

蛋白質の機能発現と柔らかいダイナミクス

名古屋大学情報科学研究科

笹井理生

概要：多くの蛋白質の生理機能が発現するのは、ミリ秒、あるいはそれ以上の時間スケールである。こうした時間スケールでは、蛋白質は局所的なアンフォールディング・フォールディングを含む大きな構造変化を引き起こしている可能性がある。具体例として Ras の構造変化、アクトミオシン系におけるミオシンの滑り運動を取り上げる。フォールディングの研究で開発された理論的な道具によって大きな構造変化を分析し、柔らかくダイナミックに動く蛋白質の描像について議論する。

1980年代には、蛋白質のフォールディングは決まった中間構造を順番に経て最終の天然構造に至る過程である、というドグマが大方の支持を得ていた。しかし、統計物理や計算物理の理論的な提言をきっかけに新しい実験データが数多く報告され、現在では、フォールディングは多様な経路を経て実現する統計的・確率的な現象であること、フォールディングの遷移状態は多様な経路の存在を反映する多様な構造のアンサンブルであること、などが判明している。フォールディングは機械の組み立てのような正確なアルゴリズムに沿った現象ではなかった、というわけであり、この20年ほどの間に視点の転換が起きたとすることができる。

同様な視点の転換は、フォールディング以外の蛋白質の物性の研究にも及び始めている。これまで「蛋白質の結晶構造が判明すると一目瞭然、その機能発現のメカニズムがわかる」という例が数多く蓄積されてきたため、蛋白質は決められた構造にしたがって正確に動く、精密機械であるというイメージが作られてきた。しかし、蛋白質は熱揺らぎによって大きくゆらぐシステムであり、確率的に動く柔らかい機械である。このことを考慮すれば、蛋白質は、正確なアルゴリズムに沿って逐次的に動く人間のつくるマクロな機械とは異なった原理で動作しているのではないか、という可能性が考えられる。実際、分子モーターの動作、シグナル伝達、アロステリック転移など、多くの生理的に重要な反応はミリ秒以上の時間スケールを持つが、これは蛋白質の2次構造が崩壊・形成するマイクロ秒の時間スケールより長く、部分的なアンフォールディングやフォールディングを可能にする時間スケールである。また、蛋白質全体がアンフォールド・フォールドする自由エネルギーのスケールは高々20kTの程度であり、ATPの加水分解やリガンドの結合・解離に伴う自由エネルギー変化は充分それに匹敵するし、光励起ではさらにずっと大きいエネルギーが供給される。生化学反応や光励起などに伴うエネルギー緩和が部分的なアンフォールディングやフォールディングとカップルするように自由度の再配分の機構が働けば、蛋白質の機能発現はフォールディングと同様、多様な経路をたどって統

計的・確率的に進むのかもしれない [1]。ここでは2つの具体例によって、そのような機構の可能性を考えて見たい。

最初にとりあげるのは、シグナル伝達において重要な役割を果たすRas-p21 という蛋白質である。Rasは細胞内で多彩な働きをする蛋白であるが、GTPを結合しているときは、複数種類のパートナー蛋白質と結合することによってシグナルを伝達し、GDPを結合しているときはパートナー蛋白質を結合しない。したがって、RasによるGTPからGDPへの加水分解はシグナル伝達のスイッチOFFであり、Rasはタイマーのように働いているわけである。もっとも、Ras単独での加水分解の速度は遅く、 0.001min^{-1} の程度であるが、GTPase-activating protein (GAP) がRasに結合すると、速度はずっと早くなって生理的時間内でのスイッチOFFが行われる。Rasに生じる突然変異はこのスイッチOFFを遅らせ、シグナルを出しっぱなしにして発ガンにつながるため、医学的な重要性から多くの研究が行われてきた。図1にRasのGTP結合型とGDP結合型を示す。GTPと離れてゆらいでいたswitch II と呼ばれるループ領域が変化し、GDPに接近した構造に変化することが示されている。以下では、Rasのゆらぎがこの構造変化とどのように関係しているかを議論する。

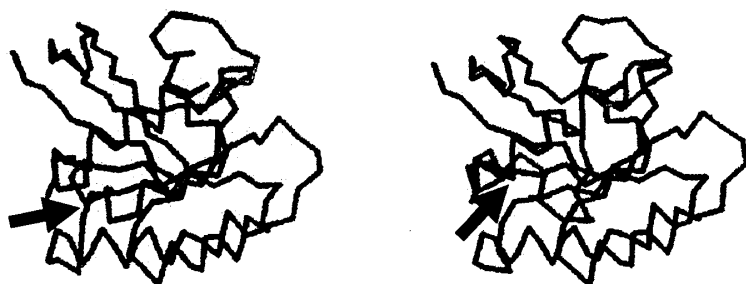


図1 Ras 蛋白質の構造。
GTP 結合型 (左) と GDP 結合型 (右)。GTP から GDP への加水分解に伴い、矢印で示した Switch II 領域の構造が大きく変化する。

GTP結合型とGDP結合型の間のスイッチングを2つのGo型ハミルトニアン、 H^{GTP} と H^{GDP} 、の切り替えで表現する。

$$H^{\text{GTP}} = H_{\text{chain}}(\{\mathbf{r}_i\}) + \sum_{ij} \varepsilon_{ij}^{\text{GTP}} u(r_{ij}), \quad (1a)$$

$$H^{\text{GDP}} = H_{\text{chain}}(\{\mathbf{r}_i\}) + \sum_{ij} \varepsilon_{ij}^{\text{GDP}} u(r_{ij}). \quad (1b)$$

ここで、 i 番目のアミノ酸残基と j 番目の残基がGTP結合型構造の中で空間的に接触していれば $\varepsilon_{ij}^{\text{GTP}} = 1$ 、そうでなければ0である。同様にGDP結合型構造の中で空間的に接触していれば $\varepsilon_{ij}^{\text{GDP}} = 1$ 、そうでなければ0とする。 H_{chain} は鎖がつながっていることを表現するバネのエネルギー、 $u(r_{ij})$ はレナード・ジョーンズポテンシャルに類似した型の引力ポテンシャルである。

(1) 式をPortman-Takada-Wolynes (PTW)が蛋白質フォールディングの研究で用いた方法 [2] により近似的に評価する。このPTW法は、Feynmanが経路積分を用いてポーラロンの質量を求めた [3] のと類似の変分法による一種の平均場近似である。PTW法を用いてGTP結合型からGDP結合型をなめらかに結ぶ構造変化経路を求め、経路上での自由エネルギーを描いたのが図2である。GTP結合型から構造変化と共に、ハミルトニアン(1a)で計算した自由エネルギー

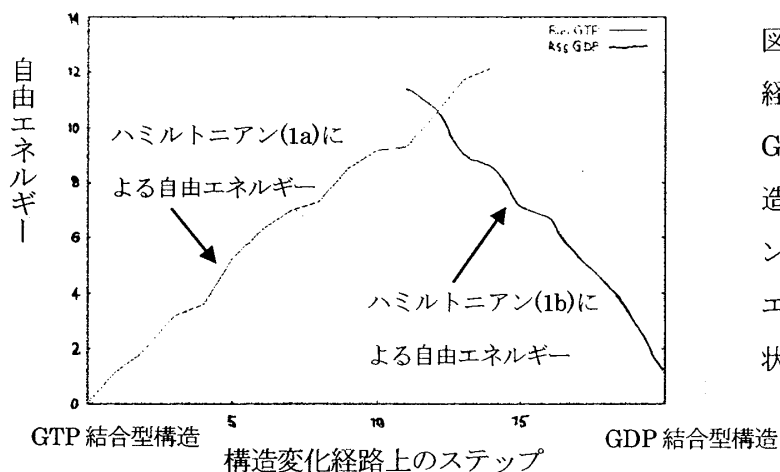


図2 PTW 法で計算された構造変化経路に沿った自由エネルギー。左端がGTP 結合型、右端がGDP 結合型の構造。2つの曲線は異なるハミルトニアン(1a)と(1b)によって計算された自由エネルギー曲線。交差する構造が遷移状態の構造。

は上昇し、ハミルトニアン(1b)で計算した自由エネルギーと交差する。ここでGTPの加水分解とともに電荷分布が変化し、相互作用が切り替わってハミルトニアン(1b)を使う状況になると考えると、この交差点が構造変化の遷移状態である。遷移状態での構造とゆらぎの様子を表したのが図3である。

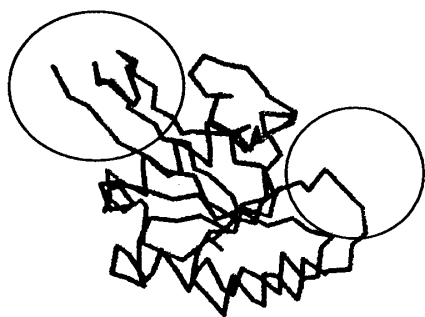


図3 遷移状態の代表的構造。円で囲んだ部分の構造ゆらぎは大きい。とくに、N末端付近のシート構造はアンフォールドに近い大きな構造ゆらぎを示している。

Switch II から離れた部分(図3の円で囲んだ部分)の構造が大きくゆらぎ、とくにN末端付近の β シートが部分的にアンフォールドしていると表現してもよいことが注目される。このゆらぎは、構造変化によって相互作用のひずみが大きくなりエネルギーが高くなったのを補償する形でエントロピーを増大させ、遷移状態の自由エネルギーを下げる効果をもたらしている。数多くの構造変化経路に対して同様の分析を行ったところ、遷移状態の自由エネルギーが低い経路ではいずれも、遷移状態で図3の円で囲んだ部分で構造のゆるみが生じていることが確認

された。GTP 加水分解を促進する GAP は主に Switch II 領域に結合して Switch II 領域の構造を加水分解に有利な形に固定していると思われるが、同時に GAP と Ras の複合体では図 3 の円で囲んだ部分のうち N 末端のシート構造のゆらぎが大きくなっており、ここで述べた計算結果と同じ機構が働いている可能性がある。計算結果は、蛋白質の機能発現に伴う構造変化に際して、別の場所の構造ゆらぎが大きくなることによってエントロピーを稼いで構造変化を促進する、という効果があることを示唆しているが、こうした効果は蛋白質にとって普遍的な機構である可能性がある。

次に紹介するのは、局所的なアンフォールディングを含む大きな構造ゆらぎが機能発現の駆動力となっていると考える仮説についての計算である。対象としたのは分子モーターとして最も古くから研究されてきたアクチンミオシンについてである。文献[4]の 1 分子測定の結果はミオシンがアクチンフィラメント上を多ステップのすべり運動をすることを示したが、その機構は未解明で、ミオシンはアクチンフィラメント上に固定されており滑らずに力を発生する、と主張するレバーアームモデルとどちらが正しいか、という論争も未決着である。図 4 はミオシンとアクチンが固く結合したと思われる構造が最低エネルギー状態になるように相互作用を決めた Go 型ハミルトニアンによる分子動力学計算のスナップショットである。アクチンと相互作用するミオシンの接触部分がアンフォールドし、再びフォールドする過程でアクチンフィラメント上を移動する様子を表現している。フォールディングは一方向への緩和過程であるため、

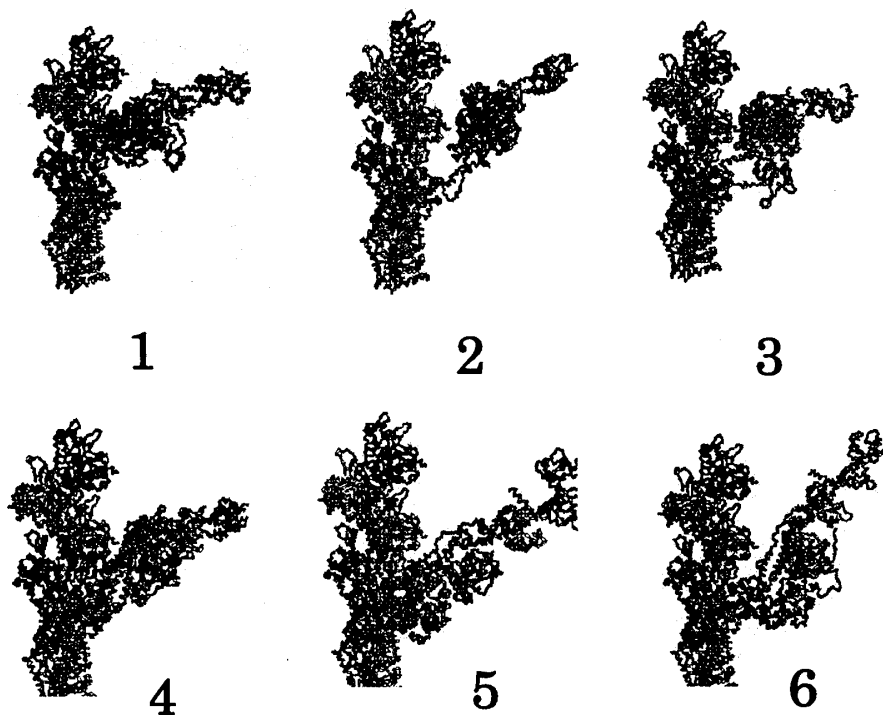


図 4 アクチンが重合したフィラメント上をミオシンが滑る運動のシミュレーションの例。

そのエネルギー緩和に伴い、アクチンフィラメント上の一方向の運動が実現している例である。現在、我々は計算の条件やモデルの詳細を変えて多数のトラジェクトリーを集めてその統計を見ようとしている。これまで(1) レバーアーム状の運動を示すトラジェクトリーも滑り運動を示すトラジェクトリーも両方現れる。(2) 構造緩和の一方向性によって滑る方向の一方向性が決まる。などの結果を得ているが、2ステップ以上の多ステップ運動を未だ観測しておらず、計算条件を再検討をしている段階である。

長年の懸案であるアクトミオシンの動作機構の解明について未だ決定的な理論は現れていないが、柔らかくダイナミックに動く蛋白質の描像が本質をついているかどうか、計算機シミュレーションによる解析、および統計物理的な考察が必要とされている。このほかに光シグナル伝達、アロステリック転移、複合体形成など複数の例で柔らかい蛋白質のメカニズムの重要性を分析することが進んでいる。こうした研究から、蛋白質とは何か？という理解がさらに深まってゆくのではないだろうか？

参考文献

- [1] K. Itoh and M. Sasai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14736 (2004).
- [2] J. J. Portman, S. Takada, & P. G. Wolynes, *J. Chem. Phys.*, **114**, 5069 (2001).
- [3] R. P. Feynman, *Statistical Mechanics*, (Benjamin., 1972).
- [4] K. Kitamura, M. Tokunaga, A. H. Iwane, & T. Yanagida, *Nature*, **397**, 129 (1999).
- [5] T. P. Terada, M. Sasai, and T. Yomo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9202 (2002).