

蛋白質・水系の階層的ダイナミクス^{*})

京都大学理学部化学教室 北尾 彰朗

(1993年5月31日受理)

1 蛋白質への理論的アプローチ

1.1 蛋白質の動的構造と機能

生体内ではさまざまな物質が機能し生命活動を維持している。様々な生体内物質の中でも、蛋白質は、最も重要な物質の1つである。蛋白質の種類は非常に多く、1つの種の生物の持っている蛋白質だけでも $10^3 \sim 10^4$ ほどの種類があると言われている。また、種類が多いだけでなく、その機能もまた多種多様である。このように多様な蛋白質それぞれが、巧妙にデザインされたメカニズムにしたがって運動し、その機能を果たす。その意味で蛋白質は、原子でできた分子の機械、分子機械であるといえる。この分子機械がどのように動いて、その機能を発現するのは非常に興味深い。

また、生命現象を考えるとときには、水の存在を忘れるわけにはいかない。実際、生物の体の大半は水である。分子機械としての蛋白質のはたらきも水と常に関係している。蛋白質の多くは、水溶液中に存在することによって構造が安定化され、その機能を果たしている。したがって、蛋白質を研究していくときには、水が蛋白質の構造や機能に対して果たしている役割を知る必要がある。

現在、蛋白質のアミノ酸配列(1次構造)と機能に関しては、多くの情報が蓄積されている(図1.1)。蛋白質のアミノ酸配列は、遺伝子暗号の中に情報として蓄えられている。遺伝子暗号はすぐにアミノ酸の配列として解読できる。近年、遺伝子暗号は精力的に解読されており、1次構造のわかっている蛋白質は 10^4 のオーダーである。一方、生物学的・化学的な機能についても、多くの蛋白質について知られている。しかし、蛋白質の1次構造から出発して、どのようなメカニズムで機能に結び付いているのかは、あまり明らかではない。したがって、このメカニズムを知ることは蛋白質の研究における最も重要な課題の1つであり、我々の興味もそこにある。

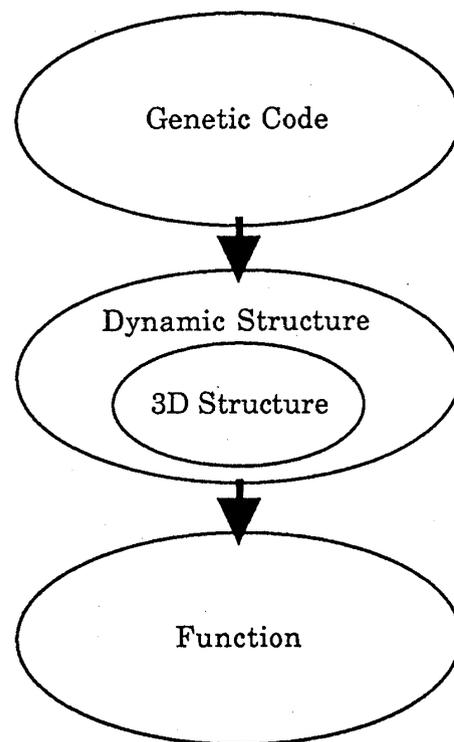
蛋白質の1次構造から出発して蛋白質の機能を理解していくためには、蛋白質の立体構造と、それに更に時間スケールを加えた動的構造を知ることが必要になる。蛋白質の立体構造は、階層的に1次構造、2次構造、3次構造、4次構造に分類される。

^{*}) 本稿は、編集部の方から特にお願ひして執筆していただいた記事である。

2次構造は、蛋白質主鎖の水素結合により安定化される α -ヘリックス構造や β -シートなどである。3次構造は、2次構造が更にコンパクトな形に折れ畳まった3次元立体構造を言う。また、いくつかの蛋白質分子が会合して構造を作っているものもあり、これを4次構造という。蛋白質内のそれぞれの原子の位置を実験的に決定する方法には、X線結晶解析・NMR・中性子散乱などがある。X線結晶解析は解像度が高く、現在知られている蛋白質立体構造の多くはこの方法で決定されている。しかし、今までに明らかになっている立体構造の数は、 10^2 ~のオーダーであり、既知の1次構造と比べると大きな違いがある。1次構造から高次構造を予測しようとする試みは、多くの場合データベース等を用いた経験的な手法を用いている。このように1次構造と蛋白質の立体構造の関係を理解することは、蛋白質研究の重要な分野の1つである。

しかし、3次元立体構造が決定されれば蛋白質の機能がすべて明らかになるわけではない。蛋白質の構造と機能の関係は、かつてはよく鍵と鍵穴の関係に例えられた。しかし、実際には蛋白質は原子レベルで熱運動をしており、現在ではこうした蛋白質のゆらぎが機能と大きくかかわっていることが明らかになってきている。

図1.1：遺伝子暗号から蛋白質の機能へいたる概念図



1.2 蛋白質の運動の時空スケール

常温での蛋白質の内部運動の時間スケールを図1.2に示した。通常我々が取り扱う蛋白質の運動の時間スケールはフェムト秒より遅い運動である。 10^1 フェムト秒~の時間スケールでは化学結合の結合長・結合角の振動がおこる。特に結合長の振動は $3800 \sim 2800 \text{ cm}^{-1}$ 程度の周期をもつ速い運動である。蛋白質のアミノ酸配列(1次構造)との機能であるこのような運動には量子的な効果が大きいので、蛋白質のシミュレーションでは、結合長・結合角をはじめから固定してする方法と、結合長・結合角のエネルギーを調和関数で近似する方法がある。これとは逆に、分子力学の分

野では、高次項や交差項を考慮することにより、この時間スケールの運動の精密化をはかっている。

～ 10^2 フェムト秒の時間スケール ($1000\text{ cm}^{-1}\sim 150\text{ cm}^{-1}$) では、二面角の微小振動がおこる。この運動は、結合長・結合角振動と比べると振幅はやや大きいはまだ局所的な運動である。

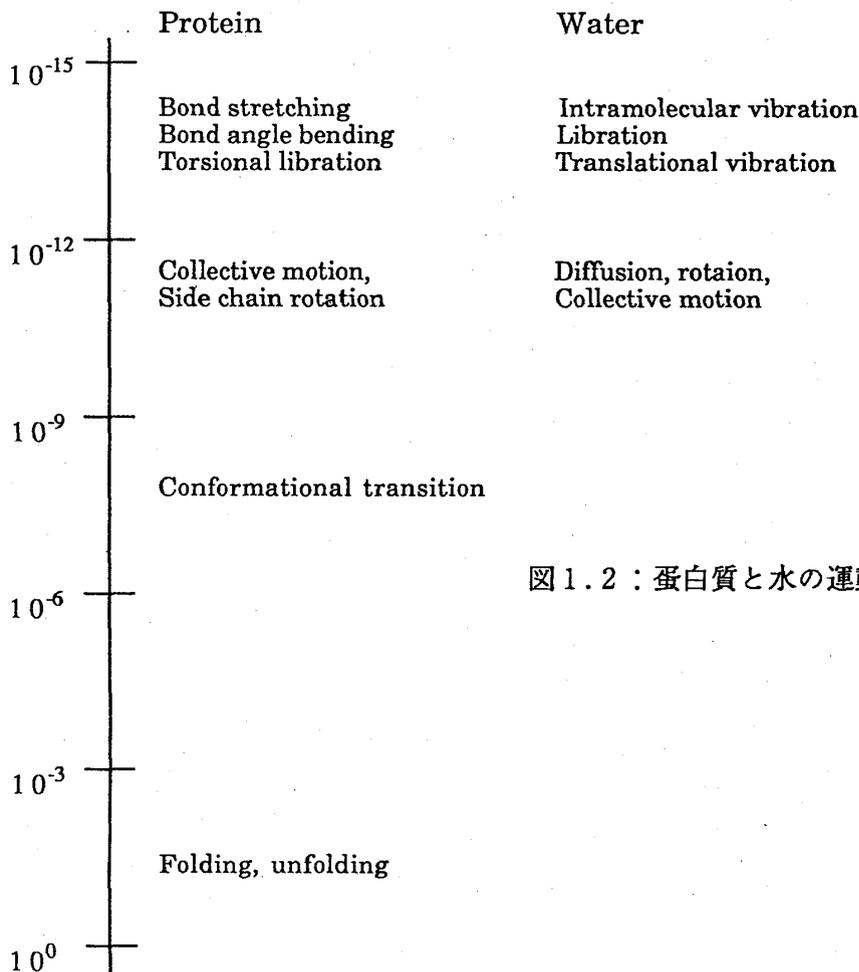


図 1.2 : 蛋白質と水の運動の時間スケール

10^2 フェムト秒～の時間スケール ($150\text{ cm}^{-1}\sim$) では、非局所的な運動がみられるようになる。この時間スケールの運動では蛋白質内の原子が集団的に運動する。このような運動は協調的運動 (Collective Motion) といわれ、蛋白質の運動のなかでも最も興味深いものの1つである。真空中の規準振動解析では、最低振動数は $2\sim 5\text{ cm}^{-1}$ 程度である。ピコ秒のオーダーからは弾性的ではなく塑性的な運動が現われてくる。表面に露出している側鎖の二面角の回転がおこるのはこの時間領域である。内部に埋もれている側鎖の二面角の回転の時間スケールはこれよりかなり遅いといわれて

いる。

10^2 ピコ秒以上のオーダーでは、分子内の原子のパッキングや水素結合の再構成を伴う大きな構造変化がみられることが、真空中のシミュレーションで観察されている。 10^{-5} ~ 10^1 秒の範囲では、蛋白質の折れ畳みや変性がおこる。この時間スケールの構造変化は、蛋白質の構造形成にかかわる重要な運動であり、近年主に実験的手法により精力的な研究がなされている。

1.3 液体の水の運動の時空スケール

次に、水の運動の時空スケールについて考えてみよう。図1.2には、室温での液体の水の運動の時間スケールを示した。 10^1 フェムト秒のオーダーでは水の運動は分子内の振動である。氷の水分子の場合には 3200 cm^{-1} 付近にO-Hの伸縮のモードが、 1600 cm^{-1} 付近にH-O-Hの変角のモードがみられる。しかし、計算機シミュレーションでは多くの場合分子内の自由度は無視する。

10^1 ~ 10^2 フェムト秒のオーダーでは水分子は水素結合や配向を変えない程度の微小な振動をおこなう。水の規準振動解析などによると^[1]、水の分子間振動には2つの領域がある。1つは 1000 cm^{-1} ~ 400 cm^{-1} の微小回転振動モード(衡振)であり、もう1つは 300 cm^{-1} ~ 10 cm^{-1} の並進振動モードである。

蛋白質の協調的運動に対応するピコ秒よりおそい時間スケールでは、水素結合の再構成を伴う拡散や再配向がおきる。純水の常温での自己拡散係数は大体 $3 \times 10^{-5}\text{ cm}^2/\text{s}$ 程度であるから、それから概算すると水分子が自分自身の大きさ(約 3 \AA)動くのに約10ピコ秒かかることになる。また、水分子の大きな回転運動もこの時間スケールで起きている。また、10~50分子の間欠的な集団運動がピコ秒のオーダーでおこることが、シミュレーションにより観察されている。

1.4 蛋白質のダイナミクスへの理論的アプローチ

蛋白質のゆらぎを実験的に計測する方法は、X線結晶解析・NMR・ESR・蛍光・ラマン等さまざまな手法がある。近年の計算機の発達により、これらの方法に加えて計算機シミュレーションも重要な研究手段として発展してきた。実験的方法に比べて、計算機シミュレーションの特徴は何であるの考えてみよう。計算機シミュレーションで通常取り扱う時間解像度はフェムト秒前後、空間解像度は \AA 以下である。これは計算機シミュレーションで通常扱う蛋白質のモデルが原子レベルであることによる。したがって、計算機シミュレーションには時間的・空間的に高解像度であるという利点

がある。しかし、時間解像度がフェムト秒であるために、あまり長い時間スケールの運動は観察することができない。現在、計算機の能力から考えて、通常取り扱うことができる時間スケールはフェムト秒からナノ秒程度である。それ以上の長さのシミュレーションをするには大きな困難がある。Monte Carlo法のような時間に異存しないシミュレーションであっても、特に効率的なサンプリング方法を開発しないかぎり、長い時間スケールの運動を扱うことは難しい。

計算機シミュレーションは計算機の発展によって大きく変化してきた。蛋白質の初期のシミュレーションでは、計算機の能力が十分ではなかったため、溶媒の水分子を無視して真空中でシミュレーションをおこなった。しかし、計算機の発達と共に、蛋白質周辺の水分子をあらわに考慮したシミュレーションがおこなわれるようになってきた。最近では、水分子だけでなく、核酸や生体膜などとの複合系のシミュレーションも可能になってきている。このようなシミュレーションでは、系をより複雑なものにすることにより現実の系に近付け、計算精度をあげていくことを目指している。

しかし、今までの水溶液中の蛋白質のシミュレーションでは、水などの溶媒が蛋白質の動的構造に対してどのような役割を果たしているかが明らかにされてこなかった。われわれの研究では、更に物理的な側面から蛋白質のダイナミクスをさぐっていくことにする。特に、蛋白質と溶媒の水の運動の相関を計算機シミュレーションと液体論をもちいて研究する。第2節では、簡単にわれわれのもちいる計算手法について触れる。第3節では、水溶液中での蛋白質の協調的運動に注目し、その特徴を探る。第4節では蛋白質周辺の水分子の運動に注目し、蛋白質の運動との相関をみていく。第5節では、液体論をもちいて蛋白質の自由エネルギー面の構造を調べる。第6節では、これらの結果を踏まえて、水溶液中の蛋白質のダイナミクスについて言及する。

2 蛋白質・溶媒系の計算機シミュレーション

2.1 蛋白質・溶媒分子のエネルギー関数

蛋白質の計算機シミュレーションの代表的なものには、分子動力学・規準振動解析・Monte Carlo法などがある。また、分子動力学・規準振動解析をそれぞれランジュバン方程式に拡張したのがランジュバン・ダイナミクスとランジュバン・モードである。ここでは実際に計算にもちいた規準振動解析・ランジュバン・モード・分子動力学について簡単に述べる。そのまえに、計算機シミュレーションにもちいた蛋白質・溶媒分子のエネルギー関数を示す。例えば、蛋白質の立体構造エネルギー関数AMBER^[2]

は以下のように形をしている。

$$\begin{aligned}
 E = & \sum_{\text{bond}} k_i (x - x_0)^2 + \sum_{\text{bond angle}} h_i (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\substack{\text{torsion,} \\ \text{improper torsion}}} V_i (1 + \cos(a_i \phi + \delta_i)) + \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \\
 & + \sum_{i < j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{H-bond}} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r^{10}} \quad (2.1)
 \end{aligned}$$

最初の3項は、化学結合に関するエネルギー項である。第1項・第2項はそれぞれ化学結合の結合長・結合角のエネルギーである。第3項は二面角のねじれと面外角のエネルギーである。二面角を変数とする場合には、化学結合の結合長・結合角を固定するので、第1項・第2項と第3項の面外角のエネルギーは考慮しない。第4項以降は非共有結合のエネルギーであり、第4項はクーロン相互作用、第5項はレナード・ジョーンズ相互作用である。第6項は、蛋白質内の水素結合を形成する特定の原子ペアにのみ使われる関数形である。この項は、エネルギー関数のOPLS^[3]などではもちいられない。

水分子は剛体として取り扱い、内部自由度は無視する。蛋白質-溶媒間、溶媒-溶媒間の相互作用エネルギーは、クーロン相互作用とレナード・ジョーンズ相互作用である。

$$E = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \sum_{i < j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.2)$$

われわれの計算では、水分子のモデルにはSPCモデル^[4]、イオンにはChadrasekharらのパラメータ^[5]を用いた。

2.2 規準振動解析

規準振動解析は、ある立体構造エネルギーの極小点のまわりでの微小振動を、調和振動として取り扱う。質量重み付きの原子の変位 $\Delta \mathbf{X}_i(t) = \sqrt{m_i} \Delta \mathbf{x}_i(t)$ は規準振動変数 $\sigma_j(t)$ の重ね合わせとして表される。

$$\Delta \mathbf{X}_i(t) = \sum_{j=1}^{3N-6} w_{ij} \sigma_j(t) \quad (2.3)$$

ただし、 N は原子数であり、規準振動の固有ベクトル \mathbf{w}_j は標準固有値問題、

$$\mathbf{F}\mathbf{W} = \mathbf{W}\boldsymbol{\omega} \quad (\mathbf{W}^T\mathbf{W} = \mathbf{I}) \quad (2.4)$$

から計算される。ただし、行列 \mathbf{F} の要素は質量重みでスケールされたエネルギーの二次微分である。

規準振動解析は、単純のモデルであるが、物理量の時間平均が解析的に得ることができる。また、規準振動解析から計算される原子のゆらぎの大きさは、X線結晶解析の B-factor からリファインメントにより抽出される値と良く一致していることが知られている^[6]。しかし、規準振動解析は1つのエネルギー極小点近傍での運動しか記述できない。また、規準振動解析において、水分子などの溶媒をあらわに考慮することは難しい。

2.3 Langevin Mode Analysis

ランジュバン・モード解析は、規準振動解析をランジュバン方程式に拡張したものである^[7]。溶媒の効果を摩擦力とランダムな力で置き換える。さて、多次元のランジュバン方程式、

$$\begin{aligned} \begin{pmatrix} \dot{\mathbf{X}} \\ \dot{\mathbf{V}} \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} \mathbf{0} & \mathbf{I} \\ -\mathbf{F} & -\boldsymbol{\Gamma} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{X} \\ \mathbf{V} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \mathbf{0} \\ \mathbf{R}(t) \end{pmatrix} \\ &= \mathbf{A} \begin{pmatrix} \mathbf{X} \\ \mathbf{V} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \mathbf{0} \\ \mathbf{R}(t) \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (2.5)$$

を考える。ただし、 \mathbf{X} と \mathbf{V} は質量重み付きの座標と速度のベクトルであり、 $\boldsymbol{\Gamma}$ は質量重みでスケールされた摩擦係数行列である。ただし、ランダムな力の平均は0で、スペクトルは白色ノイズとする。(2.5)より、 $\exp(\mathbf{A}t)$ がこのシステムのプロパゲーターであることがわかる。6 N x 6 N の非対称行列 \mathbf{A} に対する固有値問題、

$$\mathbf{A}\mathbf{T} = \mathbf{T}\boldsymbol{\lambda} \quad (2.6)$$

を解いてもよいが、以下のように6 N x 6 N の対称行列の一般固有値問題に置き換えられ出来る。

$$\begin{pmatrix} -\mathbf{F} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{L} \\ \mathbf{L}\boldsymbol{\lambda} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \boldsymbol{\Gamma} & \mathbf{I} \\ \mathbf{I} & \mathbf{0} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{L} \\ \mathbf{L}\boldsymbol{\lambda} \end{pmatrix} \boldsymbol{\lambda}$$

$$\begin{pmatrix} \mathbf{L} \\ \mathbf{L}\lambda \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} \Gamma & \mathbf{I} \\ \mathbf{I} & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{L} \\ \mathbf{L}\lambda \end{pmatrix} = \lambda \quad (2.7)$$

座標の相関関数の行列 $\mathbf{C}(t)$ は行列 \mathbf{L} と固有値 λ を用いて、

$$\mathbf{C}_x(t) = -\frac{1}{k_B T} \mathbf{L} \lambda^{-2} e^{\lambda t} \mathbf{L}^T \quad (2.8)$$

と表せる。ランジュバンモード解析では、2次微分だけではなく、摩擦係数も入力として与える必要がある。

2.4 分子動力学

分子動力学は、Newtonの運動方程式を数値的に解いていけば良い。したがって、ここでは分子動力学計算の方法には詳しく触れない。分子動力学は、取り扱いが単純なので蛋白質だけでなく、溶媒分子も容易に取り入れることができる。また、最近では蛋白質と核酸・2重膜などとの複合系のシミュレーションがおこなわれている。

3 水溶液中の蛋白質のダイナミクス

これまでの蛋白質の研究では^[8]、水溶液中の計算機シミュレーションの解析は、真空中のシミュレーションで見られる不自然な構造変化をさけることや原子のゆらぎの大きさの厳密化に重きがおかれていた。水素結合などの水和構造の解析に関しても、そのダイナミックな面にはあまり光があてられてこなかった。この節では^[9]、水溶液中の蛋白質の動的構造に注目する。特にピコ秒以上の時間スケールで起こる非局所的運動について解析する。

3.1 シミュレーションの手順

計算には、まず構造が単純で小型の蛋白質を選んだ。はじめに取り組んだのは、ミツバチの毒の主成分であるメリチンである。メリチンは26残基のアミノ酸からできており、436個の原子からなる(図3.1)。2次構造は2つの α -ヘリックスからできている。それぞれの α -ヘリックスは比較的かたいので、この分子の協調的内部運動は主に2つのヘリックスの位置関係の変化である。メリチンの他にも、より大きな球状蛋白質BPTIに関して以下と同様な解析をおこなっているが(図3.1)、こ

ここではまずメリチンの計算について述べる。シミュレーションとしては、真空中で規準振動解析と分子動力学を、溶媒中で分子動力学をおこなった。溶媒は、1304個の水分子と6つのカウンターイオンからなる。これら6個のカウンターイオンは+1の電荷をもつ残基に接するように配置した。初期構造にはDistance Geometryによって決定された構造^[10]をもちいた。蛋白質のエネルギー関数にはAMBERを用い、水分子のモデルにはSPCを用いた。分子動力学計算においては、まず系全体を300Kで平衡化したあと、そのまま温度を一定に保ちながらシミュレーションをおこなった。真空中・水中どちらの場合にも50ピコ秒の座標と速度のトラジェクトリを解析に用いた。溶媒中では、 $29.0 \times 30.1 \times 50.7$ の周期境界条件をもちいた。BPTIのエネルギー関数としては、OPLSを用い、100ピコ秒のシミュレーションをおこなった。

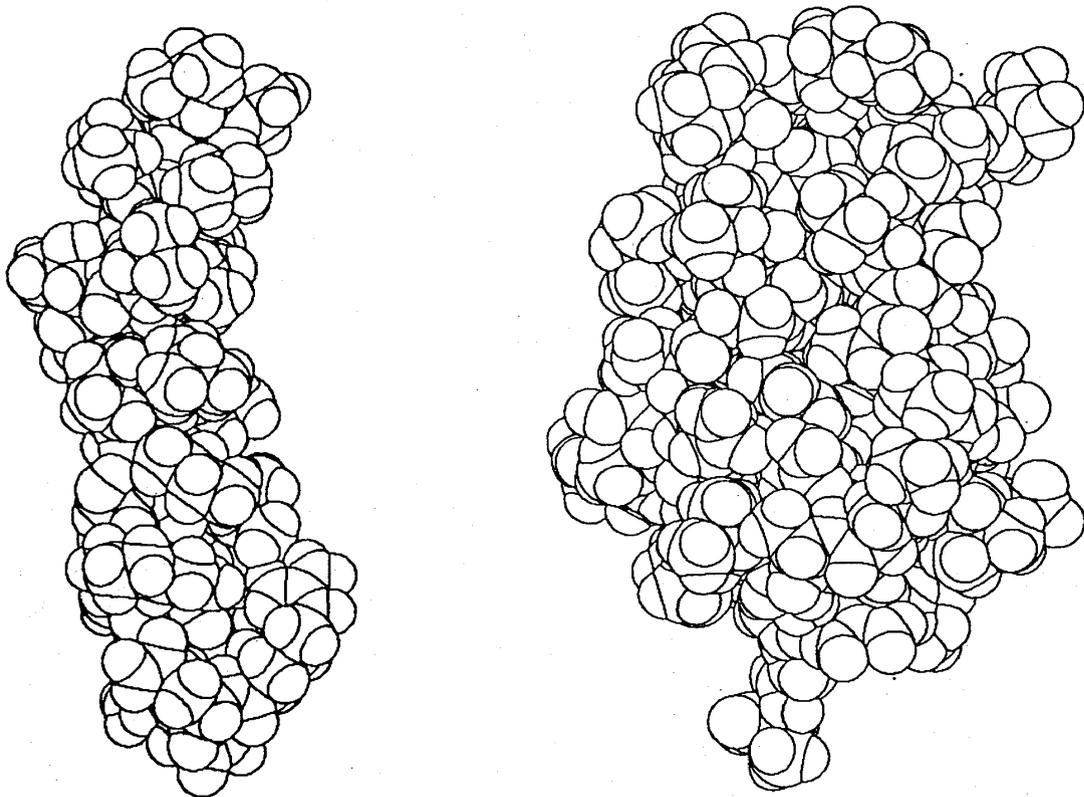


図3.1 本研究で取り上げたメリチン（左）とBPTI（右）をCPKモデルで示した。

3.2 振動数分布

まず第一に、エネルギーのスペクトルを真空中と溶媒中で計算して比較し、どの時間領域で違いが見られるのかを調べてみる。スペクトルを

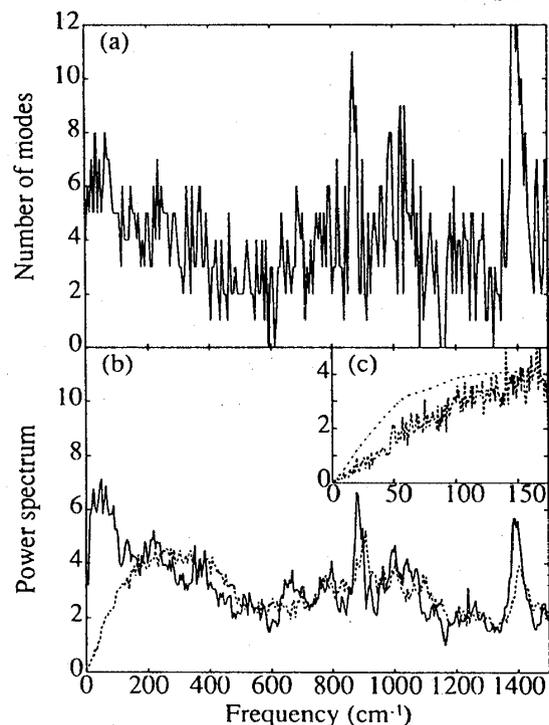
$$F(\omega) = \frac{1}{k_B T} \sum_{i=1}^N \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{2\tau} |D_i(\omega)|^2 \quad (3.1)$$

と定義する。ただし、

$$D_i(\omega) = \int_{-\tau}^{\tau} V_i(t) e^{-i\omega t} dt \quad (3.2)$$

である。ただし、 i は原子番号をあらわし、 $V_i(t) = \sqrt{m_i} \mathbf{v}_i(t)$ は質量重み付きの速度である。これに対応する規準振動解析の振動数分布も同時に示す。図3.2から明らかのように、溶媒中のスペクトルの200 cm⁻¹以下の領域では、真空中で見られるような高いピークが見られない。このことから、このような低振動領域では、溶媒が蛋白質の運動に何らかの影響を与えていることが示された。したがって、溶媒中の蛋白質の運動の特徴はこの時間領域の運動を観察することにより明らかになるはずである。この時間領域の運動は、局所的なものではなく、分子全体が協調的に動くような運動である。溶媒中でのこのようなスペクトルの形の特徴は、BPTIの溶媒中の分子動力学計算からも同様に得られた^[11]。実験的には、このようなスペクトルは中性子散乱から得ることができる。BPTIについては中性子散乱の結果が知られており^[12]、溶媒中のスペクトルに良く対応している。スペクトルについては、後でまた議論することにする。

図3.2：(a)規準振動解析の振動数分布 (b)(c)分子動力学から得られたスペクトル。水溶液中の分子動力学（破線）、真空中の分子動力学（実線）、エフェクティブ・ランジュバン・モード（1点鎖線）。文献9より転載。



3.3 主成分分析による協調的運動の分離

これまでの結果から、蛋白質の水中のダイナミクスを調べるためには、蛋白質の運動の中から、溶媒の影響を受けやすい協調的運動をとりだし、取りだされた運動の特徴を調べることがまず必要となることがわかる。そのために、主成分分析の手法をもちいた。まず、座標のトラジェクトリから分子全体の並進・回転運動を取り除いておいてから、メリチンの平均構造を計算する。瞬間毎の構造 (Instantenius Structure、I-structureと呼ぶ) は、それぞれが平均構造から少し変位している。これらの変位を質量重み付きの座標 $\mathbf{X}_i(t) = \sqrt{m_i} \mathbf{x}_i(t)$ に関してそれぞれ計算し、それより分散・共分散行列 \mathbf{R} を計算する。この行列を対角化する直交行列 \mathbf{U} が主成分主軸である。即ち、標準固有値問題、

$$\mathbf{R}\mathbf{U} = \mathbf{U}\mathbf{r} \quad (\mathbf{U}^T\mathbf{U}) \quad (3.3)$$

を解けばよい。固有値 r_j は第 j 主成分方向の原子のゆらぎの分散である。第一主軸は分子のゆらぎが最も大きくなる方向として定義され、第二主軸は二番目にゆらぎが大きくなる方向である。このようなことから、主成分軸は、規準振動解析の規準座標軸にほぼ対応するものであることが期待される。第 j 主成分の全体のゆらぎへの寄与率 s_j は、

$$s_j = r_j / \sum_{i=1}^{3N-6} r_i \quad (3.4)$$

で定義される。更に、第 j 主成分のエフェクティブな振動数を

$$\omega_{e,j} = \sqrt{k_B T / r_j} \quad (3.5)$$

で定義する。ポテンシャル面が完全にパラボラであれば、エフェクティブな振動数は規準振動に一致する。これらの解析を真空中・溶媒中のトラジェクトリに対してそれぞれおこなう。

得られた主成分のなかでも、ゆらぎへの寄与率が5%以上あるものに注目する。真空中・溶媒中ともに第4主成分までがこれに当たる。真空中では、第1~4主成分の寄与率とゆらぎの大きさはそれぞれ41.9、10.7、7.8、6.8%と0.69、0.35、0.30、0.27Åである。溶媒中では、第1~4主成分の寄与率とゆらぎの大きさはそれぞれ26.0、15.7、6.6、5.7%と0.16、0.13、0.082、0.076Åである。それら4つの主成分は、あわせて真空中で66.7%、溶媒中で54.0%の寄与をしている。

このようにして得られた主成分主軸は、どのような動きをあらわしているのだろうか。規準座標・真空中及び溶媒中の主成分主軸をあらわすベクトルの内積を計算して

みれば、規準振動モードと真空中・溶媒中での主成分の対応を比べることができる。その結果、予想していたとおり、ゆらぎの大きな主成分軸は真空中・溶媒中ともに低い規準振動モードに対応していた。このことは蛋白質の動きやすい方向は溶媒との相互作用によって変化しないことを示している。

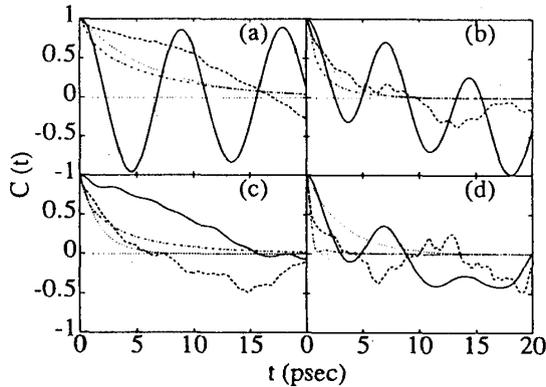


図 3.3 : (a)第 1、(b)第 2、(c)第 3、(d)第 4 主成分の時間相関関数。線の意味は図 3.2 と同じ。ただし、点線はエフェクティブ・ランジュバン・モードで摩擦係数行列の非対角項を無視したもの。文献 9 より転載。

次に、主成分軸方向の蛋白質の運動の時間変化を考える。そのためには、原子座標のトラジェクトリを主成分軸に射影すればよい。図 3.3 には、真空中・溶媒中での射影の時間相関関数 $C_{MD}(t)$ を示した。真空中の相関関数は、多少の減衰はあるものの、あきらかに振動が見られ、規準振動的な動きであることが分かる。それに対して、溶液中では振動が見られず、運動が減衰してしまう。このように、溶液中の蛋白質の協調的運動は、拡散的なものであることがわかる。

3.4 蛋白質立体構造のトランジション

今までは、ある 1 つの主成分軸方向の運動を見てきたが、今度は 2 つの主成分軸によって張られる空間での運動を見てみよう。図 3.4 には真空中、図 3.5 には溶媒中の結果を示した。真空中では、蛋白質は 1 つの構造のまわりを周期的に運動していることがわかる。しかし、溶媒中では、運動は拡散的であり、振動的な運動は見られない。また第 1 主成分主軸の方向では、50 ピコ秒のシミュレーションの中で、23 ピコから 29 ピコ秒の間で構造のトランジションが起きている。その前後では、メリチンは 1 つの構造の周りでゆらいでいる。しかし、そのゆらぎの大きさは真空中よりかなり小さい。また、球状蛋白質 BPTI に関しても、主成分分析によって同様の構造のトランジションが観察された。BPTI の場合には、100 ピコ秒の間に数回のトランジションが見られた。

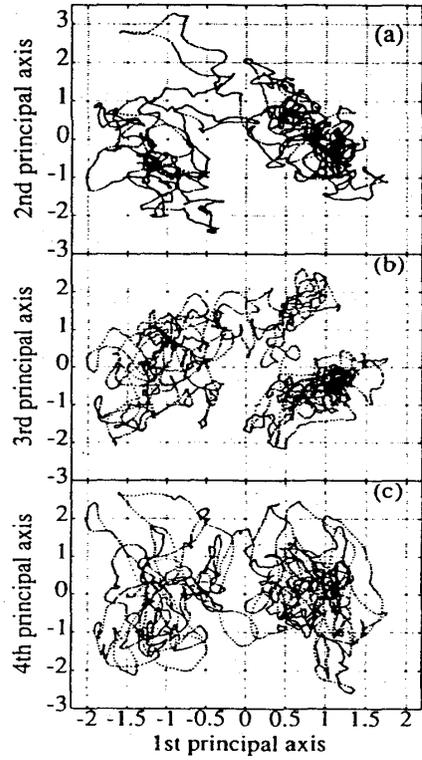
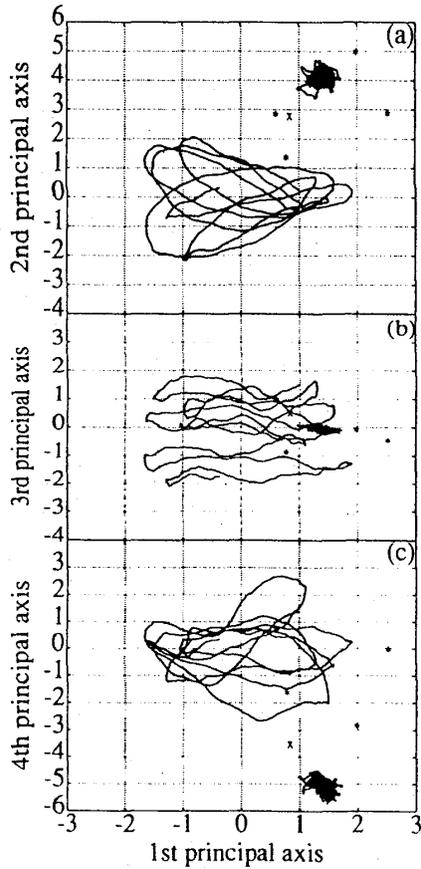


図3.4 (左) と図3.5 (右) : 分子動力学のトラジェクトリを真空中 (3.4) と水溶液中の主成分空間に射影したもの。座標は各主成分の標準偏差でスケールしてある。3.4右の小さなクラスターは水溶液中のトラジェクトリを真空中に射影したもの。また、'x' は初期構造を表わし、"*" はこの計算では用いなかったDistance Geometry より得られた構造を射影したものを表わす。文献9より転載。

このトランジションがどのようなものか更に詳しく見ていくことにしよう。ここでは、メリチンのトランジションについてのみ詳しく述べる。まず、トランジション前後の平均的な構造を調べ、その違いを見てみる。既に述べたように第1主軸は、蛋白

質の局所的な運動ではなく分子全体が協調的に動く運動をあらわす座標軸であり、この構造変化は局所的なものではない。2つの α -ヘリックスがなす角度が変わるような構造のトランジションである。2つの立体構造間の原子の変位は、全原子の平均で0.5 Å、主鎖原子の平均で0.2 Åであり、大きなものではない。既に述べたように、真空中のメリチンのゆらぎは、第1主成分で0.7 Å、第2主成分で0.4 Åであり、トランジションはみられない。溶媒中と真空中の第1主成分は似たような動きであるが、溶媒中では構造が少し変化しただけでトランジションが起きることがわかる。これは、蛋白質の立体構造エネルギー面にはみられない溶媒中のエネルギー面の微細構造の存在を示唆するものである。

つぎに、メリチン分子内の水素結合のパターンの変化を調べてみる。メリチンは2つの α -ヘリックスからなるから、主鎖の水素結合が重要である。主鎖間の水素結合は、水素結合するドナーとアクセプターのペアが決まっているので、ドナーとアクセプター間の距離を調べることにより簡単に知ることができる。その結果、分子内の水素結合のパターンはトランジションの前後で変化しない事が解かった。これは、この構造変化の変位が小さいことによる。一般には、蛋白質の分子全体が大きく変位するような構造のトランジションでは、分子内の原子のパッキングが蛋白質の内部で大きく変化することが、真空中のシミュレーションによって明らかになっている^[13]。今回観察されたトランジションは、それよりも構造変化の大きさが小さく、そのメカニズムも異なっている。

更に、トランジション前後の平均の相互作用エネルギーの違いを比べてみる。メリチンの分子内の立体構造エネルギーの変化は6.8 kcal/molである。一方、メリチン-水間の相互作用エネルギーの変化は17.9 kcal/mol、水-水間の相互作用エネルギーの変化は-15.4 kcal/molであり、メリチン分子内のエネルギー変化の2~3倍ある。つまり、ここで観察されたトランジションは水和構造の変化と深く関係していることがわかる。これについては第4節で詳しく議論することにする。

真空中・溶媒中ともに、第3主軸の方向の運動は、側鎖の構造変化である。真空中の第3主成分方向では、数種の側鎖の二面角が回転している。側鎖の回転自体は、一種のトランジションだが、それが連続的に起こっているで、一方方向にドリフトしているように見える。溶媒中の第3主軸の向きでは、17番目の残基イソロイシンの $\chi_2(C^\beta$ と C^γ の間の二面角)のみが変化している。したがって、この場合は2回のトランジションがはっきり観察できる。

3.5 ランジュバン・モードによる解析

3.3で蛋白質の協調的運動が過減衰することを示した。溶媒の影響には様々なものがあるが、それをランジュバン方程式をモデルとして再現することを試みる。ここでは2.3で述べた、ランジュバンモードを使って図3.2のスペクトルと図3.3の時間相関関数を計算してみる。2次微分行列と摩擦係数行列は分子動力学の結果からエフェクティブに求める。このような解析をエフェクティブ・ランジュバン・モードと呼ぶ。それぞれは、原子の座標と速度の相関関数から、

$$\mathbf{F}^{-1} = \frac{1}{k_B T} \mathbf{C}_x^{MD}(0) \quad (3.6)$$

$$\mathbf{\Gamma} = -\frac{1}{k_B T} \left(\frac{d}{dt} \mathbf{C}_v^{MD}(t) \right)_{t=0} \quad (3.7)$$

で計算される。ここで求められた2次微分行列には、溶媒の影響を含めた蛋白質のポテンシャル面の情報が含まれている。実際には、主成分空間で、

$$\begin{aligned} \mathbf{F}^{-1} &= \frac{1}{k_B T} \mathbf{U}^T \mathbf{C}_x^{MD}(0) \mathbf{U} \\ &= \frac{1}{k_B T} \mathbf{U}^T \mathbf{R} \mathbf{U} \\ &= \frac{1}{k_B T} \mathbf{r} \end{aligned} \quad (3.8)$$

$$\mathbf{\Gamma} = -\frac{1}{k_B T} \mathbf{U}^T \left(\frac{d}{dt} \mathbf{C}_v^{MD}(t) \right)_{t=0} \mathbf{U} \quad (3.9)$$

を計算すればよい。行列 $(1/k_B T)\mathbf{r}$ は対角行列で、各行列要素がエフェクティブな振動数を用いて $1/\omega_{ef,j}^2$ と表される。したがって、構造のトランジションがおこった場合にも、すべて1つの極小点の近傍で運動しているように取り扱う。このようにしてエフェクティブ・ランジュバン・モードをおこない、時間相関関数とスペクトルを求めてみる。その結果は既に図3.2と図3.3に既に示してある。時間相関関数は、トランジションの起こった軸の運動はあまりよく再現できないが、それ以外の場合は、定性的にほぼ形状が再現できる。スペクトルに関しても、低振動領域でのスペクトルの形がほぼ説明できる。BPTIに関するほぼ同様の解析でも、同じような結果が得られた。しかし、メリチンとBPTIのスペクトルの形状のでき方が少し異なっている。メリチンの場合には、(3.8)で得られる行列は、真空中のものと大きく異なっている。一方、BPTIの場合には(3.8)で得られる行列は、真空中のものとあまり変化していない。つまり、メリチンの場合には、エネルギー面の形状の違いと運動のダ

ンピングの双方がスペクトルの形状に影響しているが、BPTIでは主に運動のダンピングが影響していることがわかる。

4 蛋白質と水の運動相関

前節で見られた蛋白質の構造トランジションは溶媒の影響によって引き起こされたものであった。この節ではこれを詳しく調べるために、蛋白質と水の運動の関係を調べる。そのために、まず蛋白質周辺の水の運動がどのようになっているかを解析し、更に蛋白質の構造トランジションと水の運動の関係を調べる^[14]。この解析はメリチンについてのみおこなった。また、蛋白質周辺の水と純水とを比較するために、別に216個の水分子からなる系の分子動力学計算をおこなった。

4.1 V-構造を用いた動的構造解析

第1節で述べたように、水の運動には周期が ~ 0.2 ピコ秒以下の動きのはい微小振動がある。それを平均化することで非振動的でよりゆっくりとした運動を取りだすことを考える。水分子の瞬間的な原子の位置や配向は、瞬間的には平衡位置から少しずれているので、そのような微小振動を平均化するとV-構造 (Vibrationally averaged Structure)^[15] が得られる。具体的には 0.2 ピコ秒程度の範囲の瞬間構造 (I-構造) を平均化してやる必要がある。各水分子の重心位置と回転角を、

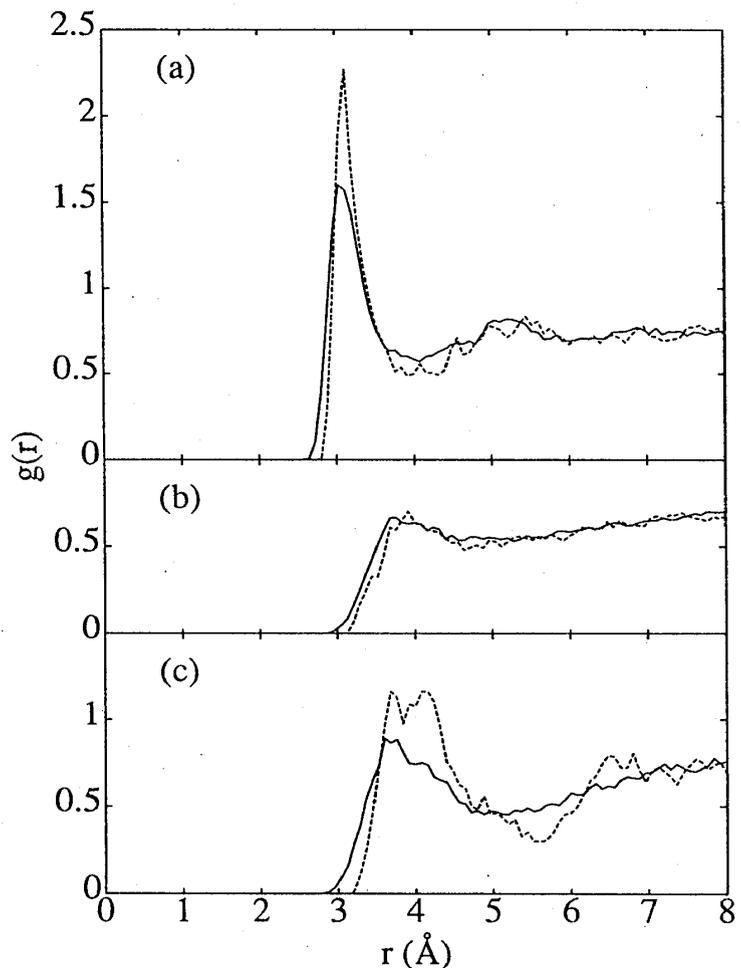


図4.1 : (a)Arg の N^{η} 、(b)Leu の C^{δ} 、(c)Ala の C^{β} の周辺の水の酸素原子の動径分布関数。I-構造 (実線) とV-構造 (破線)。文献14より転載。

$$\bar{q}_i(t) = \int_{-\Delta\tau}^{\Delta\tau} \frac{\sin(\pi t' / \Delta\tau)}{\pi t' / \Delta\tau} q_i(t+t') dt' / \int_{-\Delta\tau}^{\Delta\tau} \frac{\sin(\pi t' / \Delta\tau)}{\pi t' / \Delta\tau} dt' \quad (4.1)$$

を用いて平均化する^[16]。ただし、 $\Delta\tau = 0.2$ ピコ秒とした。また、蛋白質とイオンについても、同様にV-構造を計算する。こうしてえられたV-構造では、水分子の平均的な配向をI-構造の場合より、はっきりと見ることができる。50ピコ秒のシミュレーションの間、50フェムト秒毎に約1000のV-構造を計算し、解析をおこなった。水分子のV-構造の時間変化と蛋白質の運動との相関を調べれば、前節で見いだされた蛋白質の構造トランジションと水分子の運動の関係を説明できるかもしれない。

V-構造で、水和構造がどのように見えるのか、例をあげる。図4.1には典型的な蛋白質の原子と水の酸素原子の間の動径分布関数を示してある。V-構造では、水素結合する原子間の動径分布関数のピークや極小が、I-構造より強調されている。

4.2 原子間のパッキングと水分子の分類

蛋白質の周辺の水分子と一口にいても、実際は近接する残基や化学基によってその運動は大きく異なる。従って、蛋白周辺の物性を調べるためには水分子を分類する必要がある。V-構造では水分子は平均的な位置に存在しているので、分類するときの帰属が容易にできる。しかし、その前に原子間のパッキングトポロジーという概念を導入し、それにしたがって水分子の分類をすることにする。

共有結合していない2つの原子の間の距離がある基準より短いとき、その2つの原子はパッキングしていると定義する。その距離の基準には式(2.1)、(2.2)の中のレナード・ジョーンズ項を利用する。パラメータ σ_{ij} はi番目の原子とj番目の原子の半径の和である。もしV-構造の原子間距離が σ_{ij} の1.2倍より小さいときは、2つの原子はパッキングしているとみなすことにする。それぞれのV-構造について、どの原子が他のどの原子とパッキングしているかが計算できる。蛋白質の構造がトランジションする時には、蛋白質分子内のパッキングトポロジーが大きく変わることが知られている。しかし、前節で見られたトランジションは変位の大きさが小さいので、蛋白質分子内の原子のパッキングはほとんど変わらない。

蛋白質周辺の水分子を以下述べるように7種類に分類する。まず、水分子を蛋白質周辺の第1層・第2層・それ以降の3つに分ける。第1層の水分子は、蛋白質とパッキングしている水分子である。第2層の水分子は、第1層の水分子以外で第1層の水分子とパッキングしているものである。それより外側の水分子はBulkな水と呼ぶことにする。第1層・第2層の水分子は、それぞれ接触している蛋白質の基に応じて更に3種類に分類する。蛋白質の基の中で大きな部分電荷を持っているものをCharged Group、それ以外の極性を持った基をPolar Group、無極性の基をNonpolar Groupとし、

それぞれにパッキングしている水分子をC1、P1、N1の水分子と呼ぶことにする。ただし、複数の基とパッキングしているときには、C1、P1、N1の順に優先順位を付ける。同様に、C1、P1、N1の水分子とパッキングしている第2層の水分子をそれぞれC2、P2、N2と呼ぶ。

4.3 蛋白質周辺の水の運動

4.2では時間軸に沿ってそれぞれのV-構造について、1304個の水分子を7種類に分類した。その7種類の水について、自己拡散係数Dと回転相関時間を計算した(表4.1)。ただし、計算には分類に用いたV-構造と同時刻のI-構造を用いる。別に計算した216分子の純水(Pure)について得られた結果についても、一緒に示してある。

表4.1：水分子の回転・並進運動の性質。

Class	D ($10^{-5}\text{cm}^2/\text{s}$)	τ_1 (psec)	τ_2 (psec)
C1 (Charged1)	2.7	4.1	1.7
P1 (Polar1)	2.1	4.0	1.7
N1 (Nonpolar1)	2.6	4.4	2.0
C2 (Charged2)	3.7	2.8	1.2
P2 (Polar2)	2.6	4.4	1.9
N2 (Nonpolar2)	2.4	5.2	2.0
Bulk	3.7	3.5	1.5
Pure	4.0	3.0	1.4

C2の水を除くと、第1層・第2層の水は、それより外側の水や純水に比べて運動が遅いことが分かる。しかし、メリチン周辺の水分子は、X線結晶解析で見られるような結晶水とは異なり、純水と比べて極端に運動性がおちていることはない。C2の水分子の運動性は純水と同じかそれ以上ある。これは、通常Structure Breaking^[17]、あるいはNegative Hydration^[18]と呼ばれる現象である。C1の水分子は蛋白質の大きな部分

電荷と強い相互作用をしているので、運動性が小さくなる。C2の水分子はC1の水分子と3層の水の間において不安定化される。

4.4 水-蛋白質間・水-水間水素結合

水-蛋白質間・水-水間の水素結合は、原子のパッキングと結合エネルギーの値を用いて定義する。2つの水分子あるいは水分子と蛋白質内の基の間で、もしパッキングしている原子の組があれば、その2つの基の間のペアエネルギーを計算する。計算式は(2.2)のとおりである。ここでは、ペアエネルギーが -3.0 kcal/mol 以下の時、水素結合と定義する。

次に、水素結合の寿命を2つの異なった定義に基づいてする。定義Iでは、距離(パッキング)とエネルギー両方の条件が満たされたときのみ、水素結合の寿命を計算する。

図4.2の例では、 t_1 から t_2 までの τ_α と t_3 から t_4 までの τ_β である。定義IIでは、まず距離条件が連続的に満たされる区間を考える(t_0 から t_5)。その区間の中で、はじめにエネルギーの条件が満たされた時間(t_1)と最後にエネルギーの条件が満たされなくなった時間(t_4)を見つける。定義IIでは、その2つの間の時間(τ_c)を水素結合の寿命とする。

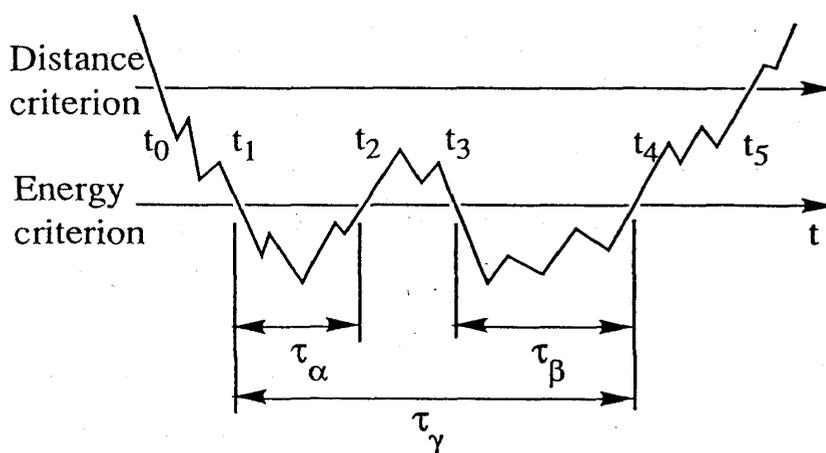


図4.2：水素結合の寿命の定義の概念図。文献14より転載。

表4.2には、それぞれの種類の水分子の水-水間水素結合の平均寿命と水1分子あたりの平均水素結合数が示してある。C1とC2を除いた第1層・第2層では、水素結合の寿命は、バルクの水や純水とほぼ同じとみなしてよい。しかし、C1とC2では、

水素結合の寿命は他より短い。これは、バルクの水や純水より第1層の水の運動性が落ちるといふ4.3の結果と一見矛盾するように見える。しかし、これはさきに述べたStructure Breakingにより説明される。C1の水分子は、その分類の定義により、C1に属する他の水分子とC2の水分子としか接していない。C1とC2の水分子には、運動性に大きく違いがあるので水素結合の寿命が小さくなる。一方、C2の水分子は、C2に属する他の水分子とC1・Bulkの水に接しているが、C1・Bulkの水とは運動性に違いがあるので、これも水素結合の寿命が短くなる。

Class	Life time I ^a (psec)	Life time II ^b (psec)	Number of H-bonds ^a
C1 (Charged1)	1.0	1.5	2.4
P1 (Polar1)	1.3	2.0	2.9
N1 (Nonpolar1)	1.3	2.0	3.3
C2 (Charged2)	0.9	1.5	3.5
P2 (Polar2)	1.2	1.7	3.6
N2 (Nonpolar2)	1.2	1.8	3.6
Bulk	1.4	2.0	3.7
Pure	1.3	1.9	3.7

a. Calculated by using definition I. b. Definition II. Definition of the life time is given in the text.

表4.2：水-水間水素結合の平均寿命と水1分子あたりの平均水素結合数

Type	Life time I ^a (psec)	Life time II ^b (psec)	Average number of H-bonds ^a (per each water molecule)	Average number of H-bonds ^a (per each group)
Charged	1.4	2.0	1.1	4.6
Polar	0.8	1.7	1.0	1.2

a. Calculated by using definition I. b. Definition II. Definition of the life time is given in the text.

表4.3：水-蛋白質間水素結合の平均寿命と平均水素結合数

水1分子あたりの平均水素結合数に関しては、第1層で大きな違いが見られる。第1層では水分子は常に蛋白質と接している。そのために、第1層の水分子に対して周りの他の水分子が接近できる領域が小さくなる。したがって、一般的には第1層の水-水間水素結合数は減少するはずである。C1・P1・N1の水素結合数はBulkやPureと比べると、それぞれ1.3・0.8・0.3少なくなっている。C1とP2における水-水間水素結合の減少分は、あとで述べるように水-蛋白質間水素結合によってほぼ補われる。したがって、C1とP2が作っている水素結合のネットワークの構造は第2層以降の水と余り変わらないようである。N1の水分子の場合は、水素結合数はあまり減少していない。角度分布関数等による解析と合わせて考えると、N1の水分子が作る水素結合のネットワークはそれ以外の水分子の場合と異なっていると考えられる。

次に、水-蛋白質間水素結合のようすを見てみる。表4.3には水-蛋白質間水素結合の平均寿命、水1分子あたりの平均水素結合数、1つの基あたりの平均水素結合数が示してある。Charged Groupの場合には、水素結合の寿命はほぼBulkやPureの水-水間水素結合の寿命とおなじである。それと比較すると、Polar Groupの場合には、水素結合の寿命はかなり短い。Polar Groupの部分電荷は比較的小さいので、水分子との相互作用エネルギーはあまり大きくない。水分子1個あたりの水-蛋白質間水素結合数は1程度である。既に述べたように、C1とP2における水-水間水素結合の減少分は、水-蛋白質間水素結合によって補われる。

Polar Groupが水となす水素結合は通常1本程度である。Charged Groupの場合には、平均4.6本だが、側鎖の種類によって大きく違う。カウンターイオンがないときはArgの側鎖は約7本、Lysの側鎖は約5本の水素結合を水分子との間で作っている。

4.5 蛋白質の構造トランジションと水和構造の変化

今までの結果を踏まえて、蛋白質と水分子の運動の相関を見てみよう。第3節でみたように、溶媒中では真空中で見られないような蛋白質の構造のトランジションが起きた。これは3.4で示したように、蛋白質・水間の相互作用が原因になっていることがわかった。これを今までに定義した原子のパッキングと水素結合を用いて更に詳しく見ていく。

図4.3には50ピコ秒の間の第1・第2主成分の時間変化と第1層の水分子の数・水-蛋白質間の水素結合数が示してある。主成分の変化と比較すると、第1層の水分子の数・水素結合数ともに変動が激しいことがわかる。蛋白質の運動と水和構造の変化にはある程度の相関があるが、これだけではあまり明らかではない。

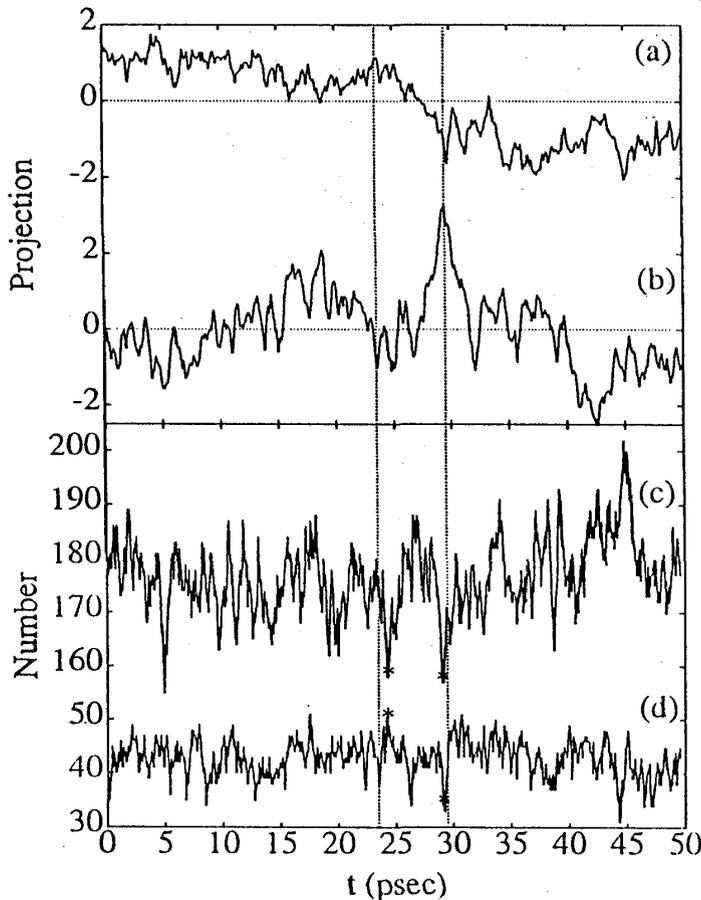


図4.3：分子動力学のトラジェクトリの(a)第1主軸、(b)第2主軸への射影の時間変化。(c)第1層の水分子の数、(d)水-蛋白質間水素結合数の時間変化。文献14より転載。

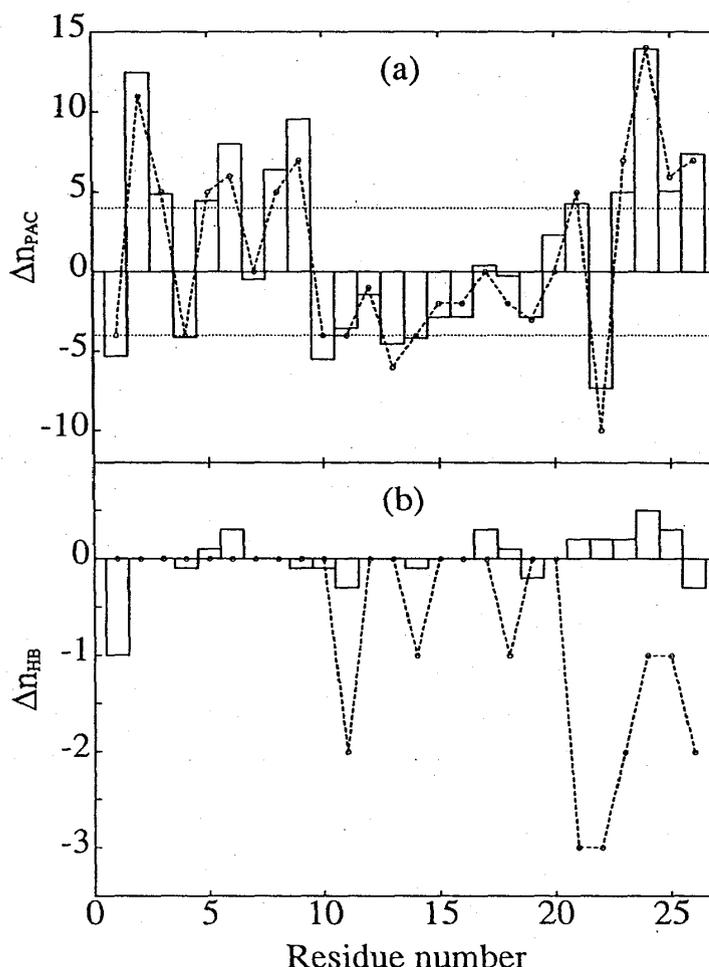
そこです、トランジション前後の平均的な水和構造を調べ、その変化をアミノ酸残基ごとに解析する。図4.4には、その結果を示した。上が残基ごとのパッキングしている蛋白質の原子と水分子のペアの数の変化、下が水素結合の数の変化である。パッキングのペアの数はトランジション後に38.7増えている。水素結合の変化は0.07本である。したがって、トランジション前後の水和構造の違いには、水素結合はあまり関係なく、原子のパッキングの違いによって特徴づけられることがわかる。原子のパッキングの変化には第1主成分方向の蛋白質の動きと関係した2つの特徴が見られる。1つは、蛋白質の運動のフェイズと関係する。第1主成分方向では、2つのヘリックス間の角度が変化する。メリチンの両端は同じ方向に変位し、中間の部分は逆方向に変位する。9番目まで残基と20番以降の残基ではパッキングが増加する傾向があるが、10～19番では減少している。蛋白質の構造変化にともなう水和構造の変化は局所的ではなく、蛋白質の運動と相関を持っていることがわかる。第2の特徴は、ピークの位置が3～4残基ごとの周期を持っていることである。これはメリチンがヘリックスから出来ていることによる。

次に、2つのV-構造の水和構造を比較してみよう。図4.3からもわかるように、水和構造は常に大きくゆらいでいる。1つの例としてトランジションの初期のV-構

造とトランジションの終期のV-構造の水和構造（図4.3の2つの‘*’）を比べてみる。その結果は図4.4に既に示してある。原子のパッキングの変化に関しては、平均的な水和構造間の変化とほとんど同じである。水素結合に関しては大きく変化している。特に、メリチンの21～26残基のChargedとPolar Groupの水素結合が変化が大きい。このことからトランジションが起こるときにはパッキングと水素結合の両方が大きく変わることが必要であると考えられる。

これらの解析によって、トランジション前後の2つの構造は、水和構造、特にパッキングの違いによって特徴づけられることがわかる。また、トランジションが起こるということは、一種のポテンシャルの山を越えることであるので、一旦水素結合と原子のパッキングが大きく変化し、その再構成が起きていると考えられる。

図4.4：水-蛋白質間の
(a)原子パッキング数、
(b)水素結合数の変化。
平均構造間の変化（ヒストグラム）と2つのV-構造間の変化（破線）。
文献14より転載。



5 蛋白質の自由エネルギー計算

第3節、第4節では、蛋白質と水の運動を計算機シミュレーションを用いて見てきた。ここでは少し視点を変え、シミュレーションの変わりに液体論をもちいて、蛋白質の自由エネルギー面を考える^[19]。

5.1 拡張RISM理論

拡張RISM (Extended Reference Interaction Site Model) 理論^[20] を、蛋白質を無限希釈で水に溶かした系に適用しよう。RISM理論では、分子の形を、サイト (通常は原子又は基) 間の2体分布関数で表現する。そのために、シミュレーションの場合と同じエネルギー関数を用いて蛋白質を取り扱うことができる。溶媒-溶媒 (solvent - solvent、vv)間のと溶質-溶媒 (solute - solvent、uv) 間のRISM積分方程式は^[21]、

$$\mathbf{h}^{vv} = \boldsymbol{\omega}^v * \mathbf{c}^{vv} * \boldsymbol{\omega}^v + \boldsymbol{\omega}^v * \mathbf{c}^{vv} * \boldsymbol{\rho}^v \mathbf{h}^{vv}, \quad (5.1)$$

$$\mathbf{h}^{uv} = \boldsymbol{\omega}^u * \mathbf{c}^{uv} * \boldsymbol{\omega}^v + \boldsymbol{\omega}^u * \mathbf{c}^{uv} * \boldsymbol{\rho}^v \mathbf{h}^{vv}, \quad (5.2)$$

で与えられる。ただし、行列 $\mathbf{h} \cdot \mathbf{c} \cdot \boldsymbol{\omega}$ の行列要素は、それぞれ2つのサイト間の全相関関数・直接相関関数・分子内相関関数である。 $\boldsymbol{\rho}^v$ は対角行列で、対角要素は溶媒の数密度をあらわす。また、' * ' は畳み込み積分をあらわす。全相関関数は、動径分布関数を用いて、 $h_{\alpha\gamma}(r) = g_{\alpha\gamma}(r) - 1$ と定義される。また、各分子の構造は固定するので、 $\boldsymbol{\omega}$ の行列要素、分子内相関関数は、

$$w_{\alpha\gamma}(r) = \delta_{\alpha\gamma} \delta(r) + (1 - \delta_{\alpha\gamma}) (1/4\pi L_{\alpha\gamma}^2) \delta(r - L_{\alpha\gamma}), \quad (5.3)$$

で与えられる。ただし、 $L_{\alpha\gamma}$ は2つのサイト $\alpha - \gamma$ 間の距離である。積分方程式を解くためのクロージャーには、ここではHNC (Hyper Netted Chain) 型のクロージャーを用いる。

メリチンおよび水のモデルには、分子動力学計算と同じようにそれぞれAMBER all atom parameterとSPCを用いた。メリチンは436個、水は3個のサイトによって構成されている。ただし、このRISM計算にはカウンターイオンは含めない。また、分子動力学とは違い、完全に無限遠まで水分子が存在するので周期境界条件や非結合性相互作用のカットオフは必要ない。

今までは、拡張RISM理論は溶液や溶液中の小さな溶質と取り扱うのに使われてきた。蛋白質のようにサイトが極端に多いモデルを取り扱うには、積分方程式の解の収束性がよくないことと計算時間がかかり過ぎることが問題であるが、それらはいくつかの計算上の工夫によって克服した。

5.2 分子動力学計算による動径分布関数との比較

まずRISMによって得られた水-メリチン間の動径分布関数を、分子動力学計算の結果と比較してみる。ただし、分子動力学計算では、動径分布関数を計算している間に溶質分子がゆらいているが、RISM計算では、溶質の蛋白質の構造は固定される。こ

ここで示すRISM計算に用いた蛋白質の立体構造は、分子動力学計算で得られる構造の平均構造である。ここでは、2つの典型的な例を示す(図5.1)。大きな部分電荷をもった基やpolarな基の周りの水の分布は、RISMの結果と分子動力学の結果が良く一致している。特に第1ピークの位置と高さは良く一致している。しかし、nonpolarな基や露出の少ない基では、分子動力学計算の結果と比べて排除効果がやや過小評価される傾向があった。

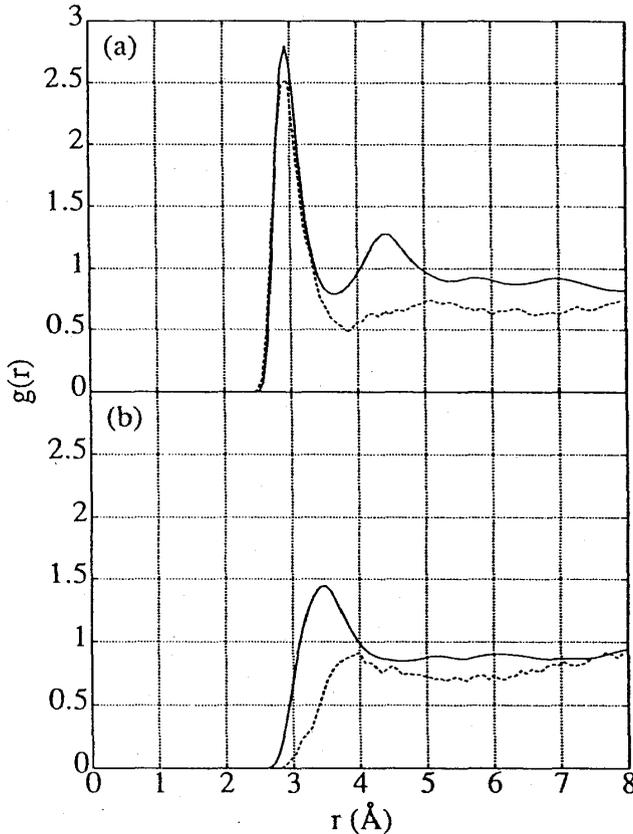


図5.1 : RISM (実線) と分子動力学 (破線) から得られた、蛋白質の原子と水の酸素原子の動径分布関数。(a)Lys23のN ζ 原子と水分子の酸素間、(b)Leu6のC δ^1 原子と水分子の酸素間の動径分布関数。文献19より転載。

5.3 自由エネルギー面の微細構造

溶質を真空中から水中に移行したときの移行自由エネルギー、水和自由エネルギーは、溶質-溶媒間の2体分布関数から、

$$\Delta\mu = 4\pi\beta^{-1} \sum_{\alpha}^{N_s} \sum_i^{N_w} \int_0^{\infty} dr \left[\frac{1}{2} h_{\alpha i}^2(r) - c_{\alpha i}(r) - \frac{1}{2} h_{\alpha i}(r) c_{\alpha i}(r) \right], \quad (5.4)$$

により計算される^[22]。これに溶質の立体構造エネルギーを加えた

$$\Delta F = \Delta E + \Delta\mu, \quad (5.5)$$

を全自由エネルギーと定義する。溶質である蛋白質の構造を徐々に変化させていながら、それぞれの構造について全自由エネルギーを計算し、自由エネルギー面の形を

見てみることにする。

自由エネルギーは、規準振動解析によって得られた第1・第2規準振動モードの方向にメリチンを変位させて計算する。規準振動解析をするときには、溶媒の影響は考慮されていない。しかし、第3節で示したように、水溶液中でも蛋白質の動きやすい方向は変わらないので、ここでは規準振動モードをもちいる。

図5.2 : (a)第1、(b)第2規準振動軸方向のエネルギー曲面。全自由エネルギー（実線）、ASAから計算した全自由エネルギー（1点鎖線）、立体構造エネルギー（破線）、水和自由エネルギー（点線）。文献19より転載。

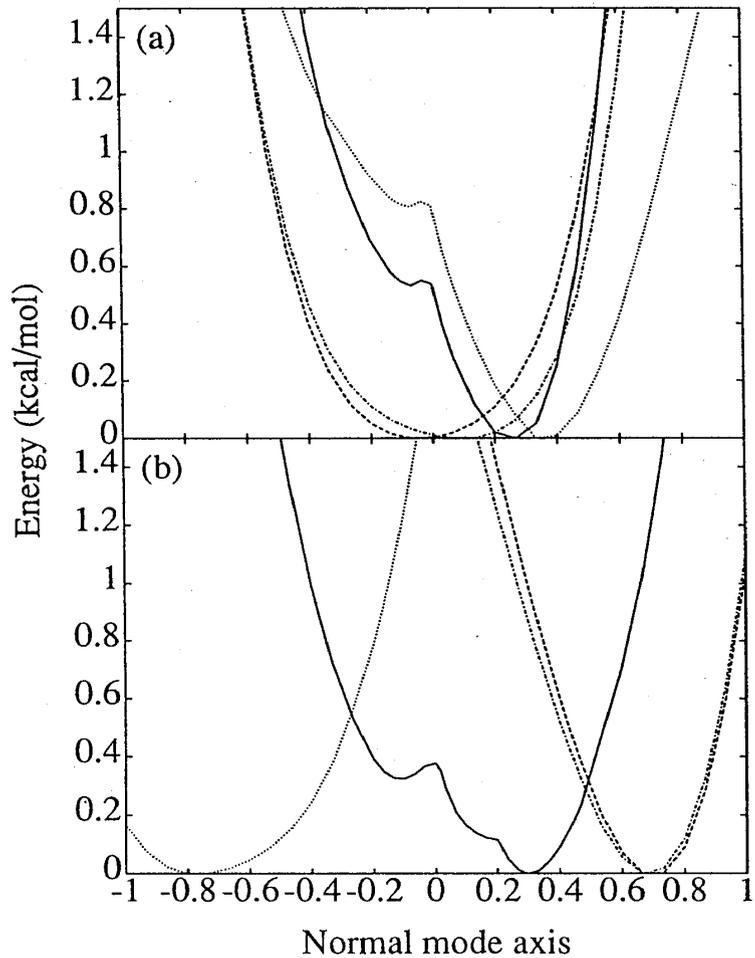


図5.2に、その結果を示した。真空中では、立体構造エネルギー面は第1・第2規準振動モードの双方で1つの極小を持ち、なめらかである。しかし、水和自由エネルギーを加えると、エネルギー面の形は複雑になる。第1・第2規準振動モードどちらの軸方向でも2つの極小が見られ、微細構造が存在する。この自由エネルギー面の微細構造は、第3節・第4節でみた構造のトランジションには直接には対応しない。しかし、溶媒の影響で自由エネルギー面に微細構造ができることが示された。

次に、自由エネルギー面の微細構造がどのように出来ているのかを調べてみる。第1規準振動モードの場合には、水和自由エネルギー面に存在する微細構造がそのまま全自由エネルギー面の微細構造に反映している。一方、第2規準振動モードの方向では、別の位置に極小をもつ2つの非調和型エネルギー面（立体構造エネルギー面と水和自由エネルギー面）の重ね合わせで微細構造が出来る。第2規準振動モード方向で

のエネルギー面の微細構造のできかたは理解しやすい。第1規準振動モード方向の水和自由エネルギー面の微細構造がどのようにしてできたのか、更に詳しく調べてみよう。

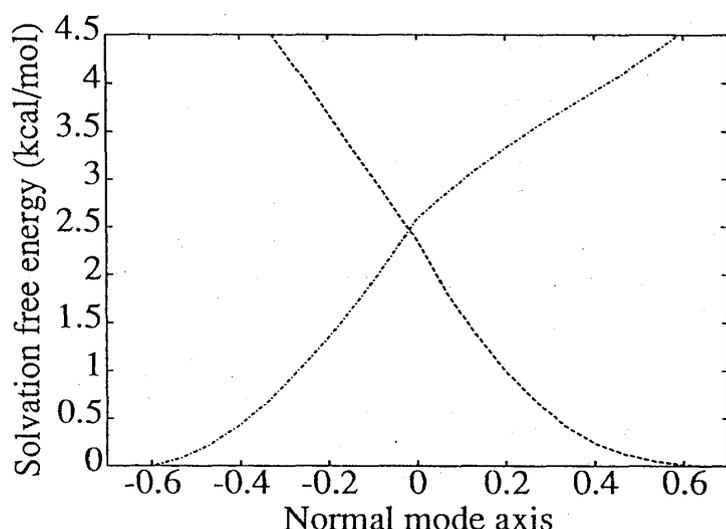


図5.3：第1規準振動軸方向でのLの残基の自由エネルギー（一点鎖線）とRの残基の自由エネルギー（破線）。文献19より転載。

まず、それぞれの残基について第1規準振動モード方向の水和自由エネルギーの変化を調べる。そのより左の極小に関係している残基と右の極小に関係している残基の2種類に分類する。1つは、図5.2の左から右へ構造を変化させたときに、原点より左側に極小があるか、単調増加をしめす残基（L）である。もう1つは、図5.2の左から右へ構造を変化させたときに、原点より右側に極小があるか、単調減少をしめす残基（R）である。分類されたそれぞれの残基の水和自由エネルギーの和を図5.3に示してある。このように、それぞれ別の位置に極小をもつエネルギー面の重ね合わせとして水和自由エネルギーの微細構造ができると考えるとよい。RとLの残基は、メリチンのなかで特徴的な分布をしている。Lの残基は立体構造上2つのクラスターを作っている。それぞれの位置は、第1規準振動モード方向の運動の節にあたる。一方、Rの残基は、原子のゆらぎが大きい部分あたっている。このように、第1規準振動モード方向の水和自由エネルギー面の微細構造ができた原因は、メリチンの協調的運動と大きく関係している。

ングが変化する。蛋白質の運動は常にパッキングの変化に追隨しているわけではないが、蛋白質の構造トランジションは、間欠的な水分子の集団運動と関係している可能性がある。また、これより更に遅い時間スケールで蛋白質の運動を観たならば、水分子の拡散も溶媒の粘性やランダムな力の一部とみなすことができるであろう。このように、蛋白質と水の運動のカップリングは複雑で、時間スケールの階層的な影響を及ぼし合っていることがわかる。

6.2 蛋白質の階層的ダイナミクス

蛋白質の運動に関しては、3.4で述べたように既に真空中のシミュレーションによって、一種の階層構造が存在することが明らかになっている。これは蛋白質の分子内の原子のパッキングトポロジーによって特徴づけられている。蛋白質の表面付近の局所的な原子パッキングの変化は、第1レベルの構造変化である。第2レベルの構造変化は分子の協調的な構造変化で、分子のコアの原子パッキングが変化する。

溶媒の影響により、このような協調的な構造変化にも、更に階層性が生じる。第1レベルは蛋白質と水分子の原子パッキングの変化によって生じ、ピコ秒程度の時間スケールでトランジションが起こる。第2レベルは蛋白質分子のコアの原子パッキングが変化するによって生じ、 10^2 ピコ秒~の時間スケールでトランジションが起こる。

これまでの結果は、メリチンとBPTIという小型の蛋白質について得られたものである。最初に述べたように、蛋白質には様々な種類があり、多様な機能がある。しかし、ここでみてきた蛋白質の階層的なダイナミクスは、その物理的要因を考えると、かなり一般性のある現象ではないだろうか。

謝辞

ここに述べた蛋白質と水の動的構造に関する研究は主に京都大学理学部の郷信広教授、平田文男助教授、Steven Hayward博士との共同研究である。

文献

- [1] Pohorille, A.; Pratt, L.R.; Laviolette, R.A.; Wilson M.A.; MacElroy, R.D. *J. Chem. Phys.* 1987, **87**, 840. Ohmine, I.; Tanaka, H.; Wolynes, P.G. *J. Chem. Phys.* 1988, **89**, 5852.

- [2] Weiner, S.J.; Kollman, P.A.; Nguyen, D. T.; Case, D.A. *J. Comp. Chem.* 1986, **7**, 230.
- [3] Jorgensen, W.L.; Tirado-Rives, J. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, **110**, 1656.
- [4] Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; van Gunsteren, W.F.; Hermans, J. *Intermolecular Forces*, edited by B. Pullman (Reidel, Dordrecht, Holland, 1981) p. 331.
- [5] Chandrasekhar, J.; Spellmeyer, D.C.; Jorgensen, W.L. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, **104**, 903.
- [6] Kidera, A.; Inaka, K.; Matsushima, M.; Go, N. *J. Mol. Biol.* 1992, **225**, 447.
- [7] Lamm, G.; Szabo, A. *J. Chem. Phys.* 1986, **85**, 7334.
- [8] Van Gunsteren, W.F.; Berendsen, H.J.C.; Hermans, J.; Hol, W.G.J.; Postma, J.P.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983, **80**, 4315. Levitt, M.; Sharon, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, **85**, 7557. Brooks III, C.L.; Karplus, M. *J. Mol. Biol.* 1989, **208**, 159. Jorgensen, W.L.; Tirado-Rives, J. *Chem. Scripta* 1989, **29A**, 191.
- [9] Kitao, A; Hirata, F; Go, N. *Chem. Phys.* 1991, **158**, 447.
- [10] Ikura, T.; Go, N.; Inagaki, F. *Proteins*, 1991, **9**, 81.
- [11] Hayward, S.; Kitao, A.; Hirata, F.; Go, N. to be published.
- [12] Smith, J.; Cusak, S.; Tidor, B; Karplus, M. *J. Chem. Phys.* 1990, **93**, 2974.
- [13] Noguti, T.; Go, N. *Proteins*, 1989, **5**, 97. Noguti, T.; Go, N. *Proteins*, 1989, **5**, 104. Noguti, T.; Go, N. *Proteins*, 1989, **5**, 113. Noguti, T.; Go, N. *Proteins*, 1989, **5**, 125. Noguti, T.; Go, N. *Proteins*, 1989, **5**, 132.
- [14] Kitao, A; Hirata, F; Go, N. to be published.
- [15] Eisenberg, D.; Kauzmann, W. *The Structure and Properties of Water* (Oxford University Press, New York 1969).
- [16] Tanaka, H.; Ohmine, I. *J. Chem. Phys.* 1987, **87**, 6128.
- [17] Frank, H.S.; Wen, W.-Y. *Discuss. Faraday. Soc.* 1957, **24**, 133.
- [18] Samoilov, O.Y. *Discuss. Faraday. Soc.* 1957, **24**, 141. Geiger, A. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1981, **85**, 52.
- [19] Kitao, A; Hirata, F; Go, N. to be published.
- [20] Hirata, F.; Rossky, P.J. *Chem. Phys. Lett.* 1981, **83**, 329. Chandler, D.; Andersen, H.C. *J. Chem. Phys.* 1972, **57**, 1930.
- [21] Hirata, F.; Rossky, P.J.; Pettitt, B.M. *J. Chem. Phys.* 1983, **78**, 4133.
- [22] Singer, S.J.; Chandler, D. *Mol. Phys.* 1985, **55**, 6221.