

生命現象発現における水分子の並進運動の役割*

京都大学エネルギー理工学研究所
木下正弘

(2007年9月3日受理)

1. はじめに

生体内では、分子レベルの種々の自己組織化や秩序構造形成過程が生命現象を支えている。例を挙げると、多くのアミノ酸がペプチド結合してできた鎖状高分子が非常にコンパクトな立体構造にフォールドする蛋白質の折り畳み、折り畳みを終えた蛋白質はその種類によって行き先と経路を心得ているという蛋白質トラフィック、酵素蛋白質がある特定の基質とのみ選択的に結合する分子認識、複数の蛋白質が規則的に集合してより大きな構造体を作る蛋白質の高次構造形成、蛋白質が脂質二重層に吸着したり中に貫入したりして完成される生体膜の高次構造形成などがある。生体系の特徴を表すキーワードとして、自己組織化、秩序化、高選択性、規則性、対称性などが当てはまる。これらのキーワードは、乱雑さの度合いを表すエントロピーの増大に反するものであり、生体内で起こる種々の過程は、大幅なエントロピー損失を伴うように見える。

物質は、単独で存在するよりも、他の物質と接触し合って、あるいは互いに混じり合って複合系を構成して初めて高い機能を発揮する場合が多い。複合系の挙動は、各構成要素の挙動の重ね合わせからは到底想像もつかない非線形性の高いものであり、しばしば非常に高度な機能の発現に結び付く。複合系の研究では、各構成要素を個別に眺めるのではなく、系全体を総合的に「システム」として捉えることが肝要である。生体系は物質複合系の典型例である。生体高分子、水、種々の低分子やイオンなどの各々は単なる「物質」に過ぎないが、それらが複雑に相関し合う結果、「生命」現象が生まれる。特に、水は中心的な役割を果たしているものと考えられる。

ところで、アフリカに生息するネムリユスリカの幼虫（ボウフラ）は、水が失われると体内でトレハロース（糖）を合成し、そのガラス化によって体系の状態を凍結させ、乾燥状態で代謝を停止させて水の供給を待つ。その間、幼虫は餌も食べな

* 本稿は、編集部の方から特にお願いして執筆していただいた記事である。

いし糞もしない。実に十数年が経過した後でも、水中に入れると生き返って活動を開始するという。(実験者が、「もう生き返ることは無理であろう」と考えて幼虫を水中に入れてしまったために、十数年という記録しか残っていない。再実験が行われているらしいが、おそらく、半永久的に生き返ることができる可能性を保ち得るものと考えられる。)この例は、まさに物質と生命の間の行き来を示し、生命には水が不可欠であることを決定づける驚くべき実例である。

生体内における種々の自己組織化や秩序構造形成過程において水が重要な役割を果たしていることは誰もが認識している。しかし、水-生体分子系を構成する原子・分子間の相互作用エネルギーに注目が集中する傾向がある。例えば、水-生体分子間の水素結合や生体分子部位間に誘起される古典的な意味での疎水相互作用(水-疎水性分子間よりも、水-水間の方が相互作用エネルギーがずっと低いことに起因する)のみが強調される。生体分子の親水基と疎水基を区別するのみで水の効果が語られることも多い。

本稿では、従来の考え方とは対照的に、非常に小さな水分子が液体として高密度で存在し、かつ活発に動き回ること(すなわち、水分子の並進運動)が、上記の自己組織化および秩序構造形成過程において本質的に重要であることを指摘する。これらの過程が大幅なエントロピー損失を伴うように思えるのは、生体分子のみを眺めた場合の話である。生体分子が自己組織化や秩序構造形成を起こすと、周囲に存在する水分子の並進運動の制限が緩和され、このことに起因して水の大幅なエントロピー利得(あるいはそれに起因する自由エネルギー利得)が生じる。筆者らの統計力学理論解析の結果を踏まえながら、「周囲の水のエントロピー利得が、生体分子系の大幅なエントロピー損失を補償あるいは凌駕する」という考え方を紹介する。

2. エントロピー的排除容積効果

2. 1. 朝倉-大沢理論

図1に示すように、小粒子集団の中に大粒子があると、小粒子の重心が入れない空間(大粒子そのものが占める空間+灰色で示した空間:排除空間)が存在する。話を簡単にするため、小粒子は直径 d_s の球、大粒子は直径 d_L の球であるものとする。このとき、排除空間は、直径 " d_s+d_L " の球となる。2個の大粒子が接触すると、排除空間に影をつけた重なりが生じ、排除空間の容積(排除容積)が重なった空間の容積分だけ減少する。その結果、小粒子が自由に動き回ることのできる(小粒子

の並進運動に利用可能な) 空間の容積が増加し, 小粒子集団の並進エントロピーの増加および自由エネルギーの減少につながる。すなわち, 大粒子同士を接触させようとする相互作用が誘起される。この相互作用は, すべての粒子が単なる剛体である(系の取り得るあらゆる微視的状态が等しいエネルギーを持ち, エントロピックな効果のみが存在する)場合にさえ誘起されるので, エントロピー相互作用と呼ばれ, 朝倉と大沢^(1,2)によってその存在が指摘された。

小粒子集団中に平面壁が存在する場合も, 大粒子の存在と同様に小粒子の入れない排除空間を生成する。図2に示すように, 直径 d_s の小粒子(剛体球)集団中で, 直径 d_L の1個の大粒子(剛体球)が平坦な表面を持つ壁(剛体壁)に接触した場合の小粒子集団の自由エネルギー利得 ΔF を朝倉-大沢理論^(1,2)の枠内で見積もる($d_L \gg d_s$ とする) と,

$$\Delta F \sim -3k_B T \eta_s (d_L/d_s) \quad (1)$$

となる。 k_B はボルツマン定数, T は絶対温度である。小粒子の充填率 η_s が高いほど, d_s が小さいほどこの利得は大きくなる。なお, 直径 d_L の2個の大粒子同士が接触した場合の小粒子集団の自由エネルギー利得は, 式(1)右辺の約半分になる。(式(1)の導出方法については, 「参考文献」(2)の下に書かれた付加説明を参照してほしい。)

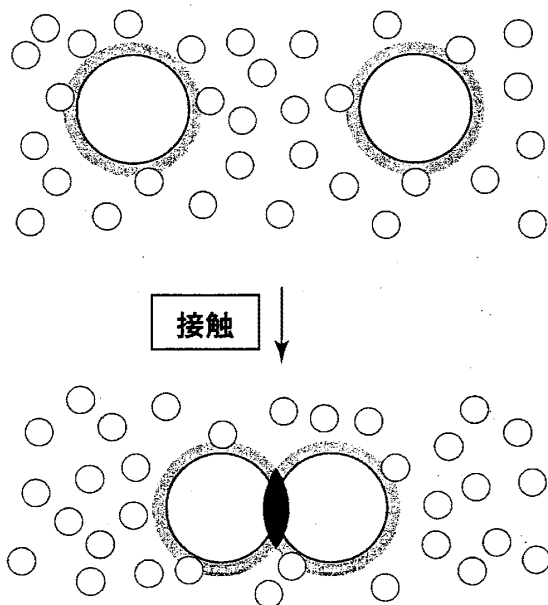


図1 小粒子集団中における球状大粒子同士の接触。

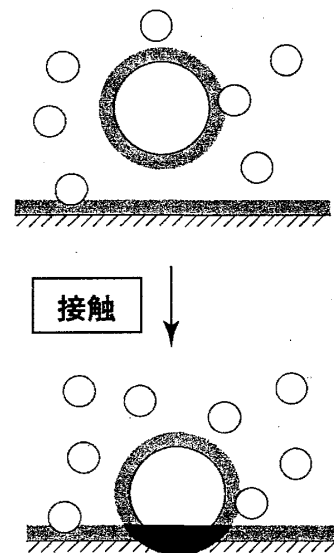


図2 小粒子集団中における平面壁と大粒子の接触。

2. 2. 大粒子および壁近傍における小粒子の構造化の影響

純粹にエントロピー相互作用を解析するために、剛体モデルに焦点を当てて考える。2. 1で単純な考察を行ったが、実際に大粒子間に誘起されるエントロピー相互作用は、 η_s が十分に低くない限り、大粒子近傍の小粒子の微視的構造を反映したかなり複雑なものになる。この効果は、朝倉-大沢理論^(1,2)では無視されており、積分方程式論⁽⁹⁾のように精密な統計力学理論を用いないと正しく考慮できない。以下より、このことについて少し詳しく説明する。

図3に、小粒子(小剛体球)集団中で平面壁(剛体壁)と大粒子(大剛体球)の間に誘起されるエントロピー相互作用を示す。(小粒子集団中で2個の大粒子間に誘起されるエントロピー相互作用も定性的に同様の挙動を示す。)エントロピー相互作用は、平均力のポテンシャルで記述される。これは、大粒子が壁から無限に離れている場合の小粒子集団の自由エネルギーに比べて、大粒子が h (壁と大粒子の最近接表面間距離) まで壁に近づいたときの小粒子集団の自由エネルギーがどれだけ高いか低いかを表す。相互作用を h で微分してマイナスを付けたものは、壁-大粒子間に誘起される平均力であり、図4

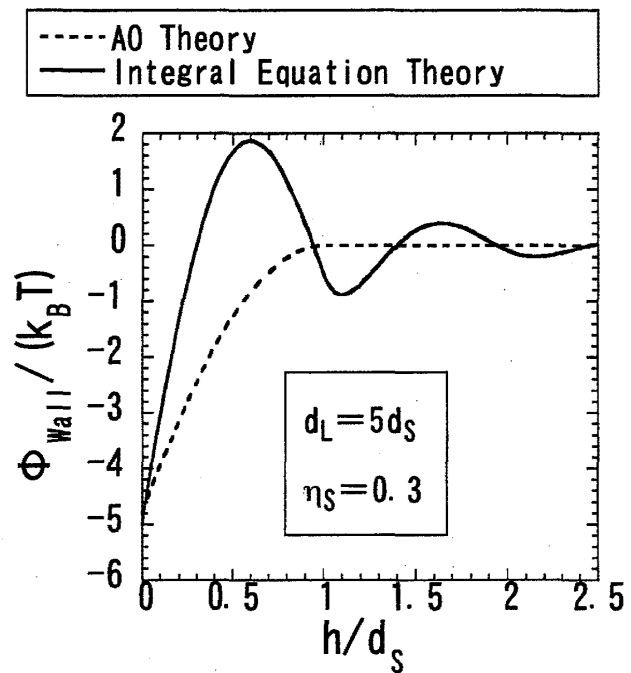


図3 小粒子集団中で平面壁と大粒子間に誘起されるエントロピー相互作用(平均力のポテンシャル) Φ_{wall} 。 T , k_B , h および d_s は、各々絶対温度、ボルツマン定数、壁と大粒子の最近接表面間距離および小粒子の直径を表す。破線が朝倉-大沢理論、実線が積分方程式論を用いた場合の計算結果である。

に示すようになる。壁-大粒子間の平均力は、「壁と大粒子の最近接表面間距離を固定し、小粒子集団にあらゆる微視的状态を取らせて、大粒子に働く力を平均したもの」である。

図4から分かるように、朝倉-大沢理論では、2つの排除空間に重なりがないときには力は誘起されない。 $h < d_s$ となって初めて重なりが生じ、重なり部分の容積

を増加させるために、 h の減少と共に単調に強くなる引力が誘起される。ところが、実際に誘起される力は、振動性（斥力性領域と引力性領域が交互に現れる性質を持ち、周期は小粒子の直径にほぼ等しい）かつより長距離性のものになる⁽³⁻⁸⁾。実は小粒子の存在自体も、他の小粒子に対して排除容積を生成しているため、小粒子が壁

や大粒子の表面に接触させられる傾向が生じる。この効果を見かけ上「Packing Force が作用する」と表現することが多い。Packing Force は、表面-小粒子間の「引力」として作用する。壁と大粒子の位置関係によって、壁表面と大粒子表面に拘束されたチャンネルやコーナーが形成されるが、図5左のチャンネル内の小粒子や図5右のコーナーにある小粒子（いずれも灰色で明記している）は、大粒子と壁の両方の表面に接触できるため、小粒子は特にチャンネル内やコーナーに密に

集まってくる^(6,7)。また、図5右に示すように h が d_s よりも小さければ、小粒子はチャンネル内に入れない。これらの効果により、壁や大粒子近傍で小粒子の構造化が起こる（数密度の不均一性が生じる）。活発に動き回る小粒子が大粒子表面に繰り返し衝突し、しかも衝突頻度（および結果として大粒子表面に及ぼされる熱圧力：Thermal Pressure）に不均一性が見られることが、壁-大粒子間に力が働く物理的要因である^(6,7)。例えば、図5左の場合には、チャンネル内が小粒子で密になるために大粒子表面に及ぼされる熱圧力も高くなり、左側からの力の方が右側からの力よりも強くなる。その結果、トータルとして大粒子を壁から引き離そうとする力が働く。一方、図5右の場合には、左側に小粒子の入れない空間ができるために熱圧力がゼロになる。この効果が支配的となって、右側からの力の方が左側からの力よりも強くなり、トータルとして大粒子を壁に押し付けようとする力が働く。

図3および図4において、 η_s が低くなるにつれて相互作用と力はより弱く、より短距離性になる：実線と破線は近くなり、 $\eta_s \rightarrow 0$ で両者は一致する。しかし、2.4で述べるように、本稿では小粒子集団として「水」を考える。常温・常圧の

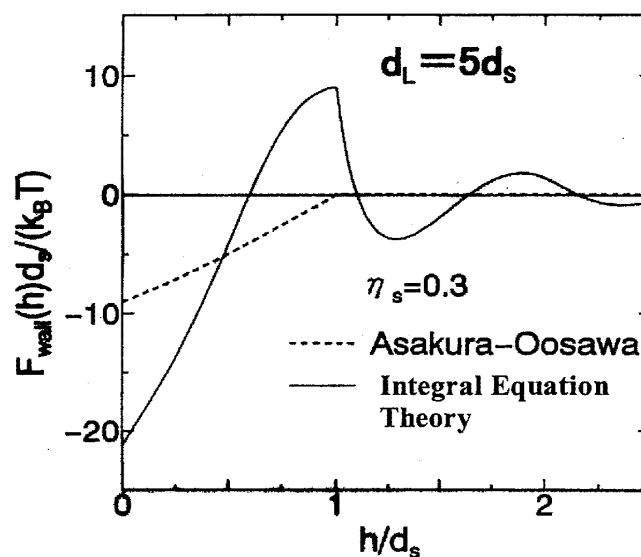


図4 小粒子集団中で平面壁と大粒子間に誘起されるエントロピー力（平均力） F_{Wall} 。破線が朝倉-大沢理論、実線が積分方程式論を用いた場合の計算結果である。

水に対しては $\eta_s=0.383$ であり，図 3 および図 4 における設定値 ($\eta_s=0.3$) よりもさらに高い値になり，実線と破線の違いもずっと大きくなる。以下では， η_s はこれらの場合のように高い値をとるものとして議論を進める。

図 3 に戻って破線と実線を比較すると，大粒子が壁に接触した場合に生じる小粒子集団の自由エネルギーの減少量（平均力のポテンシャルの $h=0$ における値）はほぼ完全に一致する。朝倉-大沢理論では，一種の誤差の相殺が起こる（詳細については筆者の原著論文^(6,7)を参照されたい）ため，平均力のポテンシャルの $h=0$ における値は良好となり，式(1)は $\eta_s \sim 0.4$ 程度までかなり正確な推定を与える（ただし，4. 1 で述べる例外もある）。一方，図 3 の実線にのみ，「大球が壁に接触するために超えなければならない自由エネルギー障壁」が存在する。一般に，チャンネルが広いほど，図 4 の実線における斥力ピーク値が高くなり，自由エネルギー障壁も高くなる。後で述べるように，この障壁の高低が重要になる場合が多い（2. 6，4. 1 および 5. 2 参照）。いずれにせよ，エントロピー相互作用は，小粒子の構造化の影響が出る距離まで，2 個の大粒子あるいは壁と大粒子が十分に接近した場合に誘起される。

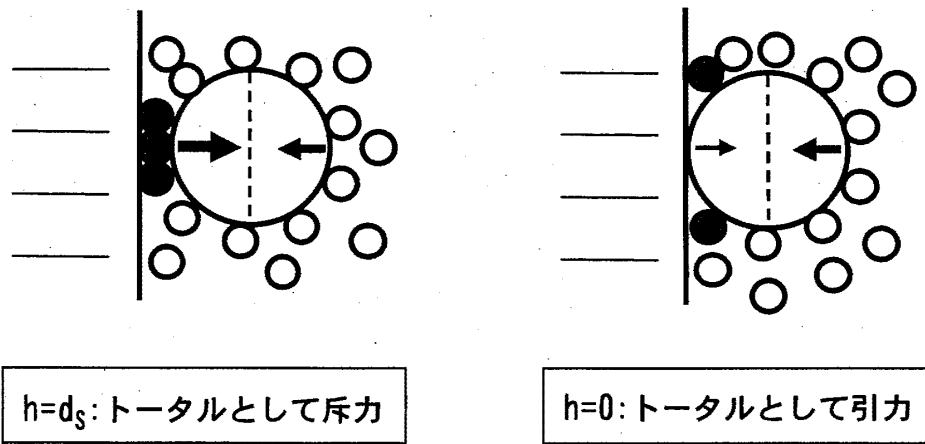


図 5 左: $h=d_s$ の場合に壁-大粒子間に斥力が働くことを説明しようとした漫画。右: $h=0$ の場合に壁-大粒子間に引力が働くことを説明しようとした漫画。

2. 3. 小粒子間あるいは大粒子および壁-小粒子間の引力相互作用の影響

小粒子間や，大粒子-小粒子間，壁-小粒子間に引力相互作用が存在する場合には，上で述べたエントロピー相互作用のみではなく，別の因子に起因する効果が加わる⁽¹⁰⁾。剛体モデル系を基準として，まず，小粒子間にのみ引力相互作用が存在する場合 (Case 1) について考える。大粒子や壁の表面に接触した小粒子に対する小粒子の配位数は，表面から充分離れた位置における小粒子に対するその約半分

なってしまう。小粒子間には引力相互作用が存在するので、表面に接触した小粒子の数が増えるほどエネルギー的な損失が大きくなる。よって、表面近傍の小粒子の数密度を減らそうとする効果が Packing Force に対抗する。この効果は、大粒子間あるいは壁と大粒子間の相互作用を引力側に（下方に）シフトさせる。例えば、図5右の状態はさらに安定化される。

一方、大粒子-小粒子間および壁-小粒子間にのみ引力相互作用が働く場合（Case 2）について考える。その場合、大粒子や壁の表面に接触した小粒子の数が増えるほどエネルギー的な利得が大きくなり、大粒子間あるいは壁と大粒子間の相互作用を斥力側に（上方に）シフトさせる。大粒子-小粒子間および壁-小粒子間の引力相互作用がかなり強い場合には、図5右の状態はむしろ不安定化される。実在系では、通常、小粒子間のみならず、大粒子-小粒子間および壁-小粒子間にも引力相互作用が働く。すなわち、Case 1 と Case 2 で述べた効果がある程度相殺し、小粒子間引力相互作用と大粒子-小粒子間および壁-小粒子間引力相互作用が同程度の強さを有する場合には、剛体モデルを用いても系の大体の挙動は把握できる。いずれにせよ、エントロピー相互作用は常に存在する。小粒子の直径がかなり小さく、かつ高密度な集団として存在する場合には、エントロピー相互作用は相当強いことを強調したい。

2. 4. 小粒子、大粒子および壁は実在系では何に該当するのか？

2. 2で、「エントロピー相互作用は、小粒子の構造化の影響が出る距離（小粒子の直径の数倍程度）まで、2個の大粒子あるいは壁と大粒子が十分に接近した場合に誘起される」と述べた。逆に、2個の大粒子あるいは壁と大粒子がその程度の距離まで接近できる場合には、小粒子の並進運動に起因するエントロピー相互作用が重要となる。

もともと、朝倉-大沢理論^(1,2)では、大粒子はコロイド粒子、小粒子は高分子に該当するとされ、共存する溶媒は単なる不活性なバックグラウンドとして扱われていた。その後の Minton らのクラウディング理論^(11,12)においても、大粒子はより大きな生体高分子、小粒子はより小さな生体高分子（または低分子）に該当するとして議論され、溶媒は同様な扱いを受けている。しかし、下で述べる「特殊な系」の場合を除いては、このような取り扱いは妥当ではなく、溶媒を陽に考慮しなければならない。

「特殊な系」は、コロイド分散系に見られる。ポリスチレン微粒子のように表面の電荷（負）密度が高いコロイド粒子が純水中に存在する場合、強い静電反発力に

よって、2個の粒子近傍における水分子の構造化の影響が出る距離まで粒子は近づけない。この場合、粒子間相互作用は、 Q_L を粒子の持つ全電荷、 ϵ を水の誘電率、 r を粒子の重心間距離として、 $Q_L^2/(\epsilon r)$ で記述できる（剛体球ポテンシャルとはほど遠い）。NaClなどの塩を加えると、粒子の電荷がカウンターイオン（ Na^+ ）によって遮蔽される。塩濃度が十分に高いと、遮蔽効果は強く、粒子間相互作用は顕著に短距離化し、2個の粒子近傍における水分子やイオンの構造化の影響が決定的に重要となる。ただし、塩濃度が高過ぎると（条件にもよるが、約0.5Mを超えると）、エントロピー相互作用よりも、粒子-カウンターイオン間の静電相互作用に起因する効果の方が支配的になる⁽¹³⁾。一方、適当な塩濃度（ポリスチレン微粒子の場合には $\sim 0.01\text{M-NaCl}$ ）条件下では、粒子の最近接表面間距離がデバイの遮蔽距離（デバイ長）よりも大きい時は粒子間に事実上力は働かず、小さくなると静電反発力が急激に強くなる（ファン・デル・ワールス引力も無視できる）。しかも、デバイ長は水分子の直径よりもずっと大きく、2個の粒子は、水分子やイオンの構造化の影響を受ける距離まで近づけない。従って、水溶液を陽に考慮する必要がなくなり、しかも、粒子間相互作用は剛体球ポテンシャルで近似できるようになる。ただし、この場合、球の直径（有効直径）は粒子そのものの直径にデバイ長を加えたものである。大小2種類の粒子が共存する系では、「大粒子」は大きい方のコロイド粒子（大剛体球）、「小粒子」は小さい方のコロイド粒子（小剛体球）に該当する。ガラス壁（やはり負の高い荷電密度を持つ）が共存する場合も、ガラス壁とコロイド粒子は近似的に剛体ポテンシャルで相互作用をすると見なすことができ、系を「小剛体球-大剛体球-剛体壁系」とモデル化することができる。すなわち、系の取り得るあらゆる微視的状态は等しいエネルギーを持つことになる。このような系は、エントロピー相互作用を実験的に研究するための格好の対象⁽¹⁴⁻¹⁷⁾となっており、理論計算結果と実験結果の良好な一致が確認されている（2.7参照）。

コロイド分散系における「特殊な系」に対する取り扱いの単純な延長として、生体系においても、溶媒を陽には考慮しない方法が採用されてきたように思われる。しかし、生体高分子はポリスチレン微粒子とは大きく異なり、正負・大小さまざまな部分電荷を持つ原子で構成されている。荷電した親水性部位間の静電相互作用は、塩濃度が比較的高い（ $\sim 0.15\text{M}$ ）のでかなり遮蔽される。しかも、生体高分子は数多くの疎水性部位をも持っている。生体高分子の部位あるいは2個の生体高分子は、水溶液の微視的な構造化の影響が決定的となる距離まで近づくことができる。エントロピー相互作用について考える場合、溶媒を単なる不活性なバックグラウンドとして扱うことは大きな間違いである。無論、溶媒の主要成分は「水」に他ならない。

生体系では、「小粒子」は水分子、「大粒子」は生体高分子、「壁」は生体膜に該当する。水分子以外の低分子は「中粒子」ということになる（7. 2 参照）。

2. 5. 定容過程と定圧過程

2. 1における説明は、厳密には大粒子の接触が定容過程で起こる場合に対して行われている。ここで、定圧過程の場合や、小粒子間あるいは大粒子-小粒子間に引力相互作用が存在する場合について考察しておく。小粒子集団（溶媒）中で2個の大粒子（溶質）が接触した場合に生じる小粒子集団の自由エネルギー利得は、

「接触した2個の大粒子の溶媒和自由エネルギー-1個の大粒子の溶媒和自由エネルギー×2」(2)

で表される。溶媒和エネルギーと溶媒和エントロピーは定容過程と定圧過程で異なってくるが、溶媒和自由エネルギーは溶質の過剰化学ポテンシャルであり、過程に依らず同じ値をとる。

図6に示すように、大粒子の近傍には、小粒子の数密度がバルクにおけるそれとは大きく異なる「小粒子の層」が形成される。2個の大粒子が接触すると、その層の量（層を構成する小粒子の総和）が減少する。このことが後の議論で非常に重要となる。

まず、小粒子・大粒子共に剛体球である場合について考える。この場合、図6に示す小粒子の層は高密度層になる。小粒子集団中で大粒子が接触した場合、定容過程では、接触に伴う排除容積の減少はそのまま小粒子の並進運動に利用可能な容積の増加につながり、小粒子集団の並進エントロピー利得は自由エネルギー利得と等価である（「エントロピーの損得」は「エントロピー変化×絶対温度」に対して考えるものとする）。その場合、上記の容積増加に起因するだけの圧力低下を伴うように思えるかもしれない。

しかし、高密度層を構成していた小粒子の一部がバルクに解放されるため、実際には圧力はほんの僅かしか低下しない。定圧過程では、定容過程の場合に比べると系

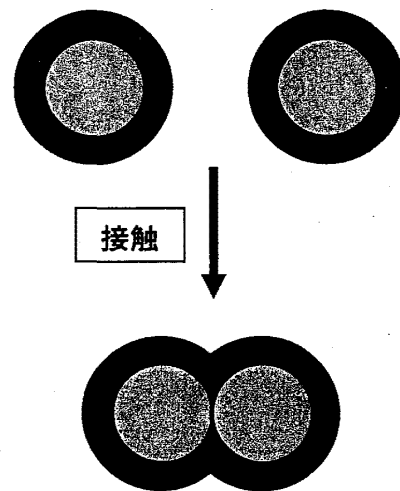


図6 溶媒中における溶質の接触。バルクと異なる構造を持つ溶媒の層を黒色で示している(実際には境界は図に示すほど明確ではない)。

の容積が僅かに減少して外部から仕事をされる（剛体球系の圧力はかなり高いため、この仕事は無視できない）ことに起因して、定容過程で見られた並進エントロピー利得の一部がエンタルピー利得に変換される。結局、小粒子集団の自由エネルギー利得としては、両過程で同じになる。（新たに溶質を挿入する場合と、すでに挿入してある2つの溶質が接触する場合は異なる。後者の場合には、定容過程でも系の圧力変化は前者の場合よりもはるかに小さい。）いずれにせよ、大粒子の接触をもたらす物理要因は小粒子の並進運動である。

次に、「小粒子＝溶媒分子（溶媒分子間に強い引力相互作用が存在）、大粒子＝溶質分子」として、筆者らの統計力学理論解析の結果⁽¹⁸⁾を紹介する。結果の中味は、溶質が疎溶媒性か親溶媒性か、溶質の接触が定容過程と定圧過程のどちらで起こるかによって複雑に変化する。ただし、溶質分子－溶媒分子間引力相互作用が溶媒分子間引力相互作用よりもずっと弱い場合には「溶質は疎溶媒性である」と言い、逆にずっと強い場合には「溶質は親溶媒性である」と言う。自由エネルギー変化は定容過程と定圧過程で不変であるが、両過程でエネルギー変化とエントロピー変化への配分が大きく変化する。溶媒分子間に強い引力相互作用が存在する場合には、圧力は極めて低い（～1気圧）ため、容積変化に伴う外部との仕事のやりとりは無視できるほど小さく、定圧過程のエネルギー変化とエンタルピー変化はほぼ等しくなる。以下より、定容過程と定圧過程に対して、筆者らの統計力学理論解析の結果⁽¹⁸⁾を要約する。溶媒を「水」と置き換えて考えてよい。ただし、溶質の接触には、溶質分子のみを眺めた場合のエネルギー変化（利得または損失）とエントロピー損失を伴うが、このことは除いて議論されていることに注意してほしい。

*** 定容過程 ***

ΔV_{ex} ＝「接触した2個の溶質の排除容積－1個の溶質の排除容積×2」とおくと、溶媒分子の並進運動に利用可能な空間の容積は、 $-\Delta V_{ex}$ だけ変化する。この変化は常に正の値になる。

（1）疎溶媒性の溶質が定容過程で接触した場合：溶媒のエネルギー低下、エントロピー増加、自由エネルギー低下が生じる。溶質分子と溶媒分子の接触は、エネルギー的に好ましくない。溶質の露出表面積(Solvent-Accessible Surface Area)が減少することに起因して、エネルギー低下が生じる。溶質近傍には、溶媒の低密度層が形成されるが、溶質の接触に伴ってその層の量が減少する（図6参照）ので、系の圧力は低くなる。

（2）親溶媒性の溶質が定容過程で接触した場合：溶媒のエネルギー、エントロピーおよび自由エネルギーの増加（上昇）が生じる。自由エネルギーの増加は、エネ

ルギーの増加に起因する。溶質近傍には、溶媒の高密度層が形成されるが、溶質の接触に伴ってその層の量が減少する効果が大きく、系の圧力はかえって高くなる。

*** 定圧過程 ***

ΔV_P = 「接触した2個の溶質の部分モル容積 - 1個の溶質の部分モル容積 × 2」とおく。溶質の部分モル容積とは、溶媒中に溶質を一定圧力下で挿入した場合に生じる系の容積変化である。溶媒分子の並進運動に利用可能な空間の容積は、 $-\Delta V_{ex} + \Delta V_P$ だけ変化する。この変化は、溶質の疎溶媒性が非常に高い場合には負の値になるが、通常は正の値になる。温度が 25°C である場合について考える。

(3) 疎溶媒性の溶質が定圧過程で接触した場合 : (1) の場合を基準に考えると、系の容積が圧縮される。その結果、溶媒のエネルギー低下はさらに顕著になるが、エントロピー増加はそれほどでもなくなる。(溶媒分子間に強い引力相互作用が存在する場合、溶媒の圧縮はエネルギー低下をもたらす、膨張はエネルギー上昇を伴う。) 溶質の疎溶媒性が高い場合には、エントロピーは溶質の接触に伴って低下しさえする。

(4) 親溶媒性の溶質が定圧過程で接触した場合 : (2) の場合を基準に考えると、系の容積が膨張する。その結果、溶媒のエネルギーとエントロピーの増加がさらに顕著になる。

(2) では、溶質分子のみを眺めた場合のエネルギー利得が、「溶媒の自由エネルギー損失と溶質分子のみを眺めた場合のエントロピー損失の和」を上回れば、溶質をも含めた系全体の自由エネルギー (過剰量) が減少する。溶質が疎溶媒性か親溶媒性かに関係なく、溶媒のエントロピーは常に増加し、溶質の接触を促進する主要因子になっていることを強調したい。(3) においても、溶媒の自由エネルギー低下は(1)の場合と同じであり、溶媒分子の並進運動は常に自由エネルギー低下をもたらす主要因子である。2. 1で、「2個の大粒子が接触すると、小粒子集団の自由エネルギーが減少する」とだけ述べておけば (すなわち、エントロピーの増減には言及しなければ)、定容過程と定圧過程の両方をカバーできて無難である。

溶質の接触に伴う溶媒の自由エネルギー変化を $\Delta\mu$, 定容過程における溶媒のエネルギー変化を ΔU_V , エントロピー変化を ΔS_V とし、定圧過程における溶媒のエネルギー変化を ΔU_P , エンタルピー変化を ΔH , エントロピー変化を ΔS_P , 容積変化を ΔV_P とする。このとき、

$$\Delta H / (k_B T) = \Delta U_V / (k_B T) + (\alpha^* / \kappa_T^*) \Delta V_P / d_S^3, \quad \Delta H = \Delta U_P + P \Delta V_P \sim \Delta U_P, \quad (3)$$

$$\Delta S_P / k_B = \Delta S_V / k_B + (\alpha^* / \kappa_T^*) \Delta V_P / d_S^3, \quad (4)$$

$$\alpha^* = \alpha T, \quad \kappa_T^* = \kappa_T k_B T / d_s^3, \quad \kappa_T > 0, \quad (5)$$

$$\Delta\mu / (k_B T) = \Delta U_V / (k_B T) - \Delta S_V / k_B = \Delta H / (k_B T) - \Delta S_P / k_B \quad (6)$$

で表される関係式が成立する⁽¹⁸⁾。ここで、 α は溶媒の熱膨張係数、 κ_T は等温圧縮率、 d_s は溶媒分子の直径である。 $d_s = 0.28$ nm とするとき、水の α^* / κ_T^* の値は以下の通りである：-0.208 (0°C), 0.052 (5°C), 0.288 (10°C), 0.894 (25°C), 1.65 (50°C), 2.14 (75°C), 2.43 (100°C)。

1気圧では、 $P\Delta V_P$ が極めて小さいため、 ΔH は ΔU_P とほぼ等しくなる。(3)の場合は $\Delta V_P < 0$ 、(4)の場合は $\Delta V_P > 0$ となる。水は、約10°C以下では、 $|\alpha|$ が極めて小さい(4°Cより低いとき $\alpha < 0$ 、4°Cでは $\alpha = 0$ 、4°Cより高いとき $\alpha > 0$)という顕著な特徴を持っている。この条件下では $|\alpha^* / \kappa_T^*|$ は無視できるほど小さくなり、 $|\Delta V_P|$ が相当大きくない限り、水のエントロピー変化とエネルギー変化は定容過程でも定圧過程でもほとんど同じ値になる。約10°C以上では、 α^* / κ_T^* は温度上昇と共にますます大きくなる⁽¹⁸⁾。定容過程で測定されたデータの方が、溶質の接触に伴うエントロピー利得がそのままの形で保持されるという意味で、水分子の並進運動に起因する効果を「あからさまに」表現している。実際の測定は定圧過程で行われるが、十分に低い温度であれば、得られるデータは定容過程におけるものに近い。

(1) および(2)において、温度上昇と共に水分子の熱運動がさかんになり、 $|\Delta U_V / (k_B T)|$ は減少し、 $\Delta S_V / k_B$ は増加する。温度上昇と共に $|\Delta V_P|$ は減少するが、約10°C以上では、 $|(\alpha^* / \kappa_T^*) \Delta V_P / d_s^3|$ は通常温度上昇と共に大きくなる。筆者らの解析結果⁽¹⁸⁾によると、 $\Delta V_P < 0$ の場合には ΔH と ΔS_P は温度上昇と共に減少し、 $\Delta V_P > 0$ の場合には逆に増加すると考えてよい(式(3)および式(4)参照)。水のエネルギー変化とエントロピー変化の温度依存性は、定容過程の場合よりも定圧過程の場合の方が大きい。その理由は $(\alpha^* / \kappa_T^*) \Delta V_P / d_s^3$ なる項の存在にあるが、エネルギー変化(エンタルピー変化にほぼ等しい)とエントロピー変化の和をとると、式(6)から分かるようにこの項はキャンセルされてしまう。このことが、水中における種々の物理化学過程に対して実験的に知られている Entropy-Enthalpy Compensation⁽¹⁹⁻²²⁾(エントロピー変化とエンタルピー変化は温度に強く依存するのに、自由エネルギー変化の温度依存性はずっと小さいこと)の主な要因である⁽¹⁸⁾。

2. 6. 大粒子が球とは大きく異なる形状を有する場合

大粒子が球とは大きく異なる形状(細長い円筒状や薄い円盤状など)をしている場合のエントロピー相互作用の働き方は特に興味深い。例えば、図7に示す大粒子の4通りの接触の仕方のうち、一番左下の規則的な仕方が、影をつけた排除空間の

重なる部分の容積および小粒子集団の自由エネルギー利得を最大にする。すなわち、小粒子は大粒子に規則的な接触を要求する：小粒子の並進運動に起因する効果が大粒子の秩序構造形成を促進する。

大粒子間のエントロピー相互作用は、2個の大粒子の近づき方（各々の大粒子の方位）に大きく依存する。ここでは、エントロピー相互作用における自由エネルギー障壁に注目し、筆者の統計力学理論解析結果⁽²³⁾を紹介する。2. 2で述べたように、2個の大粒子に挟まれて形成されるチャンネルが広いほど、障壁も高くなる。図8に示すように、種々の形状と大きさを

有する2個の大粒子の種々の近づき方に対して考える。図8における「小さな球」の直径は小粒子の直径の2-3倍程度とする。円筒の断面の直径や円盤の厚さも、小粒子の直径の2-3倍程度とする。このとき、図8中段において、2個の大粒子が接近した場合のチャンネルは充分に狭くなり、自由エネルギー障壁も低くなる。一方、上段に示す場合には、チャンネルが広いために障壁は高くなる。下段に示す場合には障壁は存在しない（または無視できるほど低い）⁽²³⁾。要するに、充分に大きな球状の粒子同士は高い障壁のために接触し難いが、大粒子の少なくとも一方が球とは大きく異なる形状を有する場合には、図9に例示するように、障壁が充分に低い近づき方を選ぶことによって、最も安定な接触に到達できるのである。この興味深い結果は、5. 2で重要となる。

2. 1から2. 6までに述べてきた、大粒子の規則的な接触が小粒子の並進運動によって促進される効果を総称してエントロピー的排除容積効果（または単に排除容積効果）、小粒子の並進運動に起因する効果などと呼ぶことにする⁽²⁴⁾。大粒子自体の並進運動も重要であり、大粒子が分散して小粒子と一緒に混じり合った方が有利である。これが混合エントロピー効果である。実際の系では2つの効果が競合するが、大粒子が非常に希薄な条件下では混合エントロピー効果が優り、大粒子濃度がある程度以上高くなると排除容積効果が支配的になる。

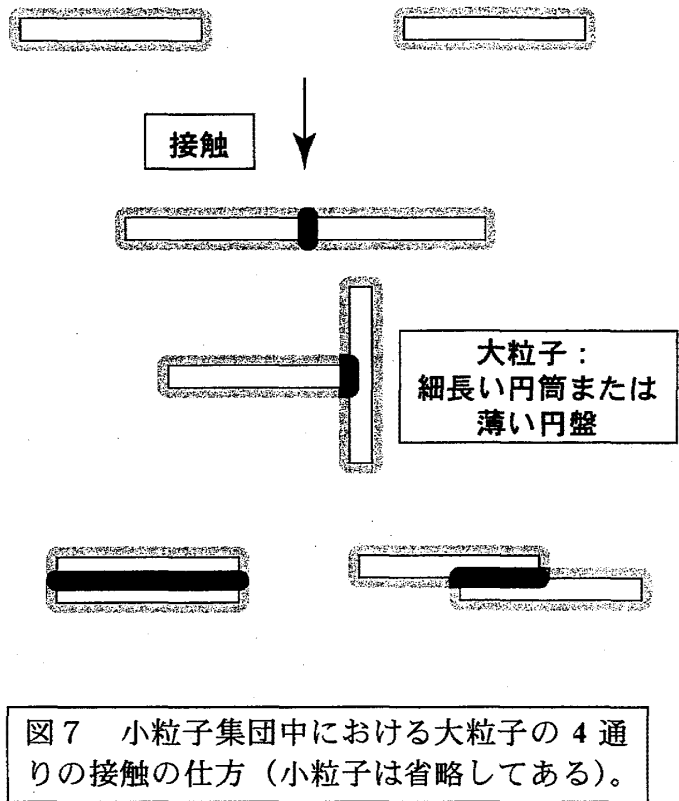


図7 小粒子集団中における大粒子の4通りの接触の仕方（小粒子は省略してある）。

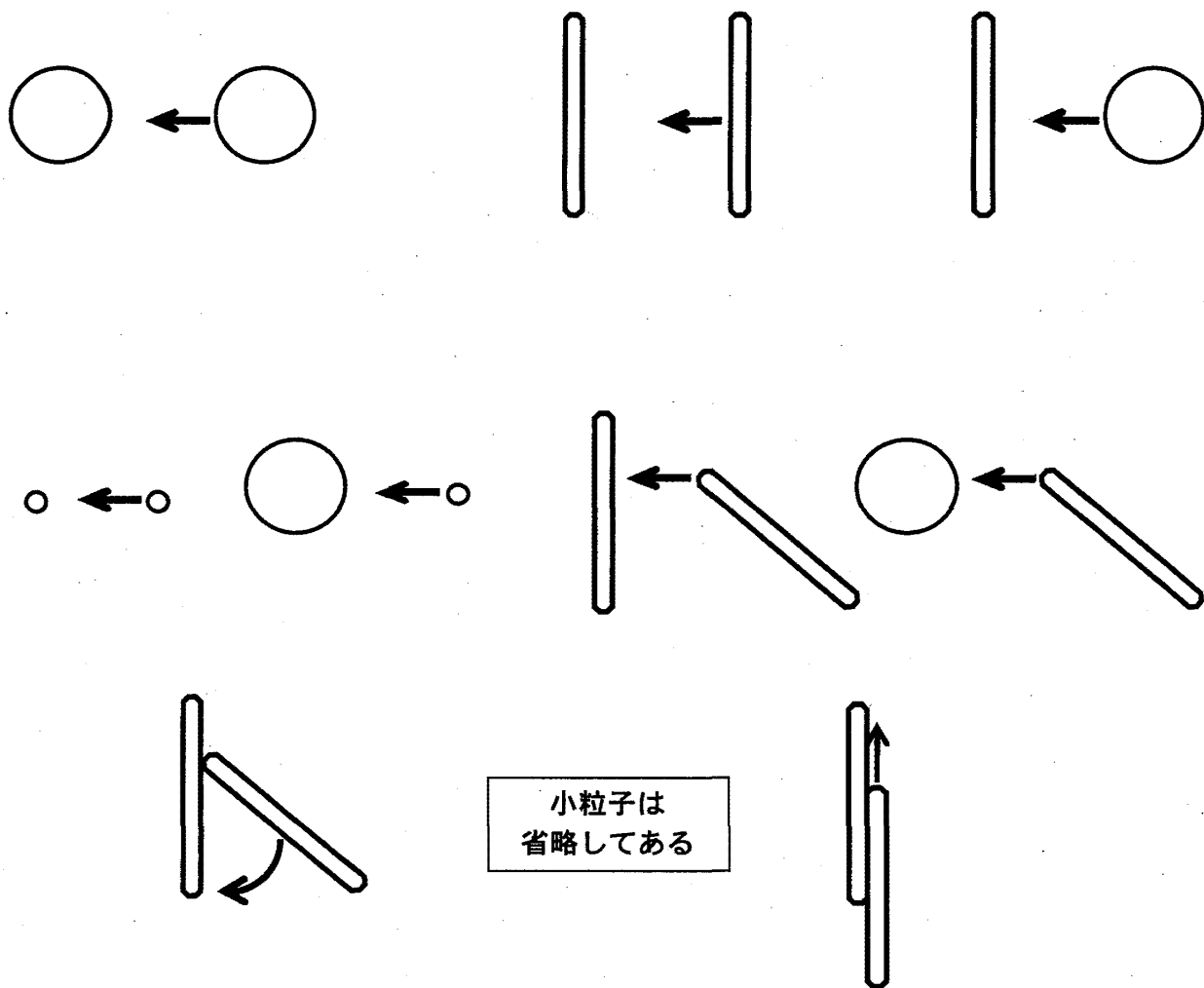


図8 2個の大粒子の種々の近づき方(下段左は回転, 右はスライド)。大粒子は小さな球(小粒子よりは大きい⁽²³⁾), 大きな球, 細長い円筒または薄い円盤である。上段: 接触するために超えなければならない自由エネルギー障壁が高い。中段: 障壁が低い。下段左: 障壁は無い⁽²³⁾。下段右: 障壁は無視できるほど低い。

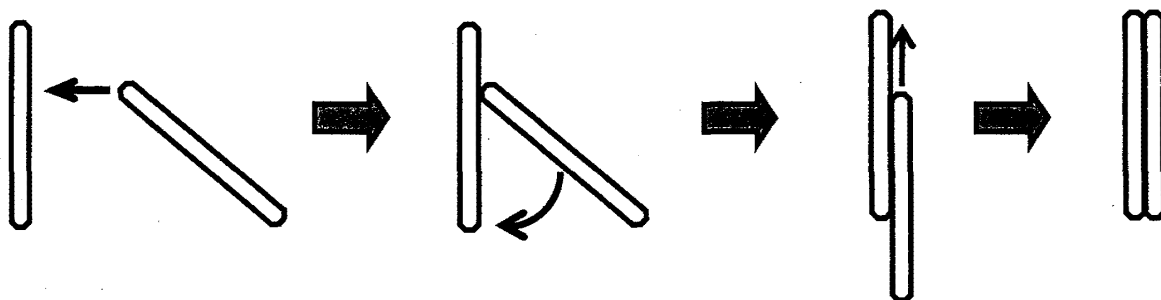


図9 2個の細長い円筒または薄い円盤の接触の仕方(小粒子は省略)。

2. 7. エントロピー的排除容積効果の実験的検証

2. 4で「特殊な系」について述べた。小剛体球に該当する小コロイド粒子（以下小粒子）の集団に、大剛体球に該当する大コロイド粒子（以下大粒子）を徐々に添加していくと、ついには「大粒子の結晶相」（小粒子の直径÷大粒子の直径が十分に小さいときは、隙間に小粒子が入る）と「主として小粒子から成る流動相」に相分離することが実験的に確認されている⁽¹⁴⁾。ガラス壁が共存する場合には、大粒子を徐々に添加していくと、壁がない場合よりも低い大粒子濃度で「大粒子の結晶相」が壁表面上に析出することも見出されている^(14,15)。無論、相図が温度にほとんど依存しないこと（近似的に剛体モデルで記述できること）も検証されている。

小コロイド粒子集団中における大コロイド粒子間相互作用も、小コロイド粒子集団の充填率を変えて実測されている⁽¹⁷⁾。充填率が充分低い場合、相互作用は朝倉一大沢理論で良好に記述できるが、高くなるにつれて振動性の挙動に移行する（2. 2参照）ことが確認されている。いずれの場合にも、積分方程式論や密度汎関数理論^(5,8,25)が与える計算結果と良く一致するデータが得られている。

2. 8. 「疎水性」に対するコメント

古典的には、疎水相互作用は以下のように解釈される：疎水性溶質分子近傍では水素結合の強化による水の強い構造化が起こる；構造化を起こした水はエネルギー的に安定であるが、エントロピー的に不安定（特に水分子の回転運動が制限されることに起因）であり、後者が勝って自由エネルギー的に不安定になる；構造化を起こした水の量を減少させるために、疎水性溶質分子間に引力相互作用が誘起される。疎水性溶質分子近傍における水の上記のような構造は、Iceberg Structure（氷様構造：蛋白質研究のコミュニティーで信じられている有名な言葉）と呼ばれる。

実際には、疎水性溶質分子近傍における水の構造は、溶質サイズによって異なる。メタンのような充分小さい溶質分子の場合には、それに隣接した水分子は4本の結合の手のうちの3本をメタン側に向け、メタンを取り囲んで水素結合を確保しようとする傾向が見られる。ところが、蛋白質の疎水性部位程度の大きさになると、水素結合の切断を避けることは幾何学的に不可能になる。しかし、隣接した水分子は4本の結合の手のうちの1本のみを疎水性部位側に向け、水素結合の切断数をできるだけ少なく抑えようとする傾向が生じる⁽²⁶⁻²⁸⁾。このような構造化を起こした水は、メタンの場合と異なり、エネルギー的にもエントロピー的にも不安定である⁽¹³⁾。いずれにせよ、溶質サイズに関係なく、近傍における水の構造は、氷様構造とは言い難い液体的なものである^(26,27)（構造化は強くない）。氷様構造は、分子性流体用積

分方程式論を用いた筆者らの解析⁽²⁶⁻²⁸⁾でも、計算機シミュレーションでも、中性子散乱実験でも観測されたことがない^(19,29)。(分子性流体用積分方程式論^(26-28,30-35)では、分子間の相互作用および相関が重心間距離および各々の分子の方向の関数(6変数関数)としてまともに扱われる。このことは、分子間の相互作用および相関を相互作用サイト間の相互作用および相関(サイト間距離のみの関数)で表現し、Closure Equation⁽⁹⁾中ではそれらが独立に扱われる RISM 理論およびその改良型⁽³⁶⁻³⁸⁾の場合と対照的である。分子性流体用積分方程式論は、分極の効果も平均場近似を用いて取り込んでおり、水分子の配位・配向構造を解析できる有力な統計力学理論である。)疎水性溶質近傍の水が氷様構造を持つという説は、疎水性水和の熱量の温度依存性に対する実測データと矛盾することが、曾田⁽³⁹⁾によって指摘されている。

筆者らの解釈によると、大きな溶質分子では、溶質分子の接触に伴う自由エネルギー低下は排除容積効果に支配される。大きな溶質分子が接触すると、「系内に存在するあらゆる水分子の並進運動に利用可能な容積が増加し、水の自由エネルギー利得につながる」という効果が非常に重要である。顕著な例として、このような解釈を用いないと、3. 8で述べる蛋白質の圧力変性を説明することができない。

2. 9. エントロピー駆動の秩序化過程

式(1)から分かるように、小粒子のサイズが小さいほど、小粒子集団が高密度であるほど、大粒子のサイズが大きいほど、排除容積効果は大きくなる。常温・常圧で高密度の液体として存在する物質を比較すると、水は例外的に小さい分子サイズを持ち、小粒子集団が水の場合に排除容積効果は最大になる。ネオンは水分子と同程度の大きさを持つが、常温ではガスであるので、この効果は無視できるほど小さい。シクロヘキサンは常温で水と同程度に高密度な液体であるが、分子サイズがかなり大きいので、この効果は水の場合よりもずっと小さい。

2. 6からある程度予想できるように、水分子の並進運動の制限を緩和させようとする効果によって、共存する生体分子が様々な秩序構造を形成したり、高度な機能を発揮したりし得る。水のエンタロピーを増加させるために、系内である種の秩序化が起こるのであり、まさに「エンタロピー駆動の秩序化過程」である。ただし、何度も述べているように、定圧過程では水のエンタロピー利得の一部が水のエネルギー利得に変換される⁽¹⁸⁾が、水分子の並進運動が推進力になっているので、「エンタロピー駆動」と表現することができる。以下より、それらの具体例について考察する。

3. 蛋白質の折り畳み

3. 1. 折り畳みの主たる推進力は何か？

蛋白質は、生理的条件下の水溶液中で、その内部が密に充填されたユニークな立体構造（天然構造）に折り畳まる。内部における密な充填は、蛋白質が安定に機能するために不可欠である。変性状態では蛋白質は拘束されておらず、数多くの異なる構造をとることができ、秩序度が低い（エントロピーが高い）。一方、天然構造では、1つの定まった構造の周りに若干ゆらぐだけであり、秩序度が高い（エントロピーが低い）。よって、折り畳みには膨大な構造エントロピー損失を伴う。それと競合できる（あるいはそれを凌駕できる）折り畳みの推進力は何であろうか？

その答えとして、疎水性部位の埋没をあげることが多い。しかし、蛋白質分子は疎水性部位と親水性部位がほぼ不規則に分布したヘテロな特性を有しており、ミセル形成の場合のように疎水性部位のみを選択的に埋没させることは不可能である。一方、蛋白質が折り畳むと、蛋白質分子内水素結合（以下より、単に分子内水素結合と呼ぶ）が数多く形成されると共に、蛋白質を構成する原子間のファン・デル・ワールス引力相互作用による安定化が起こる。このことが、折り畳みの主たる推進力であるという考え方も根強い。しかし、3. 4で説明するように、折り畳みは、脱水和という同等に大きなペナルティーを伴う。脱水和とは、蛋白質の酸素原子や窒素原子と水の酸素原子との水素結合（以下より、単に水分子との水素結合と呼ぶ）の切断、蛋白質を構成する原子と水の酸素・水素原子間のファン・デル・ワールス引力相互作用による安定化の喪失（あるいはそのうちの一方のみ）を指す。従来から考えられている因子は、どれも折り畳みの推進力としては力不足である。

3. 2. 水分子の並進運動の効果に焦点をあてた統計力学理論解析

筆者らは、水分子を直径 0.28 nm の剛体球、蛋白質を剛体球の結合体（各原子の直径＝レナード・ジョーンズ相互作用ポテンシャル中のサイズパラメーター σ の AMBER99 で提案された値）としてモデル化し、3次元積分方程式論^(6,40)に基づく溶媒和自由エネルギー（ここでは、蛋白質分子をその構造と重心の位置を固定して溶媒中に挿入した場合の系の自由エネルギー変化であり、溶媒が特に水の場合には水和自由エネルギーと呼ぶ）の解析を行った。ファン・デル・ワールス相互作用や静電相互作用などはいっさい存在しないため、系の取り得るあらゆる微視的状态が等しいエネルギーを持ち、エントロピックな効果のみが残る（溶媒和自由エネルギー＝－絶対温度×溶媒和エントロピー）。水分子の並進運動以外の効果はいっさい除外

した興味深いモデル解析である^(41,42)。なお、蛋白質は複雑な多原子構造を持ち、2つの異なる構造間の溶媒和自由エネルギーの差は、排除容積の差のみで記述する朝倉-大沢理論^(1,2)では正しく評価できないことを付記しておく。

まず、C-ペプチド（アミノ酸残基数 $N=13$ ）の場合、 α -ヘリックス構造の溶媒和自由エネルギーは、ランダムコイル状態のそれよりも $23k_B T$ 低いことが分かった。すなわち、ランダムコイル状態から α -ヘリックス構造への転移が起こると、水の並進エントロピーが $23k_B$ 増加する。この転移に伴う水の自由エネルギー利得は、室温で -14 kcal/mol である。ここで、実際の系に目を向けてみる。 $\text{CO}\cdots\text{W} + \text{NH}\cdots\text{W} \rightarrow \text{CO}\cdots\text{HN} + \text{W}\cdots\text{W}$ （Wは水分子を表す）で示される水中における分子内水素結合形成の自由エネルギー変化は、 $0 \pm 1 \text{ kcal/mol}$ と見積もられている⁽⁴³⁾。 -1 kcal/mol だとしても、C-ペプチドの α -ヘリックス構造形成で9個の分子内水素結合しかできないので、全自由エネルギー利得は -9 kcal/mol にしかない。よって、水分子の並進運動の制限が緩和されることに起因する自由エネルギー利得の方が、 α -ヘリックス構造形成のより強い推進力であることが分かる。

ただし、このことは、分子内水素結合が重要でないことを意味するのではない。水分子との水素結合の喪失というペナルティーを補償するために、分子内水素結合を確保することは不可欠である。 α -ヘリックスの形成は、主鎖がヘリカル構造を形成することと側鎖の接触が起こることに起因して大幅な排除容積の減少をもたらす。同時に分子内水素結合を確保できる非常に好都合なものである。主鎖の側面での接触と側鎖の接触が起こることに起因して大幅な排除容積の減少をもたらす。かつ分子内水素結合を確保できる β -シートの形成にも同じことが言える。主鎖の側面での接触が排除容積の減少をもたらすことは、図7に示すような細長い円筒同士の接触を考えるとよく理解できる。主鎖のヘリカル構造形成については、図で表すことは難しいが、細長い1本の円筒がヘリカル構造を作ると、排除容積が大きく減少する^(7,42,44)。以上のようにして、天然構造に α -ヘリックスと β -シートが数多く見られる理由が理解できる。

再び、モデル解析の結果を紹介する。プロテインG ($N=56$) の場合、内部における密な充填を特徴とする天然構造の溶媒和自由エネルギーは、ランダムコイル状態のそれよりも $207k_B T$ 低いことが分かった。図10に示すように、種々の幾何学的

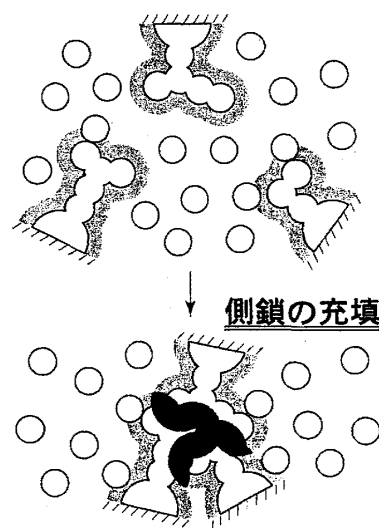


図10 水中で蛋白質の側鎖がかっちりとかみ合う様子。

形状を有する側鎖がかっちりとかみ合ったとき、図1に示す球状大粒子同士の接触における場合よりも遥かに大きな排除容積の減少と水の自由エネルギーの利得が生じる。よって、 $207k_B T$ なる大きな値が出ることも想像に難くない。

ペプチドや蛋白質がランダムコイル状態から天然構造に転移した場合の、水の並進エントロピー利得(TE Gain : TE は Translational Entropy の略)と構造エントロピー損失(CE Loss : CE は Conformational Entropy の略)を半定量的に比較してみた^(41,42)。 $N=5$ のエンケファリン、 $N=13$ のC-ペプチド、 $N=56$ のプロテインG、 $N=110$ のバルナーゼに対する両者の比較を図1に示す。ただし、エンケファリンは伸びた構造が安定であるから、真空中で強制的に丸めた構造を天然構造の代わりに使った。ランダムコイル状態の構造エントロピーは次のようにして見積もった。主鎖に対しては、1残基当たり回転可能な結合が2つあり、各々が取り得る安定な回転角が3つあるので、取り得る構造の数は $3^2=9$ 通りある。 N 残基の場合、構造エントロピーへの寄与は $k_B \ln(9^N)$ とする。側鎖からの寄与としては、計算機シミュレーション⁽⁴⁵⁾の結果から推奨されている、平均で1残基当たり $1.7k_B$ (N 残基の場合には $1.7Nk_B$)なる値を採用する。天然構造の構造エントロピーはゼロとする。

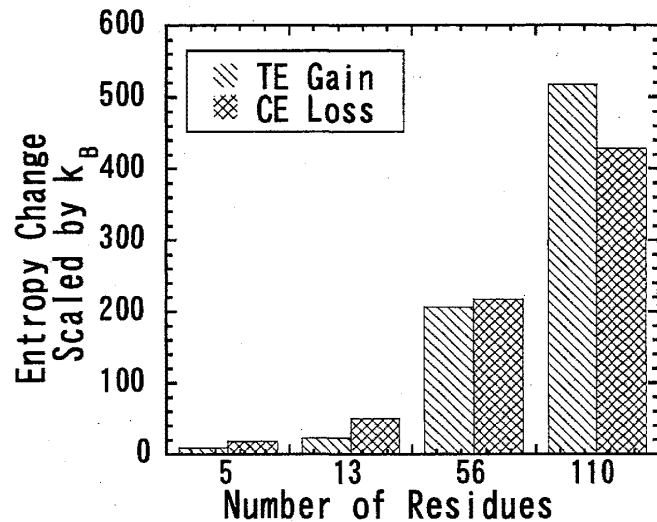


図1.1 ペプチドまたは蛋白質の折り畳みに伴う水の並進エントロピー利得(TE Gain)と構造エントロピー損失(CE Loss)の大雑把な比較。

図1.1から以下のことが分かる。小さなペプチドでは、TE

GainはCE Lossにかなわないが、プロテインGやバルナーゼ程度の大きさになると両者は競合できる。このことは、小さなペプチドは折り畳まず、充分大きなペプチドや蛋白質のみが折り畳まるという実験事実と矛盾しない。水分子の直径を仮想的に1.5倍の 0.42nm にする(充填率は一定に保つ)と、TE Gainは大幅に減少してしまい、プロテインGやバルナーゼの場合ですらCE Lossにかなわなくなる。水分子のサイズが非常に小さいことが決定的に重要であることが分かる。

プロテインGに対して、いくつかの異なる構造を仮想的に作って調べてみた。例えば、天然構造と一致する α -ヘリックスを持っていても、 β -シートが無ければ溶

媒和自由エネルギーは $46k_B T$ も高くなる。 α -ヘリックスが形成されると大きな安定化が起こると上で述べたが、 α -ヘリックスを 4 個も持つ構造でさえ、溶媒和自由エネルギーは天然構造のそれよりも、 $33k_B T$ も高くなる。このことより、局所的な構造形成のみではなく、全体としての構造形成も重要であることが分かる^(41,42)。天然構造(図 1 2)はラグビーボールのような形をしているが、ほぼ完全な球状の構造でも、溶媒和自由エネルギーは天然構造のそれよりも、 $76k_B T$ も高くなる。

精密な全原子ポテンシャルを用いた計算機シミュレーションで得られた、水中におけるプロテイン G の 600 通りの準安定構造を取り上げ、各構造に対する溶媒和自由エネルギーを解析したところ、天然構造よりも低い値を与える構造はごく僅かしか無かった(これについては 3. 4 で再び取り上げる)。天然構造の安定化には溶媒分子の並進運動が極めて重要な役割を果たしていることが分かる。換言すると、蛋白質は排除容積効果を最大限に生かした立体構造に折り畳まる。ホモポリマーは、モノマーユニットが親水性の場合には水との接触面積が大きい比較的伸びた構造を取り、疎水性の場合には水との接触面積が小さいコンパクトな構造をとる。蛋白質と同様にヘテロな特性を持つヘテロポリマーでさえ、ユニークな構造を持たない。さらに、でたらめなアミノ酸配列を持つポリペプチド鎖を作っても、ユニークな構造に折り畳まない。蛋白質は、2 次構造形成を確保しつつ、複数の側鎖をかつちりとかみ合わせることで、唯一の天然構造を獲得していると思われる。それを実現できるアミノ酸配列のみが自然淘汰されているのである。このように考えると、蛋白質の折り畳みには、「多様な幾何学的形状を持つ側鎖の存在とそれらの並べ方」が極めて重要であることが分かる。

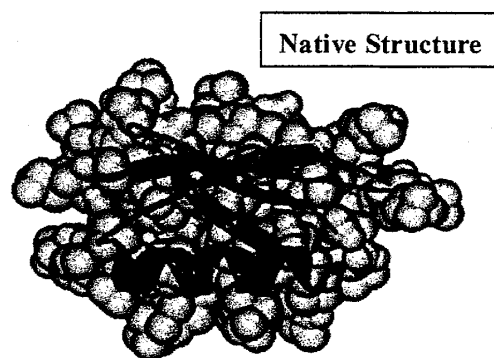


図 1 2 プロテイン G の天然構造 (PDB Code: 2GB1)。 α -ヘリックスと β -シートを 1 個ずつ持つ。

3. 3. 形態熱力学理論に基づくアプローチ

蛋白質の種々の構造に対する溶媒和自由エネルギーが、溶媒効果を記述する上で鍵となる。しかし、その計算は容易ではない。通常分子シミュレーションは、適用範囲が低分子に限られ、蛋白質のように複雑かつ大きな溶質分子を対象とすることは困難である。現状では、3. 2 で使用した 3 次元積分方程式論^(6,40)が適用可能であるが、大容量のメモリーおよび長大な計算時間が大きな問題になる。筆者らは、

形態熱力学理論に基づくアプローチ⁽⁴⁶⁾により、3次元積分方程式論を用いた場合に比べて約 $1/10^4$ の計算時間で、蛋白質の溶媒和自由エネルギーを高い精度で計算できることを実証した⁽⁴⁷⁾。

形態熱力学理論では、溶質の溶媒和自由エネルギー μ を溶質の4つの幾何学的指標 (V, A, X, Y) により次式で与える。

$$\mu/(k_B T) = C_1 V + C_2 A + C_3 X + C_4 Y. \quad (7)$$

ここで、 V =排除容積、 A =露出表面積、 X および Y は各々露出表面の平均曲率およびガウス曲率の積分値である。4つの係数 (C_1, C_2, C_3, C_4) は、溶質の形状に独立であり、複数の異なる直径を有する球状溶質の $\mu/(k_B T)$ に式(7)を適用して最小二乗法によって決定できる。また、その計算には、いかなる溶媒分子モデルおよび理論的方法を用いても良い (例: 多極子モデルの水^(30,31)+分子性流体用積分方程式論^(26-28,30-35), SPC/E水⁽⁴⁸⁾+分子動力学シミュレーション)。用いた溶媒分子モデルや理論的方法の特性は、4つの係数に反映される。蛋白質の μ は、4つの幾何学的指標 (構造によって異なる) を計算するだけで直ちに得られる。

第一段階として、3.2で採用した「水分子=剛体球、蛋白質分子=剛体球の結合体」なるモデルとプロテインGの600通りの異なる構造を対象とし、形態熱力学理論に基づくアプローチを適用して

μ を計算した。ただし、4つの係数は、動径対称の積分方程式論⁽⁹⁾を用いて決定した。3次元積分方程式論による計算値を μ_I 、形態熱力学理論による計算値を μ_M で表し、ずれの割合 $D(\%)$ を次式で定義する。

$$D = 100(\mu_I - \mu_M) / \mu_I. \quad (8)$$

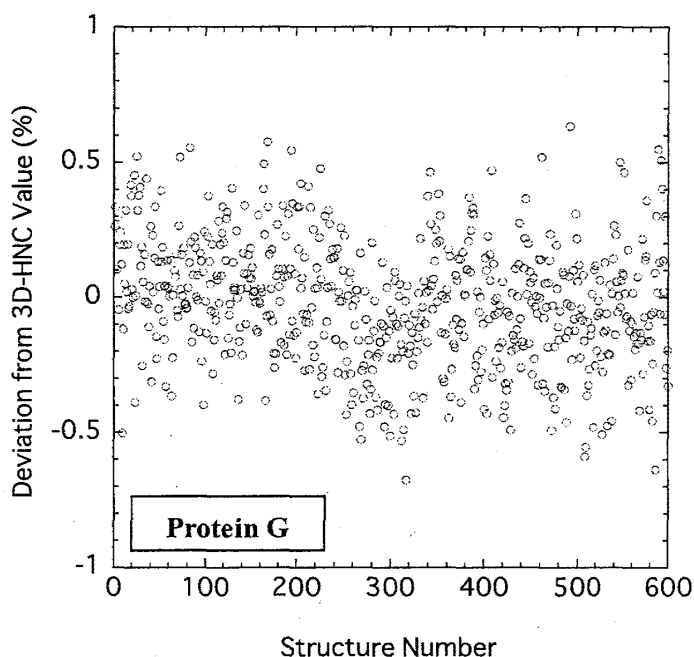


図13 プロテインGの異なる構造(600通り)の溶媒和自由エネルギーに対する、形態熱力学に基づくアプローチを用いた場合の計算誤差。3次元積分方程式論で得られた値を基準に考えている。

D を図 13 にプロットする。最大で $\pm 0.7\%$ のずれしかないことが分かる。3次元積分方程式論の基礎式を数値的に解く場合のグリッド幅を半分にする、 D はさらに $1/10 \sim 1/2$ に減少する。一方、所要計算時間は、形態熱力学理論に基づくアプローチを用いた場合には約 $1/10^4$ に短縮される。プロテイン G の 1 つの構造当たり、Itanium ワークステーションを用いて 0.1 秒以下で計算できる。必要なメモリーも非常に小さいので、極めて大きな蛋白質やそれらの会合体をも扱うことができる。これはまさに画期的なことである。

なお、ここで述べたアプローチは、溶媒和自由エネルギーに限らず、溶媒和の種々の熱力学量に適用できる。いま、剛体球溶質の挿入を定容過程で考え、水に対して精密な分子モデルを適用した場合について述べる⁽⁴⁹⁾。溶媒が常温・常圧の水の場合、水和自由エネルギー $\mu/(k_B T)$ に式(7)を適用すると $C_1 > 0$, $C_2 > 0$, $C_1 \ll C_2$ となる。水和エネルギー $U/(k_B T)$ および水和エントロピー S/k_B に式(7)を適用したときの C_1 は共に大きな負の値となるが絶対値がほぼ等しく、差 ($\mu/(k_B T) = U/(k_B T) - S/k_B$) を取ると桁落ちが起こり、 C_1 は非常に小さな正の値になる。一方、溶媒が剛体球系の場合、溶媒和エネルギーはゼロである。溶媒和自由エネルギーに対しては、 C_1 は大きな正の値、 C_2 は負の値になる。溶媒和自由エネルギーの $C_1 k_B T$ は溶媒の圧力に、 $C_2 k_B T$ は平坦な剛体壁における溶媒の表面張力に該当するから、これらの結果は容易に理解できる。当然のことながら、溶媒和エネルギーと溶媒和自由エネルギーに対する C_1 と C_2 の特性は、剛体球系の場合と水の場合で大きく異なる。しかし、溶媒和エントロピーに対する C_1 と C_2 は、2つの場合で定性的に類似した挙動を呈する。興味深いことに、相当な高圧下における水の $\mu/(k_B T)$ に式(7)を適用すると、 C_1 は正の大きな値、 C_2 は負の値になり、剛体球系の場合と定性的に似てくる。高圧下では、数密度が高いために数多くの水素結合が切断され（水素結合形成が数密度の低下に結びつくことは、氷の数密度が低いことから理解できる）、水は剛体球系的な振る舞いをするのである。

3. 4. 折り畳みのエナジेटィクス

以上見てきたように、水和の熱力学量を計算する場合、蛋白質の構造は固定して考える。種々の構造に対する熱力学量を比較・検討するわけである。蛋白質分子内エネルギー（構造エネルギーとも呼ぶ） E_I と水和自由エネルギー μ の和 W は、構造安定性を記述する上で重要な関数である。 μ は定容過程と定圧過程で同じであるから、理論上、定容過程で考える。 $\mu = E_H - TS$ (E_H は水和エネルギー、 S は水和エントロピー) で与えられる。 E_H の主要成分は、蛋白質の挿入に伴う水の圧縮に起因した

水のエネルギー利得（成分 1）と、水-蛋白質間相互作用エネルギー（成分 2）である。構造変化に伴う量 Q の変化を ΔQ で表すとき、次式が成立する。

$$\Delta W = \Delta E_I + \Delta \mu = \Delta E_I + \Delta E_H - T\Delta S. \quad (9)$$

ΔE_H へは成分 2 からの寄与が支配的となる。蛋白質が、例えばよりコンパクトな構造に変化すると、通常は排除容積と露出表面積が共により小さくなり、分子内水素結合形成や蛋白質を構成する原子間のファン・デル・ワールス引力相互作用による安定化により、 E_I は低くなる傾向がある。しかし、同時に水-蛋白質間のそれらの喪失が起こり、 E_H は高くなる傾向がある。このように、 ΔE_I と ΔE_H の符号は逆であり、絶対値はそれほど大きくは異なる（互いにほぼ補償し合う）ものと考えられる。

筆者らは、プロテイン G の天然構造と 32 通りのランダムコイルを対象とし、精密な全原子ポテンシャルと 3 次元 RISM 理論を用いた解析⁽⁵⁰⁾を実施した。静電相互作用やレナード・ジョーンズ相互作用をすべて考慮したモデル解析である。その結果、折り畳みに伴って蛋白質分子内エネルギーの大幅な利得が生じるものの、同等に大幅な水和エネルギー損失を伴い、 $|(\Delta E_I + \Delta E_H)/\Delta E_I|$ は 0.06 程度にとどまることが分かった。“ $\Delta E_I + \Delta E_H$ ”のみでは、折り畳みに伴う構造エントロピー損失と競合できる大きさにはなり得ない。「 ΔW が構造エントロピー損失と競合できるのは、主要成分 $-T\Delta S$ が存在するからである」という筆者らの考え方の妥当性が検証された。

定容過程の水和エントロピー S で構造安定性を議論することの利点は以下の通りである。 S は、主に水分子の並進運動に起因する排除容積効果で決定され、水-蛋白質間相互作用にあまり影響されない。精密な全原子ポテンシャルと 3 次元 RISM 理論を用いた筆者らの解析結果によると、水-蛋白質間の静電相互作用を完全に除外しても、 S は 5% 程度しか変化しない⁽⁵¹⁾。「水分子=剛体球、蛋白質分子=剛体球の結合体」なる剛体モデルを用いても、剛体球系に対する充填率と直径を水に対するそれらに設定しさえすれば、 S の大雑把な値は把握できる。すなわち、数多くの構造を対象にする場合でも、それらが比較的大きく異なっていれば、その中から S を最小にする構造を正しく特定することができる。しかし、3.6 で述べるような精密計算では、蛋白質分子は依然として剛体球の結合体としてモデル化できるが、水には現実的な分子モデルを適用する必要があることも分かっている。

以後、 S は形態熱力学理論に基づくアプローチ⁽⁴⁷⁾を用いて計算する。3.2 と 3.3 でも取り上げたプロテイン G の 600 通りの異なる構造に対して S を計算し、 $A = -S - (-S)_{\text{Native}}$ (Native は、天然構造に対する値を表す) の正負を調べた。ただし、水

のモデルとして、剛体球系を用いた場合(Model 1),「剛体球+強い引力ポテンシャルで相互作用をする単純流体を用いた場合(Model 2), 精密な多極子モデル^(30,31)を用いた場合(Model 3)について検討した⁽⁵²⁾。ただし, Model 3 に対しては, 式(7)の4つの係数は分子性流体用積分方程式論^(26-28,30-35)を用いて計算した。Model 1の場合でさえ, Λ に負の値を与える構造はごく僅かしかなかった(図14参照: R_g は回転半径)。このことは, 3.2で既に述べている。しかし, Model 2およびModel 3の場合(図15参照)には, いずれも Λ に負の値を与える構造は存在しなかった。これらの結果より, 以下のことが言える。

(1) S の計算では, 水分子間の引力相互作用を考慮することが重要であるが, 水分子の詳細(回転運動など)は考慮しなくても, 天然構造の特定には失敗しない。

(2) 天然構造は, 水のエントロピーをほぼ最大にする(蛋白質の挿入によって被る水のエントロピー損失をほぼ最小にする)構造である。取り上げたプロテインGの600通りの構造に対しては, 式(9)の $-T\Delta S$ のみで

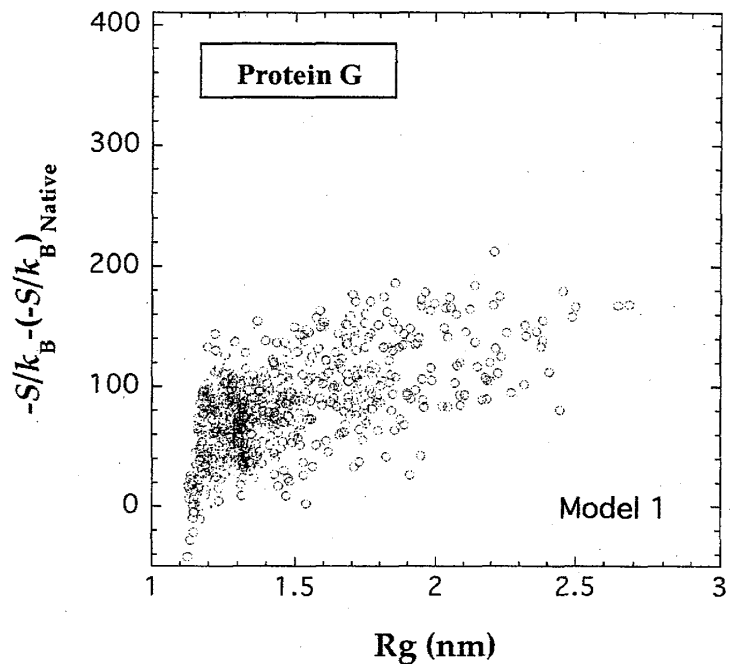


図14 プロテインGの異なる構造(600通り)に対する $\Lambda = -S - (-S)_{\text{Native}}$ の値。溶媒は剛体球系。

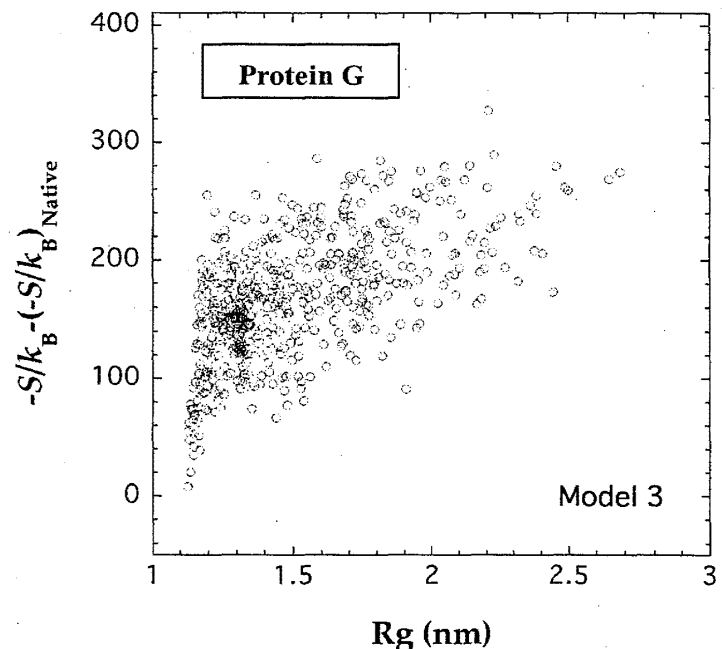


図15 プロテインGの異なる構造(600通り)に対する $\Lambda = -S - (-S)_{\text{Native}}$ の値。溶媒は水。

構造安定性を議論できる（このことは、3. 6で考察するように、いつも成立するとは限らない）。

なお、形態熱力学理論に基づくアプローチに必要な4つの係数をRISM理論およびその改良型⁽³⁶⁻³⁸⁾で計算すると、現実的な水分子モデル（SPC/E⁽⁴⁸⁾）を用いても、構造間の S の差を過小評価する上、 A に負の値を与える構造がいくつか出現する⁽⁵³⁾ことを付記しておく。

生理的条件下の水溶液中では、定容過程を考えて表現すると、「蛋白質は、脱水となるペナルティーを補償するためにできるだけ多くの分子内水素結合を確保しつつ、水のエントロピーをできるだけ大きくするような構造をとる」という描像に到達する。そのような構造には数多くの2次構造があり、主鎖と種々の幾何学的形状を有する側鎖が密に充填されている。それに到達することによって、蛋白質は天然構造のユニークさと機能を発揮するための安定性を確保しているように思われる。

3. 5. 実験結果との対応

蛋白質の折り畳みや会合は、2. 5で対象とした単純な溶質の接触よりも複雑である。折り畳みや会合の場合、疎水性部位同士の接触が優位であると考えられるが、疎水性部位と親水性部位の接触や、親水性部位同士の接触も同時に起こる（3. 1参照）。このことに注意すれば、2. 5で得られた結果は蛋白質の折り畳みや会合の場合にも応用できる。後者の場合、定圧過程における系の容積の圧縮をもたらす効果と膨張をもたらす効果がある程度相殺し、定容過程と定圧過程の違いはより小さくなる。例えば、折り畳みが定圧過程で起こった場合、2. 5の(3)で述べたような水のエントロピー低下は生じない。

蛋白質折り畳みの実験は定圧下で行われる（実際には、変性の実験が行われるが、変性に伴う系の熱力学量の変化に -1 をかければ、折り畳みに伴う系の熱力学量の変化が得られる）。2. 5で述べた結果から判断すると、折り畳みに伴う疎水性部位の脱水和（Dehydration）は系の容積の減少をもたらす、親水性部位の脱水和は系の容積の増加をもたらす。水のエントロピー変化への、疎水性部位の脱水和からの寄与は温度上昇と共に減少し、親水性部位の脱水和からの寄与は温度上昇と共に増加する。これらは、Privalovらが実測データに基づいて推定した結果⁽⁵⁴⁾と一致する。

2. 5で述べたように、4℃の場合に折り畳みに伴う水の熱力学量（エントロピーとエネルギー）の変化は定容過程の場合と同じになる（1気圧では、エネルギー変化 \sim エンタルピー変化）。観測されるエントロピー変化には構造エントロピー損失（負の変化）が、エンタルピー変化には蛋白質分子内のエネルギー利得（負の変化）

が含まれている。実験結果によると、4℃ではほとんどの蛋白質に対して、エントロピー変化とエンタルピー変化は共に正である⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾。25℃においてさえ、両方の変化が正である蛋白質がかなり多く存在する⁽¹⁹⁾。最近、寺嶋ら⁽⁵⁸⁾は、斬新な実験手法を用いて、15-30℃における Apoplastocyanin の折り畳みに伴うエンタルピー変化が非常に大きな正の値を持つこと（エントロピー変化はこれを凌駕するほど大きな正の値であること）を見出した（「参考文献」(58)の下の付加説明参照）。これらの結果は、折り畳みがエントロピー駆動であることを示している。

筆者らの解釈によると、蛋白質の折り畳みでは疎水性部位の脱水和が優位であり、系の容積が減少する。このことに起因して、定容過程で考えた場合の水の並進エントロピー利得の一部が水のエンタルピー利得に変換される。温度が高いほど、変換される割合は大きくなり、ついには、観測されるエントロピー変化（=水のエントロピー変化+蛋白質の構造エントロピー変化（後者は負））とエンタルピー変化（=水のエントロピー変化+蛋白質の分子内エネルギー変化（後者は負））が共に負になってしまう。温度上昇に伴い、エントロピー変化とエンタルピー変化は共に単調に減少する。この結果は、蛋白質折り畳みの実験結果⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾と矛盾しない（「参考文献」(57)の下の付加説明参照）。観測される負のエントロピー変化は、水分子の並進運動の制限を緩和させようとする効果を折り畳みの推進力として否定しているわけではない。負のエントロピー変化は、蛋白質分子内のエネルギー利得が折り畳みの推進力であることを必ずしも意味するものではない。

3. 6. 蛋白質立体構造予測法の構築

蛋白質の折り畳みは、生体内で起こる最も基本的な自己組織化過程である。また、蛋白質の立体構造予測は、ポストゲノム時代の中心課題の一つであるが、50年来未解決の超難問として知られており、現在までに数多くの研究者が挑戦し、次々と敗退して行った。従来考え方にとらわれない斬新なアプローチの開発が不可欠であろう。多くの研究者は、水-蛋白質系に全原子モデルを適用し、原子間の静電相互作用やレナード・ジョーンズ相互作用などを考慮して、計算機シミュレーションによって立体構造空間を探索する。しかし、膨大な計算労力が深刻な問題となる。水を連続体として副次的に扱う方法もあるが、「分子集団」としての水の重要な役割が正しく考慮できない。さらに大きな問題は、観測される結果が、用いる蛋白質用力場パラメーターによって大きく変わり得る⁽⁵⁹⁾ことである。そのため、現在では情報科学的方法（バイオインフォマティクス）が主流となっている。立体構造が既知の蛋白質に対するアミノ酸配列のデータベースを検索・参照し、情報科学的手法

を駆使して候補となる複数の立体構造を作り出すのであるが、最良と判断される立体構造を特定する最終段階で行き詰る傾向がある。水の効果を考慮していないし、折り畳み機構の解明にもつながらない。ここでは、筆者らの斬新な方法⁽⁶⁰⁾を紹介する。

一般には、3. 4で対象とした、プロテインGの600通りの構造の場合とは異なり、水和エントロピーだけで構造安定性を議論できるとは限らない。このことは、情報科学的な方法で作られられる構造群のような、数多くのバラエティーに富んだ構造を扱う場合に特に当てはまる。そこで、蛋白質の立体構造変化を広く論じる上で重要となる新しい自由エネルギー関数 F を次式で与える。

$$F = (-TS + \xi) / (k_B T_0), \quad T_0 = 298 \text{ K.} \quad (10)$$

水和エントロピー S は、水に多極子モデル^(30,31)を適用し、分子性流体用積分方程式論^(26-28,30-35)と形態熱力学理論⁽⁴⁷⁾を組み合わせで計算する。 ξ は、伸びた構造を基準にした「水和エネルギー+構造エネルギー」に該当し、構造のコンパクト化に伴う脱水和のペナルティーの総和である。水分子と最大数の水素結合を形成しているが分子内水素結合は持たない完全に伸びた構造に比べると、よりコンパクトな構造では、水分子との水素結合 ($\text{CO}\cdots\text{W}$, $\text{NH}\cdots\text{W}$ など) の切断と共に、幾つかのドナー (N) とアクセプター (O) が内部に埋もれている。その場合、分子内水素結合 ($\text{CO}\cdots\text{HN}$ など) が形成されていれば問題ないが、必ずしも形成できているとは限らず、脱水和のペナルティーを被ることになる。

$T=T_0$ に設定して考える。脱水和に対して、水分子との水素結合の切断に起因するものだけを考える (蛋白質を構成する原子間のファン・デル・ワールス引力相互作用による安定化の獲得と、蛋白質を構成する原子と水分子間のファン・デル・ワールス引力相互作用による安定化の喪失は完全にキャンセルすると仮定する)。Brooks らのホルムアミドを用いた計算機シミュレーションの結果⁽⁶¹⁾によると、 $\text{CO}\cdots\text{HN}$ なる水素結合形成の自由エネルギー利得は、無極性流体 (CCl_4) 中では $-14k_B T_0$ であるが、水中では $-0.5k_B T_0$ に過ぎない。この結果を利用し、上で述べた完全に伸びた構造を基準に考えて以下のような方式を採用する。 $-0.5k_B T_0$ なる値は、用いるアミドの種類によって異なる^(61,62) こともあり、ゼロと見なす。ドナー (N) とアクセプター (O) が水分子との水素結合を切断して埋もれた場合 (埋もれた場合の周囲の環境は無極性流体中と同じと考える)、分子内水素結合を形成すれば損得なしとする。しかし、ドナーまたはアクセプターが埋もれても分子内水素結合の相手がいない場合、 $7k_B T_0$ (これは、上記の $14k_B T_0$ の半分) のペナルティーを課す。以上

述べた方式⁽⁶⁰⁾を図16に示す。Brooksらの計算機シミュレーションの対象は、ここで考えている蛋白質構造のコンパクト化とは厳密には対応しない。しかし、物理化学的な本質は捉えているはずである。

埋もれているか否かは、露出表面積がゼロか否かで判断する。主鎖と側鎖のすべてのドナーとアクセプターに対して埋もれているか否かを判定し、主鎖-主鎖，主鎖-側鎖，側鎖-側鎖に対する分子内水素結合形成をチェックする。このようにして、脱水和のペナルティーの総和をとったものが ξ である。 $-S$ と ξ (共に正の量)は、蛋白質の立体構造，温度，圧力によって変化する。

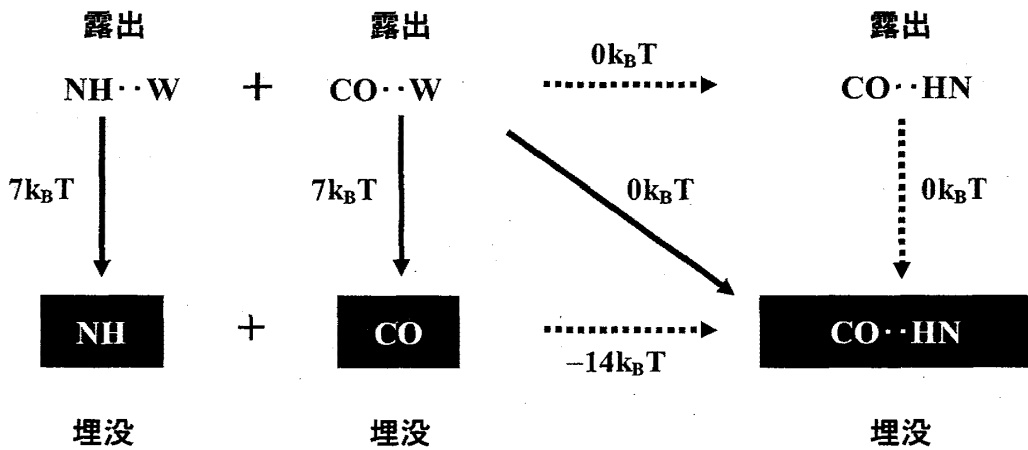


図16 脱水和のペナルティーの総和 ξ を超高速で計算するための基本となる考え方。

蛋白質研究のコミュニティーには、エネルギー関数のパワーをチェックできるように、デコイ（偽物）セット⁽⁶³⁾というものが数多くの蛋白質に対して用意されている。これは、コンパクトではあるが天然構造とは異なる1000通り近い立体構造のデータセットであり、情報科学的方法に基づいて作成されたものが多い。天然構造に極めて類似した構造も含まれる。それらと天然構造の中から、天然構造を射当てることができるかどうかで、エネルギー関数のパワーを測るのである。天然構造よりも低いエネルギー関数を与える構造が1つでもあれば、「天然構造を射当てる」ことはできない。この意味においても、式(10)に ξ を導入することが重要となる。

筆者らは、7種類（その後さらに3種類）の蛋白質のデコイセットに対して、式(10)で与えた F をエネルギー関数としてテストした⁽⁶⁰⁾。その結果、すべてにおいて天然構造を射当ててすることに成功した（ $7k_B T_0$ なる値を多少変えても成功することに変わ

りはなかった)。

X と Y を次式

$$X = \xi / (k_B T_0) - \{ \xi / (k_B T_0) \}_{\text{Native}}, \quad (11)$$

$$Y = -TS / (k_B T_0) - \{ -TS / (k_B T_0) \}_{\text{Native}}, \quad (12)$$

$$X + Y = F - F_{\text{Native}} \quad (13)$$

で定義する。図17に X と Y の関係をプロットした。7種類の蛋白質のデコイセットすべてに対する結果をまとめてある。 X と Y は大体同程度の大きさを持ち、逆の相関を持っている。その理由は、例えば蛋白質がよりコンパクトな構造に転移すると、 $-S$ は一般により小さくなる。しかし、同時にCOやNHが埋もれるが、水分子との水素結合の切断を必ずしも完全には補償できないので、 ξ は一般に大きくなる。 $Y < 0$ or $X < 0$ にする構造は少な

からず存在する。しかし、 $X + Y < 0$ にする構造は存在しない。換言すると、天然構造よりも水のエントロピー損失を小さくできる構造は、深刻な脱水和の全ペナルティを被る。天然構造よりも脱水和の全ペナルティを小さくできる構造は、深刻な水のエントロピー損失を被る。天然構造は、「水のエントロピー損失」+「脱水和の全ペナルティ」に関して最適化されている⁽⁶⁰⁾。このことは、生理的条件下の水溶液中における、自然淘汰されてきたアミノ酸配列を持つ蛋白質に対してのみ当てはまる。 F に構造エントロピーの効果を加えると、ある人工アミノ酸を持つポリペプチド鎖が折り畳むか否かの推定や、変性機構の研究なども可能となる。

本方法では、水に対して精密な分子モデルを採用し、蛋白質の立体構造を原子レベルで考慮しているにも拘らず、綿密な考察に基づく単純化と形態熱力学の適用により、自由エネルギー関数を超高速(1つの構造当たり、Itaniumワークステーション

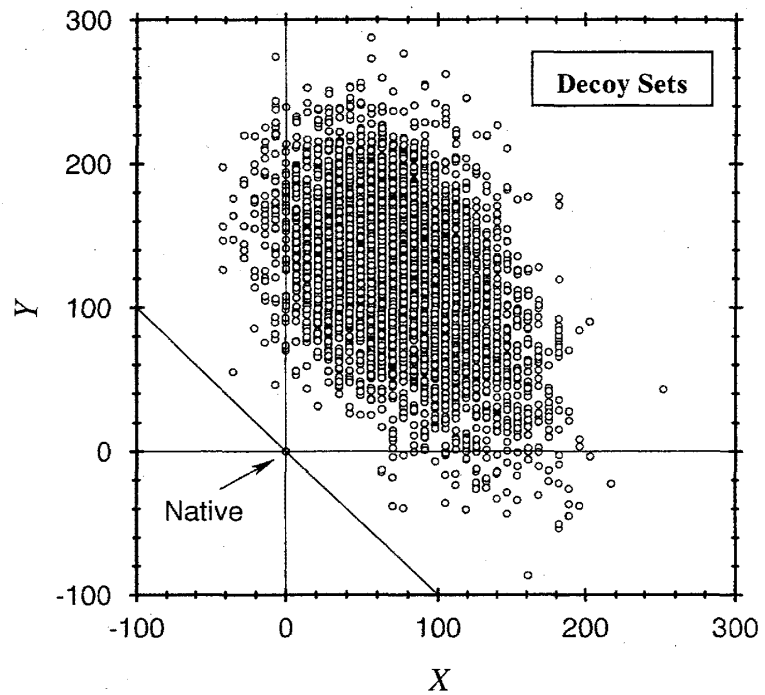


図17 Y と X の関係。3本の実線は、 $X=0$ 、 $Y=0$ および $X+Y=0$ を表す。

ンで 0.1 秒程度) で精度良く計算できる。これは、今までの液体論の常識を覆す成果である。しかも、不確定性の高い蛋白質用力場パラメーターを必要としない。本方法は、数多くの候補構造から最良の構造を選び出す場合に最適であり、情報科学的手法と統合することにより、アミノ酸配列から蛋白質の立体構造を予測できる実践的な方法を開発することができるものと大いに期待される(「参考文献」(60)の下
の付加説明参照)。非常に大きな蛋白質や会合体をも扱うことができ、ドラッグデザイン(例えば、次のプロセスから成る: 標的蛋白質の立体構造を明らかにする⇒その活性部位を特定する(多くの場合、類縁蛋白質の立体構造と活性部位の情報から、標的蛋白質の活性部位を推測することができる)⇒活性部位と選択的に結合して、標的蛋白質を失活させる化合物を探す)への応用も夢ではない。今後、図16に与えられている数値の妥当性についてのさらなる検討が必要である。

3. 7. 蛋白質の部分モル容積

蛋白質研究のコミュニティーには、部分モル容積に関する2つの誤解が定着しているように思われる。それらは、「排除容積と部分モル容積が混同されていること」および「よりコンパクトな構造ほど部分モル容積が大きい(変性して伸びた構造ほど部分モル容積が小さい)と信じられていること」である。

溶質の部分モル容積 V_M (以下より、PMV (Partial Molar Volume)と略記する) は、溶媒中に溶質を一定圧力下で挿入した場合に生じる系の容積変化である。熱力学において、PMV は溶媒和自由エネルギーの圧力微分

$$V_M = (\partial \mu / \partial P)_T \quad (14)$$

で与えられ、蛋白質の圧力変性を論じる場合に重要な量となる(3. 8参照)。

Kirkwood と Buff⁽⁶⁴⁾は、球状溶質の PMV を溶質近傍における溶媒の数密度分布で表現する式を導いた。その結果を蛋白質のような多原子分子に拡張すると、溶媒の数密度の空間分布(還元密度分布と呼ぶ)を $g(x, y, z)$ として、

$$V_M = \int \int \int \{1 - g(x, y, z)\} dx dy dz \quad (15)$$

なる式が得られる。溶質が蛋白質で溶媒が水の場合、理想項は無視できるほど小さく、かつあらゆる立体構造に対して共通であるから、式(15)には加えていない。バルクにおける水の数密度を ρ_s とするとき、微小空間 $dx dy dz$ 中の水分子の数は $\rho_s g(x, y, z) dx dy dz$ で与えられる。蛋白質から充分遠く離れた位置では、 $g \rightarrow 1$ である。蛋白質を構成する原子と水分子の重なりは許されないから、重なりが起こる位置で

は $g=0$ になる。式(15)の積分を $g=0$ の領域 (領域 1) とそれ以外の領域 (領域 2) に分割して考える。領域 1 にわたる積分は蛋白質が生成する排除容積 V に他ならない。領域 2 にわたる積分は、蛋白質表面近傍における水分子の数密度分布で決まる。バルクと異なる数密度を有する水分子層の厚さは、通常水分子直径の 2-3 倍程度に過ぎない。領域 2 にわたる積分は、層中の水の平均の数密度を表現するパラメータ ζ と露出表面積 A を用いて、近似的に $-\zeta A$ で与えられる。かくして、

$$V_M = V - \zeta A \quad (16)$$

なる関係式が近似的に成立する^(65,66)。 ζ は、蛋白質表面の特性、温度、圧力などに依存して変化する。まず、常温・常圧下で考える。親水性部位は、その近傍で平均的に $g \gg 1$ であるため、 ζ には正の大きな値として寄与する。逆に、Packing Force に打ち勝つほど疎水性の高い部位は、その近傍で平均的に $g < 1$ であるため、 ζ には小さな負の値として寄与する。蛋白質表面には親水性部位と疎水性部位が共存しており、トータルとして ζ は正の値になり、PMV は排除容積よりも小さくなる。蛋白質の構造によって V や A の値は大きく異なり、構造 1 と構造 2 に対して、「構造 1 の排除容積 > 構造 2 の排除容積」でも、「構造 2 の PMV > 構造 1 の PMV」ということがいくらかでも起こり得る。

次に、「蛋白質が構造転移を起こすと系の容積がどう変化するか」という問題 (PMV の構造依存性) について考える。一般に、蛋白質が変性すると V と A が共に大きくなる。天然構造および変性状態を各々下付添字 1 および 2 で表すと、

$$V_{M2} - V_{M1} = V_2 - V_1 - \zeta_2 A_2 + \zeta_1 A_1, \quad V_2 > V_1, \quad A_2 > A_1 \quad (17)$$

が成立する。蛋白質は疎水性部位と親水性部位がほぼ不規則に分布したヘテロな特性を有しているため、疎水性部位と親水性部位の両方に対して、変性に伴って露出表面積は増加する。全体として見れば、疎水性部位に対する露出表面積の増加の方が大きいはずであるが、表面の平均的な特性は構造によってあまり大きくは変化しないと考えられ、 $\zeta_2 = \zeta_1 = \zeta (> 0)$ と近似できる。このとき、

$$V_{M2} - V_{M1} = V_2 - V_1 - \zeta (A_2 - A_1), \quad V_2 > V_1, \quad A_2 > A_1 \quad (18)$$

と書ける。 V_{M2} と V_{M1} の大小関係は、 ζ 、 $V_2 - V_1$ および $A_2 - A_1$ の値の組み合わせによって複雑に変化する。一方、実験では、酸を加えて蛋白質を変性させ、変性に伴う系の容積変化を実測することによって天然構造と変性状態の PMV の差を決定する方法がよく用いられる。しかし、酸を加えた場合 (低 pH 条件下) の蛋白質の露

出表面はいたるところで正に荷電しており、極めて親水性が高いために水との接触面積の大きい伸びた構造のセットが安定化される。 ζ は異常に大きな正の値となる。そのため、“ $-\zeta(A_2-A_1) \ll 0$ ”が“ $V_2-V_1 > 0$ ”に圧勝し、天然構造のPMVよりも酸変性状態のPMVの方がずっと小さくなる：変性に伴って系の容積は大きく減少する。この結果を一般化して、「変性して伸びた構造ほど部分モル容積が小さい」と結論づけることは非常に危険である。蛋白質の熱変性や圧力変性（酸を加えていない）などにそのまま適用することもできない。例えば、圧力変性状態は当然天然構造よりも小さなPMVを持つが、このことから「圧力変性状態が酸変性状態のように伸びたものである」と考えることは誤りである（これについては3.8で詳しく考察する）。蛋白質が生理的条件下にある水溶液中で密に折り畳む（ランダムコイル状態から天然構造に転移する）と、系の容積は減少すると筆者らは考えている（このことは、3.5における議論からもほぼ間違いないものと思われる）。ただし、3.8で述べるように、天然構造は必ずしもPMV最小の構造ではない。極めて高い圧力をかけて蛋白質が変性すると、系の容積は当然減少するが、圧力変性状態はランダムコイル状態とは程遠い。

以上のように、溶質のPMVには溶媒条件（pH、圧力、温度など）が大きく影響することを忘れてはならない。極端な例として、低分子のPMVが常温・常圧の水の中では正の値をとるのに、超臨界水中では負の異常に大きい値になることも多い（超臨界水中では低分子近傍にバルクにおけるよりもはるかに数密度が高い水分子の層が形成されるため、その物理的起源については、筆者らの統計力学理論解析の結果を報告した文献⁽⁶⁷⁾を参照されたい）。

「天然構造は、内部に存在する隙間のために、伸びた構造よりも大きな排除容積を持つ」と考えている研究者も見受けられるが、この考えは誤りである。例えば、図10の矢印の下において、3個の側鎖が少しだけ離れて水分子が入れない程度の隙間を作っても、影をつけた排除空間の重なり部分は確かに存在し、排除容積は図10の矢印の上におけるよりも必ず減少する。筆者らは、数多くの蛋白質に対して天然構造とランダムコイル状態の排除容積を精密な計算方法⁽⁶⁸⁾（当然、隙間の存在も考慮してある）を用いて比較し、常に天然構造の排除容積の方がずっと小さいことを確認している。完全に伸びた構造の排除容積は、ランダムコイル状態のそれよりもさらに大きい。

最後に、蛋白質の部分モル容積の計算法についてコメントしておきたい。親水性部位近傍では水分子の高密度層が、疎水性部位近傍では低密度層が形成される。3D-RISM理論は、蛋白質の形状は原子レベルで考慮することができるが、肝心の水

分子に対しては2. 8で述べた1D-RISM理論の欠陥をそのまま抱えている。筆者らの解析結果によると、3D-RISM理論では、疎水性部位近傍でも水分子の高密度層が形成されてしまう⁽⁵³⁾。すなわち、蛋白質があたかも極めて親水性の高い表面のみを持つかのように扱われてしまい、 ζ の値が過大に出る。ある構造に対する絶対値（排除容積項が支配的である）を見る限り特に問題は生じないが、構造間の「差」を見積もる場合に破綻をきたす：天然構造よりも伸びた構造の方がPMVが低いという結果を与えてしまう。このことが、酸変性実験の結果に基づく誤解をさらに助長する結果になったように筆者には思われる。「水分子＝剛体球，蛋白質＝剛体球の結合体」でモデル化すると、親水性部位近傍における水分子の層の密度は過小評価されるが、疎水性部位近傍におけるそれは過大評価され、ヘテロな表面を持つ蛋白質では誤差の相殺が起これ、かえって良い結果を与える^(65,66)。

3. 8. 圧力変性のメカニズム：Alder 転移との物理的類似性

蛋白質は、生理的条件下の水溶液中でユニークな天然構造に密に折り畳む。しかし、温度変化、化学物質の添加、圧力上昇などによってその構造は変性する。なかでも、圧力変性機構の解明は興味深い課題である。常圧下では変性状態よりも天然構造の方が安定であるのに、相当な高圧下になるとその安定性が逆転する。圧力を上げると、水の充填率が高くなるので、非常にコンパクトな天然構造がさらに安定化されるように思われるかもしれないが、事實は逆である。圧力変性のおもしろさはこの点にある。実際、筆者がある国際会議で「蛋白質折り畳みにおける水分子の並進運動の役割」について発表した際、「あなたの概念は蛋白質圧力変性と完全に矛盾する」という指摘を受けた。その時には残念ながら反論できず、悔しい思いをしたが、ホテルに戻って2日間徹底的な考察を行い、圧力変性機構の基本的なシナリオ^(65,66)に到達した。その後進めた計算の結果も、すべて思い通りであった。以下より、それらについて述べることにする。

圧力変性状態（「状態」と表現したのは、変性に伴って数多くの異なる構造が安定化され得るので、それらの構造セットを意味するためである）と天然構造を考えると、常圧下では水をも含めた系の自由エネルギーは後者の方が低いが、高圧下では逆転が起こる。両者の構造エントロピーは異なるが、その差は圧力によってあまり変化しないものと考えられる。以後、変性構造セットの中の代表的な構造を対象とし、単に「圧力変性構造」と呼ぶことにする。圧力変性構造と天然構造の構造エネルギー差も、古典的に考える限り圧力に依存しない。圧力変性は、水和特性の変化に起因するはずである。実験結果⁽⁶⁹⁻⁷⁴⁾によると、圧力変性構造では疎水性部位間

にも水が浸透している。これは水素結合の切断を伴い、水和エネルギー的にはむしろ損失である。それを凌駕する水和エントロピー的利得が水の浸透によって生じるというのが筆者らの考え方である。

水和自由エネルギー μ に注目する。圧力変性が起こるためには、「変性構造の μ - 天然構造の μ 」が少なくとも圧力の上昇と共に十分に減少し、いずれ負に転じなければならない。すなわち、変性構造の PMV (式(14)参照) が天然構造のそれよりも小さいことが必要である。常圧下および高圧下の各々において、構造間の μ の値の差に注目する。筆者らは、3次元積分方程式論^(6,40)と剛体モデル(水分子=直径 0.28 nm の剛体球, 蛋白質=剛体球の結合体: このモデルでは、水和エントロピーを S として、 $\mu = -TS$) を組み合わせ、水分子の並進運動の効果に焦点をあてた蛋白質圧力変性の統計熱力学的解析^(65,66)を行い、以下のことを示した。

(1) 天然構造よりも小さい PMV を持つ構造とは、かなりコンパクトで排除容積がそれほど大きくはなく、それにもかかわらず露出表面積が異常に大きい構造である。このことは、式(16)からも理解できる。すなわち、Swelling や Cleft を持ち、内部に水分子が 1 分子層程度侵入したような構造である。この結果は、実験結果⁽⁶⁹⁻⁷⁵⁾と定性的に良く一致する。

(2) 常圧では、蛋白質が天然構造をとる場合に水の並進エントロピーがほぼ最大になるのに、高圧では、(1) で述べた構造に変性した方が水の並進エントロピーはかえって増加する。(定圧過程では系の体積が僅かに減少するため、定容過程で考えた場合のエントロピー利得の一部がエンタルピー利得に変換されるが、自由エネルギー利得は同じであり、水分子の並進運動の制限を緩和させようとする効果が推進力であることに変わりはない。)

(3) 水分子の大きさを仮想的に 1.5 倍にすると、(1) で述べた構造の PMV は天然構造のそれよりも大きくなってしまい、(2) で述べた逆転も起こらなくなる。この結果は、「水中でなければ圧力変性は起こらない」という実験結果⁽⁷⁶⁾と一致する。異常に小さな分子サイズを有する水の特異性である。

(4) ランダムコイル状態は、露出表面積は非常に大きいですが、排除容積があまりに大きいため、天然構造よりも小さな PMV を持ち得ない。よって、圧力の上昇と共にますます不安定化される。

(5) 完全に伸び切った構造(非現実的ではあるが)はランダムコイル状態以上に大きな PMV を持つ。

(2) は以下のようにして理解できる。水分子の存在自体も、他の水分子にとっての排除容積を生成する。圧力が高くなるほど、この Water Crowding の効果が強く

なる。圧力を上げると、初めは天然構造の隙間が減少するだけで変性しない。圧力をさらに上げると、少しの隙間も許されなくなり、幾つかの水分子を含めて蛋白質原子をより密に充填し直そうとする。中に侵入した水分子の並進運動は確かに制限されるが、蛋白質外の水分子の並進運動の制限は緩和される。高圧下では後者の効果が勝る。「高圧下では、疎水相互作用が弱まるから疎水性部位間に水が浸透する」という Garcia ら^(75,77)の考え方は誤りである。高圧下では、いかなる溶質の挿入に対しても水和自由エネルギーが大きな正の値になるという意味で、蛋白質の「疎水性」は極限に達している。

図18に示すプロテインGの左側の構造 (Swellingが見られる) は、必ずしも高圧下における最安定構造ではないが、圧力変性構造の特徴をうまく捉えた構造である。Swellingが見られる構造に対する、1つの特定のラインに沿った水分子の高圧下における還元密度分布を図19に示す。還元密度分布は、蛋白質から充分離れた位置では1.0であるが、蛋白質表面近傍では振動性となり、コンタクト位置で比較的高い値をとる。蛋白質内部における2つのシャープなピーク (矢印で示してある) は、水

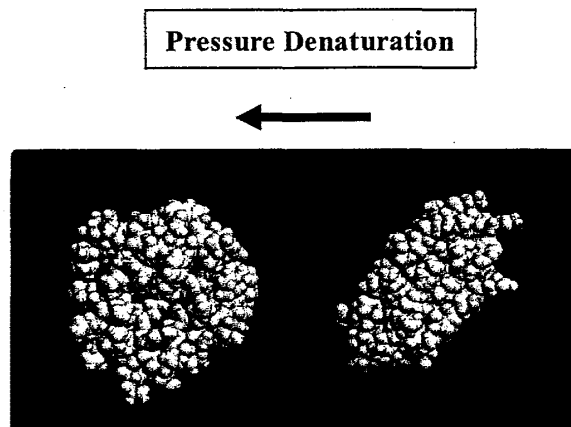


図18 プロテインGのSwellingを起こした構造 (左) と天然構造 (右)。

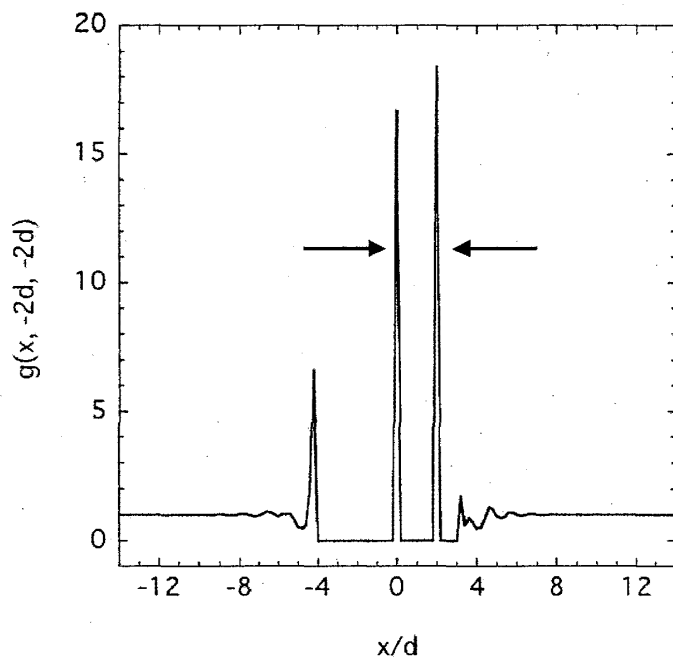


図19 Swelling を起こした構造内への水の浸透を示す還元密度分布のグラフ。

還元密度分布を図19に示す。還元密度分布は、蛋白質から充分離れた位置では1.0であるが、蛋白質表面近傍では振動性となり、コンタクト位置で比較的高い値をとる。蛋白質内部における2つのシャープなピーク (矢印で示してある) は、水

分子の浸透を示す。

その後、筆者らは、水分子に多極子モデル^(30,31)を適用し、分子性流体用積分方程式論^(26-28,30-35)と形態熱力学理論⁽⁴⁷⁾を組み合わせた追加解析⁽⁴⁹⁾を行った。蛋白質の水和エントロピーを

(i)蛋白質の排除容積のみに注目し、朝倉-大沢理論^(1,2)で計算した水和エントロピー、
(ii)蛋白質-水間の2体相関レベルの水和エントロピーから(i)を差し引いたもの、
(iii)蛋白質-水-水間の3体相関レベルおよび多体相関レベルの水和エントロピー、
の3つの成分に分解した。さらに、(ii)と(iii)の各々を水分子の並進運動の制限からの寄与と回転運動の制限からの寄与に分解した。(ii)は、各水分子の運動が、蛋白質の挿入によってその近傍でどのような制限を受けるかを表す。(iii)は、「水分子の運動が他の水分子の存在によって被る制限」が、蛋白質の挿入によってどのように変化するかを表す。水和エントロピーおよび各成分は、蛋白質の構造に大きく依存する。解析の結果、高圧下で天然構造から図18のSwelling構造に転移した場合に水のエントロピーが増加する原因は、(iii)において水分子の並進運動の制限が大きく緩和される点にあることが分かった。(ii)においては損をする。すなわち、「内部に浸透した水分子の並進運動と回転運動はより制限されるものの、系内における他の水分子の並進運動の制限が大きく緩和され、全体としてはエントロピー的に得をする」という説明の妥当性が検証されたことになる。(i)のみで議論すると、「圧力が高くなるほど天然構造はますます安定化される」という逆の推定を与える。蛋白質近傍における水分子の構造化だけに注目する従来の概念でも、圧力変性を説明することはできない。

3. 3で述べたように、相当高圧になると、水は剛体球系的な振る舞いをするようになる。水和自由エネルギーに対する式(7)において、常圧下では C_2 は正であるのに、高圧下では C_2 は負に転じる。この観点から考えても、常圧下では露出表面積の小さい構造が、高圧下では露出表面積の大きい構造が好まれることが分かる。ただし、圧力に関係なく、排除容積の小さい構造が好まれる。これらのことは、「高圧下ではSwellingを持つような構造が安定化される」という結果と矛盾しない。先に(1) - (5)で対象とした幾つかの構造に関する限り、高圧下におけるPMVの大小関係は「水分子=剛体球」の場合と同じであるが、低圧下では天然構造のPMVが一番小さくなることも分かっている。

ところで、剛体球系で充填率があまりにも高くなると、一部が結晶化する(結晶核が出現する)ことが知られており、Alder転移⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾と呼ばれている(「参考文献」(79)と(80)の下の付加説明参照)。このエントロピー駆動の相転移は、結晶化した剛

体球の並進運動はより制限されるものの、他の剛体球の並進運動の制限が大きく緩和され、全体としてはエントロピー的に得をするから起こるものと考えられる。この意味において、蛋白質圧力変性の物理描像は、Alder 転移のそれに類似している。

ここで、蛋白質の熱変性と低温変性^(81,82)に少し言及しておく。温度を上げると、折り畳みに伴う水の並進エントロピー利得はほぼ一定であるが、構造エントロピー損失は大幅に増加する（後者は実験的に見出されている⁽⁸³⁾）。構造エントロピーはねじれのエネルギーと密接に関連している。温度が低いと、二面角はいくつかの安定点のごく近傍の値しかとれない。温度が高くなるにつれて取り得る値の範囲が広まり、取り得る構造の数も増加する。この効果は、天然構造の場合よりも変性状態の場合の方が遥かに大きい。かくして、折り畳みに伴う構造エントロピー損失自体が温度上昇と共に増加するので、それに絶対温度をかけたものは温度上昇と共に顕著に増加する。以上の理由により、構造転移すなわち熱変性が起こる。低温変性機構については、現在筆者らが研究中である。「水分子の並進運動に起因する効果が、蛋白質の他の構造群に比べて天然構造を相対的に安定化させる力」は、低温ではむしろ強まる。しかし、低温では水分子の熱運動が緩慢になるために、 $\text{CO}\cdots\text{W}$ や $\text{NH}\cdots\text{W}$ （水分子との水素結合）がより安定化され、変性に伴う水和エネルギー利得が構造エネルギー損失を大きく上回る（3. 6で述べた脱水和の全ペナルティーが増加する）。後者の効果が勝り、変性が起こるものと考えられる。

4. 酵素－基質間に見られる分子認識

4. 1. 水分子の並進運動に起因する効果に焦点をあてた統計力学理論解析

酵素蛋白質は、基質と呼ばれる低分子と特異的に結合することによって独自の機能を発揮する。この特異性は、「鍵と鍵穴」の関係で例えられるほど、非常に選択性の高い反応を可能にする。高選択性の発現機構を解明することは、ドラッグデザイン分野とも密接に関わっており、応用的にも非常に重要である（3. 6で述べた標的蛋白質の活性部位が鍵穴に、それに結合する化合物が鍵に該当する）。しかし、酵素と基質のみに注目しても、その解明は困難である。

筆者らは、剛体モデルを用いて、いわゆる鍵と鍵穴間相互作用の統計力学理論解析^(6,7,84)を実施した。図20に示すように、1辺の長さが小粒子の直径 d_s の10倍の立方体の重心を原点に置き、小粒子の直径の5倍の半球状の穴をあけておく。さらに、直径 d_2 の大球を考える。3次元積分方程式論^(6,40)を用いると、立方体－大球間

の平均力のポテンシャルの空間分布 $\Phi(x, y, z)$ がたった 1 回の計算で得られる。これは、計算機シミュレーションでは考えられない素晴らしい利点である。大球が遠く離れた位置から x 軸上を原点に向かって移行するという軌跡に沿った平均力のポテンシャルを解析することにより、鍵-鍵穴間相互作用の特性を調べることができる。半球状の穴が鍵穴すなわち酵素の活性部位、大球が鍵すなわち基質に該当する。大球の直径が 4 通りの値をとる場合の結果を比較する。鍵穴よりも小さな鍵 ($d_2=3d_s, 4d_s$)、ぴったりはまる鍵 ($d_2=5d_s$)、鍵穴よりも大きな鍵 ($d_2=6d_s$) の 4 通りである。

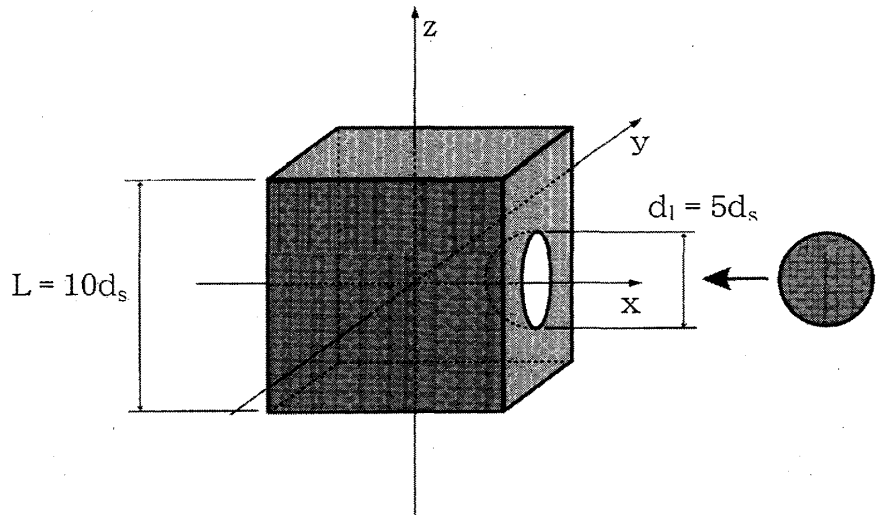


図 20 鍵と鍵穴のモデル。小粒子は省略してある。

図 21 (a) に鍵-鍵穴間の平均力のポテンシャル、図 21 (b) に平均力を示す。鍵穴にぴったりはまる鍵の場合に、接触によってずば抜けて大きな安定化が起こる。しかも、接触に伴う小粒子集団の自由エネルギー利得は、朝倉-大沢理論^(1,2)

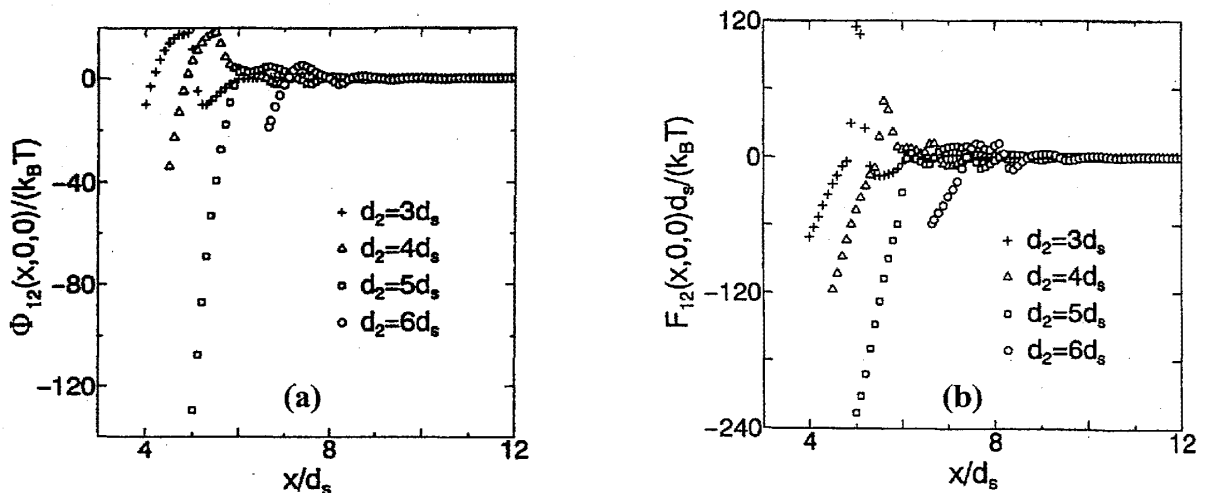


図 21 (a) 鍵-鍵穴間の平均力のポテンシャル (エントロピー相互作用)。(b) 鍵-鍵穴間の平均力 (エントロピー力)。

で推定できる値よりも約3倍大きい。この場合には、2. 2で述べた誤差の相殺は起こらないのである^(6,7)（「参考文献」(7)の下の付加説明参照）。さらに重要なことは、小さすぎる鍵の場合、超えることの難しい高い自由エネルギー障壁が見られることである。鍵穴よりも小さな鍵は、鍵穴表面と鍵の間のチャンネル内に集まってくる小粒子の衝突に起因する斥力を受け、鍵穴表面に近づけず（しかも、鍵が小さいほど受ける斥力も強くなり）、やがて立ち去っていく。（朝倉一大沢理論では、エントロピー相互作用が常に引力性であるため、鍵穴よりも小さな鍵が鍵穴表面に近づけないことを導き出せない。）要するに、エントロピックな効果のみから、鍵-鍵穴間相互作用に強いサイズ選択性が発現する。水分子の並進運動に起因する効果により、形の相補性が重要となるのである。

剛体球ではない実際の水の場合、上記のように鍵穴表面と鍵の間のチャンネル内に水分子が集まることはない（水分子はチャンネル外に出て行く）という反論があるかもしれない。鍵や鍵穴の表面が完全な疎水性である場合には確かにそうである。しかし、通常、表面には親水性部位が共存しており、剛体モデルを用いた場合に見られる挙動にむしろ近くなる。「2つの疎水性表面を水中で近づけて行くと、ついには表面間に挟まれた水は蒸発する」という概念は、この場合には当てはらない。

4. 2. 実験結果との対応

一般のレセプターとリガンドの結合に伴う系の熱力学量変化の実測値が数多く報告されている。結合によって、レセプターとリガンド自身の構造エントロピーは大幅に減少するにも拘わらず、常温で結合に伴う系のエントロピー変化とエンタルピー変化が共に正であるという例が数多く存在する^(85,86)。これは、「水分子の並進運動が結合を促進する主要因子である」ことを示す興味深い結果である。

5. 蛋白質分子の会合による高次構造形成

5. 1. 会合体の規則性と対称性

蛋白質の多くは単量体として機能を発揮する。しかし、生命を支える細胞の活動は実に様々な機能を必要とするため、蛋白質の集合体（高次構造）がそれらの機能を担う。高次構造の特徴は規則性と対称性である。これらの高次構造の形成にも、排除容積効果が重要な役割を果たしているものと考えられる。例えば、DNA や筋細胞の細いフィラメントなど、紐状の高分子または超分子の多くが、二重螺旋構造

を形成する。二重螺旋構造の形成は、水分子に対する排除容積の大幅な減少を伴う。DNA の二重螺旋構造形成の推進力は、異なる符号の大きな部分電荷を持つ 2 つの原子の接触であると一般に考えられている。しかし、その接触には脱水和という大きなペナルティーを伴うことを忘れてはならない。

5. 2. アミロイド線維形成のメカニズム

蛋白質が何らかの原因で折り畳みに失敗し、あるいは構造を崩し、アミロイド線維と呼ばれる会合体を形成して種々の病気を引き起こすことが知られている。これは生命に悪影響を及ぼす例であるが、アミロイド線維も蛋白質の高次構造に他ならない。高次構造形成の分子機構は、生命を掌る場合でも生命を脅かす場合でも同じはずであり、これにおいても、水分子の並進運動に起因する効果（エントロピー的排除容積効果）が重要な役割を果たしている。

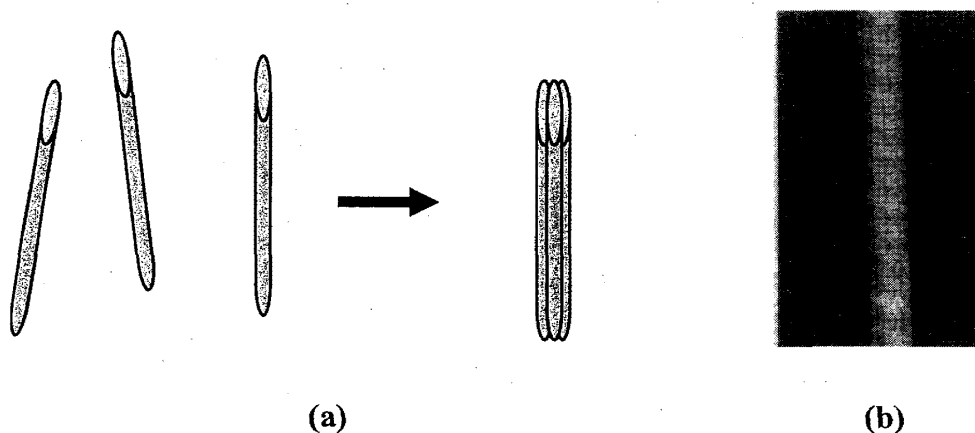


図 2 2 (a) 3本の円筒ユニットが側面で会合する様子。(b) 実際に観測された2本の円筒ユニットによる二重螺旋構造。

アミロイド線維形成に関する実験結果⁽⁸⁷⁻⁹⁷⁾を総合すると、以下のことが言える：(i)蛋白質が変性しないと会合は起こらない；(ii)充分大きな会合体（核）ができるまではかなりの時間がかかるが、その後の会合体の成長は速い；(iii)線維のモルフォロジーとしては種々のものが報告されているが、広がった薄い形状のβ-シートの積み重なりが基本である；(iv)線維状の異物を入れると、それが核として作用する。ある例では、多くのベータストランドが分子内水素結合を介して広がった薄い形状のβ-シートを構成し、それらが積み重なるようにしてよりスケールの大きいユニットを形成する。それらのユニットがさらに壁の上に積み木のように規則正しく積

み重なった構造になっている⁽⁸⁷⁾。別の例では、広がった薄い形状を持つクロスβシートが積み重なるようにして円筒状のユニットを形成する⁽⁸⁸⁾。その円筒状のユニットが図22(a)に示すように側面で会合したり、図22(b)に示すように互いにねじれあって二重螺旋構造を形成したりする⁽⁸⁹⁾。

筆者らは、水分子の並進運動に起因する効果に焦点をあてて、線維形成機構に対する統計力学理論解析⁽⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾を行い、以下の結果を得た。

(1) 球状に近い(天然構造の)蛋白質は孤立した状態で安定化する(蛋白質間のエントロピー相互作用に高い障壁が存在するため)が、球状から大きく崩れると容易に会合を起こす。

(2) 数多くの蛋白質が会合体を形成する場合、脱水和のペナルティーを補償するために、分子内水素結合を確保することが極めて重要になる。蛋白質が分子内水素結合を最大限に確保しつつ会合体を形成する過程を考えると、その仕方として、次の3通りが考えられる:(a) 球状に近い蛋白質の会合;(b) 細長い円筒状αヘリックスの側面での会合;(c) 広がった薄い形状(円盤状)を持つβシートの積み重なり。しかし、水分子の並進運動の制限が緩和されることに起因する水の自由エネルギー低下が最大になるという意味で、(c)が最も安定である。

(3) 要するに、蛋白質分子が孤立して存在する場合の最安定構造と、最安定な会合体の中の蛋白質分子の構造は大きく異なる。

(1)は、2.6と図8からも容易に推察可能であり、「蛋白質の変性がアミロイド線維形成の引き金になる(天然構造の蛋白質は会合しない)」という実験結果(i)を良好に説明できている。蛋白質が折り畳みを終了して球状に近い天然構造に到達するまでは、蛋白質の凝集を防ぐために、シャペロニンによる保護・隔離を必要とすることにも関係している。(2)の(c)は実験結果(iii)と定性的に一致する。蛋白質が変性して会合を起こしても、βシートの積み重なりに到達するまでは相当な時間がかかるであろう。蛋白質分子自身の構造および並進エントロピー効果によってすぐに崩れてしまうからである。しかし、いったん安定な会合体が形成されると、それが核となって蛋白質を次々と取り込んで成長する。以上のように、実験結果(ii)も容易に理解できる。図22に示すパターンも、エントロピー的排除容積効果以外では説明し難い。排除容積効果が支配的である場合、いったん基本となるユニットが安定化されてしまうと、その繰り返しの成長の仕方が選ばれる。実験結果(iv)も筆者らの考えと矛盾しない。

ここで、簡単な考察⁽⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾を紹介する。図23に示すように、形状が変化し得る多くの大球の中に、形状が変化しない1個の大円盤を持ち込んだ場合を想定する。す

べての大粒子は小粒子集団中にある。このとき、大球が大円盤と全く同じ形状に変化して積み重なると最も大きな安定化が起こることが分かった。1の状態から6の状態に移ったときの小粒子集団の自由エネルギー低下は、小粒子サイズの2乗に反比例する(式(1)の場合とは異なる⁽⁹⁸⁾)。小粒子の直径と小粒子集団の充填率に水の値を代入し、大球の直径が水分子の直径の5倍、大円盤の上・下面が円でありその直径が水分子の直径の10倍であるとすると、10個の大球が大円盤に変化して積み重なると自由エネルギー

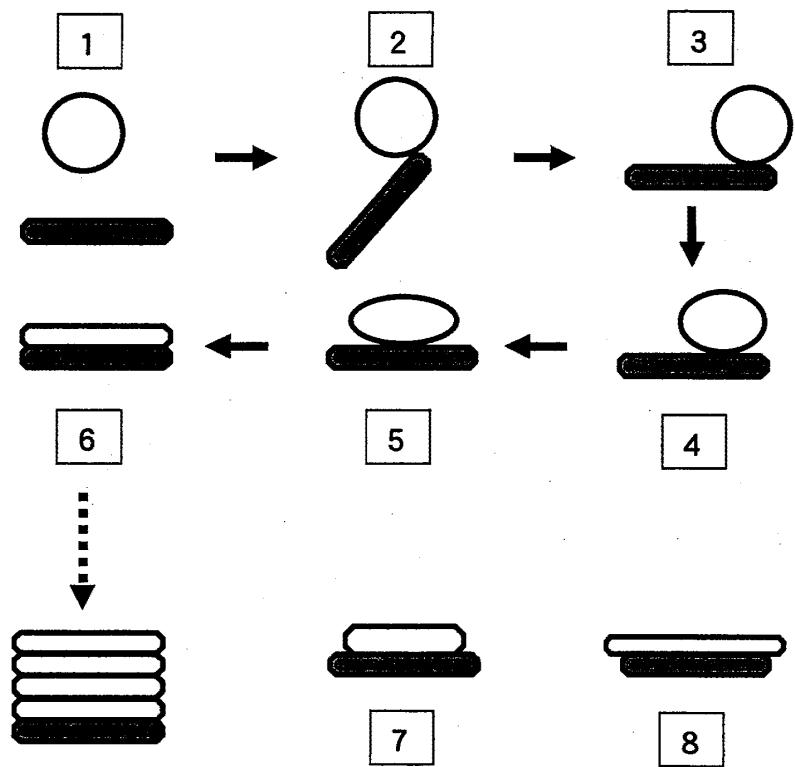


図23 形状が変化する大球群に形状が変化しない大円盤が導入されると何が起こるか？小粒子は省略してある。

減少は $-190k_B T$ にも達する。7や8のように大球が大円盤とは少しずれた形で積み重なった状態における小粒子集団の自由エネルギーよりも、6の状態におけるそれの方がずっと低いことも示すことができる。要するに、たった1個の円盤が、多くの球を自分と同じ形状に変化させつつ会合体を成長させる。小粒子の並進運動に起因する効果のみでも発現し得るこの高度な挙動は、異常型プリオンが1つでもあれば正常型を次々に異常型に変えてしまうことに対応するように見える。また、生命活動に必須の高次構造形成に話を戻すと、蛋白質が自己の構造を状況に応じて変化させつつ各機能システムの中に統合されるという、「蛋白質立体構造の柔軟性および適応性」とも関係する可能性がある。

水は、生命現象の発現において極めて重要な役割を果たしているものの、一歩間違えばアミロイド線維形成などをも引き起こすなど、時には悪役に回ることも多い。老化や発病など、生命を脅かす種々の現象にも水が一役買っていることは間違いないものと思われる。(このことは、本稿のタイトルとも矛盾しており、遺憾である。)

5. 3. 実験結果との対応

アミロイド線維形成の実験では、多くの場合、まず蛋白質を酸変性させる。このままでは正に荷電した部位間の静電反発力のために会合は起こらない。しかし、塩を添加するとそれがアニオンによって遮蔽され、エントロピー相互作用が効果的に働いて会合が起こるようになる。後藤らの実験結果⁽¹⁰¹⁾によると、塩濃度が十分に低い場合には、核を加えると成長が起こってアミロイド線維が形成される。しかし、塩濃度が高過ぎると、自発的に不規則な凝集体が形成されてしまう。これは、同じ正に荷電した部位間に静電的な効果に起因する引力相互作用⁽¹⁰²⁾が働くからである。このように、エントロピー相互作用以外の引力相互作用が支配的である場合には、不規則な凝集は起こるが、「秩序」は生まれない。

ここで、後藤ら⁽¹⁰³⁾によって報告された、アミロイド線維形成に伴う系の熱力学量変化の実測値に言及する。線維形成によって、蛋白質自身の構造エントロピーと並進エントロピーは大幅に減少するにも拘わらず、13℃以下の温度では、線維形成に伴う系のエントロピー変化は正である。この原因は、蛋白質自身のエントロピー（構造と並進）損失を補って余りある水のエントロピー利得に他ならない。系のエンタルピー変化も正であり、線維形成がエントロピー駆動であることを示している。しかし、温度が高くなると、系のエントロピー変化は負になってしまう。これは、繰り返し述べているように、定容過程で考えた場合の水の並進エントロピー利得の一部が水のエンタルピー利得に変換され、蛋白質自身のエントロピー損失を加えるとトータルとして負のエントロピー変化になっただけである。水分子の並進運動の制限を緩和させようとする効果が線維形成の重要な推進力になっていることには変わりはない。後藤らの実験結果は、線維形成が系の容積の減少を伴うことを示唆している（3. 5参照）。

最近、アミロイド線維形成は系の容積の増加を伴うという実験結果⁽¹⁰⁴⁾が報告された。この結果に基づくと、以下のように推察することができる：①線維形成に伴う系のエントロピー変化とエンタルピー変化の温度依存性は測定されていないが、後藤らの結果と逆になっているのではないか；②線維形成において、疎水性部位同士の接触や疎水性部位と親水性部位の接触よりも、親水性部位同士の接触が優位であるものと考えられる；③2. 5における議論から分かるように、蛋白質分子の会合によるエネルギー利得（蛋白質分子間のみに対するもの）がかなり大きいことを示唆している（ただし、エントロピー的排除容積効果も依然として重要な推進力であることを忘れてはならない）。しかしながら、線維形成の実験が、酸を添加した低 pH 条件下で行われていることが気になる。3. 7で詳しく述べたように、この

種の実験が「生理的条件下にある水溶液中における線維形成」を正しく模擬できていない可能性がある。生理的条件下にある水溶液中では、疎水性部位同士の接触が優先的である限り、線維形成は系の容積の減少を伴うと筆者らは考えている。ただし、高圧になると、水が剛体球的な振る舞いを示すようになり（3. 3および3. 8参照）、線維が崩れた方が系の容積はかえって減少する。表面が疎水性であるか親水性であるかに関係なく、表面近傍に水分子の高密度層が形成され、トータルの露出表面積が大きい状態ほど系の容積が小さくなるからである。水和自由エネルギーの観点から見ても、常圧下では露出表面積の小さい状態が、高圧下では露出表面積の大きい状態が好まれる。いずれにせよ、線維形成過程は溶媒条件に大きく影響されるので、ある特定の溶媒条件下で得られた実験結果を広く一般化して当てはめることは慎むべきである。「溶媒条件の影響」は複雑であり、今後の研究に待つところが大きい。（系の容積変化の正負に関係なく、排除容積は線維形成に伴って必ず減少することを再度強調したい。）

6. 生体内におけるその他の秩序化過程

6. 1. 蛋白質と生体膜を構成するリン脂質との特異的親和性

2. 1では、大粒子と平坦な表面との接触について考えたが、表面が曲率を持つ場合には、接触に伴う排除容積の減少量の大きさは、凹面（曲率大）>凹面（曲率小）>平面>凸面（曲率小）>凸面（曲率大）の順に従うことが簡単な考察から分かる⁽⁷⁾。

曲率が連続的に変化する表面と種々の大きさの複数の大粒子が共存している場合、表面の曲率と大粒子の大きさの間に高い選択性が生まれることも筆者の解析⁽⁷⁾で分かった。図24(a)に示すように表面が凸面の場合、より大きな大粒子ほど優先的に曲率のより小さい部位に接触する。図24(b)に示すように表面が凹面の場合、より大きな大粒子ほど優先的に曲率のより大きい部位に接触する。要するに、排除容積の減少量が最大になるように、それらの大粒子の接触の仕方が

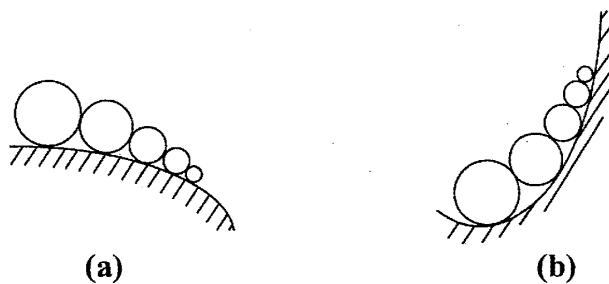


図24 (a) 大きさの異なる複数の大粒子と凸表面で形成される秩序構造。(b) 大きさの異なる複数の大粒子と凹表面で形成される秩序構造。小粒子は省略してある。

決まる。

表面を生体膜，大粒子を蛋白質，小粒子集団を水に対応させる。生体膜は複数種類のリン脂質で構成され，曲率が異なればリン脂質の局所組成も異なる。蛋白質は種類によって大きさが異なる。よって，表面の曲率と大粒子の大きさの間の高い選択性は，リン脂質と蛋白質の特異的会合と結びついてくる。（剛体壁の場合，大粒子はその表面に接触して安定化する。しかし，生体膜のように柔らかいもの場合には，大粒子がさらに中に埋め込まれる方が，小粒子にとっての排除容積は減少する。かつてある学会で，「小さなイオンさえ容易に通さない生体膜が，何故大きな蛋白質を中に取り込むのか不思議である」と講演者が述べているのを聞いたことがあるが，エントロピー的排除容積効果の観点から見れば少しも不思議ではない。）

6. 2. 生体高分子の動きを制御する？

小粒子集団中に表面と大粒子が共存する場合，表面の幾何学的形状に特徴を持たせることによって，表面－大粒子間に特異的なエントロピー力を作ることや，表面上で大粒子の動きを自由に操ることも可能である^(7,16)。図25に示すように，大粒子は，影をつけた排除空間の重なる部分の容積が増加する（小粒子集団の自由エネルギーが低下する）方向に動かされる傾向が生じる。大粒子をステップエッジではじいたり⁽¹⁶⁾，コーナーにしばらくトラップしておいたり，凸面から凹面に移行させたりすることができるであろう。

以上のような単純な系においてさえ，大粒子の挙動の高度な制御が実現できそうである。まして生体系では，小粒子集団（水）中の表面（生体膜）や大粒子（蛋白質分子）の形状はずっと複雑であり，非常に手の込んだ制御が可能になるものと考えられる。今後，どのような制御がいかなる目的で行われているかを具体的に解明することが課題である。

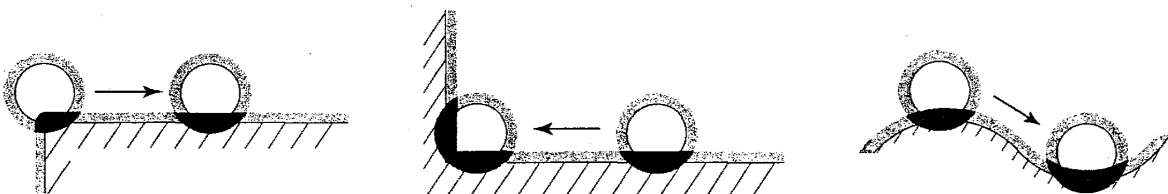


図25 表面の幾何学的形状を反映した大粒子の特徴的な動き。
小粒子は省略してある。

7. 塩や低分子の役割

7. 1. 塩の重要性

エントロピー相互作用を凌駕する可能性のある唯一の因子は静電相互作用である。例えば、同じ符号に強く荷電した部位間には強い静電反発力が働き、エントロピー力の作用を押さえ込んでしまう。しかし、塩を添加するとカウンターイオンによって静電反発力は遮蔽される。エントロピー相互作用が活躍できるのは、生体内に NaCl が存在するからであろう。同じ符号に強く荷電した部位間に対しても、NaCl 濃度が 0.1M 程度以上になると、エントロピー相互作用が前面に出ることを筆者らはモデル解析によって既に確認している⁽¹⁰⁵⁾ (生体内の NaCl 濃度は~0.15M)。

なお、筆者らは、蛋白質の溶解度や構造安定性に及ぼす塩効果に関する統計力学理論解析⁽¹⁰²⁾をも行った。「塩基性蛋白質の構造転移に及ぼすアニオン種の効果」および「DNA の構造 (B-Z) 転移に及ぼすカチオン種の効果」に対して知られている実験結果を定性的に説明することに成功した。塩濃度が高過ぎると、同じ符号に荷電した部位間に静電的な効果に起因する引力相互作用が働くことも示した (5. 3 とも関連している)。

7. 2. 中粒子の添加効果

筆者らの統計力学理論解析により、小粒子集団中に中粒子が微量共存するだけで、大粒子間に誘起されるエントロピー相互作用が大きな影響を受けることが分かった⁽¹⁰⁶⁾。しかも、中粒子の大きさや濃度によって、エントロピー相互作用の強さと及ぶ範囲が多様に変化する^(107,108)。中粒子は、水分子よりはずっと大きく、生体高分子よりは小さい低分子に該当する。この性質も、生体内で、生体高分子挙動の調節に使われている可能性がある。

この中粒子の影響に関連した実験結果の一例を紹介する。水に少量のトリフルオロエタノール (TFE) を加えると、アミロイド線維は安定化されるが、さらに加えると溶解することが知られている⁽¹⁰⁹⁾。蛋白質の天然構造の安定化に対しても、定性的に同様の結果が報告されている⁽¹¹⁰⁾。これらの一見矛盾した挙動も、大粒子間のエントロピー相互作用に及ぼす中粒子濃度の影響に注目した理論解析によって概ね説明できる (水が小粒子集団、蛋白質の部位または蛋白質自体が大粒子、TFE が中粒子に該当する)。

水と疎水性低分子が相関し合う結果として発現する興味深い現象を紹介しておく。生体系は拘束空間 (表面近傍や二表面間に挟まれた空間などを指す) の宝庫で

あり、その中の流体はバルク流体とは顕著に異なる挙動を呈する。極微量の疎水性低分子を含む水中に疎水性の表面が存在する場合を例にとると、表面近傍に疎水性低分子の高濃縮層（表面誘起層）が形成される。筆者らは、バルクの水溶液が単相として安定な条件下でも、2通りのサブマイクロスコピックスケールの相転移⁽¹¹¹⁻¹¹⁵⁾（表面誘起相転移:Thin-Thick Transition と Bridging Transition）が起こり、超長距離性の表面間引力が誘発され得ることを統計力学理論的に示した。生体系における表面誘起相転移の役割を具体的に解明することが今後の課題である。

8. おわりに

生体分子が起こす種々の自己組織化や秩序構造形成過程は、大幅なエントロピー損失を伴うように見える。しかし、その大部分は周囲の水のエントロピー利得（あるいはそれに起因する自由エネルギー利得）で補われる。系全体で考えると、必ずしもエントロピーは減少しないし、減少する場合でもそれを補償するために必要なエネルギー利得はずっと少なく済む。アミロイド線維形成⁽¹⁰³⁾や分子認識^(85,86)、ウイルスの会合⁽¹¹⁶⁾などの過程で、定圧過程でさえエンタルピー変化とエントロピー変化が共に正である（明確にエントロピー駆動である）という実測結果が数多く報告されている。自己組織化、秩序化、高選択性、規則性、対称性など、生体系の特徴を表すキーワードをもたらす因子は、意外にも水分子の並進運動であった。

生体分子の疎水基と親水基を区別するだけで水の効果を語ることは不十分である。水を格子モデルで扱ったり、連続体と見なしたりすれば、水分子の並進運動に起因するエントロピー効果を考慮することはできない。水は水素結合のおかげで、分子サイズが非常に小さいにもかかわらず、常温・常圧において高密度な液体として存在できる。換言すると、常温・常圧で高密度の液体として存在する物質の中で、水は最小の分子サイズを有する。エントロピー効果は、溶媒が水の場合に最大となる。このことが、生命の維持に水が不可欠であることの一つの理由である。無論、「水分子の並進運動に起因する効果」が全てではないが、従来の考え方にこれを導入すれば、生体系における種々の問題に対して新たな展開が期待できる。

手垢や油で汚れて表面が疎水性になった2個の1円玉を少し離して静かに水上に浮かべると、表面間距離の減少と共に単調に強くなる引力（キャピラリーフォースと呼ばれる）が作用し、2個の1円玉はくっつく。もう1個の1円玉を浮かべると、3個の1円玉の重心が正三角形になるようにくっつく。「1円玉自体が整然と並ぶ能

力を持っている」ように見えるが、実際にはそうではない。水が決定的に重要な役割を果たしており、むしろ水の方が主役である。整然と並ぶ能力の秘密を探るために、1円玉のみを徹底的に調べても（例えば、1円玉を取り出して表面分析をしても）何も分からない。

本稿で述べているように、生命現象に関する研究では、水を中心に考えた統計力学、熱力学および液体論が極めて強力な武器となり得る。残念なことに、このことは生物化学分野において十分に認識されていないように思われる。筆者らが書く論文では、いつも水が主役になっており、液体の統計力学理論に基づく解析結果や物理的な考察が纏められている。しかし、生物系の雑誌（雑誌名に“Biology”や“Bio-”が入っているもの）に論文を投稿してもリジェクトされることが多い。リジェクトされたものを無修正で化学物理系の雑誌に投稿し直すと、極めて高い評価を得てアクセプトされる。このような状況がいつまで続くのであろうか。

謝辞

本研究を実行する過程で、東京工業大学・原野雄一（2. 5, 3. 1-3. 8）、マックスプランク研究所・Roland Roth（3. 3, 3. 4, 3. 6）、九州大学・秋山良（2. 5, 7. 1, 7. 2）、京都大学・松林伸幸（2. 8）、立命館大学・今井隆志（3. 4）、横浜市立大学・池口満徳（3. 6）、理化学研究所・杉田有治（3. 6）、京都大学・吉留崇（3. 8）の各氏に、それぞれ括弧内の研究課題において協力していただいた。東京工業大学・櫻井実氏にはレセプターとリガンドの結合に関して、大正製薬株式会社・小田幸司氏には蛋白質立体構造予測に関して多くのご教示をいただいた。吉留崇氏には、本稿に対する多くの有益なコメントをいただいた。ここに深く感謝の意を表したい。

本研究の実行にあたっては、文部科学省の科学研究費補助金・特定領域研究「水と生体分子が織り成す生命現象の化学」(No.15076203) および最先端・高性能汎用スーパーコンピュータの開発利用プロジェクト「一次世代ナノ統合シミュレーションソフトウェアの研究開発 一次世代ナノ生体物質の援助」を得た。

参考文献

(1) S. Asakura and F. Oosawa, J. Chem. Phys. **22**, 1255 (1954).

(2) S. Asakura and F. Oosawa, J. Polymer Sci. **33**, 183 (1958).

*) 式(1)は以下のようにして導出できる。理想気体に対するエントロピーの表式

$$S = k_B N_S \ln(V/N_S) + C = S(V)$$

を小粒子集団に適用する。ただし、 k_B はボルツマン定数、 N_S は小粒子の総数、 V は小粒子が自由に動き回ることのできる空間の容積、 C は V に依存しない定数である。 $V \rightarrow V + \Delta V$ ($\Delta V/V \ll 1$) なる変化が起こった場合の小粒子集団のエントロピー変化は、

$$\Delta S = S(V + \Delta V) - S(V) \sim k_B N_S \Delta V/V$$

で与えられる。図 2 の影をつけた重なる部分の容積 ΔV を d_L と d_S ($d_L \gg d_S$) で表し、この式に代入すると、

$$\Delta F = -T \Delta S \sim -3 k_B T \eta_S (d_L/d_S), \quad \eta_S = \pi (N_S/V) d_S^3/6$$

が得られる。

(3) T. Biben, P. Bladon, and D. Frenkel, J. Phys.: Condens. Matter **8**, 10799 (1996).

(4) R. Dickman, P. Attard, and V. Simonian, J. Chem. Phys. **107**, 205 (1997).

(5) R. Roth, R. Evans, and S. Dietrich, Phys. Rev. E **62**, 5360 (2000).

(6) M. Kinoshita, J. Chem. Phys. **116**, 3493 (2002).

(7) M. Kinoshita, Chem. Eng. Sci. **61**, 2150 (2006).

*) 4. 1 で、鍵穴にぴったりはまる鍵の場合に障壁が低くなる理由は、この文献で詳しく説明されている。

**) 朝倉-大沢理論における「誤差の相殺」は、斥力成分と引力成分の両方が存在する場合 (図 5 に見られるような場合) に生じる。4. 1 で鍵が鍵穴にぴったりはまった状態では、引力成分しか存在しないため、朝倉-大沢理論は破綻する。詳細についてはこの文献を参照されたい。

(8) R. Roth and M. Kinoshita, J. Chem. Phys. **125**, 084910 (2006).

(9) J.-P. Hansen and I. R. McDonald, 1986, "Theory of Simple Liquids", 2nd Ed., Academic, London, UK.

(10) M. Kinoshita, J. Chem. Phys. **118**, 8969 (2003).

(11) A. P. Minton, Curr. Opin. Biotechnol. **8**, 65 (1997).

(12) R. J. Ellis and A. P. Minton, Nature **425**, 27 (2003).

- (13) M. Kinoshita, S. Iba, and M. Harada, *J. Chem. Phys.* **105**, 2487 (1996).
- (14) A. D. Dinsmore, A. G. Yodh, and D. J. Pine, *Phys. Rev. E* **52**, 4045 (1995).
- (15) P. D. Kaplan, J. L. Rouke, A. G. Yodh, and D. J. Pine, *Phys. Rev. Lett.* **72**, 582 (1994).
- (16) A. D. Dinsmore, A. G. Yodh, and D. J. Pine, *Nature* **383**, 239 (1996).
- (17) J. C. Crocker, J. A. Matteo, A. D. Dinsmore, and A. G. Yodh, *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4352 (1999).
- (18) M. Kinoshita, Y. Harano, and R. Akiyama, *J. Chem. Phys.* **125**, 244504 (2006).
- (19) L. Liu, C. Yang, and Q.-X. Guo, *Biophys. Chem.* **84**, 239 (2000).
- (20) R. Lumry and S. Rajender, *Biopolymers* **9**, 1125 (1970).
- (21) B. Lee, *Biophys. Chem.* **51**, 271 (1994).
- (22) K. Sharp, *Protein Sci.* **10**, 661 (2001).
- (23) M. Kinoshita, *Chem. Phys. Lett.* **387**, 47 (2004).
- *) 図8下段左の回転において障壁が存在しない理由は、この文献で詳しく説明されている。
- (24) 木下正弘・原野雄一, *生物物理*, **46** (No.4), 214 (2006).
- (25) Y. Rosenfeld, *Phys. Rev. Lett.* **63**, 980 (1989).
- (26) M. Kinoshita, *J. Sol. Chem.* **33**, 661 (2004).
- (27) M. Kinoshita, *J. Mol. Liq.* **119**, 47 (2005).
- *) 疎水性溶質分子近傍における水の構造化は、古典的に解釈されるほど強くはない。下記の文献に最新の結果が示されている。
- M. Kinoshita, "Molecular Origin of the Hydrophobic Effect: Analysis Using the Angle-Dependent Integral Equation Theory", *J. Chem. Phys.*, in press.
- (28) M. Kinoshita, N. Matubayasi, Y. Harano, and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.* **124**, 024512 (2006).
- (29) J. L. Finney and A. K. Soper, *Chem. Soc. Rev.* **23**, 1 (1994).
- (30) P. G. Kusalik and G. N. Patey, *J. Chem. Phys.* **88**, 7715 (1988).
- (31) P. G. Kusalik and G. N. Patey, *Mol. Phys.* **65**, 1105 (1988).
- (32) M. Kinoshita and M. Harada, *Mol. Phys.* **81**, 1473 (1994).
- (33) M. Kinoshita and D. R. Bérard, *J. Comput. Phys.* **124**, 230 (1996).
- (34) N. M. Cann and G. N. Patey, *J. Chem. Phys.* **106**, 8165 (1997).
- (35) D. R. Bérard, M. Kinoshita, N. M. Cann, and G. N. Patey, *J. Chem. Phys.* **107**, 4719 (1997).

- (36) F. Hirata and P. J. Rossky, *Chem. Phys. Lett.* **83**, 329 (1981).
- (37) J. S. Perkyns and B. M. Pettitt, *J. Chem. Phys.* **97**, 7656 (1992).
- (38) M. Kinoshita and F. Hirata, *J. Chem. Phys.* **104**, 8807 (1996).
- (39) K. Soda, *J. Phys. Soc. Jpn.* **62**, 1782 (1993).
- (40) M. Ikeguchi and J. Doi, *J. Chem. Phys.* **103**, 5011 (1995).
- (41) Y. Harano and M. Kinoshita, *Chem. Phys. Lett.* **399**, 342 (2004).
- (42) Y. Harano and M. Kinoshita, *Biophys. J.* **89**, 2701 (2005).
- (43) R. L. Baldwin, *J. Biol. Chem.* **278**, 17581 (2003).
- (44) Y. Snir and R. D. Kamien, *Science* **307**, 1067 (2005).
- (45) A. J. Doig and M. J. E. Sternberg, *Protein Sci.* **4**, 2247 (1995).
- (46) P. M. König, R. Roth, and K. R. Mecke, *Phys. Rev. Lett.* **93**, 160601 (2004).
- (47) R. Roth, Y. Harano, and M. Kinoshita, *Phys. Rev. Lett.* **97**, 078101 (2006).
- (48) H. J. C. Berendsen, J. R. Grigera, and T. P. Straatsma, *J. Phys. Chem.* **91**, 6269 (1987).
- (49) Y. Harano, T. Yoshidome, and M. Kinoshita, "Molecular Mechanism of Pressure Denaturation of Proteins", *J. Chem. Phys.*, to be published.
- (50) T. Imai, Y. Harano, M. Kinoshita, A. Kovalenko, and F. Hirata, *J. Chem. Phys.* **126**, 225102 (2007).
- (51) T. Imai, Y. Harano, M. Kinoshita, A. Kovalenko, and F. Hirata, *J. Chem. Phys.* **125**, 024911 (2006).
- (52) Y. Harano, R. Roth, and M. Kinoshita, *Chem. Phys. Lett.* **432**, 275 (2006).
- (53) M. Kinoshita and Y. Harano, "Characterization of Models and Theories of Solvation Using the Morphometric Approach", *J. Chem. Phys.*, to be published.
- (54) G. I. Makhatadze and P. L. Privalov, *Protein Sci.* **5**, 507 (1996).
- (55) P. L. Privalov and N. N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* **86**, 665 (1974).
- (56) G. I. Makhatadze and P. L. Privalov, *J. Mol. Biol.* **232**, 639 (1993).
- (57) P. L. Privalov and G. I. Makhatadze, *J. Mol. Biol.* **232**, 660 (1993).
- *) 蛋白質の折り畳みに伴うエンタルピー変化の温度微分は、定圧比熱の変化に他ならない。エンタルピー変化が温度上昇と共に減少することは、折り畳みに伴う定圧比熱の変化が負である（変性に伴う定圧比熱の変化が正である）という実験結果と矛盾しない。
- (58) N. Baden, S. Hirota, T. Takabe, N. Funasaki, and M. Terazima, "Thermodynamical Properties of Reaction Intermediates during Apoplastocyanin Folding in

Time-Domain,” *J. Chem. Phys.* **127**, 175103 (2007).

*) 実験結果によると, Apoplastocyaninの折り畳みに伴う系の容積変化は例外的に小さい。よって, 定圧過程でも, 水分子の並進運動に起因する水のエントロピー利得はほとんどそのままの形で保持される。最近, 折り畳みに伴う系の熱力学量の変化の実験値が, 筆者らの理論計算値と定量的に良く一致することを確認した (論文投稿準備中)。

(59) T. Yoda, Y. Sugita, Y. Okamoto, *Chem. Phys. Lett.* **386**, 460 (2004).

(60) Y. Harano, R. Roth, Y. Sugita, M. Ikeguchi, and M. Kinoshita, *Chem. Phys. Lett.* **437**, 112 (2007).

*) 自由エネルギー関数中のエントロピー項の計算は通常は大変であるが, 形態熱力学の適用によって計算時間が大幅に短縮されたので, 候補構造の数 (多ければ多いほど, 天然構造が含まれる確率も高くなる) は相当多くても許される。このことは極めて大きな利点である。

**) この論文で対象とした蛋白質は, vitamin-B-dependent calcium binding protein (3icb), amino terminal domain of 434 repressor (1r69), 434 Cro protein (2cro), C-terminal domain of ribosomal protein (1ctf), scorpion neurotoxin (1sn3), trypsin inhibitor (4pti), rubredoxin (4rxn)の7種類であり, それらの天然構造は, α -ヘリックスや β -シートを持つバラエティーに富んだものである。アミノ酸残基数は54-76である。各デコイセットは, 627-687通りの構造から成る。

(61) S. F. Sneddon, D. J. Tobias, and C. L. Brooks III, *J. Mol. Biol.* **209**, 817 (1989).

(62) I. M. Klotz and S. B. Farnham, *Biochemistry* **7**, 3879 (1968).

(63) B. Park and M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **258**, 367 (1996).

(64) J. G. Kirkwood and F. P. Buff, *J. Chem. Phys.* **19**, 774 (1951).

(65) Y. Harano and M. Kinoshita, *J. Phys.: Condens. Matter* **18**, L107 (2006).

(66) Y. Harano and M. Kinoshita, *J. Chem. Phys.* **125**, 024910 (2006).

(67) K. Kuwamoto and M. Kinoshita, *Mol. Phys.* **98**, 725 (2000).

(68) M. L. Connolly, *J. Appl. Crystallog.* **16**, 548 (1983).

(69) C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta, Prot. Struct. Mol. Enzymol.* **1595**, 201 (2002).

(70) G. Panick, G. J. A. Vidugiris, R. Malessa, G. Rapp, R. Winter, and C. A. Royer, *Biochemistry* **38**, 4157 (1999).

(71) J. Woenckhaus, R. Kohling, P. Thiyagarajan, K. C. Litterell, S. Seifert, C. A. Royer, and R. Winter, *Biophys. J.* **80**, 1518 (2001).

(72) G. S. Chryssomallis, P. M. Torgerson, H. G. Drickamer, and G. Weber, *Biochemistry*

20, 3955 (1981).

(73) C. Clery, F. Renault, and P. Masson, FEBS Lett. **370**, 212 (1995).

(74) A. Paliwal, D. Asthagiri, D. P. Bossev, and M. E. Paulaitis, Biophys. J. **87**, 3479 (2004).

(75) G. Hummer, S. Garde, A. E. García, M. E. Paulaitis, and L. R. Pratt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 1552 (1998).

(76) A. C. Oliveira, L. P. Gaspar, A. T. Da Poian, and J. L. Silva, J. Mol. Biol. **240**, 184 (1994).

(77) D. Paschek and A. E. García, Phys. Rev. Lett. **93**, 38105 (2004).

(78) W. W. Wood and J. D. Jacobson, J. Chem. Phys. **27**, 1207 (1957).

(79) B. J. Alder and T. E. Wainwright, J. Chem. Phys. **27**, 1208 (1957).

*) Alder 転移に対しては、未だに物理的に満足の行く解釈は与えられていない。筆者は、個人的に次のように考えている。剛体球系の充填率があまりにも高くなると一部が結晶化するのは、結晶化した剛体球の並進運動はより制限されるものの、他の剛体球の並進運動の制限が大きく緩和され、全体が流動相である場合よりもエントロピーが高くなるからである。ただし、結晶相中の剛体球も、狭い空間内を運動することができる。充填率がさらに高くなると、ついには、流動相中の剛体球が受ける運動の制限の方が結晶相中の剛体球が受けるそれよりも大きくなってしまふ：各々の剛体球が勝手気ままに運動しようとする場合よりも、規則的に並んで自らの「格子点」の近傍で運動した方が、全体として運動の制限はかえって少し緩和される。このような状況下では、すべてが結晶化する。

(80) P. N. Pusey and W. van Meegen, Nature **320**, 340 (1986).

*) 「Alder 転移は計算機シミュレーションの Artifact である」と考えている研究者も見受けられる。しかし、この文献では、Alder 転移の実験的検証が報告されている。

(81) P. L. Privalov, Y. V. Griko, S. Y. Venyaminov, J. Mol. Biol. **190**, 487 (1986).

(82) A. Pastore, S. R. Martin, A. Politou, K. C. Kondapalli, T. Stemmler, and P. A. Temussi, J. Am. Chem. Soc. **129**, 5374 (2007).

(83) J. Fitter, Biophys. J. **84**, 3924 (2003).

(84) M. Kinoshita and T. Oguni, Chem. Phys. Lett. **351**, 79 (2002).

(85) H. Ohtaka, A. Schön, and E. Freire, Biochemistry **42**, 13659 (2003).

(86) W. E. Stites, Chem. Rev. **97**, 1233 (1997).

- (87) M. López de la Paz, K. Goldie, J. Zurdo, E. Lacroix, C. M. Dobson, A. Hoenger, and L. Serrano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16052 (2002).
- (88) R. Tycko, *Biochemistry* **42**, 3151 (2003).
- (89) C. Goldsbury, J. Kistler, U. Aebi, T. Arvinte, and G. J. S. Cooper; *J. Mol. Biol.* **285**, 33-39 (1999).
- (90) M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, and C. C. F. Blake, *J. Mol. Biol.* **273**, 729 (1997).
- (91) K. Hasegawa, I. Yamaguchi, S. Omata, F. Gejyo, and H. Naiki, *Biochemistry* **38**, 15514 (1999).
- (92) L. C. Serpell, M. Sunde, M. D. Benson, G. A. Tennent, M. B. Pepys, and P. E. Fraser, *J. Mol. Biol.* **300**, 1033 (2000).
- (93) L. Nielsen, R. Khurana, A. Coats, S. Frokjaer, J. Brange, S. Vyas, V. N. Uversky, and A. L. Fink, *Biochemistry* **40**, 6036 (2001).
- (94) J. Goers, S. E. Permyakov, E. A. Permyakov, V. N. Uversky, and A. L. Fink, *Biochemistry* **41**, 12546 (2002).
- (95) D.-P. Hong, M. Gozu, K. Hasegawa, H. Naiki, and Y. Goto, *J. Biol. Chem.* **277**, 21554 (2002).
- (96) M. Hoshino, H. Katou, Y. Hagihara, K. Hasegawa, H. Naiki, and Y. Goto, *Nature Struc. Biol.* **9**, 332 (2002).
- (97) T. Ban, D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki, and Y. Goto, *J. Biol. Chem.* **278**, 16462 (2003).
- (98) M. Kinoshita, *Chem. Phys. Lett.* **387**, 54 (2004).
- (99) M. Kinoshita, "A Physical Picture of the Amyloid Fibril Formation", Proceedings of the 10th APCCChE (Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering) Congress, Kitakyushu International Conference Center, Japan, October 17-21, 2004, 1P-07-054.
- (100) 木下正弘・後藤祐児, *現代化学*, **4** (No.409), 27 (2005).
- (101) B. Raman, E. Chatani, M. Kihara, T. Ban, M. Sakai, K. Hasegawa, H. Naiki, Ch. M. Rao, and Y. Goto, *Biochemistry* **44**, 1288 (2005).
- (102) M. Kinoshita and Y. Harano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **78**, 1431 (2005).
- (103) J. Kardos, K. Yamamoto, K. Hasegawa, H. Naiki, and Y. Goto, *J. Biol. Chem.* **279**, 55308 (2004).
- (104) K. Akasaka, A. R. Abdul Latif, A. Nakamura, K. Matsuo, H. Tachibana, and K. Gekko, "Amyloid Protofibril is Highly Voluminous and Compressible",

- Biochemistry **46**, 10444 (2007).
- (105) R. Akiyama, N. Fujino, K. Kaneda, and M. Kinoshita, "Interaction between Like-Charged Colloidal Particles in Aqueous Solution: Attractive Component Arising from Solvent Granularity", *Condens. Matter Phys.*, to be published.
- (106) M. Kinoshita, *Chem. Phys. Lett.* **353**, 259 (2002).
- (107) R. Akiyama, Y. Karino, Y. Hagiwara, and M. Kinoshita, *J. Phys. Soc. Jpn.* **75**, 064804 (2006).
- (108) 秋山良・狩野康人・木下正弘, 熱測定, **33** (No.3), 104 (2006).
- (109) N. Hirota-Nakaoka, K. Hasegawa, H. Naiki, and Y. Goto, *J. Biochem.* **134**, 159 (2003).
- (110) N. Youhnovski, I. Matecko, M. Samalikova, and R. Grandri, *J. Mass Spectrom.* **11**, 519 (2005).
- (111) M. Kinoshita, *Mol. Phys.* **94**, 485 (1998).
- (112) 木下正弘, 表面, **36** (No.6), 304 (1998).
- (113) M. Kinoshita, *Chem. Phys. Lett.* **325**, 281 (2000).
- (114) M. Kinoshita, *Chem. Phys. Lett.* **326**, 551 (2000).
- (115) M. Kinoshita, "Surface-Induced Phase Transition and Long-Range Surface Force: Roles in Colloidal and Biological Systems", in *"Recent Research Developments in Molecular Physics"*, Transworld Research Network, India, ISBN: 81-7895-113-4, Vol. 1 - 2003, pp. 21-41.
- (116) C. F. S. Bonafe, C. M. R. Vital, R. C. B. Telles, M. C. Gonçalves, M. S. A. Matsuura, F. B. T. Pessine, D. R. C. Freitas, and J. Vega, *Biochemistry* **37**, 11097-11105 (1998).