

後藤 祐児 大阪大学蛋白質研究所 教授

溶解度と過飽和に基づく 蛋白質凝集の理解



ごとう・ゆうじ

1982年大阪大学大学院博士課程修了（理学博士）、1982年徳島大学医学部助手、1984年大阪大学理学部助手、1989年同助教授、1998年大阪大学蛋白質研究所教授

筆者は1970年代後半から、蛋白質研究に関わってきた。当時、蛋白質の凝集は、蛋白質研究の障害と見なされた。その後、蛋白質凝集がさまざまな病気に関わることがわかり、凝集を避けることはできなくなった。アミロイド線維を中心とする蛋白質異常凝集の研究が進むと、「溶解度」や「過飽和」、「結晶化」といった視点から研究を進めることの重要性が明らかになってきた。これらの研究は、正に分子科学の得意とするものである。分子科学と蛋白質科学が協力することによって、蛋白質異常凝集の新たな地平を切り開くことができる。分子科学に期待するところ大である。

1. 分子研との関わりと共同利用

古い記録を探すと、1985年12月頃、分子研をはじめて訪問した。当時、大阪大学理学部において、抗体やそれに結合する Secretory Component という蛋白質の構造物性を研究していた。同物理学科の櫛田孝司研究室の、木下修一さん、栗田厚さんなどにお願

いして、分子研の極端紫外光研究施設（UVSOR）で、蛍光寿命や蛍光偏光解消を測定してもらうことになった。UVSORの稼動は1983年なので、共同利用がはじまって間もないころに訪問したことになる。実験ホールに入ったとき、最先設備を駆使した実験施設において、全国的な共同利用が行われていることに、大いに感動したことを思い出す。残念ながら筆者のもちこんだ試料については、論文を発表するまでには至らなかった。

筆者の在籍している大阪大学、蛋白質研究所では、1958年の設立以来、共同利用・共同研究を活動の基盤としている。時代の変遷と共に、共同利用の在り方は変化した。現在では、スプリング8蛋白質ビームラインや950 MHz 超高磁場NMR装置などの大型機器の共同利用、世界蛋白質立体構造データベース（wwPDB）の世界3拠点の一つとしての活動に力を入れている。他方、設立当初から変わらない活動に、蛋白研セミナーがある。毎年十数件の蛋白研セミナーが開催され、各セミナーに

は数十から百名程度が参加している。関連分野、あるいは分野を超えて、焦点を絞った研究会は、その研究領域の交流と活性化に重要な役割を果たしている。

今日、研究機器や設備の充実、ネットワークの普及によって、我々は、直接、顔を合わせなくても、多くのことを済ますことができる。しかし、できないことも多い。蛋白研セミナーなどで、対面して他を知り、仲間を作るとは、研究の進展に必須であると共に、喜びである。

国際交流においても全く同じである。世界のグローバル化により、欧米に長期滞在しなくても、あるいは国外の学会に参加しなくても、インターネットによって、極めて質の高い研究情報を得ることができる。しかし、人と人の交流の重要性は、変わらない。従って、交流は、国内だけでなく、世界に向かうべきである。幸いなことに我々は、アジアに多くの仲間をもつ。蛋白質科学の領域では、Asia Pacific Protein Associationという新しい連合組織が

発足した (<http://www.pssj.jp/APPA/>)。現在、アジア・太平洋地域の13カ国が参加しており、同地域の勢いを反映している。このような流れを認識し、さまざまな集会を企画して、人の交流を推進することが、共同利用・共同研究の拠点として重要である。分子科学研究所と蛋白質研究所に共通した課題と考える。

2. 蛋白質凝集の回避

筆者自身の研究を振り返ったとき、凝集に対する意識の変化に感慨を覚える。1986年頃、UC Santa CruzのFink教授の研究室において、 β ラクタマーゼの「モルテン・グロビュール状態」と呼ばれる中間の状態の構造や安定性を研究していた^[1]。動的光散乱によって何とかそのサイズを測定しようとした。ところが光散乱によって、 β ラクタマーゼは大きな凝集体を形成していることが明らかとなった。「他の蛋白質ではモルテン・グロビュール状態のサイズが報告されているのに、 β ラクタマーゼは濁ってしまい測定できない。ああ、何と残念なことだろう。」と嘆いた。

昔も今も、蛋白質研究と言えば、濁っていない溶液を対象として研究をすることが中心である。ここで、「蛋白質とは何か?」と問われたとき、皆さんは、何と答えるだろうか。「生体の機能物質」、「アミノ酸がペプチド結合でつながった鎖状高分子」等々、さまざまな回答が考えられる。しかし、歴史的には、『蛋白質とは、(熱や酸によって)変性して、凝集する生体物質』であった。今でも日常の食品としての蛋白質においては、凝集が蛋白質の本質的な特徴であることを日々、実感する。

蛋白質が科学の研究対象となったとき、研究手法のほとんどが溶液を必

要としたため、凝集や濁りは研究から排除された。これによって蛋白質研究が大きく進展したことは疑いもないが、本来、蛋白質のもつ本質的な特徴は無視された。遂には、濁りは実験条件が悪いためとさえ、考えられるようになった。本末転倒であるが、筆者の嘆いたモルテン・グロビュールの凝集などは、正にそのような状況にあった。

3. 蛋白質凝集研究の進展

凝集を理解しようとする研究が大きく進展したのは、1990年に入ってからであった。医学の重要なテーマであったアミロイドーシスやその原因物質であるアミロイド線維に、注目が集まった。決定的であったのは、1995年頃に社会問題となったBSE(ウシ海綿状脳症)である。蛋白質の異常凝集体が、BSEをはじめとするプリオン病の感染原因物質であることが示唆された。異常凝集やミスフォールディングが、プリオン病、アルツハイマー病をはじめとするさまざまなアミロイドーシス、あるいはセルピン病などの原因となっていることが提案された。フォールディング病、コンフォメーション病、蛋白質異常凝集などの用語が現われ、関連

する分野が台頭した。

特にアミロイド線維を対象とした研究が進展するにつれて、ユニークな特徴が目されることになった。第一に、アミロイド線維の形成は、一定のラグ時間の後に突然起きる。また、一旦できあがった線維(シード)をモノマー溶液に加えることによって、ラグ時間をなくすることができる。これらは全て、物質の結晶生成の特徴と同じである。つまり、アミロイド線維は、原因蛋白質の過飽和溶液が解消されたときに析出する構造形態であることが明らかである。プリオン病は蛋白質によって伝播する。不思議な現象と考えられているが、結晶成長と同じと考えると、かなりの部分は理解できる。

2000年以降、アミロイド構造生物学という領域が台頭した。アミロイド線維やその前駆体、あるいはオリゴマーを構造生物学的に研究することによって、凝集の分子機構を理解しようとする研究が盛んである(図1)。そのような研究が重要であることは、もちろん言うまでもないが、これとは別の視点からの研究も重要であると考えている。

筆者らは、超音波を用いることによって、モノマーであったアミロイド原因

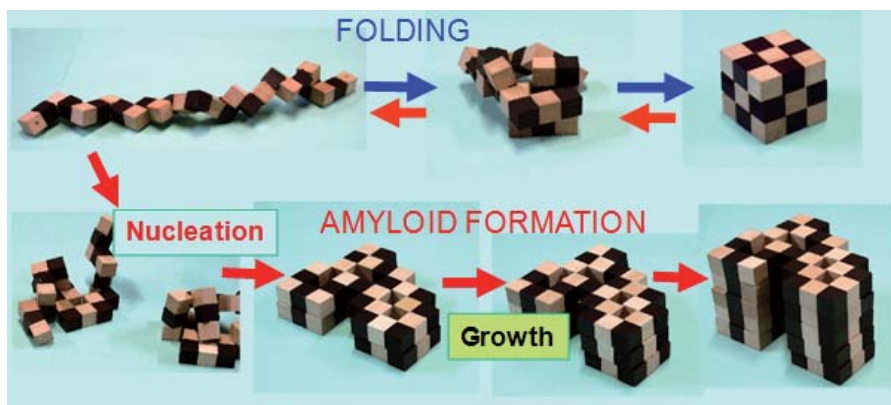


図1 積み木パズルを用いた蛋白質のフォールディング(上)とアミロイド線維形成(下)のイメージ。

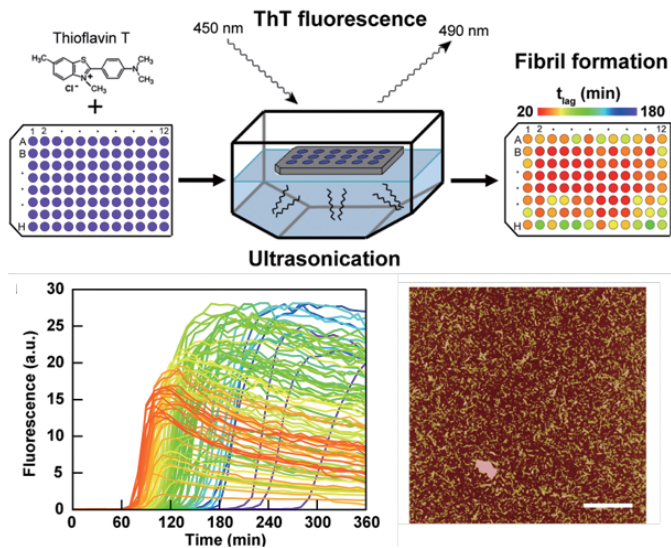


図2 超音波による β 2ミクログロブリンのアミロイド線維形成。文献[3]を改変。96穴プレートに蛋白質溶液とチオフラビンTを加え、超音波を照射する。チオフラビンTの蛍光強度を観測することによってアミロイド線維の形成を検出する(下左)。赤い穴が、より速くアミロイド線維を形成した。右下は生成したアミロイド線維の原子間力顕微鏡画像。破碎効果も加わり、短い線維がたくさんできている。

蛋白質に効率よくアミロイド線維を誘導できることを見出した(図2) [2-4]。従来、超音波は、でき上がった線維を砕き、アミロイドのシードを作ることに使われてきた。超音波によるアミロイド線維形成は、原因蛋白質の過飽和状態が解消することによって、アミロイド線維が形成したことを示す。つまり、アミロイド線維は、原因蛋白質の濃度が溶解度を越えたときに析出する構造状態である。

4. 酢酸ナトリウムの過飽和溶液

過飽和とは、平衡論的な溶解度以上に溶質が、溶解した状態である。準安定状態であるが、核形成が起きると結晶が析出して、平衡状態に至る。また既にできた結晶のかけらをシードとして加えると、結晶は析出する。過飽和といえば、「冷凍室の中の水」、「低温室にいた高濃度の緩衝液」のように、極めて不安定な状態であり、それ自体は、ささいなことにすぎないと思っていた。

筆者の考えを一変させたのが「エコカイロ」である(図3)。既にご存知の方も多と思うが、これに感動した経

験を振り返ってみたい。インターネットの検索は、こちらが思いもしないことを回答する。あるとき、「過飽和」で検索すると、「エコカイロ」が返ってきた。酢酸ナトリウムの過飽和溶液を利用したハンディヒーターが、エコカイロである。約8Mの酢酸ナトリウム過飽和溶液は、室温でも安定であり、多少のことでは、過飽和は解消されない。過飽和溶液中には金属片が入れてあり、これをクリックして衝撃を与えると、過飽和は解消して結晶の析出が始まる。約50ミリリットルの酢酸ナトリウム溶液の一カ所に生じた結晶は、数秒の内に伝播して、全体が固体になる。この



図3 固体(下部)に変わっていく途中のエコカイロ。

とき凝固熱が発生して、暖をとる。カチカチに固まったエコカイロは沸騰水でしばらく煮ると、溶解する。これを冷やすと、再び、はじめの過飽和溶液にもどる。

酢酸ナトリウムはさまざまな化合物の中でも特に過飽和を形成しやすい物質であり、理科の教材にもよく使われるらしい。そこで、中学や高校の授業などで、あるいは目にしたことがあったかもしれない。記憶にないのは、興味がなかったからであろう。早速、購入して実際に体験した。

『蛋白質異常凝集を解く鍵は、過飽和にあり』と確信した。エコカイロを静置しておく限り、おそらく永久に過飽和は解消されない。過飽和は極めて頑強である。それがクリックによって数秒で固化する。あるいは、酢酸ナトリウムのひとかけらを加えた時、それをシードとして酢酸ナトリウムは結晶化を開始する。過飽和は決してささいなことではない。

5. 過飽和とは何か?

過飽和とは何であろうか。過飽和についてたずねると、「非平衡」、「準安

定状態」などの用語と共に、核形成反応の難しさが説明される。核形成をもたらす相互作用は、エネルギー的には好ましいが、いくつもの分子を集合させることは、エントロピー的に困難であり、極めて稀にしか起きない。一旦、核が形成されると、その後の成長は容易であり、核は一気に成長して平衡状態にいたる。

このような説明は、蛋白質を含む一般の物質の結晶化だけでなく、アミロイド形成についてもしばしば用いられる。だが、どうもわかった気にならない。特にエコカイロの強靱な過飽和を見ると、どうしてそんなに核形成が難しいか、別の説明がほしくなる。酢酸ナトリウムは、何故、強固な過飽和溶液を作ってしまうのか、その仕組みは、どのくらい理解されているのであろうか。筆者は、未だ満足のできる答えを見つけない。

過飽和の代表的な例は、水の過冷却であろう。水が氷になる仕組みは、分子研・名古屋大において、大峯巖グループによって精力的な研究がなされてきた。「水の過冷却とは何か」という興味を抱いて、2002年Natureに発表された論文を読んだ^[5]。詳細についてわからない点があるが、氷の核形成の実体が、いくつかの氷型の水素結合ネットワークが同時に形成された状態であることを、コンピューター上で再現することに成功した論文であると理解した。氷の核形成が難しいのはよくわかる。大きな進歩であるが、筆者にはやはり腑に落ちないところがあった。

大峯グループの研究を検索していると、松本正和さん（岡山大学）らが、「過冷却水の構造」という立場で研究を進めていることを知った^[6]。これまた、わからない点があるが、「過冷却水には、

より構造化した水の構造があり、これが過冷却水の特異な物性をもたらしている」と読んだ。つまり、過冷却水の構造自体が、バルク水と異なっており、これが過冷却、あるいは過飽和をもたらしている。

都合のいいように解釈して、過飽和の実体を以下のように考えてみた。過飽和は、結晶析出の自由エネルギー障壁が高いことによって生じる準安定状態である。溶質にとって「自由エネルギー障壁が高いこと」は相対的な問題である。第一の可能性は、これまでの説明通り、結晶析出の自由エネルギー障壁が高いことである。他方、結晶析出をもたらす因子は、同時にさまざまな構造転移を誘導する可能性がある。これが、結晶析出と競合する反応であるならば、それらは溶液状態の自由エネルギーを下げ、ひいては相対的に溶質の析出を妨げる。つまり、過飽和をもたらす。別の言い方をすると、デッドエンドプロダクトの安定化である。このようなデッドエンドプロダクトとしては、溶質分子内での溶解度を高めるような構造変化の他、分子間での準安定な相互作用などが考えられる。先に紹介した過冷却水の構造化した水^[6]は、正にこのような状態に見える。さらに想像をたくましくすると、蛋白質のフォールディングは、不溶性の変性蛋白質が溶解性をあげて過飽和になることを追求したために生じたデッドエンドプロダクトにさえ、見えてしまう。

6. 研究の新たな地平

以上の蛋白質や物質の過飽和現象に注目すると、研究の新たな地平が見えてくる。雨や雪、氷に限らず、結晶と名のつくものの中には、必ず過飽和がある。自然界で一般的な過飽和は、生

命現象にさまざまに入りこみ、蛋白質だけでなく、生命全体に大きな影響を及ぼしている可能性がある。もし、それが有利であるとしたら、生命は過飽和を活用したであろうし、不利であるならばできるだけそれを回避する形で生命は進化したであろう。

先に述べたアミロイド線維形成などは、生命が過飽和を利用した代表的な例とみなすことができる。過飽和がなければ、溶解度を越えた蛋白質やペプチドは、ただちに析出する。ところが過飽和によって、溶液状態は維持される。急激な環境変化に対して緩衝作用をもたらす、分子シャペロンの働きに似ている。興味深いことに、超音波処理によって蛋白質の過飽和は、容易に解消することができる^[3]。生体には超音波はないが、それに相当する制御因子の存在する可能性がある。

この他、生体で蛋白質の関わる過飽和現象として、アクチン、微小管など、繊維状の高次構造体の形成反応などが考えられる。これらには、さまざまな調節蛋白質が関与し、その形成や分解を制御している。過飽和現象を生体がうまく利用した例ではないだろうか。過飽和現象の特徴は、大きな協同性である。エコカイロからもわかるように、白黒が極めてはっきりとしており、生体のスイッチとして最適である。

過飽和を理解するには、ガラス転移も同時に考えることも重要である^[4]。結晶化の力があまりに強いと、過飽和を維持することができずガラス状態に至る。ガラス状態は、相互作用が無秩序に起きる為に全体が不規則に固定化された状態である。アミロイド線維形成の阻害剤の多くは疎水性物質である。強い疎水性によって、アミロイド性蛋白質に結合し、それらを不定形凝集として沈殿させるこ

とが提案されている^[7]。このような考えは、石英（二酸化ケイ素、 SiO_2 ）に、酸化ナトリウム（ Na_2O ）、酸化マグネシウム（ MgO ）などの副成分を加えることによって、ガラス転移温度を上げ、いわゆる窓ガラスを作製するのと似ている。蛋白質の凝集においても結晶化のようなアミロイド線維形成と、ガラス転移に似た不定形凝集を区別することが重要である^[4]。

7. おわりに

何とんでも、本当に知りたいことは、過飽和の実体である。水の過冷

却をもう一度引き合いに出すと、過冷却現象には、核形成の困難さだけでなく、氷と競争するような水の構造化が起きている可能性がある。エコカイロには、酢酸ナトリウムの結晶化と競争するような構造化した酢酸ナトリウムの水溶液構造が存在しないだろうか。ネイティブなニワトリ卵白リゾチームの過飽和溶液には、結晶化と競合するような溶液構造がないだろうか。アミロイド性蛋白質やペプチドの過飽和溶液には、アミロイド析出と競争する、溶液構造がないだろうか。

過飽和の実体を明らかにすることは、

蛋白質異常凝集の本質を理解することであり、ひいては蛋白質の構造をその物性に立って理解することである。そして、これは物理や化学の研究であり、分子科学の重要なテーマである。生命科学と物質科学が連携して、蛋白質異常凝集の理解の新たな地平の切り開かれることを願う。

最後に、本記事では、専門分野を越える話題に対しても、大胆に想像を膨らませた。誤りや誤解があるかもしれないが、ご教示、議論いただけたら、幸いである。

謝辞 本稿に対して、貴重なコメントお寄せいただきました松本正和さん（岡山大学）に感謝します。

参考文献

- [1] Goto, Y., and Fink, A. L. (1989) *Biochemistry* **28**, 945-952
- [2] Ohhashi, Y., Kihara, M., Naiki, H., and Goto, Y. (2005) *J Biol Chem* **280**, 32843-32848
- [3] So, M., Yagi, H., Sakurai, K., Ogi, H., Naiki, H., and Goto, Y. (2011) *J Mol Biol* **412**, 568-577
- [4] Yoshimura, Y., Lin, Y., Yagi, H., Lee, Y.-H., Kitayama, H., Sakurai, K., So, M., Ogi, H., Naiki, H., and Goto, Y. *Proc Natl Acad Sci U S A online*
- [5] Matsumoto, M., Saito, S., and Ohmine, I. (2002) *Nature* **416**, 409-413
- [6] 松本正和, and 田中秀樹. (2011) *化学* **66**, 36-38
- [7] Lamberto, G. R., Binolfi, A., Orcellet, M. L., Bertoncini, C. W., Zweckstetter, M., Griesinger, C., and Fernandez, C. O. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21057-21062