

タンパク質フォールディングの物理化学 - ファネルとフォールディング経路 -

神戸大学理学部化学科 高田彰二

Study of fast-folding small proteins has recently been making great progress. Experimentally, the folding transition state has been characterized by using protein engineering approach. From the theoretical side, folding pathway can be successfully described by recently developed approaches of computer simulations and statistical mechanics. Combination of theoretical studies with experiments will lead us complete understanding of protein folding in near future.

fast folding / folding nucleus / landscape theory / statistical mechanics

1. はじめに

タンパク質フォールディングの研究は近年、大きな盛り上がりを見せている¹⁾。理由の1つは、ゲノムプロジェクトにより、遺伝情報の獲得スピードが急加速したことである。アミノ酸配列既知のタンパク質数に対する立体構造既知のタンパク質数の比率は年々減少し、実用的見地から、立体構造予測に対する期待は膨らんでいる。実際問題としても立体構造予測問題に手がかりが見つかり、従来のあきらめムードが楽観ムードに変わってきた²⁾³⁾。他の要因としては、周辺分野への広がりが増える。狂牛病やアルツハイマー病などのいわゆるコンフォメーション疾患は、間違ったフォールディングが引き金になることが指摘されている。また、塩基配列識別などのタンパク質の高次機能は、鍵と鍵穴のような硬い結合ではなく、部分的なフォールディングによって実現されていることが明らかになってきた⁴⁾。これらは、フォールディング問題がタンパク質のタンパク質らしさと密接に関連していることを暗示しているように思われる。もう1つの大きな波は、基礎研究の進展である。比較的小さなタンパク質でシンプルなフォールディング機構をもつものについて、タンパク質工学や高速分光法による実験と、統計力学や計算機シミュレーションが利用されて、詳細で徹底的な研究が可能になった^{1),4),5)}。

本稿の目的は、この基礎的側面、すなわちフォールデ

ィング機構の物理化学的研究の最近の発展を解説することである。従来の考え方では、端的に言ってフォールディング反応は、変性状態 (D) から天然状態 (N) へ向けて、いくつかの中間状態 (I) を経て、



のように起こると捉えられてきた (詳細は文献6に譲る)。実際、アミノ酸100残基以上のタンパク質にはかなり普遍的に共通の特徴をもつ中間体 (モルテングロビュール状態) が見出され、フォールディング機構への理解を深めた⁷⁾。一方で明らかになってきたことは、「フォールディング機構は1つではない」といういささか歯切れの悪い結論である。タンパク質ごとに、また実験条件によって、フォールディングの (1) 式は見かけ上さまざまに変化する。そういう状況を統括的に理解するには、(1) 式のように考えるよりもまったく別の見方をしたほうが良いという提案が Wolynes らによってなされ、フォールディングの捉え方に大きな影響を及ぼした⁸⁾。これが、今日ではファネル理論とかランドスケープ理論とか呼ばれるものである。(1) 式のような見方は old view、ファネル的な見方は new view と呼ばれることがあるが、両者は矛盾するものではなく、違う観点 (view) を強調していると考えたほうが適切である。

以下、ファネル理論を概説したあと、より具体的に詳細なフォールディング機構の話に進む。その際、上に述

Physical Chemistry of Protein Folding - Funnels and Pathways -

Shoji TAKADA

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University

べたようにフォールディング機構は多種多様なので、“戦略的”に対象とするタンパク質を厳選することが必要と思われる。物理化学的に問題を追いつめるために我々は、1) 比較的短いタンパク質で、2) 速くフォールディングし、3) 天然構造でS-S結合やcis形のPROをもたないものに集中することにする。この(一番シンプル)クラスのフォールディングを詳細に理解することなしには、より複雑な現象を本当に理解することはできないと考えるからである。

2. ファネル理論とランドスケープ理論

本節ではファネル理論を説明するが、そのための準備から始める。まず、タンパク質と溶媒の水を含む系のHamiltonianを $H(r, x)$ とする。ここで、 r はタンパク質の原子座標、 x は水の原子座標をそれぞれまとめて表している。系の自由エネルギーは

$$F = -k_B T \ln Z = -k_B T \int dr \int dx e^{-\beta H(r, x)} \quad (2)$$

となる。ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は温度、 $\beta = 1/(k_B T)$ 、 Z は分配関数である。通常、自由エネルギーは内部エネルギーとエントロピーに分けられるが、ここでは少し異なる分け方をする。すなわち、水の運動の緩和は1nsより短いに対して、フォールディングに関係するタンパク質の運動は1nsより十分遅いので、まず水の座標についてだけ熱平均をとる。すなわち、

$$H_{\text{eff}}(r) = -k_B T \int dx e^{-\beta H(r, x)} \quad (3)$$

は水の中を動くタンパク質(r)の有効Hamiltonian(エネルギー)である。物理的にはこれで疎水性相互作用を取り込んだことになる。以下では、 $H_{\text{eff}}(r)$ をHamiltonianとみなす。これを使って(2)式同様に r について積分すれば真の自由エネルギーが得られる。ここでは、有効エネルギーを反応座標として自由エネルギー曲線を計算する。

$$F(E_{\text{eff}}) = -k_B T \ln \int dr \Delta(E_{\text{eff}} - H_{\text{eff}}(r)) e^{-\beta H_{\text{eff}}(r)} \quad (4)$$

ここで、 $\Delta(\cdot)$ は、 $H_{\text{eff}}(r)$ が $E_{\text{eff}} \pm \delta$ の範囲にあるときのみ1で他はゼロになる関数である(δ は小さいと仮定)。簡単な変形によって、

$$F(E_{\text{eff}}) = E_{\text{eff}} - T \left[k_B \ln \int dr \Delta(E_{\text{eff}} - H_{\text{eff}}(r)) \right] \quad (5)$$

$$= E_{\text{eff}} - TS_{\text{chain}}(E_{\text{eff}}) \quad (6)$$

2行目では、とりうるコンフォメーション数の対数として鎖エントロピー $S_{\text{chain}}(E_{\text{eff}})$ を定義している。これで準備が整った。

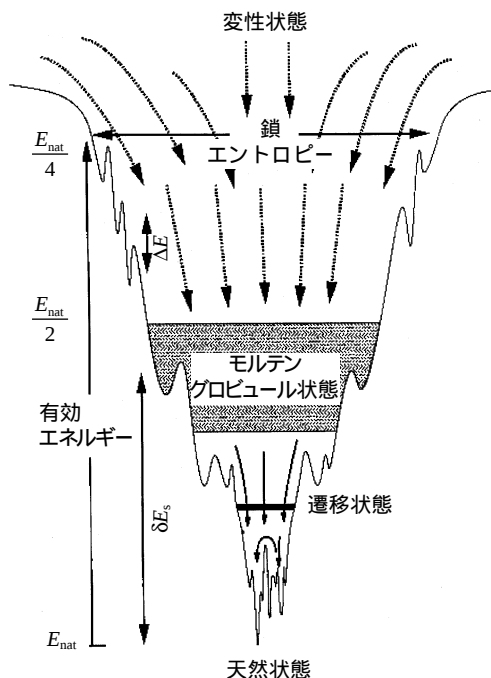


図1 フォールディングファネルの模式図

縦軸はタンパク質の有効エネルギー、横軸は構造空間を表している。構造空間の幅の対数はエントロピーに対応する。フォールディングは図上部の変性状態から、モルテングロビュール状態、遷移状態を経て天然状態へ至る無数のルートで進む。 ΔE はエネルギー面でのこぼこさを、また、 δE_s は天然構造の相対的安定性を、それぞれ表している。また、 E_{nat} 、 $E_{\text{nat}}/2$ 、 $E_{\text{nat}}/4$ は変性状態を基準にした縦軸の目盛である。

ファネル理論の考え方は、約20年前に郷によって提唱された consistency principle に基づいている⁹⁾。それは、「タンパク質は、進化の所産として、ほとんどのすべての相互作用が天然構造で安定になるようにできている」という洞察である。天然構造で E_{eff} が最小値をとり、コンフォメーションがそこから離れるほど E_{eff} が大きくなる。これをマンガ的に描けば、図1のようになる。図の横軸は、タンパク質のコンフォメーションをあらわす r で、本来超多次元であるがここでは簡単に1次元で描いてある。縦軸は E_{eff} である。変性状態は上方の E_{eff} の大きなあたりに対応し、コンフォメーションとしては広い。一方天然状態は底、 E_{eff} が最小値のところである。全体としてエネルギー面はファネル(漏斗)状の形をとり、フォールディングは、図の上方から底への遷移と捉えることができる。さて、ある E_{eff} のところでのファネルの横幅は、コンフォメーション空間の広さを表し、上に準備したように、その対数は鎖エントロピーである。

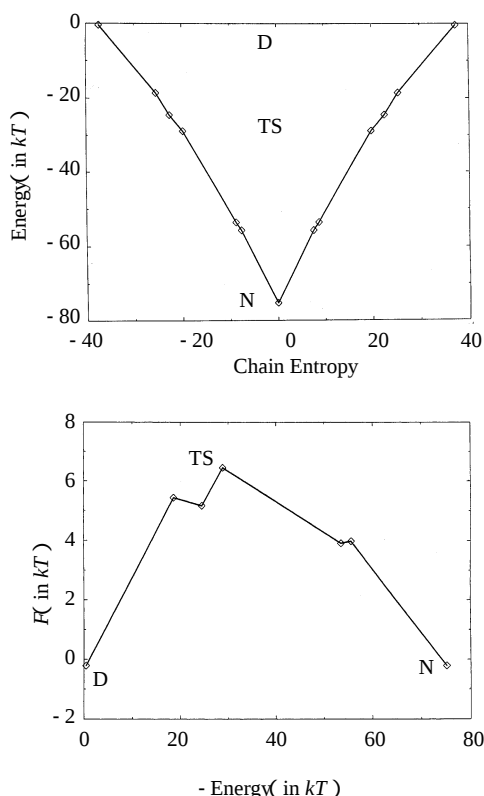


図2 フォールディングファネル(上)と自由エネルギープロファイル(下)

これらはそれぞれnew viewとold viewの代表的描像であり、両者は、 $F = E - TS$ で関係付けられる(本文参照)。図のD, TS, Nはそれぞれ、変性状態、遷移状態、天然状態を表す。四角形のマークは遷移状態または中間体を表している。図は、 λ_{6-85} に対する計算をもとにして描かれている。

このように、ファネル理論は、「フォールディング転移は E_{eff} の大きな減少(安定化)と、 S_{chain} の大きな減少(不安定化)によって特徴づけられる」ということを強調する。変性温度 T_F では、 $\Delta F = \Delta E_{\text{eff}} - T_F \Delta S_{\text{chain}} = 0$ となり、エネルギーの安定化とエントロピーの不安定化がちょうどキャンセルする。ここで、 E_{eff} (または S_{chain})が反応座標の役割をしていることがわかる。

天然構造は、ある程度のゆらぎを含めた意味で、1つの構造であるから $S_{\text{chain}}(N) \sim 0$ 、と考えてよい。ファネルを上へのぼると、 $S_{\text{chain}}(E_{\text{eff}}) > 0$ となるから、本質的に多数のコンフォーメーションの集団ということになる。重要な帰結として、フォールディング経路は、ある特定のタンパク質構造を経て起こるというようなものでは決してありえない。フォールディング経路は、統計的な分布の変移経路としてのみ意味をもつ。

もう少し定量的に見ることにしよう。図2(上)は、同様のファネルを具体的なタンパク質(λ -リプレッサー)の変性温度における計算結果(4節参照)を使って描いたものである。 $S_{\text{chain}}(E_{\text{eff}})$ を計算し、それを横軸にエントロピー、縦軸にエネルギーをとってプロットすると漏斗の片側だけきりとしたものができる。それを、図1に似せるために図形を左右対称になるように変形したのが、図2(上)である。同じ $S_{\text{chain}}(E_{\text{eff}})$ を使って、自由エネルギー $F(E_{\text{eff}}) = E_{\text{eff}} - TS_{\text{chain}}$ をプロットしたのが、図2(下)である。これはよく見慣れた(old view的な)プロットであり、反応座標(E_{eff})を横軸にとり、変性状態と天然状態の両極小点が、自由エネルギー障壁によって隔てられている。最も単純には、old viewとnew viewは $F = E - TS$ でつながっている。自由エネルギー障壁が現れた原因を考えると、図2(上)でファネルがわずかに曲線を描いていることに行き着く。すなわち、変性状態からエネルギーとエントロピーが減少する際、エントロピーの方がやや先に減少していることによっている。その差が最大になったところが、自由エネルギーでみると遷移状態をつくる。

以上がファネル理論の概要である。ランドスケープ理論と言うときには、これにさらに自由エネルギー面でのこぼさを考慮に入れる。これは、低温におけるタンパク質のガラスらしさを論じる際には重要になってくる⁸⁾。

3. フォールディング自由エネルギー曲面とフォールディング経路

より具体的な、フォールディング機構の研究に移る。小さなタンパク質のフォールディングでは、中間体が存在しないことも多い。そのような場合、反応の途中を実験的に観測するのは容易ではない。Fershtらは、部位特異的アミノ酸変異を利用するタンパク質工学の技術を駆使して、速度論的な方法によって、遷移状態の構造的特徴を個々のアミノ酸レベルの分解能で調べる方法を開発した⁴⁾(詳細は高橋氏の解説⁵⁾を参照のこと)。

さて、このように詳細なフォールディング機構に対して、ファネル理論は助けになるだろうか。2節で紹介した見方はフォールディング機構を統括的に整理するのに都合がよいが、それだけでは、どの α -ヘリックスあるいは β -ストランドが最初にできるかとか、どの部位を形作るのがネックになっているか、などのように局所的な構造レベルでフォールディングを理解するには役立たない。これは反応座標の E_{eff} がグローバルな変数だからである。

局所的な変数を反応座標にとって、自由エネルギー

曲面を計算する試みは現在進展中である¹⁰⁾。以下、やや詳しくその理論について紹介する。2節で強調したように、フォールディング反応はエネルギー減とエントロピー減の相殺によって起こる。エネルギーの計算は比較的容易なので、鍵となるのは、「反応途中における鎖エントロピーの減少量をいかに的確に計算できるか」である。

タンパク質中の各アミノ酸、 i , を C_α に位置するビーズ r_i で表現し、それらがバネでつながって鎖になっている模型を考える。これは、高分子物理で標準的に使われている模型である。ビーズ間に、疎水性相互作用や静電相互作用からくる有効相互作用が働く。これを Hamiltonian で書くと、

$$H = H_{\text{chain}} + H_{\text{int}} \quad (7)$$

$$= k_B T \frac{1}{2} \sum_i r_i \Gamma_{ij} r_j + \sum_{\text{Nat-pair}} \varepsilon_{ij} u(r_{ij}) \quad (8)$$

となる。ここで、 H_{chain} が鎖のつながりを表す部分で、 C_α 間の平均距離を 3.8 Å に、3つの連続した C_α のつくる平均（仮想的）結合角を $\sim 140^\circ$ にするように行列 Γ が設定されている。 H_{int} は、アミノ酸間の（非局所）相互作用を表している。 ε_{ij} は、（宮沢-Jernigan によって提案された¹¹⁾）アミノ酸 i, j 間の有効接触エネルギーで、物理的には疎水性相互作用や静電相互作用などをひくくめて表そうとしている。 $u(r)$ は、相互作用の距離依存性で、レナード-ジョーンズポテンシャル様の形をしている。 $\Sigma_{\text{Nat-pair}}$ は、天然構造で C_β 間距離が、6.5 Å 以内に接触しているペアのみに相互作用が働くことを意味する。これは、郷による consistency principle の具現化であり、天然構造に寄与しない相互作用には安定化と不安定化の両方があり、平均すると相殺されてゼロに近くなるので、これを無視しようというのである。以下この Hamiltonian を使って自由エネルギーを計算する。

上の Hamiltonian はかなり簡単に見えるが、それでも厳密に自由エネルギーを計算することはできない。そこで変分法のアイデアを使って近似計算する。まず、上の Hamiltonian と似ているが、厳密に自由エネルギーを計算可能な参照 Hamiltonian, $H_{\text{ref}}(\{C_i\}) = H_{\text{chain}} + \sum_i C_i (r_i - r_i^{\text{nat}})^2$ を導入する。ここで r_i^{nat} は、天然構造を表す。 $\{C_i\}$ はフリーパラメータであり、この参照 Hamiltonian が真の Hamiltonian に最も近くなるように最適化される。参照 Hamiltonian を使って、近似自由エネルギーは $F_{\text{approx}} = F_{\text{ref}} + \langle H - H_{\text{ref}} \rangle$ で求められる。ここで、 F_{ref} は参照 Hamiltonian の自由エネルギー、 $\langle \dots \rangle$ は参照 Hamiltonian による平均値をそれぞれ表す。これで、自由エネルギーの計算ができる。

我々は局所的な反応座標を導入し、その上で自由エネルギー曲面を計算する必要がある。ここでは、各アミノ酸の揺らぎの大きさ（いわゆる B 因子と等価）、 $B_i = \langle (r_i - \langle r_i \rangle)^2 \rangle$ を反応座標にして、自由エネルギー、 $F_{\text{approx}} = \langle \{B_i\} \rangle$ を計算する。たとえば、 λ -リプレッサーの N 末端ドメイン、 $\lambda_6 - 85$ は 80 残基あるので、80 次元の超曲面を計算することになる。

この自由エネルギー超曲面上で変性状態と天然状態はそれぞれ、すべての B 因子が大きい領域と、すべての B 因子が小さい領域とに見つかる自由エネルギー極小点に対応する。注意すべき点は、変性状態は超曲面の上では 1 点に対応するが、その 1 点は各アミノ酸の揺らぎの大きさと規定されたコンフォメーション集団（アンサンブル）をあらわしていることである。次に、両状態の中間に位置する遷移状態を探索する。遷移状態は、自由エネルギー面上で、1 次微分がすべてゼロで、2 次微分行列の固有値がただ 1 つだけ負で他は正の点（鞍点）である。一般に遷移状態は多数見つかる。各遷移状態から、溝に沿って自由エネルギー面を下っていくと極小点（変性状態、天然状態あるいは中間体）に至る。このようにして、遷移状態を経由して（時にはさらに中間体も経由して）変性状態と天然状態の間を結ぶフォールディング経路が見つかる。やはり経路といってもここでは、コンフォメーション集団としての統計的経路を意味している。

それでは、 $\lambda_6 - 85$ を例にとり、統計的フォールディング経路の様子を見てみよう。 $\lambda_6 - 85$ は、5本のヘリックスからなるタンパク質ドメインで、フォールディングは非常に速く、2 状態転移で起こることが実験的にわかっている。図 3a は、80 次元で探索された経路を 1 次元（ $\sim E_{\text{eff}}$ ）に射影した自由エネルギープロフィールである。変性状態（左端）から 4 つの遷移状態と 3 つの中間体を交互に通って天然状態（右端）へつながっている。それでは、各遷移状態はどのようなものか。図 3b に、フォールディング経路に沿って各アミノ酸の揺らぎがどのように減少していくかを示した。一番上の曲線は変性状態の大きな揺らぎ、一番下の曲線は天然状態の小さな揺らぎを表す。TS1, TS2, TS3, TS4 と書かれた曲線は、それぞれ遷移状態における B 因子である。最初の遷移状態 1 で、ヘリックス 4 と 5 の部分の揺らぎが急激に減少し、すでに天然様の構造を作っていることがわかる。またヘリックス 1 の中央部分もやや揺らぎが小さくなっている。次の遷移状態 2, 3 で、ヘリックス 1 は概ね形作られる。最後に、ヘリックス 2, 3 の部分が完成して天然状態に至る。3 次元的に見ると、ヘリックス 1 はヘリックス 4, 5 と接触しており、空間的には端から順次構

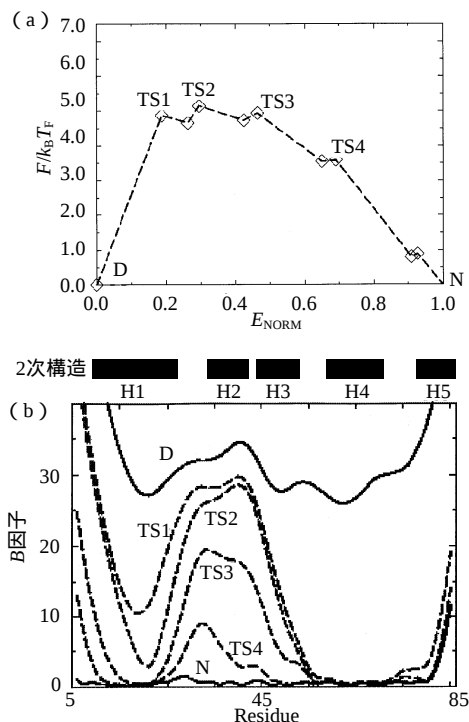


図3 λ_{6-85} のフォールディング経路

a) 反応座標, $E_{\text{NORM}} = (\langle H \rangle - E_D) / (E_N - E_D)$ に沿った自由エネルギー曲線. b) 変性状態 (D), 天然状態 (N) および4つの遷移状態 (TS1-TS4) における各アミノ酸の揺らぎの大きさ (B 因子). 図上部の黒い棒は5つのヘリックスの位置 (H1-H5) を表している.

造が成長している. このように理論的に計算された遷移状態の構造 (Φ 値) が, 実験と定量的によく一致することが示された.

興味深いことに, フォールディング経路は (10) 式の有効接触エネルギーにあまり依存しないことがわかった. すなわち, アミノ酸のタイプによらず native-pair すべてに, $\epsilon_{ij} = 1$, としても大雑把な経路は変わらなかった. これは, フォールディング経路を決める情報が概ね天然の立体構造に織り込まれていて, アミノ酸個々の情報にそれほど依存しないことを暗示している. 与えられた立体構造を作るプロセスの中で鎖エントロピーをいかにゆっくりと減らしていくかによって, フォールディングの道筋がある程度決まっているからだ, と推測できる.

4. 今後の課題

実験, 理論の両面から, いくつかのタンパク質についてフォールディング反応核 (遷移状態) の様子が見え

てきた. 残念ながら現時点ではまだ研究例が少なく, 一般論を導き出すにはやや時期尚早のようであるが, あえて総括的な議論を試みる. Fersht は, 反応核のパターンを 1) 逐次フォールディング型 (λ_{6-85} はこれに属する) と 2) 協奏的フォールディング型 (有名なキモトリプシンインヒビター-2 はこれに属する) に分類した⁴⁾. 多分これは量的な問題で, 協奏的な領域のサイズがタンパク質によって異なるのであろう. このサイズは, おそらく天然構造のトポロジー (α, β , あるいは, α/β 混合) と深い関係があるに違いない. 理論家への宿題である.

今後, 実験家と理論家の協力によって, 小さいタンパク質の速いフォールディング問題は解決に近づいていくものと期待される. 実験的には, 高速分光法の利用と1分子計測による各トラジェクトリの直接観測が重要になるであろう. 理論サイドでは, よいモデルの構築法の確立とミリ秒までのシミュレーションが鍵になるように思われる. また, そこで得られる概念的枠組みは, 細胞内でのフォールディング, 膜タンパクのフォールディング, フォールディングによる分子認識, 人工タンパク質の設計, および, α/β 転移の物理化学とコンフォーメーション疾患の分子機構など, 周辺問題への広がりを増していくであろう.

最後に, 共同研究者の Peter Wolynes および John Portman, および原稿に貴重な意見を頂いた田村厚夫氏に感謝します.

文 献

- 1) 最近のタンパク質フォールディング研究に関するレビュー集; *Current Opinion in Struct. Biol.* 7, 1 (1997); *ibid* 8, 65 (1998).
- 2) 大田元規 (1998) 生物物理 38, 111.
- 3) 岡本祐幸 (1998) 生物物理 38, 203.
- 4) Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman.
- 5) 高橋聡 (1999) 生物物理 39, 70.
- 6) 後藤祐児 (1994) 蛋白質 - この絶妙な設計物 (赤坂 編), 54-78, 吉岡書店.
- 7) Kuwajima, K. (1989) *Proteins* 6, 87.
- 8) Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D. and Wolynes, P. G. (1995) *Proteins* 21, 167; 笹井理生 (1997) 日本物理学会誌 52, 901.
- 9) Gō, N. (1983) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 12, 183.
- 10) Portman, J. J., Takada, S. and Wolynes, P. G. (1998) *Phys. Rev. Lett.* 81, 5237.
- 11) 宮沢三造 (1997) 日本物理学会誌 52, 312.