理論計算からタンパク質の変性構造を探る

岡崎国立共同研究機構分子科学研究所 杉田有治

京都大学大学院理学研究科 北尾彰朗

The role of the denatured state in protein stability is studied by theoretical methods based on molecular dynamics simulations. The results show that the free energy differences depend significantly on the denatured-state structures in the case of thermal denaturation. By modeling the denatured-state structures in various denaturation conditions, more quantitative analyses of protein stability and folding will be possible.

protein stability / denatured-state structure / molecular dynamics / free energy perturbation / component analysis

1. はじめに

タンパク質のフォールディングや安定性の問題を理解するためには、天然状態のみならず変性状態に関する情報が必要である。タンパク質の安定性は、アミノ酸配列にしたがって形成される固有の立体構造をとる天然状態と決まった立体構造をとらない変性状態との2状態の自由エネルギー差によって評価される。つまり、実験で測定される変性の熱力学量は、天然状態のみならず変性状態の立体構造にも依存する。一方、タンパク質のフォールディングは、変性状態から天然状態への自発的な巻き戻り過程を調べることで実験的に研究される。したがって、フォールディングを理解するためには、その過程の始状態である変性状態が何かを理解する必要がある。本稿では、タンパク質の変性状態に関する研究の現状を簡単にまとめた上で、安定性と変性状態の立体構造に関する理論的な解析について詳しく議論したい。

2. 変性状態とは何か

タンパク質の天然状態は、生理的な条件（適度なpH、温度、塩濃度など）において安定に存在するものである。極端な条件（例えば高温など）では、天然状態で形成されている非共有結合の多くが壊れた状態になり、天然状態と比較してよりランダムな構造をとっていると考えられる。その状態が変性状態であり、実験的には、1) 高温による熱変性、2) 変性剤を加えることによ

る変性剤変性、3) pHによる酸変性、アルカリ変性、4) 高圧による圧力変性などが知られている¹⁾。

変性状態に関する先駆的な研究としては、1960年代にTanfordらによる研究がある。彼らは、6M塩酸グアニジン中ではタンパク質はほとんどランダムコイル（完全変性状態）と区別できないことを示した。では、その他の変性条件における変性構造はどうであろうか？ さまざまな変性条件における変性構造の研究は、近年のNMRやX線散乱などの実験技術の進歩により格段に発展した²⁾。NMRによって変性構造におけるローカルな構造情報（例えば二次構造など）を、X線散乱によってはグローバルな構造情報（慣性半径など）を得ることができる。これらの実験から、1) 熱変性や酸変性などの比較的穏やかな変性条件においては、ランダムコイル状態と比較するとかなりコンパクトな構造をしている、2) そのような条件下では、比較的安定な部分構造が存在することがある、などの新たな知見が得られた。したがって、変性状態が関わる問題に関してはその変性条件による構造の違いを明確にする必要性が生じてきた。

3. 変性過程の分子動力学計算

天然状態の構造とは異なり特定の構造をもたない変性状態を、実験的手法を用いて原子レベルで詳細に解析することは困難である。これに対して、分子シミュレーションなどを用いた理論的な手法は、原子レベルの詳細な解析が可能である。これは、分子シミュレーシ

Theoretical Studies on the Role of the Denatured State in Protein Stability

Yuji SUGITA* and Akio KITAO**

* Institute for Molecular Science ; ** Graduate School of Science, Kyoto University

ンでは1分子計測が可能であるからで、アンサンブルが観測量となる多くの実験との違いである。近年、天然状態の構造を始状態として、変性条件下での分子動力学計算を行うといった変性過程のシミュレーションが盛んに行われるようになった³⁾。

Daggettらは、Barnase、CI2、BPTIなどの比較的小さなタンパク質の熱変性過程のシミュレーションを行っている^{4a)}。Barnaseの場合、ランダムコイル構造とは異なる構造部位が見られたが、この部位はNMRの実験により示唆された部位と良い一致を示している。また、フォールディング過程における中間体として、疎水的なコアが含まれる構造や α ヘリックス構造が残っている構造などが見つかり、これらも実験データと矛盾しない。また、JorgensenらはBarnaseの水中で8M尿素存在下における変性過程の計算を行った^{4b)}。彼らはこの計算結果から、尿素によるタンパク質の不安定化機構は、タンパク質表面に結合した尿素分子が疎水性相互作用を弱め、さらに天然状態の構造に見られるタンパク質内部の水素結合とタンパク質-尿素間の水素結合の競合が起こることであると主張している。

しかし、これらの計算で用いられている条件は、実験で用いられている条件とは必ずしも同一ではない。例えば、熱変性を1ナノ秒程度の限られた計算時間で実現させるために、500 Kや700 Kといった非常に高温の条件が用いられている。また、通常の分子動力学計算の1つのトラジェクトリから得られた結果は、1つの初期条件での変性過程を示しているのであってすべての変性構造を網羅しているとは考えにくい。このため、初期構造の異なる複数の分子動力学計算を行うことにより、統計的な解析を行う上での信頼性を高める試みがなされている^{4c)}。

4. タンパク質安定性と変性状態の構造

タンパク質の安定性の詳しい解析は、アミノ酸変異型タンパク質を用いることによりアミノ酸レベルで行われている⁵⁾。野生型と変異型タンパク質の熱力学量の精密な測定と、天然状態の立体構造に関するX線結晶構造解析が実験的な研究の二本柱である。これらの実験のデータから、例えばタンパク質内部のIleをそれぞれValに変異させたことによる安定性の変化はどの程度であるかが定量的に求められ、さらにその変化が変異部位の天然状態の立体構造にどのように依存しているかといった議論がなされている。

このような研究の目的は、系統的な解析によって安定性のメカニズムを説明する規則を見出すことである。特に、疎水性残基のアミノ酸変異に関しては、置換

によって天然構造に生じた空孔の大きさや露出表面積の変化などと熱力学量との相関から、安定化因子に関する経験則が提案されている⁶⁾。しかし、このような経験則は、あるタンパク質では成り立つが別のタンパク質では成り立たないというのが現状である。例えば、T4リゾチームで見出された安定性と置換によって生じた空孔の大きさの相関は、Barnaseでは明確には見出すことができない。このような経験則では、変性状態の構造はランダムコイル状態（すなわち完全変性状態）あるいは β ストランド様の伸びきった構造と仮定して、その寄与を見積もっている。しかし、はじめに述べたようにタンパク質の安定性は、天然状態と変性状態の自由エネルギー差で決まっている。つまり、変性状態の寄与をより高い精度で見積もらなければ、すべてのタンパク質に適用できる一般の経験則を見出すことはできないだろう。

先に述べたような変性過程の分子動力学計算は、フォールディング過程における始状態としての変性状態やその中間体の構造に関する直観的な描像を与えてくれる。しかもこの描像は、NMRなどの実験データをかなりよく再現している。しかし、天然状態と変性状態の間の微小な自由エネルギー変化（たかだか数kcal/mol程度）や、さらにそのアミノ酸変異型と野生型との差といった微妙な安定性のバランス（marginal stability）を再現できる精度はない。また、複数のアミノ酸変異体の変性過程の計算をそれぞれ行って、その構造をモデリングすることは原理的には可能だが、現在の計算機能力では膨大な計算となるのではほぼ不可能である。そこで、我々はタンパク質の安定性と変性状態の構造との関係を議論するために、以下に述べるような分子動力学計算に基づく自由エネルギー摂動計算を行っている。

5. 自由エネルギー摂動計算による安定性と変性状態の解析

5.1 自由エネルギー摂動計算

自由エネルギー摂動計算は、熱力学的な2状態間の自由エネルギー差を計算するための理論的な手法であり、分子動力学法やMonte Carlo法といったシミュレーションと組み合わせて行われる⁷⁾。この手法は、1980年代からタンパク質の安定性や基質結合性などの問題に応用されるようになってきた。タンパク質の安定性では以下の熱力学サイクルを考える⁸⁾。

$$\begin{array}{ccc}
 & \Delta G_N & \\
 W_N & \rightarrow & M_N \\
 \Delta G_W \downarrow & & \downarrow \Delta G_M \\
 W_D & \rightarrow & M_D \\
 & \Delta G_D &
 \end{array} \quad (1)$$

ここで、WとMはそれぞれ野生型と変異型タンパク質を、添え字のNとDはこれら2種類のタンパク質のそれぞれ天然状態と変性状態を表す。また、 ΔG_W と ΔG_M はそれぞれ野生型と変異型の変性の自由エネルギー差であり、実験で測定可能な物理量である。しかし、 ΔG_W と ΔG_M は理論的にはフォールディング過程の計算により求める必要があり、数十残基程度の小タンパク質に関しても現時点では計算不可能である。そこで、自由エネルギー摂動計算では、天然状態と変性状態でそれぞれ野生型から変異型へのアミノ酸置換に関する自由エネルギー差 (ΔG_N と ΔG_D) を計算する。式(1)の熱力学サイクルを用いることにより、以下のように野生型と変異型の安定性の自由エネルギー変化 ($\Delta\Delta G$) を計算することができる。

$$\begin{aligned}\Delta\Delta G &= \Delta G_W - \Delta G_M \\ &= \Delta G_N - \Delta G_D\end{aligned}\quad (2)$$

実際には、 ΔG_N と ΔG_D は、それぞれ天然状態と変性状態の構造をもとに分子動力学計算を行い、徐々に野生型から変異型へとポテンシャル関数とアミノ酸の形を変化させることにより計算される。また、この計算の利点は、計算により得られた自由エネルギー変化 ($\Delta\Delta G$) を、以下のようにポテンシャル関数を構成する共有結合 (添え字は cov) や Lennard-Jones エネルギー (LJ) や静電相互作用 (el) に依存する自由エネルギー変化に分割することができるという点にある。また、 $\Delta\Delta G$ を各残基からの寄与 ($\Delta G_{\text{residue}}$) に分割することも可能であり、これにより変異部位周辺のどの残基からの寄与がアミノ酸変異により変化したかという観点からの議論もできる。

$$\begin{aligned}\Delta\Delta G &= \Delta G_{\text{cov}} + \Delta G_{\text{LJ}} + \Delta G_{\text{el}} \\ &= \sum_{\text{residue}} \Delta G_{\text{residue}}\end{aligned}\quad (3)$$

このような解析は自由エネルギーの成分分析とよばれており、自由エネルギー摂動計算を行う動機の一つである。

自由エネルギー摂動計算は、現在では AMBER などの市販のプログラムを用いることにより実行可能である。しかし、この計算を行う上でのいくつかの近似による計算誤差は、計算結果としての自由エネルギー変化に大きな影響を及ぼす。特に、静電相互作用のカットオフ近似による計算誤差が分子動力学計算、自由エネルギー計算に及ぼす影響は、Saito により詳しく調べられている⁹⁾。そこで、我々は信頼性の高い安定性の計算を行うために、これまでの分子動力学計算に用いられて

きたアルゴリズムを再検討し、PRESTO Version 2.0¹⁰⁾ をベースに、自由エネルギー摂動法を行う上で最善と思われるプログラムを開発した¹¹⁾。ここでは、静電相互作用計算として cell multipole method (CMM)^{12a)} を、境界条件として spherical solvent boundary potential (SSBP)^{12b)} を、カノニカルアンサンブルを得るために Nose-Hoover method^{12c)} を用いた。詳細に関しては、文献11に譲る。

5.2 安定性と変性状態の寄与の見積もり

自由エネルギー摂動法を用いてタンパク質の安定性を解析する上では、変性状態の構造をどう扱うかという点が問題になる。先に述べたように、野生型と変異型の安定性の自由エネルギー変化 ($\Delta\Delta G$) を計算するためには、天然状態での変化 ΔG_N と変性状態での変化 ΔG_D の両方を必要とする。天然状態に関しては、X線結晶解析によって得られた構造を用いることにより信頼性の高い計算を行うことができる。一方、変性状態の構造に関しては、これまで述べてきたように、原子レベルの構造情報として十分な実験データは得られていない。そこで変性状態の構造に関していくつかの仮定を置く必要性が生ずる。

従来の自由エネルギー計算では、変性状態について2つの大きな仮定を用いてきた。1つは計算で用いる変性状態を置換部位を含む数残基のペプチドで近似することであり、もう1つはその初期構造として伸び切ったペプチドの構造を用いることである⁸⁾。第一の仮定は、変性状態では天然状態と異なり残基間のパッキングは非常に弱く、かなり解けた状態であるため、アミノ酸配列上で離れた残基からの影響は無視できる、という考察をもとになされている。この仮定の妥当性は、以下に示すように、自由エネルギー変化を各アミノ酸残基からの寄与に分割するなどして、判断することが可能である。一方、第二の仮定の物理的な根拠はほとんどない。変性状態の構造をほぼ完全な変性状態と見なすことのできる強い変性剤変性においては適用できる可能性はあるが、熱変性や酸変性といった穏やかな変性条件下での実験データとは矛盾する。

そこで、我々は熱変性状態の安定性の寄与を正しく見積もるために、伸びきったペプチド構造のみならず、天然状態類似の構造を含めたいくつかの初期構造に関して計算を行った。ここで、実験データとしての $\Delta\Delta G$ 、天然状態に関する計算値 ΔG_N の値の精度が十分に高いと考ええると、複数の変性状態の構造のうち実験データを最もよく再現する $\Delta\Delta G$ を与える構造が変性状態の構造であると推定できる。したがって、このアプローチの目的は *ab initio* に変性の自由エネルギー変化 $\Delta\Delta G$ を求

めることなく、実験では得られない変性状態の構造を理論的に予測し、その構造に基づいて物理化学的な安定化因子を詳しく解析することである。

5.3 塩酸グアニジン変性によるCI2の安定性と変性状態

キモトリプシン インヒビター2 (CI2) は83残基の小さなタンパク質で、Fershtらのグループにより折れ畳みや安定性の観点から多くの実験が行われている¹³⁾。我々は、Val57をAlaに変異した変異体 (V57A) について安定性の変化を計算した。この置換部位はCI2が酵素と結合するループ領域に存在し、Leu51やPhe69とともに疎水的な環境を形成している。(図1)

Fershtらの実験は、強い変性剤による変性であり、変性状態としてはほぼ完全変性状態を仮定すればよいと思われる。そこで、置換部位を含む5残基ペプチドが伸びきった構造を初期構造として変性状態をモデル化した。計算結果は、表1に見られるように実験値と良く一致していた。また、自由エネルギー成分分析により ΔG_N や $\Delta\Delta G$ を各残基からの寄与に分割してみると、置換部位の周辺残基からの寄与がほとんどであった。特に、側鎖間のパッキングが強い天然状態の計算においても、置換部位から離れた部位からの寄与は少なかった。以上をまとめると、変性剤による変性状態のモデルとしてはこのモデルで十分であることがわかった。また、ここでは詳しくは述べないが、計算手法のチェックのために我々の計算手法によるものと、静電相互作用をカットオフする計算手法によるものとを比較した。その結果、我々の計算手法が最も実験値と良く一致し、さらに計算誤差も少ないことがわかった。詳しくは文献11aを見られたい。

5.4 熱変性によるヒトリゾチームの安定性と変性状態

ヒトリゾチームの安定性に関しては、油谷らによる研究がある。タンパク質内部から分子表面にいたるまでの数多くの変異型について安定性変化が熱測定により求められ、天然状態の構造についてはX線結晶構造解析が系統的になされている⁵⁾。この実験では、熱変性による安定性変化の際の熱力学量が測定されているため、熱変性状態の構造を知る必要がある。一方、リゾチ

図1 キモトリプシンインヒビター2における置換部位V57周辺の構造

ームの熱変性状態に関しては、ヒトリゾチームと相同性の高いニワトリのリゾチームに関する実験が、Dobsonらにより行われている¹⁴⁾。彼らの実験によると、リゾチームの熱変性状態はランダムコイル状態とは異なっており、疎水的なコアが存在することが観測されている。

ここでは我々のヒトリゾチームのI56Vに関する計算結果を紹介する^{15a)}。この置換部位は、タンパク質内部に埋もれた疎水的な環境にあり、2つの β シートを結ぶターン構造上にある。熱変性状態における置換部位近傍の構造として、置換残基を含む5残基のペプチドを用い、その初期構造として5つの構造を用意した。その初期構造は、従来から用いられている伸びきった構造 (EXT)、天然状態類似の構造 (NTV)、真空中の高温の分子動力学計算のトラジェクトリからサンプルしたランダムな3つの構造 (RND1, RND2, RND3) である。これら5つの初期構造の主鎖構造は互いに大きく異なっている (表2)。ランダムコイル状態のモデルとして、非常に長い時間の計算をするかわりに、RND1, RND2, RND3から得られた自由エネルギー差の平均を考えることにより、ランダムコイル状態をモデル化し

表1 キモトリプシン V57A 置換体の自由エネルギー変化

	ΔG_N (kcal/mol)	ΔG_D (kcal/mol)	$\Delta\Delta G^{\text{cal}}$ (kcal/mol)
計算値	-2.99 ± 0.13	-4.17 ± 0.01	1.18 ± 0.13
実験値	—	—	1.47 ± 0.05

表2 ヒトリゾチーム I56V 置換体の自由エネルギー変化

変性状態の モデル名	ΔG_N (kcal/mol)	ΔG_D (kcal/mol)	$\Delta\Delta G^{\text{cal}}$ (kcal/mol)	$ \Delta\Delta G^{\text{cal}} - \Delta\Delta G^{\text{exp}} $ (kcal/mol)
EXT	-0.02 ± 0.21	-2.40 ± 0.06	2.38 ± 0.22	1.19
NTV	-0.02 ± 0.21	-1.01 ± 0.12	0.99 ± 0.24	0.21
RND1	-0.02 ± 0.21	-1.90 ± 0.48	1.88 ± 0.53	0.69
RND2	-0.02 ± 0.21	-2.10 ± 0.14	2.08 ± 0.25	0.89
RND3	-0.02 ± 0.21	-2.12 ± 0.97	2.10 ± 1.00	0.91
RND4V	-0.02 ± 0.21	-2.04 ± 0.64	2.02 ± 0.64	0.84

た。前節にも述べたように、複数の構造を仮定することにより、変性状態での置換残基近傍からの相互作用を正しく見積もることが目的である。

天然状態と5つの変性状態のモデルペプチドに関する計算結果を表2に示す。変性状態として天然状態類似のペプチド構造を用いた場合の結果は、 0.99 ± 0.24 kcal/molであり、実験で得られた安定性の変化 $\Delta\Delta G^{\text{exp}}$ は 1.2 ± 0.1 kcal/molであって非常によく一致していた。その他の変性状態のモデルでは、安定性の変化を大きく見積もりすぎる結果となった。よって、熱変性条件下におけるこの置換部位の構造は、天然状態に類似していることが示唆された。ヒトリゾチームの疎水性コアに存在する3つのIleをそれぞれValに変えた変異体に関しても同様の計算を行ったが、いずれも天然状態類似の構造を採用した場合に、実験値とよい一致を示した^{15b)}。この変性状態のモデルペプチドは、計算途中で初期構造から大きく壊れることがないように、主鎖構造に弱い拘束がかけられている。その結果、主鎖構造の揺らぎは、天然状態と比較すれば大きい、ランダムコイル状態のモデルペプチドよりは小さい。しかし、置換部位を含む5残基のペプチドで近似しているため、側鎖は完全に水に露出し大きく揺らいでいる。その結果、表2にあるように、変性状態での自由エネルギー差は、置換部位のアミノ酸側鎖の水和の性質を反映して大きな値をとっている。これに対して、天然状態では置換部位がタンパク質の疎水コア内部にあるため、周囲のアミノ酸残基に若干の構造変化が起こり、置換部位のアミノ酸側鎖の違いによる自由エネルギー差を打ち消していると思われる。これらのことから、ヒトリゾチームの熱変性状態はランダムコイル状態というよりも、ローカルな構造ができていているという点では、むしろモルテングロビュール状態に近い構造であると思われる。

次に、I56V変異の計算で得られた自由エネルギー変化 $\Delta\Delta G$ を各残基からの寄与に分割してみた。図2には、ヒトリゾチームの天然状態の構造に、置換部位Ile56と安定性変化に大きく寄与している残基を図示した。Phe3, Leu8, Tyr38, Asn39, Thr40, Ile89は、置換部位と

配列上は遠距離にあるが空間上は近距離にある残基である。したがって、リゾチームの疎水コア内部に埋もれているIle56のメチル基1つ分を取り去った影響は、疎水的なパッキングが弱くなった影響としてごく近傍の残基の変化で吸収されていることがわかる。一方、ここでは詳しく触れないが、同じIle56を同じ疎水性アミノ酸であるAlaやPheに変えた場合には、自由エネルギー変化に大きく寄与する残基はより広範囲に広がっていた。またその広がり程度と、安定性の変化には相関があった。今後はさらに多くのアミノ酸変異による安定性変化を計算することにより、アミノ酸置換による安定性変化と影響を受ける残基との関係をより定量的な形で理解できると考えている。

6. まとめと今後の展望

これまで十分な情報が得られていなかったタンパク質の変性状態での立体構造に関して、理論的な手法により詳しい解析を行えることを示した。特に安定性の観点からは、それぞれの変性条件にあった変性構造を用いることにより定量的に安定性機構を解析できる。今後は、さらに多くのアミノ酸変異に関する計算を行い、いくつかのタンパク質に関して、タンパク質全体としての変性状態の構造を理解したいと考えている。また、変性状態の立体構造は、理論計算だけでなくさまざまな

図2 ヒトリゾチームにおける置換部位I56と安定性変化への寄与の大きな残基

まな実験手法を駆使して解明していく必要がある。

また、これまでの我々の計算では、熱変性状態の構造に関していくつかの初期構造を始状態として仮定している。これは通常の分子動力学計算の手法では始状態周辺の構造以外はサンプルすることが不可能であったからである。しかし、近年、筆者らにより新しい強力な構造サンプリングの手法（レプリカ交換分子動力学法）が開発された¹⁶⁾。このような手法とここで述べた手法とを組み合わせることにより、始状態として天然状態類似の構造を仮定することなしに、構造アンサンブルとしての変性状態の構造が得られる。

ここでは詳しく述べなかったが、タンパク質の変性機構自身の理解を深める研究も重要である。それぞれの変性条件におけるタンパク質の変性の機構に関しては、いわゆる定説としてのモデルはあるが分子科学的な観点からしっかりと調べられている例は少ない¹⁷⁾。このような観点からの研究も今後、非常に重要であると思われる。

最後に、この研究を進める上でご指導頂いた郷信広先生、ヒトリゾチームに関する実験データを下さった油谷克英先生、高野和文氏、船橋順氏に感謝します。

文 献

- 1) a) 濱口浩三 (1990) 蛋白質機能の分子論, pp.111-128, 学会出版センター, 東京. b) 油谷克英, 中村春木 (1991) 蛋白質工学, pp.45-48, 朝倉書店, 東京.
- 2) a) Shortle, D. (1996) *FASEB J.* **10**, 27-34. b) Kataoka, M. and Goto, Y. (1996) *Folding & Des.* **1**, 107-114.
- 3) a) Brooks, C. (1998) *Curr.Opin.Struct.Biol.* **8**, 222-226. b) Dobson, C.M. and Karplus, M. (1999) *Curr.Opin.Struct.Biol.* **9**, 92-101.
- 4) a) Bond, C.J. *et al.* (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, 13409-13413. b) Tirado-Rives, J., Orozco, M. and Jorgensen, W.L. (1997) *Biochemistry* **36**, 7313-7329. c) Alonso, D. and Daggett, V. (1998) *Protein Sci.* **7**, 860-874. d) Lazaridis, T. and Karplus, M. (1997) *Science* **278**, 1928-1931.
- 5) a) 油谷克英 (1994) 蛋白質 核酸 酵素 **39**, 1017-1027. b) 高野和文, 船橋順, 油谷克英 (1998) 生物物理 **39**, 92-96.
- 6) a) Eriksson, A.E. *et al.* (1992) *Science* **255**, 178-183. b) Takano, K. *et al.* (1997) *Biochemistry* **36**, 62-76.
- 7) Kollman, P.A. (1993) *Chem. Rev.* **93**, 2395-2417.
- 8) a) Tidor, B. and Karplus, M. (1991) *Biochemistry* **30**, 3217-3228. b) Yun-Yu, S. *et al.* (1993) *Protein Eng.* **6**, 289-295. c) Saito, M. and Tanimura, R. (1995) *Chem. Phys. Lett.* **236**, 156-161. d) Sun, Y.-C. *et al.* (1996) *Protein Eng.* **9**, 273-281.
- 9) a) Saito, M. (1992) *Mol.Sim.* **8**, 321-333. b) Saito, M. (1994) *J.Chem. Phys.* **101**, 4055-4061.
- 10) Morikami, T. *et al.* (1992) *Comp. Chem.* **16**, 243-248.
- 11) a) Sugita, Y. and Kitao, A. (1998) *Proteins* **30**, 388-400. b) Kitao, A. Hayward, S. and Go, N. (1998) *Proteins* **33**, 496-517.
- 12) a) Ding, H.-Q. *et al.* (1992) *J. Chem. Phys.* **97**, 4309-4315. b) Beglov, D. and Roux, B. (1994) *J. Chem. Phys.* **100**, 9050-9063. c) Nose, S. (1985) *Mole. Phys.* **52**, 255-268. d) Hoover, W.G. (1985) *Phys. Rev. A* **31**, 1695-1697.
- 13) Otzen, D.E. *et al.* (1995) *Biochemistry* **34**, 13051-13058.
- 14) Evans, P.A. *et al.* (1991) *Proteins* **9**, 248-266.
- 15) a) Sugita, Y. and Kitao, A. (1998) *Biophys J.* **75**, 2178-2187. b) Sugita, Y., Kitao, A. and Go, N. (1998) *Folding & Des.* **3**, 173-181.
- 16) Sugita, Y. and Okamoto, Y. (1999) *Chem. Phys. Lett.* **314**, 141-151.
- 17) Ikeguchi, M., *et al.* (1998) *J.Phys.Chem.B* **102**, 5891.