

物理化学概論

熱力学的観点からの生体分子の相互作用

九州工業大学 竹中繁織

Langmuirの吸着等温式

前提条件として

- ①吸着媒体表面に有限の数の結合サイトsがあるとす。
- ②結合サイトsにリガンドLが吸着したものをsLとする。
- ③会合平衡定数をKとすると、吸着平衡ではそれぞれのモル濃度について以下の平衡式が成立する。

$$K = [SL] / [S][L]$$

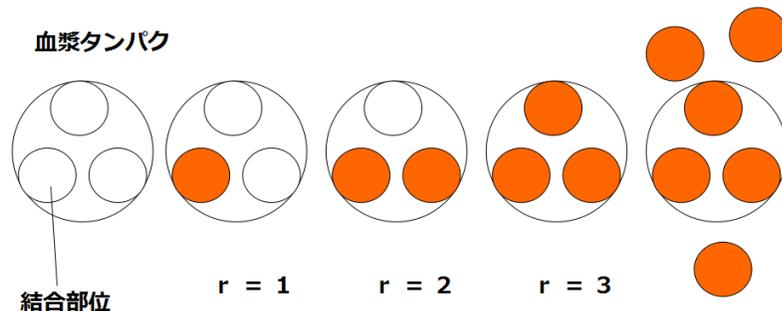
吸着媒体上のサイト数をn、吸着媒体ごとの吸着量をγとすると、 $\gamma / n = [SL] / [S] + [SL] = K[S][L] / [S] + K[S][L] = K[L] / 1 + K[L]$

ここで[L]を遊離リガンド濃度[Df]と表し、γについて整理すると、 $r = nK[Df] / 1 + K[Df]$

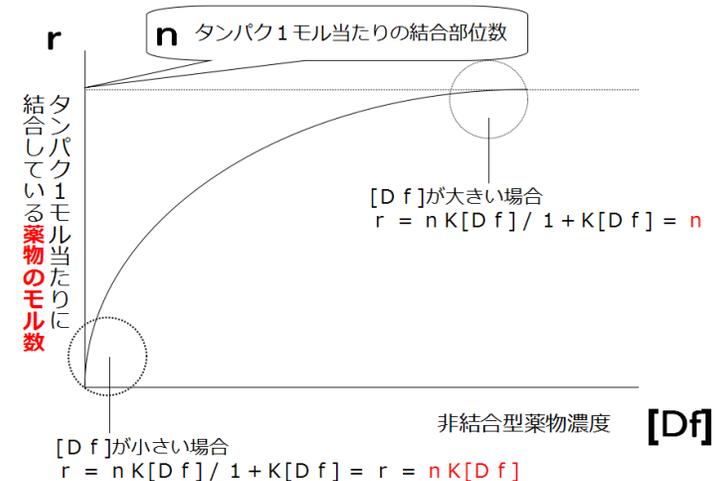
r: タンパク 1 mol 当りに結合している薬物の mol 数 ($0 \leq r \leq n$), n: タンパク 1 mol 当たりの結合部位数, K: 結合定数
[Df]: 非結合型薬物濃度

このような式が得られ、これがLangmuirの吸着等温式に相当します。

次は図を見ながら理解していきましょう。n=3の場合(結合部位数が3カ所)



この図で確認しておいてほしいことは、rの最大値はnであるということです。薬物濃度がいくら多くなったとしても、結合部位数以上に薬物は結合できないという、当たり前のことを理解しておけば大丈夫です。



この図からも、薬物濃度を上げていくことで、 $r=n$ になることがわかります。

次にScatchard式、両辺逆数式について見ていきましょう。Langmuir式より、Scatchard式、両辺逆数式を求めることができます。これらの式は、結合定数やタンパク質1分子当たりの薬物結合部位数を求める時に用います。

スカッチャード(Scatchard)プロット



$$[P]_0 = [P] + [PL] \text{ より}$$

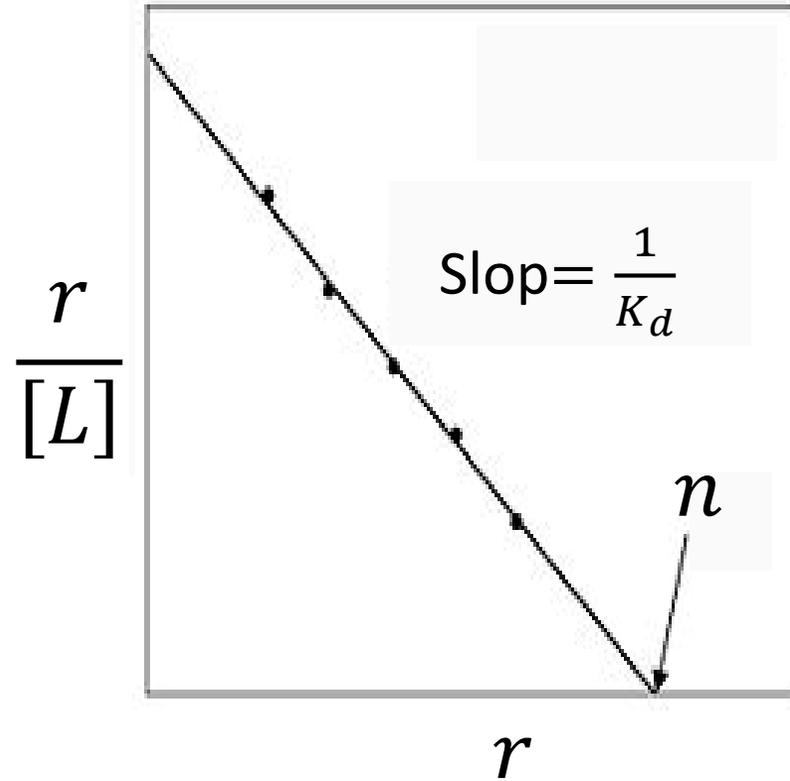
$$K_d = \frac{([LP]_0 - [P][L])}{[PL]}$$

飽和度(saturation fraction)

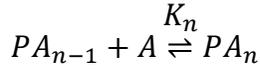
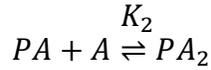
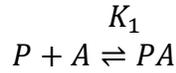
$$r = \frac{[PL]}{[P]_0} = \frac{[L]}{K_d + [L]}$$

$$\frac{r}{[L]} = \frac{1}{K_d} (1 - r)$$

$$\frac{r}{[L]} = \frac{1}{K_d} (n - r)$$



Scatchardの拡張



$$\sum_{i=1}^3 a_i = a_1 + a_2 + a_3$$

$$\prod_{i=1}^3 a_i = a_1 \times a_2 \times a_3$$

$$K_1 = \frac{[PA]}{[P][A]} \implies [PA] = K_1[P][A]$$

$$K_2 = \frac{[PA_2]}{[PA][A]} = \frac{[PA_2]}{K_1[P][A]^2} \implies [PA_2] = K_1 K_2 [P][A]^2$$

$$K_n = \frac{[PA_n]}{[PA_{n-1}][A]} = \frac{[PA_n]}{K_1 K_2 \dots K_{n-1} [P][A]^n}$$

Pの全モル数を $[P]_t$, 結合したAのモル数を $[A]_B$ とすると

$$\begin{aligned} [P]_t &= [P] + [PA] + [PA_2] + \dots + [PA_n] \\ &= [P] \left(1 + \sum_{j=1}^i K_j [A]^j \right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [A]_B &= [PA] + 2[PA_2] + \dots + n[PA_n] \\ &= [P] \left(1 + \sum_{i=1}^n \prod_{j=1}^i K_j i [A]^i \right) \end{aligned}$$

平均結合数 (飽和度) $\tilde{v} = \frac{[A]_B}{[P]_t}$

n個の結合サイトが等価であるとする

PA型についてとり得る異なった結合構造の数n個

PA₂型についてとり得る異なった結合構造の数 $\frac{n(n-1)}{2}$ 個

PA_i型についてとり得る異なった結合構造の数 $\frac{n!}{i!(n-i)!}$ 個

すべて結合定数をkとすると

$$\frac{[PA]}{[P][A]} = K_1 = k$$

$$\frac{[PA_2]}{[P][A]^2} = K_1 K_2 = \frac{n(n-1)k^2}{2!} \quad K_2 = \frac{(n-1)k}{2}$$

$$K_i = \frac{(n-i+1)k}{i}$$

$$\text{従って } \tilde{v} = \frac{\sum_{i=1}^n i \left\{ \prod_{j=1}^i \left(\frac{n-j+1}{j} \right) \right\} k^i [A]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \left\{ \prod_{j=1}^i \left(\frac{n-j+1}{j} \right) \right\} k^i [A]^i}$$

$$\prod_{j=1}^i \left(\frac{n-j+1}{j} \right) = \frac{n!}{(n-i)! i!} \text{ より}$$

$$\tilde{v} = \frac{\sum_{i=1}^n i k^i \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^i}{1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^i}$$

2項定理

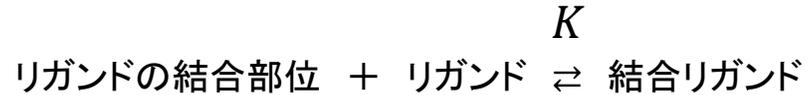
$$(1 + k[A])^n = 1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^i$$

$$n(1 + k[A])^{n-1} = 1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^{i-1}$$

2項定理より

$$\tilde{v} = \frac{nk[A]}{1 + k[A]} \implies \frac{\tilde{v}}{[A]} = k(n - \tilde{v})$$

DNA上の塩基対一つを一つの格子とし、その格子のn個がリガンド(ここではインターカレータ分子)が結合することにより覆われるとする。今DNAがN個の格子よりなっていると考え、平衡式は、結合定数を K とすると、



質量作用の法則より、

$$\frac{[\text{結合リガンド}]}{[\text{リガンド}]} = K \cdot [\text{リガンドの結合部位}] \quad (1)$$

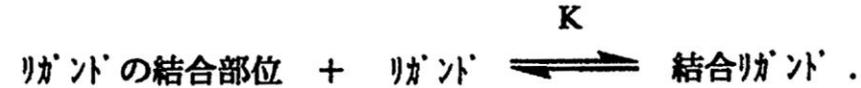
格子あたりのモル濃度で両辺を割ると、

$$[L] \frac{[\text{格子あたりの結合リガンドの平均数}]}{[L]} = K \cdot [\text{格子あたりのリガンドの結合部位の平均数}] \quad (2)$$

ここでLは、リガンド濃度である。 ν をリガンドの結合数、 B を(格子あたりの結合リガンドの平均数)とすると $\nu = B/N$ となるので(2)式の左辺は、 $\nu N/L$ である。

ここでは、(1)式を導く。

DNA上の塩基対一つを一つの格子とし、この格子のn個がリガンド（ここではインターカレーター分子）が結合することにより被われるとする。今DNAがN個の格子よりなっていると考える。平衡式は、結合定数をKとすると、



質量作用の法則より、

$$\frac{[\text{結合リガンド}]}{[\text{リガンド}]} = K \cdot [\text{リガンドの結合部位}]$$

格子あたりのモル濃度で両辺を割ると、

$$\frac{\{\text{格子あたりの結合リガンドの平均数}\}}{L} = K \cdot \{\text{格子あたりのリガンドの結合部位の平均数}\} \quad (6)$$

ここでLは、リガンドの濃度である。vをリガンドの結合数、Bを{格子あたりの結合リガンドの平均数}とすると $v=B/N$ となるので(6)式の左辺は、 vN/L である。

$$B = vN \quad v = B \cdot N$$

格子に結合したB個のリガンドに対して(B+1)個の間隔があり、その間隔あたりリガンドの結合部位が平均s個存在すると考えると右辺の{格子あたりのリガンドの結合部位の平均数}は、(B+1)・sとなる。

隣り合った結合格子の間隔がg個の時のリガンドの結合部位の数は、(g-n+1)であるので(図7参照)。

格子に結合したB個のリガンドに対して(B+1)個の間隔があり、その間隔あたりリガンドの結合部位が平均s個存在すると考えると右辺の[格子あたりのリガンドの結合数の平均]は(B+1)・sとなる。隣り合った結合格子の間隔がg個の時のリガンドの結合部位の数は、(g-n+1)であるので、

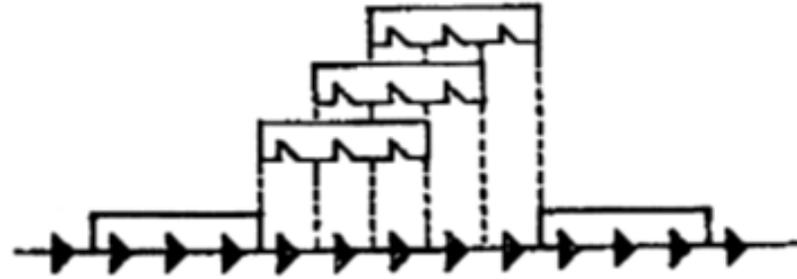


図1. 結合格子の間隔がg個の時のリガンドの結合部位の数は(g-n+1)である。ここでは、g=5, n=3の場合を示している。

格子に結合した二つのリガンドの間隔がg個である確率を P_g とすると、

$$s = \sum_{g=n}^N (g - n + 1) \cdot P_g \quad (3)$$

となる。格子あたりリガンドが結合している確率をb、リガンドが結合していない確率をfとすると(図2参照)

$$P_g = (b_n f)(f f)^{s-1}(f b_1) \quad (4)$$

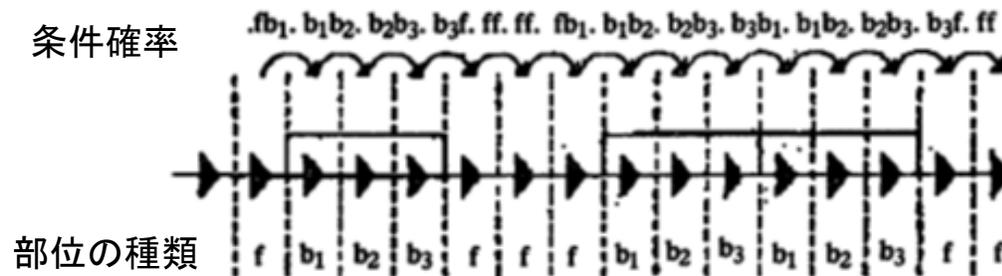


図2. それぞれの格子に可能な(n+1)個の条件確率。ここではn=3である。

ここで、結合していない格子のすぐ隣は、結合しているか結合していないかの二通りしかないので、

$$(ff) + (fb_1) = 1 \quad (5)$$

である。また結合したリガンドの右末端は、結合していないか結合しているかの二通りしかないので

$$(b_n f) + (b_n b_1) = 1 \quad (6)$$

となる。リガンドは格子n個を覆うので

$$(b_{n-1} b_n) = 1 \quad (7)$$

である。ところでB個が結合したDNAは、 $(B \cdot n)$ 個の格子が覆われている。被われた割合は $v=B/N$ より、 $nv=Bn/N$ である。従って、被われていない割合は $(1-nv)$ (でたために選んだ格子がリガンドによって被われていない割合に等しい)である。また、二番目の格子がリガンドによって被われていない割合は $(1-nv)$ であるので、

$$(1 - nv)(ff) + (b_n f) = (1 - nv) \quad (8)$$

となる。ここでは非協同過程での結合を考えているので

$$(ff) = (b_n f) \quad (9)$$

$$(fb_1) = (b_n b_1) \quad (10)$$

となる。(8), (9)式より

$$(ff) = (b_n f) = \frac{1 - nv}{1 - (n - 1)v} \quad (11)$$

また、(5), (11)式より

$$(fb_1) = \frac{v}{1 - (n-1)v} \quad (12)$$

(9), (11), (12)式より

$$P_g = (ff)^g(fb_1) = \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v}\right)^g \left(\frac{v}{1-(n-1)v}\right) \quad (13)$$

となる。従って(3)式は、(14)式となる。

$$s = \sum_{g=n}^N (g-n+1) \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v}\right)^g \left(\frac{v}{1-(n-1)v}\right) \quad (14)$$

$N \rightarrow \infty$ とすると(14)式は(15)式となる(補足参照)。

$$s = \left(\frac{1-nv}{v}\right) \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v}\right)^{n-1} \quad (15)$$

$N \rightarrow \infty$ では $B \doteq B+1$ なので(1)式の右辺は、

$$K \cdot N \cdot (1-nv) \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v}\right)^{n-1} \quad (16)$$

となる。結局(1)より

$$\frac{v}{L} = K \cdot (1-nv) \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v}\right)^{n-1} \quad (17)$$

が導かれる。

<補足>(14)式が $N \rightarrow \infty$ で(15)式となる理由

$$\frac{1-n}{1-(n-1)v} = s$$

とおいて、 s' を考える。 $s = s' \frac{v}{1-(n-1)v}$

$$s' = \sum_{g=n}^N (g-n+1) \cdot a^g = 1 \cdot a^n + 2 \cdot a^{n+1} + 3 \cdot a^{n+2} + \dots$$

となる。従って、 $\frac{(1-a)}{a^n} \cdot s' = 1 + a + a^2 + \dots = \frac{a^{N+1} - 1}{a - 1}$

すなわち $s' = \frac{a^n}{(1-a)^2} (1 - a^{N+1})$

ところで $v > 0$ から、 $1 > a = \frac{1-nv}{1-(n-1)v}$ であるから、 $N \rightarrow \infty$ とすると $a^{N+1} \rightarrow 0$ となるので

$$s' = \frac{a^n}{(1-a)^2} = \frac{\{1-(n-1)v\}^2}{v^2} \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v} \right)^n$$

である。従って s は、

$$s = \frac{\{1-(n-1)v\}^2}{v^2} \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v} \right)^n \frac{v}{1-(n-1)v} = \left(\frac{1-nv}{v} \right) \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v} \right)^{n-1}$$

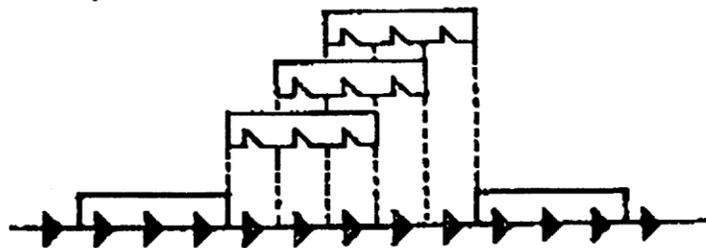


図7. 結合格子の間隔が g 個の時のリガンドの結合部位の数は $(g-n+1)$ である. ここでは, $g=5, n=3$ の場合を示している.

格子に結合した二つのリガンドの間隔が g 個である確率を P_g とすると,

$$s = \sum_{g=n}^N (g-n+1) \cdot P_g \quad (7)$$

となる. 格子あたりリガンドが結合している確率を b , リガンドが結合していない確率を f とすると (図8参照)

$$P_g = (b_n f) (ff)^{g-1} (fb_n) \quad (8)$$

となる.

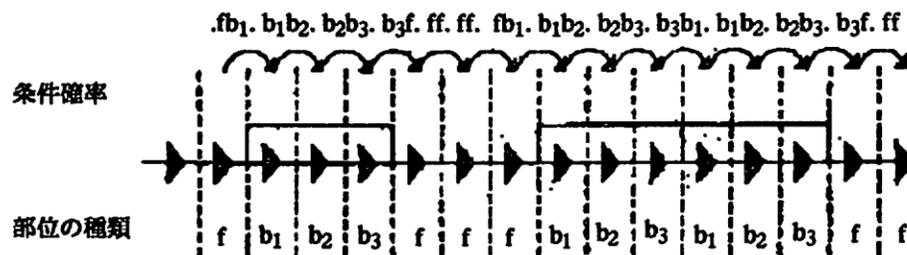


図8. それぞれの格子に可能な $(n+1)$ 個の条件確率. ここでは $n=3$ である.

$$(b_n f) + (b_n b_1) = 1 \quad (10)$$

となる。リガンドは格子n個を被うので

$$(b_{n-1} b_n) = 1 \quad (11)$$

である。

ところでB個が結合したDNAは、 $(B \cdot n)$ 個の格子が被われている。被われた割合は $v=B/N$ より $nv=Bn/N$ である。したがって、被われていない割合は $(1-nv)$ （でたらめに選んだ格子がリガンドによって被われていない割合に等しい）である。

また、二番目の格子がリガンドによって被われていない割合は $(1-nv)$ であるので、

$$(1-nv)(ff) + v(b_n f) = (1-nv) \quad (12)$$

となる。ここでは非協同過程での結合を考えているので

$$(ff) = (b_n f) \quad (13)$$

$$(fb_1) = (b_n b_1) \quad (14)$$

となる。(12), (13)式より

$$(ff) = (b_n f) = \frac{1-nv}{1-(n-1)v} \quad (15)$$

$$Pg = (ff)g(fb_1) = \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v}\right)^g \left(\frac{v}{1-(n-1)v}\right) \quad (17)$$

となる。従って(7)式は、(18)式となる。

$$s = \sum_{g=n}^N (g-n+1) \cdot \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v}\right)^g \left(\frac{v}{1-(n-1)v}\right) \quad (18)$$

$N \rightarrow \infty$ とすると(18)式は(19)式となる（補足参照）。

$$s = \left(\frac{1-nv}{v}\right) \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v}\right)^{n-1} \quad (19)$$

$N \rightarrow \infty$ では $B \approx B+1$ なので

(6)式の右辺は、

$$K \cdot N \cdot (1-nv) \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v}\right)^{n-1} \quad (20)$$

となる。結局(6)式より

$$\frac{v}{L} = K \cdot (1-nv) \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v}\right)^{n-1} \quad (1)$$

が導かれる。

<補足> (18)式が $N \rightarrow \infty$ で(19)式となる理由

$$\frac{1-nv}{1-(n-1)v} = a \text{ とおいて, } s' \text{ を考える } \left(s = s' \cdot \frac{v}{1-(n-1)v} \right).$$

$$s' = \sum_{g=n}^N (g-n+1) \cdot a^g$$

$$\begin{aligned}
 &g=n \\
 &= 1 \cdot a^n + 2 \cdot a^{n+1} + 3 \cdot a^{n+2} + \dots
 \end{aligned}$$

となる。従って

$$\begin{aligned}
 \frac{(1-a)}{a^n} \cdot s' &= 1 + a + a^2 + \dots \\
 &= \frac{a^{N+1} - 1}{a - 1}
 \end{aligned}$$

すなわち

$$s' = \frac{a^n}{(1-a)^2} (1 - a^{N+1})$$

ところで $v > 0$ から $1 > a = \frac{1 - nv}{1 - (n-1)v}$ であるから、 $N \rightarrow \infty$ とすると $a^{N+1} \rightarrow 0$ となるので

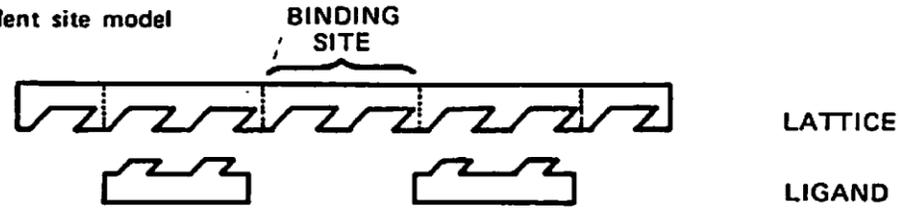
$$s' = \frac{a^n}{(1-a)^2} = \frac{(1 - (n-1)v)^2}{v^2} \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^n$$

である。従って s は、

$$\begin{aligned}
 s &= \frac{(1 - (n-1)v)^2}{v^2} \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^n \frac{v}{1 - (n-1)v} \\
 &= \left(\frac{1 - nv}{v} \right) \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^{n-1}
 \end{aligned}$$

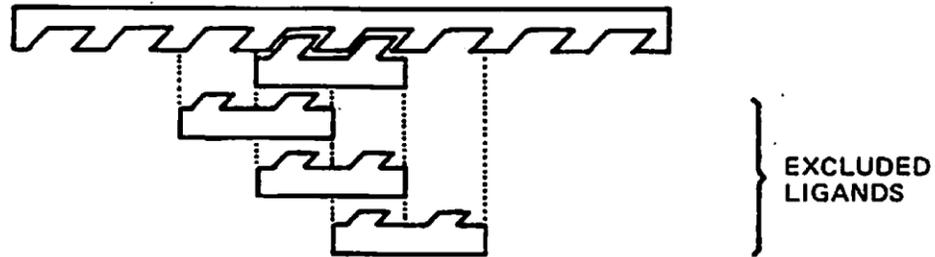
となる。

I. Independent site model

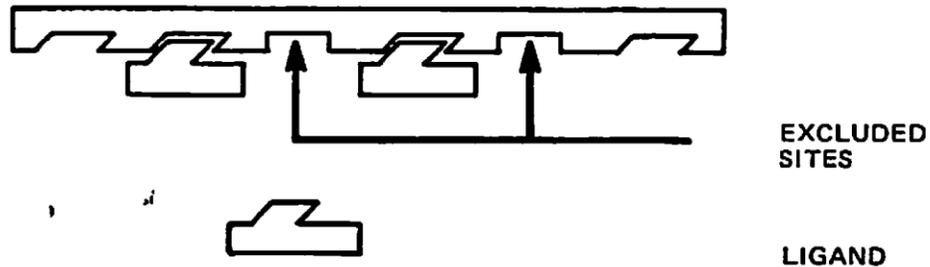


II. Excluded site model: overlapping binding sites

(a) Direct exclusion: large ligands



(b) Indirect exclusion: binding at one site induces a conformational change at an adjacent site.



Possible ligand interactions with a linear lattice such as DNA. Exclusion models involving binding site elimination through direct blockage of lattice binding sites by large ligands (IIa) and through indirect blockage caused by a conformational change induced in the lattice (double helix) by the ligand interaction (IIb) are shown. Classical independent site behavior is shown in I.

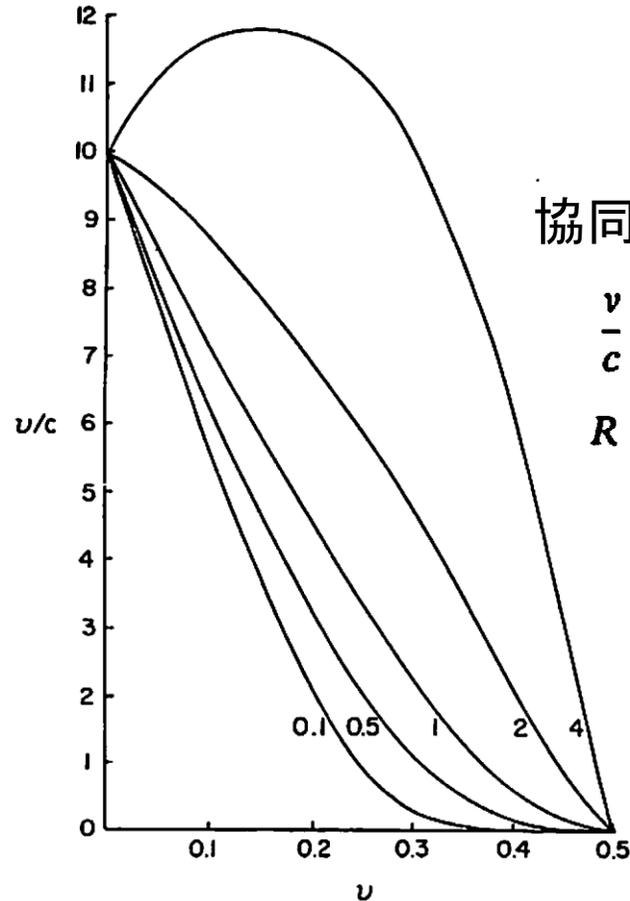
協同性がない場合

$$\frac{v}{c} = K(1 - nv) \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^{n-1}$$

協同性がある場合

$$\frac{v}{c} = K(1 - nv) \left(\frac{(2\omega - 1)(1 - nv) + v - R}{2(\omega - 1)(1 - nv)} \right)^{n-1} \left(\frac{1 - (n+1)v + R}{2(1 - nv)} \right)^2$$

$$R = [(1 - (n+1)v)^2 + 4\omega v(1 - nv)]^{1/2}$$



Idealized Scatchard plots as predicted by Eq. (6) for different ω values. The ω value for each curve is indicated at the bottom of the figure. When $\omega = 1$, which indicates no ligand cooperativity, Eq. (6) reduces to Eq. (5). For the illustration, a K value of 10 is used for all curves. Changing K values over a fairly wide range do not dramatically affect the curve shapes.

課題レポート

Scatchard解析の解析法に関して詳細に説明せよ。