岡山理科大学紀要 第51号 A pp. 31-40(2015)

界面活性剤の逆ミセル中におけるタンパク質の構造

―逆ミセルに可溶化した水（water poor）の異常性―

竹田　邦雄・森山　佳子

岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科

（2015年９月28日受付、2015年11月９日受理）

1 界面

「コロイド・界面化学（Colloid and Interface Chemistry）」という分野が化学にある。“界面”とは、物質の3態、固体、液体、気体の接する面を指し、界面には固体同士、液体同士、固体と液体の間、固体と気体の間、液体と気体の間の5種類がある。コップに入れた水の表面は、液体と気体（空気）の気－液界面の一例である。一方、“コロイド”という単語は、19世紀半ばに生まれたようで、普通の濾紙の穴は通過するが半透膜の穴は通過しない程度の大きさで、普通の分子やイオンほど小さくはないサイズやそのサイズのものを指して使われて来ている。今やナノ粒子（1nm=10^{-9}m）という単語が日常的に使われているが、この“コロイド”がまさにナノサイズであった。

さて、1cm四角のサイコロは、体積は1cm^{3}で、表面積は6cm^{2}である。このサイコロを小さくきざんで1辺が1マイクロメートル（1μm=10^{-6}m）の小さなサイコロにすると、総体積は依然1cm^{3}であるが、総表面積は6m^2（3.7畳）になる。このサイコロをさらに小さくきざんで、1辺が10nmや1nmの小さなサイコロにすると、総体積は依然1cm^{3}であるが、総表面積は600m^2（370畳）や6000m^2（3700畳）にもなる。小さい粒子というのは、総体積あるいは総質量は大きくないのに、その総表面積はとてつもなく広くなり、その粒子の内部より粒子の表面（すなわち界面）がその粒子を含む溶液の性質を決める。そんな事情で、コロイドという概念と界面という概念には密接な関係があり、コロイド・界面化学という分野が生まれたようである。触媒などは、ある物質の表面でその触媒機能を発揮することが多いので、どれだけそういう物質を小さな粒子にして界面を拡げるかは重要な意味をもつ。ナノサイエンス、ナノテクノロジーはもとより、機能材料、環境化学、生化学、薬学、農学の分野でもナノサイズの物質を扱い、それらの多くは“コロイド”状であり、それらの“界面”は重要な役割を果たしているはずであるが、これらの分野で“コロイド”や“界面”の単語はほとんど使われていない。“コロイド”は、分子やイオンでもないが、それらの結晶とも違い、その実態は20世紀後半までベールに包まれていたと思う。タンパク質も20世紀に入っても長い間ある種類のコロイド粒子として扱われていたようである。しかし、この数10年で“コロイド”を覆っていたベールはかなりの程度はがされ、その実態が明らかになって来た。同時に、“コロイド”状物質の中身や“界面”の状態もある程度明らかにされて来ている。

拙稿の中心になる界面活性剤は、多くの“界面”で吸着などユニークな挙動をする。また、界面活性剤はミセルというナノサイズの会合体を形成し、油と水の“界面”を広大に作ることもできる。今回、界面活性剤が油の中で微量の水を含んで作る“逆ミセル”の油－水界面における水側のnmの世界を中心に述べる。

2 界面活性剤の逆ミセル

界面活性剤は、親水的な親水基と親油的な疎水基をもつ。したがって、界面活性剤の親水的な性質が強ければ水によく溶け、親油的な性質が強ければ油によく溶ける。家庭で使われる石けんのような界面活性剤は、水に溶かして使うので親水性の方が強い界面活性剤である。水に溶けた親水性の強い界面活性剤は、疎水基を水との接触を避けるために内側に、親水基を外側に向けた球状のミセルを作る（図1(A)）。通常ミセルとして知られているのは、このタイプである。これと逆に、やや疎水性の方が強い界面活性剤は、油のような非極性溶媒の中で、この溶媒を嫌う親水基を内側に親油性の疎水基を外側にした会合体を形成する(図1(B))。これを“逆ミセル”と言う[1-6]。

逆ミセルの内側の親水基の集まっている場所は少量の水を含むことができ、この水部分をwater poolと呼ぶ。一般的に、water poolの水は界面活性剤の親水基周辺（water poolの外側）の“固定水”とwater poolの中央部分の“自由水”に分けて考えられている[1-6]。多くの研究者が、逆ミセルの作成に疎水基を2本もつ界面活性剤sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate（AOT）を使用している（図2(A)）。このAOTは、疎水

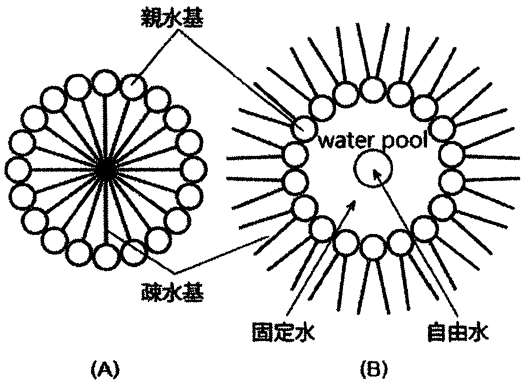

図1　ミセル(A)と逆ミセル(B)
界面活性剤の親水基を白丸で、疎水基を棒で示す。

基を2本もち疎水性で非水系によく溶けるが、親水基が$-SO_3^-$でマイナスの荷電をもつため水にもそれなりに溶けるイオン性界面活性剤である。図1(B)には、AOTの逆ミセルを想定して疎水基が2本描かれている。

そもそも水溶液の溶媒である水H_2Oは、そのH-O-Hの結合角度が104.5度で、結合の性質からH_2OのOはごく微量のマイナス電荷を、2つのHはごく微量のプラス電荷をもつ。このように水分子自身は弱いながらも電荷を帯び、Oの微量のマイナス電荷は特定の2方向に向き、2つのHと共に1つの水分子は微量の電荷を4方向に働かせている。水は、このように生まれつき電気双極子をもち、極性溶媒である。水の固体である氷は、1つの水分子がH-O-H のHとOの微量の電荷を4方向に働かせてまわりの4つの水分子と水素結合(弱い電気的な相互作用)で繋がった規則的な構造をしている。液体状態の水は、その分子がばらばらになっているようであるが、実際は動き回りながらたまたま近くに来た水分子と瞬間的な水素結合をしている。それが液体の水の個性である。この液体の水にものが溶けるということは、水の個性とうまく付き合えるということである。

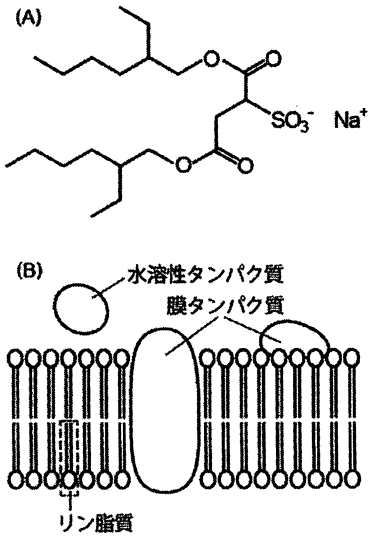

図2　AOTの構造(A)と細胞膜(B)
AOTも細胞膜を作るリン脂質も2本の疎水基を、どちらの親水基もマイナスの電荷をもつ。

AOTが逆ミセルを作ると、その親水基のマイナスの電荷とその周囲にあるH_2O のHの微量のプラス電荷とが作用し、付き合っている。したがって、界面活性剤の親水基周辺の水はこのような荷電の影響を受け、周囲を水だけに囲まれている水分子のように自由に動けないという意味で“固定水”と呼ばれている。“自由水”の方は、界面活性剤の親水基の電荷の影響を受けない距離にあると考えられ、そう呼ばれている。しかし、界面活性剤の親水基の荷電の影響が消えるほどwater poolは大きくはなく、著者らはwater poolの水は、後述するように、やはり全体が“異常水”のままだと思う[7,8]。

この逆ミセルについての研究も多い。図2(B)に、細胞膜の断面の略図を示す。細胞は、AOTと同じように親水基が負に帯電し、疎水基を2本もつ界面活性剤の1種のリン脂質が形成する二重膜、つまり細胞膜で囲まれている。この二重膜は、逆ミセルの外側の疎水基のまわりにもう1列疎水基が並び、外側に並んだ界面活性剤の親水基は逆ミセルの内側と同じように水と付き合うようになっている。したがって、二重膜の両サイドは水溶性である。細胞膜に存在するタンパク質を膜タンパク質と呼び、膜タンパク質によってはその疎水性部分は膜の中に入り、親水性部分は膜の外に出ている。細胞膜の外である細胞内は水溶液で、細胞膜の外に出ているタンパク質の親水性部分は、水とうまく付き合って水和(後述)している。後述するように、水溶性のタンパク質や酵素は細胞膜の近傍に存在し、“自由水”よりもむしろ“固定水”に近い性質の水に溶けていると考えられる。このような事情で、AOTのような界面活性剤の逆ミセルの内側を擬似細胞内と想定した研究は多くされて来ている[3,9]。

3 ミセルの触媒機能

ミセルの触媒機能については既に1975年に“ミセル触媒“の成書[10] が出ているほど研究されている。そもそも、反応は反応するもの同士が接触・衝突することによって起こる。そういう反応場を、通常のミセル(図1(A))と逆ミセル(図1(B))どちらの表面近傍も提供できる。ミセルが触媒機能をもつことについてもっとも分かりやすいのは、反応物同士が一方は水溶性、もう1つは疎水性の場合であろう。疎水性の反応物は、通常のミセルの場合は内側の疎水性部分に濃縮して存在し、逆ミセルの場合ミセル外の非極性溶媒中に溶けている。一方、親水性の反応物は、通常のミセルの場合

も逆ミセルの場合も、その反応物のイオン性の反対の荷電をもつ親水基の界面活性剤が作るミセルの親水性側表面の周辺に濃縮して存在する。水溶性の反応物と疎水性の反応物はいずれのミセルの表面近傍でも濃縮され、それらの接触・衝突の頻度は上がる。また、いずれの場合も、溶媒にとけている反応物は、ミセルの表面近傍での反応の進行に伴ってその近傍の濃度が下がれば自然と表面近傍に補給される。反応物同士が共に水溶性、または疎水性でも、反応によっては、ミセルが反応場を提供し、触媒の役目をしていることがある。どちらのミセルの場合も、界面活性剤の親水基が作る電荷密度の高い表面や疎水基の作る疎水的環境が反応物を濃縮させる効果を生んでいる。水溶性反応物同士でも、一方がやや疎水性である場合、反応物は通常のミセルの親水基に近い疎水性部分に可溶化され、そのため反応物同士の接触・衝突の頻度が上がり反応が促進される場合もある。

通常のミセルも逆ミセルも、直径は数nmのコロイドサイズである。どちらの型のミセルも、小さな試験管の中でも畳の数100枚、数1000枚の広さの反応場を提供して、反応物同士が接触・衝突できるように触媒機能を発揮しているに違いない。

4 逆ミセルの大きさ

図3に、著者らが動的光散乱法（DLS）によって測定したイソオクタン中のAOTの逆ミセルの直径を示す[7,8]。この測定法では、対象物を球体とみなして、そのサイズを評価する。できる限り水分を除いたAOT単独と思われる逆ミセルの直径は2.5nmである。この直径は、AOTの分子径1.2nm[11]の約2倍で、AOTがナトリウムイオンを解離した状態のこの界面活性剤イオンが親水基を内側に疎水基を外側に球状の逆ミセルを形成しているとしたら妥当な値である。ちなみに、AOTと同じように親水基が負に荷電している代表的陰イオン性界面活性剤sodium dodecyl sulfate (SDS) が水の中で作るミセルの直径は3.2nmで、dodecyl sulfateイオンの長さの大体2倍である。どちらのタイプのミセルも、界面活性剤イオンが図1に描かれているように伸びきった状態で形成していると思われる。

逆ミセルのサイズは、その中に水を含ませることによって大きくすることができる。AOT逆ミセルの水含量は、水のモル濃度のAOTのモル濃度に対する割合（W_0 (=[H_2O]/[AOT]））で表す。図3は、AOT逆ミセルの直径のこのW_0への依存性を示している[7,8]。水を含む逆ミセルは上述のwater poorをもち、水含量が増えると逆ミセル全体の直径（○）が大きくなる。water poorは、逆ミセルを作る界面活性剤部分の外周の厚さ相当の2.5nm（無水の逆ミセルの直径相当）を差し引いた大

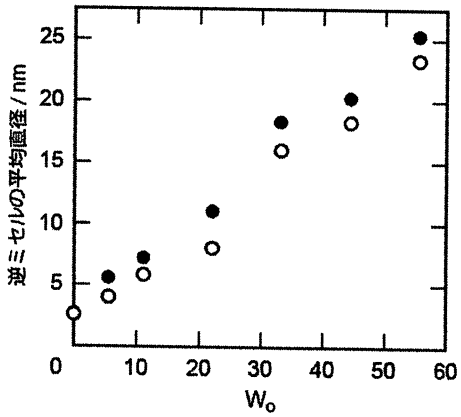

図3　AOTの逆ミセルの平均直径のW_0依存性
○：空の逆ミセル、●：BSAを含む逆ミセル

きさだろう。このwater poorの大きさはあまりにも小さく、そこの水は以下で述べるように普通の水とはいろいろ違うことになる。

5 逆ミセル中の水の異常性

逆ミセル中のwater poolの水は界面活性剤の親水基周辺の“固定水”と中央部分の“自由水”とに一般に分けられると先に紹介した(図1 (B))。ここで言う“固定水”と“自由水”は、実際は1リットルのビーカーの中の水にも存在する。ただ、ビーカーの中では、“固定水”に比べ“自由水”と呼ぶ概念の水が圧倒的に多く、“固定水”の存在が問題にならないだけである。このような場合の“自由水”を“バルク水”とか呼ぶ。これに対し、逆ミセルのwater poolの場合、直径数nmの世界の話である。このnmの世界の水溶液の特徴を図4(A)に示す。この図は、NaClを溶かした水溶液がAOTの逆ミセルのマイナスの荷電をもつ内側の壁面に接している状態を想定している。NaClは水の中では解離してNa^+イオンとCl^-イオンになっている（図中では、それぞれ＋、－で示す）。Na^+イオンとCl^-イオンが水に溶けたとき、水分子の極性のため、Na^+の周囲にはH_2OのOの方が、Cl^-の周囲にはH_2OのHの方が電気的に相互作用し、先の逆ミセルの“固定水”をもつような状態になっている。この“固定水”の状態は、イオンのまわりに水1層だけではなく、2層目3層目と1層目よりイオンとの相互作用は弱くはなるが、多層に及ぶ。このような状態のイオンを水和イオンと呼び、水の方は水和水と呼ぶ。Na^+、Cl^-のイオン自身は小さいが、これらの水和イオンの大きさは0.3～0.4nmである。ちなみに、pHで表される水素イオンH^+の水和状態はこれらの約3倍も大きい。これは、H^+がもっとも小さいイオンであるにも関わらずNa^+などと同じようにプラス1荷の電気量をもち、H^+自身の表面積あたりの電荷密度が大きく

なるためである。これは、表面電荷の強さ（電位）が周囲の水に著しく影響することの証でもある。1リットルのビーカーの中のNaCl水溶液のバルクの部分では、Na^+、Cl^-の水和イオンは同数ランダムに存在し（図4(A)の右端）、プラスとマイナスの電気的バランスもとれている。多くの水溶液の場合、すべてこのような電気的中性の条件を満たしていると考えて問題ない。

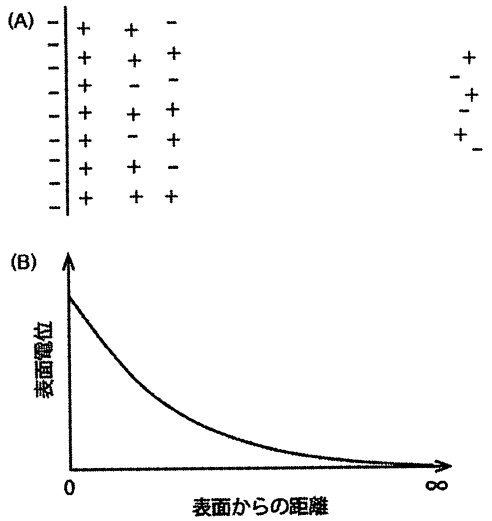

図4　界面の表面電位の周囲のイオンへの影響(A)と電位の距離に伴う減衰の様子(B)
＋：Na^+イオン、－：Cl^-イオン

しかし、数nmの世界の水溶液の場合、この電気的バランスが電位をもつ界面近傍では極端に崩れることを図4(A)には描いている。マイナスの電荷をもっている壁面のすぐ傍の第1層目にはプラス電荷をもつNa^+の水和イオンばかりが集まって来る。第2層目には、第1層目ほどではないにしても、Na^+の水和イオンが圧倒的に集まる（図4(A)）。順次、Na^+の水和イオンの優勢さは減って行くが、壁面の電位の影響する距離は、nmの世界ではとても長い（図4(B)）。NaCl水溶液の例で言えば、図4のような壁面の電位の影響が約37%まで減衰する距離（無くなる距離ではない）は、NaCl濃度が0.1Mのとき0.96nm、0.01Mのとき3.0nm、0.001Mのとき9.6nmと言われている。この距離はNaCl濃度が高いほど明確に短くなり、それだけ壁面の電位は周囲に影響し、壁面の電位を電気的に中和するためにその反対電荷をもつイオンが引き付けられていることの証でもある。壁面の電位の影響が全く無くなり、Na^+、Cl^-の水和イオンが同数ランダムに存在して電気的バランスがとれる距離はもっと長い。また、先のH^+とNa^+の水和イオンの大きさが違うのは、表面電荷密度が高い前者の表面電位の方が高く、多くの水分子を引き付けているからである。図4の(A)も(B)も、電位をもつ平たい面の話であるが、水溶液中のイオンの電位も、面というより点として周囲に影響し、反対荷電をもつイオンが周囲にあればそれと相互作用する。ただ、普通の電解質の水溶液の濃度では、あるイオンもその反対荷電をもつイオンもバルク水の中を水和イオンの状態で動き回りながら瞬間的に静電的相互作用をするだけで、結合することはない。例外的に、反応することによって沈殿するようなイオン同士の場合などは、相互作用が強く働き両方のイオンの水和水を壊して、結合する。

図4(A)ではイオンは平たい界面の電荷の影響を受けているが、water poor中の水やイオンは、逆ミセルを作る界面活性剤の親水基が球状に囲む周囲全体（図1(B)）からその中心に向かって電荷の影響を受けることになる。まだ誰も注目していないようであるが、球状の面をもつ凸レンズが集光するように、逆ミセルのwater poor中では壁面からの距離によっては電荷の影響が壁面近辺より強くなる可能性もあるのではないかと思われる。これが、著者らがnmサイズの逆ミセル中に親水基の電荷の影響が消滅する距離はありえず、“自由水”はないと考える理由の1つでもある。したがって、何らかの電解質を含むwater poor内のイオンの電気的バランスは崩れたままではなかろうか。また、water poor内で水和イオンを作っているはずの水和水の状態も普通の水とは当然違っていると思われる。特に小さいAOTの逆ミセル中の水分子は、AOTの親水基やこの界面活性剤の対イオンに当たるNa^+イオンの水和水として強く束縛され、その並進や回転の運動も制限され[12]、その内壁近辺の粘度も高くなる[1]という報告がある。pH7.0の緩衝溶液が逆ミセルのwater poor中ではpH8.3になるという報告もある[13]。ただ、これはpHが変化するというより、緩衝溶液に使う塩のpK_a値が逆ミセルのwater poorの水の異常性のために変わるためと考えた方がいいかもしれない。また、逆ミセルの水の融点は-30℃以下になるとの報告もあり[14]、water poorの中の水の瞬間的水素結合の在り様も通常の水とは異質なものになっているに違いない。普通の水も個性豊かな液体で特有な挙動をしているが、逆ミセルのwater poorの水は、普通の水とはかけ離れた挙動をしているに違いない。

6　高分子電解質としてのタンパク質

逆ミセルの中にタンパク質を入れる場合、タンパク質の大きさだけでなくその電解質としての性質も大いに関係する。タンパク質は、DNAに保存されているルールにしたがって20種類のアミノ酸がどういう順番で何個並ぶかによって、その種類の多様性を可能にしている。タンパク質のある種のものが酵素で、酵素もタンパク質である。多くのタンパク質は大体数100個のアミ

ノ酸が繋がったものであるが、アミノ酸は水に溶け易いものも水に溶けにくいものもあり、タンパク質もそれを構成するアミノ酸の組み合わせによって水に溶け易いものも水に溶けにくいものもある。水溶性のタンパク質は、水に溶けにくいアミノ酸をほとんど水に接しないようにタンパク質内部にたたみ込み、水に溶け易いアミノ酸を水に接するタンパク質表面の方にうまく並べるように折りたたまれている（タンパク質の三次構造）。ある意味、界面活性剤が疎水基を内側に形成する普通のミセルと似ている。タンパク質表面に並ぶ水に溶け易いアミノ酸は、一部が電荷を帯びている。したがって、水に溶けるようなタンパク質は、その分子表面にプラスとマイナスの電気を帯びた高分子の電解質と見ることもできる。逆ミセルを形成する界面活性剤の親水基が“固定水”をもつのと同様、タンパク質の表面電荷も“固定水”を当然もつ。タンパク質の場合、そういう水をタンパク質の“水和水”と呼ぶ。

水溶性タンパク質は、このように極性側鎖をもつアミノ酸残基がその表面に出ていることによって、水に可溶になっている。そういう水溶性タンパク質表面に出ているリジン（Lys）のようなプラス荷電をもっているアミノ酸残基に、水溶液状態のAOTのような陰イオン性界面活性剤の親水基が真っ先に静電的に結合する。続いて、既に親水基でタンパク質のアミノ酸残基に結合している界面活性剤の疎水基の周囲に別の界面活性剤が疎水的に結合する。タンパク質が構造変化を起こし、疎水性アミノ酸残基が表面に出てくれば、そこにも界面活性剤が結合する。タンパク質に結合する界面活性剤の大部分は、この後半の疎水性相互作用の協同的結合によるものである[15-21]。AOTのようなイオン性界面活性剤は、水系である濃度以上になるとタンパク質のポリペプチド鎖の周囲でミセル状の会合体を形成し、その球状の会合体はそれぞれ独自の曲率半径を当然もつ。イオン性界面活性剤のミセル状の会合体は、親水基が同じ電荷をもつため相互に静電的に反発もする。そういう会合体は、それを形成するイオン性界面活性剤のごく一部の親水基の静電的結合によってタンパク質のポリペプチド鎖に強く繋がっている。そのため、一定の曲率をもち、静電的に反発もし合うミセル状の会合体の形成は、タンパク質本来の三次元的形態の合理性を崩し、その構造変化を誘引すると考えられる。非イオン性界面活性剤の場合、同様の会合体を形成してもタンパク質の極性側鎖をもつアミノ酸残基に対しての静電的相互作用があまりにも弱いため、タンパク質の構造は変化せず、マイルドな界面活性剤と呼ばれていると著者らは考えている。このように水溶液中で界面活性剤の親水基がタンパク質と静電的相互作用をするか否かは重要である。

イオン性界面活性剤の水溶液中で、ヘリックス含量の多いタンパク質ではその構造が一部壊れ、ヘリックス含量の少ないタンパク質ではその構造を新たに形成するような二次構造変化をする[15-21]。AOTと同じように親水基が負に荷電している代表的陰イオン性界面活性剤のSDS溶液中における種々のタンパク質のヘリックス構造の増減とタンパク質を構成するLys残基の組成比が興味ある関係を示す[15]。タンパク質の全残基数に対するLys残基の組成比が大体8%を超えるとヘリックス構造はSDSによって壊されるようになり、その組成比が大きくなるほどさらに壊されやすくなる傾向がある。これは、疎水性相互作用によるタンパク質への結合に比べ、静電的相互作用で結合する量は圧倒的に少ないにも関わらず、界面活性剤とタンパク質との間のこの静電的相互作用がタンパク質の構造変化に重大な効果を発揮することを示している。界面活性剤の親水基とタンパク質との静電的相互作用は、逆ミセル中でも起こり、重要な意味をもつ[18,19]。

7 逆ミセル中のタンパク質

ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin：BSA）は、物理化学的研究に半世紀以上に渡ってもっとも多く選ばれて来ているタンパク質である。水系のタンパク質と界面活性剤、特にSDSとの相互作用の研究にも、このBSAがもっとも多く使われて来ている[15-21]。タンパク質も水溶液中ではその表面が水和されていて、著者らのDLSの測定結果によると、通常の水溶液中で水和しているBSAの平均直径は6.2nmである[7,8]。BSAに酷似しているhuman serum albuminは結晶状態で長径8nm、短径3nmの形状をしているとのX線による報告もある[22]。BSAのサイズは、図3のW_0の小さいAOTの逆ミセルの直径よりはるかに大きい。以下、このBSAをその逆ミセル中のwater poolに入れた場合の挙動を見て行く。

すべての測定は、BSA分子の量より逆ミセルの量が圧倒的に多い条件で行っている。したがって、BSAはすべて逆ミセルに入っているが、1つの逆ミセルに複数のBSAが入っているとは考えられない。図3のBSAを含む逆ミセルの直径（●）は、量的にBSAより逆ミセルが圧倒的に多いため、BSAを含む逆ミセルとBSAが入っていない空の逆ミセルの直径を平均したものである。低いW_0では、逆ミセルの直径の方がBSAの大きさより明らかに小さく、water pool部分はもっと小さいはずである。タンパク質が逆ミセルに入る場合、タンパク質がその周りに逆ミセルを形成し直すと考えられ[11,23]、水溶性のBSAも非極性溶媒のイソオクタンには溶けられず、最低自身が入れる大きさの逆ミセルを作り直して、その中に入っていると思われる。water poolより大きいタンパク質が逆ミセルに入る場合、単にサイズの問題だ

けでなく、そのタンパク質の表面電荷に合う逆ミセルを構成する界面活性剤の親水基の増加と共存する水分子の増加も必要になるはずである[4]。図3において、同じW_0でもBSAを含む逆ミセルの平均直径（●）の方が含まないもの（○）よりわずかに大きい。BSAを含む逆ミセルの直径は当然空のものより大きくなり、その実際の直径は図3に示す空の逆ミセルも含め平均した直径（●）よりかなり大きいと思われる。

7-1 逆ミセル中のタンパク質の二次構造変化

円偏光二色性(CD)測定によるAOTの逆ミセル中のBSAのヘリックス構造の割合を図5(A)に示す。BSAがAOTの逆ミセル中に入ると、66%あったヘリックス構造の割合は47～48%まで減少し、W_0が大きくなってもヘリックス構造は壊れたままである[7,8]。これは、このタンパク質を構成する583個のアミノ酸の内ヘリックス構造を形成しているアミノ酸の数がその水溶液状態では約385個であるのに対し、逆ミセル中では275～280個まで減少することを示している。一方、BSAのヘリックス構造はAOT水溶液中でも壊れ、その割合は51%まで減少する（図5(B)）[7,8]。注目すべきは、BSAのヘリックス構造がAOTの逆ミセル中でAOT水溶液中とほぼ同じように壊れることである。

W_0が低いAOTの逆ミセル中の水分子は、AOTの親水基やこの界面活性剤の対イオンであるNa^+イオンに強く束縛される[12]。小さい逆ミセル中では、水分子は普通の水のようには動けず、水自体も固体の氷に近い束縛を受けている液体状態にあると考えられる。このような逆ミセルのwater pool部分にタンパク質が入ると、特にW_0が低い場合、タンパク質の水和水が逆ミセルを作るAOTの親水基の水和水、すなわちwater poolの“固定水”を兼ねざるをえないだろう。これは、逆ミセルを形成する界面活性剤の親水基の電荷とタンパク質の表面電荷の双方が水和する水を互いに奪い合っている状況に違いない。W_0が相対的に高い逆ミセル中では、タンパク質のまわりの水がW_0の低い逆ミセル中より増え、ヘリックス構造の壊される程度は減少するかと予想されるが、ヘリックス構造は壊れたままである。W_0が高くなると、球状の逆ミセル内壁の電荷の影響が、凸レンズの集光のように強くなるため、BSAのヘリックス構造は依然壊されているのかもしれない。

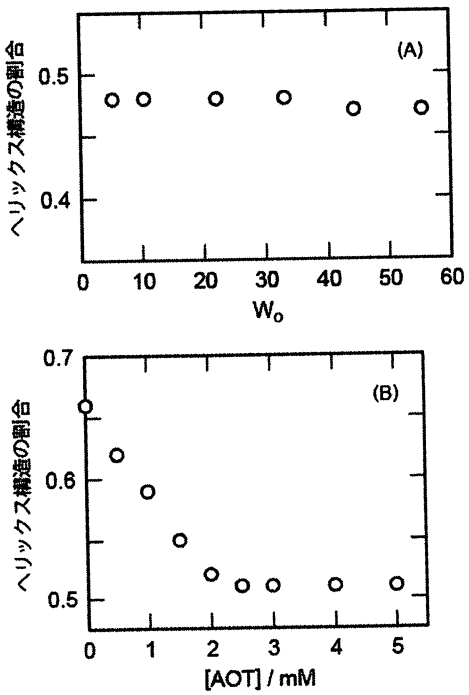

図5 AOT逆ミセル中(A)とAOT水溶液中のBSAのヘリックス構造の割合の変化

AOTのようなイオン性界面活性剤は、その水溶液中でヘリックス構造の多いタンパク質のそれは壊し、ヘリックス構造の少ないタンパク質にはその構造を新しく形成することは、先にも述べた。注目すべきは、この水溶液中で見られる傾向が、全体としてはAOTの逆ミセル中でも同じように見られることである[7,8]。BSAに関しては、図5の説明で述べた。ヘリックス構造の割合が82%と高いミオグロビン[15]も、AOTの水溶液中でもAOT逆ミセル中でもその割合は約60%程度まで減少する。一方、リゾチーム、α-キモトリプシンやトリプシンは陰イオン性界面活性剤水溶液中でヘリックス構造を形成するタイプのタンパク質で[15]、AOT逆ミセル中でもヘリックス構造を同程度形成する。

この類似性は、タンパク質がAOT水溶液中においてその親水基と静電的相互作用するように、AOT逆ミセル中でもその内壁のAOTの親水基と同じように相互作用するためと考えざるをえない。例えば、W_0が22の逆ミセルの直径は8nmであるが（図3）、AOTの分子長1.2nmを考慮すると、water poorの直径は5.6nmと見積もられる。上述したように、BSAの平均直径は水溶液状態で6.2nmである。この大きさのBSAがW_0が22の逆ミセルに入っているとき、逆ミセルの平均直径は11nmで（図3）、water poorの直径は計算上8.6nmになり、サイズ的にはBSAは入れるはずである。さらに、W_0が30を超えてwater poorの直径が9nm以上になれば、逆ミセルは膨らむ必要はないはずであるが、BSAを含む逆ミセルの直径（厳密には、BSAを含む逆ミセルと空の逆ミセルの直径の平均）は、高いW_0でも緩衝溶液だけを含むものに比べわずかに大きくなっている。

逆ミセル中に入るBSAは水和水として最低限必要な水を取り込んでいる。逆ミセルのサイズくらいでは、図4で説明した電荷をもつ壁面の影響が及ばなくなる場所はなく、タンパク質が逆ミセル中に入ると高いW_0でも“固定水”と呼ばれる水は不十分で、そこにある

水を内壁の親水基の電荷とタンパク質の表面電荷とが奪い合う状況にあると思われる。むしろ、W_0が高い逆ミセル中の方がwater poor の水の流動性が上がり、この奪い合いは強くなるかもしれない。上述のミオグロビンなどは、BSAに比べれば小さいタンパク質であるが、逆ミセルの内壁の親水基とタンパク質の表面電荷が競合して水を束縛していることは変わらないであろう。逆ミセルがタンパク質を取り込むとき、特に大きいタンパク質の場合、water poor のpHがタンパク質のpI（等電点）より大きく、かつ逆ミセルを作る界面活性剤はタンパク質の正味電荷の反対荷電を帯びている必要があるという報告もある[24]。これは、タンパク質の大小に関係なく、AOTの逆ミセル中でも、AOTの水溶液中で生じるその親水基とタンパク質との間の静電的相互作用が同じように起こっていることの証である。

したがって、逆ミセルのwater poorが少々大きくなっても、水溶性タンパク質は逆ミセルの内壁近くに存在すると思われる。しかも、water poorには、図4で述べた逆ミセル内壁の電荷のみならず、タンパク質表面の電荷の影響から逃れられない水しかなく、したがって“自由水”はなく、多分氷に近いであろう“異常水”しかないと思われる。このような“異常水”の中でも、タンパク質は逆ミセルを構成する界面活性剤の親水基の電荷の影響を受け、その結果水溶液中と似たような二次構造変化[7,8]をすると考えられる。

7-2 逆ミセル中のタンパク質の三次構造変化

BSAの全体的な構造である三次構造を、著者らは、このタンパク質に2個含まれるトリプトファン（Trp）残基の蛍光と1つだけS-S架橋をしていない34番目のシステイン残基（Cys^{34}）に結合させた蛍光プローブのN-iodoacetyl-N'-(5-sulfo-1-naphthyl)ethylenediamineの蛍光寿命（τ）の測定で検討している[7,8]。

逆ミセル中のBSAのTrpの最大蛍光波長（λ_{max}）のW_0依存性を図6(A)に示す。このλ_{max}はpH7.0の普通の水溶液中では340nmである。BSAが逆ミセルに入ると、そのλ_{max}は低波長側にシフトし、W_0が大きくなると330nm近辺まで逆シフトする。比較のために、図6(B)にAOT水溶液中のλ_{max}の変化を示す。AOTは水溶液中では陰イオン性界面活性剤としてBSAに結合し、BSAのλ_{max}はAOT低濃度で330nm付近まで急にシフトする。

BSAはTrpをトータル583個のアミノ酸中134番目（Trp^{134}）と213番目（Trp^{213}）に2個もち、立体構造上Trp^{134}方がTrp^{213}より溶媒に露出している。さらに、先に述べたように、AOTのような負に荷電した親水基と強く相互作用するLys残基を、Trp^{213} は近辺に1個しかもたないのに対して、Trp^{134}は近傍の131、132、136番目に3個もつ。したがって、λ_{max}のシフトは、Trp^{134}の環境の変化を反映していると考えられる。AOT水溶液の低濃度からTrp^{134}の近傍のLys残基にAOTが結合するため、Trp^{134}のλ_{max}はその濃度にほぼ無関係に332nm付近までシフトすると考えられる。一方、逆ミセル中のTrp^{134}のλ_{max}はW_0が低いところでは325nm以下までシフトし、この残基周囲の極性の低下を示すが、W_0の増加に伴い330nm付近まで逆シフトする。いずれのW_0の逆ミセル中でもTrp^{134}の環境は、タンパク質単独の水溶液中の状態ではなく、陰イオン性界面活性剤のAOTが水溶液中で結合している状態に近い。つまり、AOTの逆ミセル中でもTrp^{134}がAOTの親水基の傍にあることを示している。

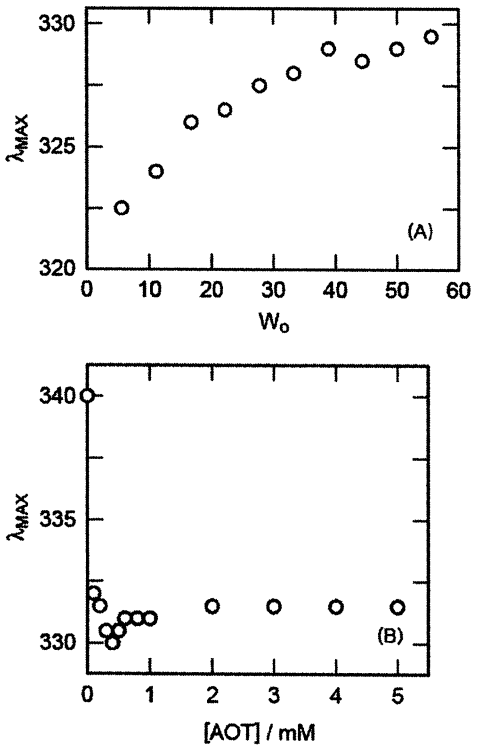

図6 BSAのλ_{max}のAOT逆ミセル中（A）とAOT水溶液中（B）の変化

図7(A)に、逆ミセル中のBSAのCys^{34}に結合させた蛍光プローブのτのW_0依存性を示す。このτは、pH7.0の普通の水溶液中では21.2nsである。BSAが逆ミセルに入ると、τはW_0が低いところで19ns付近まで速くなり、W_0が20を超えると、この残基の回転の自由度がさらに大きくなるためか、18.1nsまで速くなる。AOT水溶液中のτは、AOT濃度の増加と共に19.4nsまで速くなる（図7(B)）。これは、Cys^{34}周辺の環境がW_0の小さい逆ミセル中ではAOT水溶液中の状態に近づくが、W_0の大きい逆ミセル中ではその環境はAOT水溶液中とも違うことを示している。W_0の変化に伴い逆ミセル中の水の融点[14]、極性[9]、粘度[1] 等が変わるため、τは逆ミセル中の水の分子間相互作用の変化に伴うタンパク質の微妙な三

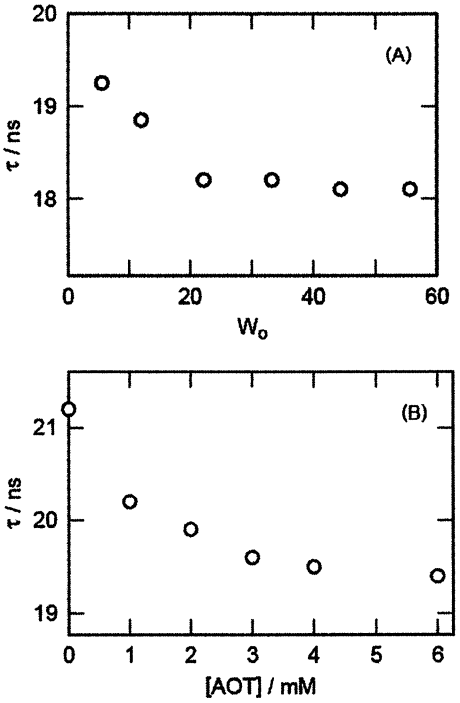

図7 BSAのτのAOT逆ミセル中（A）とAOT水溶液中（B）の変化

次構造の変化を反映していると考えられる。

逆ミセルのwater poolの水は“固定水”と“自由水”という従来の概念で考えれば、W_0の増加と共に“自由水”が増え、タンパク質の環境は単なるその水溶液の状態に接近するはずである。しかし、実際はそうではない。AOT逆ミセル中のTrp^{134}とCys^{34}周辺の環境は、タンパク質単独溶液中とは大きく違い、マクロに見ればAOTの水溶液中の環境に類似していることは明らかである。

Trp^{134}もCys^{34}も、3つあるBSAのドメインの第1番目のドメインに属する[16,19]。ここで見た三次構造の変化の様子は第1ドメインのそれを検証したことになるが、BSAのドメインは相互によく似ていて、第1ドメインの挙動は、第2第3ドメインの挙動でもあり、BSA分子全体の挙動と考えてもいいだろう。したがって、逆ミセル中でもそれを構成する界面活性剤の親水基の電荷の影響を強く受けている“固定水”の中にタンパク質全体が存在すると考えられる。図1(B)の逆ミセルの“自由水”の中にタンパク質や酵素を入れたスケッチをたまに目にするが、そのイメージは間違いである。

7-3 逆ミセル中の酵素反応

逆ミセル中のタンパク質の研究は、逆ミセル中に入れた酵素の活性への興味から始まったようである。酵素として、α-キモトリプシンがもっともよく選ばれている[25,26]。逆ミセル中のα-キモトリプシンやトリプシンのCDスペクトルが-20℃でも測定され、二次構造は室温付近と変わらないと報告されている[27]。酵素によっては、逆ミセル中の酵素活性はW_0が10くらいが最適で、W_0が高くなるとタンパク質のまわりの強く結びついた水が希釈されて低下すると解釈されているが[27]、希釈が問題になるほど酵素を入れた逆ミセル中に水は多くないと思われる。上述したように、逆ミセル中の水の粘度、極性、pHは緩衝溶液中のものとは違い、これらはW_0によっても変化し、酵素活性の変化もこういう水自身の変化の影響も受けているだろう。酵素によっては、陽イオン性界面活性剤の逆ミセル中では活性化するが、陰イオン性のAOTの逆ミセル中では活性を失うという報告もあり[28]、これも逆ミセルを構成する界面活性剤の親水基の電荷が酵素活性にも強く影響することを示している。

実際、ここで述べて来たBSAの逆ミセル中の挙動を見ただけでも、water poorの水の状態がW_0によってもはっきり変わっていることが分かる。逆ミセル中の酵素活性は、こういうwater poorの水自身の変化による影響も受ける上、AOTのようなイオン性界面活性剤のミセルがある種の酵素と同じ基質に対して触媒活性をもつこと[10]も影響するに違いない。逆ミセル中の酵素活性に注目するとき、酵素と基質の濃度を、逆ミセル中と比較するバルク水中の濃度（ブランクテスト）とどこまで同一にできるか、実際は難しい。逆ミセル中の酵素活性が水溶液中より高くなるとか水溶液中と変わらないというような報告を目にするが、酵素活性の強弱は、酵素と基質の濃度決定の問題やW_0に伴うwater poorの水自身の変化も考慮に入れなければ、明確な評価はできないだろう。

8 おわりに

逆ミセルの中は、チラコイド（葉緑体の内膜系の袋状構造で、その膜はタンパク質と脂質から成る）のモデル系としても選ばれ、そこでの光化学反応やエネルギー転移の研究も行われている[4]。冒頭でも述べたように、生物の細胞膜はある種の界面活性剤（リン脂質）で作られている。このような膜に囲まれる細胞やチラコイド内のタンパク質や酵素は生命維持のために活動してくれているが、決して普通の水“自由水”に溶けているような状態ではない環境におかれているに違いない。多くの研究者がタンパク質や酵素の研究を、上述した“バルク水”の“自由水”の中で行っている。無水の結晶状態のタンパク質を研究している人もいる。しかし、これらの研究条件は、実際にタンパク質や酵素が働いている条件とはかなり違う。“バルク水”に比べると、逆ミセルの中の水は細胞の中の水に近いと思われる。“バルク水”の中や無水条件で行われてい

るタンパク質や酵素の研究を実際の生体細胞中の液相状態におけるそれらの挙動と相関させるために、界面活性剤の逆ミセルを使った研究はもっと注目されてもいいのではないかと思われる。

冒頭に、“コロイド”や“界面”の実態がこの数10年でかなりの程度明らかになって来たと述べたが、今回見てきたように逆ミセルについても明らかになったこともあるが、まだまだ不明な点もある。water poorの水に入れる電解質の種類を変えたりイオン強度には注目したりしているが、water poorの水中のイオンの活量係数にまで言及した論文はまだ発表されてないようである。ここまでの検討は、現状ではまだ無理なのであろう。

一方で、逆ミセルは、タンパク質の抽出や精製にも利用されたり、薬物輸送の容器、あるいは化学触媒や物質合成などのマイクロ反応器としても研究されたりしている[9]。ナノサイズのミセルが非常に広い“界面”を提供することによる触媒機能もこれらのプロセスに関わっていると思われる。このような逆ミセルの反応器としての活用などは、逆ミセル中の水の異常性はとりあえず別にして、さらに活用が拡がることが望まれる。これら逆ミセルのwater poorの応用研究と並行して、water poorの水自身についての研究がさらに必要であることは言うまでもない。water poorの水だけに限定せず、water poorに入れたタンパク質や酵素の挙動からも、そこの水の異常性や物性がさらに見えて来ることもあるだろう。

逆ミセルの膨らんだ、いわゆる、W/O (water-in-oil) 型マイクロエマルションはたしかに大きいwater poorをもつ。W/O型マイクロエマルションは、どの程度の大きさになると“自由水”の存在が確認できるか興味がある。また、この“自由水”の存在やその量はマイクロエマルションのwater poorに入れたタンパク質やイオンの種類、大きさ、濃度などにどのように影響されるか、興味は尽きない。

参考文献

1) P. E. Zinsli, *Inhomogeneous Interior of Aerosol OT Microemulsions Probed by Fluorescence and Polarization Decay,* J. Phys. Chem. 83, 3223-3231 (1979).

2) H. Kondo, I. Miwa, and J. Sunamoto, *Biphasic Structure Model for Reversed Micelles. Depressed Acid Dissociation of Excited-State Pyranine in the Restricted Reaction Field*, J. Phys. Chem. 86, 4826-4831 (1982).

3) P. L. Luisi and L. J. Magid, *Solubilization of Enzymes Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions*, CRC Crit. Rev. Biochem., 20, 409-474 (1986).

4) P. L. Luisi, M. Giomini, M. P. Pileni, and B. H. Robinson, *Reverse Micelles as Hosts for Proteins and Small Molecules*, Biochim. Biophys. Acta, 947, 209-246 (1988).

5) J. Zhang and F. V. Bright, *Nanosecond Reorganization of Water within the Interior of Reversed Micelles Revealed by Frequency-Domain Fluorescence Spectroscopy*, J. Phys. Chem. 95, 7900-7907 (1991).

6) K. K. Karukstis, A. A. Frazier, C. T. Loftus, and A. S. Tuan, *Fluorescence Investigation of Multiple Partitioning Sites in Aqueous and Reverse Micelles*, J. Phys. Chem. 102, 8163-8169 (1998).

7) K. Takeda, K. Hachiya, and Y. Moriyama, *Interaction of Protein with Ionic Surfactant (part 2): Kinetics of Conformational Change of Protein Induced by the Binding of Surfactant; Dynamics of Protein-Surfactant Complexes; Interaction of Protein with Reverse Micelles*, Encyclopedia of Surfactant and Colloid Science, A. T. Hubbard Ed., Marcel Dekker: New York, pp.2575-2592 (2002).

8) K. Takeda, K. Harada, K. Yamaguchi, and Y. Moriyama, *Conformational Changes of Bovine Serum Albumin in an Aqueous Solution of Sodium Bis(2-ethylhexyl) Sulfosuccinate and in the Reverse Micelle of the Same Surfactant*, J. Colloid Interface Sci., 164, 382-386 (1994).

9) J. Faeder and B. M. Ladanyi, *Molecular Dynamics Simulations of the Interior of Aqueous Reverse Micelles*, J. Phys. Chem. 104, 1033-1046 (2000).

10) J. H. Fendler and E. J. Fendler, Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems, Academic Press, New York (1975).

11) J. B. Peri, *The State of Solution of Aerosol OT in Nonaqueous Solvents*, J. Colloid Interface Sci., 29, 6-15 (1969).

12) D. J. Christopher, J. Yarwood, P. S. Belton, and B. P. Hills, *A Fourier Transform Infrared Study of Water-Head Group Interactions in Reversed Micelles Containing Sodium Bis(2-ethylhexyl) Sulfosuccinate (AOT)*, J. Colloid Interface Sci., 152, 465-472 (1992).

13) H. Fujii, T. Kawai, and H. Nishikawa, Determination of pH in Reverse Micelles, Bull. Chem. Soc. Japan, 52, 2051-2055 (1979).

14) C. Grandi, R. E. Smith, and P. L. Luisi, *Micellar Solubilization of Biopolymers in Organic Solvents*, J. Biol. Chem., 256, 837-843 (1981).

15) K. Takeda, and Y. Moriyama, *Circular Dichroism Studies on Helical Structure Preferences of Amino Acid Residues of Proteins Caused by Sodium Dodecyl Sulfate*, J. Protein Chem. 9, 573-582 (1990).

16) K. Takeda, Y. Moriyama, and K. Hachiya, *Interaction of Protein with Ionic Surfactant (part 1): Binging of Surfactant to Protein and Protein Fragments and Conformational Changes Induced by Binding*, Encyclopedia of Surfactant and Colloid Science, A. T. Hubbard Ed., Marcel Dekker: New York, pp.2558-2574 (2002).

17) 竹田邦雄，森山佳子，イオン性界面活性剤が見せるタンパク質構造の保護と再形成，表面, 42, pp.1-10 (2004).

18) 竹田邦雄，森山佳子，界面活性剤とタンパク質の相互作用，オレオサイエンス，11, pp.3-10 (2011).
19) 竹田邦雄，界面活性剤によるタンパク質の構造変化;界面活性剤とともに 40 年余,岡山理科大学紀要，50, pp.13-22 (2014).
20) 森山佳子，タンパク質の構造に対する界面活性剤の保護作用，Colloid Interface Commun. News Letter from DCSC, 40, pp.14-16 (2015).
21) K. Takeda, and Y. Moriyama, Kinetic Aspects of Surfactant-Induced Structural Changes of Proteins: Unsolved Problems in Two-State Model for Protein Denaturation. J. Oleo. Sci. (2015) in press.
22) X. M. He, and D. C. Carter, *Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin*. Nature, 358, 209-215 (1992).
23) S. F. Matzke, A. L. Creagh, C. A. Haynes, J. M. Prausnitz, and H. W. Blanch, *Mechanisms of Protein Solubilization in Reverse Micelles*, Biotech. Bioeng., 40, 91-102 (1992).
24) R. B. G. Wolbert, R. Hilhorst, G. Voskuilen, H. Nachtegaal, M. Dekker, K. V. Riet, and B. H. Bujsterbosch, *Protein Transfer from an Aqueous Phase into Reverse Micelles. The Effect of Protein Size and Charge Distribution*, Eur. J. Biochem., 184, 627-633 (1989).
25) E. Ruckenstein and P. Karpe, *On the Enzymatic Superactivity in Ionic Reverse Micelles*, J. Colloid Interface Sci., 139, 408-436 (1990).
26) P. Karpe and E. Ruckenstein, *The Enzymatic Superactivity in Reverse Micelles : Role of the Dielectric Constant*, J. Colloid Interface Sci., 141, 534-552 (1991).
27) P. Walde, Q. Peng, N. W. Fadnavis, E. Battistel, and P. L. Luisi, *Structure and Activity of Trypsin in Reverse Micelles*, Eur. J. Biochem., 173, 401-409 (1988).
28) Y. Kuwahara, A. Goto, Y. Ibuki, K. Yamazaki, and R. Goto, *Catalytic Activity of Hexokinase in Reversed Micelles*, J. Colloid Interface Sci., 233, 190-196 (2001).

Protein Structures in Surfactant Reverse Micelles

—Abnormality of Water Incorporated in Reverse Micelles—

Kunio TAKEDA and Yoshiko MORIYAMA

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,
Okayama University of Science
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 28, 2015; accepted November 9, 2015)

The secondary structural change and the tertiary structural change of bovine serum albumin (BSA) in the reverse micelles of sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) have been examined mainly by the measurements of circular dichroism, time-resolved fluorescence, tryptophan fluorescence, and dynamic light scattering. The diameter of the reverse micelle increases with an increase of water content (W_0=[H_2O]/[AOT]). The diameter of the reverse micelle, containing BSA, is larger than the empty reverse micelle at each W_0. Upon the incorporation of BSA into the reverse micelles, the helical structures are disrupted, the fluorescence lifetime of N-iodoacetyl-N'-(5-sulfo-1-naphthyl) ethylenediamine bound to Cys34 shortens, and the maximal wavelength of tryptophan fluorescence shifts from 340 to 330 nm. These changes substantially agree with those observed in the aqueous AOT solution, indicating that the interaction between the hydrophilic groups of AOT and the oppositely charged amino acid residues of BSA plays an important role in the reverse micelle as well as the abnormality of water.

Keywords: surfactant; reverse micelle; protein structure; Sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate; Bovine serum albumin; circular dichroism; dynamic light scattering.