

# 蛋白質およびポリペプチドの立体構造

九大理・物理 郷 信広, 武富 敬, 上田裕三

九大理・生物 郷 通子

京大化研 大畠玄久, 高橋 敏, 大井龍夫

## § I 序 論

ここ十数年の間に生体高分子の構造に関する研究は目覚ましい発展をとげてきた。その原動力となったのは、合成ポリペプチドによる $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -構造等に関する2次構造の研究の進歩であり、またX線構造解析による蛋白質の立体構造の決定である。現在では、結晶化できる蛋白質の三次元構造<sup>1)</sup>は、かなり複雑なものでも決定されるので、原子数六千程度のものも原子座標がえられている。

もともと蛋白質は20種のアミノ酸が遺伝情報に従った配列順序で共重合したポリペプチド鎖であるが、X線解析で明らかにされた特異的立体構造は、 $\alpha$ -ヘリックスとか $\beta$ -構造のように単純な繰り返し構造でなく、一見非常に不規則な形をとっている。この複雑な特異的立体構造の静的ならびに動的な特質は蛋白質の機能と関係しており、それを理解するためにはいろいろな側面から眺める必要がある。その一つは立体構造既知の蛋白質について構造に何らかの法則性をもつような情報が含まれているかといった面を探がす構造解析であり、またその一つは蛋白質の変性再生にみられる転移現象と立体構造のゆらぎとを統一的に分子レベルで理解しようとする試みである。

上にあげた2つのアプローチ以外にもいろいろな方法があるであろうが、我々が行っている研究を通して現状を記述することにする。

## § II 構造解析 (Conformational Analysis)

### (1) 記述の基礎

我々の取扱い系はポリペプチド鎖であり、化学構造は既知である。したがって低分子結晶解析から得られた分子内の原子座標から側鎖の原子配置(結合距離, 結合角)の知識が得られるし、主鎖のペプチド結合部分についてもかなり正確な原子座標が与えられ

ている。蛋白質、ポリペプチドの全体の形は主鎖の Conformation と側鎖の位置によつてきめられ、自由度として化学結合の距離、結合角、結合のまわりの回転があげられるので、結局この自由度をある値にとれば一つの conformation が定まる。いま取扱う高分子は重合度 100 以上のものであり、自由度はできるだけ少ない方が望ましい。

そこで結合距離、結合角は一定とし回転の自由度だけを考慮する。しかもペプチド結合部分は平面と近似し最も簡単でよい近似と考えられる二面角  $\phi$  ( $N-C^\alpha$ ),  $\psi$  ( $C^\alpha-C'$ ) だけを主鎖のもつ自由度とする。

この近似がどの程度まで適用できるかはまだ明らかでないが、低分子アミノ酸の結晶解析では結合角  $N-C^\alpha-C'$  の値がアミノ酸毎にちがっており、結合距離よりも結合角の変化を考慮することが次の段階の近似となるであろう。

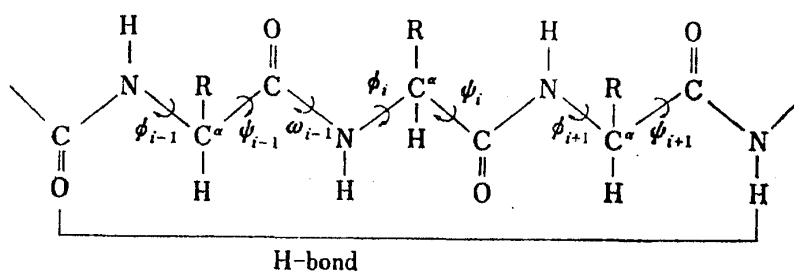
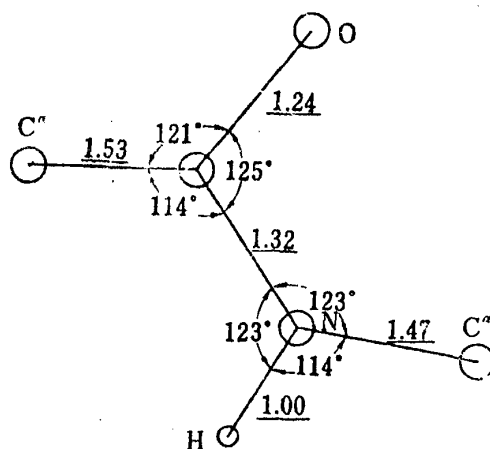


図1 ペプチド結合の幾何学的配置

## (2) エネルギー関数

高分子の安定性をみる場合、構造解析の立場ではエネルギー計算を必要

とする。比較的low分子では電子論的な計算も可能である<sup>2)</sup>が、蛋白質のように大きな分子では経験的なエネルギー関数を用いざるを得ないのが実情であろう。しかしエネルギーの定数に任意性があるのと、原子対ポテンシャルの和としてエネルギーを求める近似であることからあまり詳細な議論はできない。それでも、大まかな理解には適当なものではないかと思われる。この近似では、電気的な効果、非共有結合の大きさ、水素結合の役割などいろいろなエネルギーの寄与を評価するには便利である。

具体的には非共有結合エネルギーに Lennard-Jones の 6-12 ポテンシャル, 電氣的エネルギーに  $1/R$  のクーロンポテンシャル, 回転に対して三角関数で表わすポテンシャルを用いる。<sup>3)</sup> 蛋白質の系ではまだすべてのエネルギーを入れて計算する程原子座標が正確でないので主として非共有結合エネルギーを用いてエネルギー計算が行われている段階である。ポリペプチド系については, これらのエネルギーの他, 水素結合, 水和, 疎水結合も考慮して計算される。<sup>4)</sup>

### (3) ポリペプチドの構造解析

上記の原子配置とエネルギー関数を用いれば, 同一アミノ酸からなる homopolymer の構造の解析は比較的容易にできる。特にくりかえし構造の  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -構造等いわゆる 2 次構造のエネルギー計算はその特徴が明確にできる。たとえば  $\alpha$ -ヘリックスの 4 残基毎に水素結合がうまくできるのは, 明らかにペプチド結合の特質であることなどである。

しかし homopolymer 以外の heteropolymer についてはあまり実験がないので計算も行われていないが, 取扱いがそれ程簡単でない。その一例をあげると, sequential polymer でアラニンとグリシンの交互に入ったものや, アラニン 2 残基にグリシン 1 残基が入ったもの, すなわち  $(G)_n$ ,  $(AG)_n$ ,  $(AAG)_n$ ,  $(AAAG)_n$  といったポリペプチドの  $\alpha$ -ヘリックス含有量は必ずしも G の含有量に比例しないという実験結果がある。<sup>5)</sup> これを説明するのに普通使われる解析の手段で求めてみても予想されるように大体 G の含有量を反映したヘリックス量しか求められない。この説明にはもっといろいろな効果を考慮して理論を組立てねばならないのであろう。

この他あまり手がつけられていない問題に multi 鎖の解析がある。コラーゲンの 3 本鎖や, 2 本鎖の線維状蛋白質の問題は今後研究を進めなければならない分野の研究課題である。

### (4) 蛋白質の立体構造の精密化

蛋白質の立体構造は X 線解析によって原子座標がえられていると述べた。しかしこの座標はかなりの誤差があり, この座標を用いて何らかの計算を行おうとすれば, 直ちにここまでは使えないことに気付く。なる程全体の形はこの座標であらわせるが, 細部ま

で信用するわけにはいかない。これは本質的な問題であり、もともと X-線の解析で 1 Å 以下の精度ですべての原子座標がきめられるとは限らないし、実験的な限度が存在する。現在最も高い分解能で得られた蛋白質の原子座標は Insulin であり、1 Å 以下の分解能で行われている。この座標ですら未だに不十分である。ここで座標が正確でないということをはっきりさせるため、与えられた原子座標でエネルギーを計算してみる。するとある原子間では原子間距離が小さすぎて 1000 Kcal 以上のぶつかりを示すものがある。また結合角から bending のエネルギーを求めてみれば、 $NC^{\alpha}C'$  の角が  $110^{\circ}$  附近から  $\pm 20^{\circ}$  以上もずれているものがあり、数十 Kcal のエネルギー損失がある。こうして結局は負のエネルギーが得られず、不安定な正のエネルギーが得られてしまうのである。

ここ数年来以上の矛盾に対して X-線で得られた原子座標から、エネルギー的にもっともらしい座標へ精密化する試みがなされている<sup>6,7,8)</sup>が、残念ながらまだ満足すべき方法は確立されていない。要は X 線から得られた原子座標  $X_i^c$  と求める座標  $X_i$  との差を出来るだけ小さく、すなわち

$$\Delta = \sum_i (X_i - X_i^c)^2 \quad (1)$$

の形で  $\Delta$  を小さく、かつ負のエネルギーを得るような解を求めることであって、きわめて単純なようにみえる。しかし問題が多変数であるため、すぐに局所的な極小に入り、なかなか唯一の解が求められない。第一に解が唯一であるかどうかも未知である。

我々のところで用いた一つの方法<sup>9)</sup>は蛋白質の原子座標をそのまま合わせる (1) 式のかわりに原子対間の距離を合わせる道をとることである。i 原子と j 原子の距離を  $C_i^{\alpha}$  と  $C_j^{\alpha}$  の距離で代表し結晶解析から得られる  $r_{ij}^c$  と二面角  $\varphi, \psi$  を与えて得られる  $r_{ij}$  の差を最小にするよう  $\varphi, \psi$  の組を定めるという操作である。ただこの方法ではペプチドの平面が実験値と近いかどうかかわらず、一応エネルギー的に負の conformation が得られているが、現在更にこのペプチド面まで合わせて、 $\varphi, \psi$  の値が唯一の値に収斂するかどうかを検討中である。

## (5) 立体構造の比較

前述のように原子座標は細部にわたる議論を対象としないならば、いろいろな構造の

10)  
 検討に使うことができる。その一例が相似的な蛋白質の立体構造間の比較<sup>10)</sup>である。すなわち一次構造をかえて conformation を調べるかわりに、自然がかえた一次構造がどのように立体構造に反映しているかを比較してみることである。現在このような研究につかえる蛋白質は、ヘム蛋白質であるヘモグロビン $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、ミオグロビン、またチトクローム系統のチトクロームc、チトクロームc5、それにセリン酵素のキモトリプシン、トリプシン、エラスターゼの3種類の蛋白質群があり、それぞれX-線によって構造がきめられている。

例としてヘモグロビンの $\alpha$ -鎖と $\beta$ -鎖をあげよう。図2、3にその立体構造を距離のマップとしてあらわしてある。この図は縦軸と横軸にN-末端からの残基番号をとりi番目とj番目のますに $C_i^\alpha$ と $C_j^\alpha$ 間の距離 $r_{ij}$ をかきこみ、 $r_{ij}$ が $10 \text{ \AA}$ 以下のものは黒く塗り $r_{ij}$

$35 \text{ \AA}$ より大きいものはそのままかこんで図示してある。このようにすると原子対の近い部分は黒い領域として表現され、相互作用をする可能性のある対としてその分布がわかりまた大体の立体構造が2次元として図示できる利点をもっている。両面を眺めると2つの構造がかなり似ていることがわかる。しかしよくみると

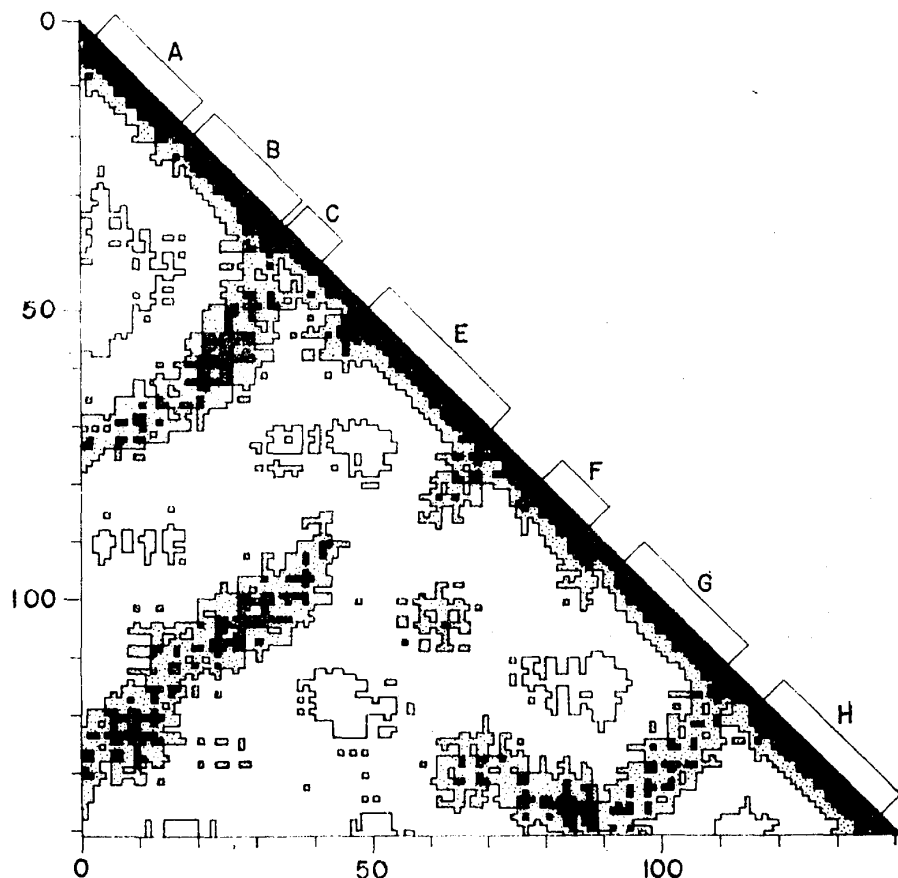


図2 ヘモグロビン $\alpha$ 鎖の距離のマップ

その違いに気付く。

対角線上 A, B, C  
とアルファベット  
がかかっているの  
はそれぞれ  $\alpha$ -ヘ  
リックス部分であ  
るが,  $\beta$ -鎖にあ  
る D-ヘリックス  
は  $\alpha$ -鎖には欠落  
している。にもか  
かわらずこの両者  
はパターンとして  
殆ど同じである。

立体構造の比較  
は実際に 2つの原  
子座標を重さね合  
わせてみればよい  
が,  $\alpha$ 鎖と  $\beta$ -鎖  
を比較して原子座  
標間の距離が  $2\text{\AA}$

以下であるような対応関係にあるアミノ酸残基を示したのが表 1 であって, ミオグロビンについても同時に示した。  $\beta$ -鎖とミオグロビンの D-ヘリックスを含む 11 残基の代りに  $\alpha$ -鎖の 5 残基で C-ヘリックスと E-ヘリックスの位置が合うようになっている点が注目される。

上の結果, またキモトリプシンとエラスターゼの比較, チトクロームの重さね合わせの結果を通じて一般的にいえることは, これら homologous な蛋白質で立体構造の同じ部分は蛋白質の内部にある残基であること, 特に違いが目立つ部分は鎖の折れまがりにみられることである。一次構造の似ている個所は大体同じような空間的配置をとっているが, これはすべてでない。すなわちあるきまった一次構造をもつ個所は必ずしも一

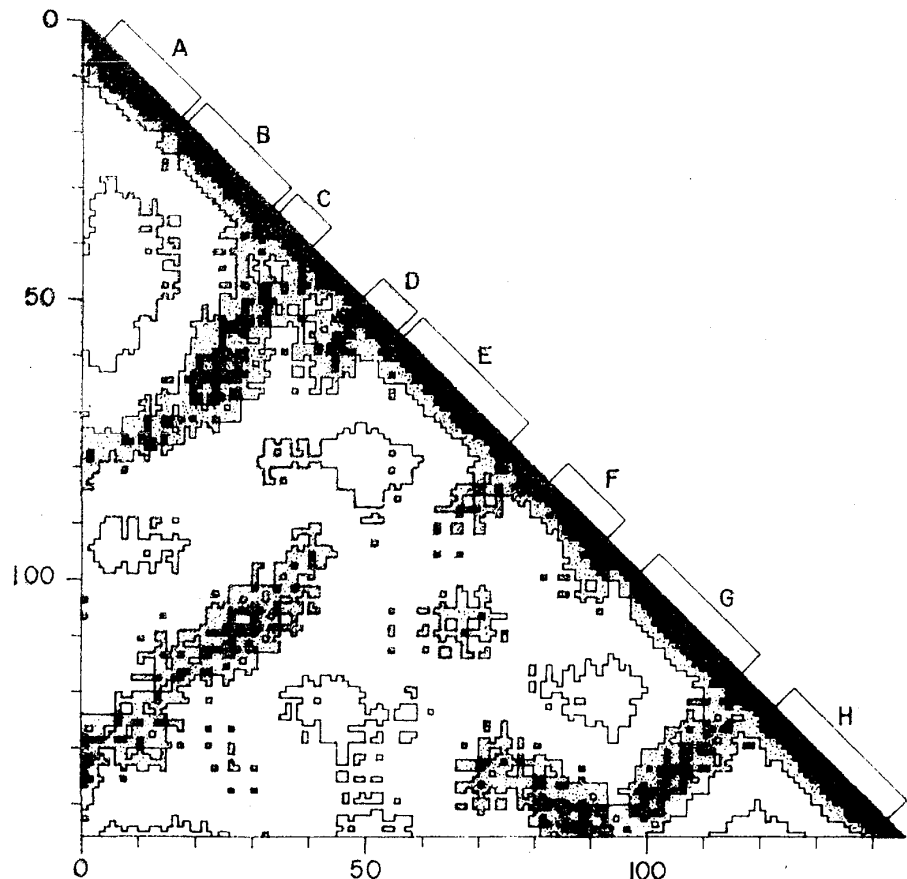


図3 ヘモグロビン  $\beta$ 鎖の距離のマップ

表1 Hb- $\alpha$ , H- $\beta$ , Mb の対応図

Table 1

	1	2	5	10	15	20	25	30																								
Hba:	V	-	L	S	A	A	D	K	T	N	V	K	A	A	W	S	K	V	G	G	H	A	G	E	Y	G	A	E	A	L	E	
Hb $\beta$ :	V	Q	L	S	G	E	E	K	A	A	V	L	A	L	W	D	K	V	N	-	-	E	E	E	V	G	G	E	A	L	G	
Mb:	V	-	L	S	E	G	E	W	Q	L	V	L	H	V	W	A	K	V	E	A	D	V	A	G	H	G	Q	D	I	L	I	
			35		40		45		50		60																					
Hba:	R	M	F	L	G	F	P	T	T	K	T	Y	F	P	H	F	-	D	L	S	H	-	-	-	-	G	S	A	Q			
Hb $\beta$ :	R	L	L	V	V	Y	P	W	T	Q	R	F	F	D	S	F	G	D	L	S	N	P	G	A	V	M	G	N	P	K		
Mb:	R	L	F	K	S	H	P	E	T	L	E	K	F	D	R	F	K	H	L	K	T	E	A	E	M	K	A	S	E	D		
			65		70		75		80		85		90																			
Hba:	V	K	A	H	G	K	K	V	A	D	G	L	T	L	A	V	G	H	L	D	D	L	P	G	A	L	S	D	L	S		
Hb $\beta$ :	V	K	A	H	G	K	K	V	L	H	S	F	G	E	G	V	H	H	L	D	N	L	K	G	T	F	A	A	L	S		
Mb:	L	K	K	H	G	V	T	V	L	T	A	L	G	A	I	L	K	K	K	G	H	H	E	A	E	L	K	P	L	A		
			95		100		105		110		115		120																			
Hba:	N	L	H	A	H	K	L	R	V	D	P	V	N	F	K	L	L	S	H	C	L	L	S	T	L	A	V	H	L	P		
Hb $\beta$ :	E	L	H	C	D	K	L	H	V	D	P	E	N	F	R	L	L	G	N	V	L	A	L	V	V	A	R	H	F	G		
Mb:	Q	S	H	A	T	K	H	K	I	P	I	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	I	H	V	L	H	S	R	H	P		
			125		130		135		140		145	147																				
Hba:	N	D	F	T	P	A	V	H	A	S	L	D	K	F	L	S	S	V	S	T	V	L	T	S	K	Y	R					
Hb $\beta$ :	K	D	F	T	P	E	L	Q	A	S	Y	Q	K	V	V	A	G	V	A	N	A	L	A	H	K	Y	H					
Mb:	G	N	F	G	A	D	A	Q	G	A	M	N	K	A	L	E	L	F	R	K	D	I	A	A	K	Y	K					

定の三次構造をとることは限らない。こういった結果から一次構造上遠くはなれた部分の相互作用が最終的にその蛋白質の最後の形を定めているように見える。

立体構造の比較はこれから出る新しい原子座標を利用してその相異と一次構造との関係から、未知の蛋白質でもそれに似た蛋白質の座標がきめられれば推定できる可能性がある。

### (6) 蛋白質のエネルギー計算

X線解析による原子座標は正確でなくエネルギー計算には不適當であるが、大よそのエネルギーを評価することは可能である。この場合、大きい結合角のひずみや、数ヶ所

郷 信広, 武富 敬, 上田裕三, 郷 通子, 大畠玄久, 高橋 敏, 大井龍夫

にみられる立体障害には目をつぶることになる。リゾチームについて非共有結合エネルギーマップは大體距離のマップで  $r_{ij}$  を  $8 \sim 10 \text{ \AA}$  以内にある対を考慮したパターンと同じになる。側鎖の原子まで含めたエネルギー計算でもこのように大凡のパターンが一致することは、非共有結合が近距離力であるためである。全エネルギーの内容をしらべてみると、ある残基を中心に  $\pm 10$  残基間の相互作用、特に隣接残基間の相互作用は全体の  $\frac{2}{3}$  に達し、一次構造上離れた残基間の相互作用はそれ程大きくない。恐らく近距離力のみを考慮したのでこのような結果が得られたのであろうが、三次構造の決まる過程での、互に近い残基間、 $10 \sim 20$  残基程はなれた中程度の残基間に働らく相互作用は、後述の核化過程と関連してかなり重要な役割を果しているように思われる。

勿論上の計算は不正確な原子座標を用いているので最終の結論は座標が精密化されるまでまたねばならないが、大きな差はないだろうと予想される。

立体構造の解析についての問題点は前述のようにいくつかあり、これからの発展を期している。

### § III 転移現象とゆらぎ

蛋白質の特異的立体構造の特質を理解するために conformational analysis の立場からはエネルギーを主に考慮することになるが、局所的なエネルギー極小の問題はいつもつきまとう困難である。ここで視点をかえ蛋白質の変性・再生に伴う転移現象を現象論的に理解する方向を考えよう。この立場ではゆらぎと転移現象との結びつきを明らかにし、かつ系を抽象化して統計力学の対象とすることである。そのためには原子座標を利用せず、むしろ格子模型を導入して簡単化することも必要である。そしてゆらぎは系の力学的性質と密接な関係にあり、以下球状蛋白質を対象とし記述をすすめよう。

#### (1) 球状蛋白質の力学的構築

いま、高分子の立体構造を記述する独立変数の組を  $Q = (q_1, q_2, \dots, q_n)$  とし、 $Q$  の関数である conformational energy を  $F(Q)$  とする。(溶媒中の高分子についても、この量は考えることができるが、<sup>11)</sup> その時には、正確には energy ではなく free energy である。)  $Q$  で表わされる立体構造における、ある幾何学的な量(例えば、分子中のどこかの長さとか、角度等)を  $L(Q)$  とし、これに共役な力を  $f$  とし



よう。力  $f$  が作用していない時の分配関数は

$$Z = \int \exp [-\beta F(Q)] dQ \quad (2)$$

$f \neq 0$  の場合の分配関数は

$$Y(f) = \int \exp [-\beta \{ F(Q) - fL(Q) \}] dQ \quad (3)$$

で与えられる。今、外力  $f$  が加えられている時の物理量  $A$  の期待値を  $\langle A \rangle_f$ 、外力のかかっていない時のそれを  $\langle A \rangle_0$  とすると、

$$\langle L \rangle_f = \frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln Y(f)}{\partial f} \quad (4)$$

で与えられる。 $f$  を小さいとして、(3)で  $f$  についての展開を行なうと次式が得られる。

$$\langle L \rangle_f = \langle L \rangle_0 + \beta f \langle (L - \langle L \rangle_0)^2 \rangle_0 \quad (5)$$

この生体高分子の力学定数は、 $\langle L \rangle_f$  の  $f$  による微分として定義される。すなわち、

$$\frac{\partial \langle L \rangle_f}{\partial f} = \langle (L - \langle L \rangle_0)^2 \rangle_0 / kT \quad (6)$$

この式の大切な所は、力学定数が、外力の加わっていない時の  $L$  のゆらぎの 2 乗平均によって与えられることにある。よって、外力のかかっていない時のゆらぎが計算されると、それを、生体高分子の力学定数に、(6)を用いて翻訳することができる。すなわち、蛋白質の立体構造のゆらぎの研究は、ある意味では、蛋白質の力学的性質の研究と等価である。

さて、蛋白質と基質あるいはリガンド（以下単に基質と言う）との結合について、induced fit という考えがある。これは、基質が蛋白質の新しい立体構造を induce（誘起）して、それに結合すると言うものである。このような現象は、conformational energy  $F(Q)$  の極小の位置  $Q_0$  と、基質と蛋白質との結合定数  $K(Q)$  が極大となる位置  $Q_1$  が異なっていれば生じる。基質と蛋白質の複合体における蛋白質の立体構造は、 $Q_0$  と  $Q_1$  の間の点  $Q_2$  のまわりに分布し、ゆらいでいるであろう。点  $Q_2$

郷 信広, 武富 敬, 上田裕三, 郷 通子, 大島玄久, 高橋 敏, 大井龍夫

で与えられる立体構造は,  $F(Q)$  の極小点  $Q_0$  からずれているから,  $F(Q_2) - F(Q_0)$  だけ歪みのエネルギーが蛋白質に貯えられていることになる。この歪みのエネルギーは蛋白質のどこに貯えられているであろうか? Hopfield<sup>12)</sup> は, ヘモグロビンにおけるサブ・ユニット間の協力の自由エネルギーについて, この問題を考察し, 複合体では, 蛋白質は, 全体にわたってほんの少しだけ歪んだ状態にあり, この歪みのエネルギーの総和が協力の自由エネルギーであると考えて, いくつかの現象を説明している。しかし球状蛋白質内部の力学的性質は, 一般には, かなり不均一と考えられるから, 上の歪みのエネルギーが蛋白質分子内に比較的均一に分布するという考えは吟味してみる必要がある。このことについて考察を進めるために, 自然長, 強さの異なったいくつかのバネを1次元的につないだ系を考える。i番目のバネの自然長を  $\ell_i$ , 強さを  $k_i$  とする。全体の自然長は  $L = \sum_i \ell_i$  であるが, これを  $\Delta L$  だけ伸ばした時, i番目のバネに貯えられるエネルギー  $\epsilon_i$  は, 簡単な計算によって

$$\epsilon_i = \frac{(\Delta L)^2}{2 k_i} \bigg/ \left( \sum_i \frac{1}{k_i} \right)^2 \quad (7)$$

と求められる。すなわち, 貯えられるエネルギーは, バネの強さに反比例する。エネルギーは, バネの弱い所に貯えられる。球状蛋白質は, バネ系とみるとすれば, それは非常に不均一なバネ系であろう。するとエネルギーは弱いバネに集中する。そのような弱いバネ結合は, 多くのエネルギーを貯えるくらい歪んだら, すぐに非線型性を現わすのではないか? これらの問いに答えて行くことが, 酵素作用を物理的に理解してゆく1つの道であろう。蛋白質中の  $\alpha$ -ヘリックス構造,  $\beta$ -シート構造は, 今までのところ多く, folding の過程との関連において論じられているが, 出来上がった生の球状蛋白質中で, これらの構造が柱や壁のような力学的構造物として働いている可能性を調べてゆくの, その1つの具体化ではなからうか? 本節では, 球状蛋白質を力学的に設計・構築されたものと考え, その中での  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シートの役割を追求していこうという考えが述べられた。その為の第1歩として,  $\alpha$ -ヘリックスのゆらぎの計算を次節で述べる。

(2)  $\alpha$ -ヘリックスのゆらぎ

poly-L-alanine のヘリックス構造に対して計算されたエネルギー地図は、 $(\phi, \psi) = (132^\circ, 123^\circ)$  に極小点  $Q_0$  をもつ。<sup>3)</sup> すなわち、すべての  $\phi_i$  が  $132^\circ$ 、すべての  $\psi_i$  が  $123^\circ$  の値をもつ規則的ヘリックス構造がエネルギーの極小構造である。しかし、実際のヘリックス構造は、この規則的ヘリックス構造のまわりにゆらいでいる。このゆらぎは、一般には、ヘリックスの対称性すなわち  $\phi_1 = \phi_2 = \dots = \phi_n$  および  $\psi_1 = \psi_2 = \dots = \psi_n$  を壊す。そのため  $n$  個のアミノ酸残基からなるヘリックス構造の小さなゆらぎを知るには、 $F(Q)$  の  $Q = Q_0$  の付近の様子を、ヘリックス構造のみに対応する 2 次元内のみでなく、規則的なヘリックス構造からはずれも許す  $2n$  次元空間で知る必要がある。  $2n$  次元空間における極小点付近の  $F(Q)$  の様子は、 $F(Q)$  の  $Q = Q_0$  における 2 次微分行列を求めることによって分かる。二面角  $\phi, \psi$  を統一記号  $\theta$  で表わし、その極小点からのずれを  $\Delta \theta_i$  で表わすと、conformational energy は、極小点の付近で 2 次関数で近似されるであろう。

$$F = F_0 + \frac{1}{2} \sum_{i,j} f_{ij} \Delta \theta_i \Delta \theta_j \quad (8)$$

ホモ・ポリペプチドの  $\alpha$ -ヘリックスについては、 $f_{ij}$  はヘリックス・コイル転移の分子論を作るさい、ポリペプチド分子内に働く分子内力に関する知見に基いて計算された。<sup>13), 14)</sup> この  $f_{ij}$  を用いると、 $\alpha$ -ヘリックス構造における角度のゆらぎの相関が、

$$\langle \Delta \theta_i \Delta \theta_j \rangle = kT f_{ij}^{-1} \quad (9)$$

と求められる。ここで  $f_{ij}^{-1}$  は、行列  $\mathbf{F} = (f_{ij})$  の逆行列  $\mathbf{F}^{-1}$  の  $i, j$  成分である。図 4, 5 にその結果<sup>15)</sup>を示す。

角度のゆらぎは数度から 10 度近くあり、これはかなり大きい。水素結合により束縛される 6 つの内部回転角が互いに違う方向にずれることによって、 $\alpha$ -ヘリックス構造から大きくずれることを防いでいる。角度のゆらぎの相関が、両側に約 15 残基くらいまでひろがっていることも注意に値する。このゆらぎの計算をもとに、 $\alpha$ -ヘリックスの力学的性質を調べる仕事は現在進行中である。

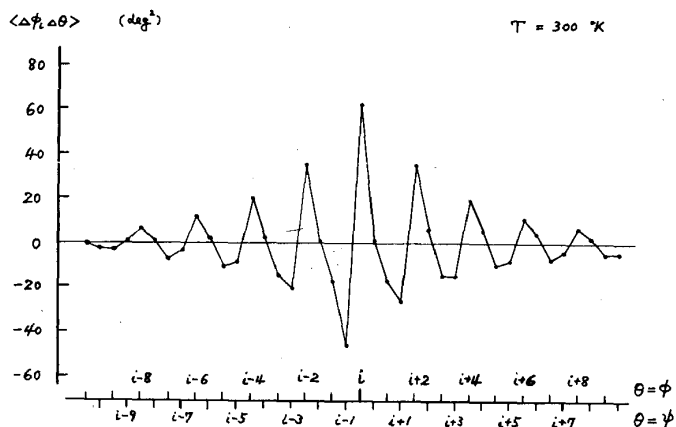


図4  $\alpha$ -ヘリックスの back bone の二面角のゆらぎの 相関 : poly-L-alanine (300°K)

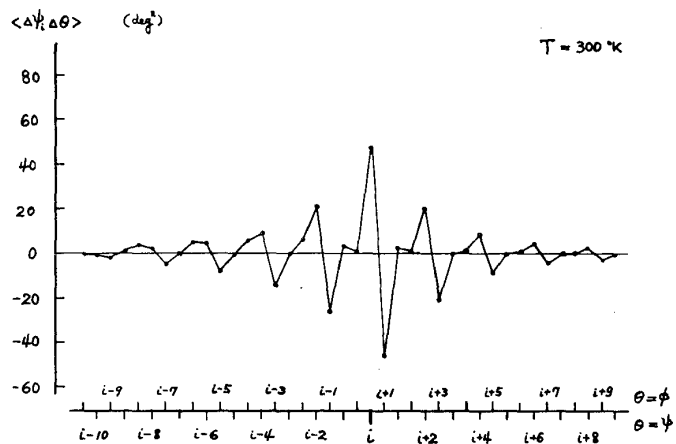


図5  $\alpha$ -ヘリックスの back bone の二面角のゆらぎの 相関 : poly-L-alanine (300°K)

### (3) 変性・再生現象の現象論

高分子の分配関数は, conformational (free) energy  $F(Q)$  を用いて(2)式で与えられる。この free energy を, enthalpy 項と entropy 項に分けよう。

$$F(Q) = H(Q, T) - TS(Q, T) \quad (10)$$

次に, 分配関数を求める積分を2段階に分けて行なう。

$$\begin{aligned}
 Z &= \int dQ \exp \left[ - \frac{H(Q, T) - TS(Q, T)}{RT} \right] \\
 &= \int d \left( \frac{H}{RT} \right) \exp \left( - \frac{H}{RT} \right) \exp \left( \frac{S(H)}{R} \right) \quad (11)
 \end{aligned}$$

ただし

$$\exp \left( \frac{S(H)}{R} \right) = \int dQ \exp \left( \frac{S(Q, T)}{R} \right) \delta \left( \frac{H(Q, T) - H}{RT} \right) \quad (12)$$

すなわち、 $Q$ -空間についての積分を、まず  $H(Q, T)/RT$  が、ある与えられた値  $H/RT$  をもつ超平面上のみで実行し、(12)式により  $S(H, T)$  を定義し、次に  $H/RT$  について積分して  $Z$  を求める。ところで、(11)式の被積分関数は、蛋白質がある与えられたエンタルピーの値  $H$  をもっている状態の統計重率、すなわち population に比例する量である。よって、この量の対数をとって  $R$  を掛けた量  $S(H, T) - H/T$  を考えると、蛋白質は、この量が maximum となる  $H$  をもつ状態に存在する確率が一番大きい。よって  $S(H, T)$  の形が分かれば、蛋白質が温度とともに、いかに変性するかが分かる。

次に、蛋白質の変性について極めて一般的なモデルを導入し、それについて  $S(H, T)$  の形を議論し、それが all-or-none 的に変性することを示す。<sup>16)</sup> この議論から蛋白質の変性の all-or-none 的な性格の本質を知ることができる。all-or-none 的でない変性過程をもつ蛋白質も実験的に問題になっているが、ここでは all-or-none 的な性格の転移を prototype と考え、その理解が理論建設の第一歩であるという立場に立つ。

与えられた球状蛋白質の取り得る任意の立体構造は、球状部分とコイル部分とから成っているものとする。球状部分の自由エネルギーは主としてエネルギー的で、それを作っているアミノ酸残基の数  $m$  の関数  $[ \equiv \epsilon(m) ]$  として与えられるものと考え、コイル部分の自由エネルギーは主としてエントロピー的で、それを作っているアミノ酸残基の数  $(N-m)$  ( $N$  は、蛋白質分子中の全アミノ酸の数) に比例するものとする。 $H \cong \epsilon(m)$  は次に述べる考察から、図6のごとく上に凸の曲線であると言える。変性途中の任意の球状部分は、図7のような shell 構造をとっており、エネルギー密度は

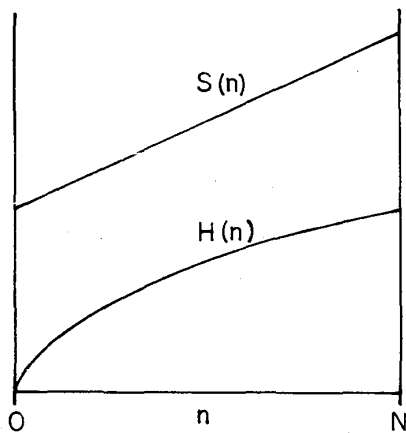


図6 H-n, S-n 曲線

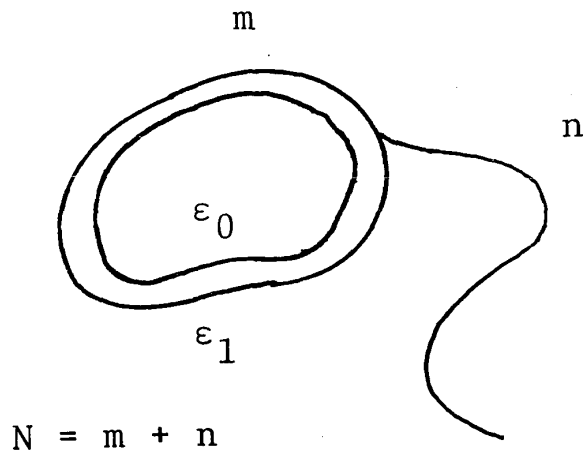


図7 shell 構造モデル

coreの方がshellのそれよりも大きいと考えてよい。shellの厚さは球状部分の大きさに関係なく、分子内力の距離くらい、すなわち、数Åくらいと考えられる。変性が進んで球状部分が小さくなるに従って、shellの占める体積が相対的に増大するために、曲線は上に凸になる。次に、蛋白質中のN個の全アミノ酸残基のうち、m個が球状部分を作る場合の数は小さく、簡単のため、極限的な場合として1つしかないと仮定する（立体構造と変性過程の特異性の仮定）。すると球状部分に含まれるアミノ酸残基の数がm個の時の、蛋白質分子のエントロピーは(N-m)に比例する（図6）。

図6の2つの曲線H-n, S-nからnを消去してS-Hの曲線を作ると、図8のごとく下に凸の曲線が得られる。

このS-H曲線をもとにS-H/T (populationの対数に比例)をいろいろのTに対してplotしたのが図9である。T > T<sub>m</sub>では変性状態(H at D)の、T < T<sub>m</sub>では生の状態(H at N)の確率が圧倒的で、T = T<sub>m</sub>では両者が半々に存在する（すなわちall-or-none的に転移する）。ここでは、Nをmと(N-m)に分ける分け方の数を1としたが、これは必

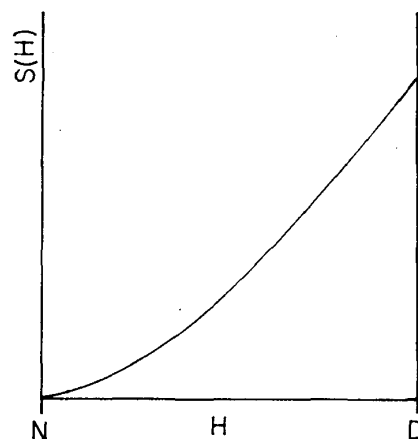


図8 S-H 曲線

ずしも必要ではない。しかし、この数が  $N/2$  付近であり大きくないと仮定することは本質的で、さもないと、この数から来るエントロピーで、図6の  $S-m$  曲線が上に凸になり、その結果図8の  $S-H$  曲線が上に凸になる可能性が生じる。その場合には、変性の中点  $T_m$  では個々の蛋白分子が半分変性している状態となり、転移は all-or-none 的でなくなる。

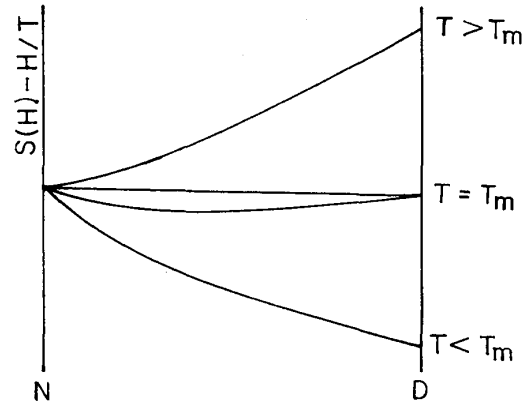


図9 all-or-none 的に転移が起こることを説明している。

#### (4) 蛋白質の格子模型と計算機実験

この節では、アミノ酸配列（1次構造）の heterogeneity を考慮に入れた蛋白質の格子模型を導入する。<sup>17)</sup> 格子は2次元正方格子（3次元の場合は立方格子）で、異なる segment が同一の格子点を占めることはないという形で、排除体積効果を採り入れる。segment 間に二体相互作用を仮定し、1次構造の heterogeneity は次のように採り入れる。  $i, j$  segment が格子上で隣り合う2点を占めた時、その組が図10で黒くぬりつぶした組である時は、引力が働くものとし、ぬりつぶしてない組の時は引力は働かないものとする。引力の大きさは、今は  $i, j$  の組によらず一定であるとする（相互作用の特異性）。これを解析的に計算することは難しいので、Monte-Carlo 法（Metropolis-Teller 法<sup>18)</sup>）による計算機実験を行なう。現在進行中の計算においては、図10のように表示される相互作用の特異性は次のようにして決めた。すなわち、まず特異的立体構造をもつ生の状態を格子上に仮定し、この構造状で隣り合っている segment の組のみ図10で黒くぬりつぶした。これは、いわば相互作用の特異性が最も強い極限であるが、反対に弱い極限として、図10で隣接しうるすべての組を黒くぬりつぶした場合、すなわち、すべての segment の組は、格子上で隣り合う点を占めれば非特異的に引力が働く場合を考えることができる。これは、Kronたちが扱ったモデルに相当し、彼らの計算機実験の結果によれば、<sup>19)</sup> 転移は all-or-none 的にならない。相互作用の特異性としては、上に述べた2つの極限の中間的なものを考え

することもできる。

このモデルは、蛋白質の変性・再生という転移現象の性格には、アミノ酸配列の heterogeneity およびそれによって生じる立体構造の特異性が本質的な影響を与えているとの観点に立ち、この点を強調し、他の点は思い切って理想化したものであるが、このモデルについての計算機実験から次の諸点の解明が期待される。① heterogeneous な 1 次構造の、転移の性格 (all-or-none 的か?) に及ぼす影響。② 変性・再生過程の kinetic process。③ 変性・再生過程における、および生の状態における立体構造のゆらぎ。④ 変性状態とは何か?

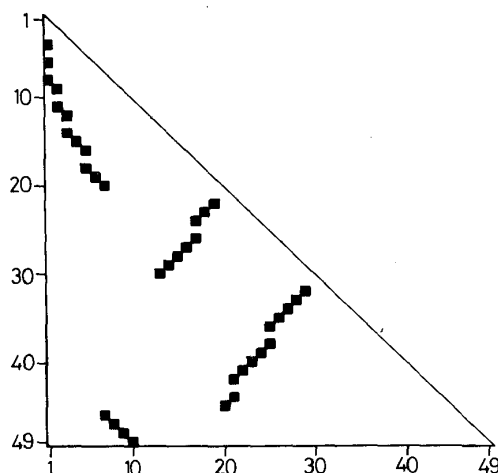


図 10 相互作用の特異性

① heterogeneous な 1 次構造の、転移の性格 (all-or-none 的か?) に及ぼす影響。② 変性・再生過程の kinetic process。③ 変性・再生過程における、および生の状態における立体構造のゆらぎ。④ 変性状態とは何か?

#### a. 計算機実験の結果

次に、2次元正方格子で、49 segments の場合に行なった計算機実験の結果について述べる。簡単のために、特異性が一番強い極限を  $SP=1$ 、特異性が無い極限を  $SP=0$ 、それらの中間で、隣接しうる組のうち全体の  $1/3$  を random に選んでぬりつぶした場合 ( $SP=1$  の場合の組も含めて) を  $SP=2/3$  と呼ぶことにする。

図 11 (a), (b), (c) に平衡での変性曲線を示した。縦軸  $\theta$  は、この体系の構造の秩序度で隣接する contact 数 (あるいはエネルギー) を  $m$  とした時に  $\theta = \langle m \rangle / m_{\max}$  で定義される。横軸  $T^*$  は、無次元化された温度で、引力の大きさを  $\epsilon$  とした時に  $T^* = T / \epsilon$  で定義される。  $SP=0$  の場合は、ほぼ同じ contact 数のレベルの所で揺いでおり、温度が上がるにつれて、その位置がだんだん下がるのが特徴である。  $SP=1$  の場合には、温度の上昇につれ、ある程度の試行回数で急激に秩序を失なう。図から読み取れるように、この変性曲線だけ見ても特異性の効果は明らかである。

前の変性・再生の現象論の項で述べたように、 $S(H)$  の  $H$  に対する依存性は、転移の性格を知る指標として重要であるが、これを図 12 (a), (b), (c) に示す。

$SP=0$ ,  $SP=1$  の両者の場合の相違は明白である。  $SP=0$  の場合は、曲線は上に



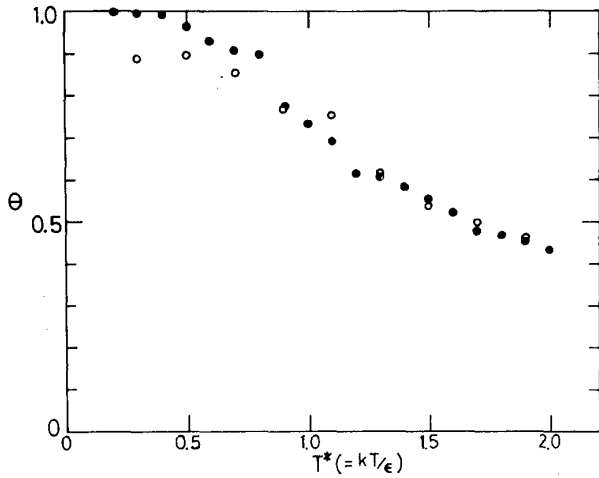


図 11 (a)  $SP=0$  の場合の変性曲線  
● は変性，○ は再生の data

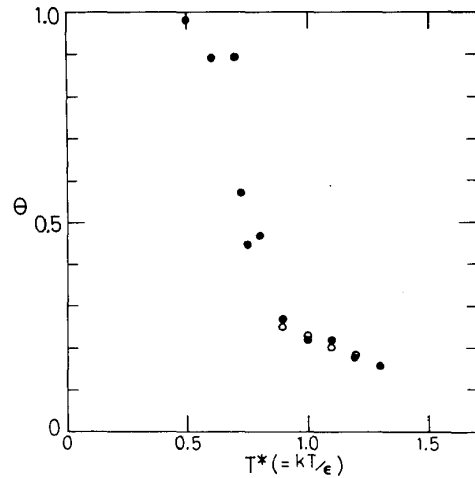


図 11 (b)  $SP=2/3$  の場合の変性曲線

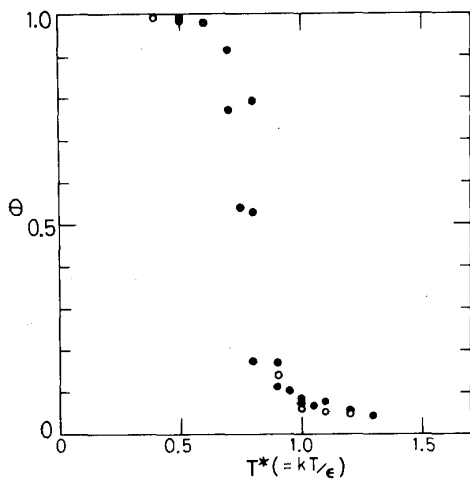


図 11 (c)  $SP=1$  の場合の変性曲線

凸で all-or-none 的な転移は示さない。それに対して  $SP=1$  の場合は、全体的に殆んど直線に近いけれども、(N) …… (生の状態) と (D) …… (変性状態) の中間付近で下に凸になっており、転移は all-or-none 的である。 $SP=2/3$  の場合も (N) に近い付近が下に凸なために、転移は all-or-none 的性格を示すが、(D) に近い付近が上に凸なために、変性状態とみられるところでの揺ぎは大きい。

に、転移の中間付近での状態分布を掲げた。

Kron たち<sup>19)</sup> の扱ったモデル (ここでの  $SP=0$  に相当) では出なかった状態分布の double peak が著しい特徴で、転移の all-or-none 的性格を端的に示す。

図 14 (a), (b) には、この体系の比熱の温度依存性を示した。比熱は転移点近くでの揺ぎを反映して、 $\lambda$  型の peak によく似た形を示す。

図 10 には、 $SP=1$  の場合の all-or-none 的転移の性格を更にはっきり示すため

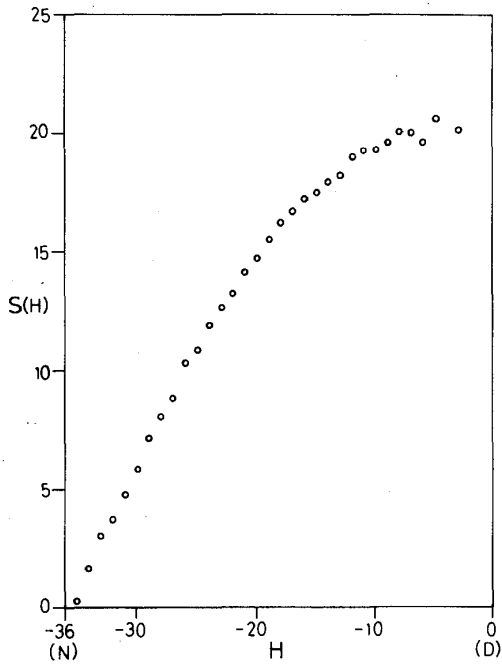


図 12 (a)  $SP=0$  の場合の  $S(H) - H$  曲線

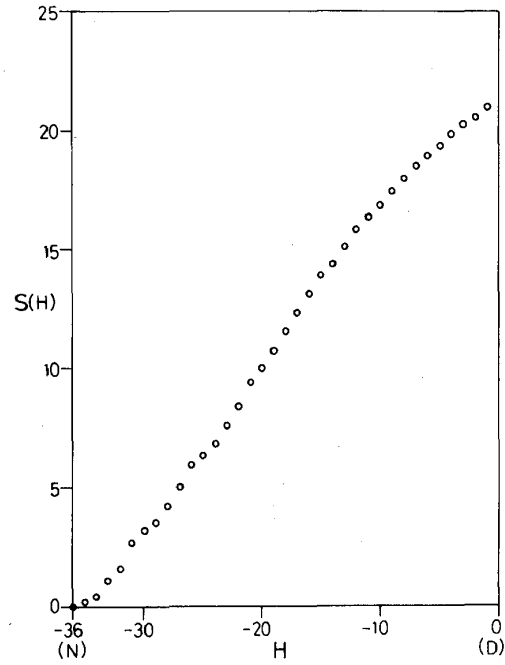


図 12 (b)  $SP=2/3$  の場合の  $S(H) - H$  曲線

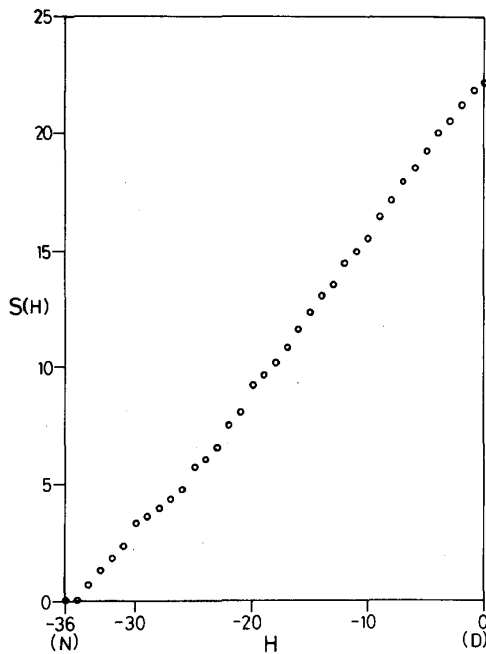


図 12 (c)  $SP=1$  の場合の  $S(H) - H$  曲線

### (6) 議 論

次に、以上の結果をふまえて、計算機実験の目的に答える形で議論を行なう。

① heterogeneous な構造要素が転移の性格を決定するという新しい観点。この単純化したモデルが、実際の蛋白質のどのような面を抽象しているのか、問題の残るところであるが、少なくとも上記の観点を示す1つのモデルではあり、統計物理の中においても、あまり例のないものの1つだと思われる。蛋白質の変性・再生現象に対するモデルとしてみられるならば、その all-or-none 的性格にとって、heterogeneous な1次構造の影響

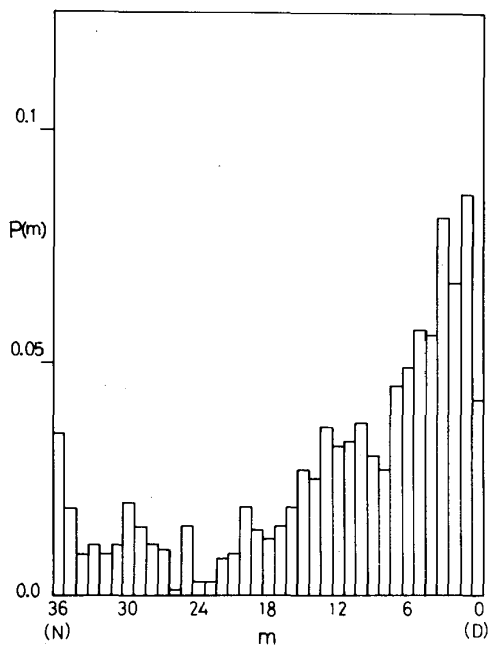


図 13 (a)  $SP=1, T^*=0.85$  での状態分布

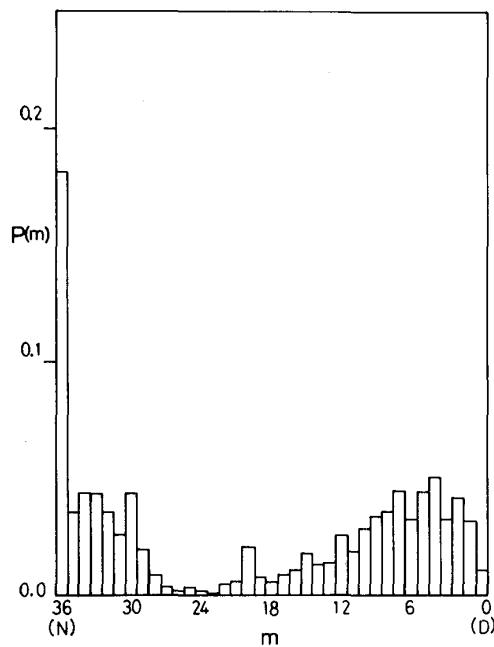


図 13 (b)  $SP=1, T^*=0.75$  での状態分布

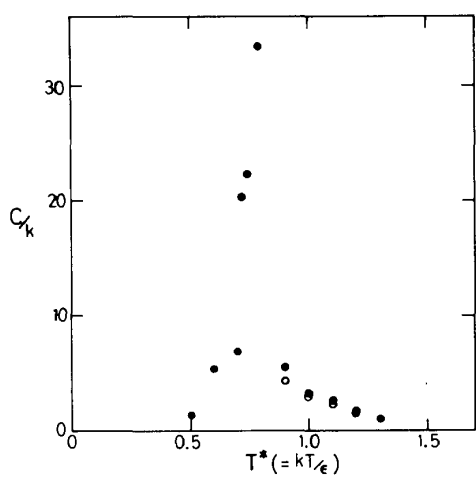


図 14 (a)  $SP=2/3$  の場合の比熱の温度依存性

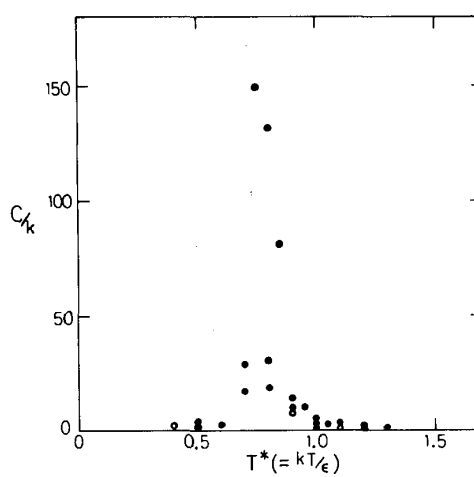


図 14 (b)  $SP=1$  の場合の比熱の温度依存性

● は変性， ○ は再生の data

響は本質的であるということが出来る。逆に, 実際の蛋白質は heterogeneous な要素 (アミノ酸) から成り立っていることを考えれば, all-or-none 的転移を変性・再生現象の prototype として捉える観点は, 重要な出発点であろう。

② 最近, 再生の過程に対して核形成の過程が重要視されてきた。この計算機実験においても,  $SP=1$  の場合に  $T^* \leq 0.6$  の範囲で, 直線状の初期状態から始めて指定した生状態に再生した。その過程では, ある出来やすい構造の部分が最初作られ, 生成消滅を繰り返しながら, ある critical な大きさの核に成長すると, 更に他の部分を引き寄せて安定化するという傾向が見られた。転移の midpoint に近づくと揺ぎが大きくなり, 試行回数を増しても再生しなくなるが, ある大きさの核をあらかじめ作って, そこから始めると再生する例がつくれた。これらは, 実際の蛋白質の folding に対して次のことを示唆する。蛋白質の特異的立体構造は熱力学的には, 1次構造の情報をもととして環境との相互作用を通じて自由エネルギー最小の原理で定まる。それは kinetic には, 核形成を rate limiting とする過程で, もちろん, その核形成には1次構造の heterogeneity が本質的役割を果たす。 $SP=2/3$  の場合には, 温度を下げても再生する例はなかった。 $m_{\max}$  の  $2/3$  位のレベルの所で局所平衡に落ち込んだように見える。相互作用する組を random に選んだために不正確な bond が作られ, そこから抜け出せないように見える。実際には, 特異性の空間は  $SP=1$  ほど極端でなくとも random ではなく, 自然に再生するように design されているのかも知れない。また, もう1つの可能性としては,  $SP=2/3$  であっても短距離力の効果 (すなわち2次構造の出来やすさ) を陽に考慮すれば, 結果が異なってくることは十分考えられる。

③ 蛋白質の立体構造における揺ぎは, その機能と関連して基本的に重要であると考えられているが, この計算機実験では, 変性曲線では生状態にあると考えられる状態でもかなり大きい揺ぎを示すことがある ( $SP=1$  の場合)。一般的傾向として, 特異性が弱くなるほど, 温度が高くなるにつれ, 揺ぎの幅は大きくなる。それらの定量的な一面は, 比熱の温度依存性に現われるが, それによれば, 特異性が強いほど転移の midpoint 付近での (それ以外の温度に対する) 相対的 peak は高い。これも all-or-none 的転移の一端をうかがわせる。

④ 2次元の場合には, 2次構造と見れる所がはっきりしないし, また, その効果を陽には採り入れてないので, 変性状態で構造が残っているかどうか, はっきり見ることは

出来ないが、系統的に秩序が残っているようには見えない。

(c) 今後の問題点

2次元

(i) 疎水結合の効果を顕わに採り入れて(すなわち、各 segment を親水、疎水の2種に大別) 転移の性格をみる。現在進行中である。

(ii)  $SP=1$  という、いわば極限的な特異性の状態以外に、再生の可能性はないのか。あるいは再生するためには、特異性の空間に何らかの構造が必要であるのか、ないのか。また、さほど特異性は強くなくとも、2次構造の効果を顕わに取り入れれば、再生の可能性が生じるかといった事の解明。

(iii) 上に述べた結果は、すべて1つの生の構造を仮定して実験した。この生の構造を他の形に変化させれば、何か影響があるかどうかをみる。更に2次元の場合、特に、それは1つの variation として  $\beta$ -構造 - random coil の転移のモデルになりうる。

3次元

立方格子上に Lysozyme に似せたモデルをとった計算が現在進行中である。

(i) 次元の違いが、何か本質的役割を果たすことがあるかどうかをみる。

(ii) 3次元のモデルでは、 $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -構造などの2次構造も、きちんと考慮されている。この事から、その効果をうまく取り込めば、核形成の際に何が核となるか、それらの集まり具合はどうか、核が安定に成長するための critical な大きさはどれ位か、再生に対して何か決まった path がありうるのかどうか、といった問いに答えることができる可能性がある。

(iii) 変性状態についても、何か構造(2次構造、あるいはその変種)が残ることがあるかどうかは、2次元の場合よりは、はっきりさせられる。

IV 結 び

蛋白質およびポリペプチドの立体構造に関して我々の行っている研究を紹介してきたが、蛋白質の系は有限個の原子からなる集合体であるため取扱いが簡単でない。したがって始めにも述べたようにいろいろな面から研究する必要がある。これが今後の課題と

郷 信広, 武富 敬, 上田裕三, 郷 通子, 大嶋玄久, 高橋 敏, 大井龍夫

もいえるかもしれない。

なお本研究は京都大学基礎物理学研究所モレキュール型研究, および文部省科学研究費の補助をうけて行なわれた。

#### 参考文献

- 1) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Vol. 36
- 2) B.Pullman, Colloque International de CNRS (1971) 261
- 3) T.Ooi, R.A.Scott, G.Vanderkooi & H.A.Scheraga, J.Chem. Phys. (1967) 46 4410
- 4) K.D.Gibson & H.A.Scheraga, Physiol. Chem. & Phys. (1969) 1 109
- 5) S.Takahashi, Bull. Chem. Soc. Japan (1969) 42 521, T.Iio & S.Takahashi, *ibid* (1970) 43 515, Biopolymer (1971) 10 1583
- 6) R.Diamond, J.Mol. Biol. (1974) 82 371
- 7) M.Levitt & S.Lifson J.Mol. Biol. (1969) 46 269, M.Levitt, J.Mol. Biol. (1974) 82 393
- 8) P.K.Warme, & H.A.Scheraga, Biochem. (1974) 13 757
- 9) K.Nishikawa, T.Ooi, Y.Isogai, & N.Saito, J.Phys. Soc. Japan (1972) 32 1331, K.Nishikawa, T.Ooi, *ibid* (1972) 32 1338
- 10) K.Nishikawa & T.Ooi, J.Theo. Biol. (1974) 43 351
- 11) N.Go & H.A.Scheraga, J.Chem. Phys. (1969) 51 4751
- 12) J.J.Hopfield, J.Mol. Biol. (1973) 77 207
- 13) M.Go, N.Go, & H.A.Scheraga, J.Chem. Phys. (1970) 52 2060
- 14) N.Go, M.Go, & H.A.Scheraga, Macromolecules (1974) 7 137
- 15) 郷 通子, 郷 信広, 第12回日本生物物理学会一般講演会予稿集 p. 58
- 16) 郷 信広, 武富 敬, " " p.227

- 17) 武富 敬, 郷 信広, 第12回日本生物物理学会一般講演会予稿集 p. 228
- 18) N.Metropolis, A.W.Rosenbluth, M.N.Rosenbluth, A.H.Teller & E.Teller, J.Chem. Phys. (1953) 21 1087
- 19) A.J.Kron, O.B.Ptitsyn, A.M.Skvortsov & A.K.Fedorov, Mol. Biol. (1967) 1 576