

LECTURES

生理現象と高分子排除体積効果 (Excluded Volume Effect) —高分子活量係数 (II)—

^a岐阜大学

^b岐阜大学大学院・医学系研究科・分子生理学分野

^c岐阜大学・工学部・生命工学科

^d自然科学研究機構生理学研究所・統合バイオサイエンスセンター・ナノ形態生理学研究部門

^e独協医科大学・生理学 (生体制御) 教室

^f藤田保健衛生大学・衛生学部・リハビリテーション学科・病理学教室

^g大阪医科大学

曾我美 勝^a, 恵良 聖一^b, 平松 宏一^c
村上 政隆^d, 瀬尾 芳輝^e, 加藤 一夫^f
藤本 守^g

(前編とのつながり) : 前編では, まず Gurney (1953) [23] によって提起されたユニタリー・エントロピー, ユニタリー・エンタルピー (普通のエンタルピーと同じ) およびユニタリー・自由エネルギーについて概説し, 次いで, Kauzmann (1959) [25] がこの表示法を用いて「疎水結合」の概念を提唱するに至った経緯について説明した. すなわち Kauzmann によれば, 疎水性分子を非極性溶媒から水溶液に移動させた場合には, ユニタリー・エントロピー変化 (ΔS_u) が負, かつユニタリー・自由エネルギー変化 (ΔG_u) が正の値となってその系は不安定になる. この水溶液中の疎水性分子表面には構造化された水層 (アイスバグ) が形成されるので, このアイスバグ量を減らそうとして, 疎水性分子は互いに会合する. 彼は, 疎水性分子間にみられるこのような相互作用を「疎水結合」とよんだが, これは上述のように, 「エントロピー由来」の結合である.

しかし「エントロピー由来の相互作用」に関しては, 実はこれ以前に, Asakura & Oosawa

(1954, 1958) によって報告がなされていた [36, 37]. AOモデルとよばれる彼らの理論によれば, 多数のコロイド小粒子を含む溶液中に少数のコロイド大粒子が浮遊しているときに, 大粒子同士が会合すると, 大粒子表面にある小粒子に対する排除領域が減少することによって, 小粒子が自由に並進運動できる容積が増加し (すなわち, 小粒子の並進エントロピーが増加するために), 系全体の自由エネルギーは減少する. このAOモデルは, 報告されて50年たった現在でもその理論の改良や検証実験が発表されている. 続く後編では, この「排除体積効果」が高分子の活量係数に及ぼす影響を与えるかについて説明する (文献番号, 図番号は前編からのとおし番号である).

IV. 排除体積効果と高分子の活量係数—クラウダー理論 (crowder theory)

著者らはこれまでに, 界面活性剤水溶液の性状 [70, 71], タンパク質の溶液→ゲル変換 [72], 赤血球内のHb分子の物理的性状 [73], さらに唾

液腺における諸物質の分泌機序 [74-76] などについて研究を進めてきた。しかしこのような系の研究をさらに踏み込んで推進するには、非常に希薄なタンパク質濃度の溶液状態における研究とは違い、高濃度のタンパク質溶液に関する知見を十分に考慮にいった研究が不可欠なために、まず、高濃度タンパク質溶液（高分子クラウダー溶液 (macromolecular crowder solution)）の生体内における意義や役割に関するデータの総合的な集約の必要性に迫られた。

IV-A. 高分子の活量係数 (activity coefficient)

前編の序章でもすでに述べたが、EMBO ワークショップの紹介記事 (Ellis & Minton [3]) によれば、その国際会議 (Biological Implication of Macromolecular Crowding, 2003) では『クラウダー理論 ((crowder theory); 排除体積効果, すなわち並進エントロピー効果)』の現状について多くの報告がなされたが、さらに、その理論の生命科学分野への応用という点で、その重要性が指摘・強調されたという。従来の生化学領域での‘酵素’活性の測定系としては、少量の酵素を緩衝液に溶かしただけの系での測定が一般的である。しかし Minton らは、このワークショップの多数の研究発表を引用しながら、このような従来型の条件下での酵素反応と、高濃度 (5~30%) のタンパク質など (これを『高分子クラウダー (macromolecular crowder)』とよぶ) が共存している実際の細胞内での酵素反応とでは、その測定結果には当然大きな差が生じるであろうと指摘し、さらに今後は、生命科学分野の研究においても『クラウダー理論』を考慮することが重要であろうと言及している。すなわち、目的の系のなかに高分子クラウダーが共存していると、クラウダーによる排除体積効果のために、活性を調べたい酵素 (以下『トレーサー (tracer)』とよぶ) の活量係数が 10~100 倍にも増加するので、細胞内における実際の酵素反応は、上述のようなイン・ビトロの希薄な溶液中で得られる結果とは大きく異なるであろうと予測した [2, 3, 77-83]。ここではまず、その“トレーサーの活量係数が増加する機序”について、熱力学的な説明をしよう

(統計熱力学による具体的な計算法については、第 IV-B 章で紹介する)。

少量の i -トレーサーを j -高分子クラウダー溶液に溶かしたときの i -トレーサーの化学ポテンシャル (μ_i) は (7) 式のようになる。

$$\begin{aligned}\mu_i &= \mu_i^0 + RT \ln \gamma_i C_i \\ &= (\mu_i^0 + RT \ln C_i) + RT \ln \gamma_i \\ &= \mu_i^I + \mu_i^{NI}\end{aligned}\quad (7)$$

(7) 式において、 μ_i^0 、 C_i および γ_i は、それぞれ i -トレーサーの標準化学ポテンシャル、濃度および活量係数を示している。I, NI は、それぞれ理想状態 (ideal state) と非理想状態 (non-ideal state) を表している。エンタルピー (H) とエントロピー (S) の偏微分、 $(\partial H / \partial n_i)_{T,P,i \neq j}$ 、 $(\partial S / \partial n_i)_{T,P,i \neq j}$ をそれぞれ h_i 、 s_i とすると、(8A) 式が得られる [2]。

$$RT \ln \gamma_i = \mu_i^{NI} = (h_i - h_i^I) - T(s_i - s_i^I) \quad (8A)$$

第 III 章で述べたときと同様に、トレーサーと高分子クラウダー間に引力や斥力など特別な相互作用がないときは $(h_i - h_i^I) \sim 0$ となり (Minton の総説 [2] の表 1 参照)、(8A) 式は (8B) 式のようになる [1, 2, 81, 83]。

$$RT \ln \gamma_i = \mu_i^{NI} = -T(s_i - s_i^I) \quad (8B)$$

少量の i -トレーサーを j -高分子クラウダー溶液に加えたとき、 i -トレーサー分子内の振動や回転などには変化なく、 i -トレーサーが並進運動に利用できる容積は高分子クラウダーによる排除体積のために減少して V_a となる。理想溶液の容積、すなわち高分子クラウダー分子が排除体積をもたないときの容積を V とすると、 $RT \ln \gamma_i$ は (9) 式のようになる [1, 2, 81, 83-85]。この機構により $\gamma_i > 1$ となる。

$$\ln \gamma_i = \ln(V/V_a) \quad (9)$$

ここで、第III章の(3)式では、分子数の多い高分子(図1の小さい球)が自由に動ける容積を V_f 、理想溶液の容積を V としたが、この章では、分子数の少ない「i-トレーサー分子」が自由に動ける容積を V_a 、溶液の容積を V として、(3)式と(9)式を区別した。

IV-A-1. 単量体 (monomer) の活量係数

これから以下の章では『scaled particle theory (SPT)』という聞き慣れない用語を多く使用するが、その前に、良く知られている van der Waals の不完全気体の状態方程式、 $(P + a/V^2)(V - b) = RT$ を用いてSPTの原型を説明しよう。この式で、 a は気体の分子間引力に関する定数、 b は気体分子(剛体球)の排除体積に関する定数(分子容の4倍)である。van der Waals式を展開すると、 $PV = RT + (RT/V)(b - a/RT) + \dots$ となる。 $(b - a/RT)$ は不完全気体のビリアル展開式($PV = RT[1 + B(T)/V + C(T)/V^2 + \dots]$)の第2項、すなわち第2ビリアル係数に対応している(後述するHb溶液浸透圧の第2ビリアル係数(図2B参照)も、形式的にはこの $(b - a/RT)$ に対応し、Hb分子容の4~5倍である)。『scaled particle』といえは耳慣れない用語に思われるかもしれないが、このように、今までに良く使用されている用語の表現を変えたものである。

球状および棒状の高分子の $\ln \gamma_T$ の統計熱力学による計算法については後述するので、この章ではまずそれらの結果のみ紹介する。図2Aは、Hb溶液の浸透圧の実測データ(Adair (1928))を用いて、SPT法を使って求めたHbの活量係数の対数($\log \gamma_{Hb}$)値の濃度依存性を示す(この図は、Ellis (2001)の総説[80, 81]の中でもよく引用されている代表的な図である)。この図より、濃度が300 g/l(すなわち30%)のような高濃度のときのHb分子の活量係数(γ_{Hb})は、希薄溶液中での値の約100倍にもなることが分かる。またさらに、2種類のHb溶液の浸透圧の実測データ(濃度が~300 g/lまでと~500 g/lまでの2種類のデータ)を使って、MintonとBergがともにSPT法によって計算した結果(それぞれ、

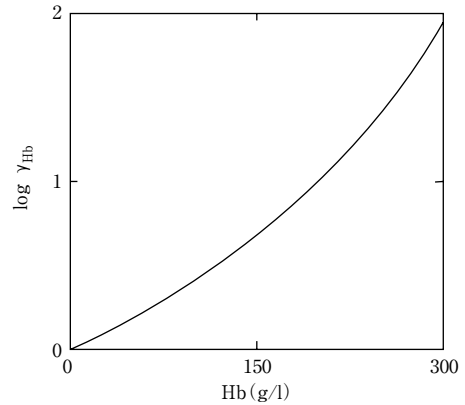


図2A. Hb溶液の浸透圧の実測値(Adair (1928))より求めたHbの活量係数の対数($\log \gamma_{Hb}$)を、Hb濃度(g/l)に対してプロットしたもの(Minton [2]).

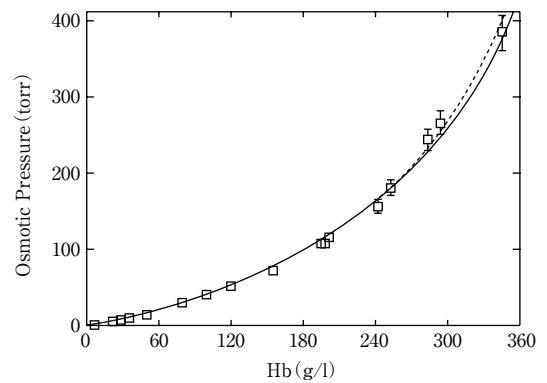


図2B. Hb溶液の浸透圧の実測値(□, Adair (1928))と、MintonおよびBergによるSPT法を用いた計算値(MSPT, 実線; BSPT, 破線)の3データを合わせて、Hb濃度(g/l)に対してプロットしたものを(Guttmanら [86]).

MintonのSPT法をMSPT、BergのSPT法をBSPTと略)を比較検討した報告も行われている[86]。すなわち、かなり前にAdair (1928)が測定したHb溶液の浸透圧実測データ(□)、ならびにMSPT(実線)とBSPT(破線)の解析結果を合わせて、Hb濃度(g/l)に対してプロットしたものを図2Bに示す[86]。余談であるが、Hb濃度が509 g/lまでの測定データはAdair (1928)によるものであるが、これまで未発表だった彼の

そのデータを Dick (1967) が公表し、その公表値を用いて Guttman ら (1995) [86] が SPT 法によって解析・発表している (その経緯の詳細については [86] の引用文献参照)。

単量体の活量係数に対する水和量, 静電気相互作用の補正: scaled particle に対する水和量, 静電気相互作用を考慮した有効比容 [effective specific volume (v_{effect})] による活量係数の補正が報告されている [2, 77]. すなわち v_{effect} は, 偏比容 (partial specific volume), 結合水和量 (hydrated water volume), 静電気相互作用の補正項 (correction for electrostatic interaction) の総和である [2, 77]. 図 2B において, Hb 溶液の浸透圧解析に使用した BSPT 値 [86] の場合, 水和量として 0.4~0.6 g/g Hb をあてがった. pH 7.0 (Hb 分子の等電点) 近傍では静電気相互作用は小さく, v_{effect} は 0.77~0.79 ml/g と報告されている ([77, 86]; 引用文献参照).

この v_{effect} に関連して, ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) の v_{effect} 値は, pH 4.40 (等電点) では 0.62 ml/g, pH 5.05 では 0.82 ml/g, pH 7.60 では 1.67 ml/g と報告されている ([2, 77]; 引用文献参照). これも余談であるが, Edsall ら (1950) による BSA 溶液の光散乱に関する論文では, 未発表であった測定データ (測定されたのは 1950 年) がそれから 32 年後に公表された. Minton ら (1982) はそれらの全データを用いて v_{effect} 値を求めた ([2, 77]; 引用文献参照). 前述した Hb 浸透圧の未発表データは測定されてから約 70 年後に, この BSA 光散乱の未発表データは約 30 年後に公表されて SPT 解析に使用されたが, それらはいずれも現在の SPT 計算に使用し得るに十分な精度を有する測定値であったことは, 今さらながら驚嘆すべきことである.

クラウダー分子: Hb は球状クラウダーの溶液として多くの実験系によく用いられているので, その溶液の性状について簡単に説明する. 浸透圧 [86, 87], 拡散係数 [86, 88] の測定値と SPT 法による予測値の一致, パルス磁場勾配 NMR 法による拡散係数 (tracer diffusion coefficient) [89],

NMR による Hb 分子の回転相関時間 [90], NMR によるラジオ波照射された Hb 分子より水分子への分子間交差緩和速度 [73] など多くの報告では, Hb は高濃度溶液であっても会合状態としてではなく「scaled particle 分散 (浮遊) 溶液」に近い状態であることが示唆されている. しかし Krueger らは, Hb 溶液の中性子小角散乱測定により, 高濃度 Hb 溶液中における分子会合の存在の可能性を示唆している [91, 92]. 彼らは, これらの差異は測定法の時間分解能の差, すなわち中性子小角散乱測定では他の測定法では不可能な, 非常に過渡的な弱い相互作用をも観測しているためであろうと説明している [92].

上述のように, 溶解度の大きい Hb, BSA, デキストラン溶液などが高分子クラウダーとして良く使用されている. Minton ら (1992) は, Hb (分子量, 65×10^3) 溶液中における固い球状のトレーサー (rigid hard sphere tracer) の活量係数 (γ_T) がその分子量の変化によってどのように変化するかを, SPT 法を用いて計算した [80, 93] (以下, トレーサーの活量係数を「 γ_T 」と表示する. これまでは温度 T との混乱を避けるために i 表示を用いた). 図 3 は, Hb 溶液 (この場合, 300 g/l) 中における $\log[\text{トレーサーの分子量}]$ と $\log \gamma_T$ との関係を示している. 興味ある

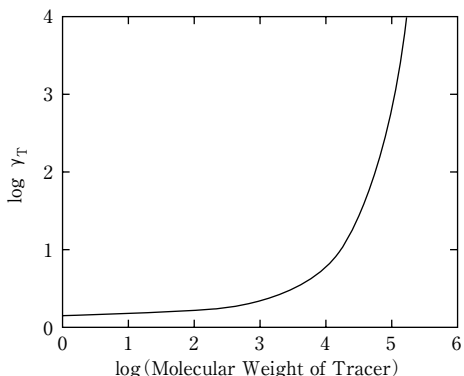


図3. 濃度が 300 g/l の Hb 溶液 (球状のクラウダー溶液) 中において, 固い球状のトレーサー (比容, 1.0 ml/g) の活量係数の対数 ($\log \gamma_T$) を, そのトレーサーの分子量の対数に対してプロットしたものの (Minton ら [93]).

点は、この系のクラウダーの分子量が 65×10^3 (すなわち Hb の分子量) のときには、球状のトレーサー自身の分子量が 10^4 以上にならないと $\log \gamma_T$ 値の急激な増加はみられない。すなわち、球状のトレーサーの分子量が高分子クラウダーのそれと同程度、あるいはそれ以上にならないと、この系では明確なクラウダー効果が観測されない ということである。

さらに Hall & Minton (2003) [83] は、上述の結果を別の観点から整理した計算結果を示した。図4では、トレーサー (分子量, M_T) およびクラウダー (分子量, M_C) がともに固い球形であるとするとき、 $\log \gamma_T$ 値 (トレーサーの活量係数の対数) が球状のクラウダーの体積分率 (volume fraction, ϕ) に対してどのような変化を示すかについて、 $[M_T/M_C]$ 値がそれぞれ 0.1, 0.3, 1, 3 および 10 の場合に対して、SPT法を用いて求めた。図4から明らかなように、 $[M_T/M_C]$ 比が1以上でないと $\log \gamma_T$ 値の顕著な増加はみられない。すなわち、トレーサーの分子量が高分子クラウダーのそれと同程度あるいはそれ以上にならないと、明確なクラウダー効果は観測されない。

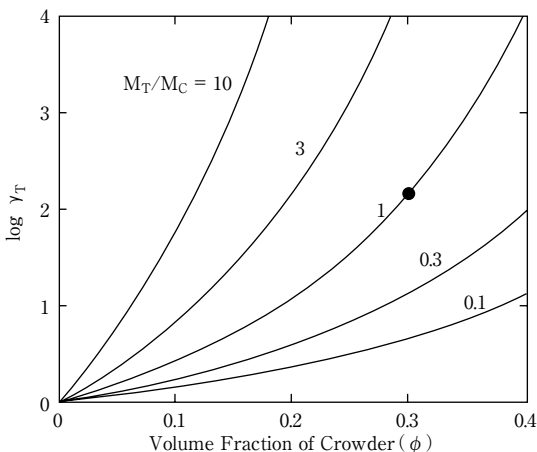


図4. 球状のクラウダー溶液 (分子量, M_C ; 体積分率, ϕ) 中において、球状のトレーサー (分子量, M_T) の活量係数の対数 ($\log \gamma_T$) を、クラウダーの ϕ 値に対してプロットしたもの。 $[M_T/M_C]$ 値がそれぞれ、0.1, 0.3, 1, 3 および 10 の場合における変化を示している (Hall & Minton [83])。

IV-A-2. 二量体 (dimer), 三量体 (trimer) … の活量係数

2個のR分子から二量体Pが生成される反応におけるクラウダーの効果を考えてみよう [83] (R, Pおよびクラウダーはともに固い球形, Pの分子容はRの分子容の2倍と仮定)。



$$(\gamma_P C_P) / (\gamma_R^2 C_R^2) = K_0 \quad (11A)$$

$$C_P / C_R^2 = K_0 (\gamma_R^2 / \gamma_P) = K_0 \Gamma \quad (11B)$$

図5Aは、二量体の生成反応における $\log \Gamma$ とクラウダー分子の体積分率 (ϕ) の関係を、Rの分子容 (v_R) とクラウダーの分子容 (v_C) の比、すなわち $[v_R/v_C]$ の値が0.3, 1および3の場合に対して示している。図から明らかなように、 $[v_R/v_C]$ 値が大きくなるにつれて、 $\log \Gamma$ 値も大きくなる。すなわち C_P/C_R^2 も大きくなって、クラウダーの存在下ではトレーサーの二量体がより多く生成されるようになる。また図5Aの結果は、

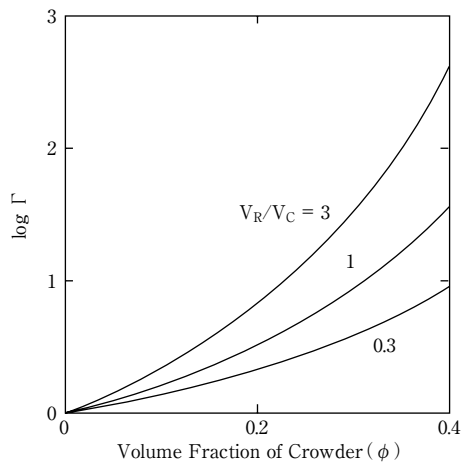


図5A. 球状のクラウダー溶液 (体積分率, ϕ) 中において、 $2R \rightleftharpoons P$ (二量化反応, R, Pは球形) のR, Pそれぞれの活量係数を γ_R, γ_P としたとき、 $\Gamma = (\gamma_R^2 / \gamma_P)$ の対数 ($\log \Gamma$) を、クラウダーの ϕ 値に対してプロットしたもの。Rの分子容 (v_R) とクラウダーの分子容 (v_C) との比、 $[v_R/v_C]$ が0.3, 1および3の場合における変化を示している ($v_P = 2v_R$ と仮定) (Hall & Minton [83])。

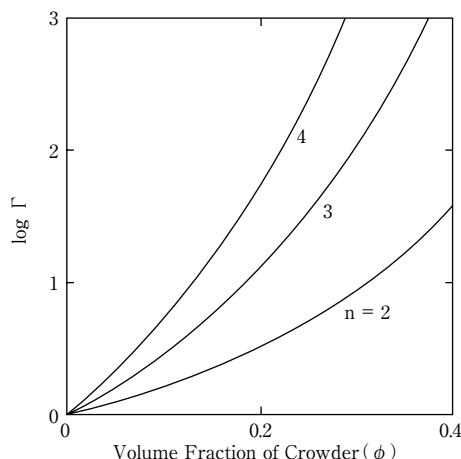


図5B. 球状のクラウダー溶液（体積分率， ϕ ）中において， $nR \rightleftharpoons P$ （ n 量体反応， R ， P は球形）の R ， P それぞれの活量係数を γ_R ， γ_P としたとき， $\Gamma = (\gamma_R^n / \gamma_P)$ の対数（ $\log \Gamma$ ）を，クラウダーの ϕ 値に対してプロットしたもの． R の分子容（ v_R ）とクラウダーの分子容（ v_C ）との比， $[v_R/v_C]$ は1で，式の n が2，3および4の場合における変化を示している（Hall & Minton [83]）．

AOモデルと形式的には同等であろう．AOモデルでは「高分子半径/コロイド大粒子半径」が0.70（Meijerら [48]，Bolhuisら [49]）や0.60（Poon [50]，Aartら [51]）の場合においても成立すると報告されているが，この場合の $[v_R/v_C]$ 値に換算すると，それぞれ2.9と4.6となる（第III-B章参照）．

次に， n 量体の生成反応におけるSPT法による解析結果（Hall & Minton（2003）[83]）について説明する． n 個の R 分子が n 量体 P を生成する反応におよぼすクラウダーの効果について考えてみよう（ R ， P およびクラウダーはいずれも固い球と仮定）．



$$C_P/C_R^n = K_0 (\gamma_R^n / \gamma_P) = K_0 \Gamma \quad (13)$$

P の分子容（ v_P ）は R の分子容（ v_R ）の n 倍であるが，クラウダー分子の体積分率（ ϕ ）が0から0.4のときに， $\log \Gamma$ の値が n の値によってどのよ

うに変化するかを図5Bに示す．図から明らかのように， n の値が大きいくほど $\log \Gamma$ の値も大きくなっている．すなわち適度な量のクラウダー存在下では，より多量体が生成する方向に反応がすすむといえる．実際の細胞内では，クラウダーに相当したタンパク質の濃度が非常に大きいために，アクチン，チューブリンなどの単量体物質からアクチンフィラメントやマイクロチューブルなどの超高分子量集合体が形成されやすい機構も理解できるであろう（第IV-B-2章参照）．

図6は，図5Bの四量体形成反応におけるクラウダーの効果をも，反応軸に対して視覚的に説明した模式図である（Minton（1983）[2]）．すなわち，上より H ， $-TS$ ， G 値（Gibbs自由エネルギー）に対応し，一番下のスキームは4個の単量体（ $4P_1$ ），その遷移状態（ T ）および四量体（ P_4 ）を示している．また中央にある1本の縦破線は，反応軸（reaction coordinate; 横軸）上における遷移状態（transition state, T ）の位置を示し，横破線と横実線はそれぞれ，クラウダーが共存するときとしないときの H ， $-TS$ および G 値を示している．第III，IV章で説明したように，（a）トレイサーとクラウダーの分子（固い球； scaled particle）間には特別な引力あるいは斥力は働かない（仮定）．したがって，エンタルピー（ H ）自身には変化がないので， H のところでは横破線と横実線の軌跡は概ね重なっている（Mintonの総説 [2] の表1参照）．ところが（b）この系にクラウダーが共存すると，（9）式によって $RT \ln (V/V_a)$ だけ $-TS$ 値（エントロピー項）は増加する．このために（c）クラウダー分子が共存するときは，自由エネルギー（ G ）は横破線で示すように増加する．4個の単量体，遷移体および四量体の自由エネルギーをそれぞれ $G(4P_1)$ ， $G(T)$ ， $G(P_4)$ とすると，4個の単量体から遷移状態への活性化自由エネルギー， $[G(T) - G(4P_1)]$ は，四量体から遷移状態への活性化自由エネルギー， $[G(T) - G(P_4)]$ よりも小さくなって，反応は四量体形成の方向に進行する．これが図5Bにおける $n = 4$ の場合に対応した模式図的な説明である．

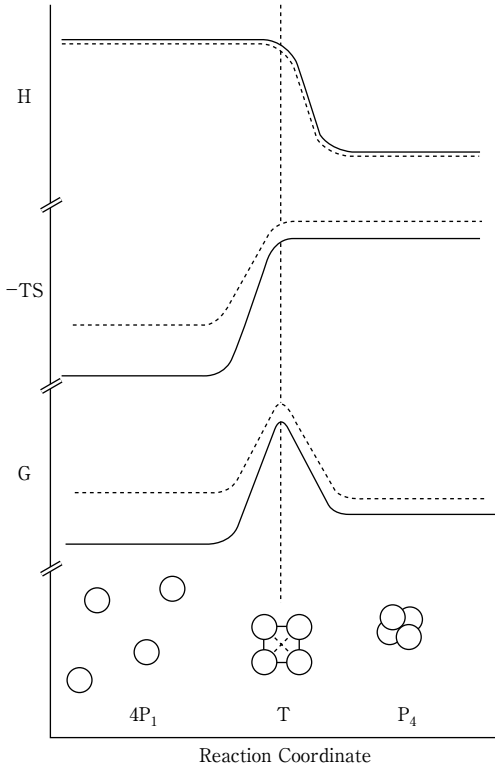


図6. 図5Bの中の四量体反応におけるエンタルピー (H), エントロピー項 (-TS), ギブスの自由エネルギー (G) の変化について, 横軸を反応軸として表示した模式図. クラウダーが共存する溶液中での反応は「破線」表示, クラウダーが共存していない場合の溶液中での反応は「実線」表示にしてある. P_1 , T , P_4 は, それぞれ単量体, 遷移状態, 四量体を示す (Minton [2]).

IV-B. 高分子の活量係数の scaled particle theory による計算法とアミロイド線維生成への応用

IV-B-1. 高分子の活量係数の scaled particle theory による計算法

これまでに高分子トレイサーの活量係数 (γ_T) の結果のみを図2~5に示したが, 以下の節では $\ln \gamma_T$ の具体的な計算法について説明し, その応用例を示す.

固い球形のトレイサー (spherical tracer) が固い球形のクラウダー溶液 (fluid of rigid spheres) 中にあるときの $\ln \gamma_T$ 値を求める式については, 多くの研究者が, 一見異なるような表示を使った式を發表している [2, 78, 79, 82, 86,

94, 95]. また Minton (1998) は, 上記引用論文以外の $\ln \gamma_T$ の理論式について比較検討した結果を報告している. すなわち, Minton の総説 [78] の表IV及び図1において, 4種類の理論式 (理論式の一つは後述の (14B) 式と同じ) によって求めた $\log \gamma_T$ 値を, クラウダーの体積分率 (ϕ) 値が0.7の近傍まで比較検討しているが, ϕ 値が0.5以下の場合ではこれらの理論式による結果 (計算値) にはほとんど差はない, すなわち, 排除体積効果を考慮した4種類の理論式は実用的にはほとんど差を示さないようである.

今, スフェロシリンダー (spherocylinder) という形状について説明する. すなわち, 直径が $2r_T$, 長さが l_T の円筒 (i 個の単量体の会合) の両端に直径が $2r_T$ の半球 ($n/2$ 個の単量体) をつけたような形のことをスフェロシリンダーとよぶ. そこで, 半径が r_C の球形のクラウダー溶液中に存在するスフェロシリンダー形のトレイサー (spherocylindrical tracer) の $\ln \gamma_T$ 値について, Hall & Minton [82] による理論式を示す (余談であるが, 第IV-B章の式は全て, (14A), (15A) 式から容易に誘導できる).

$$\ln \gamma_T = -\ln(1 - \phi) + A_1 Q + A_2 Q^2 + A_3 Q^3 \quad (14A)$$

ここで, Q , A_1 , A_2 , A_3 は以下のとおりである.

$$Q = \phi / (1 - \phi)$$

$$A_1 = R^3 + 3R^2 + 3R + 1.5L_T(R^2 + 2R + 1)$$

$$A_2 = 1.5(2R^3 + 3R^2) + 4.5L_T(R^2 + R)$$

$$A_3 = 3R^3 + 4.5L_T R^2$$

$L_T = l_T / 2r_T$ (円筒, 両端の半球が, それぞれ i , $n/2$ 個の単量体から構成されているときは, $L_{T,i} = 2(i - n) / 3n$ となる; 第IV-B-2章においてこの表示を使用)

$$R = r_T / r_C$$

スフェロシリンダー形のトレイサーの式を用いて, Rivas ら [95] は円筒状で中央と両端の少し

膨らんだ形 (trinodal form) のフィブリノーゲンをスフェロシリンダー形状に置き換えて、BSAのクラウダー溶液中におけるフィブリノーゲンの活量係数の対数 ($\ln \gamma_{\text{Fbg}}$) の実験値、およびSPT法による計算値を求めた。その結果BSA溶液の濃度が80と100 g/lでは、 γ_{Fbg} 値はそれぞれ ~ 10 、 ~ 25 となった。フィブリノーゲンによるESR現象の促進がヒト血清アルブミン (human serum albumin, HSA) の存在によって増強されたという結果 (Shigaらの総説 [41; 図15]) は、このRivasら [95] の結果と同様に、HSAがクラウダーとなってフィブリノーゲンの活量係数を増加させたことに起因したと考えられる (前編 IIIA 参照)。また球形のトレーサーの場合は $L_T = 0$ として計算すればよい。応用例として、球状タンパク質の $\ln \gamma_T$ は $R = r_T/r_C = 1$ として、(14B) 式を用いて計算すればよい ((14B) 式は Minton の総説 [79] の表IVに、またその計算結果は図1に図示されている)。

$$\ln \gamma_T = -\ln(1-\phi) + 7Q + 7.5Q^2 + 3Q^3 \quad (14B)$$

Hall & Minton (2002) [82] によると、半径 r_C の棒状のクラウダー溶液 (fluid of rigid rods) 中におけるスフェロシリンダー形のトレーサーの $\ln \gamma_T$ は (15A) 式になる。

$$\ln \gamma_T = [1 + (r_T/r_C)] [1 + (L_T + 1)(r_T/r_C)] \phi \quad (15A)$$

球形のトレーサーの場合は前述と同様に、 $L_T = 0$ として計算すると (15B) 式ようになる。

$$\ln \gamma_T = [1 + (r_T/r_C)]^2 \phi \quad (15B)$$

Hattersら [94] は、棒状のクラウダー溶液としてデキストラン (a random array of rods [94-96]) を使用し、 r_C および比排除体積 (specific exclusion volume, v_C) をそれぞれ0.7 nmおよび0.8 cm³/gとした (余談であるが、Hattersら [94]、Rivasら [95, 96] も Minton と共著で (15A)、

(15B) 式に相当した理論式を報告している)。

IV-B-2. アミロイド線維生成への応用

Hattersら [94] は、デキストラン溶液中におけるヒトのアポリポタンパク質 C-II (apoC-II) のアミロイド線維形成について、(15A) および (15B) 式を用いて解析した。



(16) 式において、デキストランが存在しないとき、すなわちクラウダーが共存しないときの正、逆の反応速度定数をそれぞれ k_f^0 、 k_b^0 、またクラウダーが共存するときの正、逆の反応速度定数をそれぞれ k_f 、 k_b とする。遷移状態が反応速度決定に寄与し、 k_b がデキストランに影響されないとき (図6のGを参照)、すなわち $k_b \sim k_b^0$ のときに $k_f \sim k_f^0 (\gamma_1 \gamma_{i-1} / \gamma_i) = k_f^0 \Gamma_i$ となる [83, 94]。アポリポタンパク質 C-II の単量体は球形のトレーサーに対応した $\ln \gamma_{T,1}$ ((15B) 式)、アミロイド線維はスフェロシリンダー状のトレーサーに対応する $\ln \gamma_{T,i-1}$ 、 $\ln \gamma_{T,i}$ ((15A) 式) を使用し、会合がある程度進行した後は $r_{T,i} \sim r_{T,i-1}$ と仮定すると、 $\ln \Gamma_i$ は下式のように表示される (繰返しになるが、サブスクリプト、Tはトレーサー (tracer) を表示し、反応過程の遷移状態 (transition state) を示すものではない)。

$$\begin{aligned} \ln \Gamma_i &= \ln \gamma_{T,1} + \ln \gamma_{T,i-1} - \ln \gamma_{T,i} \\ &= [1 + (r_{T,1}/r_C)]^2 \phi + \\ &\quad [1 + (r_{T,i}/r_C)] [L_{T,i-1} - L_{T,i}] (r_{T,i}/r_C) \phi \\ &= [1 + (r_{T,1}/r_C)]^2 \phi - [1 + (r_{T,i}/r_C)] [\Delta] \\ &\quad \times (r_{T,i}/r_C) \phi \end{aligned} \quad (17)$$

Hatterら [94] は、 $r_{T,1} = 2.1$ nm、 $r_{T,i} = 2.4$ nm、 $r_C = 0.7$ nm、 $\Delta = 0.104$ の値を与えたときには $\ln \Gamma_i = 0.11 \phi$ となって、アミロイド線維の生成速度がデキストランによって促進されることを実験的にも示した。Kinoshitaらは、より拡張・改良されたAOモデルを使用してアミロイド線維形成反応を解析した [56, 57, 59]。またRivasらは、フィブリノーゲン、チューブリンとデキストラン

[95], 細菌の細胞分裂タンパク質 (bacterial cell division protein) の FtsZ (分子量, 40×10^3) と Hb, BSA (球形クラウダー) の系 [96] について解析している。

V. おわりに

著者らが分担して調べた問題をまとめると, 下記の項目 **A**, **B** のようになる。

(A1) 低分子 (無機イオン) の静電気相互作用に由来する活量係数 (Debye-Hückel 理論, 1923).
(A2) Asakura-Oosawa モデル (1954, 1958) : 高分子とコロイド粒子間に特別な相互作用がなくても, 高分子溶液 (小さい球で, 粒子数は多い) 中に分散 (浮遊) しているコロイド粒子 (大きな球で, 粒子数は少ない) 同士が近接・接触 (会合) すると, コロイド粒子表面上にある高分子に対する排除領域が減少するので, 高分子が自由に並進運動できる容積が増加する (すなわち, 高分子の並進エントロピーが増加する). 高分子数が圧倒的に多いために, この増加はコロイド粒子間の会合による混合エントロピーの減少をカバーする. 従って, 系全体としての自由エネルギーは減少して, 結局, 系は安定になる. このような機構による会合を「枯渇引力」と呼ぶ. (A3) クラウダー理論 (crowder theory) : 目的の系にクラウダー分子 (crowder molecule ; たとえば, ヘモグロビン, 血清アルブミン, デキストランなど) を加えると, トレイサー分子 (tracer molecule ; たとえば, 酵素, あるいは目的とする特殊なタンパク質など) の活量係数は顕著に増加する. すなわち, (トレイサー分子とクラウダー分子間には特別な相互作用はないという条件下で) トレイサー分子溶液内にクラウダー分子を加えると, トレイサー分子の内部エネルギーは変化しないが, クラウダー分子の排除体積効果のために, トレイサー分子が並進運動に利用し得る容積は減少する. このためトレイサー分子の並進エントロピーは減少し, 自由エネルギーは増加する (図6). すなわち, トレイサー分子の活量係数が増加する.

(B) 実際の細胞内の微細構造と生理機能との問題: 例えば, Medalia ら [97] による細胞質の

電子顕微鏡写真に示されるように, 細胞質には高濃度のタンパク質およびアクチンフィラメントなどの細胞骨格タンパク質が共存している. 酵素活性に対する高濃度タンパク質の影響については, 前述のクラウダー理論によってかなり洞察を加えることが可能になった. しかし, 細胞質フィラメント・ネットワーク構造における細隙, 細孔内 (ナノメートル・オーダー) のタンパク質の自由エネルギー (化学ポテンシャル) に対する影響は, 今後に残された問題である. フィラメント構造物表面の水構造と細胞内の水構造変化の問題も従来より取り上げられている. Giddings ら (1968) [85] は分子篩クロマトグラフィーにおけるポラス・ネットワークと溶液間の分配係数, すなわち自由エネルギー変化の解析を試みている. また Minton (1992, 1995) [98, 99] も各種の形状をもつナノメートル・オーダーの細隙, 細孔内の溶質分子の自由エネルギーの解析を試みている.

実際の生きた細胞内には上述の諸問題以外にも, シャペロンのような超微小空間におけるタンパク質の構造と安定性の問題 [81, 100 : 引用文献参照] など, まだまだ解決すべき問題が数多くある. これらを解明する研究手段としては, 昨今の分子生物学的手法以外にも, 本講座全般で述べたような物理化学的手法が今後有力な研究手段となり得る場合も多々あろうと思われるので, 今回はその手法の捉え方・考え方の一端を紹介した.

文 献

70. Hiramatsu K, Kameyama K, Ishiguro R, Mori M and Hayase H : Properties of dilute aqueous solutions of double-chain surfactants, alkyl dodecyl ammonium bromides with a change in the length of the alkyl chains. *Bull. Chem. Soc. Japan* **76** : 1903–1910, 2003
71. Yokoyama Y, Ishiguro R, Maeda H, Mukaiyama M, Kameyama K and Hiramatsu K : Quantitative analysis of protein adsorption on a planar surface by Fourier transform infrared spectroscopy : lysozyme adsorbed on hydrophobic silicon-containing polymer. *J. Colloid Interface Sci.* **268** : 23–32, 2003
72. Era S, Sogami M, Kuwata K, Fujii H, Suzuki E, Miura K, Kato K and Watari H : ^1H -n.m.r. studies on cross-relaxation phenomena in bovine mercaptalbumin solution and partially hydrolyzed bovine plasma

- albumin (BPA*) gel. *Int. J. Peptide Protein Res.* **33** : 214–222, 1989
73. Sogami M, Uyesaka N, Era S and Kato K : Saturation transfer in human red blood cells with normal and unstable hemoglobin. *NMR Biomed.* **16** : 19–28, 2003
 74. Murakami M, Yoshimura K, Segawa A, Loffredo F and Riva A : Relationship between amylase and fluid secretion in the isolated perfused whole parotid gland of the rat. *Eur. J. Morphol.* **38** : 243–247, 2000
 75. Yoshimura K, Fujita-Yoshigaki J, Murakami M and Segawa A : Cyclic AMP has distinct effects from Ca^{2+} in evoking priming and fusion/exocytosis in parotid amylase secretion. *Eur. J. Physiol.* **444** : 586–596, 2002
 76. Murakami M, Yoshimura K, Sugiya H, Seo Y, Luffredo F and Riva A : Relationship of fluid and mucin secretion to morphological changes in the perfused rat submandibular gland. *Eur. J. Morphol.* **40** : 203–207, 2002
 77. Zimmerman SB and Minton AP : Macromolecular crowding : Biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22** : 27–65, 1993
 78. Minton AP : Molecular crowding : Analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. *Methods in Enzymol.* **295** : 127–149, 1998
 79. Minton AP : Effect of a concentrated “inert” macromolecular cosolute on the stability of a globular protein with respect to denaturation by heat and by chaperons : A statistical-thermodynamic model. *Biophys. J.* **78** : 101–109, 2000
 80. Ellis RJ : Macromolecular crowding : an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11** : 114–119, 2001
 81. Ellis RJ : Macromolecular crowding : obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* **26** : 597–604, 2001
 82. Hall D and Minton AP : Effects of inert volume-excluding macromolecules on protein fiber formation. I. Equilibrium models. *Biophys. Chem.* **98** : 93–104, 2002
 83. Hall D and Minton AP : Macromolecular crowding : qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges. *Biochim. Biophys. Acta* **1649** : 127–139, 2003
 84. Lebowitz JL, Helfand E and Prestgard E : Scaled particle theory of fluids mixtures. *J. Chem. Phys.* **43** : 774–779, 1965
 85. Giddings JC, Kucera E, Russell CP and Myers MN : Statistical theory for the equilibrium distribution of rigid molecules in inert porous networks. Exclusion chromatography. *J. Phys. Chem.* **72** : 4397–4408, 1968
 86. Guttman HJ, Anderson CF and Record Jr. MT : Analyses of thermodynamic data for concentrated hemoglobin solutions using scaled particle theory : Implications for a simple two-state model of water in thermodynamic analyses of crowding in vitro and in vivo. *Biophys. J.* **68** : 835–846, 1995
 87. Ross PD and Minton AP : Analysis of non-ideal behavior in concentrated hemoglobin solutions. *J. Mol. Biol.* **112** : 437–452, 1977
 88. Minton AP and Ross PD : Concentration dependence of the diffusion coefficient of hemoglobin. *J. Phys. Chem.* **82** : 1934–1938, 1978
 89. Everhart CH and Johnson Jr. CS : The determination of tracer diffusion coefficients for proteins by means of pulsed field gradient NMR with applications to hemoglobin. *J. Magn. Reson.* **48** : 466–474, 1982
 90. Koenig CH and Brown III RD : Field-cycling relaxation of protein solutions and tissue : Implications for MRI. *Prog. NMR Spectr.* **22** : 487–567, 1991
 91. Krueger S and Nossal R : SANS studies of interacting hemoglobin in intact erythrocyte. *Biophys. J.* **53** : 97–105, 1988
 92. Krueger S, Chen S-H, Hofrichter J and Nossal R : Small angle neutron scattering studies of HbA in concentrated solutions. *Biophys. J.* **58** : 745–757, 1990
 93. Minton AP, Colclasure GC and Parker JC : Model for the role of macromolecular crowding in regulation of cellular volume. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 10504–10506, 1992
 94. Hatters DM, Minton AP and Howlett GJ : Macromolecular crowding accelerates amyloid formation by human apolipoprotein C-II. *J. Biol. Chem.* **277** : 7824–7830, 2002
 95. Rivas G, Fernandez JA and Minton AP : Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium : Theory, experiment, and biological significance. *Biochemistry* **38** : 9379–9388, 1999
 96. Rivas G, Fernandez JA and Minton AP : Direct observation of the enhancement of noncooperative protein self-assembly by macro-molecular crowding : Indefinite linear self-association of bacterial cell division protein FtsZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98** : 3150–3155, 2001
 97. Medalia O, Weber I, Frangakis AS, Nicastro D,

- Gerisch G and Baumeister W : Macromolecular architecture in eukariotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science* **298** : 1209–1213, 2002
98. Minton AP : Confinement as a determinant of macromolecular structure and reactivity. *Biophys. J.* **63** : 1090–1100, 1992
99. Minton AP : Confinement as a determinant of macromolecular structure and reactivity. II. Effects of weakly attractive interactions between confined macrosolutes and confining structures. *Biophys. J.* **68** : 1311–1322, 1995
100. Eggers DK and Valentine JS : Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability. *Protein Sci.* **10** : 250–261, 2001