

タンパク質水溶液のテラヘルツ分光

青木 克仁*・服部 利明**

塩は、水溶液中のタンパク質の溶解度や安定性を変化させることが知られている。塩による溶解度や安定性の変化の違いは、ホフマイスター系列^{1,2)}として知られている。ホフマイスター系列を分子レベルで理解することは、タンパク質の結晶化や薬剤の安定的な保存において重要な知見を与えると期待される。

塩による溶解度や安定性の変化の原因の一つにタンパク質の水和状態の変化が考えられる。これまで、タンパク質とその周囲の水との相互作用は、密度測定、NMR、DSC (differential scanning calorimetry) など^{3,4)}により調べられてきた。しかし、これらの実験手法で明らかになるのは、ナノ秒よりも遅い動きをする水の情報である。水素結合ネットワークの形成・破壊は、ピコ秒の時間スケールで生じる⁵⁾。タンパク質の表面付近の水の動きを、ピコ秒の時間スケールで、かつ、直接的な実験手法により調べることは、技術的に難しかった。近年では、超短パルスレーザーやそれを用いた超高速分光技術の発達により、水分子のダイナミクスをピコ秒の時間スケールで観測することが可能である。本稿では、タンパク質の水和状態が塩によってどのように変化するかを、水分子のピコ秒スケールのダイナミクスを直接的に観測できるテラヘルツ分光法を用いて調べた結果を紹介したい。

テラヘルツ波とテラヘルツ分光

テラヘルツ波 テラヘルツ波は、図1に示すように、振動数0.03–12 THz(波長1 cm–25 μm)の電磁波であり、ミリ波から遠赤外線の波長域に含まれる電磁波の総称である。このことから、テラヘルツ波は、電波と光の境界領域に位置する電磁波であるとも言われる。たとえば、振動数1 THzは、波数では 33.36 cm^{-1} 、エネルギーで

0.399 kJ/molに相当する。テラヘルツ波のエネルギーは、可視光の1000分の1程度であり、水素結合の100分の1程度、van der Waals結合や疎水性結合のエネルギーよりも1桁小さい。

テラヘルツ分光 テラヘルツ分光は、テラヘルツ領域における電磁波の屈折率と吸収係数を知ることができる分光法である。テラヘルツ帯における吸収係数は、分子の持つ双極子モーメントの揺らぎと直接関連する量である⁶⁾。したがって、テラヘルツ帯における試料の吸収係数を調べることで、分子の動きの速さ(ダイナミクス)に関する情報が得られる。水分子は、大きな永久双極子モーメントを持つ分子である。水の吸収係数をテラヘルツ分光で調べることで、ピコ秒スケールの水の回転緩和のダイナミクスを知ることができる。

タンパク質水溶液のテラヘルツ分光 水は、テラヘルツ波を強く吸収する。そのため、テラヘルツ分光による初期のタンパク質の研究は、タンパク質の水溶液ではなく、乾燥粉末や凍結した水溶液に対して行われていた。しかし、テラヘルツ波が水に強く吸収されるということは、テラヘルツ分光が水に対して非常に敏感であるともいえる。タンパク質水溶液のテラヘルツスペクトルは2005年から報告されており、リゾチーム^{7,8)}、BSA^{9,10)}、ユビキチン¹¹⁾、 λ リプレッサー^{12,13)}、不凍タンパク質^{14,15)}、 β ラクトグロブリン¹⁶⁾の水溶液中での水和水が調べられている。

Havenithらの研究グループは、水溶液中の λ リプレッサーとユビキチンの水和水を、テラヘルツ分光とMDシミュレーションを組み合わせるにより調べている⁶⁾。彼らは、2.4 THz付近の水溶液の吸収スペクトルをさまざまなタンパク質濃度で調べている。タンパク質濃度の小さい領域では吸収が増加するが、タンパク質濃度が大きい領域では吸収が減少すると報告している。MDシミュレーションにより、タンパク質と水との相互作用により水のダイナミクスが遅くなり、2.4 THz付近で水の吸収が増加することを示している。(また、2 THz以下では、水のダイナミクスが遅くなることで、水の吸収が減少することも示している。このことから、テラヘルツ帯における吸収の増減を調べることで、タンパク質の表面近傍の水分子のダイナミクスに関する情報を知ることができると考えられる。)彼らは、タンパク質の濃度増加に従って、タンパク質濃度の小さい領域($\sim 1\text{ mM}$ 以下)で吸収が増加し、高濃度領域($\sim 1\text{ mM}$ 以上)では吸収が減少すると報告している。低濃度における吸収の

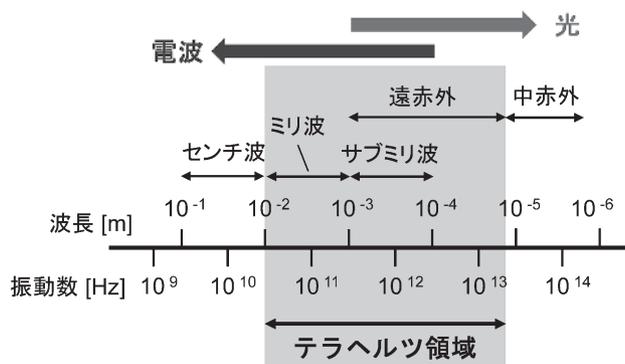


図1. テラヘルツ波の波長域

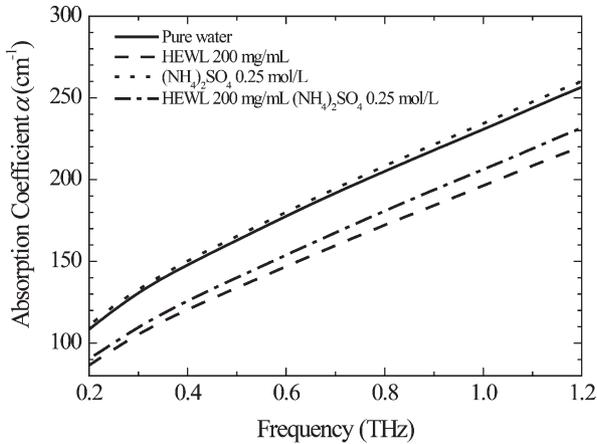


図2. 純水とリゾチーム 200 mg/mL 水溶液, およびそれらに $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えた水溶液の吸収スペクトル.

減少は, 水のダイナミクスが遅くなっていることにより生じると述べている. 高濃度領域での吸収の減少は, タンパク質の水和層が隣のタンパク質の水和層と重なり合い, 水和水の増加の仕方が緩やかになることで生じると述べている. 水和層の重なり合いが生じるタンパク質濃度の解析から, 入りプレッサーの水和層の厚さは 2.2 nm, ユビキチンの水和層の厚さを 1.4 nm であると報告している. NMR や X 線散乱, 中性子散乱などでは, この第一水和層の水分子を観測できるが, テラヘルツ分光はその外側の弱く水和している水分子の情報も得られる^{5,6,17}.

硫酸アンモニウムがリゾチームの水和に与える影響

タンパク質の水和状態が塩によってどのように変化するかを調べることは, ホフマイスター系列の分子機構を解明する上で重要であると考えられる. ここでは, タンパク質の水和に塩が与える影響の例として, 硫酸アンモニウム $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ が水溶液中のリゾチームの水和に与える影響について調べた我々の研究¹⁸⁾について述べたい.

図2に測定した純水とリゾチーム水溶液, およびそれらに $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加した水溶液の吸収スペクトルを示す. この実験では, リゾチームが $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ によって沈殿や変性をしていない条件で測定を行った. 測定温度は, $19.5 \pm 1^\circ\text{C}$ であった. 水溶液中のリゾチーム濃度は, 200 mg/mL (14 mmol/L) としたが, これは水溶液中の水和水の割合を大きくし水和状態の変化をより感度よく検出するためである. また, リゾチーム水溶液の pH の調整は行わなかった. これは, バッファーがリゾチームの水和に与える影響を排除するためである.

測定したスペクトルは, すべてピークを持たないブロードなスペクトルであった. ピークを持たないことから, このスペクトルの吸収の大きさを基にリゾチームの水和について議論する. リゾチーム水溶液の吸収係数は純水よりも小さくなった. これは, (1) リゾチーム水

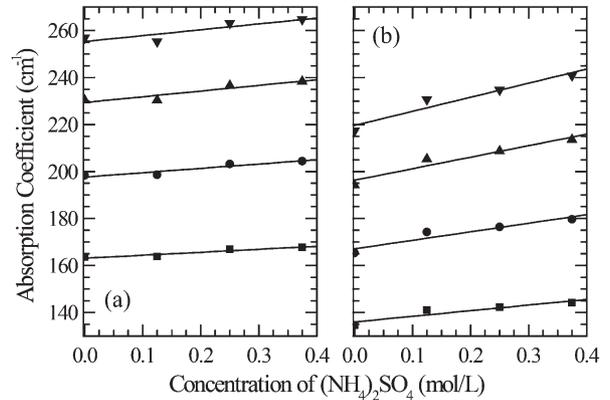


図3. (a) 純水と (b) リゾチーム 200 mg/mL 水溶液の吸収係数の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度依存性. ■: 0.5 THz, ●: 0.75 THz, ▲: 1.0 THz, ▼: 1.2 THz. 文献18から許可を得て転載した

溶液に含まれる水の量が減っていること, (2) リゾチームの周囲の水分子が水和によりバルク水よりも動きにくくなっていること, によると考えられる⁸⁾. 純水に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えると, 吸収スペクトルはわずかに増加した. リゾチーム 200 mg/mL に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えると吸収の大きさは増加し, その増分は純水の時よりもおよそ2倍大きかった.

さまざまな振動数における純水とリゾチーム水溶液の吸収の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対する変化を図3に示す. 純水においてもリゾチーム水溶液においても, 吸収係数は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対して直線的に増加した. このことから, 吸収係数の変化を直線でフィットした. どの周波数でも, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対するリゾチーム水溶液の吸収の傾きは純水の傾きよりもおよそ2倍大きかった. 水溶液中におけるリゾチームが $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ によって変性していないことを FTIR により確認した. (リゾチーム水溶液が高濃度であるため, CD スペクトルの測定はできなかった.) したがって, テラヘルツ帯におけるリゾチームの吸収は塩の添加により変わらないと考えられる. このことから, リゾチーム水溶液と純水の吸収の傾きの差は, リゾチームの表面近傍の水分子のダイナミクスが $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の添加により変化しているために生じると考えられる.

リゾチームの周囲の水分子がバルク水よりも遅くなっていることを確認するために, リゾチーム水溶液の吸収スペクトルと水溶液中に含まれる $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の吸収スペクトルの差を取った. 差をとることで, リゾチーム水溶液中の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の量がリゾチームによって減少することの影響を排除できる. 水溶液中に含まれる $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の量は, 水溶液の密度を測定し, 得られた密度から見積もった. さまざまな $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度で吸収差 $\Delta\alpha$ のスペクトルを計算した結果を図4に示す. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加していない場合, 差スペクトルは負となった. この差スペクトルは, リゾチーム水溶液の吸収

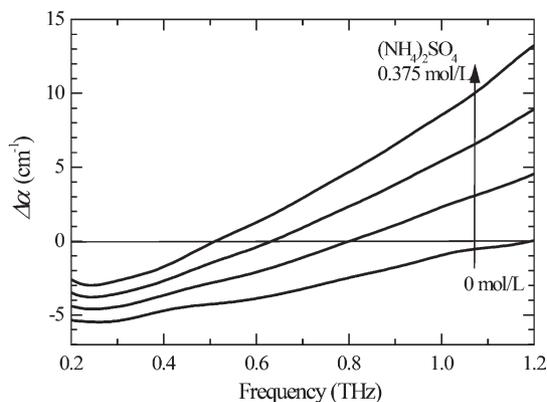


図4. さまざまな $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度におけるリゾチーム- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 混合水溶液と $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の吸収の差 $\Delta\alpha$ のスペクトル. 差スペクトルの計算には図3のフィッティング結果を用いた. 文献18から許可を得て転載した.

から水の吸収を差し引いているので、リゾチームの吸収スペクトルを見ている。リゾチームの吸収は正であるべきである。一方、リゾチームの表面付近の水がリゾチームと相互作用することで動きが遅くなり、吸収はバルク水よりも小さくなる。リゾチームの吸収よりも、水の吸収の減少分のほうが大きいために、差スペクトルは負になったと考えられる。差スペクトルが負になることは先行研究の結果⁸⁾とも一致する。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加すると、濃度の増加とともに吸収の差スペクトルは上昇した。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ によってリゾチーム自身の吸収は変わらないと考えられるので、差スペクトルの増加は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ によってリゾチームの表面近傍の水分子のダイナミクスが速まることを示している。多くの実験では、変性などのタンパク質の構造変化に伴う水和状態の変化を観測しているが、この実験結果は、構造変化が起こっていない状態でも塩によって水和状態は変化することを示している。この水のダイナミクスの変化を、水和数 N_{hyd} （リゾチーム分子1個あたりに水和している水分子の数）として評価した。その結果、 N_{hyd} は塩濃度 c_s (mol/L)の関数として、 $N_{\text{hyd}} = (182 \pm 30) - (201 \pm 130) c_s$ となった¹⁸⁾。ここで得られる水和数 N_{hyd} は、リゾチームの周りの水分子のダイナミクスを示す実効的な値である。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加していないリゾチーム水溶液では、リゾチーム分子1個あたりに水和している水分子の数は182個であった。Vinhら⁸⁾が同様の方法で調べたリゾチームの水和数 (153 ± 15) と大きな差はないといえる。182個は水和層の厚さにして、 1.3 \AA であった。この水和層の厚さは水分子1層分よりも薄いといえる。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加すると、水和水のダイナミクスが速くなることにより $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mol/Lあたり、リゾチーム分子1個に対して201個分の水の吸収が減少する。

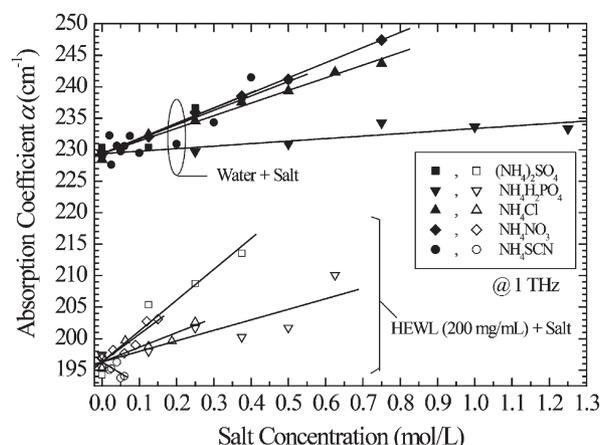


図5. 周波数1 THzにおける純水（塗りつぶしプロット）の吸収係数とリゾチーム（200 mg/mL）水溶液（中抜きプロット）の塩濃度依存性。

さまざまな塩がリゾチームの水和に与える影響

塩の違いによってリゾチームの水和がどのように異なるかを調べるために、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ のほかに、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 NH_4SCN についても調べた。その結果から、リゾチームの表面付近の水のダイナミクスに対する陰イオンの影響がホフマイスター系列に従うかを調べた（論文準備中）。測定したすべての吸収スペクトルの形状は、純水やリゾチーム水溶液のスペクトル形状と大きな差はなく、特徴的なピークのないブロードなスペクトルであった。1 THzを例に、5つの塩に対して、純水とリゾチーム水溶液の吸収係数の塩濃度依存性を図5に示す。測定したすべての水溶液において、吸収係数は塩濃度の増加とともに直線的に変化した。このことから、吸収係数の変化を直線でフィッティングした。純水に塩を加えたときの吸収係数の変化は、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ を除いて塩の種類に依存しなかった。5つの塩のうち、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ だけがプロトンを含む塩である。このことから、プロトンが塩水溶液の吸収の傾きに影響を与えたと予想される。一方で、リゾチーム200 mg/mL水溶液に塩を加えたときの吸収係数の変化は、塩の種類によって異なった。FTIRスペクトルから、リゾチームは変性していないことを確認したことから、リゾチームの吸収は塩によって変わらないと考えられる。塩による吸収の変化の仕方の違いは、リゾチームの表面付近の水分子のダイナミクスが塩によって異なる変化をしているために生じると考えられる。塩によるリゾチームの水和状態の変化を知る上で重要なことは、純水に対する吸収係数の傾きとリゾチーム水溶液に対する傾きとの差である。この結果を解析した結果、 SO_4^{2-} のようなコスモトロブはリゾチームの表面付近の水のダイナミクスを速め、 SCN^- のようなカオトロブほど表面付近の水のダイナミクスを遅くすることが分かった。

タンパク質の水和とホフマイスター系列

Collinsの水和モデルとテラヘルツ分光 ここまで、タンパク質の周囲の水分子のダイナミクスに対する塩の影響について述べてきた。一方で、コスモトロープは、イオンの周囲の水の構造を強め、カオトロープは構造を弱めることが知られている。このことから、コスモトロープはイオンの周囲の水の動きを遅くし、カオトロープは速くすると考えられる。我々の実験で明らかになった塩がタンパク質の周囲の水分子のダイナミクスに与える影響は、塩がバルク水のダイナミクスに与える影響とは逆であるといえる。

このことは、Collinsによって報告されたモデル¹⁹⁾を考えることで説明できる。このモデルでは、タンパク質の表面近傍の水分子に対する塩の影響を考察している。タンパク質の表面付近のコスモトロープは、周囲の水分子を強く束縛する。これは、コスモトロープがタンパク質の水和水を奪うと見ることができ、タンパク質の水和層内の水素結合の数は減少する。これにより、水分子同士の結びつきが弱まり、個々の水分子は動きが速くなり、テラヘルツ帯の吸収は増加すると考えられる。カオトロープは、その周囲の水を自由にする。これは、カオトロープがタンパク質の水和を助けると見ることができ、タンパク質の水和層内の水素結合数が増加する。これにより、水分子同士の結びつきが強まり、個々の水分子は動きが遅くなり、テラヘルツ帯の吸収は減少すると考えられる。テラヘルツ分光の結果は、Collinsのモデルから導かれるタンパク質の表面近傍の水へのイオンの影響と一致するといえる。また、水和層内の水素結合数の増加〔減少〕とテラヘルツ帯の吸収の減少〔増加〕は対応すると考えられる。このモデルにより、タンパク質の周囲の水とバルク水に塩が与える影響の違いを説明できる。

タンパク質の安定性と水和 Collinsのモデルで明らかになる水素結合数およびテラヘルツ分光で明らかになる水のダイナミクスとタンパク質の安定性・溶解度との関係について考えてみたい。Collinsは、コスモトロープは、タンパク質の水和層内における水素結合数を減少させ、タンパク質と溶媒との接触面積を小さくしようとすると述べている。これにより、安定性は向上すると考えられる。カオトロープの場合にも同様の議論が可能であり、水素結合数は増加し、安定性は低下する。したがって、水のダイナミクスや水素結合数を考えることで、塩によるタンパク質の安定性の変化を説明できる。

Collinsは、塩によるタンパク質の溶解度の変化についてもこのモデルで説明している。しかし、彼が議論しているのは、水溶液のpHがタンパク質の等電点pIよりも大きい場合 ($\text{pH} > \text{pI}$) である。このとき、タンパク質の溶解度の変化は(順)ホフマイスター系列に従う。一方、 $\text{pH} < \text{pI}$ の場合、溶解度の変化はホフマイスター系列の逆順に従う。(タンパク質は、pHとpIの大小関

係によらず、コスモトロープによって安定化し、カオトロープによって不安定化することに注意する。CollinsのモデルもpHとpIの大小関係によらないと考えられる。)彼のモデルとテラヘルツ分光の結果は、このホフマイスター系列の逆転を説明できない。ホフマイスター系列の逆転は、和周波発生分光を用いた研究によれば、タンパク質分子間の静電相互作用を考えることで説明できると報告されている²⁰⁾。

このことから、Collinsのモデルで明らかになる水和層内の水素結合数やテラヘルツ分光で明らかになる水分子のダイナミクスは、タンパク質の安定性に寄与し、タンパク質の溶解度への寄与は小さいと考えられる。また、pHとpIの大小関係によってタンパク質の安定性に関するホフマイスター系列が逆転しないことを説明できる。さらに、テラヘルツ分光ではピコ秒スケールの水のダイナミクスの情報が得られることから、我々の実験結果は、タンパク質の水和水のピコ秒スケールのダイナミクスがタンパク質の安定性に関わっていることを示しているといえる。タンパク質の溶解度には、タンパク質分子間の静電相互作用が寄与していると考えられている。

タンパク質の水和に対する塩の影響をピコ秒の時間スケールでかつ直接的な観測手法により調べることは、ホフマイスター系列を分子レベルで理解するうえで重要な知見となると期待する。

文 献

- Hofmeister, F.: *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **24**, 247 (1888).
- Kunz, W. et al.: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **9**, 19 (2004).
- Arakawa, T. and Timasheff, S. N.: *Biochemistry*, **23**, 5912 (1984).
- Tompa, K. et al.: *Biophys. J.*, **96**, 2789 (2009).
- Heugen, U. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12301 (2006).
- Heyden, M. and Havenith, M.: *Methods*, **52**, 74 (2010).
- Xu, J. et al.: *J. Phys. Chem. B*, **110**, 24255 (2006).
- Vinh, N. Q. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 8942 (2011).
- Xu, J. et al.: *Protein Sci.*, **15**, 1175 (2006).
- Bye, J. W. et al.: *J. Phys. Chem. A*, **118**, 83 (2014).
- Born, B. et al.: *Faraday Discuss.*, **141**, 161 (2009).
- Ebbinghaus, S. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 2374 (2008).
- Ebbinghaus, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20749 (2007).
- Ebbinghaus, S. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12210 (2010).
- Meister, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 1617 (2013).
- Vondracek, H. et al.: *J. Chem. Phys.*, **141**, 22D534 (2014).
- Hishida, M. and Tanaka, K.: *Phys. Rev. Lett.*, **106**, 158102 (2011).
- Aoki, K. et al.: *Appl. Phys. Lett.*, **103**, 173704 (2013).
- Collins, K. D.: *Methods*, **34**, 300 (2004).
- Flores, S. C.: *J. Phys. Chem. C*, **116**, 14408 (2012).