

## タンパク質の凝集剤としての塩・有機溶媒・高分子

吉澤 俊祐\*・白木賢太郎

## はじめに

タンパク質の凝集剤として、塩や有機溶媒、高分子が広く用いられている。タンパク質の分画や結晶化など、それぞれの目的に応じて経験的に使い分けられているが、原理はかなり複雑で、それぞれに違った顔を持っている。塩はタンパク質分子の間の静電相互作用を弱めることでタンパク質を沈殿させるが、数百 mM まで加えると塩の種類によって異なる性質が現れる。有機溶媒は溶液の誘電率を低下させるとともに、アミノ酸残基とも相互作用することでタンパク質の凝集と変性を引き起こす。高分子は排除体積効果による凝集と、アミノ酸残基との相互作用による溶解の両方の効果を考える必要がある。本稿では、このような3タイプの典型的な凝集剤の特徴を俯瞰してみたい。

## 塩

タンパク質溶液に硫酸ナトリウムなどの塩を加えると、タンパク質は析出する。塩析と呼ばれるこの現象の研究は、1888年の研究にまでさかのぼることができる<sup>1)</sup>。Hofmeisterらは、卵白やウシ血清や膠などにさまざまな塩を添加して、タンパク質が沈殿する様子を観察した。その結果、塩の種類によって沈殿が生じる濃度が変わることを、一連の論文として報告した。この塩析の強さは後に Hofmeister 系列と呼ばれるようになった。この原典にあたる論文はドイツ語で書かれていたが、今では英訳も出版されている<sup>2)</sup>。繙いてみると、タンパク質を塩析させる塩は利尿作用があり、溶解させる塩は下剤作用があるといった塩と生理作用の関係を議論しているのが興味深い。当時はまだタンパク質がどういう物質のかもわかっていなかったころだ。

図1に Hofmeister 系列を示す。たとえば 1 M 程度のイオンをタンパク質溶液に加えたとき、左のイオンは

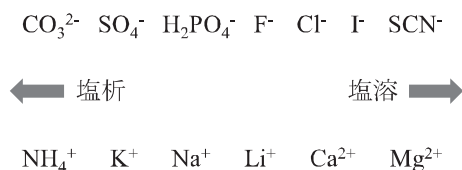
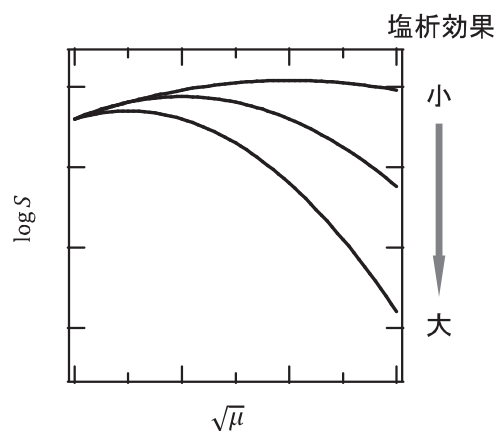


図1. Hofmeister 系列

ど塩析させる力が強い。この塩析の強さはどのように説明できるのだろうか。一つは溶解度で説明できる。タンパク質の溶解度は、一般に、イオンの濃度を増加させると増加し、極大値があって、さらに濃度を高めると低下する(図2)。これは、デバイーヒュッケルの理論によると次のように考えられる。タンパク質溶液に塩を加えると、低濃度では静電遮蔽によってタンパク質の分子間の反発力が弱まって、タンパク質が占める実質的な体積が減り、その結果、溶解度が増加する。さらに塩を加えていくと、タンパク質間のファンデアワールス力や疎水性相互作用などの引力が強まり凝集しやすくなる。

このように静電相互作用だけで塩析が説明できるなら加える塩の種類にはよらないだろう。しかし、すでに1932年に Green らが報告しているように、この曲線は図2のように塩の種類によって異なったのである<sup>3)</sup>。したがって、タンパク質とイオンとの間には、静電相互作用だけでなく、別の相互作用があるか、もしくは水の構造への影響があると予想できる。

それ以降、この効果についてはイオンが水の構造に影響するという説が有力だった<sup>4)</sup>。塩析させやすい塩をコスモトロープ、塩溶させやすい塩をカオトロープというが、その語源どおりコスモトロープは水の水素結合ネットワークを秩序化し(=コスモス)、逆にカオトロープは無秩序化する(=カオス)という考えである。しかし、水の水素結合を直接観察したところ、イオンは水の水素結合ネットワークには影響を与えないという重要な論文

図2. 塩濃度によるタンパク質の溶解度のイメージ図。Sはタンパク質の溶解度、 $\mu$ は溶液のイオン強度を表す。

\* 著者紹介 筑波大学大学院数理物質科学研究科(博士後期課程1年) E-mail: yshu586844@gmail.com

が報告されている<sup>5)</sup>。つまり、溶液中のイオンは、バルク水の構造を変えるとよりも、むしろタンパク質の表面にある水和水に影響して、タンパク質の安定性や凝集などの性質を変えるのだろう。

表面張力は水和を理解するための一つの指標である<sup>6)</sup>。コスモトロープは気液界面の表面張力を増加させるので、広い界面ほど不安定になり、溶液は表面を減らそうとして、タンパク質は凝集する。一方、カオトロープは逆の議論が成り立ち、凝集しにくくなる。このような平衡論的な考えは、加熱にともなうリゾチームの凝集速度と、溶液の表面張力が正の相関があるという速度論的な結果とも矛盾しない<sup>7)</sup>。

数百mMという高濃度のイオンがタンパク質と相互作用する場合、選択的相互作用という概念が必要になる<sup>8)</sup>。このパラメーターは、タンパク質表面に結合した溶質の量から、水和によってタンパク質表面から排除された溶質の量を差し引いた値として定義される。選択的相互作用の値が正であればタンパク質表面にはバルク中の水よりも多くの溶質が存在することを意味し、逆に負であれば溶質の量は少なくなるという見方である。これまでにさまざまな塩や溶質やタンパク質の選択的相互作用が調べられており、たとえば、コスモトロープイオンである硫化物イオンのタンパク質への選択的相互作用の値は、塩化物イオンよりも低く、硫化物イオンがタンパク質表面から選択的に排除されることが実測されるなど、表面張力に関する議論と整合性が取れた結果が得られている<sup>9)</sup>。

ホフマイスター系列は周期表と興味深い規則性が見られる。たとえばハロゲン族では、フッ素イオン>塩化物イオン>臭素イオン>ヨウ素イオンという順番に塩析作用は強まるが、これは元素表ではちょうど上から下への順番に一致している。この傾向は、アルカリ金属のカチオンでは逆になる。したがってホフマイスター系列は、イオンの半径や電子密度、質量で説明できることを示唆しているが、硫酸イオンやグアニジウムイオンなどの複雑な構造を持つイオンとは違った説明が必要になるだろう。

ホフマイスター系列とタンパク質凝集のこれまでの研究は、実験科学の性質が強いものだったが、量子化学などを用いた原理からの理解も深まりつつある<sup>10)</sup>。一方、測定装置も著しく進歩し、最近ではテラヘルツ分光によってピコ秒単位の水分子のダイナミクスが実測できるようになっている(本特集の青木らの解説を参照)。なお、タンパク質の凝集を調べることで発見されたホフマイスター系列だが、酵素活性にも影響を与えるなど依然として謎が多い<sup>11)</sup>。最近でも「ホフマイスターを超えて」という解説がハイインパクトな雑誌に記載されているよう

に<sup>12)</sup>、今もなお面白い研究分野である。

### 有機溶媒

有機溶媒は古くからDNAやRNAを沈殿させる手法として用いられてきた。タンパク質への応用は、アルコールによる血清タンパク質の沈殿の報告があつて以降<sup>13)</sup>、簡便な分画法として組換えタンパク質の精製などに用いられている。基本的な仕組みは単純に考えることができ、有機溶媒によって水溶液の誘電率が低下して、タンパク質間の静電反発力が強まる結果、溶解度が減少して沈殿するというものである。しかし、誘電率だけではタンパク質の溶解度は説明できないことも分かってきている。Klibanovらは34種類の有機溶媒中におけるリゾチームの溶解度を測定し、有機溶媒の性質を示すパラメーターと溶解度の相関を調べたが<sup>14)</sup>、意外なことに相関は一部だけしか見られなかった。つまり、タンパク質の有機溶媒への溶解度は誘電率というバルクの性質だけではなく、有機分子とタンパク質との相互作用も考える必要がある。

アミノ酸と有機分子との相互作用は、NozakiとTanfordの一連の研究に端を発する<sup>15)</sup>。エタノールとジオキサンに対するアミノ酸やペプチドの溶解度を調べたところ、有機溶媒はアミノ酸の疎水性側鎖を安定化し、親水性のアミノ酸側鎖やペプチド結合の領域を不安定化することがわかった。Arakawaらは実際に、ジメチルスルホキシドと4種類のタンパク質の相互作用を調べた<sup>16)</sup>。その結果、高濃度では、ジメチルスルホキシドは疎水性相互作用によってタンパク質に選択的に結合して変性させるが、低濃度では、それよりも親水性部位の不安定化効果が強まるので、タンパク質表面から選択的に排除されることを報告している。

有機溶媒がタンパク質の疎水性側鎖を安定化するのであれば、有機溶媒を加えていくとタンパク質は変性し、同時に溶解度が増加するはずである。しかし実際には異なる結果が得られている。Yoshikawaらは還元変性させたウシアルブミンのエタノール水溶液に対する溶解度と二次構造の変化を調べた<sup>17)</sup>。その結果、エタノール濃度が増加するにつれて、ネイティブ構造からランダムへと変性し、さらに $\alpha$ ヘリックスに富む構造へと複雑な構造変化をした。一方で、エタノール濃度が増加すると、タンパク質の溶解度は単調に減少したのである。エタノールはタンパク質の疎水性部分と相互作用して変性させ、同時に疎水性部分の溶解度を上げる効果はあるが、荷電残基との好ましくない反発の影響が強くあられ、結果としてタンパク質の溶解度を低下させると考えられる(図3)。

有機溶媒のなかでも、ハロゲン系アルコールは興味深

## 特 集

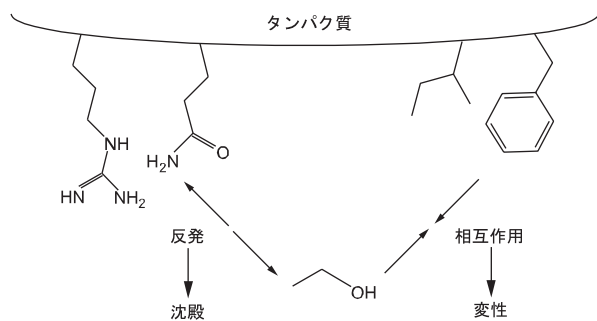


図3. エタノールによるタンパク質の変性と沈殿作用の模式図

い挙動を示す。トリフルオロエタノール<sup>18)</sup>や、ヘキサフルオロイソプロパノール<sup>19)</sup>は、タンパク質を $\alpha$ ヘリックス構造に富んだ構造へと変性させる。たとえば、酸性条件の50%トリフルオロエタノール溶液中にタンパク質があると、主鎖の間にできる水素結合が強められて $\alpha$ ヘリックス構造に富んだ構造へと変性するが、それと同時に、タンパク質が高濃度までよく溶けて、最終的には透明なゲルになる。ハロゲン系アルコールは、タンパク質の溶解を考える良い題材になると思う。

有機溶媒は殺菌作用を持つという応用上の利点がある。この作用は、ウイルスや細菌の脂質膜を溶解させることに起因する。しかし、エタノールは外殻がタンパク質からなるウイルスもpH依存的に不活化させる<sup>20)</sup>。実際にエタノール溶液中のタンパク質は、荷電状態によって凝集のしやすさが異なる<sup>21)</sup>。つまり、pHを少し変化させるだけで、エタノール中のタンパク質凝集を制御できることを意味する。たとえば、アルコール溶液中でタンパク質を保存するとき、凝集を防ぐためには、タンパク質の等電点から離すことが有効である。

このように有機溶媒によるタンパク質の凝集には、1) タンパク質の構造変化とそれにもなう疎水性の変化、2) マクロに見た溶液の誘電率の低下、3) 有機溶媒とタンパク質の非極性領域との相互作用、4) 有機溶媒とタンパク質の荷電残基との反発、という複雑な影響があるので、pHやイオン強度やアルコール濃度を少し変えるだけで溶解と凝集の正反対の効果を生むこともある。このような性質は、応用面からみると、溶液を適切にデザインすればタンパク質凝集を制御できる可能性を秘めている。

## 高分子

高分子によるタンパク質の沈殿も、古くから知られている現象である。作用機構は塩や有機溶媒と異なり、基本的には高分子の振る舞いによって説明ができる。高分子は溶液中で、ある広がりをもって存在するので、タンパク質が占めることのできる空間が減る。その結果、高

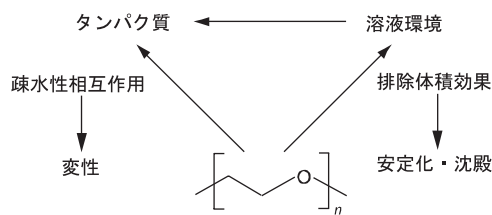


図4. PEGによるタンパク質の凝集の模式図

分子を加えるとタンパク質の会合が促進される。このような効果を排除体積効果という。高分子の中でも特にポリエチレングリコール (PEG) は無毒であり、さまざまな分子量のものが安価に合成できるので、タンパク質の沈殿剤や結晶化剤としてよく用いられている。

高分子は排除体積の効果以外にもタンパク質に影響をおよぼす。PEGのような荷電のない高分子でも影響があり、大きなPEGほどタンパク質の選択的水和をうながし、タンパク質を沈殿させる傾向が強まる<sup>22)</sup>。PEGとアミノ酸の相互作用を調べた報告によると、芳香族アミノ酸の溶解度は、PEG溶液中で増加する<sup>23)</sup>。トリプトファンはわずかに溶けやすく、グリシンはわずかに溶けにくい(およそ20% PEG4000の溶液に対して1 kJ/mol程度)。さらに、主鎖の効果を差し引くと、結果的にPEG溶液には脂肪族アミノ酸をわずかに溶かす性質がある<sup>24)</sup>。つまり、高濃度のPEGは、タンパク質の疎水性部分に結合する性質があり、弱い変性作用があることを意味する。図4のように整理すると、PEGには、1) 排除体積効果によるタンパク質の安定化と凝集、および、2) 弱い変性作用によるタンパク質の不安定化と溶解を促進する両方の性質がある。

タンパク質一分子に注目したとき、高分子はタンパク質のフォールディングにも影響する。高濃度のPEGや多糖類を加えると、変性状態を不安定化するので、ネイティブ構造が安定化し、フォールディング速度も増加する。このような構造への効果は活性にも影響する。Derhamらは、3種類の多量体酵素にクラウダーを加えて活性の変化を調べた。その結果、PEGやデキストランを加えると活性が減少したが、ヘモグロビンやリゾチームをクラウダーとして加えると活性が5-10倍程度に増加するという興味深い現象を報告している<sup>25)</sup>。おそらく、クラウダーによって多量体形成が促進されて高活性化するが、PEGのように粘度を増加させるクラウダーでは、基質や生成物の拡散速度が遅くなり、かえって活性が減少してしまうのだろう。

このような高分子による混み合いがタンパク質に与える影響は、細胞内でのタンパク質の物性を理解する鍵になる<sup>26)</sup>。

電荷を持つ高分子電解質とタンパク質との相互作用の

研究も進められている。ポリアミノ酸のような高分子電解質とタンパク質は、静電相互作用によって複合体を形成して、複合体の間の静電的な反発力が弱まって沈殿する<sup>27)</sup>。このタンパク質・高分子電解質複合体の沈殿は、静電相互作用が主な駆動力になっているので、pHや塩濃度の変化で凝集の制御ができる<sup>28)</sup>。本特集で栗之丸が解説するように、低塩濃度で抗体・ポリアミノ酸の複合体を形成させた懸濁液は生理食塩水によって簡単に解離させることもできる。高分子電解質をタンパク質にまとわせることで、凝集の制御性を付与するという視点は面白い。

### 凝集の制御へ

タンパク質の凝集剤としての塩と有機溶媒、高分子はそれぞれに特徴がある。簡単にまとめると、1) 塩の凝集剤としての性質は、塩に共通の静電相互作用とホフマイスター系列による特異的な塩析の効果、2) 有機溶媒の凝集剤としての性質は、溶媒の誘電率とタンパク質を変性させるほど強い相互作用、3) 高分子の凝集剤としての性質は、排除体積効果とタンパク質への弱い相互作用が主な因子である。かつてタンパク質の凝集は、水の構造や誘電体など、溶媒全体のバルクの性質から考える研究が盛んに進められてきたが、10年ほど前からようやく、分子間の個々の相互作用を含めた研究が本格化してきている。

このようなタンパク質の凝集の仕組みをふまえると、逆に、タンパク質の凝集抑制剤の理想的な形を思い描くことができる。すなわち、タンパク質の溶解度を増加させる働きを持つが、タンパク質を変性させるほどアミノ酸残基と強く結合せず、水和を強めたり溶液の表面張力を上げたりするような効果も弱い分子がふさわしいだろう。こうして考えると、アルギニン塩酸塩はタンパク質の凝集抑制剤として理想的であることも納得がいくように思う<sup>29)</sup>。なお、アルギニンについては、本特集の荒川らがタンパク質とカラムとの相互作用の制御法について、平野が難溶性の化合物の溶解度の向上について解説している。

タンパク質が凝集する現象は馴染み深いものだが、かなり複雑な現象がおこっている。Matsuokaらは、変性タンパク質の凝集をふせぐ理想的な分子を探す目的で、アミノ酸やその誘導体など40種類を準備し、網羅的に調べた<sup>30)</sup>。その結果、加熱によるタンパク質凝集と還元変性からのリフォールディングにともなうタンパク質凝集を抑制できる分子は違うことがわかった。加熱凝集の抑制にはアミノ酸主鎖の骨格、つまり双性イオンの性質が必要だったが、リフォールディングにともなう凝集の抑制にはアルギニンのグアニジウム基が必要だった。こ

のような結果は実験科学らしい成果だが、では、なぜそうなっているのかという問いに答えることは難しい。アルギニンは化学反応を抑制するし<sup>31)</sup>、芳香族化合物の溶解度を上げ<sup>32)</sup>、低濃度タンパク質でより加熱にともなうタンパク質凝集の抑制効果が高まるが<sup>33)</sup>、こうした実験事実がいったいどのような理由で生じるのかは説明できない。今はこのように、タンパク質の凝集を合理的に制御するまでに必要な、ある種の博物学的知見が蓄積している時期にあたるのだろうと思っている。

### 文 献

- Hofmeister, F.: *Arch. Exp. Pathol. Phamakol.*, **24**, 247 (1888).
- Kunz, W. et al.: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **9**, 19 (2004).
- Green, A.: *J. Biol. Chem.*, **95**, 47 (1932).
- Marcus, Y.: *Chem. Rev.*, **109**, 1346 (2009).
- Omta, A. et al.: *Science*, **301**, 347 (2003).
- Pegram, L. and Record, M.: *J. Phys. Chem. B*, **111**, 5411 (2007).
- Hirano, A. et al.: *Protein J.*, **26**, 423 (2007).
- 荒川 力, 喜多淑子: *生物物理*, **45**, 4 (2005).
- Arakawa, T. and Timasheff, S.: *Biochemistry*, **21**, 6545 (1982).
- Salis, A. and Ninham, B.: *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 7358 (2014).
- Pinna, M. et al.: *J. Phys. Chem. B*, **109**, 5406 (2007).
- Jungwirth, P.: *Nat. Chem.*, **6**, 261 (2014).
- Cohn, E. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 465 (1950).
- Chin, J. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 140 (1994).
- Nozaki, Y. and Tanford, C.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 2211 (1971).
- Arakawa, T. et al.: *Biophys. Chem.*, **131**, 62 (2007).
- Yoshikawa, H. et al.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **50**, 1286 (2012).
- Shiraki, K. et al.: *J. Mol. Biol.*, **245**, 180 (1995).
- Hirota, N. et al.: *J. Mol. Biol.*, **275**, 365 (1998).
- Park, G. et al.: *J. Food Protec.*, **73**, 2232 (2010).
- Yoshizawa, S. et al.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **68**, 169 (2014).
- Arakawa, T. and Timasheff, S.: *Biochemistry*, **24**, 6756 (1985).
- Sasahara, K. and Uedaira, H.: *Colloid Polym. Sci.*, **271**, 1035 (1993).
- Hirano, A. et al.: *Biopolymer*, **97**, 117 (2012).
- Derham, B. and Harding, J.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1764**, 1000 (2006).
- Minton, A.: *Biophys. J.*, **88**, 971 (2005).
- Kayitmazer, A. et al.: *Soft Matter*, **9**, 2553 (2013).
- Kurinomaru, T. et al.: *J. Pharm. Sci.*, **103**, 2248 (2014).
- Arakawa, T. and Kita, Y.: *Curr. Protein Pept. Sci.*, **15**, 608 (2014).
- Matsuoka, T. et al.: *Biotechnol. Prog.*, **25**, 1515 (2009).
- Tomita, S. and Shiraki, K.: *Biotechnol. Prog.*, **27**, 855 (2011).
- Hirano, A. et al.: *J. Biochem.*, **27**, 253 (2008).
- Tomita, S. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 2543 (2012).