

タンパク質折り畳みの熱力学特性と熱力学的折り畳みシミュレーション

Thermodynamic Properties for Protein Folding and Thermodynamic Folding Simulation

鬼塚 健太郎
Kentaro Onizuka

要 旨

タンパク質の立体構造は、そのアミノ酸残基配列によって決定されている。よって、与えられたアミノ酸残基配列から、折り畳みシミュレーションによってタンパク質の立体構造は予測できるはずである。しかし、折り畳みや構造安定性のメカニズムが十分に解明されていないため、現状では現象にかかわる数万の全原子についての長時間シミュレーションを行う必要がある。本論文では、実験的に得られたタンパク質熱変性に関連する熱力学特性を、要素反応ごとに分解し、対象タンパク質の変性にかかわる熱力学特性が復元できることを示す。また、ここからタンパク質の熱力学的安定性解析や、熱力学的折り畳みシミュレーションを提案する。

Abstract

Protein structures are determined by their amino-residue sequence. The fold of a protein could be thereby predicted by the folding simulation of the peptide with a given amino-residue sequence. However, as the mechanism of folding and stability has not yet been completely solved, the simulation requires tremendous computational power for the entire tens of thousands of atoms involved in protein folding. In this paper I show how the thermodynamic properties in protein denaturation are dissected into the properties for each component reaction. This simple view of protein denaturation yields a thermodynamic simulation of protein folding and thermodynamic stability analysis.

1. はじめに

タンパク質は20種類のアミノ酸が数十から数千程度直線的に結合した鎖状高分子であり、構造変化と分子内結合形成を伴う折り畳み (folding) により特定の立体構造をもち特定の物理的・化学的活性をもつ。タンパク質分子の折り畳みや構造安定性のメカニズムの解明は未だ十分ではないため、タンパク質がかかわる現象のシミュレーションは原子レベルの現象をすべて取り込み数万の全原子を対象とした原理計算に近いものになり、計算量は莫大 (原子数の2~4乗に比例) である。

一方、タンパク質の安定性や折り畳みの要素反応 (結合の会合解離と構造変化) ごとの熱力学特性が判明すれば、これを利用して計算量を数桁減らすことができると考えられる。これによって、タンパク質を含む生体高分子の構造安定性解析や動的シミュレーションが短時間に正確に行うことができるようになり、タンパク質を標的分子とする新薬開発やペプチド創薬、さらには分子レベルの生命現象の解明に大きく貢献できる。

1.1 タンパク質の化学構造と立体構造

タンパク質を構成するアミノ酸は、アミノ基-NH₃⁺とカルボキシル基-COO⁻がアミノ酸の中心の炭素原子C^αに結合し、さらにC^αに水素原子-Hと側鎖-Rが結合した化学構造 (H₃⁺N-C^αHR-COO⁻) をもつ。側鎖-Rの違いにより20種類存在する。最も小さいのは側鎖が-HのGly(G)であり、最も大きいのはTrp(W)である。Ala(A), Leu

(L), Val(V)など側鎖が飽和炭化水素のもの、Phe(F), Tyr(Y)など芳香環をもつもの、Asp(D), Glu(E)などの酸性のもの、Arg(R), Lys(K)など塩基性のもの、Asn(N), Gln(Q)など極性基を含むものなどがある。タンパク質の鎖状分子では、隣接するアミノ酸はそれぞれの-COO⁻と-NH₃⁺が脱水結合 (-CO-NH-) し、アミノ酸残基 (-NH-C^αHR-CO-) が連続した化学構造になる。遺伝子DNAの塩基配列に基づいた残基配列のペプチドがリボソームで合成され、折り畳みにより特定の立体構造をもつタンパク質になる。ヒトのタンパク質は約2万種類である。

1.2 タンパク質の構造形成と安定性

タンパク質には、特定の立体構造をもち化学的・物理的活性がある安定状態と、構造がランダムで活性がない変性状態がある。タンパク質は温度上昇によって変性状態へ遷移する。リボソームで合成された直後は変性状態と同様と考えられるので、タンパク質の折り畳みは変性状態から安定状態への等温過程の状態遷移と考えられる。変性状態から安定状態への遷移における全自由エネルギー変化ΔGを、タンパク質分子内の結合や相互作用に関する自由エネルギー変化ΔG^Iと構造に関する自由エネルギー変化ΔG^Cに分けられるとし、次式で表す。

$$\begin{aligned} \Delta G &= \Delta G^I + \Delta G^C = \Delta H^I + \Delta H^C - T(\Delta S^I + \Delta S^C) \\ &= \sum_{ab} \Delta H^I(ab) - \Delta H^C - T[\sum_{ab} \Delta S^I(ab) + \Delta S^C] \\ &= \Delta G^I - T\Delta S^C \dots \dots \dots (1) \end{aligned}$$

$$\Delta G^l = \sum_{ab} \Delta G^l(ab) = \sum_{ab} [\Delta H^l(ab) - T\Delta S^l(ab)] \dots \dots \dots (2)$$

$$\Delta G^c = \Delta H^c - T\Delta S^c = -T\Delta S^c \dots \dots \dots (3)$$

ここで ab は、結合基 a, b の結合を表し、 $\Delta G^l(ab)$, $\Delta H^l(ab)$, $\Delta S^l(ab)$ は結合基 a, b の結合が形成される際の結合自由エネルギー変化、結合エンタルピー変化、結合エントロピー変化である。また、 ΔH^c , ΔS^c は構造遷移にかかわる構造エンタルピー変化、構造エントロピー変化であるが、構造変化に伴うエンタルピー変化はすべて結合エンタルピー変化に繰りこまれていると考えるので $\Delta H^c = 0$ である（共有結合の結合距離・角度・二面角の変化に対するエンタルピー変化も結合エントロピーに織り込み済みとする）。(1)式より、タンパク質は変性中央温度 T^m （ $= \Delta G^l / \Delta S^c$ ）より低温では安定状態で、高温では熱変性することがわかる[1]。ある種の小さなタンパク質では変性状態から T^m 以下にすると折り畳み戻し（refolding）で元の安定構造に戻る。

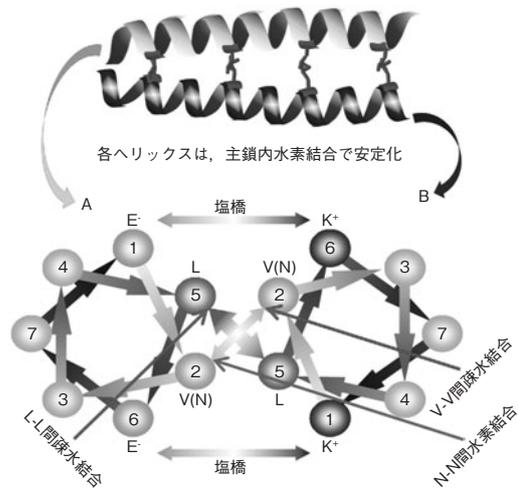
タンパク質分子内の結合は分子鎖を形成する共有結合を除くと、疎水結合、水素結合、塩橋、ジスルフィド結合がある。ジスルフィド結合はCys(C)残基間の特殊な結合であるから除外し、本論文では疎水結合、水素結合、塩橋についてのみ考察する。結合を構成する結合基は、疎水結合では非極性水素原子と非極性炭素原子、水素結合では極性水素原子と酸素原子や窒素原子の孤立電子対、塩橋では正荷電基と負荷電基である[2]-[10]。

1.3 本研究の概要

本研究の目的は、タンパク質の折り畳み、安定性の熱力学的なシミュレーションを可能にするため、系全体の熱力学特性をタンパク質の諸反応の熱力学特性に分解し、また、それらの特性を総和すると全体特性になることを示すことである。最初に、タンパク質の熱変性を疎水結合、水素結合、塩橋、構造遷移の諸反応に分離しそれぞれの熱力学特性を決定する。ついで、タンパク質の熱変性、および折り畳みに関するモデルを提案する。

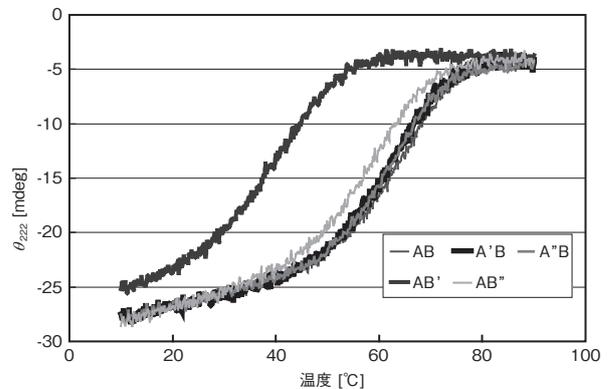
2. 実験法、および実験結果

実験系として、ロイシンジッパ構造形成能をもつ非常に小さい人工のペプチドを利用する[11]。第1図に示すように、20～50残基長の2つのペプチドA、Bのおおのが α ヘリックスを形成し、A、Bの配列上7残基ごとに現れるロイシン（Leu）残基側鎖間疎水結合でA、Bが会合する。高温では α ヘリックスが変性してランダム構造になり、A、Bが解離する。この状況は、円二色性（以



第1図 ロイシンジッパ構造の模式図
Fig. 1 Leucine-zipper structure

下、CDと記す）スペクトル解析によって観察する。波長190 nm～250 nmのCDスペクトルは水溶液中のタンパク質構造中の α ヘリックス（以下、 α と記す）、 β ストランド（以下、 β と記す）、およびポリプロリンII型左巻きヘリックス（以下、PPIIと記す）[12]～[13]の3つの主要な規則的な二次構造の含有比率に対応する。波長222 nmのCD値（ θ_{222} ）は、 α では絶対値の大きな負値、 β では、 α の θ_{222} の半分程度の負値、PPIIでは0である。安定状態のロイシンジッパ構造は α のみで θ_{222} は絶対値の大きな負値であるが、熱変性すると α が減り β およびPPIIが増え θ_{222} は0に近づく（第2図）。 θ_{222} の温度変化から、A、Bの会合と解離の存在比率の温度依存性を求めA、Bの状態遷移中央温度 T^m 、および熱容量変化 ΔC_p 一定の仮定のもと



第2図 GCN4由来ペプチドのロイシンジッパ熱変性に関するCD値（ θ_{222} ）の温度依存性
Fig. 2 Temperature dependency of θ_{222} for thermal denaturation of leucine-zippers from Yeast GCN4

とで系全体の会合の ΔG , ΔH , ΔS を求めることができる。これらから、結合1つ当たりの疎水結合の ΔG^{NP} , 水素結合の ΔH^{HB} , 塩橋の ΔH^{SB} を求める。

また、長さの異なる2対のロイシンジッパ形成ペプチド対の実験から1残基当たりの平均の構造エントロピー変化 ΔS_i^C を求める。さらに、ランダム構造状態のペプチドのCDスペクトルの温度変化から1残基当たりの平均の折り畳みエントロピー S_i^F を求める。得られた熱力学特性は新規設計のペプチド対によって検証する。

本研究のすべての実験で、溶液条件はイオン強度100 mM(NaCl), pH7.4 (リン酸バッファ)である。また、ペプチドは、化学合成で合成された純度95%以上のもので、N末端側アセチル化(Ac-), C末端側アミド化(-NH₂)の修飾がなされているものを用いた。

2.1 疎水結合・水素結合・塩橋の熱力学特性

酵母のGCN4と呼ばれる1対のタンパク質のロイシンジッパ領域を切り出したものに改変を加えた2種類のペプチド, AとB [11], および1残基置換をしたA', A'', B', B''を用いて疎水結合の熱力学特性について検証し, 水素結合・塩橋の熱力学特性を解析した。第1表に, A', A'', B', B''の配列を示す。

第1表 酵母GCN4由来ペプチドA, B[11]と変異型の配列

Table 1 Sequence A, B[11] from Yeast GCN4 and variants

	---1234567-1234567-1234567-1234567-12---
A	Ac-EVAQLEK-EVAQLEA-ENYQLEQ-EVAQLEH-EG-NH ₂
A'	Ac-EVAQLEK-EVAQLEA-ENYQLEQ-EVAQLQH-EG-NH ₂
A''	Ac-EVAQLEK-EVAQLEA-ENYQLEQ-EVAQLAH-EG-NH ₂
B	Ac-EVQALKK-RVQALKA-RNYALKQ-KVQALRH-KG-NH ₂
B'	Ac-EVQALKK-RVQALKA-RNYAAKQ-KVQALRH-KG-NH ₂
B''	Ac-EVQALKK-RVQALKA-RNYALKQ-KAQALRH-KG-NH ₂

疎水結合の熱力学的特性の変化は、疎水結合にかかわる非極性水素原子の数 n_H に比例し、非極性水素1個当たり $T=295\text{ K}$ において、 $\Delta S^{NP}=-6.4\text{ J/molK}$, $\Delta H^{NP}=0$, $\Delta G^{NP}=-1.85\text{ kJ/mol}$, $\Delta C_p^{NP}=-33\text{ J/molK}$ である。

各対の熱変性（ロイシンジッパ構造の解離）における θ_{222} の温度依存性の測定結果を、第2図のグラフに示す。そこから得られた熱変性（解離）に伴う熱力学特性値を、第2表に示す。各対で2種類の初期濃度 ($[A]_0 + [B]_0$) で実験した。Leu-Leuの結合の一方のLeuをAlaに置換すると（第2表の対ABと対AB'の $\Delta\Delta G$ ）、全体の ΔG は約12 kJ/mol大きかった。LeuとAlaとの $\Delta n_H=6$ から $\Delta G^{NP}\cong-2\text{ kJ/mol}$ であり-1.85 kJ/mol [2]と非常に近い。

Val-Valの疎水結合では、一方のValをAlaに変更した場合（AB''）は $\Delta\Delta G=3.3\text{ kJ/mol} \sim 5\text{ kJ/mol}$ であった。ValとAlaで $\Delta n_H=4$ であるから、各Valの非極性水素原子中約2個が疎水結合にかかわっていることが判明した。

第2表 酵母GCN4由来のペプチド対の熱力学特性

Table 2 Thermodynamic properties for Yeast GCN4-based pair and variant pairs

対	濃度 [μM]	T^m [$^{\circ}\text{C}$]	$\Delta H(T^m)$ [kJ/mol]	$\Delta G(295\text{ K})$ [kJ/mol]	$\Delta\Delta G(295\text{ K})$ [kJ/mol]
AB	35.7	65.0	-228.6	-50.1	-
	142.6	71.1	-240.6	-50.3	-
AB'	35.9	41.4	-190.1	-38.7	11.4
	143.5	47.5	-189.3	-37.7	12.6
AB''	35.8	59.5	-210.2	-46.8	3.3
	143.2	65.9	-213.6	-45.3	5.0
A'B	35.7	63.1	-222.0	-49.1	1.0
	142.6	69.1	-244.6	-50.2	0.1
A''B	36.0	63.2	-245.7	-52.0	-1.9
	143.8	70.0	-255.3	-51.9	-1.6

以上で、疎水結合に関する熱力学特性値[2]が検証され、 ΔS^{NP} , ΔH^{NP} , ΔG^{NP} , ΔC_p^{NP} が決定された。

水素結合は極性基間の静電相互作用による結合で、塩橋も同じく荷電基間の静電相互作用であり、これらが水溶液中の水和によってどの程度弱まるかについては現在でも議論が続いている[3]-[10]。本実験ではイオン強度が100 mM(NaCl)であるから、塩橋は著しく弱められる。ロイシンジッパの熱変性（解離）に伴う熱力学特性の変化により、水素結合・塩橋の特性を解析した。塩橋を確立しているGlu-LysはGlu(E)をAlaに変更した場合、塩橋を作れなくなるが $\Delta\Delta G$ （第2表のA''Bの項）は0に近く、またGluをGln(Q)に変更し塩橋ではなく水素結合を作るようにした場合との差も誤差範囲内であった（第2表A'Bの $\Delta\Delta G$ ）。すなわち、本実験のイオン強度100 mM(NaCl)においては、水素結合と塩橋の強度はほぼ差がないことが判明した。そこで、水素結合と塩橋の強度（ ΔG や ΔH ）が同一と仮定する。対ABのロイシンジッパ構造[11]では、水素結合・塩橋は合わせて60個存在する。ABでは、 $\Delta C_p = -2.5\text{ kJ/molK}$ [11] = -2500 J/molK , $\Delta H(65.0\text{ }^{\circ}\text{C}) = -228.6\text{ kJ/mol}$ から $\Delta H(295\text{ K}) = -120\text{ kJ/mol}$ である。疎水結合は $\Delta H^{NP}(295\text{ K}) = 0$ [2]であるから、 $\Delta H^{HB} \cong \Delta H^{SB} \cong -120/60 = -2\text{ kJ/mol}$ と結論できる。また、系全体の $n_H=60$ 、全疎水結合による熱容量変化 $33 \times 60 = -2000\text{ J/molK}$ から $\Delta C_p^p \cong \Delta C_p^{ch} \cong (2500-2000)/(60 \times 2) = -4\text{ J/molK}$ である。

以上で、水素結合・塩橋については、 ΔS^p , ΔS^{ch} 以外の熱力学特性 ΔH^{HB} , ΔH^{SB} , ΔC_p^p , ΔC_p^{ch} が決定された。理論的に ΔS^p , ΔS^{ch} は無視できるものと考えられる。

2.2 構造エントロピー変化と会合エントロピー変化

2種類の長さの異なるペプチド対を用い、1残基当たりの平均の構造遷移エントロピー変化 ΔS_i^C を求める。

ロイシンジッパの熱変性においては、A, Bのペプチドの解離を伴うため、A, Bの会合エントロピー変化 ΔS^A を考慮し、系全体で $\Delta G = \Delta G^I - T(\Delta S^C + \Delta S^A)$ になる。 ΔS^A

はA, Bの濃度項 $-R\ln([A]/[B])$ と双方の3次元空間での相対配置の項 ΔS^R に依存しA, Bの長さや配列には依存しないので, 相対配置を考慮すべき3原子以上の分子の会合解離における ΔS^A と理論的には同じ値になり, これら3原子以上の分子の気相常温常圧でのエントロピーから, -200 J/molK 前後と見積もられる. 第3表の21残基長の $A_{21}^{EK,A}$, $B_{21}^{EK,A}$ と28残基長の $A_{28}^{EK,A}$, $B_{28}^{EK,A}$ のペプチドの熱力学特性の残基数依存性を調べた(第4表).

第3表 新規開発のペプチド配列

Table 3 De-novo designed peptide sequences

	---67-1234567-1234567-1234567-1234567----
$A^{AA,Q}$	Ac-EQ-EVAALEQ-EVAALEQ-EVAALEQ-K-----NH2
$B^{AA,Q}$	Ac-EQ-KVAALKQ-KVAALKQ-KVAALKQ-K-----NH2
$A_N^{AA,Q}$	Ac-EQ-EVAALEQ-ENAALEQ-EVAALEQ-K-----NH2
$B_N^{AA,Q}$	Ac-EQ-KVAALKQ-KNAALKQ-KVAALKQ-K-----NH2
$A_N^{AQ,Q}$	Ac-EQ-EVAQLEQ-ENAQLEQ-EVAQLEQ-K-----NH2
$B_N^{AQ,Q}$	Ac-EQ-KVQALKQ-KNQALKQ-KVQALKQ-K-----NH2
$A_{21}^{EK,A}$	Ac----EVEKLEA-EVEKLEA-EVEKLEA-----NH2
$B_{21}^{EK,A}$	Ac----KVEKLKA-KVEKLKA-KVEKLKA-----NH2
$A_{28}^{EK,A}$	Ac----EVEKLEA-EVEKLEA-EVEKLEA-EVEKLEA-NH2
$B_{28}^{EK,A}$	Ac----KVEKLKA-KVEKLKA-KVEKLKA-KVEKLKA-NH2

第4表 新規開発のペプチド対の熱力学特性

Table 4 Thermodynamic properties for de-novo-designed peptide pairs

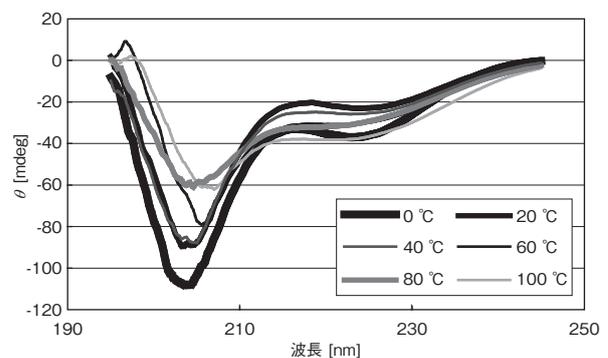
対	濃度 [μM]	T^m [$^{\circ}\text{C}$]	$\Delta H(T^m)$ [kJ/mol]	$\Delta G(295 \text{ K})$ [kJ/mol]
$A^{AA,Q}B^{AA,Q}$	46.9	47.8	-122.3	-35.5
	93.8	52.6	-129.0	-35.7
$A_N^{AA,Q}B_N^{AA,Q}$	46.7	23.8	-83.1	-28.3
	186.6	34.8	-108.7	-28.4
$A_N^{AQ,Q}B_N^{AQ,Q}$	43.9	7.1	-37.1	-25.3
	175.4	29.2	-94.8	-26.7
$A_{21}^{EK,A}B_{21}^{EK,A}$	51.0	14.1	-51.3	-26.0
	101.9	24.1	-71.5	-26.7
	203.8	31.2	-82.5	-26.4
$A_{28}^{EK,A}B_{28}^{EK,A}$	38.5	79.9	-92.1	-42.1

両者は, 同じ7残基長の配列の繰り返しでA, B間の結合の強さは長さに比例し, かつ α 内水素結合の数も長さにほぼ比例する. 2つの対それぞれの ΔG^I を推定し, そこから, 構造エントロピー変化と会合エントロピー変化の和 $\Delta S^T = \Delta S^C + \Delta S^A$ を求めることができる. n を残基数, C を定数として1残基当たりのエントロピー変化を ΔS_i^T とし, $\Delta S^T = n\Delta S_i^T + C$ と表すと, $\Delta S_i^T \cong -5 \text{ J/molK}$, $C = -440 \text{ J/molK}$ が得られる. ΔS_i^T は, ΔS^C の一部と考えられ, C のうち約 -200 J/molK は ΔS^A と考えられるので, 残りの約 -240 J/molK は ΔS^C の一部と考えられる. ΔS_i^T と C のうちの 240 J/molK を各残基に割り振ると1残基当たり $\Delta S_i^C = -10 \text{ J/molK}$ になる. ペプチドの両末端に近い残基は自由度が高く, 残基当たり3~5の可能な状態(β , PPII, 若干の α , 右巻きPPII, 左巻き α など)があり, この場合気体定数 R を用いて1残基当たり $\Delta S_i^C < R\ln(1/3) \cong -10 \text{ J/molK}$ となる. 中央部の残基はこれをまたぐ両末端側の残基の衝突から, おお

むね2状態(β , PPII, 若干の α)に限定され, $\Delta S_i^C \cong R\ln(1/2) \cong -5 \text{ J/molK}$ となると考えられる. 以上で, 1残基当たりの平均の ΔS_i^C が決定された.

2.3 折り畳みエントロピー

28残基長のペプチド $A_{28}^{EK,A}$ のCDスペクトル測定を行い, ランダム構造の熱力学特性を求め, そこから平均の折り畳み自由エネルギー G_i^F を求め, ΔH^{HB} と平均の折り畳みエントロピー S_i^F を分離する. 第3表の28残基長の $A_{28}^{EK,A}$ の溶液のCDスペクトル測定の結果(第3図)から, PPII, α , β の存在比率は低温(0°C)でおおむね5:1:1, 高温(100°C)で5:1:3であった. 1残基当たりの α への折り畳み自由エネルギー変化は α の存在比率が 0°C で1/7, 100°C で1/9であるから $G_i^F(0^{\circ}\text{C}) = -RT\ln(1/7)$ および $G_i^F(100^{\circ}\text{C}) = -RT\ln(1/9)$ である. 理論的に構造遷移に伴う熱容量変化がないことと, 水素結合に伴う熱容量変化が小さい($> -4 \text{ J/molK}$)ことから, 熱容量変化 $\Delta C_{p,i}^{\alpha} = 0$ と仮定すると, 折り畳みエンタルピー変化は $\Delta H_i^{\alpha} = -2 \text{ kJ/mol}$ であり, 前述の ΔH^{HB} と一致する. α は1残基当たり1つの水素結合をもつので $\Delta H_i^{\alpha} = -2 \text{ kJ/mol}$ は水素結合に起因すると結論できる. また, このことは, 主鎖の変異に伴う1残基当たりの構造エンタルピー変化(ΔH_i^C)が無視できる程度に小さいことも示している. 平均の折り畳みエントロピーは $S_i^{\alpha} = -23 \text{ J/molK}$ と決定された.



第3図 $A_{28}^{EK,A}$ のCDスペクトルの温度変化

Fig. 3 Temperature-dependency of CD spectrum for $A_{28}^{EK,A}$

2.4 熱力学特性の検証

決定された疎水結合, 水素結合, 塩橋, 構造遷移の熱力学特性が, 新規開発の短いロイシンジッパ形成ペプチド対の熱変性を記述できるかを検証する.

第3表の新規設計のロイシンジッパ構造形成ペプチド対について θ_{222} から会合の T^m , ΔH , ΔG を求めた.

対 $A^{AA,Q}B^{AA,Q}$ と $A_N^{AA,Q}B_N^{AA,Q}$ の自由エネルギー変化の差

(第4表) から, Val-Valの疎水結合と, Asn-Asnの水素結合との $\Delta\Delta G$ は, 7 kJ/molである. これは, Val-Val間疎水結合とAsn-Asn間水素結合との推定値に一致する. 対 $A^{AA,Q}B^{AA,Q}$ は, ほかに比べて非常に高い T^m であった. これは, α 形成能が高いAlaが多いことに起因し, ほかの残基に比べてAla 1個当たり $\Delta\Delta G^\alpha = -1.5$ kJ/molである. α 形成時, Glu, Lysなどの残基では側鎖方向が3から2に制限されるがAlaでは側鎖方向自由度がないので制限されない. この違いによる $T\Delta S$ は300 K近傍では $RT\ln(3/2) = 1$ kJ/molより大きい. Glu, Lysが α になるための自由エネルギー変化がAlaと比べ1.5 kJ/mol高いのは, 側鎖エントロピーの減少によると結論できる.

以上で, 21残基長から24残基長の短いロイシンジッパ構造形成ペプチド対の熱力学特性は, 前述のGCN4の改変型の, 対の場合の実験結果から決定された熱変性についての個々の要素反応ごとの熱力学特性をそれぞれの対について総和したものと一致することが判明した.

3. 熱力学的シミュレーションの提案

ペプチド断片 (segment) がランダム構造から折り畳み, 結合基 a, b の間に1つの結合 (疎水結合・水素結合・塩橋など) を作る過程を微小折り畳み過程とする. タンパク質の折り畳みはこの微小折り畳み過程の連鎖で起こり, 変性は微小折り畳み過程の逆の過程の連鎖で起こると考える. 例えば, (4残基長の) ペプチド断片で a (1番目の残基のCO) と b (4番目の残基のNH) の間に ab (CO-HN)の(水素)結合を確立する(1巻きの α を作る)過程は微小折り畳み過程である. i 番目の微小折り畳み過程で形成された構造の安定性は a_i, b_i 間の結合自由エネルギー変化を $\Delta G^l(a_i, b_i)$ とし構造エントロピー変化を ΔS_i^c とすると $\Delta G_i = \Delta G^l(a_i, b_i) - T\Delta S_i^c$ で与えられ, $T_i^m = \Delta G^l(a_i, b_i) / \Delta S_i^c$ 以下では安定で T_i^m 以上では変性する.

温度下降による折り畳み戻しでは折り畳み戻しの道筋 (pathway) はすべての i について, $T_i^m > T_{i+1}^m$ となるように決まると考えられる. 逆に, 温度上昇に伴う変性場合は温度下降による折り畳み戻しと全く逆のことが起こっていると想定される. よって, 各微小折り畳み過程で ΔG_i を計算できれば, タンパク質の安定性を予測することができる. 変性剤濃度を変化させることによる変性や折り畳み戻しも各微小折り畳み過程における $\Delta G^l(a_i, b_i)$ と $T\Delta S_i^c$ のバランスを変更するため, メカニズムは同一と考えてよい.

3.1 反応速度論からみた折り畳みの道筋

一方, 合成されたペプチドが低温で自発的に折り畳み

をする等温過程の場合, 折り畳みの順序は ΔG_i とは無関係に, むしろ各断片の折り畳みの速度に依存すると考えられる. 本研究では S_i^F を実験的に求めることができたので, 等温過程の折り畳み速度について議論できる.

微小折り畳み過程における折り畳み速度 r_i は, その過程における折り畳み確率 P_i の時間微分で与えられ, その際, 折り畳みと, ほどこ戻し (unfolding) は同時に進行するので, 折り畳みの速度定数 k_i^F と, ほどこ戻しの速度定数 k_i^U を用いて, 以下の式が得られる.

$$r_i = \frac{dP_i}{dt} = k_i^F(1-P_i) - k_i^U P_i \dots \dots \dots (4)$$

ここで, 平衡状態に至ると, r_i は0になり, その際には $P_i/(1-P_i)$ が平衡定数 k_i^F になり, 平衡定数は $\exp(-\Delta G_i/RT)$ で与えられるので, k_i^F と k_i^U は次式で与えられる.

$$k_i^F = k^* \exp\left[\frac{G^l(a_i) + G^H(b_i)}{RT}\right] \exp\left(\frac{S_i^F}{R}\right) \dots \dots \dots (5)$$

$$k_i^U = k^* \exp\left[\frac{G^l(a_i, b_i) + G^{HB}(H_2O \cdot HOH)}{RT}\right] \exp\left(\frac{S_i^U}{R}\right) \dots \dots \dots (6)$$

$$\Delta G^l(a_i, b_i) = [G^l(a_i, b_i) + G^{HB}(H_2O \cdot HOH)] - [G^H(a_i) + G^H(b_i)] \dots \dots \dots (7)$$

$$\Delta S_i^c = S_i^F - S_i^U \dots \dots \dots (8)$$

ここで, $G^H(a_i), G^H(b_i)$ は結合基 a_i, b_i それぞれの水和自由エネルギーを表し, $G^l(a_i, b_i)$ は, a_i, b_i 結合の自由エネルギーを表し, $G^{HB}(H_2O \cdot HOH)$ は水分子間の水素結合の自由エネルギーを表す. また, S_i^F は折り畳みやすさを表し, S_i^U は, ほどこ戻しやすさを表す. $G^H(a_i), G^H(b_i)$ は a_i, b_i が水分子と水素結合やファンデルワールス力による結合をしている場合の自由エネルギーを表すので, 古典理論で値を見積もることができる. また $G^l(a_i, b_i)$ は a_i, b_i の性質によって同じく古典理論で見積もることができ, 実験的に求めた $\Delta G^l(a_i, b_i)$ によって $G^H(a_i), G^H(b_i)$ と $G^l(a_i, b_i)$ 値を高精度に推定できる. (5)式, (6)式において, 速度の次元をもつのは k^* であり, それぞれの反応ごとのさまざまな条件に依存するが, 自由エネルギー $G^H(a_i), G^H(b_i), G^l(a_i, b_i), G^{HB}(2H_2O \cdot HOH)$ やエントロピー S_i^F, S_i^U が正規化されていれば, k^* は近似的に定数とみなせる.

ここで, 簡単な見積もりをすると, 疎水結合と水素結合や塩橋などの親水的な結合基による結合では親水性の違いにより, $G^H(a_i), G^H(b_i)$ が合計で10 kJ/mol以上異なる. その結果, k_i^F は疎水結合と親水的な結合では50倍以上異なる. また, k_i^U も50倍以上異なる. すなわち疎水結合のほうが, 水素結合や塩橋に比べて, 50倍以上速く形成され, かつ解離の速度も50倍以上速い. これは, 水和斥力 (hydration repulsion) と呼ばれ, これまで見過ごされて

きたが、コロイドの分散や脂質二重膜間の相互作用などの分野で知られており[14]、タンパク質の折り畳みにおいても近年注目されている[15]。身近な例としては、シャボン玉と水の泡では寿命が大きく異なる現象が挙げられる。シャボン玉では洗剤（界面活性剤）により空気の疎水性が大幅に緩和され親水性が高まったことにより、泡が割れにくくなっている。

3.2 熱力学折り畳みシミュレーションへ向けて

タンパク質のアミノ酸残基配列から、それぞれのアミノ酸残基のもつ結合基の配列上での配置は判明し、またどの結合基とどの結合基が結合し得るかは絞り込むことができ、その結合可能な2つの基の間の配列断片から決定できる。よって可能な微小折り畳み過程すべてについて S_i^F , $G^I(a,b)$, $G^H(a_i)$, $G^H(b_j)$ が計算できれば, k_i^F , k_i^U が得られ、等温過程の折り畳みの道筋が予測できる。これにより、高速折り畳みシミュレーションが可能になる。また、熱力学的なシミュレーションにおいては周囲の水分子の挙動は結合の熱力学特性の中に織り込まれているので対象とする原子数はタンパク質分子内の原子数のみであり、結合を起こす相互作用は近接場であるから、計算量はほぼタンパク質の残基数に比例する。これが、熱力学的折り畳みシミュレーションの方法である。

4. まとめ

本研究により、タンパク質の構造形成にかかわる諸反応（疎水結合、水素結合、塩橋の確立や構造遷移）の熱力学特性 (ΔG^{NP} , ΔH^{NP} , ΔS^{NP} , ΔH^{HB} , ΔH^{SB} , ΔC_p^{NP} , ΔC_p^P , ΔC_p^{Ch} および S_i^F , ΔS_i^C) がほぼ決定された。脱水とエントロピーなど、一部未決定の特性がある。また、アミノ酸残基の種類ごとの熱力学特性の違いについても未解明な点は残る。これらについては、今回解明された平均的な熱力学特性をもとに、それぞれのアミノ酸残基の側鎖の分子構造から理論的な推定を行うことが可能である。よって、一部未解明な点は残るものの、タンパク質の構造形成のほぼ全般が解明されたことになり、今後、熱力学的シミュレーションを展開できる。

参考文献

- [1] J. A. Schellman, "Temperature, stability and the hydrophobic interaction," *Biophysical Journal*, 73, pp.2960-2964, 1997.
- [2] S. J. Gill et al., "An equation of state describing hydrophobic interactions," *PNAS*, 73-9, pp.2955-2958, 1976.
- [3] G. Graziano et al., "Group additivity analysis of the heat capacity changes associated with the dissolution into water of different," *Organic Compounds. J. Am. Chem. Soc.*, 118, pp.1831-1835, 1996.
- [4] G. Graziano et al., "Prediction of the heat capacity change on thermal denaturation of globular proteins," *Thermochimica Acta*, 321, pp.23-31, 1998.
- [5] M. Oobatake et al., "Hydration and heat stability effects on protein unfolding," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 59, pp.237-284, 1993.
- [6] G. I. Makhatadze et al., "Heat capacity of proteins; I. partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: hydration effect," *J. Mol. Biol.*, 213, pp.375-384, 1989.
- [7] P. L. Privalov et al., "Contribution of hydration and non-covalent interactions to the heat capacity effect on protein unfolding," *J. Mol. Biol.*, 224, pp.715-723, 1992.
- [8] A. D. Robertson et al., "Protein structure and the energetics of protein stability," *Chem. Rev.*, 97, pp.1251-1267, 1997.
- [9] A. Cooper, "Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics," *Biophysical Chemistry*, 85, pp.25-39, 2000.
- [10] N. V. Prabhu et al., "Heat capacity of proteins," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 56, pp.521-548, 2005.
- [11] D. N. Marti et al., "Inverse electrostatic effect: Electrostatic repulsion in the unfolded state stabilizes a leucine zipper," *Biochemistry*, 43, pp.12436-12447, 2004.
- [12] B. J. Stapley et al., "A survey of left-handed polyproline II helices," *Protein Science*, 8, pp.585-595, 1998.
- [13] Z. S. Shi et al., "Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues," *PNAS*, 99-14, pp.9190-9195, 2002.
- [14] J. Israelachvili et al., "Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions," *Nature*, 379, pp.219-225, 1996.
- [15] J. L. MacCallum et al., "Hydrophobic association of α -helices, steric dewetting, and enthalpic barriers to protein folding," *PNAS*, 104-15, pp.6206-6210, 2007.

執筆者紹介



鬼塚 健太郎 Kentaro Onizuka
パナソニックヘルスケア（株）R&Dセンター
R&D Center, Panasonic Healthcare Co., Ltd.
博士（工学）