

# 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 (I)—

<sup>a</sup>岐阜大学

<sup>b</sup>岐阜大学大学院・医学系研究科・分子生理学分野

<sup>c</sup>岐阜大学・工学部・生命工学科

<sup>d</sup>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

<sup>e</sup>独協医科大学・生理学 (生体制御) 教室

<sup>f</sup>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

<sup>g</sup>大阪医科大学

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

### I. はじめに

生理学の研究対象となる系は、一般に低分子から高分子までの多くの生体関連物質を含み、さらにそれらの反応区画としてはタンパク質の内部空間から血管内空間までの領域におよぶ広範囲な系であるといえよう。物理化学の領域において得られた成果をこのような生理学の研究領域に適用しようとして、先人たちはこれまでに大変な努力を積み重ねてきた。本講座では、紙面の都合上特定の領域に限定するが、高分子の物理化学的知見、とくに統計熱力学的知見を「生理学」という分野に応用する手立てについて、これまでの研究経緯を紹介しながら概説していこう。

高分子溶液の物理化学的パラメーター、例えばタンパク質の沈降定数を求める場合、濃度の異なる試料溶液について得られた沈降係数の値を濃度ゼロに外挿することで求められた。このような方法は拡散定数、浸透圧などの測定においても同様に行われている (Tanford (1961) [1])。第II章で説明するが、溶質分子の化学ポテンシャル ( $\mu_i$ )

は、低分子、高分子を問わず、標準化学ポテンシャル ( $\mu_i^0$ ) と [活量係数 ( $\gamma_i$ ) と濃度 ( $m_i$ ) との積の関数,  $RT \ln(\gamma_i m_i)$ ] との和で熱力学的に表示することができる ((1A) 式参照)。「低分子イオン溶液」、例えばNaCl溶液ではイオン間の静電気相互作用を補正した活量係数 ( $\gamma_i$ ) を理論計算から求めることが可能である [1]。高分子溶液では活量係数 ( $\gamma_i$ ) を誘導することが困難なために、前述のように濃度ゼロに外挿すれば  $\gamma_i \sim 1$  となり  $RT \ln \gamma_i \sim 0$  になるとして、沈降定数、拡散定数などを求めた。しかし一方では高分子 (タンパク質) の活量係数の理論的解析も多数のグループによって試みられた。タンパク質の浸透圧解析に、不完全気体の van der Waals 状態方程式のビリアル展開が応用された [1]。これらの問題に関連して行われた研究について、示唆に富んだ総説が Minton (1983) [2] によって発表されている。この総説によれば「タンパク質など高分子の活量係数 ( $\gamma_i$ ) の濃度による変化の機構は、高分子の排除体積効果によるエントロピー

変化（とくに並進エントロピー変化）に由来する」と説明されている。また他の高分子が共存する際の特定のタンパク質の活量係数 ( $\gamma_i$ ) の変化についても解析がなされている。

この分野は20世紀末から現在にかけてかなり集中的に研究されている。筆者らは、Ellis & Minton (2003) [3] による学会紹介記事 (“Join the Crowd”) によって、EMBO ワークショップ：Biological Implication of Macromolecular Crowding ; June 14—18, 2003, スペイン) (第1回国際会議) が開催されたことを知り、その後ただちにこの中の「クラウダー理論 (crowder theory)」関連の文献を系統的に調査した。そしてこれらの集約結果は生理学領域の研究に対して参考資料となり得ると判断し、今回「生理現象と高分子排除体積効果」と題して紹介することにした。

## II. 物理化学，とくに熱力学の生理学への応用

### II-A. イオンの活量 (activity) および活量係数 (activity coefficient)

まず以下の項目において、物理化学を基礎医学分野へ応用するために活躍したわが国の研究者たちについて紹介する。

[pH] : 熱力学の生理学への応用を計画し、著名な成書「pHの理論と測定法」(1940, 1968) [4, 5] を著したのは吉村寿人(京都府立医科大学)であった。彼は京都大学・医学部を卒業後8年間、Lewis & Randallによる「熱力学テキスト」(1923) [6] やDebye-Hückelの理論 [1, 7] を独学で修めて、その研究成果を「pHの理論と測定法」(1940, 1968) [4, 5], 「生物の物理化学」(1931) [8] としてまとめた。吉村が学んだLewis & Randallの「熱力学テキスト」には、電解質溶液について、イオンの活量 (activity), 活量係数 (activity coefficient), イオン強度 (ionic strength) といった種々の熱力学的概念およびそれらの測定法が記載されており、同時代のDebye & HückelはLewis & Randallによる測定値の理論解析を報告している [9]。生体内のpHに関して、その後藤本 守(大阪医科大学)らは、Walker (1971) [10] が考案したliquid ion ex-

changer microelectrodeを用いて、細胞内の各種イオンの活量測定に成功し、新たな研究領域を展開した [11, 12]。

Moon & Richard (1973) [13] は $^{31}\text{P}$ -NMR法を用いて赤血球内のpH測定法について報告している (pH測定に、無機リン酸の解離による $^{31}\text{P}$ -化学シフトの変化を利用) が、同時期 (すなわち1970年代後半) に基礎生物学研究所に360 MHz  $^1\text{H}$ -NMR装置が導入されたのを機に、巨 弘(生理学研究所) が中心となって、その最新のNMR装置を用いた生理学分野の共同研究をスタートさせた。まず森本武利(京都府立医科大学), 今井雄介(大阪医科大学)グループの若手研究者らが $^{31}\text{P}$ -NMR法による細胞内pH測定の共同研究を始めた。吉崎和男, 村上政隆, 瀬尾芳輝ら(1983) は $[\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+]$  反応の見かけの $\text{p}K_{2,\text{app}}$  について、 $^{31}\text{P}$ -NMR法を用いてイオン強度などの影響を検討し、その結果に基づいて、実際の筋細胞や唾液腺細胞内のpH, エネルギー代謝に関係したクレアチンリン酸, ATP濃度の同時測定を行った [14, 15]。彼ら(1983) は、 $\text{p}K_{2,\text{app}}$  値の検討に、後述する(1B)式を使用している。リン酸の $\text{p}K_{2,\text{app}}$ に関連して、生理学者にはあまり知られていないようであるが、生理学研究において重要と思われる論文を紹介する。Cohn (1927) [16], Green (1933) [17] はリン酸緩衝液, 酢酸緩衝液のpH, イオン強度を指定した際の緩衝液組成計算法として(1B)式にさらに1項を加えた高近似の理論式を発表している。驚くことに、彼らの理論式に従って調製した緩衝液のpH測定値は、実に $\pm 0.03$ 以内の精度で計算値と一致する。

pH測定に関して、歴史的経緯にそってイオン活量の測定法について概説してきたが、より一般的な様式に拡張して、 $i$ -イオンの化学ポテンシャルについてさらに若干の説明を加えてみよう [1]。 $i$ -イオンの活量係数を $\gamma_i$ , 濃度を $m_i$ とすると、活量は $(\gamma_i m_i)$ と定義され、化学ポテンシャル、 $\mu_i$ と活量の関係は(1A)式で与えられる。

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln(\gamma_i m_i) \quad (1A)$$

$\mu_i^0$ は標準化学ポテンシャルである。

良く知られている pH は  $-\log(H^+ \text{の活量})$ , すなわち,  $-\log[(H^+ \text{活量係数}) \times (H^+ \text{濃度})]$  である. このように, 活量はイオン間の相互作用を補正した実効濃度である.  $i$ -イオンの活量係数,  $\gamma_i$  は (1B) 式のようになる [1, 7].

$$\ln \gamma_i = - [v_i z_i^2 e^2 / (2 \epsilon k_B T)] [\kappa / (1 + \kappa a)] \quad (1B)$$

$$\kappa^2 = [4 \pi e^2 / (\epsilon k_B T)] \sum n_i z_i^2 \quad (1C)$$

$k_B$ ,  $e$ ,  $\epsilon$ ,  $v_i$ ,  $n_i$ ,  $z_i$  はそれぞれ Boltzmann 定数, 電気素量, 溶媒の誘電率, 1 分子から生じる  $i$ -イオンの数,  $i$ -イオンの濃度 (個数/ml) および  $i$ -イオンの電荷数である.  $a$  は陽イオン半径と陰イオン半径の和で, 例えば  $Na^+$ ,  $Cl^-$  では 0.5 nm,  $\sum n_i z_i^2 / 2$  はイオン強度 (ionic strength;  $I = \sum C_i z_i^2 / 2$ ;  $C_i$ , 容量モル濃度) で表示すると  $(N/1000)I$  であり,  $N$  は Avogadro 数である.  $1/\kappa$  は任意の 1 個のイオンに座標軸を固定したとき, 注目するこのイオンの周りのイオン雲の半径であり, 25°C では  $0.304(I \text{強度})^{-1/2}$  nm となる. イオン強度 ( $I$ ) が 0.001, 0.01, 0.05 および 0.10 の場合, それぞれ 9.61, 3.04, 1.36 および 0.96 nm となる.

高分子の活量係数の概念について, 「排除体積」を考慮した考え方がおもに 20 世紀末からこれまでに報告されているが, タンパク質などの高分子電解質溶液の酸, アルカリ滴定におけるアミノ酸側鎖の固有解離定数 ( $pK_{int}$ ) 測定には, 以前から Debye & Hückel の理論が応用されている. 見かけの解離定数 ( $pK_{app}$ ) から  $pK_{int}$  の推定に際して, 例えば  $H^+$  と荷電タンパク質 (電荷数,  $Z_p$ ; 半径,  $b$ ;  $a = b + H^+$  半径) 間の静電気ポテンシャル補正項は  $-0.868(e^2/2 \epsilon k_B T) [1/b - \kappa/(1 + \kappa a)] Z_p$  となる [1] が, 高分子電解質の滴定データ解析にこの方法が使用されている.

**【電気化学ポテンシャル (electrochemical potential) 勾配と電気生理学】**:  $i$ -イオンを含む濃度の異なる溶液が薄い膜 (イオンの透過は可能) で隔てられていて (I 室と II 室), 系全体が平衡状態に達したときの I, II 側の電位がそれぞれ  $\Phi^I$ ,  $\Phi^{II}$  のとき, 両側の電気化学ポテンシャル,  $\mu_i + \Phi z_i F$  は等しくなる.

$$\mu_i^I + \Phi^I z_i F = \mu_i^{II} + \Phi^{II} z_i F \quad (2B)$$

$F$  は Faraday 定数,  $z_i$  は  $i$ -イオンの電荷数である.

熱力学の生理学への積極的導入をはかった吉村が在職していた当時の京都府立医科大学・生理学教室では, 若手研究者は多かれ少なかれ統計熱力学的概念の影響を受けている. 北里 宏 (滋賀医科大学) は Goldman の論文 [18], Johnson, Eyring & Pollisser のテキスト [19] を参照しながら, 電気生理学の分野におけるイオン・フラックスと電気化学ポテンシャル勾配の関係を, 他の研究者に先んじて統計熱力学的に解析した [20].

**【酸化還元電位】**: 吉村と同時代であるが, 久保秀雄 (大阪大学・医学部) も熱力学や量子力学の生理学への応用の第一歩として, 生物試料の酸化還元電位の理論と測定を進め, 興味ある現象を多数発見している [21]. また  $^{31}P$ -NMR 法による細胞内 pH 測定などの共同研究を主宰した生理研の亙は久保門下である.

**II-B. 疎水結合 (hydrophobic bonding) の概念, ならびに Asakura-Oosawa モデル (排除体積効果によるコロイド粒子の会合) と疎水結合との類似点**

一般に使用される濃度表示には, (1) 重量モル濃度 (molality), (2) 容量モル濃度 (molarity), (3) モル分率 (mole fraction) がある. 容量モル濃度は温度変化を示すが, 重量モル濃度は温度変化を示さない. 3つの濃度表示のうち, 溶液の物性を統計熱力学的に考察するには「モル分率表示」が望ましい. その理由は, モル分率を用いると混合エントロピー (mixing entropy) の変化が補正された熱力学状態量が得られるからである [22]. この際, 希薄溶液の全モル数を水分子のモル数, 55.5 (溶媒 1 kg) で近似すると, モル分率表示は大変簡単になる. このモル分率表示によって, 混合エントロピー変化を補正した, 溶質それ自身によるエントロピーの変化, すなわち, ユニタリー・エントロピー (unitary entropy) の変化 ( $\Delta S_u$ ) を求め得る. Gurney (1953) はこの  $\Delta S_u$  値の大, 小を用いてイオンを 2 つに大別, すなわち水構造を壊すイオン (order-destroying ions) と水を構造化するイオン (order-producing ions)

とに分類した [22]. イオンのこのような分類のしかたは, Friedman & Krishnan (1973) [23] や Marcus (1985) [24] によっても別の表現でなされている (structure-breaking ions; structure-making ions). このように, Gurney は新しい熱力学状態量, すなわちユニタリー・エンタルピー (unitary enthalpy, 通常のエンタルピーと同じ), ユニタリー・エントロピー (unitary entropy), ユニタリー・自由エネルギー (unitary free energy) などを提案した [22]. Kauzmann (1959) [25] は, 疎水性分子を非極性溶媒より水溶液へ移動させたときのエントロピー変化の値 (既報の値) に混合エントロピーの項を補正して  $\Delta S_u$  値を求め, これが負になることを見いだした. 上述のように, Gurney はイオン溶液の  $\Delta S_u$  値が水構造の変化を反映していると示唆したが, Kauzmann はこの  $\Delta S_u$  値の減少 ( $\Delta S_u < 0$ ) は疎水性分子の界面間の相互作用の要因と考え, これを「疎水結合 (hydrophobic bonding)」とよんで, 疎水結合の概念を生物学や生理学の分野に応用しようと試みた. Kauzmann のこのような論文の発表後, 多数のグループが水構造の統計熱力学的研究を進めたが, なかでも Wada ら (神戸大学・理学部・化学) (1961, 1962) [26-28] は水構造に関する論文をいち早く発表した. さらに Némethy & Scheraga (1962) [29-31], Tanford (1962, 1964) [32, 33], Wetlaufer ら (1964) [34] も疎水結合について詳細に解析・検討した.

ここで, Kauzmann [25] によって初めて提案された疎水結合について, 実測値 [29-34] を用いながら説明しよう. メタン, エタン, プロパンなどの脂肪族炭化水素や, ベンゼン, トルエンなどの芳香族炭化水素を非極性溶媒から水溶液に移した場合, 上述のように, ユニタリー・エントロピー変化 ( $\Delta S_u$ ) は  $-24 \sim -16$  e.u. ほど変化し, 一方ユニタリー・自由エネルギー変化 ( $\Delta G_u$ ) は  $+3 \sim +5$  kcal/mol ほど増加した [25, 29-34]. このことは, 構造化した水層 (アイスバーグ (iceberg) とよぶ) が疎水性分子の表面に形成された結果,  $\Delta S_u < 0$ ,  $\Delta G_u > 0$  となって, 系は不安定になったと考えられる. このために, 疎水性分

子はお互いに会合することによってこの“アイスバーグ”量を減らそうとする機構で疎水結合を形成する. このように, 疎水性分子の会合による疎水結合はエントロピー由来の会合である. 疎水性界面におけるアイスバーグの形成に関しては, 上述の  $\Delta S_u$  値の測定結果以外には直接的な証明はあまり報告されていない. ところで, 最近のネイチャー誌の論文書評 (news and views) (Ball (2003) [35]) には, 疎水性物質と水の界面における中性子, X線反射率の測定結果から, その界面には  $1.5 \sim 2$  nm にわたってアイスバーグに対応した構造があるとの報告が紹介されているが, これは今後の検討課題であろう ([35] の引用論文参照).

エントロピー由来の会合に関する上記の報告よりも前に, Asakura & Oosawa (朝倉 昌, 大沢 文夫; 名古屋大学・理学部の生物物理学者) (1954, 1958) は, 同様にエントロピー由来ではあるが, 別の会合メカニズムに関する報告を行っている. Asakura & Oosawa モデル (外国の論文では「AO モデル」と表示) とよばれているこの会合機構を理解するために, これまでに説明してきた疎水結合と AO モデルを, 次のように対比させてみよう (「疎水結合  $\Leftrightarrow$  AO モデル」のように): 疎水性分子  $\Leftrightarrow$  図1の大きい球; 疎水性分子表面のアイスバーグ (エントロピー変化に関与)  $\Leftrightarrow$  図1の大きい球表面の, 小さい球 (高分子) に対する排除領域 (エントロピー変化に関与) とする. 今, 図1Bのように大きい球同士が近接したとすると, 大きい球表面の (○) マークで表される排除領域が減少するので, その結果小さい球が並進運動に利用できる容積が増す. すなわち, 大きい球同士が会合すると, より粒子数の多い小さい球の並進運動に関するエントロピー (並進エントロピー (translational entropy) とよぶ) が増加して, 自由エネルギーは減少する. 第III-B章で詳しく述べるが, このAOモデルによる会合機構と Kauzmann による疎水結合の会合機構の類似点について, 両者はいずれもエントロピー由来の結合であるという点が理解できたかと思う.

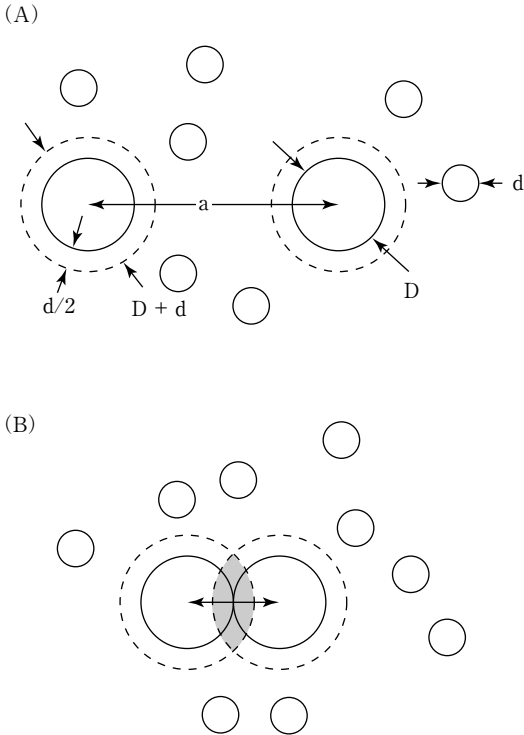


図1. Asakura-Oosawaモデル：(A) 直径Dの大きい粒子（剛体球）が、直径dの小さい粒子（剛体球、高分子）の溶液中に浮遊した状態を示している。直径が  $[D+d]$  の球（破線）と直径がDの球（実線）間の体積が、小さい粒子（高分子）に対する大きい粒子による排除領域を示している。(B) 2つの大きい粒子が最近接した状態を示している。(O) は大きい粒子のコンタクトによって消失する小さい球に対する排除領域を示す (Asakura & Oosawa [36, 37])。

### III. 排除体積効果と Asakura-Oosawa モデル

#### III-A. 赤血球沈降速度 (erythrocyte sedimentation rate ; ESR)

臨床では疾患の病態把握のために赤血球沈降速度 (ESR) の測定が今でもしばしば用いられているが、この ESR の発生機構に関しては、コロイド化学者が大変興味を抱いていた。Meyer ら (1945) [38], Inokuchi (1951) [39] は、親水性高分子 (hydrophilic polymer) による ESR 現象の促進について報告している。Inokuchi は多種類の高分子について系統的に検討した結果、合成鎖状高分子 (ポリビニルアルコールなど)、天然

鎖状高分子 (アルギン酸ソーダ、ペクチン、ゼラチン、アラビアゴム、デキストラン、DNA など)、棒状タンパク質 (フィブリノーゲンなど) は ESR 現象の促進作用を示すが、球状タンパク質 (卵白アルブミン、血清アルブミン、ヘモグロビン (Hb) など) は ESR 現象の促進作用は示さないと報告している。彼は、親水性鎖状高分子による連銭形成 (rouleaux formation) すなわち集合体 (aggregate) の形成は、鎖状高分子による赤血球間の架橋形成であると説明した。すなわち、コロイド化学でいう “bridging flocculation” (Napper 1983 [40] の図 17-20 を参照) であると説明した。また ESR の発生機構は Shiga らの総説 (1990) [41] に良くまとめて解説されている。その中で彼らは、ESR 現象に対する諸物質の効果、たとえばフィブリノーゲン、免疫グロブリン G、デキストラン、ポリ-L-グルタミン酸、血清アルブミンなどの効果の解析結果を報告しているが、Inokuchi の報告 [39] と同様に、非球形をした大きなタンパク質や鎖状高分子は赤血球同士に架橋して “連銭” を形成すると説明している。次節では、ESR 現象のメカニズム解明に端を発した AO モデルについて説明する。

#### III-B. Asakura-Oosawa モデル (AO モデル)

Asakura & Oosawa (1954, 1958) [36, 37] は、Meyer ら (1945) [38] や Inokuchi (1951) [39] の ESR 現象に関する論文に大変興味を抱いた。赤血球は、実際には円盤状で中央が窪んでいるが、彼らは赤血球の血漿中浮遊液を図 1 に示すように、大きい粒子 (直径が D の剛体球) が小さい粒子 (直径 d の剛体球で、「高分子」に相当する ;  $d \ll D$ , かつ高分子数 ( $N_S$ )  $\gg$  大きな粒子数 ( $N_L$ ) の溶液中に浮遊 (分散) した状態としてモデル化した。大きい粒子間、小さい粒子 (高分子) 間、および大きい粒子と高分子間には特別な相互作用がないものと仮定して、高分子溶液中に浮遊している大きい粒子の挙動について統計熱力学的手法を用いて解析した。その結果は、従来 (1954 年以前) には報告されていないような機構による相互作用 (会合) が、大きい粒子間に生じるというものであった。第 II-B 章でも若干説明し

たが、エントロピー由来の相互作用という概念に慣れるために、まずその機序を定性的に説明しよう。高分子溶液に少量の大きい粒子が図1のように浮遊しているとき、(上述の仮定で) 各々の粒子間には特別な相互作用はないので、系全体の内部エネルギー変化は $\sim$ ゼロであり (Minton [2] の Table 1 参照), 系はエントロピー変化が最大のときに自由エネルギー変化が負となって安定になる。図1Aに示すように、直径Dの大きい浮遊粒子の表面には、高分子が排除される領域(厚さが $d/2$ で示される層)が存在する。ところが図1Bのように、大きい浮遊粒子同士が近接・接触すると、高分子が排除される領域の一部(○の箇所)が消失するために、直径dの高分子が並進運動することのできる空間(容積)がその分増加し、その結果、高分子の並進エントロピーが増加する。すなわち、図1Bのように、大きい粒子が互いに会合すると、大きい粒子に由来する混合エントロピーは減少するが、大きい粒子の数に比べて高分子の数が圧倒的に多いために、全体としてのエントロピーは増加する。このような機構によって、大きな粒子同士はさらに会合する [36, 37, 40, 42-45]。この会合の引力は、高分子溶液の浸透圧に比例するだろう。すなわち、Asakura & Oosawaは、図1Bの○領域においては、高分子が排除されて溶媒のみとなり、その結果高分子の浸透圧に相当した力が大きい粒子に対してその両側より働くとして説明している [36, 37]。

このようなAOモデルはその後多くの物理化学者の興味を引いて、この大きな粒子同士間に生じる相互作用について、いろいろな名称がつけられた。枯渇引力 (depletion attraction) [40], エントロピー由来の引力 (entropically driven force, entropic force (attraction)), エントロピーによる排除体積効果 (entropic excluded-volume effect) [43, 45], エントロピーによる架橋 (entropy bridge) [44] などである。Kodaら [42], Dinsmoreら [43], Kestenbaum [44] の論文には、上述の模式図に対応した詳細なスキームが示されており、“枯渇引力”の概念を幾何学的あるいは視覚的に理解できるような試みがなされてい

る。サイエンス誌のリサーチニュースの中で Kestenbaum (1998) [44] は、「枯渇力 (depletion force) の研究は2人の日本人物理学者によって端緒が開かれた」と Asakura & Oosawa の先駆的な業績を紹介し、さらに、「彼らのこの研究 (AOモデル) は、コロイド化学分野のみならず生命科学分野における諸現象を解析する際に大いに役に立つであろう」と言及している。Kestenbaumは2次元模式図を用いてモデル実験を行い、枯渇力を説明した。すなわち、容器内に大、小2種類の剛体球の浮遊液が存在するとき、容器壁および大球の表面にある小球に対する排除領域を減少させるため、大球は容器壁、特に容器のコーナーに集合する。このため、多数の小球が利用できる領域が増加して、小球の並進エントロピーは増加する。この増加は大球の集合(会合)によるエントロピー(混合エントロピー)の減少を補償するに十分な増加であり、これが枯渇引力発生機構であると説明した。彼は、上述の容器に大球と多数の小球の均一な浮遊液を放置して形成された大球のみの集合状態の模式図を示している。さらに彼は次のような興味ある生物系の現象を紹介している。すなわち、正染色赤芽球の核がしかるべき時期に細胞外へ放出される現象に関して、正染色赤芽球が成熟してその細胞内のHbの合成量がいきなり増加すると、上記モデル実験と同様に、モデルの大球に対応する“核”は小球に対応する“Hb分子”によって細胞膜の方に押しやられ、その結果、核は細胞外に放出されると説明した(核の細胞外放出過程は [46] の図88-10参照)。

枯渇引力の発生機構については上述の定性的説明によって十分に理解できたと思う。しかしAOモデル(理論, theory)は歴史的にみて有名で、しかもこれまでに改良されてきている理論なので、もう少し定量的な説明を加えよう。すなわち、図1に示すような2個の大きい粒子(直径がD)と多数の小さい粒子(「高分子」に相当; 直径がd)よりなる幾何学的モデルを用いて、まずエントロピー由来の引力を求め、次いで熱エネルギー( $k_B T$ )と比較したAOモデルの理論について紹介しよう。図1において、直径dの高分子が

自由に動ける容積 ( $V_f$ ) は、溶液全体の容積 ( $V$ )、直径 ( $D+d$ ) の球の体積 ( $V_{ex}$ )、および図1Bの(○)の体積 ( $V_{over}$ ) より、(3A)、(3B) 式のようにになる。

$$D+d \leq a; \\ V_f = V - 2V_{ex} \\ = V - (8\pi/3)\{(D+d)/2\}^3 \quad (3A)$$

$$D \leq a \leq D+d; \\ V_f = V - 2V_{ex} + V_{over} \\ = V - (4\pi/3)[\{(D+d)/2\}^3 + \\ (3/16)(D+d)^2a - (1/16)a^3] \quad (3B)$$

今、高分子数を  $N_S$ 、Boltzmann 定数を  $k_B$  とすると、Helmholtz の自由エネルギーは  $-N_S k_B T \ln(V_f)$  となり、圧力  $P$  は (4) 式のようにになる。

$$P = N_S k_B T (\partial \ln V_f / \partial a)_T \\ = N_S k_B T (\partial V_f / \partial a)_T / V_f \\ \sim (N_S k_B T / V) (\partial V_f / \partial a)_T \quad (4)$$

(4) 式の  $P$  値は、 $D+d \leq a$  ではゼロ、 $D \leq a \leq D+d$  では負 (引力) になる。すなわち、 $D \leq a \leq D+d$  の場合には浮遊大粒子間に引力が発生する。図1Bの排除領域の重なった部分の断面積  $S$ 、 $(\pi/4)[(D+d)^2 - a^2]$  と  $P$  の間には (5) 式の関係がある。

$$P = -P_0 S \quad (5)$$

$P_0$  は高分子溶液の浸透圧 ( $N_S k_B T / V$ ) である。排除領域の重なった部位 ( $V_{over}$ ) では溶媒のみが存在し、したがって浮遊大粒子は高分子の浸透圧によって両側から加圧されることになる。その際の浮遊大粒子間の引力ポテンシャル [ $U(a)$ ] は近似的に (6) 式のようにになる。

$$U(a) \sim - (3/2) k_B T \phi \beta x^2 \quad (6)$$

(6) 式において  $x = (D+d-a)/d$ 、 $\beta = D/d$ 、 $\phi = (\pi/6)d^3 N_S / V$  (高分子の体積分率 (volume fraction)) である。  $x=1$ 、すなわち  $a=D$  の場合、 $U(a)$  は  $- (3/2) k_B T \phi \beta$  となる (以下、 $a=D$  の場合の  $U(a)$  を  $U_m$  と標記する)。Asakura & Oosawa は、 $\beta=50$ 、 $\phi=10^{-2}$  のときに、 $U_m / k_B T = -0.75$  となることを見いだした [36, 37, 40]。しかし、図5A, 5B (「後編」に提示) などの  $\phi$  値、すなわち、 $0.10 \sim 0.40$  と比較して判断すると、 $-U_m / k_B T$  はかなり大きな値になる。

今、高分子の形状が扁長回転楕円体 (長軸が  $A$ 、短軸が  $B$ ) の場合を考えよう、 $x = (D+A-a)/A$ 、 $\beta = D/A$ 、 $q = A/B$ 、 $\phi =$  高分子の体積分率とすると、扁長回転楕円体の高分子溶液中での浮遊大粒子間の  $U_m$  と、この楕円体と同じ分子容で、かつ同じ体積分率を有する球状の高分子溶液中のそれとの比、 $U_m$  (扁長回転楕円体) /  $U_m$  (球) の値は、 $q$  が5、20のときには、それぞれ3、18となった。すなわち、回転楕円体、棒状高分子の方が浮遊大粒子間に対しては、より強い引力を発生させる。また高分子が荷電を有するかどうかでは、 $U_m$  値、すなわち  $U_m$  (荷電球状高分子) /  $U_m$  (非荷電球状高分子) 比の値が1以上になることも見いだしている。さらに彼らは、鎖状の高分子が浮遊大粒子に吸着されて、浮遊大粒子間に分子架橋が生じる場合についても考察した。すなわち鎖状高分子の濃度が増すにつれて架橋数は増加し、かつ浮遊大粒子の表面が架橋分子で飽和する以前に最大となり、次いで架橋数は減少すると報告している。デキストランによる赤血球の連鎖形成について、Seike (1988) [47] はこの予測と一致する実験結果を報告している。Asakura & Oosawa (1958) は、架橋分子を介してのこのような相互作用は、枯渇引力が観測されるほど大球同士が近接しなくても発生するので、適切な測定条件下では、二つの極小引力ポテンシャル [ $U(a)$ ] を観測できであろうと推論した [37]。Meijer & Frenkel [48]、Bolhuis ら [49] は AO モデルの近似を挙げて、高分子 (ポリマー間相互作用ポテンシャルがいかなる状態でもゼロ) の慣性半径 (radius of gyration) がコロイド大粒子の70%以下であれば AO モデルは適用可能であると報告している。また Poon [50]、Aarts ら [41] は [高分子半径 / コロイド粒子半径] 値が0.60において、AO モデルが成立することを実験で示した。

AO モデル [36, 37] の理論ならびに理論検証の測定は、1990年代の後半になるとさらに精度があげられた [52-54]。図1Bのように大粒子同士が接近するにつれて、その間には小さい斥力、引力が出現し、大粒子同士がさらに会合状態に近づくと AO モデルのポテンシャル・エネルギー曲

線になることが報告された。Crockerら [54] は大粒子 ( $D \sim 1100$  nm) と小粒子 ( $d \sim 83$  nm) の浮遊水溶液 (5 mM NaCl, 5 mM SDS) を用いて、光ピンセット法によって、 $\phi$  (浮遊小粒子の体積分率で (6) 式を参照) 値が0 ~ 0.42にわたって測定した。すなわち $\phi$ 値が0のときには、大粒子間に van der Waals 引力によるわずかな相互作用が観測されるのみであったが、 $\phi$ 値が0.04, 0.07では、AOモデルで予測される $\phi$ 値に対応した枯渇引力の増加が観測された。さらに $\phi$ 値が0.15以上では、 $\phi$ 値が増加するにつれて枯渇引力も増加するが、これと並行して、大粒子同士が接近するにつれて、小さい斥力→引力→斥力…が観測され、改良されたAOモデル理論と一致した [52-58]。(この件に関しては、Crockerらの論文 [54] の図1 (測定値), 図2 (斥力→引力→斥力…出現機序の模式図) を参照されたい)。

最近Kinoshitaら [55-59] は、タンパク質のフォールディング (folding; 折れたたみ) 問題にAOモデルを応用し、興味ある結果を見いだしている。Kinoshitaらの理論解析の結果を説明する前に、筆者らが計算したゼロ近似による計算結果を説明しよう。アンフォールディング (unfolding), フォールディング (folding) 状態におけるタンパク質の水溶媒との接触面積を、(Denisov & Halle [60] も使用した) Millerら [61] の経験式を用いて求めた。アンフォールディング, フォールディングの両状態におけるタンパク質表面 (近傍) の水分子の占める面積値と体積値をそれぞれ $0.102$  nm<sup>2</sup>,  $0.0245$  nm<sup>3</sup> (van der Waals 直径より求めた値ではなく、熱運動をも考慮にいられた Gerstein & Chothia [62] の水分子直径より求めた値) と仮定して、アミノ酸の残基数が13, 57, 110, 583の場合のタンパク質について、アンフォールディング状態からフォールディング状態へと変化する過程 (折りたたみ過程) における排除体積の減少量 (図1Bの○に対応) と、フォールディング状態での1分子容とを比較した。その結果は次のようになった: アミノ酸の残基数が13残基のタンパク質の場合では、[排除体積減少量 =  $1.07$  nm<sup>3</sup>; 1分子容 =  $1.76$  nm<sup>3</sup>]. 57

残基の場合 [それぞれ  $6.70$  nm<sup>3</sup>;  $7.58$  nm<sup>3</sup>], 110残基の場合 [ $14.6$  nm<sup>3</sup>;  $14.9$  nm<sup>3</sup>], 583残基の場合 [ $92.4$  nm<sup>3</sup>;  $80.5$  nm<sup>3</sup>] であった。この結果から、110残基のタンパク質のときに、フォールディングに伴う排除体積減少量がタンパク質の1分子容にほぼ等しくなった。これらの推定値は水分子の並進エントロピー増加の指標になると思われる。Harano & Kinoshita [58] は3次元積分方程式論を用いて、アミノ酸残基数が13, 57, 110のタンパク質の場合について計算し、並進エントロピーの増加は、上述のゼロ近似計算による排除体積の減少量に対応して増加し、タンパク質のフォールディングによる構造エントロピー損失 (減少) を相殺していると報告している。

折りたたまれたタンパク質表面にはイオン性側鎖や極性側鎖をもったアミノ酸残基が多く存在している [58, 63] ので、溶液中では普通のタンパク質は良く溶解 (分散) した状態にある。このようなタンパク質の界面の状態は、枯渇引力の検証実験における特殊な溶媒条件下で分散しているときのコロイド大粒子のそれに似ている。例えば、5 mM NaCl, 5 mM SDS 溶液 [コロイド大粒子系はポリメチルメタクリレート球 (直径1100 nm), 小球系はポリスチレン小球 (直径83 nm)] [54], 0.01 M NaCl, 0.15% Triton X-405 [コロイド大粒子系はポリスチレン球 (直径400 nm), 小球系はヒドロキシエチルセルロース (有効直径92 nm)] [64], 0.01 M NaCl [コロイド大粒子系はポリスチレン大球 (直径460 nm), 小球系はポリスチレン小球 (直径84 nm), 0.01 M NaCl, すなわち,  $1/\kappa \sim 3.04$  nmにより, 通常的合成過程で生じた荷電をもつコロイド大粒子, 小粒子間の静電気相互作用の調節] [43] などがコロイド粒子の会合 (凝集) 防止に使用されている。折りたたまれたタンパク質は分子表面のイオン性側鎖や極性側鎖のために、上述の特殊な溶媒中にあるコロイド大粒子と似たような状態であろうと考えられる。したがって、水溶液中で折りたたまれたタンパク質間の枯渇引力, すなわち排除体積効果を検証するためには、コロイド分散系の場合と同様に、コロイド小球, すなわち高分子に相当した物

質 (IV 章にて説明するクラウダー分子 (crowder molecule)) を加えることが必要になるであろう。

ESR 現象の発生機構の解析, すなわち「生理学分野において観測される現象の機構解明」という観点に端を発した AO モデル [36, 37] は, 当時 (あるいは今でも), 生理学者たちからは特段の注目を浴びることもなかったが, その一方で, 高分子化学・コロイド化学分野の研究者たちからは大いに興味をもたれた (ただ筆者らの知る範囲では, 真島英信著の「生理学」[65] の血液の章に AO モデルが簡単に説明されているのみのようである)。ESR 現象の発生機序の統計熱力学的解析より提起された「枯渇引力」という概念は, 高分子化学やコロイド化学の分野のみならず, 実は生命科学の分野でも, 最近話題になっているタンパク質のアミロイド線維形成機構の解明 [57, 59] や, 生きた細胞内, すなわち細胞質のコロイド的性状などの解析 [66-69] においても重要かつ有用な考え方であるといえる。

(後編へのつながり) : 本編では「物理化学, とくに熱力学の生理学への応用」, 「排除体積効果と Asakura-Oosawa モデル (1954, 1958) (AO モデル; 排除領域効果によるコロイド大粒子同士の会合)」を中心にして話を進めた。AO モデル (理論) は, 実は生理現象の発生機構の解明, すなわち赤血球の連鎖および集合体形成の物理的機序解析よりスタートした: 非常に多数のコロイド小粒子 (高分子など) からなる溶液中に, 少数のコロイド大粒子が浮遊しているとき, その大粒子同士が会合すると, 小粒子に対する大粒子表面の排除領域が減少することになって, 小粒子自身の並進運動に使用し得る容積が増加, すなわち小粒子の並進エントロピーが増加し, 系の自由エネルギーが減少して, その系は安定になる。この AO モデルの数学的改良や理論の検証実験はこれが発表されて 50 年たった現在でも多数行われ, とくに最近ではタンパク質のフォールディング問題の解析にも応用されている。

続く後編では「排除体積効果と高分子活量係数 (クラウダー理論)」について説明する。実際の生

きた細胞内にはタンパク質など生体高分子が非常に高濃度 (5~30%) 存在している。そのような生体系において, 共存する高濃度の非活性タンパク質による排除体積効果が「酵素」などの活量係数に対してどのような影響を与えるかについて, 半定量的に解説する。また疾患の病態生理に関連したアミロイド線維形成に対していかなる効果を示すかについても解説する。

## 文 献

1. Tanford C : Physical Chemistry of Macromolecules. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 180-274, pp. 457-586, 1961
2. Minton AP : The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins : some biochemical consequences. *Mol. Cell. Biochem.* **55** : 119-140, 1983
3. Ellis RJ and Minton AP : Join the crowd. *Nature* **425** : 27-28, 2003
4. 正路倫之助 (監修)・吉村寿人 : pH の理論と測定法. 丸善出版社, 東京, 1940
5. 吉村寿人, 松下 寛, 森本武利 : 新版 pH の理論と測定法. 丸善出版社, 東京, 1968
6. Lewis GN and Randall M : Thermodynamics and the Free Energy of Chemical Substances. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York, 1923
7. Robinson RA and Stokes RH : Electrolyte solutions. Butterworths Scientific Publications, London, pp. 72-86, 1955
8. 正路倫之助, 吉村寿人 : 生物の物理化学, 日本評論社, 東京, 1931
9. 亀山直人 : II 電気化学史. 亀山直人, 岡田辰三 (監修) : 電気化学理論, 産業図書 (株), 東京, 上巻 : pp. 43-50, 1951
10. Walker JL : Ionic specific liquid ion exchanger microelectrodes. *Anal. Chem.* **43** : 39A-93A, 1971
11. Fujimoto M and Kubota T : Physicochemical properties of a liquid ion exchanger microelectrode and its application to biological fluid. *Jpn. J. Physiol.* **26** : 631-650, 1976
12. Fujimoto M, Naito K and Kubota T : Electrochemical profile for ion transport across the membrane of proximal tubular cells. *Membr. Biochem.* **3** : 67-90, 1980
13. Moon RB and Richard JH : Determination of intracellular pH by  $^{31}\text{P}$  magnetic resonance. *J. Biol. Chem.* **248** : 7276-7278, 1973
14. Murakami M, Imai Y, Seo Y, Morimoto T, Shiga K and Watari H : Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused salivary gland. *Biochim. Biophys.*

- Acta **762** : 19–24, 1983
15. Seo Y, Murakami M, Watari H, Imai Y, Yoshizaki K, Nishikawa H and Morimoto T : Intracellular pH determination by <sup>31</sup>P-NMR technique. The second dissociation constant of phosphoric acid in a biological system. *J. Biochem.* **94** : 729–734, 1983
  16. Cohn EJ : The activity coefficients of the ions in certain phosphate solutions. A contribution to the theory of buffer action. *J. Am. Chem. Soc.* **49** : 173–193, 1927
  17. Green AA : The preparation of acetate and phosphate buffer solutions of known pH and ionic strength. *J. Am. Chem. Soc.* **55** : 2331–2336, 1933
  18. Goldman DE : Potential impedance and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* **27** : 37–60, 1943
  19. Johnson FH, Eyring H and Pollisser MJ : Kinetic Basis of Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1954
  20. 北里 宏 : 興奮性膜の一般生理. 南江堂, 京都, pp. 1–204, 1967
  21. 久保秀雄 : 酸化還元電位. 南條書店, 東京, 1947
  22. Gurney RW : Ionic Processes in Solution. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 1953
  23. Friedman HL and Krishnan CV : Thermodynamics of ionic hydration. In: Water, Ed. Franks F, Plenum Press, New York, Vol. 3 pp. 1–118, 1973
  24. Marcus Y : Ion Solvation. John Wiley & Sons, Chichester, 1985
  25. Kauzmann W : Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **14** : 1–63, 1959
  26. Wada G : A simplified model for the structure of water. *Bull. Chem. Soc. Japan* **34** : 955–962, 1961
  27. Wada G and Umeda S : Effects of nonelectrolytes on the temperature of the maximum density of water. I. Alcohols. *Bull. Chem. Soc. Japan* **35** : 646–655, 1962
  28. Wada G and Umeda S : Effects of nonelectrolytes on the temperature of the maximum density of water. II. Organic compounds with polar groups. *Bull. Chem. Soc. Japan* **35** : 1797–1801, 1962
  29. Némethy G and Scheraga HA : Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. I. A model for the thermodynamic properties of liquid water. *J. Chem. Phys.* **36** : 3382–3400, 1962
  30. Némethy G and Scheraga HA : Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. II. Model for the thermodynamic properties of aqueous solutions of hydrocarbons. *J. Chem. Phys.* **36** : 3402–3417, 1962
  31. Némethy G and Scheraga HA : Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. III. Thermodynamic properties of hydrophobic bonds in proteins. *J. Phys. Chem.* **66** : 1773–1789, 1962
  32. Tanford C : Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **84** : 4240–4247, 1962
  33. Tanford C : Thermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solution. *J. Am. Chem. Soc.* **86** : 2050–2059, 1964
  34. Wetlaufer DB, Malik SK, Stoller L and Coppin RI : Nonpolar group participation in the denaturation of proteins by urea and guanidin salts. Model compound studies. *J. Am. Chem. Soc.* **86** : 508–514, 1964
  35. Ball P : How to keep dry in water. *Nature* **423** : 25–26, 2003
  36. Asakura S and Oosawa F : On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. *J. Chem. Phys.* **22** : 1255–1256, 1954
  37. Asakura S and Oosawa F : Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *J. Polym. Sci.* **33** : 183–192, 1958
  38. Meyer K, Hahnel E and Feiner RR : Experiments on erythrocyte sedimentation rate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **58** : 36–40, 1945
  39. Inokuchi K : Mechanisms of agglomeration of red cells by high polymer compounds. *Bull. Chem. Soc. Japan* **24** : 78–82, 1951
  40. Napper DH : Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions. Academic Press, New York, pp. 332–413, 1983
  41. Shiga T, Maeda N and Kon K : Erythrocyte rheology. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **10** : 9–48, 1990
  42. Koda T, Numajiri M and Ikeda S : Smectic-A phase of a bidisperse system of parallel hard rods and hard spheres. *J. Phys. Soc. Japan* **65** : 3551–3556, 1996
  43. Dinsmore AD, Yodh AG and Pine DJ : Entropic control of particle motion using passive surface microstructures. *Nature* **383** : 239–242, 1996
  44. Kestenbaum D : Gentle force of entropy bridges disciplines. *Science* **279** : 1849, 1998
  45. Adams M, Dogic Z, Keller SL and Fraden S : Entropically driven microphase transitions in mixtures of colloidal rods and spheres. *Nature* **393** : 349–352, 1998
  46. Schmidt-Schoenbein H : 88 Hemorheology. In : Comprehensive Human Physiology. Ed. Greger R and Windhost U. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, vol. 2, pp. 1747–1792, 1996
  47. Seike M : Effects of plasma substitutes on the velocity of erythrocytes aggregation. *J. Jpn. Soc. Blood Transfusion* **34** : 420–431, 1988
  48. Meijer EJ and Frenkel D : Colloids dispersed in polymer solutions. A computer simulation study. *J. Chem. Phys.* **100** : 6873–6887, 1994
  49. Bolhuis PG, Stroobants A, Frenkel D and Lekkerkerker HNW : Numerical study of the phase behavior

- of rodlike colloids with attractive interactions. *J. Chem. Phys.* **107** : 1551–1564, 1997
50. Poon W : Colloids as big atoms. *Science* **304** : 830–831, 2004
  51. Aarts DGAL, Schmidt M and Lekkerkerker HNW : Direct visual observation of thermal capillary waves. *Science* **304** : 847–850, 2004
  52. Chu XL, Nikolov AD and Wasan DT : Effects of particle size and polydispersity on the depletion and structural forces in colloidal dispersions. *Langmuir* **12** : 5004–5010, 1996
  53. Dickman R, Attard P and Simonian V : Entropic forces in binary hard sphere mixtures : Theory and simulation. *J. Chem. Phys.* **107** : 205–213, 1997
  54. Crocker JC, Matteo JA, Dinsmore AD and Yodh AG : Entropic attraction and repulsion in binary colloids probed with a line optical tweezer. *Phys. Rev. Lett.* **82** : 4352–4355, 1999
  55. Kinoshita M : Spatial distribution of a depletion potential between a big solute of arbitrary geometry and a big sphere immersed in small spheres. *J. Chem. Phys.* **116** : 3493–3501, 2002
  56. Kinoshita M : Interaction between big bodies with high asphericity immersed in small spheres. *Chem. Phys. Lett.* **387** : 47–53, 2004
  57. Kinoshita M : Ordered aggregation of big bodies with high asphericity in small spheres : a possible mechanism of the amyloid fibril formation. *Chem. Phys. Lett.* **387** : 54–60, 2004
  58. Harano Y and Kinoshita M : Large gain in translational entropy of water is a major driving force in protein folding. *Chem. Phys. Lett.* **399** : 342–348, 2004
  59. 木下正弘, 後藤祐児 : アミロイド線維形成の原動力 : エントロピーの排除容積効果. *現代化学* 4月号 : 27–31, 2005
  60. Denisov VP and Halle B : Protein hydration dynamics in aqueous solution. *Faraday Discuss.* **103** : 227–244, 1996
  61. Millers S, Janin J, Lesk AM and Chothia C : Interior and surface of monomeric proteins. *J. Mol. Biol.* **196** : 641–656, 1987
  62. Gerstein M and Chothia C : Packing at the protein-water interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** : 10167–10172, 1996
  63. Pace CN : Polar group burial contributes more to protein stability than nonpolar group burial. *Biochemistry* **40** : 310–313, 2001
  64. Gast AP, Russel WB and Hall CK : An experimental and theoretical study of phase transitions in the polystyrene latex and hydroxyethylcellulose system. *J. Colloid Interface Sci.* **109** : 161–171, 1986
  65. 真島英信 : 生理学. 文光堂, 東京, 第18版, pp. 289–320, 1986
  66. Cuneo P, Magri E, Verzola A and Grazi E : ‘Macromolecular crowding’ is a primary factor in the organization of the cytoskeleton. *Biochem. J.* **281** : 507–512, 1992
  67. Walter H and Brooks DE : Phase separation in cytoplasm, due to macromolecular crowding, is the basis for microcompartmentation. *FEBS Lett.* **361** : 135–139, 1995
  68. Herzfeld J : Entropically driven order in crowded solution : from liquid crystals to cell biology. *Acc. Chem. Res.* **29** : 31–37, 1996
  69. Herzfeld J : Crowding-induced organization in cells : spontaneous alignment and sorting of filaments with physiological control points. *J. Mol. Recognit.* **17** : 376–381, 2004