基準振動を用いたタンパク質の 動的構造の結晶学的精密化

蛋白工学研究所 木寺詔紀

Akinori KIDERA : Crystallographic Refinement of Protein Dynamic Structures using Normal Modes.

A dynamic structure refinement method for protein X-ray crystallography is presented. The Debye-Waller factor is expanded in terms of the low-frequency normal modes whose amplitudes and eigenvectors are experimentally optimized in the process of the crystallographic refinement.

Application of the method to human lysozyme showed: (1) Debye-Waller factor consists of two parts, highly anisotropic internal fluctuations and almost isotropic external terms. The former is smaller than the latter. (2) Correlation of fluctuations corresponding to the hinge-bending motion was detected.

1. はじめに

タンパク質のX線結晶構造解析が低分子系と大きく異なる点は、精密化の観点からみると、

観測される反射の数/モデルパラメータの数の比が十分大きくないことにある。巨大分子であるため構造を表現するのに必要なパラメータの数が極めて大きくなることで「分母」を大きくし、結晶の半分近くが溶媒に占められているために分解能が限られていることで「分子」を小さくしている。そのような場合に最小自乗法で信頼性のあるモデルを構築するためにはモデルの自由度を可能な限り下げ（「分母」を小さくし）なければならない。そのためタンパク質の構造精密化では、平均構造については低分子系（アミノ酸等）ですでにわかっている構造の情報、つまりモデル（結合長、結合角等）を制約条件として導入し¹⁻³⁾、動的構造については等方的温度因子を用いゆらぎの異方性は議論しないという単純化をしている。

タンパク質の機能に密接に関わる動的構造を議論するには、この等方的温度因子による描像では不十分であることが第1図の比較からもわかるだろう。パラメータの数を増やすことなしに、X線回折データからもっと多くの動的構造に関する情報（ゆらぎの異方性等）を引き出すことはできな

いのだろうか。我々は「平均構造にモデルを導入しているように、動的構造にもモデルを導入すればパラメータの数を増やすことなしにより多くの情報が引き出せるのではないか」と考えた。現在ではタンパク質の動的構造は適当な力場を仮定した種々の分子シミュレーションの方法^{4,5)}によって、平均構造が与えられればある程度の精度で予測することが可能となっており、そこにモデルを求めることができる。それらの中から、最小自乗法によって精密化されるモデルに必要な条件「できるだけ少数の変数で記述される解析的な構造を持つ」を満たす方法として、我々はタンパク質の基準振動を動的構造のモデルとして採用し、基準振動動的因子法を開発した⁶⁻⁸⁾。以下、ヒトリゾチームを例にして基準振動を用いた精密化の方法とそこから得られる結果について述べる。

2. タンパク質の基準振動

基準振動は低分子系と同様に、エネルギー極小構造での二次微分行列の固有値問題を解くことによって理論的に得られる（基準振動解析）⁹⁾。ヒトリゾチームの基準振動モードの例を第2図に示す。例として、最低振動モードから順に1, 10, 50番目のモードを主鎖原子の運動を表す矢印で表示した。低分子化合物で伸縮、変角などのモードがあ

第1図 等方的温度因子と異方的温度因子の描像の違い。ヒトリゾチームの部分構造(Gly68-Lys69-Thr70-Pro71)の熱振動楕円体をORTEPで表示した(主鎖原子には影をつけてある)。(a) 通常の等方的温度因子による精密化の結果 (20% probability scale)。(b) 基準振動動的因子法による精密化の結果。内部運動のみによるゆらぎ(48% probability scale)。

るように、タンパク質でも構造によって決まる特徴的なモードがある。第1モードは二つのドメイン間の相互の動きを、第10モードは右側のドメイン全体の動きを、第50モードは左側のドメインの一部に限定された動きを表している。振動数が低いモードほど協同性が高くなっていることがわかる。動的構造のモデルとしての基準振動の重要な性質は、

- (1) 自由度の数だけある基準振動の中で(ヒトリゾチームで6000余り)、少数(高々数百程度)の低振動(大きな振幅を持つ)モードだけでタンパク質の運動のほとんどを記述することができる^{7, 9, 10)}。この性質によってパラメータの数を増やさずにより精密な動的構造の記述ができるわけである。
- (2) 基準振動は本質的に協同的な運動を記述するモデルである。この性質からタンパク質のゆらぎの相関に関する情報を引き出すことができる。

3. 基準振動動的因子法

基準振動による動的構造のモデルはどのように精密化すればよいだろうか。第2図に示したようにタンパク質のゆらぎはいろいろな形のモードの和として表現される。モードの形はある程度精密化された平均構造があれば、そこから基準振動解

fluctuations =

第2図 ヒトリゾチームのゆらぎは基準振動モードの和として表現される。最低振動モードから順に1, 10, 50番目のモードを主鎖原子の運動を表す矢印で表示した。基準振動動的因子法でモードの振幅 A_m を変数として実験データに合うゆらぎを捜す。

析によって前もって計算しておくことができる。したがって、動的構造の精密化は各モードの寄与(第2図の振幅 A_m)を少しずつ変えて実験データに最も良く合うように最適化することによって行うことができる。モードの形は理論的に予想されたものを用い、それらの全体に対する寄与の割合を変えて実験の電子密度分布に合わせようという考え方である。

ここで3つの重要な工夫をする。

- (1) 前節で述べたように用いるモードを少数の(高々数百)の低振動モードに限ることでパラメータの数を抑える。
- (2) 第2図で示した内部運動のモードだけではなく並進、回転などの外部運動のモード(TLSモデル¹¹⁾)を同時に用いることで内部運動モードで表現されない寄与、例えばタンパク質全体の剛直な全体運動、格子の乱れ、散漫散乱などを吸収する。
- (3) モードの振幅(分散)だけでなくモード間の相関(共分散)を考慮する。これによって振幅だけでなくモードの形(第2図に示した矢印の大きさと方向)自体を精密化することができる。

式の形でこれらの事を具体的に示しておこう。動的因子を基準振動で展開し、モデルの構造因子 $F_{cal}(\mathbf{q})$ を

$$F_{cal}(\mathbf{q}) = \sum_j f_j(\mathbf{q}) \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j) DWF_j \quad (1)$$

と表現する。ここで和は原子 j について行う。 f_j は原子散乱因子、 $\mathbf{r}_j$ は原子 j の平均位置を表す座標。 DWF_j は動的因子(Debye-Waller 因子)で基準振動によって、

$$DWF_j = \exp \left[-\frac{1}{2} \sum_k \mathbf{q}_k \mathbf{q}_k^T \sum_{m,n} \phi_{jkm} \phi_{jln} \sigma_{mn} \right] \quad (2)$$

$\mathbf{q}_k$ は逆格子スペクトル $\mathbf{q}$ の要素、 ϕ_{jkm} は基準振動 m (内部運動と外部運動のモードを含む) の固有ベクトルの要素(ベクトル $(\phi_{j1m}, \phi_{j2m}, \phi_{j3m})$ が第2図の矢印を表す)。 σ_{mn} は基準振動モードの分散共分散で振幅と相関の程度を表す。通常の等方的温度因子による動的因子

$$DWF_j = \exp[-B_j q^2 / 16\pi^2] \quad (3)$$

と比較すると2式のゆらぎの表現が、異方的、協同的であることがわかる。 F_{cal} の精密化での変数は座標値 $\mathbf{r}_j$ とモードの共分散 σ_{mn} である。

第3図 基準振動動的因子法プログラム NM-REF のフローチャート⁷⁾

4. 計 算

第3図のフローチャートに従って説明をしよう。基準振動動的因子法による精密化はNM-REF(Normal Mode Refinement)というプログラムでなされる。極小化すべき関数 T は通常の制約条件下のエネルギー極小化で³⁾

$$T = X + w_E E \quad (4)$$

$$X = \sum_h w(h) [|F_{obs}(h)| - k |F_{cal}(h)|]^2 \quad (5)$$

X 線項 X と制約条件 E (ここでは分子力場 AMBER¹²⁾ のエネルギー) の重み w_E を介した和の形を用いる。5式のスケール因子 k は X が最小になるように選ばれる。

X 線回折実験から各格子点の構造因子の絶対値 $|F_{obs}(h)|$ が求まる。NM-REF による精密化以前に PROLSQ¹¹⁾ などの通常の等方的温度因子による精密化を行い、平均構造の初期値(1式の $\mathbf{r}_j$) と溶媒分子の等方的温度因子 B_j (NM-REF では溶媒分子を基準振動ではなく等方的温度因子で扱っている) が得られる。その平均構造 $\mathbf{r}_j$ を入力にして二面角系エネルギー計算プログラム FEDER¹³⁾ によって基準振動解析を行うことでモードの固有ベクトル(2式の ϕ_{jkm} すなわち第2図の矢印の形)と分散の初期値(2式の σ_{mn} すなわち第2図の A_m) が得られる。 E はエネルギー計算プログラム PRESTO¹⁴⁾ を用いて結晶場による分子間相互作用を考慮して計算される。3式の T の極小化は共役勾配法を用いて座標 $\mathbf{r}_j$ 、モード分散共分散 σ_{mn} 、溶媒の等方的温度因子 B_j (場合によって占有率 o_j を加える) を変数として行われる。

(a)

(b)

第4図 ヒトリゾチームの α 炭素の熱振動楕円体をORTEPによって表示した(90% probability scale)⁸⁾

(a) みかけ(内部運動+外部運動)のゆらぎ。(b) 内部運動によるゆらぎ。

第1表 ヒトリゾチームの精密化

X線結晶回折データ	
結晶形	$P2_1 2_1 2_1$ ($56.50 \times 60.89 \times 33.83 \text{ \AA}^3$)
分解能	5–1.8 $\text{\AA}$ (独立な反射 10179)
構造のモデル	
原子数	1029+115 (溶媒分子)
内部運動モード	100個の低振動モード—そのうち43個の最低振動モード間の相関を考慮する (自由度 1003)
外部運動モード	TLS モデル (自由度 20)
精密化の結果	
R 因子	15.2%
構造の標準値からのずれ	結合長 0.016 $\text{\AA}$ 結合角 2.1 deg

プログラムは高度にベクトル化されており(スカラ演算の約27倍の計算速度),スーパーコンピュータで高速に計算をすることが可能である。第1表の系で1回の関数値と微分値を計算するためのCPU timeは約15秒(FACOM VP2600)である。

5. ヒトリゾチームへの適用

ヒトリゾチーム結晶のX線回折データを基準振動動的因子法で第3図のフローチャートに従って精密化を行った(第1表)。モデルに含まれるパラメータの数は通常の等方的温度因子によるモデルとほぼ同じ数になるように選んである。結果をORTEPによって α 炭素を第4図に側鎖を含めた

第5図 ヒトリゾチームの α 炭素間のゆらぎの相関 $\langle \Delta r_i \cdot \Delta r_j \rangle$ 。xは強い正の相関をoは強い負の相関を表す。対応する構造上の位置を右上の図で示した。リゾチームは図の右側の第一ドメイン(1-39, 90-130残基)と左側の第二ドメイン(40-89残基)がクレフトを形成する構造を持っている。図中のゆらぎの相関 β γ δ がクレフトをはさむhinge-bending運動に対応している⁸⁾。

部分構造を第1図(b)に示す。これからわかることは、

- (1) 外部運動モードを含めた見かけのゆらぎ(第4図(a))の異方性は必ずしも大きくない(熱振動楕円体の軸比にして平均1.3)。そのため等方的温度因子による精密化の結果との座標値のずれはほとんどなかった(変位はほとんどの原子で0.1 Å以下であった)。
- (2) しかし、そこからタンパク質の本来のゆらぎを表現する内部運動モードを取り出すと(第4図(b))、その大きさは温度因子のスケールで半分以上(5.3/12.9)になり異方性は極めて大きくなる(軸比が平均1.8)。タンパク質のゆらぎは外部運動で認識される寄与によって覆いかくされており、内部運動モードを取り出してはじめて正しく認識することができることがわかる。

- (3) 部分構造の内部運動をみると(第1図(b)) Lys 69の側鎖が首振り運動をし、Pro 71の側鎖が主鎖原子と同じ方向にゆらいでいる局所的なゆらぎの様子がみられる。

基準振動を用いることのもう一つの利点は、ゆらぎがどのように相関しているかを精密化された基準振動の内挿として推定できることにある^{7, 15)}。第5図に α 炭素のゆらぎの相関を表す $\langle \Delta r_i \cdot \Delta r_j \rangle$ を示す。対角線に近い部分の相関は共有結合で近接している原子間の相関を表し、特にループA, Bが剛直体としてふるまっていることがわかる。二つのドメイン間(β , γ , δ)に負の相関が見られる。これはクレフト部分をはさみこむhinge-bending運動に対応している。さらにドメイン内の α , ϵ , ζ の部分にも負の相関が見られる。

6. おわりに

タンパク質のX線結晶構造解析から得られる動的構造は、その解析の困難さから必ずしも積極的に議論されてきたとは言い難い。上に述べた解析法がそれらの問題を解消し、タンパク質の機能に結びついた動的構造の議論がより多くなされるようになることを期待する。

この研究は京都大学理学部郷信広教授、蛋白質工学研究所松島正明氏、東京工業大学伊中浩治氏と共同で行われた。ここに深謝する。

文 献

- 1) W.A.Hendrickson: *Method Enzymol.* **115**, 252 (1985).
- 2) J.L.Sussman: *Method Enzymol.* **115**, 271 (1985).
- 3) A.Jack and M.Levitt: *Acta Cryst.* **A34**, 931 (1978).
- 4) J.A.McCammon and S.C.Harvey: *Dynamics of proteins and nucleic acids*, Cambridge University Press (1987).
- 5) C.L.Brooks, M.Karplus and B.M.Pettitt: *Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics*, John Wiley & Sons (1988).
- 6) A.Kidera and N.Go: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **87**, 3718 (1990).
- 7) A.Kidera and N.Go: *J.Mol.Biol.* **225**, in press (1992).
- 8) A.Kidera, K.Inaka, M.Matsushima and N.Go: *J.Mol.Biol.* **225**, in press (1992).
- 9) T.Nishikawa and N.Go: *Proteins* **2**, 308 (1987).
- 10) N.Go: *Biophys. Chem.* **35**, 105 (1990).
- 11) V.Schomaker and K.N.Trueblood: *Acta Cryst.* **B24**, 63 (1963).
- 12) P.K.Weiner and P.A.Kollman: *J. Comput. Chem.* **2**, 287 (1981).
- 13) H.Wako and N.Go: *J. Comput. Chem.* **8**, 625 (1987).
- 14) K.Morikami, T.Nakai, A.Kidera, M.Saito and H.Nakamura: *Computer & Chem.* in press (1992).
- 15) A.Kidera K.Inaka, M.Matsushima and N.Go: *Biopolymers*, **32**, 315 (1992).