

## 蛋白質の水和とフォールディング

肥後順一

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

### 初めに

多くの蛋白質はそのアミノ酸配列によって特定の立体構造（フレームワーク）に自発的におれたたまれ（folding）、そのフレームワークに支えられつつ活性部位が形作られる。活性部位は生理活性を発揮するための中心的役割を果たす。言うまでもなく、folding が起きるのも生理活性が発揮されるのも溶液環境中（生体内）である。

蛋白質の folding 機構の解明および立体構造予測は、生物物理学の黎明期からこの分野の中心問題のひとつであり、今なおそうあり続けている。非常に多くの試みの結果、知識は蓄積されたが、folding を理論的または計算機科学的に（すなわち第一原理的に）解明するには至っていない。しかし、計算機の高速化と分子シミュレーション技術の進歩で folding 問題は新たな展開を見せている。

生体高分子が機能を発揮するのは溶液中である。よって機能と水合は切っても切れない関係にあると、筆者は考えている。しかし、計算機を用いて生体高分子の機能を研究する場合、溶媒は単に溶質を浮かべるための媒体という見方が従来の主流であり、機能発揮のための能動的・積極的役割が溶媒に付与されることはない。本当に溶媒は脇役なのであろうか。

### folding.

蛋白質 folding 問題を第一原理的に計算機シミュレーションにより解こうとすると、2つの困難がある。ひとつは力場（force field）の精度であり、もうひとつは構造サンプリングの効率である。力場が不正確だと、構造空間をどんなに広く探索したとしても正しい答え（その蛋白質の天然構造）は得られない。シミュレーションで時々刻々変化する立体構造が、構造空間の中で天然構造の領域にやってきたとしても、それが安定構造であると判定されない（または、別の立体構造がより安定であると判定される）からである。しかし、ここでは力場の問題にはこれ以上触れない。

一方サンプリング効率が低いと、仮に力場が正確でも正しい立体構造にはたどり着けない。ポリペプチド鎖（アミノ酸がつながった鎖）の伸びた状態からシミュレーションを始めたでしょう。立体構造が様々な構造変化を経て天然状態にたどり着くまでには、広大な構造空間を幅広く探索する必要がある。筆者の経験から言って、通常のカノニカル分子動力学シミュレーション（または、カノニカルモンテカルロシミュレーション）で蛋白質の天然構造を得るのは絶望的に難しい。

1990年代後半から、ペプチドや蛋白質（ひっくるめてポリペプチドと呼ぶ）の構造探索にマルチカノニカル分子動力学法（McMD）[1]やレプリカ交換分子動力学法[2]が適用され、サンプリング効率が飛躍的に向上した。これら2つの方法は、もとは物理学の分野で考案されたものであるが、ほぼ時を同じくしてポリペプチド系に応用された。生体分子系に限って言えば、世界的にはレプリカ交換分子動力学法の利用が盛んであり、McMD法を使っている研究者はごく少数である。我々はその少数派に属しており、約10年間McMDシミュレーションを使い蛋白質の立体構造予測、自由エネルギー地形の算出に努力をしてきた。蛋白質は大きな系である。だから最近では計算時間短縮のために溶媒を適当な関数で近似することが流行している。一方我々の手法の特徴は、溶媒（水分子やイオン）をあらわに取り入れることである[3,4]。その結果、計算時間が長くなる。しかし、溶媒の近似的取り扱いは結果に重大な影響を与える[5]。

現在までのところ我々は、40残基の蛋白質（C-terminal domain of H-NS）のサンプリングまでできるようになった[6]。この蛋白質の特徴は、その天然構造に $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ シートの両二次構造を含むことである。つまり、力場には $\alpha/\beta$ 両二次構造を安定化できる能力が要求される。残念ながら我々は、単一の力場でこの40残基蛋白質の天然構造を導き出すことに成功していない。そこで次善の策として、シミュレーションの前に二次構造予測という手法を用いて、蛋白質各部位の二次構造になりやすさを調べた。そして、 $\alpha$ ヘリックス度合いが高いと判定された部位は若干ではあるが $\alpha$ ヘリックスになりやすいように、 $\beta$ シート度合いの高い部位は $\beta$ シートになりやすいように力場を調節した（力場の調節についてはref.7を参照）。その結果、天然構造がサンプルされるようになった。しかし、天然構造は最安定構造（自由エネルギー最小構造）としてではなく、準安定構造として得られた。多くサンプリングされた立体構造は、局所的には天然の構造を取ってはいるが分子全体としては歪んだ形をしていた。

このように、現在我々は力場の精度の問題に直面しているが、サンプリング効率の点ではかなり満足している。すなわち、McMDシミュレーションは天然構造を含む広範囲な構造空間を探索できることが、この研究から示せたからである。言い換えると、正確な力場さえ手に入れば、おそらく50残基以上の蛋白質の立体構造予測も可能であると、現在我々は考えている。

サンプリング効率の向上と力場の正確さの2つの問題は、研究の過程で交互に現れる[6,8-12]。ある程度サンプリング効率が向上すれば、より長いポリペプチド鎖の構造探索が可能になる。するとその長さのポリペプチド鎖にとっての正確な力場が必要になる。そして力場が改良されれば、さらに長いポリペプチド鎖を取り扱うためにサンプリング効率の向上に努める。計算機科学的な蛋白質 folding 問題の研究は、このように深化していく。

## 水和。

物理化学の分野では水和は盛んに研究されている。生体高分子の分野でも多種多様な水和の研究が行われてきた。蛋白質は大きな分子であり、分子表面には帯電した残基、極性基、非極性基が複雑に分布する。また、蛋白質分子表面の形もアミノ酸の多様性を反映して凹凸に富んでいる。従って、水和は複雑な様相を示す。

多くの研究がなされてきた一方で、水和と生体高分子の機能との関係を真正面にとらえた研究は少ない。生体高分子の大きな特徴は、生理機能である。多種多様な蛋白質がそれぞれの機能を発揮することで、生命は維持される。つまり、生体高分子は、多様な様式で相互作用をしている。機能を発揮する上で水和は積極的な役割をしているのであろうか。

従来の生体高分子の水和研究は、個々の水分子に注目したり、生体高分子のごく近傍の水に注目しつつ行われてきた（こうした研究に意味がないとは、もちろん言うつもりはない）。例えば、あるアミノ酸のある原子とその近傍の水分子との間の水素結合の有無を調べたり、第一水和層の水の統計的振る舞いを調べたりする。

我々は個々の水に注目することをいったん忘れ、生体高分子の回りの空間（サイト）に注目した。あるサイトを訪れた多数の水分子の統計的性質をそのサイトの物理量だと考える。このような考え方で、水分子の配向の場所依存性[13-17]、水素結合の場所依存性[18,19]、水の流れの場所依存性[20]を研究した。生体高分子周辺の（室温、1気圧での）水分子の動きは、一見乱雑でとりとめのないものに見える。しかし、場の量ととらえることで、生体高分子から離れた場所の水和も研究可能になる[21,22]。

ここでは、水分子の配向について述べる。生体高分子の周囲の水の分子配向は、場としてとらえると空間的なパターンが見えてくる。あたかも太陽の周囲のフレアを見るようである。我々はこの空間パターンを *solvent site-dipole field* と名付けた。生体高分子に近いほど *solvent site-dipole field* の時間的揺らぎは小さく、離れると揺らぎが増す[15,16]。また、生体高分子の極性残基や電荷を持った残基に近いほど、配向度合いは強い。特徴的なのは、配向が及ぶ有効距離である。我々の分子動力学シミュレーションによると、2つの蛋白質の最短距離が 30Å 程度でも、2分子の中間領域に配向が残る[22]。言い換えると、2つの蛋白質は 30Å 離れていても、水を介して相互作用をする。この 30Å という値は常識に長い。連続体近似した溶媒の取り扱い（ポアソンボルツマン方程式）では、2つの生体高分子が数 Å 離れるだけでその相互作用は消える。従来の常識にあてはまらない分子間相互作用の機構を、分子動力学が提案している。

*solvent site-dipole field* を介した生体高分子間相互作用は、熱力学的にどうとらえられるのであろうか。生体高分子周辺で水分子の配向が抑えられることで、二つの生体高分子の接近が

エントロピーの得を生み出すのか、エンタルピー的な安定化をもたらすのか？我々は、今のところ確たる答えを持っていない[22]。

終わりに。

folding simulation に関しては、力場の精度向上が現在の我々の課題である。力場さえ妥当なら50残基を超え、かつ $\alpha/\beta$ 両二次構造を含む蛋白質の第一原理的な folding simulation は可能であると、我々は考えている。solvent site-dipole field に関しては、実験的な手法が開発され field がじかに観測されることを望む。solvent site-dipole field や水の流れの場は計算屋からの提案である。

今回の発表では、2つの課題を別々のものとして発表した。2つの研究は、いずれ結びつくだろう。なぜなら、folding も分子間相互作用も溶液中で起こる現象である。コンピュータの発達で、多くの生体高分子を含んだ巨大系の長時間シミュレーションが可能になりつつある。いずれ、まるまる一個の細胞をリアルな（近似を用いない）分子シミュレーションで観察できる日がくるかもしれない。

## References

1. N. Nakajima, H. Nakamura, A. Kidera, *J. Phys. Chem. B* **101**, 817 (1997).
2. Y. Sugita, Y. Okamoto, *Chem. Phys. Lett.* **314**, 141 (1999).
3. N. Kamiya, D. Mitomo, J.-E. Shea, J. Higo, *J. Phys. Chem. B* **111**, 5351 (2007).
4. R. Yagisawa, N. Kamiya, J. Ikebe, K. Umezawa, J. Higo, *Chem. Phys. Lett.* **455**, 293 (2008).
5. D. Mitomo, Y. S. Watanabe, N. Kamiya, J. Higo, *Chem. Phys. Lett.* **427**, 399 (2006).
6. J. Ikebe, N. Kamiya, H. Shindo, H. Nakamura, J. Higo, *Chem. Phys. Lett.* **443**, 364 (2007).
7. N. Kamiya, Y. S. Watanabe, S. Ono, J. Higo, *Chem. Phys. Lett.* **401**, 312 (2005).
8. J. Higo, N. Ito, M. Kuroda, S. Ono, N. Nakajima, H. Nakamura, *Protein Science* **10**, 1160 (2001).
9. S. Ono, M. Kuroda, J. Higo, N. Nakajima, H. Nakamura, *J. Comp. Chem.* **23**, 470 (2002).
10. N. Kamiya, J. Higo, H. Nakamura, *Protein Science* **11**, 2297 (2002).
11. K. Ikeda, J. Higo, *Protein Science* **12**, 2542 (2003).
12. J. Ikebe, N. Kamiya, J. Ito, H. Shindo, J. Higo, *Protein Science* **16**, 1596 (2007).
13. J. Higo, H. Kono, N. Nakajima, H. Shirai, H. Nakamura, A. Sarai, *Chem. Phys. Lett.* **306**, 395 (1999).
14. J. Higo, H. Kono, H. Nakamura, A. Sarai, *Proteins* **40**, 193-206 (2000).
15. J. Higo, M. Sasai, H. Shirai, H. Nakamura, T. Kugimiya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5961 (2001).

16. J. Higo, M. Nakasako, *J. Comp. Chem.* **23**, 1323 (2002).
17. T. Yokomizo, S. Yagihara, J. Higo, *Chem. Phys. Lett.* **374**, 453 (2003).
18. T. Yokomizo, M. Nakasako, T. Yamazaki, H. Shindo, J. Higo, *Chem. Phys. Lett.* **401**, 332 (2005).
19. T. Yokomizo, J. Higo, M. Nakasako, *Chem. Phys. Lett.* **410**, 31 (2005).
20. K. Umezawa, J. Higo, S. Shimotakahara, H. Shindo, *J. Chem. Phys.* **127**, 045101 (2007).
21. N. Hamasaki, H. Miyagawa, D. Mitomo, A. Yamagishi, J. Higo, *Chem. Phys. Lett.* **431**, 160 (2006).
22. N. Takano, K. Umezawa, J. Ikebe, Y. Sonobe, R. Yagisawa, J. Ito, N. Hamasaki, D. Mitomo, H. Miyagawa, A. Yamagishi, J. Higo, *CBI J.* **8**, 14 (2008).