タンパク質構造変化の理論： 平衡ゆらぎと線形応答理論

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科

池口満徳, 木寺詔紀

1. タンパク質の構造変化モデル

タンパク質の立体構造変化は、さまざまな生命現象において重要な役割を果たしている¹⁾。多くの場合、立体構造変化は生体内で精密な制御を受けているが、熱雑音の影響の大きい分子サイズの世界で、どのように実現しているのだろうか。その原理を、立体構造をもとにした物理化学理論で理解することは、きわめて生物物理的な重要な問題であるといえよう。

リガンド結合によるタンパク質の立体構造変化に関する研究は古くからなされている。特にヘモグロビンのアロステリック効果におけるKoshland-Némethy-Filmer (KNF) モデル、およびMonod-Wyman-Changeux (MWC) モデルは、これ以降のタンパク質立体構造変化の研究に大きな影響を与えた。これらのモデルの詳細な説明については書籍や総説を参照していただきたい^{1), 2)}が、ここでは、これらを他のタンパク質に一般化したモデルについて簡単に紹介する。

KNFモデルの一般的モデルはinduced-fitモデルである。このモデルでは、リガンドとの相互作用がタンパク質の立体構造変化を誘起し、タンパク質の立体構造を結合可能な形状に変化させる (Fig. 1)。したがって、このモデルでは、タンパク質の構造変化の原因はリガンドとの相互作用である。一方、MWCモデルの一般的モデルはpre-existingモデルとよばれる。このモデルでは、タンパク質は、リガンド結合以前に、熱ゆらぎによって非結合型と結合型の立体構造間の平衡にあり、非結合型が大部分だが、まれに結合型も存在する。リガンドは結合型を選択して結合し、結合型に平衡が移動する (Fig. 1)。したがって、このモデルでは、タンバ

ク質の構造変化の主たる原因は、平衡ゆらぎである。

リガンド結合以前の平衡ゆらぎと、機能に重要な構造変化の関連については、実験的・理論的証拠がある。実験的には、たとえば、カルモジュリンの Ca^{2+} 結合に伴う構造変化³⁾やABCトランスポータのヌクレオチド結合に伴う構造変化⁴⁾において、平衡ゆらぎと構造変化の関連を指摘したNMR研究がある。理論的には、基準振動解析によって、平衡ゆらぎで支配的な低振動モードの方向と構造変化の方向に相関があると指摘されている⁵⁾。たとえば、Cuiらは、 $\text{F}_1\text{-ATPase}$ の基準振動解析を行い、ATPが結合していない β_{E} サブユニットの低振動モード方向が、 $\text{F}_1\text{-ATPase}$ の回転運動に重要な β サブユニットの構造変化方向と相関があるとしている⁶⁾。

しかし、pre-existingモデルにも問題がある。まず、タンパク質が結合型になってはじめて基質と結合できるとすると、結合型の存在確率がある程度高くないと現実的な速度で結合できないだろう。また、大きく閉じるように構造変化するタンパク質の場合には、リガンドは潜り込むように結合せねばならず非現実的である⁷⁾。そもそも、実験的、理論的証拠があるといっても、非結合状態で原子レベルの精密な結合型構造が存在するというよりも、実は単に平衡ゆらぎと構造変化の関係を指摘していることが多い。一方、induced-fitモデル

Fig. 1 Models of conformational changes in proteins (gray) upon ligand (black) binding. In the induced-fit model, a protein and a ligand firstly form an encounter complex (right top), and then the ligand induces the conformational change in the protein. In the pre-existing model, the unbound and bound forms pre-exist in the equilibrium before ligand binding. The ligand selects the bound form between the two forms.

Theory of Structural Changes in Proteins: Equilibrium Fluctuation and Linear Response Theory

Mitsunori IKEGUCHI and Akinori KIDERA

International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University

では、非結合状態での平衡ゆらぎが考慮されておらず、上記の実験的、理論的証拠からすると、こちらも無理がある。つまり、この2つのモデルは極論であって、現実的にはこの間をいくようなモデルが必要とされているのである。

そこで、筆者らは、最近、非平衡統計物理学の基礎理論である線形応答理論を応用し、タンパク質構造変化のモデルを提案した⁸⁾。この小論では、その理論について、式の導出も含め、その概要を紹介したい。別稿にて、式をなるべく使わずに、理論のエッセンスを紹介したものも著した⁷⁾ので、そちらも併せて参考にしていただきたい。

2. タンパク質構造変化の線形応答理論

タンパク質構造変化の線形応答理論⁸⁾では、タンパク質-リガンド間相互作用を摂動ポテンシャル $V = \sum_i V_i(\mathbf{r}_i)$ (i はタンパク質原子)としてモデル化する。リガンド非結合状態(非摂動状態)のハミルトニアンを H_0 とすると、結合状態(摂動状態)のハミルトニアン H_1 は、

$$H_1(\Gamma) = H_0(\Gamma) + V = H_0(\Gamma) + \sum_i \int d\mathbf{r} V_i(\mathbf{r}) \phi_i(\mathbf{r}) \quad (1)$$

と書ける。ただし、関数 $\phi_i(\mathbf{r})$ は $\phi_i(\mathbf{r}) \equiv \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$ と定義され、 Γ はタンパク質・溶媒を含めた位相空間上の点を表す。関数 $\phi_i(\mathbf{r})$ の平均値 $\langle \phi_i(\mathbf{r}) \rangle$ は、原子 i の存在確率の分布関数に対応することを考慮し、リガンド結合に対するタンパク質の応答を、結合状態と非結合状態の分布関数の差として次式のように考える。

$$\langle \phi_i(\mathbf{r}) \rangle_1 - \langle \phi_i(\mathbf{r}) \rangle_0 = \langle \delta \phi_i(\mathbf{r}) \rangle_1 = \frac{1}{Z_1} \int d\Gamma \delta \phi_i(\mathbf{r}) e^{-\beta H_1(\Gamma)} \quad (2)$$

ここで、 $\langle \rangle_0$ 、 $\langle \rangle_1$ は、それぞれ非結合状態、結合状態での平均値を表し、関数 $\delta \phi_i(\mathbf{r})$ は $\delta \phi_i(\mathbf{r}) \equiv \phi_i(\mathbf{r}) - \langle \phi_i(\mathbf{r}) \rangle_0$ と定義される。 Z_1 は、結合状態での分配関数で、 $Z_1 = \int d\Gamma \exp[-\beta H_1(\Gamma)]$ である。もし、摂動ポテンシャル V が十分小さければ、次のように一次までで展開される。

$$e^{-\beta H_0 - \beta V} \simeq e^{-\beta H_0} (1 - \beta V) \quad (3)$$

式 (1)、(3) を用いると、式 (2) は、

$$\langle \phi_i(\mathbf{r}) \rangle_1 - \langle \phi_i(\mathbf{r}) \rangle_0 \simeq -\beta \sum_j \int d\mathbf{r}' \langle \delta \phi_i(\mathbf{r}) \delta \phi_j(\mathbf{r}') \rangle_0 V_j(\mathbf{r}') \quad (4)$$

と表される。この式は、オーソドックスな線形応答理論の式であり、 $\beta \langle \delta \phi_i(\mathbf{r}) \delta \phi_j(\mathbf{r}') \rangle_0$ は応答関数とよばれ、原子 i と j がどのくらい相関をもってゆらいでいるかを表

すものである。重要なのは、この応答関数が非結合状態での平均として得られることで、この関数の中に非結合状態でのタンパク質の平衡ゆらぎの情報が入っていることになる。

式 (4) の形では使いにくいので、ポテンシャルを展開し、期待値の形にすると、

$$\langle \Delta \mathbf{r}_i \rangle_1 \simeq \beta \sum_j \langle \Delta \mathbf{r}_i \Delta \mathbf{r}_j \rangle_0 \mathbf{f}_j \quad (5)$$

となる。 $\langle \Delta \mathbf{r}_i \rangle_1$ は、摂動に対するタンパク質の応答で、リガンド結合によって生じるタンパク質原子 i の変位ベクトルである。この応答が、非結合状態でのタンパク質の平衡ゆらぎを表す分散共分散行列 $\langle \Delta \mathbf{r}_i \Delta \mathbf{r}_j \rangle_0$ と、リガンドからタンパク質原子 j にかかる力ベクトル $\mathbf{f}_j$ の積で表されることになる。

3. タンパク質の平衡ゆらぎ

式 (5) については、別な導き方がある。非結合状態でのタンパク質の平衡ゆらぎを、タンパク質原子の存在確率の分布関数 $\rho_0(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$ で表す。この分布関数を平衡位置 $\bar{\mathbf{r}}_1, \bar{\mathbf{r}}_2, \dots, \bar{\mathbf{r}}_N$ のまわりで、

$$\rho_0(\bar{\mathbf{r}}_1 + \Delta \mathbf{r}_1, \dots, \bar{\mathbf{r}}_N + \Delta \mathbf{r}_N) \sim e^{-\frac{1}{2} \Delta \mathbf{r}' (\Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r}')^{-1} \Delta \mathbf{r}} \quad (6)$$

とキュムラント展開⁹⁾し、二次までで表現できるものと近似する(擬調和近似)。ここで、 $\Delta \mathbf{r} = (\Delta \mathbf{r}_1, \Delta \mathbf{r}_2, \dots, \Delta \mathbf{r}_N)'$ 、 $\langle \Delta \mathbf{r}_i \Delta \mathbf{r}_j \rangle_0^{-1}$ は分散共分散行列 $\langle \Delta \mathbf{r}_i \Delta \mathbf{r}_j \rangle_0$ の逆行列である。タンパク質の平衡ダイナミクスは、分子動力学シミュレーションで見られるように複雑なものであるが、この擬調和近似の重要な点は、分布関数の概形が正規分布で近似可能とするところである。この近似を導入すると、リガンドからタンパク質にかかる力 $\mathbf{f}_i$ を含めた結合状態での分配関数 Z_1 は、

$$Z_1 = \int d\Delta \mathbf{r} e^{-\frac{1}{2} \Delta \mathbf{r}' (\Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r}')^{-1} \Delta \mathbf{r} + \beta \sum_i \mathbf{f}_i \Delta \mathbf{r}_i} \quad (7)$$

と書ける。分配関数の対数を力 $\mathbf{f}_i$ で偏微分すると、

$$\frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln Z_1}{\partial \mathbf{f}_i} = \langle \Delta \mathbf{r}_i \rangle_1 \quad (8)$$

となつて、式 (5) の左辺となる。また、 $\Delta \mathbf{r}'_i = \Delta \mathbf{r}_i - \beta \sum_j \langle \Delta \mathbf{r}_i \Delta \mathbf{r}_j \rangle_0 \mathbf{f}_j$ とおくと、

$$Z_1 = \int d\Delta \mathbf{r}' e^{-\frac{1}{2} \Delta \mathbf{r}' (\Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r}')^{-1} \Delta \mathbf{r}' + \frac{\beta^2}{2} \sum_{j,j'} \mathbf{f}_j (\Delta \mathbf{r}_j \Delta \mathbf{r}_{j'}) \mathbf{f}_{j'}} \quad (9)$$

となる。この式を用いると、

Fig. 2 Conformational changes in Fe^{3+} binding protein⁹⁾. (a) Results of linear response theory (black arrows) are compared with experimental results (gray arrows). The correlation coefficient of them is 0.95. Fe^{3+} and the applied force are represented by a sphere and a thick arrow, respectively. (b) The magnitudes of conformational changes obtained by linear response theory (black line) and experiments (gray line) are in agreement. The correlation coefficient of them is 0.98. (c) Results of theory are robust with respect to the direction and position of the applied force. Correlation coefficients more than 0.8 are obtained for force vectors (gray arrows) on O ϵ 1 of Glu58 and the attractive forces toward the ligand from the C α atoms (black on the backbone).

$$\frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln Z_1}{\partial \mathbf{f}_i} = \beta \sum_j \langle \Delta \mathbf{r}_i \Delta \mathbf{r}_j \rangle_0 \mathbf{f}_j \quad (10)$$

となり、これが式 (5) の右辺となる。この導出法では、摂動ポテンシャル V が小さいという近似のかわりに、タンパク質の平衡分布の概形を正規分布で表すことができるという近似を用いた。タンパク質の平衡分布を、このように分散共分散行列で表現することは、タンパク質原子群の集団的運動を解析する際に用いられるオーソドックスな方法である⁹⁾。本理論は、この平衡分布の記述法に、induced-fitモデル的なリガンドからの相互作用の概念を付け加えることにより、平衡ダイナミクスから機能ダイナミクスへ橋渡しをしたものと考えられる。さらに、基準振動解析では、式 (6) が厳密になりたつので、同様の式を得ることが可能である^{10), 11)}。

4. 線形応答理論の応用

式 (5) を実際のタンパク質に応用する。対象は、309 アミノ酸残基からなるペリプラズム鉄結合タンパク質である。このタンパク質は、鉄イオン非結合状態のオープン構造¹²⁾と、結合状態のクローズ構造¹³⁾の双方がX線結晶解析にて決定されている。このタンパク質の立体構造は2つのドメインから構成されており、オープン構造からクローズ構造になる際に片方のドメインが約20度回転する。

まず、このタンパク質の平衡ゆらぎの分散共分散行列 $\langle \Delta \mathbf{r}_i \Delta \mathbf{r}_j \rangle_0$ を求めるため、非結合状態の構造に対して、水分子をあらわに導入した分子動力学シミュレーションをソフトウェア MARBLE¹⁴⁾ を用いて 10 ns 行った。次に、鉄イオンからタンパク質原子にかかる力 $\mathbf{f}_i$ を、クローズ構造で鉄イオンに配位している Glu58 の酸素原子に対し、鉄イオンの方向にかけた。この力の選び方には任意性があるのだが、この点については後で述べる。Fig. 2a, b に、線形応答理論による予測と実験結果を比較した。C α 原子の構造変化ベクトルの相関係数は 0.95、構造変化の大きさの相関係数は 0.98 とよく一致している。式 (5) のような簡単な行列とベクトルの積で、ここまで一致するというのは驚きである。

次に力の選択の任意性について調べた。Fig. 2c に構造変化ベクトルとの相関係数が 0.8 以上となる力を示した。かなり広い範囲の力の方向を用いても、理論と実験結果はよく相関することがわかる。主鎖の濃い色の部分は、その位置の C α 原子に力をかけた際に、相関係数が 0.8 以上になる箇所である。回転する移動ドメインであれば、幅広い場所に力をかけても、構造変化はそれほど変わらないことがわかる。このような構造変化のロバストネス（頑健さ）は、どこから来るのだろうか。式 (5) の分散共分散行列を対角化すると、

$$\langle \Delta \mathbf{r}_i \rangle_1 \simeq \beta \sum_k \sum_j \mathbf{v}_i^k \lambda_k \mathbf{v}_j^k \cdot \mathbf{f}_j \quad (11)$$

となる。ここで λ_k は k 番目の固有値、 $\mathbf{v}_i^k$ は k 番目の固有ベクトルの原子 i 成分である。一般に、タンパク質の平衡ゆらぎでは、その自由度の大きさにもかかわらず、少数の自由度のみの固有値が大きく平衡ゆらぎを支配する傾向があることが知られている⁹⁾。タンパク質がゆらぐことができる方向は限定されており、リガンドからの力が作用すると、その限定された方向にタンパク質は応答して構造変化するのである。つまり、リガンドからの力の役割は、タンパク質の固有の立体構造によって限定された熱ゆらぎの方向の選択なのである。このことから、分子サイズの世界の大きな熱ゆらぎの中でも、タンパク質が精密に構造変化することが可能な原理が見えてくる。

鉄結合タンパク質のほかにも、HPPK (6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase)、クエン酸合成酵素、 F_1 -ATPaseなどの多くのタンパク質でこの線形応答理論は成功している^{2), 8)}。この理論の導出には、リガンド-タンパク質間相互作用が小さいという近似、もしくは、タンパク質の平衡ゆらぎの概形が正規分布に近いという近似を用いた。一般に、リガンド-タンパク質間相互作用は、 $k_B T$ と比較してそれほど小さくないと考えられるので、この線形応答理論の成功の要因は、タンパク質の平衡ゆらぎの概形が正規分布に近いということにあるように思われる。このことは、さまざまなタンパク質の機能にかかわる構造変化を読み解く鍵になるだろう。

文 献

- 1) Fersht, A. (2005) タンパク質の構造と機構, 医学出版, 東京.
- 2) 木寺詔紀, 池口満徳 (2005) タンパク質科学: 構造・物性・機能 (後藤祐児, 桑島邦博, 谷澤克行編), pp. 221-231, 化学同人.
- 3) Malmendal, A., Evenäs, J., Forsén, S. and Akke, M. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 883-899.
- 4) Wang, C., Karpowich, N., Hunt, J. F., Rance, M. and Palmer, A. G. (2004) *J. Mol. Biol.* **342**, 525-537.
- 5) Hayward, S. and Go, N. (1995) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **46**, 223-250.
- 6) Cui, Q., Li, G., Ma, J. and Karplus, M. (2004) *J. Mol. Biol.* **340**, 345-372.
- 7) 池口満徳, 木寺詔紀 (2006) 蛋白質 核酸 酵素 **51**, 268-273.
- 8) Ikeguchi, M., Ueno, J., Sato, M. and Kidera, A. (2005) *Phys. Rev. Lett.* **94**, 078102.
- 9) Kitao, A. and Go, N. (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 164-169.
- 10) Seno, Y. and Go, N. (1990) *J. Mol. Biol.* **216**, 111-126.
- 11) Demirel, M. C. and Lesk, A. M. (2005) *Phys. Rev. Lett.* **95**, 208106.
- 12) Bruns, C. M., Anderson, D. S., Vaughan, K. G., Williams, P. A., Nowalk, A. J., McRee, D. E. and Mietzner, T. A. (2001) *Biochemistry* **40**, 15631-15637.
- 13) Bruns, C. M., Nowalk, A. J., Arvai, A. S., McTigue, M. A., Vaughan, K. G., Mietzner, T. A. and McRee, D. E. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 919-924.
- 14) Ikeguchi, M. (2004) *J. Comput. Chem.* **25**, 529-541.

タンパク質構造変化の理論：平衡ゆらぎと線形応答理論

池口満徳（いけぐち みつのり）

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻準教授

連絡先：〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29

E-mail: ike@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

木寺詔紀（きでら あきのり）

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻教授

連絡先：〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29

E-mail: kidera@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp