

A possible mechanism of high-pressure unfolding of proteins: Formation of high-density hydration shell

豊橋技科大 墨 智成¹

1 導入

水中の蛋白質において、一般に観測される高圧変性(圧力誘起の globule-coil (G-C)転移)は、水と蛋白質が織りなす一般的な物理現象である。変性に伴うギブスの自由エネルギー変化

$$d(\Delta G) = -dT\Delta S + dP\Delta V. \quad (1)$$

は、温度一定での加圧過程を考えると、高圧変性に伴う系の体積変化は、 $\Delta V < 0$ でなければならない。溶媒に対する露出表面積によって定義される蛋白質の幾何学的な排除体積は、G-C 転移によって通常増加するので、それを上回る何らかの体積減少機構が存在しない限り、高圧変性は観測されない。従って、体積減少を導く物理的起源を明らかにする事が、高圧変性機構の理解において、必要不可欠あると言える。

蛋白質のコンパクトな天然構造安定性について、疎水性相互作用(炭化水素の様な疎水性物質間に働く水を介した間接相互作用)が重要である事が、Kauzman の実験[1]により示唆されている。そのため、蛋白質の高圧変性は、メタン分子間に働く平均力ポテンシャルに対する圧力効果の観点から、多くの研究者によって議論されている。それらの研究により、水を一個挟んで安定化した状態が、メタン分子が会合した状態に比べ、安定化する事が示されている[2]。この結果に基づき、高圧変性は水分子が蛋白質内部に侵入する現象として解釈する事が出来る。一方、高圧変性に伴う体積減少は、蛋白質内部に存在する空孔への水の浸入によって説明されている。しかしながら、メタン間の平均力ポテンシャルに基づく解釈と体積減少機構との関連性があまり明確ではない。

我々はこれまで、温度および圧力による蛋白質の変性の物理的起源を調べる目的で、疎水性高分子鎖を溶媒和自由エネルギー面のプローブ分子として用いた、液体の密度汎関数理論(DFT)に基づくマルチスケールシミュレーションによる液体論的解析を行ってきた。その結果、蛋白質の高温および低圧変性は、水の凝集性液体としての性質に起因した溶媒和現象であり、蛋白質表面での水の長距離に及ぶ dewetting によって誘起される G-C 転移に対応する事が明らかと成った[3]。この結果から、室温

¹ E-mail: sumi@tut.jp

においてでさえも、大気圧以下の低圧領域(気-液共存線近傍)において、常に変性状態が出現する可能性が示唆される。

一方、高圧変性に対応した圧力誘起の G-C 転移に関しては、凝集性液体の性質だけでは説明出来ない事が明らかと成った。そこで本研究では、水素結合ネットワークによる寄与を考慮するために、水の点電荷モデルを溶媒として採用した液体の DFT に基づく解析を行い、G-C 転移に伴う体積減少を導く物理的起源を明らかにする事を目的に研究を行う。

2 モデルと理論

本研究では、圧力上昇に伴う蛋白質の水和自由エネルギー面の変化を調べるプローブ分子として、疎水性高分子鎖を採用する。そして、水中での疎水性高分子鎖のマルチスケールシミュレーションを行い、密度汎関数理論(DFT)に基づく液体論的解析を行う。高分子モノマー間に働く水を介した間接相互作用(疎水性相互作用)は、そのフーリエ変換した形として、次式によって与えられる[3]。

$$\hat{W}_{pp}(k)/k_B T = \hat{\sigma}_{pp}^{-1}(k) \hat{h}_{pw}(k) n_w^0 \hat{C}_{ww}(k) n_w^0 \hat{h}_{wp}(k) \hat{\sigma}_{pp}^{-1}(k). \quad (2)$$

ここで、 n_w^0 , $\hat{\sigma}_{pp}(k)$, $\hat{h}_{pw}(k)$ および $\hat{C}_{ww}(k)$ は、水の数密度、高分子モノマー間の分子内相関関数、高分子-水間の対相関関数、およびバルクの水の直接相関関数である。また、高分子周りの水の配置情報は、以下に示す高分子-溶媒混合系の DFT に基づく高分子-水間対相関関数 $h_{pw}(r)$ の積分方程式により計算する[3]。

$$h_{pw}(r) = \int \left\{ \prod_{a=1}^{N_p} d\mathbf{r}_1^a \right\} \left\{ \frac{1}{N_p} \sum_{a=1}^{N_p} \delta(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_1^a|) \right\} \left\{ \prod_{a=1}^{N_p-1} s(|\mathbf{r}_1^a - \mathbf{r}_1^{a+1}|) \right\} \left\{ \prod_{a=1}^{N_p} \exp(-\beta U_p^{ref}(|\mathbf{r}_1^a|)) \right\} - 1, \quad (3)$$

$$U_p^{ref}(r) = v_{pw}(r) - \frac{1}{\beta} \int d\mathbf{k} \exp(-i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}) \hat{\Gamma}_p(k), \quad (4)$$

$$\hat{\Gamma}_p(k) = \frac{\hat{\sigma}_{pp}(k) - \hat{\sigma}_{pp}^{ref}(k)}{\hat{\sigma}_{pp}(k) \hat{\sigma}_{pp}^{ref}(k)} \hat{h}_{pw}(k) + \frac{\hat{h}_{pw}(k)}{\hat{\sigma}_{pp}(k)} n_w^0 \hat{C}_{ww}(k). \quad (5)$$

ここで、 N_p は高分子モノマーの数、 $s(r)$ はモノマー間の連結を表す関数である。また、式(4)の $U_p^{ref}(r)$ はモノマーにかかる有効外場である。本研究では、DFT の参照系(上付き *ref* として表示)として、理想鎖気体を採用したので、式(3)は理想鎖のサイト密度分布に相当する。式(5)の右辺第二項では、バルクの情報である水分子間の直接相関関数 $\hat{C}_{ww}(k)$ が必要となる。本研究では水の点電荷モデル(TIP4P/2005)による 4000 分

子の等温等圧分子動力学法を実行し、それによって得られる動径分布関数(2nm 以下)を、積分方程式を用いて 50nm まで延長することにより、バルクの水の構造因子 $\hat{S}_{ww}(k)$ を正確に計算する。 $\hat{S}_{ww}(k)$ によって与えられる $\hat{C}_{ww}(k)$ を式(5)で用いて、高分子周りの水和構造を式(3)から計算する。得られた $\hat{h}_{pw}(k)$ を用いて式(2)による高分子モノマー間に働く水を介した疎水性相互作用を計算し、これを用いた水中での高分子鎖のシミュレーションを行う。その統計平均から得られた $\hat{\sigma}_{pp}(k)$ を入力として、再び式(3)–(5)を解き、 $\hat{h}_{pw}(k)$ を求める。この手続きを自己無撞着な結果が得られるまで続けることにより、水中での高分子鎖の分子内および分子間相関関数を得る事が出来る。

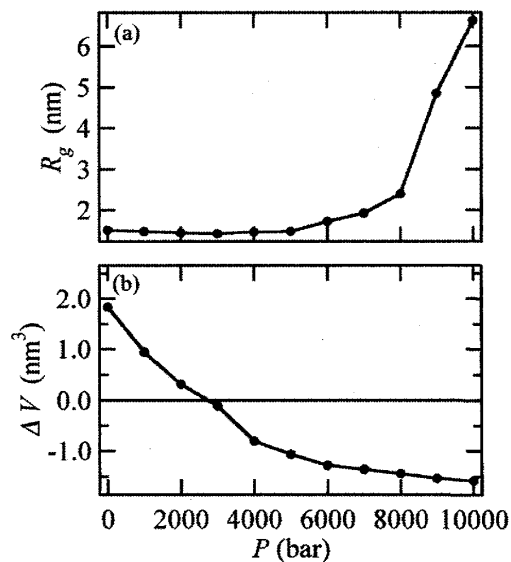


図 1. (a)慣性半径および(b)体積変化の圧力依存性

3 結果と考察

図 1 に、温度 300K の等温線に沿った(a)高分子鎖の慣性半径 R_g および(b)G-C 転移に伴う体積変化 ΔV の圧力依存性を示す。3000bar までの加圧では、 R_g は若干減少するが、それ以上の圧力上昇において R_g は増加し始め、7000bar 以上では顕著なランダムコイル化が観測される(図 1(a))。また、それに対応して、3000bar 以下の圧力領域では $\Delta V > 0$ であり、 R_g が加圧によって増加する圧力領域では $\Delta V < 0$ となる事がわかる(図 1(b))。

図 2 に高分子-水間動径分布関数 $g_{pw}(r)$ を示す。圧力が低い領域では、高分子がコンパクトな構造を形成するため、水が内部に侵入出来ない。一方、完全にランダムコイル化した 10000bar では、水は内部まで浸透し、第一水和圏の水は、モノマーに対し強く水和している事がわかる。また、 $g_{pw}(r)$ の第二極大以降のピークが示す水和構造の周期が、加圧に伴い

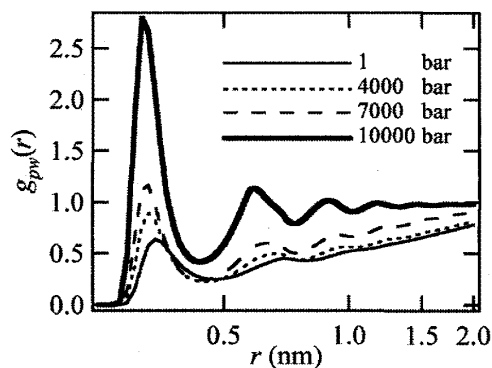


図 2. 高分子-水間動径分布関数の圧力依存性

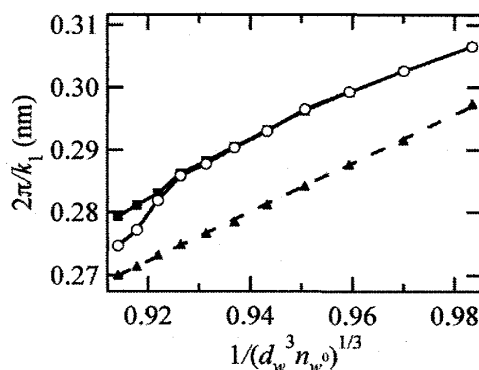


図 3. バルク水および高分子周りの水和層における水の周期構造のシステムサイズ依存性

短くなっている事が分かる. これを定量的に示すために, $h_{pw}(r) = g_{pw}(r) - 1$ のフーリエ変換 $\hat{h}_{pw}(k)$ における第一極大の波数 k_1 によって与えられる $2\pi/k_1$ を縦軸に, 横軸にはシステムサイズを表す $(1/d_w n_w^0)^{1/3}$ を採用したプロットを図 3 に示す. $2\pi/k_1$ は, $\hat{h}_{pw}(k)$ の第一極大によって特徴付けられる周期的な溶媒和構造における周期長を示す. また, G-C 転移に伴う溶媒和構造への影響を調べるために, 比較として, コンパクトな高分子構造における $\hat{\sigma}_{pp}(k)$ を仮定した $\hat{h}_{pw}(k)$ の計算による結果を, 四角(■)に示す. さらに, 高分子が存在しない場合, すなわち, 高分子-水界面が存在しない場合のバルク水の周期構造の変化と比較するために, バルクの水の $\hat{h}_{ww}(k)$ における $2\pi/k_1$ を三角(▲)に示す. バルクの周期構造は, 加圧に伴うシステムサイズの減少に“比例”して, その周期長 $2\pi/k_1$ が短くなっている事がわかる. これは, バルクの水の周期構造が, 等方均一的に圧縮されている事を示す. 一方, 高分子周りの水和層における周期構造を表す ○ および ■ は, システムサイズの減少に対して“非線形”な変化を示す. これは, システムサイズの減少に伴い, 不均一な水和構造の圧縮が高分子鎖によって誘起されている事を示す. また, 高分子構造をコンパクトに保った場合(■)は, システムサイズの減少に対して比較的単調な変化を示すが, ○ は高分子鎖の顕著なランダムコイル化に対応して, 急激に減少する. この結果は, 高分子鎖の G-C 転移に伴う露出表面積の増加によって, 水の水素結合ネットワークが高分子表面によって断絶されて, その結果として, 隙間の少ない周期の短い高密度水和層が高分子周りに連鎖的に形成される事を示唆している. これが高圧下での G-C 転移に伴う体積減少を導く物理的起源であり, 高分子鎖は系の体積を減少させるために, G-C 転移により露出表面積を増加させ, それにより, より多くの水素結合ネットワークを断絶し, その周りに隙間の少ない周期の短い高密度水和層を形成するのだと考えられる. この様な界面誘起の水の体積減少機構は, 蛋白質表面に限らず, 平面壁や巨大溶質等の表面によって誘起される高圧下での一般的な水和現象であると考えられる.

参考文献

- [1] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **14**, 1 (1959).
- [2] G. Hummer *et. al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1552 (1998).
- [3] T. Sumi *et. al*, *J. Chem. Phys.* **132**, 165101 (2010); *ibid.* **132**, 229901 (2010).