高次構造とアロステリズム

木原 裕

Hiroshi Kihara, 自治医科大学物理教室

1. はじめに

タンパク質の場所的に異なった部位が互いに相互作用するアロステリズム (allosterism) という概念は、タンパク質のもつ巧妙な機能発現の方法として、認識されてきた。例えばヘモグロビンでは、酸素圧の少ない所では酸素を離しやすく、酸素圧の高い所では酸素を多く結合する現象がある。アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ (ATCase) では、基質濃度の増加とともに活性が協同的に増し、最終生成物である CTP が増えると酵素活性が抑制されることがよく知られている。このアロステリック効果と高次構造を結びつけたモデルとしては、Monod-Wyman-Changex (MWC) モデル¹⁾ と Koshland-Nemethy-Filmer (KNF) モデル²⁾ がよく知られている。前者は、高次構造に活性の異なる二つの状態 (T=tense; より活性の低い状態, R=relaxed; より活性の高い状態) を考え、T→R へのスイッチングが協同性発現の基礎であるとするものである。一方、後者はサブユニットの一部に起こる構造変化が引き金となり、隣の構造に変化を及ぼし、活性を変化させるというもので、シーケンシャル・モデルともいわれる。これらのモデルは、タンパク質の4次構造の違いとアロステリック機能とを結びつけた点で歴史的に大きな役割を果たしてきたが、現存のアロステリズムを説明する上には、モデルが簡単すぎることも指摘されている。

2. X 線結晶解析と静的描象

デオキシ状態およびオキシ状態ヘモグロビンのX線結晶解析の結果^{3),4)} より、ヘモグロビンにはサブユニットの相対位置の異なる二状態 (通常T型, R型とよばれる) が存在することが知られている。もう一つのアロステリックタンパク質として知られるアスパラギン

酸トランスカルバミラーゼ (ATCase) でも同様に活性型、不活性型の二状態が結晶として解析されている^{5),6)}。この事実は、MWC モデルに代表されるアロステリックタンパク質の二状態モデルを強く支持している。しかし、実験事実が詳細になるにつれて、MWC や KNF モデルのままでは説明しきれない現象が増えてきており、ヘモグロビンについての今井の MWC 三状態モデル³⁰⁾ を初め、モデルの修正・拡張が企てられている。いずれにしろX線結晶解析の与える描象は、静的平衡にある多くの状態 (conformational substate) の平均値であり⁷⁾、サブユニット間の距離のみでなく、TとR状態では、多くの側鎖の位置関係にも変化が見られている。なぜそれぞれの状態の活性状態が異なり、アロステリズムがどのように分子構造に立脚して説明されるのかは、解答を得られていない。

3. 分子動力学と FIM

Frauenfelder らによるミオグロビンのフラッシュフォトリシスの詳細な実験⁸⁾ およびそれに続く解析^{7),9),26)}、MacCamon-Karplus の分子動力学 (molecular dynamics)¹⁰⁾ は、タンパク質の機能と構造の描象を大きく変えた。分子動力学の結果より、タンパク質は大変フレキシブルで、ピコ秒オーダーのさまざまな運動をしている。また Frauenfelder らは、

木原 裕 自治医科大学物理教室 (329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1) 講師・理博昭和42年東大理学部物理学科卒、47年東大理系研究科物理学専門博士課程満期退学、47年より自治医大、専門は生物物理。

(a) の縦軸はギブスの自由エネルギー G
EF: equilibrium fluctuation CS: conformational
substate CC: conformation coordinate

図1 コンホメーションのサブステイトの階層構造¹⁾

横軸は反応座標系に相当する
図2 (1) 式を図で表わしたもの¹⁾

光照射後のミオグロビン (Mb) から CO が解離する挙動を調べ、FIM (functionally important motion) 1~4 と名付けた階層的ゆらぎ構造モデルを提唱した^{7),26)} (図1, 図2)。これらは例示されたタンパク質にとどまらず、一般的描象といえよう。タンパク質がこのような多層の動的構造からなるとすると、いったいあの静的二状態モデルは、これらの動的描象とどのようにマッチさせればよいのだろうか。

図3
自由エネルギーで表わした構造変化の進化

4. 空間的階層と時間的階層

タンパク質は高分子である。にもかかわらず機能について考えるときは、個々のアミノ酸の個性一時には特定部位の電子状態の変化まで無視することができない。空間的階層は存在するが極めて diffuse である。一方、時間的にはどうか。いみじくも Frauenfelder らの FIM モデルが示すように、それぞれの運動の区別は時間スケールで行なっている。すなわち、空間に比べて、時間的階層性はより明確に区別しやすい^{*1}。その折に時間的に変化するものは、エネルギーの流れであり、また空間的にはある広がりをもった集合体の構造である。

5. 構造変化と進化

1976 年 Albery と Knowles は、酵素は触媒効率を高めるように進化するという仮説 (完全酵素仮説) を提唱した^{11),28)}。すなわち酵素は、拡散律速の生体内基質結合速度と制御機能を担う構造変化速度とが同じ時間オーダーになるように進化してきたというものである。図3に不完全酵素と完全酵素の例を示す。彼らの仮説に従えば、生理的に重要な構造変化 (われわれはこれを Frauenfelder にならって PIM - physiologically important motion と名付ける^{*2} は、サブミリ秒からミリ秒のオーダーになる。PIM は FIM の一部である。

*1 少し本筋からはずれるが、ロドプシンの光受容過程を時間軸上へ展開して得られる時間的階層構造について、垣谷が大変美しいレビューを書いている²⁵⁾。参照されたい。

*2 Frauenfelder らは、FIM の全体を包含する言葉として proteinquake という語を用いているが、ここでの PIM とは定義が異なる⁷⁾。

6. PIM と分子動力学

分子動力学の教えるところによれば、タンパク質にはピコ秒領域に始まる多くの運動がある。では PIM もそれらの速い時間領域の運動の時間平均として求められるだろうか。答は今のところ否である。今のスーパー・コンピュータではたかだかナノ秒のオーダーまでしか計算できないこと、また量子力学的効果の無視など元来もっている方法論の限界が厳しいことなどのためである²⁴⁾。

郷はタンパク質の基準振動解析より、タンパク質中には遅い振動モードを記録しておくメモリーが存在しないことを示した¹²⁾。したがってミリ秒オーダーの現象は、タンパク質がたまたま確率的に非常に起こりにくい状態になって、反応そのものは速く起こるというわけである^{*3}。

$$k_{app} = k \cdot P$$

ここで k_{app} は見かけの速度定数、 k は素反応速度、 P は確率を表わす。

7. 高次構造の動的描象

以上述べてきたような動的描象に立って、高次構造とアロステリズムをどのように理解したらよいのだろうか。Richard & Noat は、オリゴマー酵素の速度定数 k_{app} が

$$k_{app} = k^* \cdot \Pi \alpha \cdot \Pi \sigma$$

で求められるとした¹³⁾。ここでは k^* は個々のサブユニットに内在して決められる速度定数、 α 、 σ はそれぞれ

$$\alpha = \exp[-(\alpha \Delta G^{int})/RT]$$

$$\sigma = \exp[-(\sigma \Delta G^{int})/RT]$$

で求められる。 α はサブユニットが会合することにより生じる速度定数の変化項を表わす。活性部位の構造変化に伴う 4 次構造への影響は含まない。 σ は活性部位のひずみが高次構造の変化に寄与する項を表わす。一般に k^* は k_{app} より大きい。したがって高次構造を形成することにより、反応の進行は遅くなる。その代償として、系は高次構造のコントロールにより反応を制御する鍵を手に入れるのである。アロステリック効果とは PIM である。われわれが高次構造変化によるアロステリズムに興味を抱くのは、それがタンパク質の機能獲得法として高度かつ功妙な方法であり、さまざまな生物らしさの表現実態であるからである。

では、 α 、 σ で表わされる高次構造変化の実態は何であろうか。Cooper & Dryden は、サブユニット間

の情報伝達は平均的分子間距離の変化（通常の意味での構造変化）によってのみでなく、動的な振動の振動数や振幅の変化という形によっても起こりうることを示唆した¹⁴⁾。

アロステリズムは、非常に広い概念である。われわれはやはり現実の分子で何が起きているかについて、もう少し知る必要がある。

8. ヘモグロビン

前述したように、デオキシ型、オキシ型のヘモグロビンの結晶構造は解かれており、サブユニット間距離を含む構造変化が検知されている。Perutz は、結晶解析像に基づいて T→R 転移を平均的分子構造の変化として記述した^{15), 29)}。しかし静的モデルは局在部位と全体構造がどのように関係づけられるかについては語らない。Friedman は主に RAMAN の知見を基に、ヘモグロビンの酸素結合により誘起される構造変化の動的描象を提出した¹⁶⁾。彼によれば、マイクロ秒領域で起こる 4 次構造変化¹⁷⁾ に先立って、ナノ秒領域で現われる 3 次構造変化がある。

9. アスパラギン酸トランス

カルバミラーゼ (AT Case)

ATCase には、サブユニット間の配置状態の異なる二状態 (T, R 状態) が存在する。両者はすでに X 線結晶解析もなされている。もしタンパク質の結晶中での反応が時間分解の X 線回折パターンの変化として追跡できるなら、反応途中の構造変化を検知できるに違いない。このような試みはすでに、リゾチーム、リボヌクレアーゼなどでなされている（ただし低温にして反応を遅らせることによって¹⁸⁾）。しかし、この魅力的な方法はアロステリックタンパク質には使えない。4 次構造の変化に伴い結晶が壊れてしまうからである¹⁹⁾。Moody らは、ATCase の T 型、R 型の X 線溶液散乱パターンが大きく変化することを見出した²⁰⁾。Herve らは、このパターン変化を利用して基質アナログやエフェクターによる T, R スwitching の様子を調べ、4 次構造は、X 線溶液散乱法で見限り、T, R の 2 種のみであること、しかし、エフェクターと基質アナログでは構造変化への寄与の仕方が異なり、MWC モデルでは説明できない現象があることを指摘した²¹⁾。われわれはさらに基質アナログを用い、ストップフロー X 線散乱法により、4 次構造変化の時間的経過を測定することに成功した²²⁾ (図 4)。一方、生体内基質との反応については、ケミカル・クエンチ法により、不活性型から活性型へのスイッチ（おそらくは T→R 転移）が、約 10 ms であることが

^{*3} Parak & Knapp は、反応は遷移状態のエントロピー駆動型であると述べている^{24), 27)}。

基質アナログとしてアセチルリン酸とアスパラギン酸を用いた。30% エチレングリコール中

図4 ATCaseのX線散乱強度の時間変化¹⁴⁾

報告されている²³⁾。

10. 高次構造変化とアロステリズム

タンパク質には時間的に階層をなす種々の FIM がある。中でもおそらく最も遅い FIM は、拡散律速基質結合速度と同じ時間オーダーの PIM となる。高次構造を有するタンパク質では、PIM をサブユニット間の再配位 (4 次構造変化) が担う。これがアロステリック効果である。4 次構造変化が PIM として利用されているのは、おそらくは進化の過程で獲得しやすい形質であること、わずかの環境の変化でポテンシャルを制御しやすいことにあろう。PIM を理解し、機能を演繹するのは容易なことではないが、いくつかの重要な鍵はわかってきた。(1) 平衡的描象で見ると、高次構造には二状態 (あるいはたかだか数個) のみ存在する。(2) PIM は時間的にサブミリ秒〜ミリ秒の時間領域にある。

このような問題を解くには、おそらく Langevin 方程式が有効であろう：

$$M\ddot{x} + \beta\dot{x} + fx = T(t)$$

ここで M は有効質量、 $\beta\dot{x}$ は粘性項を表わす。 $T(t)$ は分子運動を表わす項だが、長い時間領域にわたるときは平均化してよい。タンパク質内には多くの自由度が存在するが、このような平均化の過程で、ごく少数のパラメータのみで系を記述できよう。

11. おわりに

本特集では、私に、「希望する機能をもったアロステリックタンパク質を分子設計することへの展望」を期待されたことを思う。鍵-鍵穴モデルで説明できるような酵素反応であれば、機能を予測することはある範囲で可能であろう。アロステリックタンパク質の場

合は……。絶望的に難しいといわざるを得ない。しかしその解析の過程でおそらくわれわれは進化の歩みの中で獲得された造化の妙を一つ一つ嘆賞することができるに違いない。

文 献

- 1) J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux : *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965)
- 2) D.E. Koshland, G. Nemethy, D. Filmer : *Biochemistry*, **5**, 365 (1966)
- 3) M.F. Perutz : *Brit. Med. Bull.*, **32**, 195 (1976)
- 4) M.F. Perutz : *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 327 (1979)
- 5) H.L. Monaco, J.C. Crawford, W.N. Lipscomb : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5276 (1978)
- 6) E.R. Kantrowitz, S.C. Pastra-Landis, W.N. Lipscomb : *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 150 (1980)
- 7) A. Ansari, J. Berendzen, S.F. Bowne, H. Frauenfelder, I.E.T. Iben, T.B. Sanke, E. Shyamsunder, R.D. Young : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5000 (1985)
- 8) R.H. Austin, K.W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, I.C. Gunsalus : *Biochemistry*, **14**, 5355 (1975)
- 9) H. Frauenfelder, P.G. Wolynes : *Science*, **229**, 337 (1985)
- 10) J.A. McCammon, M. Karplus : *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **31**, 29 (1980)
- 11) W.J. Albery, J.R. Knowles : *Biochemistry*, **15**, 5631 (1976)
- 12) 郷 信広：蛋白質核酸酵素 (別冊), **28**, 14 (1985)
- 13) J. Richard, G. Noat : *J. Theor. Biol.*, **111**, 737 (1984)
- 14) A. Cooper, D.T.F. Dryden : *Eur. Biophys. J.*, **11**, 103 (1984)
- 15) M.F. Perutz : *Nature (London)*, **228**, 726 (1970)
- 16) J.M. Friedman : *Science*, **228**, 1273 (1985)
- 17) C. Sawicki, Q.H. Gibson : *J. Biol. Chem.*, **251**, 1533 (1976)
- 18) P. Douzou, G.A. Petsko : *Adv. Prot. Chem.*, **36**, 245 (1984)
- 19) A.L. Fink, G.A. Petsko : *Adv. Enzymol.*, **52**, 177 (1981)
- 20) M. Moody, P. Vachette, A.M. Foote : *J. Mol. Biol.*, **133**, 517 (1979)
- 21) G. Herve, M.F. Moody, P. Tauc, P. Vachette, P.T. Jones : *J. Mol. Biol.*, **185**, 189 (1985)
- 22) H. Kihara, Y. Honda, Y. Amemiya, P. Tauc, G. Herve, M.F. Moody, P. Vachette : *Photon Factory Activity Report 1984*, **85**, 3, 243 (1986)
- 23) H. Kihara, T.E. Barman, P.T. Jones, M.F. Moody : *J. Mol. Biol.*, **176**, 523 (1984)
- 24) F. Parak, E.W. Knapp : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7088 (1984)
- 25) 垣谷俊昭：蛋白質核酸酵素 (別冊), **28**, 46 (1985)
- 26) 藤原敏道：蛋白質核酸酵素 (別冊), **28**, 139 (1985)
- 27) 永山国昭：蛋白質核酸酵素 (別冊), **28**, 114 (1985)
- 28) 木原 裕：蛋白質核酸酵素 (別冊), **28**, 37 (1985)
- 29) M.F. Perutz : *Proc. Roy. Soc. London Ser.*, **B208**, 135 (1980)
- 30) A.P. Minton, K. Imai : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1418 (1974)