

蛋白質のガラス状態

やまと たかひさ ごう のぶひろ
倭 剛久、郷 信広 (京大・理・化学)

1. はじめに

蛋白質^{a)}の三次元立体構造は複雑である。そして蛋白質は、履歴現象¹⁾や遅いダウニング^{b)1,2)}をみせる。蛋白質のこのような物性は、立体構造エネルギー-曲面の形状と関係している。蛋白質の立体構造エネルギー-曲面は多くの極小点を持ち、しかもそれらは階層的である、と我々は考えている^{c)1,2,3,4)}。

これまでに多くの実験家が、ある温度 T_g ^{d)} を境にして蛋白質の揺らぎの様子が変化することを確認している^{5,6)}。この事実は、蛋白質の揺らぎが T_g の上下で質的に異なっていることを意味する。我々は、 T_g 以下の温度では、蛋白質はガラス状態にあると考えている。

複雑系の振る舞いの原子レベルでの記述は、計算機実験が適している。野口らは、ウシ脾臓トリグリンインヒビター-(BPTI)^{e)} のモンテカルロシミュレーションを行なった。そして、そのサンプルの中からいくつかの構造を抽出してエネルギー-極小化を行なった^{f)}。その結果得られた極小構造の違いを、分子論的に解析した。

-
- a) 蛋白質には、大別して球状蛋白質と繊維状蛋白質がある。本稿では、話を球状蛋白質に限定する。
- b) 具体的には、非デバイ型の緩和過程で、その緩和関数が引き伸ばされた指数関数型で現されるものを指す。
- c) 異なったエネルギー-極小点に対応する蛋白質の構造は、conformational substates と呼ばれている。
- d) この温度が蛋白質のみで決まっているのではなく溶媒の種類にも依存していることから、Frauenfelderらは $T_{s,g}$ (slaved glass transition temperature) と呼んでいる。
- e) 蛋白質分解酵素 (プロテアーゼ) に結合して、その活性を阻害する機能を持つ。この蛋白質はアミノ酸58残基よりなる。
- f) このようにして得られたエネルギー-極小構造は、"蛋白質のInherent structure" とよぶことができる⁷⁾。

2. 実験

2. 1 蛋白質の揺らぎ

Parakらは、メスバウアー分光法を用いて、蛋白質中の原子揺らぎの温度依存性を調べた⁵⁾。図1を見ると、原子揺らぎの単位温度あたりの増加が、低温相 (T_L) で高温相 (T_H) に比べて小さくなっている。彼らはこの理由を、「蛋白質がエネルギー-曲面の多谷構造の中の谷にトラップされてしまい、揺らぎが抑圧されるためである」と説明している。エネルギー-曲面の多谷階層構造の各々の谷には、conformational substates (CS) が対応している (図2)⁶⁾。

2. 2 蛋白質の履歴現象¹⁾

蛋白質に高い圧力を加えると、その自由エネルギー-曲面の形状が変化する。そして、異なったCS間の遷移がおこる。Frauenfelderらは、蛋白質の構造に対する温度圧力効果を分光学的に研究した。彼らは、高温低圧状態 ($T_H P_L$) の蛋白質を(i)加圧+冷却、(ii)冷却+加圧、の2通りのプロセスで低温高圧状態 ($T_L P_H$) にした。そして、その終状態の蛋白質の吸収スペクトルの形状が2つのプロセスで異なっていることを見いだした。吸収スペクトルの形状の違いは、CSの分布の違いを反映している。この実験結果は、 T_H では許されていた加圧による遷移も T_L では許されなくなると考えれば説明できる。そして、エネルギー-曲面の多谷階層構造を裏付ける。

Atomic Fluctuation v.s. Temperature

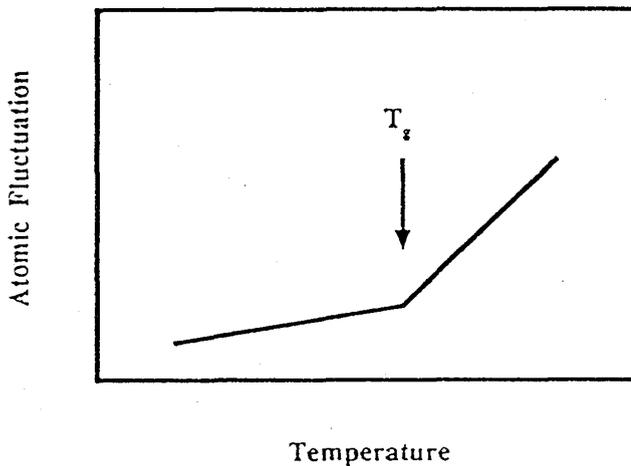


図1 原子揺らぎの温度依存性の概略図。
T_gは200K前後であることが多い。

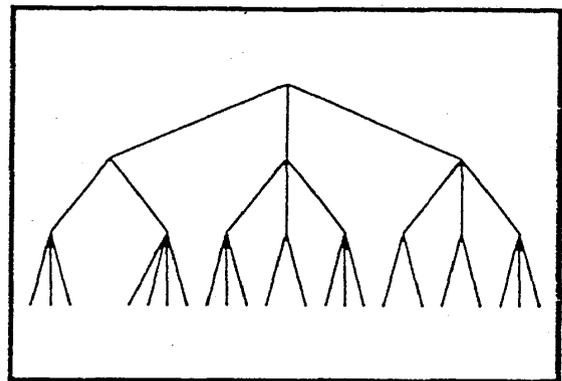


図2 Conformational substates の概念図。
Frauenfelderらは、蛋白質ミオグロビンの3つのsubstatesを分光学的に識別している。それらは、上図の第一の3つの分岐に相当している。それ以降の分岐の本数は、適当にかいてある。

⁶⁾ 高温相では、より高い階層間での揺らぎが可能である。この高い階層間での揺らぎが、蛋白質の生機能にとって重要であるという報告がある⁸⁾。

2. 3 蛋白質の遅いダイナミクス

2. 3. 1 圧力ジャンプ実験¹⁾

図2において、蛋白質ミグロビンの第一階層の3つのCSは赤外吸収スペクトルを用いて識別できる。そのスペクトルの各々の山の面積は、CSの分布状況を反映している。さて、 T_H において圧力を急激に変化させると、異なったCS間の遷移が起こる。そこで、Frauenfelderらは1つのスペクトルの山の積分面積の時間変化を調べた。そして、その緩和関数が”引き伸ばされた指数関数型”になることを見いだした。さらに彼らは、 T_L において、1つのピーク周波数の時間変化を調べた。そして、ここにも非デバイ型の緩和関数を見いだした。この結果は次のように解釈できる：第一階層のCSの下に第二階層のCSがある。そして、 T_L においても第二階層のCS間の遷移が起こり、ピーク周波数の変化が起こる^{h)}。

2. 3. 2 配位子結合反応²⁾

蛋白質ミグロビンの吸収スペクトルは、配位子の結合型と解離型とで異なっている。結合型のミグロビンに光子を照射すると配位子を解離させることができる。Frauenfelderらは、このFlash photolysis実験を利用して、配位子結合反応のkineticsを調べた。そして、非デバイ型の緩和過程を見いだした。

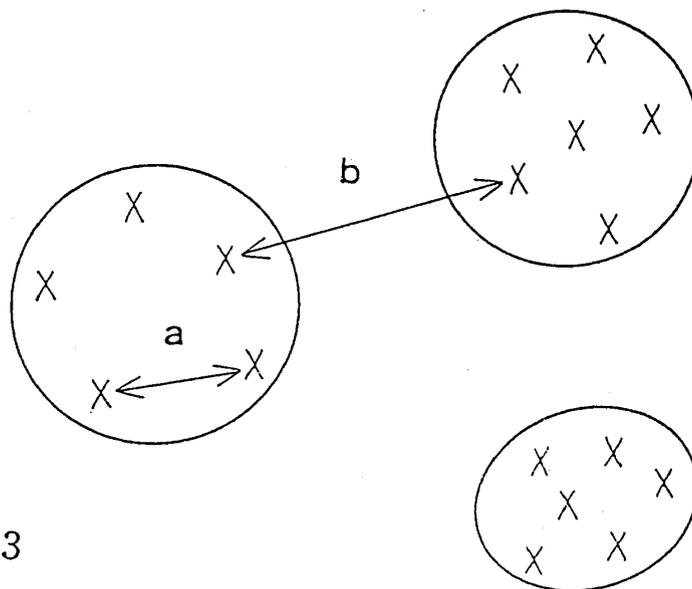


図3

A schematic illustration of the distribution of energy minima in the conformational space. A symbol, \times , represents an energy minimum, and each of clusters of minima is encircled. (a) A transition between minima within one cluster; (b) a transition between clusters.

^{h)} Frauenfelderらは、第三の階層のCSの存在も指摘している。ここでは詳細は省く。

3. 計算機実験³⁾

野口らはBPTIのモンテカルロシミュレーションを行なった。彼らは、室温50万ステップのシミュレーションで得られたサンプルの中からいくつかの構造を選び、エネルギー-極小化を行なった。エネルギー-極小化の結果得られた構造 (Minimum Energy Conformation; MEC) を解析してみると、面白いことが分かった。まず、MECはクラスターをなしていることである (図3)。彼らは9つのMECを解析し、それらを5+4の2つのクラスターに分類した。同一のクラスターに属するMEC間の平均二乗変位¹⁾は 0.1\AA^2 以下であるのに対し、異なったクラスターに属するMEC間の平均二乗変位は 0.4\AA^2 以上であった。次に、MECのクラスター内遷移とクラスター間遷移に伴う蛋白質の構造変化を分子論的に解析した。その解析のために、“原子のパッキングトポロジー”²⁾という概念を導入した。図4-1は、クラスター内遷移にともなう構造変化を示したものである。aはBPTIの全体像、bは局所的に構造変化を起こした箇所のワイヤ表示、cはパッキングトポロジーの変化した箇所を点で表示してある。cの変化が局所化していることが分かる。図4-2は、クラスター間遷移に伴う構造変化を示したものである。cの変化が蛋白質分子を縦断していることが分かる。図5のa, bは、それぞれ図4-1、4-2を模式的にあらわした図である。この2種類の構造変化とエネルギー-曲面の関係は、図6のようになっていると考えられる。

4. 蛋白質研究の利点

凝縮系の遅いダイナミクスを調べる上で、蛋白質は有利である。なぜならば、その三次元立体構造がよく調べられているからである。そして、分子論的な研究が可能である。

-
- 1) 蛋白質の2つの異なった構造を重ね合わせたときの、対応する原子の移動距離の二乗平均のこと。構造変化の大小をはかる一つの尺度。
- 2) 蛋白質内で原子の近隣関係を定義する概念。2つの原子がファンデルワールス半径の和の1.2倍以内であれば、そのペアはPAC(Pair of Atoms in Contact)であると定義する。そして、蛋白質の2つの構造のPACの和集合をとる。その集合の要素で、原子間距離が蛋白質の構造変化に伴って 0.5\AA 以上変化したペアは、パッキングトポロジーが変化したという。蛋白質の構造変化は微視的に2種類のカテゴリに分類できる：(i)弾性変形、(ii)塑性変形である。(i)はパッキングトポロジーの変化を伴わない変形で、(ii)はそれを伴う変形であると分類することができる。

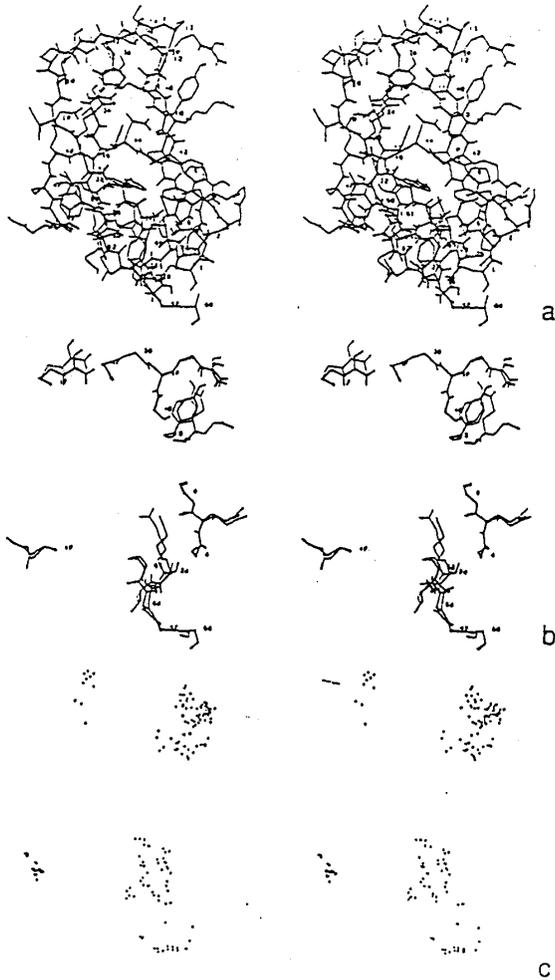


図 4-1

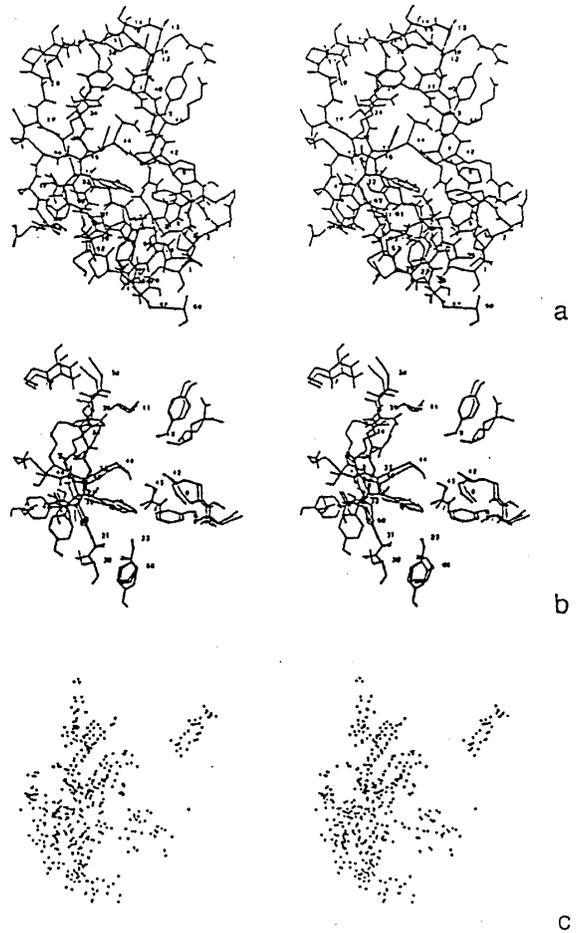
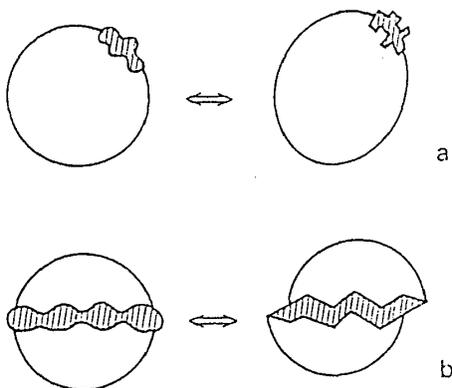
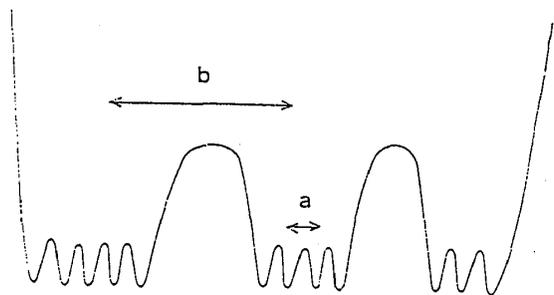


図 4-2



Schematic illustrations of collective conformational switching and subsequent deformation of the shape of the whole molecule. The collective conformational switching occurs in the shaded parts. (a) The collective switching occurs in a region consisting of a few residues near the surface of the molecule, and slight and elastic deformation is observed in the remaining part of the molecule. (b) The collective switching occurs in an extended region involving the core of the molecule, and the remaining two parts of the molecule move relatively to each other.

図 5



A schematic illustration of the structure of energy surface and the hierarchical structure of the protein dynamics. (a) A transition among minima within one of clusters of them, which is observed in fluctuations of the first level. (b) A transition between the clusters of minima.

図 6

参考文献

1. Frauenfelder, H., Alberding, N.A., Ansari, A., Braunstein, D., Cowen B.R., Mi, K.Y., Iben, I.E.T., Johnson, J.B., Luck, S., Marden, M.C., Mourant, J.R., Ormos, P., Reinisch, L., Scholl, R., Schulte, A., Shyamsunder, E., Sorensen, L.B., Steinbach, P.J., Xie, A., Young, R.D., Yue, K.T. Proteins and Pressure. *J. Phys. Chem.* 94:1024-1037,1990.
2. Steinbach, P.J., Ansari, A., Berendzen, J., Braunstein, D., Chu, K., Cowen, B.R., Ehrenstein, D., Frauenfelder, H., Johnson, J.B., Lamb, D.C., Luck, S., Mourant, J.R., Nienhaus, G.U., Ormos, P., Philipp, R., Xie, A., Young, R.D. Ligand binding to heme proteins: Connection between dynamics and function. *Biochemistry* 30:3988-4001,1991.
3. Gō, N., Noguti, T. Structural basis of hierarchical multiple substates of a protein. *Chemica Scripta* 29A:151-164,1989.
4. Elber, R., Karplus, M. Multiple conformational states of proteins: A molecular dynamics analysis of myoglobin. *Science* 235:318-321,1987.
5. Parak, F., Knapp, E.W., Kucheida, D. Protein dynamics. Mössbauer spectroscopy on deoxymyoglobin crystals. *J. Mol. Biol.* 161:177-194,1982.
6. Hartmann, H., Parak, F., Steigemann, W., Petsko, G.A., Ponzi, D.R., Frauenfelder, H. Conformational substates in a protein: Structure and dynamics of metmyoglobin at 80K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:4967-4971,1982.
7. Stillinger, F.H., Weber, T.A., Packing structures and transitions in liquids and solids. *Science*, 225:983-989,1984.
8. Rasmussen, B.F., Stock, A.M., Ringe, D., Petsko, G.A. Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220K. *Nature*, 357:423-424,1992.