン複合体形成 TMAO	クラウダー 糖質 コスモトロープ
不安定化	ヘキサソール 糖質 オスモライト 低濃度のイオン	アルギニン 変性剤 界面活性剤 カオトロープ

図3. ドロプレットとアモルファス凝集体の主な安定化因子と、それらに効果のある添加剤

として想定されているのは、加熱によってアスパラギン側鎖のアミンが脱離するのを防ぐようである²⁷⁾。

アルギニン 天然アミノ酸の一種だが、添加剤として使用すると、タンパク質の加熱にともなう凝集の抑制や、芳香族化合物の溶解、リフォールディング収率の改善など、さまざまな応用が可能である²⁾。アルギニンの側鎖のグアニジニウムは平面の構造を持つため、タンパク質の表面にある芳香環と安定なカチオン- π 相互作用をして、凝集しやすいタンパク質分子間の反発力を強めるためである²⁸⁾。

有機溶媒 有機溶媒中では誘電率が低下するため、タンパク質分子内の水素結合が強められ、その結果、 α -ヘリックスに富んだ構造を形成しやすい²⁹⁾。数%程度の1,6-ヘキサジオールはドロプレットを溶かすことが知られており³⁰⁾、顆粒のように見えるものがドロプレットかどうかを判断する添加剤として使われるようになっていく。一方、免疫グロブリンGとポリグルタミン酸の複合体が形成するドロプレットはエタノールで安定化されるので²⁶⁾、有機溶媒でドロプレットが安定化されるのか否かを単純に推測することは現在では難しい。ドロプレットを安定化する主な駆動力が水素結合や静電相互作用によるネットワークであれば誘電率を下げる有機溶媒が効果的だが、もし弱い疎水性相互作用も安定化因子なのであれば、有機溶媒で溶けやすくなるからである。

クラウダー 高濃度の高分子のことをいう。たとえば、ポリエチレングリコールやフィコールなどが含まれた溶液中では、タンパク質の立体構造が安定化される。このような状態を分子クラウディングといい、それによって現れるタンパク質構造の安定化効果を排除体積効果という³¹⁾。排除体積効果によってタンパク質がコンパクトになるという効果が主に働くのであればドロプレットは形成しにくいと考えられるが、実験的にはポリエチレングリコールはドロプレットを安定化させるために溶液に加えられていることが多い。

さいごに

本稿ではタンパク質の分子間にはたらく相互作用と、それに影響する添加剤の仕組みを簡単に整理した。添加剤の効果はタンパク質のフォールディングや凝集に対し

て系統的に研究が進んできた。一方、ドロプレットに対する添加剤の効果はまだ実験例が少なく、統一的な説明は難しいのが現状である。しかし、凝集抑制剤や安定化剤の研究成果を延長していくと説明できるようになるだろう。そのためには、親水性・疎水性ではなく相分離性のような新たな指標の理解が必要になると考えられる。

添加剤を加えたときのタンパク質の挙動を調べると、そこに働いている相互作用を考察することができる。タンパク質の状態への添加剤の効果を系統的に調べることで、細胞内に生じているタンパク質の相分離の理解も進んでいくと考えられる。

文 献

- 1) 白木賢太郎：相分離生物学，東京科学同人 (2019)。
- 2) Shiraki, K. *et al.*: *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **17**, 116 (2016)。
- 3) Hong, T. *et al.*: *Curr. Protein Pept. Sci.*, **19**, 746 (2018)。
- 4) Kurinamaru, T. *et al.*: *Int. J. Biol. Macromol.*, **100**, 11 (2017)。
- 5) Iwashita, K. *et al.*: *Curr. Pharm Biotechnol.*, **19**, 946 (2018)。
- 6) Shin, Y. *et al.*: *Cell*, **168**, 159 (2017)。
- 7) Kato, M. *et al.*: *Cell*, **149**, 753 (2012)。
- 8) Patel, A. *et al.*: *Cell*, **162**, 1066 (2015)。
- 9) Murray, D. T. *et al.*: *Cell*, **171**, 615 (2017)。
- 10) Oki, S. *et al.*: *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 1428 (2018)。
- 11) Iwashita, K. *et al.*: *Int. J. Biol. Macromol.*, **120**, 10 (2018)。
- 12) Nott, T. J. *et al.*: *Mol. Cell*, **57**, 936 (2015)。
- 13) Ryan, V. H. *et al.*: *Mol. Cell*, **69**, 465 (2018)。
- 14) Delarue, M. *et al.*: *Cell*, **174**, 338 (2018)。
- 15) Chong, P. A. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **430**, 4650 (2018)。
- 16) Boeynaems, S. *et al.*: *Trends Cell Biol.*, **28**, 420 (2018)。
- 17) Li, P. *et al.*: *Nature*, **483**, 336 (2012)。
- 18) Ditlev, J. A. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **430**, 4666 (2018)。
- 19) Luo, F. *et al.*: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 341 (2018)。
- 20) Nelson, R. *et al.*: *Nature*, **435**, 773 (2005)。
- 21) Chang, L. W. *et al.*: *Nat. Commun.*, **8**, 1273 (2017)。
- 22) Ditlev, J. A. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **430**, 4666 (2018)。
- 23) Shiraki, K. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **21**, 640 (2005)。
- 24) Yancey, P. H. *et al.*: *Science*, **217**, 1214 (1982)。
- 25) Choi, K. J. *et al.*: *Biochemistry*, **57**, 6822 (2018)。
- 26) Mimura, M. *et al.*: *J. Chem. Phys.*, **150**, 064903 (2019)。
- 27) Tomita, S. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **27**, 855 (2011)。
- 28) Miyatake, T. *et al.*: *Int. J. Biol. Macromol.*, **87**, 563 (2016)。
- 29) Shiraki, K. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **245**, 180 (1995)。
- 30) Lin, Y. *et al.*: *Cell*, **167**, 789 (2016)。
- 31) Kuznetsova, I. M. *et al.*: *Molecules*, **20**, 1377 (2015)。